

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE INGENIERÍA**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“Corrosión inducida por microorganismos en superficies de cobre de dispositivos intrauterinos T Cu 380 A y Nova T en medio sintético”**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de:  
**Doctor en Ciencias**

Presenta:  
**Mónica Carrillo Beltrán**

Director:  
**Dr. Benjamín Valdez Salas**

Codirectora:  
**Dra. Lucien Veleva Muleshkova**

**Mexicali, B. C.**

**Junio de 2005**

# *Agradecimientos*

*A Dios, por permitirme culminar con éxito este proyecto y así escalar un peldaño más.*

*A mis padres: Armando y Delfina, por enseñarme con el ejemplo que hay que luchar para alcanzar nuestras metas, y que en ocasiones hay que hacer sacrificios, que son los que nos permiten valorar nuestros logros.*

*A mis hermanas: Adelaida, Erika y Sandra, por su apoyo incondicional y por preocuparse y cuidar de mi pequeño cuando, por motivos de trabajo, tuve que ausentarme de casa.*

*A mis dos hombres y grandes amores: Javier y Javier Andrés.*

*Javier, Sé que en más de una ocasión mi trabajo me absorbió demasiado y tuve que sacrificar de nuestro tiempo. Mil gracias por tu comprensión, paciencia y apoyo durante mis esfuerzos, sacrificios y desvelos, ya que sin ello no habría podido lograrlo.*

*Javier Andrés, mi niño precioso, tú eres el motor que me impulsa a seguir adelante, la energía que me ayuda a levantarme para iniciar con ánimo cada día y mi motivo para continuar superándome.*

*A mi director de tesis, compañero de trabajo y mi mejor amigo Benjamín, por confiar en mi al asignarme este proyecto, por brindarme tu apoyo, orientación y consejo en todo momento (profesional y personal), y por darme la oportunidad de iniciar en el fascinante campo de la investigación.*

*A los integrantes del Comité Revisor de tesis: Lucien, Tezozomoc, Lydia y M. Schorr, por aceptar la invitación y por todas sus valiosas sugerencias y aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.*

*A mi Alma Mater, la Universidad Autónoma de Baja California por todo el apoyo proporcionado, brindándome la oportunidad de finalizar este posgrado.*

*Al Instituto de Ingeniería por ofrecerme un espacio para la aplicación del conocimiento adquirido, obteniendo así la consolidación profesional.*

*A Lidia Vargas, por su valioso e incondicional soporte en la parte experimental.*

*A cada uno de mis compañeros y amigos del Laboratorio de Corrosión y Materiales: Benjamín, Navor, Miguel, Juan, que en todo momento me dieron ánimos y a quienes considero, además de un excelente equipo de trabajo, una familia.*

# Índice

	<b>Página</b>
Agradecimientos .....	ii
Índice .....	iv
Listado de tablas .....	vii
Listado de figuras .....	x
Resumen .....	2
1. Introducción .....	6
2. Fundamentos teóricos .....	9
2.1 Corrosión electroquímica .....	10
2.1.1 Definición y técnicas de análisis.....	10
2.1.2 Tipos de corrosión .....	12
2.1.3 Técnicas de análisis .....	14
2.2 Corrosión microbiológicamente inducida (CMI) .....	19
2.2.1 Interacción Microorganismo-Superficie metálica ....	21
2.2.2 Desarrollo de la biopelícula.....	22
2.2.3 Estructura de la biopelícula .....	26
2.2.4 Mecanismos de la CMI .....	26
2.3 Dispositivo intrauterino (DIU) para Contracepción .....	31
2.3.1 Antecedentes .....	31
2.3.2 Estructura y componentes de los DIUs de cobre .....	33
2.3.3 Mecanismo de acción .....	33
2.3.4 Prevalencia de uso .....	34
2.3.5 Efectos secundarios y complicaciones .....	34
2.4 Útero (medio uterino) .....	37
2.4.1 Interacción DIU-útero .....	37
2.4.2 Colonización bacteriana del tracto urogenital .....	38
2.5 Cobre .....	41
2.5.1 Propiedades físicas y químicas .....	41
2.5.2 Corrosión del cobre .....	44

2.5.3	Corrosión microbiológica en cobre .....	45
2.5.4	Cobre en sistemas biológicos .....	46
	• Cobre en tejidos sangre y otros fluidos .....	46
	• Cinética y metabolismo del cobre .....	48
	• Funciones biológicas del cobre .....	49
	• Bases bioquímicas de la toxicidad del cobre .....	51
3	Metodología Experimental .....	53
3.1	Obtención de <i>Enterobacter sp.</i> .....	54
3.1.1	Aislamiento del microorganismo .....	54
3.1.2	Identificación bioquímica .....	55
3.2	Desarrollo de la biopelícula por <i>Enterobacter sp.</i> .....	57
3.3	Especímenes de prueba .....	58
3.4	Ensayos electroquímicos .....	58
3.4.1	Preparación de los electrodos .....	58
3.4.2	Preparación del medio uterino simulado (solución electrolítica).....	60
3.4.3	Preparación de la celda electroquímica .....	60
3.4.4	Espectroscopía de impedancia electroquímica .....	61
3.4.5	Voltametría cíclica .....	62
3.4.6	Polarización electroquímica .....	62
3.5	Análisis de superficie .....	62
3.5.1	Microscopía óptica .....	63
3.5.2	Microscopía de barrido electrónico (SEM) .....	63
3.5.3	Preparación de las placas para su observación en SEM .....	63
3.5.4	Análisis de Rayos-X de electrones dispersados (EDS) .....	64
3.6	Caracterización de biopelículas .....	64
3.6.1	Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF) ..	64
4	Resultados y discusión .....	65
4.1	Ensayos electroquímicos .....	65
4.1.1	Espectroscopía de impedancia electroquímica .....	65
4.1.2	Voltametría cíclica .....	70

4.1.3	Polarización electroquímica .....	73
4.2	Análisis de superficie .....	77
4.2.1	Microscopía óptica .....	77
4.2.2	Microscopía de barrido electrónico .....	77
4.2.3	Análisis de Rayos-X de electrones dispersados (EDX) .....	80
4.3	Caracterización de biopelículas .....	84
4.3.1	Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF) ..	84
5	Conclusiones .....	87
6	Referencias y Bibliografía adicional .....	90
Anexos		

## Listado de Figuras

		<b>Página</b>
Figura 1	Estados termodinámicos de un metal sumergido en un medio corrosivo .....	11
Figura 2	Representación esquemática de las ocho formas de corrosión ....	13
Figura 3	Voltamograma obtenido por voltametría cíclica para estudiar el proceso de corrosión .....	16
Figura 4	Diagrama hipotético de polarización anódica y catódica para estudiar el proceso de corrosión con regiones de Tafel .....	16
Figura 5	Tipos de Diagramas (espectros) de la EIS y la información proporcionada para estudiar el proceso de corrosión .....	18
Figura 6	Adsorción de moléculas orgánicas sobre una superficie limpia, formando una capa acondicionadora.....	23
Figura 7	Transporte de células bacterianas a la superficie acondicionada, adsorción, desorción, y adsorción irreversible.....	23
Figura 8	Células con material polimérico extracelular el cual permite la adherencia en las superficies.....	24
Figura 9	La biopelícula está formada por microorganismos y una red de polímeros extracelulares.....	24
Figura 10	Esquematización y caracterización por SEM de las diferentes etapas de desarrollo de una biopelícula .....	25
Figura 11	Modelo conceptual de la arquitectura de biopelículas de una sola especie, basado en observación directa utilizando un microscopio confocal.....	26
Figura 12	Proceso de corrosión en presencia de bacterias sulfato reductoras (BSR) .....	28
Figura 13	Formación de celdas de concentración de oxígeno por debajo de la biopelícula .....	30
Figura 13a	Prevalencia de uso del DIU en mujeres portadoras .....	36

Figura 14	Efectos secundarios del DIU en mujeres portadoras .....	36
Figura 15	Posición de un DIU en el interior de la cavidad uterina .....	37
Figura 16	Diagrama esquemático que muestra la naturaleza de la película de óxido de cobre en presencia de MIC.....	45
Figura 17	Estructura de la porfina (I) y de una metaloporfirina (II) .....	47
Figura 18	Diagrama de ramificación para la identificación de Enterobacterias .....	57
Figura 19	Dispositivos Nova T y TCu380A utilizados para la realización de los ensayos .....	58
Figura 20	Esquema de los electrodos utilizados durante los ensayos electroquímicos .....	59
Figura 21	Celda de prueba para ensayos electroquímicos .....	61
Figura 22	Curvas de Nyquist obtenidas a partir de una placa de cobre inmersa en medio uterino enriquecido con peptona e inoculado con <i>Enterobacter sp.</i> .....	68
Figura 23	Diagramas de Bode de una placa de cobre inmersa en medio uterino enriquecido con peptona e inoculado con <i>Enterobacter sp.</i> .....	69
Figura 24	Voltametrías cíclicas realizadas sobre placa de cobre en presencia de <i>Enterobacter sp.</i> durante la primera etapa de desarrollo del biofilm.....	71
Figura 25	Voltametrías cíclicas realizadas sobre placa de cobre en presencia de <i>Enterobacter sp.</i> durante la segunda etapa.....	72
Figura 26	Curvas de polarización obtenidas de DIU Nova T inmerso en medio uterino sintético enriquecido con peptona e inoculado con <i>Enterobacter sp.</i> .....	74
Figura 27	Curvas de polarización obtenidas de DIU TCu380A inmerso en medio uterino sintético enriquecido con peptona e inoculado con <i>Enterobacter sp.</i> .....	75

Figura 28	Variación del potencial de circuito abierto ( $E_{ocp}$ ) con respecto al tiempo de una placa de cobre expuesta al medio uterino sintético enriquecido con peptona e inoculado con <i>Enterobacter sp.</i> .....	76
Figura 29	Formación de biopelícula sobre las espirales del DIU Nova T ....	78
Figura 30	Formación de biopelícula sobre las espirales del DIU TCu380A..	78
Figura 31	Micrografía de la biopelícula generada por <i>Enterobacter sp.</i> sobre placas de cobre .....	79
Figura 32	Ataque sobre cobre metálico de DIUs en ausencia y en presencia de una biopelícula bacteriana .....	80
Figura 33	Composición química de la biopelícula generada por <i>Enterobacter sp.</i> sobre las espirales de cobre de los DIUs evaluados.....	81
Figura 34	Composición química de las bacterias formadoras de la biopelícula .....	82
Figura 35	Composición química de los cristales presentes sobre la biopelícula .....	82
Figura 36	Composición química del substrato metálico después de la remoción de la biopelícula bacteriana .....	83
Figura 37	Espectro infrarrojo de exopolisacáridos generados por <i>Enterobacter sp.</i> sobre la superficie de cobre.....	86

## Listado de Tablas

		<b>Página</b>
Tabla 1	Dispositivos intrauterinos de cobre .....	34
Tabla 2	Microorganismos aislados e identificados en DIUs infectados ...	38
Tabla 3	Restos de aminoácidos más importantes como ligandos en una metaloproteína .....	47
Tabla 4	Valores promedio de cobre en los principales órganos de almacenamiento .....	48
Tabla 5	Funciones biológicas de las proteínas de cobre .....	50
Tabla 6	Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de la colonia bacteriana aislada en laboratorio a partir de un DIU .....	56
Tabla 7	Composición del medio uterino simulado .....	60

# Capítulo 1

## Introducción

## Resumen

El dispositivo intrauterino (DIU) T de cobre ha sido calificado como el método más satisfactorio en tecnología contraceptiva en vista de su gran aceptación por mujeres fértiles, especialmente, en países del tercer mundo, para espaciar la familia. El mecanismo contraceptivo del DIU de cobre está directamente relacionado con la cantidad de cobre liberado desde el dispositivo hacia el medio uterino. Se sabe que muchos de estos dispositivos se llegan a fracturar cuando están en funcionamiento. Tales fracturas pueden tener su origen en eventos de corrosión.

Al igual que el resto de los implantes médicos (catéteres, implantes dentales u ortopédicos), el DIU es susceptible a la colonización bacteriana con la subsiguiente generación de biopelículas sobre su superficie. La cavidad uterina, debido a sus características anatómicas, es muy susceptible de colonizarse y presentar infecciones. La colonización en el DIU puede estar formada por la flora vaginal normal y/o por contaminación con microorganismos patógenos. Los microorganismos alcanzan la cavidad uterina por migración a través de los hilos del dispositivo desde la vagina hasta el útero, se depositan sobre la superficie de cobre del DIU y forman comunidades microbianas dentro de biopelículas. Estas biopelículas modifican drásticamente el comportamiento de la superficie de cobre mediante el mecanismo de corrosión, el cual asegura la acción contraceptiva del DIU.

El presente trabajo se enfocó al estudio de la corrosión microbiológicamente inducida (MIC, del inglés *Microbially Induced Corrosion*) por *Enterobacter sp.*, bacteria comúnmente encontrada en cultivos vaginales, sobre superficies de cobre. Los materiales de estudio para los ensayos fueron placas planas y espirales de cobre de los DIUs Nova T y TCu380A, los cuales se utilizaron como electrodos de trabajo en el interior de una celda electroquímica, que contenía un medio uterino sintético enriquecido con peptona como medio de cultivo. Para simular las condiciones uterinas, la celda se mantuvo a 37°C utilizando un baño de temperatura controlada.

Los especímenes permanecieron en el interior de la celda por 7 días. El comportamiento de la corrosión se evaluó aplicando las técnicas electroquímicas: espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, del inglés *Electrochemical Impedance Spectroscopy*), polarización electroquímica y voltametría cíclica (VC) cada 24 horas. Concluida esta etapa, se retiraron los electrodos de trabajo y se procedió al análisis de superficie, mediante microscopía de barrido electrónico (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) con la finalidad de observar las características de la superficie. La composición química de los productos de corrosión y de la biopelícula formada se determinó por análisis de rayos-X de electrones dispersados (EDS, por sus siglas en inglés). Finalmente, se realizó la caracterización de los componentes orgánicos de las biopelículas generadas por espectroscopia infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).

Los resultados obtenidos muestran la generación de una biopelícula de composición polisacáridica sobre el cobre, como resultado del crecimiento y desarrollo de la colonia de *Enterobacter sp.* Las curvas de Nyquist obtenidas por EIS, indican que la formación de la biopelícula se inicia a partir de las 42 horas de inmersión en el medio uterino sintético inoculado con la cepa bacteriana, y continúa desarrollándose hasta el final del experimento. Esto coincide con los resultados obtenidos mediante VC y polarización electroquímica en tiempos similares, ya que los voltamogramas indican un proceso auto catalítico a partir de las 48 horas. En cuanto a las curvas de polarización electroquímica, éstas muestran que el electrodo adquiere un comportamiento pasivo debido a la presencia de la biopelícula sobre la superficie del cobre, que actúa como una barrera física. Sin embargo, esto no impide que el proceso de corrosión se lleve a cabo. Hay que notar también que, debido a que la disolución de los iones cobre continúa a través de los poros de la biopelícula, el ataque no es uniforme.

Después de la remoción de la biopelícula, en las micrografías se observa el ataque localizado inducido por la colonia de *Enterobacter sp.*, con una alta densidad de picaduras. El análisis cualitativo de la biopelícula señala la presencia de elementos

minerales (cloro, sodio, potasio y calcio), productos de corrosión (óxidos e hidróxidos de cobre), así como un elevado porcentaje de carbono, debido a la presencia de materia orgánica. La composición química y estructural de los productos metabólicos indica que se trata de exopolisacáridos generados durante el metabolismo de la colonia de *Enterobacter sp.*, lo que se corroboró haciendo un barrido por FTIR. En este barrido se encontraron las bandas características de macromoléculas orgánicas, particularmente proteínas Amida I y Amida II, el grupo funcional éster proveniente de ácidos grasos y aminoácidos, los grupos fosfato de los nucleótidos formadores de ácidos nucleicos, y la presencia de carbohidratos del tipo glicógeno.

**Objetivo principal:**

Caracterizar el desarrollo de biopelículas y su efecto inductor en la corrosión del cobre metálico presente en los DIUs TCu380A y Nova T expuestos a medios uterinos sintéticos.

**Objetivos particulares:**

Los objetivos particulares de esta investigación son:

- Aislar y caracterizar cepas de microorganismos de medios naturales en mujeres portadoras de dispositivos intrauterinos de cobre.
- Llevar a cabo diferentes ensayos de corrosión utilizando los microorganismos aislados, a fin de evaluar su efecto inductivo en la corrosión microbiológica sobre placas y espirales de cobre de los DIUs T Cu 380 A y Nova T.
- Caracterizar las biopelículas generadas por la actividad metabólica de los microorganismos mediante el uso de análisis químicos y técnicas de análisis de superficie.
- Caracterizar los procesos de corrosión inducida por microorganismos utilizando técnicas electroquímicas.

**Hipótesis:**

Existen microorganismos capaces de resistir el efecto tóxico de los productos de corrosión del cobre metálico de dispositivos intrauterinos T Cu 380 A y Nova T en medios uterinos.

## 1. Introducción

Los dispositivos intrauterinos de cobre (DIUs) que se utilizan actualmente están constituidos por una estructura de polietileno (generalmente en forma de T), envuelta con espirales y/o placas de cobre. La longitud de la espiral y las dimensiones de las placas se diseñan en función del área superficial que se desee alcanzar, por ejemplo, 200 y 380 mm<sup>2</sup> para los DIUs NovaT y TCU380A, respectivamente. El área superficial del cobre generalmente es proporcional al tiempo de vida del DIU en cuestión, ya que su efecto contraceptivo se debe a la disolución continua del cobre metálico (corrosión) en la cavidad uterina.

Debido a la naturaleza y agresividad del medio uterino, la corrosión del cobre no siempre se presenta de manera uniforme, sino que se intensifica en áreas específicas ocasionando un deterioro muy localizado del tipo picaduras. Estas picaduras se pueden intensificar hasta provocar la ruptura del espiral, ocasionando daños severos a las usuarias. Asimismo, se han reportado dos casos extremos<sup>1</sup> en donde el DIU permaneció en el útero por más de 10 años y al ser removido se encontró la estructura de polietileno totalmente desnuda, debido a la disolución total del cobre.

Los iones de cobre liberados son Cu<sup>1+</sup> y Cu<sup>2+</sup>, siendo el ion cuproso la especie predominante, que ocasiona cambios celulares y bioquímicos en el endometrio y los líquidos uterinos. Entre estos cambios están el incremento en la producción de los mecanismos de defensa; la producción de especies reactivas de oxígeno y la acción directa sobre los espermatozoides que disminuye su motilidad, viabilidad y capacidad de fertilización<sup>2-4</sup>. La toxicidad del cobre se basa en la generación de radicales libres de oxígeno, que catalizan la peroxidación de lípidos así como el daño a ácidos nucleicos y proteínas<sup>5</sup>.

El proceso de corrosión ocurre, de manera espontánea, cuando el cobre entra en contacto con los fluidos uterinos, o incluso antes de su inserción. En un estudio previo, realizado a temperatura ambiente sobre DIUs nuevos en su empaque original, se detectó

la presencia de productos de corrosión generados durante su almacenamiento/vida de anaquel<sup>6</sup>; el análisis por espectroscopia foto-electrónica de rayos X (XPS, por sus siglas en inglés), revela que los compuestos encontrados fueron cuprita (Cu<sub>2</sub>O) y tenorita (CuO). Se han realizado otra serie de experimentos *in vitro*, utilizando un medio uterino sintético<sup>7</sup> preparado artificialmente a partir de sustancias orgánicas e inorgánicas, simulando el ambiente uterino al que se expone el DIU en condiciones reales.

Sin embargo, el fluido uterino es una mezcla mucho más compleja, que contiene además componentes bioquímicos orgánicos como aminoácidos, proteínas, péptidos, restos celulares y residuos de sangre provenientes de los ciclos menstruales. Además, se ha reportado que después de la inserción del DIU, el fluido uterino presenta algunos cambios bioquímicos<sup>8</sup>, que en algunas ocasiones inducen la generación de daños histopatológicos<sup>9</sup>. Considerando estos factores, se han realizado estudios complementarios que utilizan la composición del medio uterino simulado y exponen los DIUs a la presencia de las proteínas albúmina sérica,  $\gamma$ -globulina y hemoglobina<sup>8</sup>, al agente anti-inflamatorio indometacina<sup>10</sup>, a la sangre total y al plasma sanguíneo<sup>11-12</sup>, a fin de caracterizar la corrosión electroquímica del cobre.

Algunos estudios recientes han demostrado que el 75% de los DIUs retirados de pacientes con infecciones genito-urinarias se encontraban cubiertos por un consorcio de microorganismos<sup>13-14</sup>. Esto era de esperarse ya que el DIU, al igual que otros implantes médicos, es susceptible a la colonización bacteriana y al desarrollo de biopelículas. El cobre proporciona una superficie apropiada para la adsorción y crecimiento de microorganismos. La biopelícula formada sobre la superficie de cobre de los DIUs está constituida por una masa gelatinosa y esponjosa de materia orgánica e inorgánica, material polimérico extracelular o exopolisacáridos (EPS), principalmente polisacáridos ácidos, proteínas, agentes anti-inflamatorios, sangre, restos celulares, productos de corrosión, sales de cobre y cerca de 95% de agua.

Previamente a la colonización por microorganismos del DIU, se adsorbe una “película acondicionadora” formada por residuos orgánicos, que modifica la

permeabilidad y distribución de cargas eléctricas en la superficie de cobre<sup>15</sup>. Esta capa orgánica facilitará la adsorción posterior de un mayor número de células microbianas. La presencia de bacterias y de los productos generados de su actividad metabólica modifica las condiciones y los procesos electroquímicos en la interfase metal/disolución (cobre/medio uterino). Las células adsorbidas crecen y se reproducen en forma de colonias, creando zonas heterogéneas que favorecen la formación de ánodos o cátodos sobre la superficie del cobre.

La biopelícula depositada sobre el DIU modifica la interfase cobre/fluido uterino, formando una barrera entre el metal y el medio circundante. La interacción entre la superficie de cobre del DIU y los componentes de la biopelícula afectan al proceso de corrosión conocido como *corrosión microbiológicamente inducida* (MIC, por sus siglas en inglés), que es una corrosión influenciada por la presencia y actividades de microorganismos y/o sus metabolitos.

El presente trabajo de investigación tiene el propósito de complementar los estudios realizados sobre la corrosión del DIU. El objetivo principal es caracterizar el proceso de corrosión microbiológicamente inducida sobre el cobre, a fin de garantizar que la producción de iones de cobre por corrosión y la efectividad anticonceptiva de los DIUs, no se ve afectada por la formación de una biopelícula bacteriana sobre éstos. El procedimiento consiste en aislar y cultivar bacterias (*Enterobacter sp*), comúnmente encontradas en cultivos vaginales, a partir de DIUs retirados para, posteriormente, ponerlas en contacto con nuevos DIUs en condiciones uterinas simuladas. Bajo estas condiciones, las bacterias crecen y desarrollan una biopelícula, la cual es generada metabólicamente por la colonia sobre la superficie de cobre. Se realizan mediciones electroquímicas cada 24 horas para monitorear el desarrollo de la biopelícula y el comportamiento de corrosión. Posteriormente se analiza la superficie para determinar las características de la biopelícula, la morfología de la colonia y el tipo de ataque sobre el sustrato.

# Capítulo 2

## Fundamentos Teóricos

## 2.1. CORROSIÓN ELECTROQUÍMICA

### 2.1.1 Definición y técnicas de análisis

La *corrosión* se define como la interacción fisicoquímica entre un metal y el ambiente que lo rodea<sup>16</sup>, como resultado de la cual ocurren cambios en las propiedades del metal (que pueden conllevar a su destrucción funcional), y en las características del ambiente. Cuando la corrosión del metal ocurre en la presencia de una capa húmeda formada sobre la superficie metálica, ésta se denomina como *corrosión electroquímica*. El proceso de corrosión es espontáneo, de destrucción *irreversible* del metal, y se debe a su interacción fisicoquímica con un *ambiente corrosivo*, que contiene uno o más *agentes corrosivos*.

Dependiendo del tipo de agente corrosivo, existe una clasificación aceptada, según la cual se reconocen diferentes ambientes, como por ejemplo, marino, marino-costero, industrial, rural, rural-urbano, urbano, subterráneo, agua del mar, aguas dulces, aguas subterráneas, concreto, soluciones ácidas, etc. Su nivel de corrosividad (agresividad corrosiva) se determina por el nivel (concentración) de los agentes corrosivos que forman parte de ellos.

El ambiente es el conjunto de condiciones (físicas, químicas, mecánicas, ambientales, etc.) a las que un material se encuentra expuesto. Los factores primarios que caracterizan un ambiente son los siguientes:

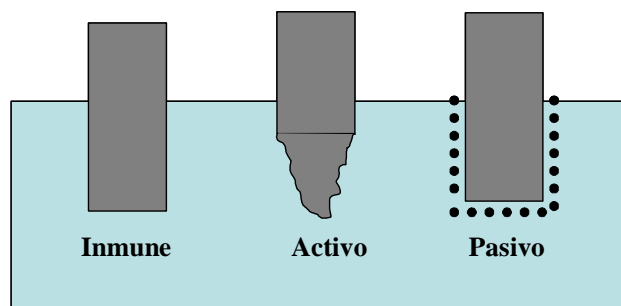
- Estado físico: gas, líquido o sólido;
- Composición química: constituyentes y concentraciones;
- Temperatura y humedad relativa.

La corrosión de los metales en medio acuoso es de naturaleza electroquímica e involucra dos tipos de reacciones en la superficie del metal (electrodo): *catódica* y *anódica*, las cuales se desarrollan en diferentes áreas de la superficie del metal, denominadas como *cátodos* y *ánodos*, respectivamente.

Como resultado, el metal se disuelve (*oxida*) en forma de iones en los áreas de ánodos ( $Me \rightarrow Me^{+z} + ze^-$ ) liberando electrones, convirtiéndose en productos de corrosión, especies químicas disueltas o productos insolubles (óxidos, oxihidróxidos, etc.), adheridos en el metal, hasta la completa transformación de metal debido al proceso de corrosión. De esta manera, a través de la corrosión, el metal libera el exceso de energía libre de Gibbs que contiene, hasta su valor mínimo posible, entrando en un nuevo estado termodinámico estable formando los productos de corrosión. En las áreas del cátodo, un *agente oxidante* (*Ox*) recibe los electrones liberados en la reacción anódica ( $Ox + e^- \rightarrow Red$ ). En medios neutros o alcalinos el oxidante común es el oxígeno del aire ( $O_2$ ) y en medios ácidos – el ion de hidrógeno ( $H^+$ ).

Además de ánodos y cátodos en contacto eléctrico, como parte del metal, la corrosión electroquímica requiere de un *conductor iónico*, en donde se liberan los iones del metal y se encuentra disuelto el agente oxidante. Un conductor tal es una capa acuosa húmeda formada sobre el metal, llamada *electrolito*. El proceso electroquímico implica un flujo de electrones entre las áreas anódicas y catódicas, cuya velocidad determina las velocidades de las reacciones de oxidación y reducción que ocurren en la superficie o en total el proceso de corrosión.

Cuando un metal se encuentra completa o parcialmente en contacto con un medio corrosivo, puede estar en uno de los tres diferentes estados termodinámicos<sup>16</sup> que se presentan en la Figura 1:



**Figura 1. Estados termodinámicos de un metal sumergido en un medio corrosivo**

1. *Estado inmune.* En este estado se encuentran los metales nobles, por ejemplo, oro, plata y platino. No se desarrolla la reacción anódica de oxidación del metal y el proceso de corrosión no ocurre. Para los metales activos (hierro, cobre, aluminio y otros) se puede llegar a este estado convirtiendo el metal en cátodo, polarizándolo con una fuente externa de corriente directa.
2. *Estado activo.* El metal se corroe (oxida) en el electrolito, disolviéndose y formando productos de corrosión solubles, no protectores. La corrosión activa se caracteriza por una pérdida de masa del metal.
3. *Comportamiento pasivo.* Sobre la superficie del metal se forma una película insoluble y protectora de productos de corrosión (habitualmente de óxido), conocida como capa pasiva, que disminuye significativamente la velocidad de corrosión del metal. La resistencia a la corrosión depende de la integridad de la película protectora y si la película se destruye o se disuelve, entonces el metal presenta nuevamente un comportamiento activo.

Normalmente la corrosión se presenta a una velocidad determinada por el equilibrio entre las reacciones electroquímicas opuestas de oxidación y reducción. Cuando ambas reacciones están en equilibrio, el flujo de electrones está balanceado y no existe flujo neto de electrones (corriente eléctrica).

### **2.1.2 Tipos de corrosión**

En dependencia del desarrollo del ataque corrosivo y su aparición, la corrosión puede ser *uniforme* (general) o *no uniforme* (localizada). En el primer caso, la superficie del metal se corroe a una misma velocidad, lo que es típico para el acero a bajo carbono y el metal cobre, por ejemplo. Cuando la corrosión no es uniforme, solamente son afectadas áreas pequeñas en la superficie y el desarrollo del proceso corrosivo puede seguir en la profundidad del metal. La corrosión localizada se puede clasificar en varios tipos de *corrosión no uniforme*:

- Corrosión por picaduras
- Corrosión por hendiduras, incluyendo la corrosión bajo depósitos o tubérculos, corrosión filiforme.
- Corrosión galvánica
- Corrosión-erosión, incluyendo cavitación erosión y corrosión por desgaste.
- Corrosión intergranular, incluyendo sensibilización y exfoliación.
- Dealeación, incluyendo dezincificación y corrosión grafitica.
- Corrosión bajo tensión y corrosión por fatiga
- Corrosión fragilización por hidrógeno.

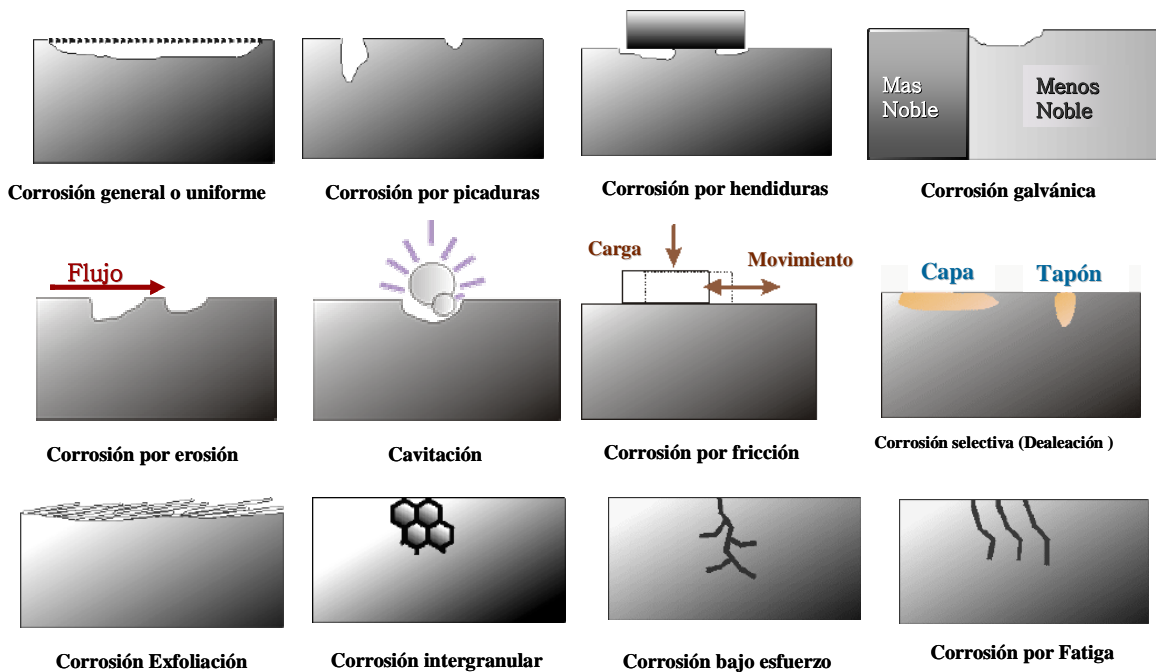


Figura 2. Representación esquemática de las ocho formas de corrosión

### 2.1.3 Técnicas de análisis

Las técnicas electroquímicas son ideales para estudiar el proceso de corrosión. Estas técnicas utilizan una muestra del metal de interés (*electrodo de trabajo*) con un área superficial de unos cuantos centímetros cuadrados (o menor). La muestra se sumerge en una solución del medio corrosivo, y se introducen electrodos adicionales que fungirán como *electrodo de referencia* al potencial y otro como *auxiliar* (contra-electrodo) en la medición de corriente en la solución. Los electrodos de referencia más comunes en el laboratorio son el electrodo de calomel saturado (ECS) y el electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). El electrodo auxiliar es un conductor que completa el circuito de la celda y generalmente es inerte, como platino o grafito.

Todos los electrodos se conectan a un *potenciostato*, un equipo electrónico que controla la diferencia de voltaje entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, ambos electrodos contenidos en una *celda electroquímica*. El potenciostato permite cambiar el potencial del metal de prueba en una manera controlada y mide la corriente que fluye como una función del potencial aplicado. Los tres tipos de electrodos están inmersos en una celda electroquímica que contiene el electrolito (el medio corrosivo).

Una medida para la actividad del metal y su estado en un ambiente dado, relacionada con el exceso de energía libre de Gibbs que éste contiene, es el valor de su potencial. Cuando se alcanza el equilibrio cinético entre las reacciones anódicas y catódicas en la superficie del metal (en ausencia de polarización externa), el potencial del metal se reconoce como *potencial de circuito abierto* ( $E_{ocp}$ ). En muchos de los experimentos electroquímicos de corrosión, el primer paso es la medición del  $E_{ocp}$ . Cuando el potencial de un metal en una solución es forzado a alejarse de su  $E_{ocp}$ , por medio de una polarización externa, se dice que la muestra está polarizada. La corriente eléctrica en el metal se mide conforme éste va siendo polarizado y se utiliza para desarrollar un modelo del comportamiento de corrosión de la muestra, mediante una gráfica de potencial-corriente eléctrica.

Existen diferentes métodos para evaluación de la corrosión. Los métodos electroquímicos de polarización potenciodinámica y voltametría cíclica se utilizan comúnmente para la evaluación de corrosión en el laboratorio. En estas técnicas, el potencial del electrodo se varía a una velocidad determinada, aplicando una corriente entre los electrodos de trabajo y el auxiliar, a través del electrolito, proporcionando información significativa respecto a los mecanismos de corrosión, velocidades de corrosión y susceptibilidad a la corrosión de materiales específicos en determinados medios. Los métodos de polarización incluyen cambios de potencial en el electrodo de trabajo y monitorean la corriente producida como una función del tiempo o del potencial.

- *Polarización anódica:* el potencial se varía en dirección anódica (valores más positivos), originando que el electrodo de trabajo (el metal de estudio) se convierta en ánodo, liberando electrones (se oxida).
- *Polarización catódica:* el potencial del electrodo de trabajo se desplaza hacia valores más negativos y los electrones se adicionan a su superficie provocando una reacción de reducción.
- *Polarización cíclica:* Se realizan ambas polarizaciones, anódica y catódica, de manera cíclica. Estas pruebas frecuentemente se utilizan, por ejemplo, para evaluar la susceptibilidad a picaduras (corrosión localizada). El potencial se modifica en un solo ciclo, y el tamaño de la histéresis se examina junto con las diferencias entre los valores del potencial de circuito abierto inicial y el potencial de pasivación de retorno. La existencia de histéresis usualmente es indicativo de picaduras, mientras que el tamaño de la curva está relacionado con la cantidad de picaduras presentes.
- *Voltametría cíclica:* La voltametría cíclica involucra un barrido del potencial hacia una dirección positiva hasta alcanzar un valor predeterminado de corriente o potencial. Inmediatamente después, el barrido se invierte hacia valores más negativos hasta alcanzar el valor original de potencial. En algunos casos, este barrido se repite para determinar cambios en la curva corriente-potencial producidos con el barrido. La figura 3 muestra el ejemplo de un voltamograma obtenido.

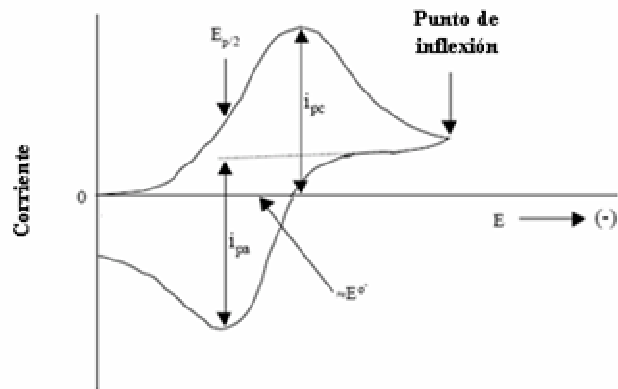


Figura 3. Voltamograma obtenido por voltametría cíclica para estudiar el proceso de corrosión

- *Curvas de Tafel.* Es una curva de polarización catódica o anódica, que representa el logaritmo de la densidad de corriente contra el potencial. Cuando en esta curva se observa una región lineal, esto significa que el proceso electroquímico está bajo el control de la transferencia de cargas (electrones y iones), como la etapa más lenta del proceso. El análisis se realiza por extrapolación de las porciones lineales de las curvas hasta su intersección. El valor de la corriente en la intersección corresponde a la corriente de corrosión ( $I_{corr}$ ) y el potencial de corrosión ( $E_{corr}$ ). Ver Figura 4.

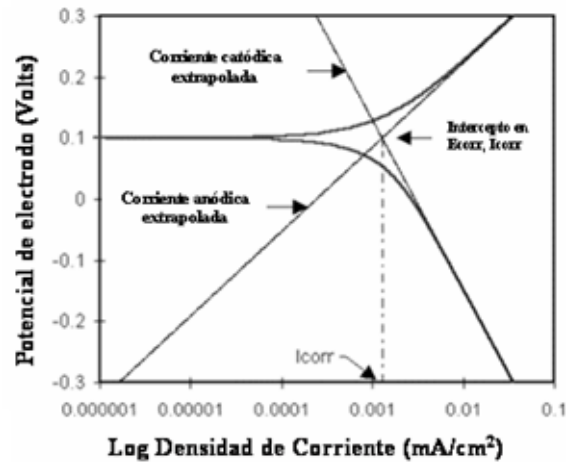


Figura 4. Diagrama hipotético de polarización anódica y catódica para estudiar el proceso de corrosión con regiones de Tafel

- *Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés):* Esta técnica se utiliza principalmente para deducir el mecanismo del proceso de corrosión y para obtener información sobre la resistencia a la polarización por parte del metal. Esta última es proporcional a la velocidad de corrosión en la interfase metal/electrolito de interés. Los resultados de EIS se pueden interpretar con la ayuda de un circuito equivalente de la interfase. La ventaja más importante de la EIS es que se aplica al metal (electrodo de trabajo) una señal no directa, sino sinusoidal, con muy altas y bajas frecuencias (de 0.001 Hz a 100,000 Hz., habitualmente), lo que no perturba el proceso electroquímico. Otra ventaja importante de la EIS es la posibilidad de trabajar al potencial de circuito abierto o utilizar amplitudes de polarizaciones muy pequeñas (10-30 mV), sin modificar significativamente las propiedades de la interfase, que están siendo evaluadas.

Los espectros de la EIS (Fig.5) se pueden obtener en dos formas principales: *Diagramas de Nyquist* y *Diagrama de Bode*, cuya descripción se da en una forma resumida a continuación, acompañadas por el circuito equivalente que los representa. A partir de la forma de los diagramas y sus parámetros se puede deducir el estado (comportamiento) del metal.

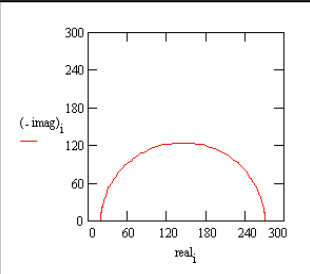
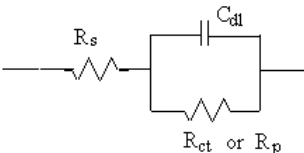
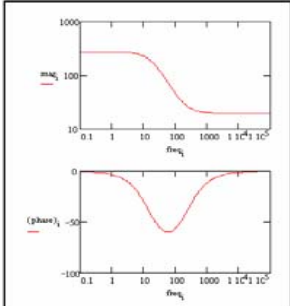
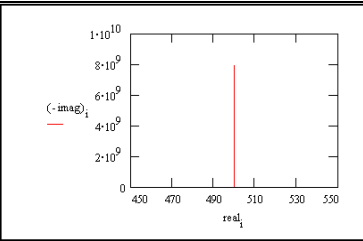
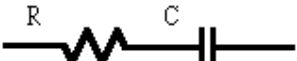
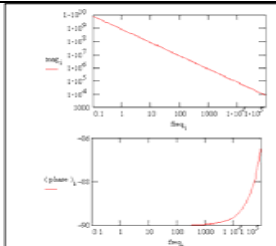
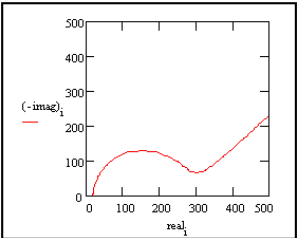
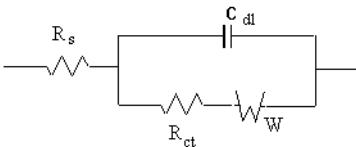
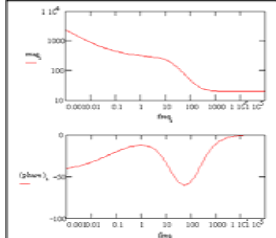
Comportamiento del metal	Diagrama de Nyquist	Circuito Equivalente	Diagrama de Bode
<b>Resistivo</b>			
<b>Capacitivo</b>			
<b>Mixto</b>			

Figura 5. Tipos de Diagramas de la EIS y la información proporcionada para estudiar el proceso de corrosión

## 2.2 CORROSIÓN MICROBIOLÓGICAMENTE INDUCIDA

La corrosión microbiana o microbiológicamente inducida (MIC, por sus siglas en inglés) es corrosión asociada con la acción de microorganismos presentes en el sistema de corrosión. Por lo tanto, ésta incluye la destrucción (oxidación) del metal en el cual los microorganismos actúan directamente o por medio de las sustancias provenientes de su metabolismo, que aceleran la corrosión ya establecida o generan las condiciones favorables para que se produzca dicho fenómeno.

Los factores que influyen en la MIC se pueden clasificar en tres tipos:

- A. El estado en que se encuentra el material. La estructura, las alteraciones de la superficie (por mínimas que éstas sean) o el deterioro mecánico que presenta el metal son factores que permiten el inicio del proceso de corrosión. Una vez iniciado, se observa la acción que posteriormente desempeñan las bacterias.
- B. La influencia del medio.
  - i. *Composición química del medio.* La presencia de oxígeno en el medio corrosivo favorece el desarrollo de los microorganismos aerobios, mientras que el gas carbónico es utilizado como fuente de carbono por las bacterias autótrofas. La presencia de los minerales nitrógeno, fósforo, azufre, hierro, manganeso, calcio, etc., en forma de nitratos, fosfatos, sulfatos o sulfuros, proporciona los oligoelementos necesarios para el crecimiento de las bacterias.
  - ii. *Temperatura.* Cada microorganismo tiene una temperatura óptima en la cual su desarrollo se acelera.
  - iii. *El pH.* La acidez o alcalinidad del medio tienen al principio una acción directa sobre el metal y luego, favorecen o inhiben el desarrollo de las bacterias. Existen microorganismos que producen ácidos minerales, disminuyendo el pH del medio, por lo que éste se vuelve más corrosivo para el metal
  - iv. *La luz.* La luz condiciona el desarrollo de las bacterias fotolitótrofas y fotoorganótrofas.

- C. La acción de los microorganismos. Los microorganismos participan en el proceso de corrosión mediante uno o más de los siguientes procesos:
- i. Produciendo sustancias corrosivas durante su metabolismo, esto es, transformando un medio originalmente inerte en agresivo.
  - ii. Generando celdas de aireación diferencial, por un desigual consumo de oxígeno en zonas localizadas;
  - iii. Destruyendo capas protectoras de óxidos sobre el metal, que son metabolizadas por microorganismos.
  - iv. Algunos microorganismos pueden consumir inhibidores de corrosión que han sido introducidos en el ambiente, facilitando así la acción de iones corrosivos para el metal.

Los microorganismos asociados a la corrosión son:

- Bacterias aerobias, anaerobias y/o facultativas, las cuales producen especies altamente corrosivas como parte de su metabolismo.
- Hongos, causantes de daños severos provocados por su actividad enzimática, son capaces de generar productos de corrosión durante su metabolismo, y secretan ácidos orgánicos hacia el medio. Además, generan subproductos metabólicos que son de utilidad para algunas bacterias.
- Algas, proporcionan la materia orgánica necesaria para el crecimiento de otros microorganismos. Al igual que los hongos, también secretan enzimas que atacan numerosos substratos como madera, papel, etc., y pueden metabolizar sustancias ácidas corrosivas. Por otra parte, las algas conducen a la formación de limo o sedimentos que favorecen el desarrollo de las bacterias anaerobias.
- Formadores de lama. Se refiere a un variado grupo de bacterias aerobias. Son de importancia en la corrosión, debido a que producen material polimérico extracelular, comúnmente llamado “lama”. Este polímero es una red que permite la adherencia de las células a la superficie, controlando así la permeabilidad a través de sus depósitos. Los formadores de lama evitan que el oxígeno alcance la superficie subyacente, generando celdas de concentración en la superficie del substrato.

## Clasificación de los microorganismos

Existen diferentes criterios para clasificar a los microorganismos, entre los cuales se puede mencionar:

*A. Tolerancia al oxígeno:* Algunos microorganismos sólo pueden vivir en presencia de oxígeno, otros por el contrario, no viven sino en ausencia de oxígeno y existen otros que pueden adaptarse a la presencia o ausencia de oxígeno.

- Anaerobios estrictos (u obligados), los cuales no se desarrollarán en la presencia de oxígeno.
- Aerobios, los cuales requieren oxígeno en su metabolismo.
- Anaerobios facultativos, quienes pueden desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno.
- Micro aerofilicos, los cuales utilizan oxígeno pero prefieren bajos niveles.

*B. De acuerdo a su metabolismo:*

- Los compuestos o nutrientes a partir de los cuales obtienen fuentes de carbono para su crecimiento y reproducción
- La química a través de la cual obtienen energía o llevan a cabo su respiración
- Los elementos que acumulan como resultado de estos procesos.

*C. En base a su morfología:*

- *Vibrio* para células con forma de coma
- *Bacilos* para células en forma de bastoncillos
- *Cocos* para células redondas
- *Micelio* para hongos

### 2.2.1 Interacción Microorganismo - Superficie Metálica

Cuando una superficie metálica está expuesta en una solución acuosa, parte del material orgánico presente recubre el metal, enmascarando las propiedades

fisicoquímicas originales de la superficie. Este recubrimiento orgánico puede actuar como fuente de nutrientes, estimulando la quimiotaxis en bacterias para colonizar dicha superficie. El crecimiento microbiano sobre una superficie metálica facilita el establecimiento de regiones anódicas y catódicas mediante la generación de gradientes de concentración. Esto ocurre debido a la generación local de protones u otros productos metabólicos y a la formación de enlaces entre los iones metálicos con los exopolisacáridos (EPS) generados por la colonia bacteriana. La colonización microbiana de metales y aleaciones modifica drásticamente el comportamiento de dichos materiales frente a la corrosión.

El movimiento de los microorganismos dentro de un medio líquido puede ser activo mediante cilios o flagelos, o pasivo por medio de corrientes o flujos. Cerca de la interfase metal-electrolito intervienen varias fuerzas de corto alcance: hidrofóbicas, coulombianas o de Van der Waals, capaces de retener a los microorganismos sobre la superficie. No obstante, la remoción de los microorganismos es fácil en esta etapa, denominada de *adsorción reversible*.

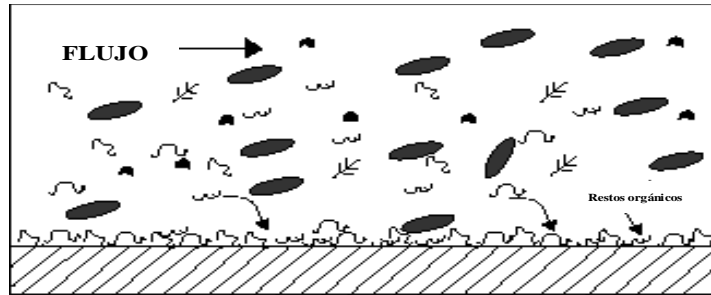
### **2.2.2 Desarrollo de la biopelícula**

Las superficies metálicas son susceptibles de ser colonizadas por microorganismos, quienes son capaces de tomar del entorno los nutrientes necesarios para llevar a cabo su actividad metabólica, reproducirse y establecerse como colonias sobre diversas superficies. Durante su desarrollo, los microorganismos secretan material polimérico extracelular generando una red heterogénea, por cuyos canales existe un flujo continuo de agua, oxígeno y nutrientes. La generación y desarrollo de la biopelícula sobre una superficie determinada se puede clasificar en diferentes etapas<sup>18</sup>, entre las que destacan:

- **Etapa 1. Acondicionamiento de la superficie**

Casi inmediatamente después de que una superficie entra en contacto con una fase acuosa que contiene microorganismos, se deposita una película orgánica en la

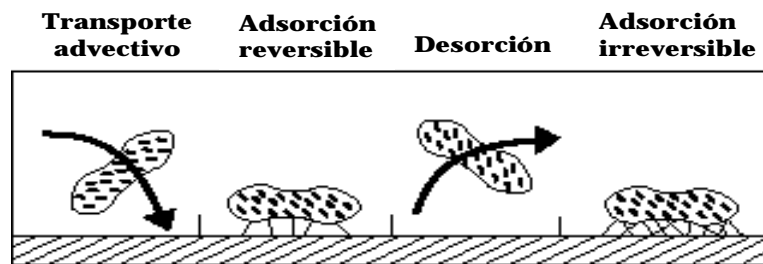
interfase metal/electrolito, conocida como “capa acondicionadora”. Esta capa acondicionadora neutraliza el exceso de cargas y enmascara las características de la superficie, permitiendo así que las células bacterianas se aproximen lo suficiente para iniciar su adsorción (fijación). Las moléculas orgánicas adsorbidas sirven en ocasiones como nutrientes para otras bacterias. La formación de esta capa se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Adsorción de moléculas orgánicas sobre una superficie limpia, formando una capa acondicionadora.

▪ **Etapas 2. Adhesión de bacterias ‘precursoras’**

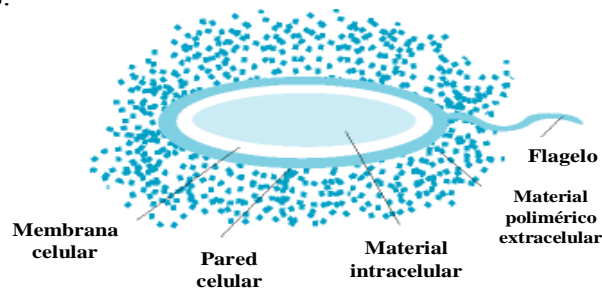
Las bacterias planctónicas o flotantes se aproximan a la superficie metálica hasta una zona donde la velocidad de flujo es cero. Algunas de estas células se adsorberán al metal por un tiempo determinado, para después desprenderse, lo que se conoce como *adsorción reversible*. Esta adherencia inicial está basada en *atracción electrostática* y en *fuerzas físicas*, no en enlaces químicos. Las células adsorbidas reversiblemente se denominan precursoras y permiten la adsorción permanente de otras células sobre la superficie, como se aprecia en la Figura 7.



**Figura 7.** Transporte de células bacterianas a la superficie acondicionada, adsorción, desorción, y adsorción irreversible

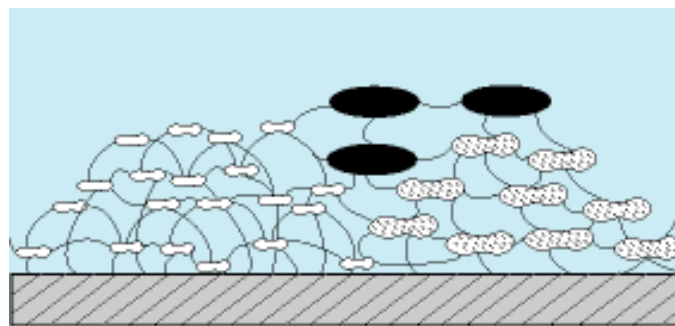
- **Etapa 3. Formación de glucocáliz o “lama”**

La colonia bacteriana excreta un material polimérico extracelular, que permite la unión entre la biopelícula y la superficie metálica. La adherencia está regulada por estos polímeros extracelulares que se extienden hacia fuera de la pared celular bacteriana, como una especie de telaraña (Figura 8). El glicocáliz está formado por grupos polisacáridos cargados o neutros, los cuales no sólo facilitan la adherencia sino que también actúan como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar nutrientes del medio. El glicocáliz también actúa como una capa protectora, la cual minimiza los efectos de biocidas y otras sustancias tóxicas para las células adheridas.



**Figura 8. Células con material polimérico extracelular el cual permite la adherencia en las superficies.**

Conforme los nutrientes se acumulan, las células precursoras empiezan a reproducirse. Posteriormente las nuevas células producen su propio glucocáliz, lo que incrementa el volumen de la superficie de intercambio iónico, de modo que se establece una biopelícula bacteriana (Fig.9). En una biopelícula madura, la mayor parte del volumen es ocupado por la matriz de glicocáliz (75-95%), mientras que las células bacterianas ocupan 5-25%.



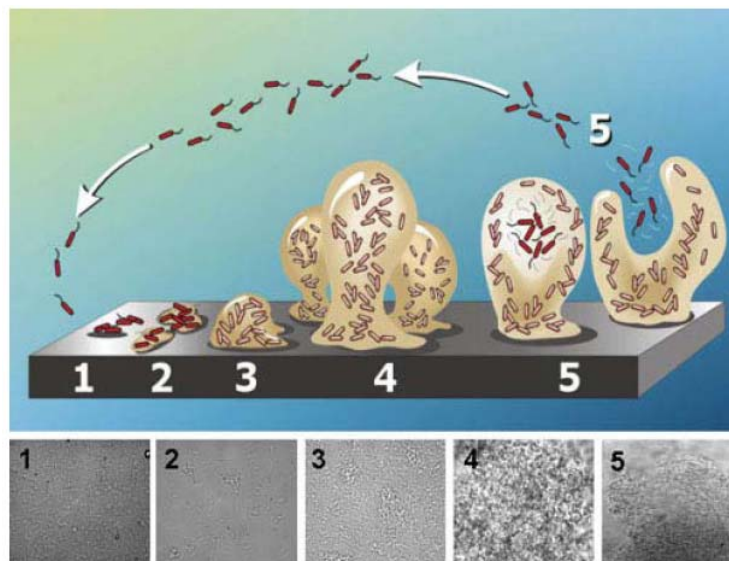
**Figura 9. La biopelícula está formada por microbios y una red de polímeros extracelulares.**

- **Etapa 4. Colonizadores secundarios**

Conforme los nutrientes son atrapados, la red de glicocálix enlaza también células microbianas. Estos colonizadores secundarios metabolizan los residuos de los colonizadores primarios, al mismo tiempo que generan sus propios residuos, los cuales serán utilizados posteriormente por otras células.

- **Etapa 5. Biopelícula funcional. Un “consorcio” cooperativo de especies**

La biopelícula en funcionamiento es como un tejido vivo sobre la superficie del metal. Es una comunidad compleja, metabólicamente cooperativa, formada por diferentes especies que viven en un nicho especializado. Las diferentes etapas del desarrollo de una biopelícula se esquematizan en la Figura 10 en la cual se muestra el acondicionamiento de la superficie, la formación de la biopelícula y el fenómeno de desorción. Este último fenómeno inicia la formación de una nueva biopelícula cuando los materiales se adsorben en otro lugar del sustrato. El seguimiento de cada una de las etapas se hace con SEM y se muestran las micrografías en la misma figura.



**Figura 10. Esquematización y caracterización por SEM de las diferentes etapas de desarrollo de una biopelícula.**

### 2.2.3 Estructura de la biopelícula

En el pasado, los microbiólogos suponían que las biopelículas estaban formadas por diversos grupos de bacterias sin ningún patrón o estructura particular. Las nuevas técnicas de microscopía permiten observar las biopelículas sin destruir su estructura tipo gel, permitiendo descubrir su estructura compleja. En la mayoría de los casos, la base de la biopelícula es una capa densa y opaca de lama de 5-10 micrómetros de espesor. Es una mezcla viscosa de polisacáridos, sustancias poliméricas generados por la bacteria y agua. Se incrementa hasta 100-200 micrómetros y sobre ella se encuentran las colonias bacterianas con forma de hongos o conos. Por debajo hay más lama, de consistencia variable, con canales a través de los cuales pasa agua, restos bacterianos, nutrientes, enzimas, metabolitos y oxígeno<sup>17</sup>. Esta estructura se ilustra en la Figura 11.

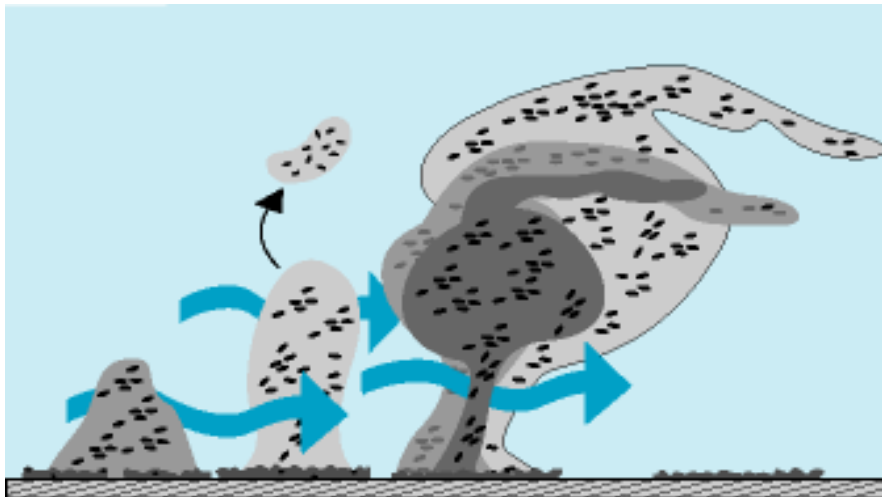


Figura 11. Modelo conceptual de la arquitectura de biopelículas de una sola especie, basado en observación directa utilizando un microscopio confocal.

### 2.2.4 Mecanismos de corrosión microbiológicamente inducida (MIC)

La inducción que ejercen los microorganismos en el proceso de corrosión puede ser analizada desde el punto de vista electroquímico, con lo que se establecen los siguientes mecanismos:

- **Mecanismos que involucran una modificación de la reacción anódica**

*A. Producción de aniones agresivos*

Producción de sulfuros por parte de las bacterias sulfato reductoras (BSR). Estos aniones son capaces de producir corrosión localizada del hierro y acero al carbono, en un proceso que se presenta a potenciales más negativos que los observados en presencia de aniones cloruro. Durante este proceso, en los lugares del ataque corrosivo, el metal pierde la película protectora de óxido por una capa de FeS. Ésta última puede retardar la velocidad de corrosión, pero la presencia de elevadas concentraciones de aniones cloruro la desestabiliza, provocando una intensa disolución del metal.

*B. Producción de metabolitos que facilitan la acción de los iones agresivos*

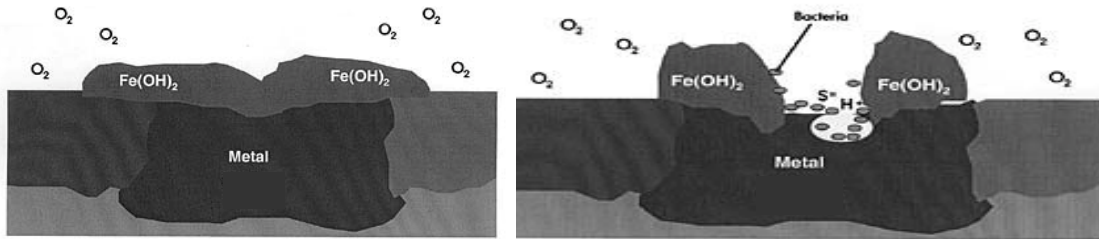
Este mecanismo permite explicar la corrosión microbiológica de diversos metales. En todos los casos, el anión agresivo que inicia el proceso de picado es el cloruro, pero su acción se ve facilitada por la presencia de los metabolitos microbianos: sulfuros y ácidos orgánicos e inorgánicos.

- *Producción de sulfuros bajo condiciones anaerobias.*

Un ejemplo de este mecanismo es la corrosión localizada del acero inoxidable en presencia de cloruros, debido a la actividad de las BSR. Los sulfuros generados metabólicamente inestabilizan la película de óxido, facilitando el ataque de los iones cloruro, lo cual ocurre a valores de potencial más negativos que los observados en ausencia de los microorganismos.

Utilizando la enzima hidrogenasa, las BSR remueven el hidrógeno atómico de la superficie del metal (despolarización catódica), empleándolo posteriormente

en la reducción de sulfatos a sulfuros. La siguiente serie de ecuaciones explica este mecanismo, que se ilustra en la Figura 12:



**Figura 12. Proceso de corrosión en presencia de bacterias sulfato reductoras (BSR)**

- Producción de ácidos orgánicos e inorgánicos como sub-productos metabólicos

La corrosión del aluminio y sus aleaciones en sistemas de agua-combustible por el hongo *Cladosporium resinae* se explica por este mecanismo. Este hongo produce ácidos orgánicos que provienen de la oxidación metabólica de los hidrocarburos del combustible, los cuales inestabilizan la película de óxido de aluminio. Esto permite que los aniones cloruro inicien el ataque a potenciales más negativos que los registrados en ausencia de este microorganismo. Los ácidos orgánicos también provocan la pérdida de la pasividad del hierro y del acero al carbono, lo cual, en presencia de cloruros, provoca una intensa disolución asociada con picaduras.

Las bacterias oxidantes del azufre pueden producir hasta 10% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Este ácido mineral, con su bajo pH, es altamente corrosivo para muchos metales, cerámicas y concreto. Existen otras especies bacterianas que producen ácidos orgánicos similarmente corrosivos.

### *C. Consumo de inhibidores de corrosión*

Las células vivas contienen cantidades importantes de nitrógeno (N) y fósforo (P), mientras que poseen bajos niveles de cloruros (Cl<sup>-</sup>). La fuente de P más común para los microorganismos es el anión fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), que es un inhibidor de corrosión para aluminio y hierro. Por consiguiente, el consumo de fosfato por parte de los microorganismos incrementa la agresividad corrosiva del medio.

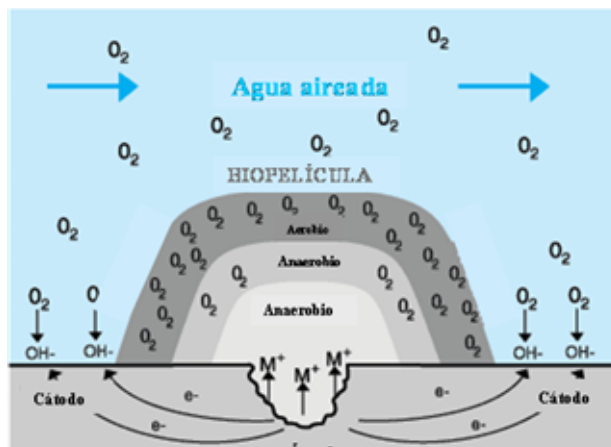
El anión nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) es un buen inhibidor de la corrosión del aluminio en soluciones que contienen cloruros. Sin embargo, algunos microorganismos (hongos filamentosos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida sp.*, etc.) son capaces de utilizar el  $\text{NO}_3^-$  como fuente de N, reduciéndolo a  $\text{NH}_4^+$ , el cual se incorpora a las proteínas celulares.

En ambos casos, el efecto del consumo de inhibidores de corrosión se manifiesta en un desplazamiento del potencial de picado ( $E_p$ ) hacia regiones más negativas.

### ▪ *D. Producción de aireación diferencial o celdas de concentración química*

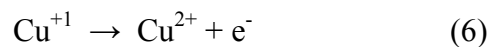
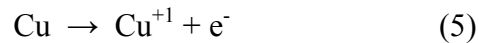
Las celdas de concentración diferencial de oxígeno producen una forma de corrosión electroquímica. La biopelícula formada sobre la superficie del metal o aleación no proporciona una cobertura uniforme, lo que le brinda la posibilidad de formar celdas de concentración. En ambientes aireados, las superficies desnudas del metal en contacto con el electrolito oxigenado, serán catódicas en relación con las áreas por debajo de la biopelícula. El metal que tiene contacto directo con el medio acuoso, se convierte en cátodo, donde el oxígeno se reduce.

Por debajo del depósito, la concentración de oxígeno disminuye conforme es utilizado por los microorganismos durante su metabolismo, convirtiéndose en ánodo, donde el metal se disuelve e inicia la formación de una picadura. Los productos de corrosión expanden el tamaño del depósito y posteriormente dificultan la difusión de agua, de modo que la velocidad de corrosión se intensifica en éstas zonas localizadas. La formación de dicha celda se muestra en la Figura 13.

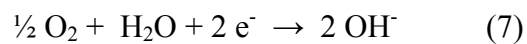


**Figura 13. Formación de celdas de concentración de oxígeno por debajo de la biopelícula.**

Conforme crece la picadura, el metal (cobre) se disuelve conforme a las reacciones anódicas:



La reacción catódica es la reducción del oxígeno disuelto en el exterior de la picadura para formar  $\text{OH}^{-}$  de acuerdo a la reacción:



Los productos de corrosión insolubles se forman por la reacción:



Los productos de corrosión se combinan con la película bacteriana formando un tubérculo el cual puede ser tan grande como para generar, por sí solo un problema de obstrucción en tuberías.

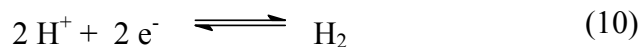
Los cloruros provenientes del medio se combinan con los iones cúpricos producidos por corrosión en presencia de las bacterias, formando una solución muy corrosiva de cloruros cuproso y cúprico, en el interior del tubérculo.

### **Mecanismos que involucran una modificación de la reacción catódica**

La producción de sustancias capaces de actuar como reactivos catódicos se detecta en el caso de las bacterias sulfato reductoras, en medio neutro generando mezclas de  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ . El  $\text{H}_2\text{S}$  puede actuar como agente catódico:



El  $\text{FeS}$  formado por estas bacterias durante la corrosión del hierro también acelera la descarga del  $\text{H}^+$  para dar  $\text{H}_2$ :



La producción de ácidos orgánicos por parte de los microorganismos aumenta la concentración de iones  $\text{H}^+$  capaces de reducirse a  $\text{H}_2$ , con lo cual se incrementa la velocidad de la reacción catódica.

En la práctica, estos mecanismos se pueden presentar simultáneamente. La presencia de varias especies químicas en un sistema también conduce a distintos mecanismos de corrosión simultáneos, que se intensifican en las zonas donde las colonias microbianas se encuentran adheridas a la superficie del metal. En esas regiones las especies químicas son

más agresivas, debido a que la concentración de metabolitos y el consumo de inhibidores es mayor.

## **2.3 DISPOSITIVO INTRAUTERINO (DIU) PARA CONTRACEPCIÓN**

### **2.3.1 Antecedentes**

El uso de los dispositivos intrauterinos (DIUs) tiene su origen en la antigüedad. Es probable que fueran los camelleros árabes los primeros en utilizar un mecanismo similar al del DIU actual, para evitar que sus camellas quedaran embarazadas durante sus travesías por el desierto. Ellos introducían, a través una caña hueca, unas piedritas en el útero. Las mujeres egipcias utilizaban una bola hecha a base de excremento de cocodrilo y miel. Posteriormente, en el siglo XIX se empleaban instrumentos contraceptivos de plomo, zinc, estaño y de diamantes mezclados con platino. Sin embargo, estos sistemas no eran estrictamente DIUs ya que se colocaban en la vagina, en lugar del útero.

El primer DIU propiamente dicho lo diseñó el médico alemán R. Richter, en 1909, y consistía en un anillo hecho de víscera animal enrollado con un hilo de seda natural. En 1928, el alemán Erns Grafenberg presenta un anillo de 1.5 centímetros de diámetro constituido de un fino hilo de plata enrollado en espiral, que se introducía en la cavidad uterina con el objetivo de evitar la implantación del óvulo fecundado.

El japonés Ternei Ota implementó el uso de anillos intrauterinos de oro y de aleación oro-plata. Posteriormente, la utilización de los DIUs fue prohibida en muchos países debido a los riesgos de infección en aquella época, cuando el consumo de antibióticos no era generalizado. Esta actitud se mantuvo hasta 1963, cuando en la primera Conferencia Internacional sobre los DIUs, celebrada en El Cairo, se dieron a conocer las experiencias favorables en el uso de estos dispositivos.

Por otro lado, el desarrollo del polietileno, un plástico biológicamente inerte y con memoria de forma, significó un paso importante para la aplicación generalizada de los DIUs. Los primeros fueron el espiral de Marguiles y el Lippes Loop. Más tarde, se perfeccionó el dispositivo con un hilo de prolongación transcervical que ayudaba a detectar y a retirar el DIU.

Tras la Conferencia de El Cairo se empezó a extender la utilización de los DIUs de segunda generación, denominados también “medicados”. El primero de ellos fue desarrollado por Zipper y Tatum. Este nuevo DIU consistía de una estructura de polietileno en forma de “T” o de “7”, alrededor de la cual se coloca un alambre de cobre enrollado a su alrededor formando una espiral.

Este último diseño se sigue utilizando en la actualidad, y se han implementando algunas modificaciones. En algunos modelos, además del espiral, se utilizan placas de cobre sobre los brazos del polietileno, con la finalidad de incrementar el área superficial de cobre expuesta a los fluidos uterinos.

Otra modificación es utilizar una espiral de plata recubierta con cobre, a fin de evitar las rupturas que pudieran generarse debido a la intensa corrosión localizada que se genera; un ejemplo de este DIU es el NovaT. Se ha propuesto también el uso de oro y platino en vez de plata, pero esto implica costos más elevados.

El efecto contraceptivo de los DIUs se atribuye a la liberación de iones de cobre, como resultado de la oxidación (corrosión) del cobre metálico en el útero. Para entender el comportamiento de los DIUs de cobre, se han realizado una serie de experimentos *in vitro*.

En muchos de estos estudios se utiliza un medio uterino simulado, preparado artificialmente a partir de sustancias orgánicas e inorgánicas<sup>6</sup>. Sin embargo, se sabe que el fluido uterino humano es una mezcla mucho más compleja, que contiene además varios componentes bioquímicos orgánicos como aminoácidos, proteínas y péptidos.

Además, se ha reportado que el fluido uterino presenta algunos cambios bioquímicos después de la inserción del DIU.

Los análisis bioquímicos indican que la concentración de proteínas en útero varía de 141.2 mg/dL a 530 mg/dL en ciclos menstruales regulares.


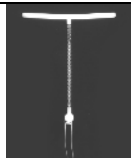



### **2.3.2 Estructura y componentes de los DIUs de cobre**

Existen diferentes modelos de DIUs de cobre. Su diferencia radica, básicamente, en la cantidad de cobre utilizada, que es proporcional a su tiempo de vida. Para incrementar el área superficial del cobre en el interior de la cavidad uterina, se puede incrementar la longitud del espiral o bien, colocar placas adicionales de cobre ya sea longitudinal o transversalmente sobre la estructura de polietileno. La tabla 1 describe los diferentes modelos de DIUs de cobre.

### **2.3.3 Mecanismo de acción**

Con el transcurso de los años se han formulado varias hipótesis acerca del mecanismo de acción de los DIUs. La teoría más aceptada es la de que el DIU produce una reacción inflamatoria dentro del útero, como respuesta hacia un cuerpo extraño. Esto produce cambios celulares y bioquímicos en el endometrio y líquidos uterinos, dando lugar a que las defensas del cuerpo generen un mayor número de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares; en el endometrio aparecen también células plasmáticas y macrófagos, que consumen por fagocitosis a los espermatozoides o al óvulo fecundado<sup>20</sup>. Los cambios cíclicos normales del endometrio pueden sufrir retraso o alterarse debido a la reacción inflamatoria, de manera que la implantación no se lleva a cabo. Sin embargo, no se ha demostrado que el DIU de cobre provoque alguna modificación en la función hormonal.

**Tabla 1. Dispositivos Intrauterinos de cobre**

Nombre / Características	Figura
<p><b>TCu-380A y TCu-380S</b></p> <p>Contiene 314 mm<sup>2</sup> de cobre en el espiral y dos placas de 33 mm<sup>2</sup> en cada uno de los brazos. En el TCu380S las placas de cobre están colocadas al final de los brazos.</p>	
<p><b>TCu-200 B</b></p> <p>Contiene un espiral de cobre con 200 mm<sup>2</sup>, la base de polietileno tiene una terminación esférica.</p>	
<p><b>Nova T y CuNovaT</b></p> <p>El NovaT contiene un espiral con alma de plata (11-29 mg Ag) y 200 mm<sup>2</sup> de cobre. El CuNovaT tiene un espiral con 380 mm<sup>2</sup>. El alma de plata previene la fragmentación del alambre y prolonga la vida del dispositivo.</p>	
<p><b>Multiload-250</b></p> <p>Polietileno con dos brazos flexibles ramificados. El MLCu-250 tiene 250 mm<sup>2</sup> de cobre en el espiral y está disponible en 2 tamaños: estándar y corto</p>	
<p><b>TCu-220C</b></p> <p><b>Descripción:</b> 220 mm<sup>2</sup> de cobre distribuidos en 7 placas: 2 en los brazos y 5 en el cuerpo.</p>	

La presencia de iones de cobre alteran la composición bioquímica del moco cervical, lo cual afecta la motilidad, alcance y supervivencia de los espermatozoides. Existen estudios que demuestran que los DIUs de cobre previenen la fertilización disminuyendo el número y la viabilidad de espermatozoides que alcanzan el óvulo<sup>3</sup>. El cobre ejerce su acción sobre las enzimas del útero, el contenido de DNA de células endometriales, el metabolismo del glucógeno y la captación de estrógenos por la mucosa uterina.

El DIU puede utilizarse también como un sistema administrador de fármacos para tratar ciertas enfermedades<sup>20</sup>. Puede utilizarse para introducir medicamentos

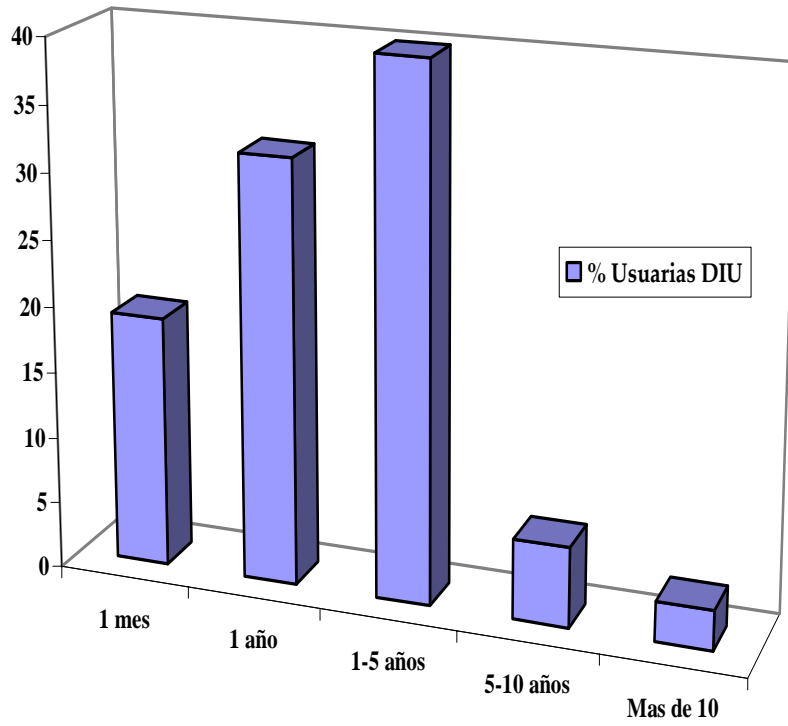
esclerosantes intrauterinos, provocando la oclusión de los orificios tubarios. Puede mejorar el potencial anticonceptivo de los fármacos inmunológicos contra los antígenos espermáticos, los receptores de progesterona y de gonadotropina coriónica humana (GCH). Asimismo, puede emplearse para administrar medicamentos contra las enzimas espermáticas como acrosina y hialuronidasa. También es posible tratar la hemorragia disfuncional, hiperplasia endometrial o endometriosis crónica añadiendo esteroides o antibióticos.

#### **2.3.4 Prevalencia de uso**

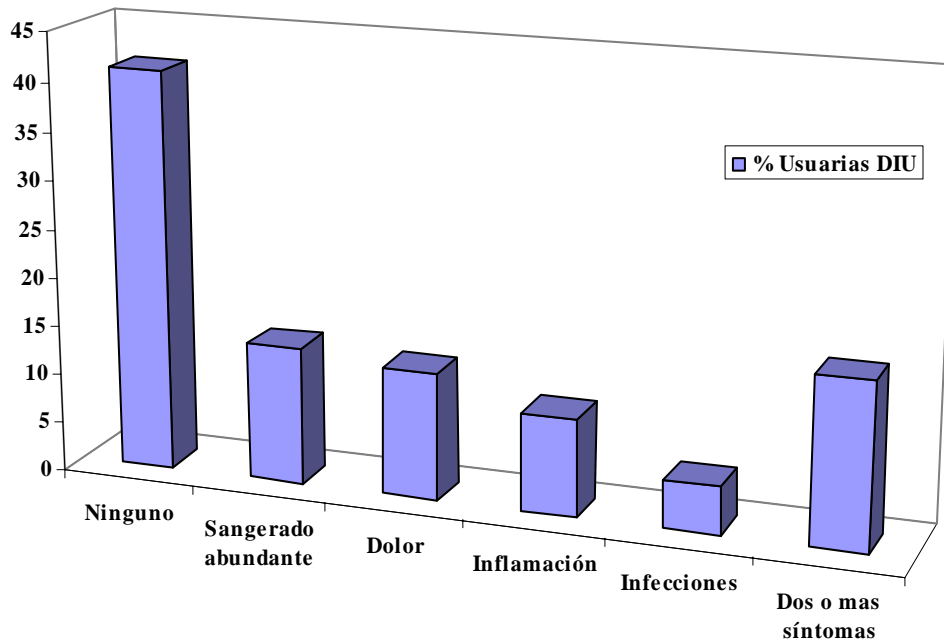
El DIU es el anticonceptivo más utilizado a nivel mundial. Los DIUs varían de un país a otro, reflejando las diferencias en cultura, selección y disponibilidad de anticonceptivos, así como expectativas de la mujer portadora. El efecto contraceptivo del DIU de cobre es revertido cuando se retira el dispositivo. Se realizó un estudio<sup>21</sup> en la ciudad de Mexicali, B.C., para determinar la prevalencia del uso del DIU en mujeres portadoras que acudieron al servicio de Planificación Familiar de la Clínica 28 del I.M.S.S. La información obtenida de las encuestas aplicadas se presenta en la Figura 13.

#### **2.3.5 EFECTOS SECUNDARIOS Y COMPLICACIONES**

El éxito de todo método de anticoncepción se evalúa en base al índice de aceptación y la continuación de su uso, lo que depende de la efectividad y efectos secundarios que presente. La tasa de falla para el DIU es mayor durante el primer mes; su discontinuación durante el primer año es de 22.6 tanto por expulsión como por indicaciones médicas por dolor y/o hemorragias severas. El índice de embarazo de 2.4 también es mayor dentro del primer año. Entre las complicaciones que se pueden presentar por el uso del DIU se encuentran: sangrado y dolor, expulsión, perforación uterina, embarazo, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), entre otras. La Figura 14 muestra los principales efectos secundarios que experimentaron las mujeres portadoras del DIU durante un estudio realizado en el I.M.S.S.<sup>21</sup>.



**Figura 13a. Prevalencia de uso del DIU en mujeres portadoras**

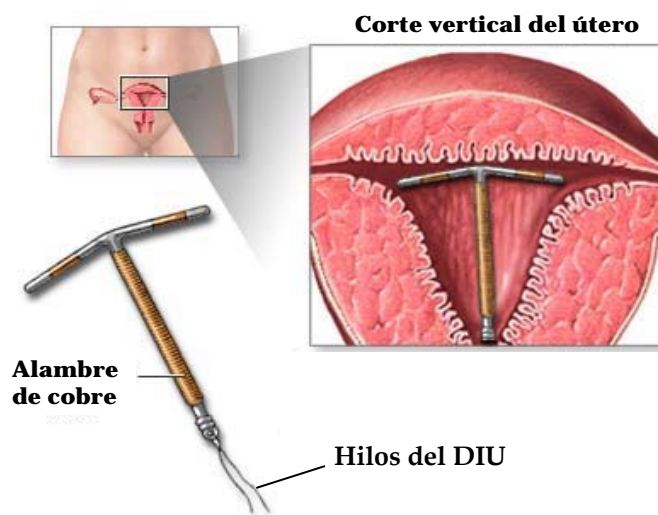


**Figura 14. Efectos secundarios del DIU en mujeres portadoras**

## 2.4 EL ÚTERO

### 2.4.1 Interacción DIU-útero

Previamente a la inserción de un DIU, el médico debe realizar un examen pélvico para determinar el tamaño, forma, profundidad y posición del útero. El DIU debe permanecer en su empaque estéril hasta el momento de la inserción. Los hilos adjuntos al DIU deben extenderse en el interior de la vagina hacia la apertura cervical para cortarse posteriormente.



**Figura 15. Posición de un DIU en el interior de la cavidad uterina**

La inserción de un DIU dentro de la cavidad uterina, representa la introducción de una toxina ambiental que debilita la respuesta inmunológica del huésped hacia otros antígenos. La presencia de un DIU rompe el balance entre las bacterias y el mecanismo de defensa, haciendo al individuo más susceptible a la colonización bacteriana<sup>19</sup>. Estos cambios intrauterinos, provocados por los DIUs se presentan como alteraciones físicas y biológicas simultáneamente, entre los cuales se pueden mencionar:

1. Depósitos amorfos
2. Células inflamatorias
3. Acumulación de bacterias

4. Depósitos cristalinos
5. Agrietamiento / Fracturas
6. Distorsión
7. Corrosión

La migración de microorganismos (bacterias, levaduras u hongos) hacia la parte alta del tracto urogenital femenino, frecuentemente genera infecciones. Investigaciones previas revelan que el 75% de los DIUs retirados de pacientes con infecciones genito-uritarias, estaban recubiertos por un consorcio de microorganismos. Se considera que los hilos que forman parte del cuerpo del DIU, posiblemente sean una de las rutas de migración microbiana desde la vagina hacia el útero<sup>13</sup>. La Tabla 2 muestra la identificación y porcentaje de distribución de los microorganismos encontrados en 86 muestras de DIUs removidos:

**Tabla 2. Microorganismos aislados e identificados en DIUs infectados**

<b>Microorganismo</b>	<b>% de Incidencia</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	27
<i>Candida albicans</i>	20
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2
<i>Candida dubliniensis</i>	12

Pruthi *et al.*, 2003

#### **2.4.2 Colonización bacteriana del tracto urogenital**

La orina normalmente es estéril, y debido a que el tracto urinario es lavado periódicamente, los microorganismos tienen problemas para tener acceso y establecerse. La flora de la uretra anterior, indicada principalmente por los cultivos urinarios, sugiere que el área puede estar habitada por flora normal consistente principalmente de

*Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y algunos streptococcus  $\alpha$ -hemolíticos. Además, algunas bacterias entéricas (*E. coli*, *Proteus*) y corynebacteria, los cuales probablemente son contaminantes de la piel, vulva o recto, pueden encontrarse ocasionalmente en la uretra anterior<sup>15</sup>.

Los microorganismos que se encuentran formando parte de la flora vaginal se pueden clasificar de la siguiente manera:

<b>Etapa</b>	<b>Microorganismos presentes</b>
<b>Recién nacido</b>	Estéril
<b>Pre-pubertad (pH Alcalino)</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (++++) <i>Anaerobios</i> (+++) <i>Corynebacteria</i> (+) <i>Lactobacillus</i> (+) <i>Streptococcus</i> (+)
<b>Post-pubertad (pH Ácido)</b>	<i>Lactobacillus</i> (++++) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (+++) <i>Streptococcus</i> (++) <i>Corynebacteria</i> (+) <i>Anaerobios</i> (+) <i>Gardnerella vaginalis</i> (+)
<b>Miembros ocasionales</b>	<i>Candida</i> , <i>Fungi</i> , <i>Micoplasma</i> , <i>Actinomyces</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Patógenos</b>	<i>Tricomonas</i> , <i>Chlamydia</i> , virus del papiloma humano (VPH), <i>Leptothrix</i> , entre otros.
<b>Embarazo</b>	Ligeras variaciones

Algunos de los factores que producen alteraciones de la flora vaginal son:

- La actividad sexual (más *G. vaginalis*, *Micoplasma*, *ureaplasma*, *Lactobacillus*)
- La presencia de algún cuerpo extraño como tampón, DIU, diafragma u otros anticonceptivos de barrera. (más *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*).
- El uso de antibióticos, favoreciendo el desarrollo de algunos hongos y levaduras.
- La recurrencia de infecciones.

Después del nacimiento, la vagina es colonizada por *Corynebacteria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, y bacterias del ácido láctico, conocido como “bacilos de Döderlein” (*Lactobacillus acidophilus*). El glucógeno presente en el epitelio vaginal, el cual proviene de la actividad de los estrógenos circulantes, es utilizado por los bacilos de Döderlein para la producción de ácido láctico. Éste ácido junto con otros productos del metabolismo, inhibe la colonización de la mayoría de los bacilos, excepto el de Döderlein y otras bacterias del ácido láctico.

El bajo pH que se genera en el epitelio vaginal, previene su colonización por otras bacterias y levaduras patógenas como *Candida albicans*. Este es un ejemplo del efecto protector que imparte de la flora bacteriana normal hacia el huésped humano.

Con frecuencia se presentan infecciones agudas del tracto urogenital por *E. coli*; ésta entra por la vejiga, se adhiere a la mucosa y se multiplica. La detección de una infección en vejiga está determinada por la presencia de un elevado número de bacterias planctónicas en orina, así como la presencia de glóbulos blancos y, en algunas ocasiones, glóbulos rojos.

Cuando se trata de infecciones vaginales, los posibles agentes causales son organismos específicos como *Gardnerella*, *Chlamydia sp.*, virus y *Candida sp.* Sin embargo, la presencia de microorganismos patógenos en vagina no necesariamente produce una infección. Entonces, ¿cuál es la diferencia entre las células y el entorno de la vagina comparado con la vejiga? En relación con *E. coli*, en ambas células existen sitios receptores, anticuerpos y disponibilidad de nutrientes.

La principal diferencia es que las células de la vagina están cubiertas diversos microorganismos; la flora vaginal normal y la respuesta inmunológica del huésped determinará si *E. coli* será patógena o no para el organismo.

La presencia de *Lactobacillus* es importante en la prevención de infecciones vaginales. Algunas de las propiedades que le confieren tal protección son:

- i. Los microorganismos patógenos que compiten, deben ser capaces de adsorberse a las células uroepiteliales. El mecanismo de adherencia está en función de los ácidos lipoteicoicos, polisacáridos, proteínas y tripsina, componentes presentes en la pared celular y secretados hacia el medio.
- ii. Los lactobacilos previenen o minimizan la adsorción y colonización de uropatógenos, por tanto, la flora resultante será menos susceptible a ser dominada por patógenos infecciosos (exclusión competitiva).
- iii. En presencia de microorganismos patógenos, los lactobacilos producen sustancias que inhiben el crecimiento y desarrollo de dichos organismos, manteniendo así una flora normal.
- iv. Si existe una flora balanceada, los lactobacilos serán capaces de adaptarse a la presencia de diferentes tipos de bacterias, estableciendo un balance microbiano por cooperación con dichos organismos.
- v. Dado que el tracto urogenital se expone a agentes anti-microbianos y espermicidas, los lactobacilos desarrollan colonias más resistentes que soportan la acción de estos compuestos.

## **2.5 COBRE**

### **2.5.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS**

El cobre pertenece al grupo IB de la tabla periódica. Es un metal de color pardo rojizo, dúctil y maleable. Suele encontrarse en el ambiente formando compuestos con valencia +2, pero pueden existir estados metálicos de valencia +1 y +3. En la naturaleza se encuentra en una gran variedad de sales minerales, compuestos orgánicos y en forma metálica. El metal es muy poco soluble en soluciones acuosas, salinas o ligeramente ácidas, pero se puede disolver en los ácidos nítrico y sulfúrico, así como en soluciones básicas de hidróxido o carbonato de amonio. Posee una elevada conductividad eléctrica y térmica y es resistente a la corrosión.

## Química del cobre

El cobre es el elemento 29 de la tabla periódica, su configuración electrónica es  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1$ . Partiendo de su configuración podría predecirse que la química del cobre sería similar a la de otros metales alcalinos. Sin embargo no es adecuado hacer una comparación de este tipo, ya que no se tomaría en consideración el hecho de que la capa llena  $3d$  es mucho menos efectiva que una capa  $p$  para la protección de un electrón externo  $s$  frente a las fuerzas atractivas de un núcleo cargado positivamente.

Normalmente se encuentra que el estado cuproso se vuelve más estable conforme incrementa el carácter covalente de enlaces Cu-X, lo cual ocurre con ligandos polarizables o ligandos capaces de aceptar electrones provenientes de los orbitales  $d$  del cobre; un ejemplo de ello es el incremento en la estabilidad del estado cuproso en soluciones acuosas de halogenuros, conforme el halógeno se cambia de fluoruro a yoduro.

En sistemas biológicos, son las proteínas las que proporcionan el efecto de estabilización del estado cobre(I), enlazando el metal a los sitios activos de los ligandos en el interior de la molécula.

- **Compuestos de Cobre (I)**

En este estado de oxidación el cobre tiene su capa  $3d$  llena y los compuestos cuprosos generalmente son blancos y diamagnéticos. El número de coordinación más comúnmente adoptado por Cu(I) es cuatro: el átomo metálico rodeado tetrahédricamente por los cuatro ligandos; se conocen también números de coordinación de dos (lineal) y tres (trigonal plano), pero son menos comunes.

1. *Halogenuros cuprosos*: La reducción de cloruro o bromuro cúprico con diferentes agentes reductores, da como resultado la formación de un

precipitado blanco de cloruro o bromuro cuproso. La adición de iones halógeno incrementa la solubilidad de las sales cuprosas debido a la formación de aniones halocuprato(I) del tipo  $\text{CuX}_2^-$  y  $\text{CuX}_3^{2-}$ . La solubilidad de halogenuros cuprosos en solventes orgánicos como aminas y cianuros, se debe en parte, a la formación de complejos entre el solvente y los átomos de cobre.

2. *Óxido cuproso,  $\text{Cu}_2\text{O}$* : El óxido de cobre se encuentra nativo como cuprita roja; es un compuesto covalente, diamagnético, que funde a  $1230^\circ\text{C}$ . El amonio acuoso disuelve el óxido cuproso para dar una solución incolora, debido posiblemente a la formación de un catión solvatado cobre-amino.

- **Compuestos de Cobre (II)**

En este estado de oxidación el cobre tiene la configuración electrónica  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^9$ . Los números de coordinación comúnmente adoptados por cobre (II) son cuatro, cinco y, con mayor frecuencia, seis.

*Óxido e hidróxido cúprico.* El  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  puede prepararse adicionando al sulfato cúprico la cantidad suficiente de amonio acuoso para mantener al cobre en solución. Posteriormente se precipita el hidróxido ya sea por adición de una cantidad equivalente de álcali o removiendo el amonio de la solución utilizando un desecador que contenga ácido sulfúrico.

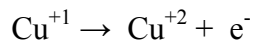
El hidróxido cúprico obtenido de esta forma es cristalino pero inerte. En presencia de un exceso de iones hidroxilo, el gel  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  se ennegrece por deshidratación espontánea a óxido; la estabilización de este gel por sulfatos de metales pesados no es propiamente un fenómeno de estabilización, pero consiste en la formación de un sulfato azul básico. Las principales especies formadas durante la hidrólisis del ion cúprico son los iones polinucleares  $\text{Cu}_n(\text{OH})_{2n-2}^{++}$ , no  $\text{CuOH}^+$ .

La estructura del hidróxido cúprico contiene cadenas de átomos de cobre unidos por grupos hidroxilo. Las cadenas están empacadas de modo tal que dos átomos de hidrógeno de diferentes cadenas se encuentran por arriba y debajo de cada átomo de cobre, el cual después toma la configuración octaédrica (cuatro oxígenos a 1.93 Å; otros dos a 2.63 Å; distancia cobre-cobre, 2.95 Å)

En presencia de iones citrato el peróxido no se precipita, permanece en solución la cual se torna color café intenso; la solución lentamente desprende oxígeno y regresa a su color azul original. El producto de una fuerte oxidación de hidróxido cúprico puede ser un compuesto de cobre (III), posiblemente  $\text{CuO}\cdot\text{OH}^{22}$ .

### 2.5.2 Corrosión del cobre

El cobre y sus aleaciones son muy particulares entre las aleaciones resistentes a la corrosión, debido a que no forman una verdadera capa pasiva de productos de corrosión. En medio acuoso a temperatura ambiente, el producto de corrosión responsable predominantemente de la protección es óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Esta película de  $\text{Cu}_2\text{O}$  es adherente y sigue una cinética de crecimiento parabólica. El óxido cuproso se forma a partir de las semi-reacciones electroquímicas:



Para que la reacción de corrosión proceda, los iones cobre y los electrones deben migrar hacia la película de  $\text{Cu}_2\text{O}$  y reducir consecuentemente la conductividad iónica o electrónica de la película por dopado con cationes divalentes o trivalentes, lo que debe mejorar la resistencia a la corrosión.

En la práctica, se utilizan aleaciones con adiciones de aluminio, zinc, estaño, hierro y níquel para dopar la capa de productos de corrosión, y ésto generalmente disminuye las velocidades de corrosión significativamente.

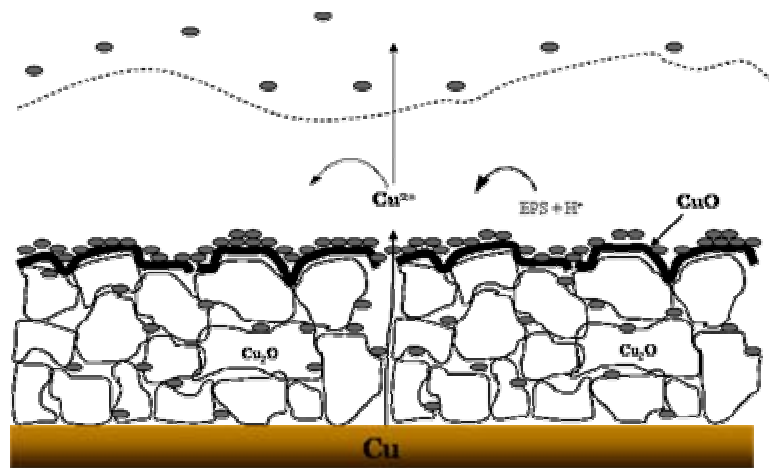
Los DIUs de cobre experimentan el proceso de corrosión, de manera espontánea, una vez que éstos entran en contacto con los fluidos uterinos. Debido a la naturaleza y agresividad del medio uterino, la corrosión del cobre no siempre se presenta de manera uniforme, sino que se intensifica en áreas específicas ocasionando un deterioro muy localizado del tipo picaduras, las cuales se pueden intensificar hasta provocar la ruptura del espiral, ocasionando daños severos a las usuarias. La caracterización electroquímica del proceso de corrosión del cobre de los DIUs se ha realizado bajo diferentes condiciones por diversos autores<sup>8-12</sup>, encontrando que los principales productos de corrosión encontrados fueron cuprita ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) y tenorita ( $\text{CuO}$ ).

### **2.5.3 Corrosión microbiológica en cobre**

Existen reportes que manifiestan la liberación de sub-productos de cobre en el interior de las paredes de los tubos utilizados para el suministro de agua potable, provocando que el agua tenga una apariencia de color azul-verdosa<sup>23</sup>. Las causas por las que se presenta este fenómeno se relacionan con un mecanismo de corrosión microbiológicamente inducida (MIC). Investigaciones en MIC muestran que ciertas especies bacterianas pueden adherirse y desarrollarse, en el interior de una biopelícula, sobre superficies de cobre, disipando la creencia de que los iones cobre son tóxicos para todas las bacterias.

Se han propuesto dos modelos que describen la MIC en cobre<sup>23</sup>. Un modelo sugiere que los exopolisacáridos (EPS) generados por la bacteria durante su actividad metabólica, producen zonas catódicas debido a la naturaleza iónica de los EPS. El segundo modelo propone que durante la MIC se desarrollan celdas de concentración

de cobre, debido a la formación de enlaces de los iones cobre con los EPS producidos microbiológicamente, así como la generación de un ambiente ligeramente ácido. La capa de óxido se ve afectada por la biopelícula generada, ya que ésta le imparte una porosidad adicional mediante la incorporación de los microorganismos y sus EPS, tal como se esquematiza en la Figura 16.



**Figura 16. Diagrama esquemático que muestra la naturaleza de la película de óxido de cobre en presencia de MIC.**

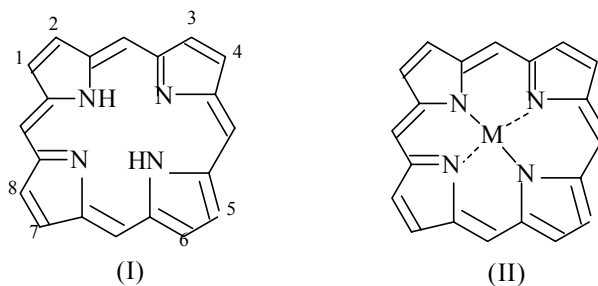
### 2.5.3 Cobre en sistemas biológicos

El cobre es uno de los elementos traza esenciales para el funcionamiento adecuado de plantas y animales, ya que forma parte del grupo prostético de enzimas oxidantes (por ejemplo ácido ascórbico oxidasa, tirosinasa, laccasa, monoamino oxidasa, citocromo oxidasa y galactosa oxidasa). Estas oxidasas son proteínas de elevado peso molecular que contienen 0.05-0.35% de cobre, que participan en los procesos vitales de oxidación y reducción, intercambiando cíclicamente entre los estados Cu(I) y Cu(II). El metal se encuentra fuertemente unido a los sitios ligandos en las proteínas (átomos de O, S o N).

- **Cobre en tejidos, sangre y otros fluidos**

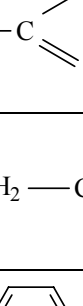
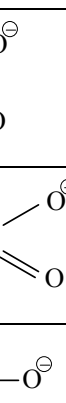
El cobre se encuentra en todos los órganos y tejidos del cuerpo humano, normalmente unido a proteínas o compuestos orgánicos y no como iones libres. Las proteínas se coordinan con el cobre a través de los grupos donadores presentes en los restos de aminoácido, que constituyen la cadena polipeptídica. Los ligandos más comunes son los grupos imidazol, tiolato, carboxilato, fenolato y tioéter. Estos grupos y el aminoácido correspondiente se presentan en la Tabla 3. También las bases nucleicas tienen una gran capacidad de coordinación. Asimismo, los grupos fosfato y las pentosas de los nucleótidos también son ligandos apropiados para muchos centros metálicos.

Aparte de estos tipos de ligandos, los sistemas biológicos han generado otra serie de ligandos muy particulares, y capaces de impartir a los centros metálicos a los que complejan, propiedades sumamente interesantes e importantes. Estos ligandos son, principalmente, macrociclos tetrapirrólicos, que actúan como quelantes tetradentados. Los más importantes y difundidos en la naturaleza son las porfirinas. Las porfirinas constituyen un grupo muy amplio e importante de complejos metálicos que se presentan comúnmente en sistemas biológicos. Estos complejos tienen como ligante básico al macrociclo llamado **porfina**. Los derivados de la porfina, por sustitución en las posiciones de 1 a 8 reciben genéricamente el nombre de **porfirinas**, y cuando ambos hidrógenos de los grupos NH son desplazados, por incorporación de un ion metálico, se les llama **metaloporfirinas**. La Figura 17 muestra la formación de una metaloporfirina.



**Figura 17. Estructura de la porfina (I) y de una metaloporfirina (II).**

**Tabla 3. Restos de aminoácidos más importantes como ligandos en una metaloproteína.**

$\left[ \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{---C---CH---NH---} \\   \\ \text{R} \end{array} \right]$ Resto de aminoácido (unidad constituyente de la cadena polipeptídica)		
Aminoácido	Cadena R	Grupo coordinante
Histidina (His)	$\text{---CH}_2\text{---}$ 	Imidazol
Cisteína (Cis)	$\text{---CH}_2\text{---S}^\ominus$	Tiolato
Glutamato (Glu)	$\text{---CH}_2\text{---C} \begin{array}{l} \diagup \text{O}^\ominus \\ \diagdown \text{O} \end{array}$	Carboxilato
Aspartato (Asp)	$\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C} \begin{array}{l} \diagup \text{O}^\ominus \\ \diagdown \text{O} \end{array}$	Carboxilato
Tirosina (Tyr)	$\text{---CH}_2\text{---}$ 	Fenolato
Metionina (Met)	$\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---S---CH}_3$	Tioéter

El nivel total de cobre en sangre varía de 1.1 – 1.5 µg/ml, aunque estos valores pueden fluctuar con la edad, ejercicio y condiciones de salud. Alrededor de 90-95% del cobre plasmático se une a la ceruloplasmina, una proteína plasmática. Existe una fracción menor de cobre ligado a albúmina plasmática y aminoácidos. El cobre en eritrocitos se encuentra asociado con la superóxido dismutasa o con una mezcla compleja de aminoácidos. Los valores promedio de los principales órganos de almacenamiento se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Valores promedio de cobre en los principales órganos de almacenamiento**

<b>Órgano</b>	<b>Valores típicos de cobre (<math>\mu\text{g/g}</math> peso húmedo)</b>	
	<b>Adulto</b>	<b>Infantes</b>
Hígado	5.1	19.0
Corazón	3.0	2.6
Riñón	2.0	3.1
Cerebro	6.3	3.7

- **Cinética y metabolismo del cobre**

El cobre participa en una gran variedad de procesos metabólicos. Sin embargo, al igual que otros elementos traza como hierro y zinc, su exposición excesiva puede ser tóxica. Los mecanismos de absorción y almacenamiento de cobre incluyen quelantes biológicos, receptores específicos, proteínas y péptidos secuestrantes.

El cobre se absorbe principalmente en el medio ácido del estómago y parte superior del intestino, formando complejos con aminoácidos como histidina y otros péptidos (Tabla 3); el cobre también se puede absorber en la parte baja del intestino. Cuando el cobre llega a la sangre proveniente del intestino, se enlaza fuertemente a la albúmina sérica, y solamente hasta llegar al hígado se incorpora a la ceruloplasmina.

- **Funciones biológicas del cobre**

Cerca del 25% de las enzimas contienen iones metálicos. Las enzimas activadas por metales (metaloenzimas) se unen con éstos para ser activadas. Los

mecanismos en donde participan los iones metálicos para incrementar la velocidad de las reacciones químicas son<sup>27</sup>:

1. Catálisis general ácido-base. Los iones metálicos pueden aceptar electrones a través de los enlaces  $\sigma$  o  $\pi$  para activar electrófilos o neutrófilos
2. Catálisis covalente. Por donación de electrones, los metales pueden activar a los neutrófilos o actuar como nucleófilos ellos mismos.
3. Aproximación de los reactantes. La esfera de coordinación de un metal puede atraer a la enzima y al sustrato.
4. Inducción de rigidez o tensión en la enzima o el sustrato. La esfera de coordinación de un metal puede crear una distorsión que produce quelatos en los mismos.

Los iones metálicos, al igual que los protones, son ácidos de Lewis (electrófilos) y pueden compartir un par de electrones para formar un enlace sigma ( $\sigma$ ). También (a diferencia de los protones), los metales pueden servir como moldes tridimensionales para la orientación de los grupos básicos en la enzima o el sustrato. Además, un ion metálico puede “enmascarar” a un nucleófilo y así prevenir una probable reacción secundaria. Finalmente, el control estereoquímico del curso de una reacción catalizada por enzimas, puede lograrse por la propiedad de la esfera de coordinación del metal de actuar como un molde tridimensional para mantener los grupos reactivos en una orientación espacial específica.

El papel del cobre en actividades enzimáticas de oxidación-reducción es una consecuencia de su habilidad para funcionar como intermediario en la transferencia de electrones. Así, el cobre está presente en enzimas de los procesos de respiración celular, protección contra radicales libres, función neurotransmisora, biosíntesis de tejido conectivo y metabolismo del hierro celular.

En algunas de ellas, el cobre se requiere como cofactor, por ejemplo superoxidasas dismutasa 1 (SOD1), citocromo oxidasa y ceruloplasmina. En otros casos, el cobre está involucrado como un componente enzimático, lo que le confiere una estructura específica para su actividad catalítica. Ningún otro elemento puede ser sustituido por estas proteínas para proporcionar las propiedades redox que el cobre provee.

Las proteínas de cobre están ampliamente distribuidas en el organismo; éstas realizan diversas funciones incluyendo el transporte de oxígeno y electrones, catálisis en reacciones de oxidación-reducción y la protección de la célula contra los dañinos radicales de oxígeno. Algunas de estas proteínas así como su función biológica, se presentan en la Tabla 5:

**Tabla 5. Funciones biológicas de las proteínas de cobre**

<b>Función</b>	<b>Proteína de cobre</b>	<b>Masa molecular (kDa)</b>
Transporte de O <sub>2</sub>	Hemocianina	500 – 9,000
Transferencia electrónica	Proteínas azules de cobre (plastocianina, azulina, etc)	10 – 20
Oxigenasas	Dopamina β-monooxigenasa Tirosinasa Quercetinasa	290 42 110
Oxidasas azules (O <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Lacasa Ascorbato oxidasa Ceruloplasmina	60 - 140 145 130
Oxidasas no azules (O <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Galacto oxidasa Amino oxidasa	68 160 - 200
Oxidasa terminal (O <sub>2</sub> → 2H <sub>2</sub> O)	Citocromo <i>c</i> oxidasa	170
Dismutación de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (2O <sub>2</sub> <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Cu, Zn-superóxido dismutasa	32
Reducción de nitrito	Nitrito reductasa de cobre	75 - 120

- **Bases bioquímicas de la toxicidad del cobre**

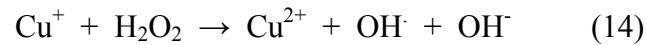
Contrario a su función como elemento traza esencial, el cobre puede ser tóxico en cantidades elevadas, especialmente para organismos pequeños como bacilos, hongos y algas, aunque algunos hongos pueden crecer en soluciones concentradas de sulfato de cobre. La toxicidad se presenta cuando el control homeostático se rompe y/o los mecanismos de defensa y reparación celular están desequilibrados.

La toxicidad de cobre en sistemas biológicos se debe a su configuración electrónica, principalmente por los electrones de valencia más externos. El ion cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) es altamente polarizable y se une principalmente a ligandos que contienen nitrógeno y azufre, compartiendo sus orbitales electrónicos. Por otro lado, el ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) forma complejos de coordinación con ligandos que contienen oxígeno y enlaces covalentes parciales con nitrógeno y azufre como átomos centrales. Por lo tanto, el cobre debe considerarse bastante reactivo y capaz de enlazarse fuertemente a diferentes tipos de estructuras ricas en electrones. La afinidad de los iones de cobre hacia un ligando específico, también está influenciada por la polarizabilidad del ligando.

La toxicidad del cobre se puede considerar cuando el exceso de éste provoca las siguientes reacciones adversas:

- Problemas estructurales de los sitios activos por desplazamiento de metales, lo que da como resultado cambios en la membrana tales como depolarización y desequilibrio de receptores o transportadores de moléculas.
- Problemas funcionales de enlace de cobre en sitios específicos de macromoléculas como DNA o enzimas que contienen sulfhidrilos, carboxilatos o imidazoles. Esto generará un daño directo a las proteínas o cambios oxidativos en el DNA, lo que provoca cambios funcionales debido al gran número de enzimas dependientes de cobre y a la posible mala interpretación de códigos genéticos.

- Daño celular debido a la producción de oxiradicales vía reacción de Fenton:



La producción excesiva de dichos radicales iniciará una cascada de reacciones de oxidación-reducción (estrés oxidativo), provocando finalmente la pérdida de la integridad celular. Las causas de daño consideradas incluyen el incremento de niveles de calcio citosólico, agotamiento de ATP, oxidación de tioles, peroxidación de lípidos, daño al DNA y daño crítico a organelos como mitocondrias y lisosomas.

El cobre tiene un uso limitado en medicina humana y veterinaria. Sin embargo, sigue siendo uno de los principales constituyentes de muchas amalgamas metálicas utilizadas en odontología y continúa utilizándose en la elaboración de dispositivos intrauterinos anticonceptivos.

# Capítulo 3

## Metodología Experimental

### 3.1 OBTENCIÓN DE *Enterobacter sp.*

Para la obtención de las cepas, se realizó el aislamiento a partir de un DIU T Cu 380A removido de una paciente de 34 años, gestas: 1, para: 1, con infecciones recurrentes y uso del DIU por 5 años. En el DIU se encontró la presencia de diferentes colonias, aunque la especie más resistente que continuó desarrollándose fue *Enterobacter sp.* Se seleccionó esta colonia para la realización de los ensayos por ser la más resistente en la serie de cultivos realizados y porque es una de las bacterias más comúnmente encontrada en la región cérvico-uterina como parte de la flora vaginal oportunista.

#### 3.1.1 Aislamiento de microorganismo

Para obtener un determinado microorganismo a partir de una muestra clínica, es necesario utilizar agares de aislamiento primario, cuya composición general consta de lo siguiente:

- hidrolizados de proteínas, para suministrar fuentes de carbono y nitrógeno;
- hidratos de carbono, para la producción de energía;
- soluciones amortiguadoras de pH, para estabilizar el pH de desarrollo de la bacteria y de los productos metabólicos generados;
- indicadores de pH, para observar los cambios producidos en los medios por la acción de las bacterias;
- inhibidores, para limitar (en casos específicos) el crecimiento de especies no deseadas.

Debido a las características anatómicas y fisiológicas de la región cérvico-uterina, la probabilidad de encontrar enterobacterias en esta región es muy alta, por lo que se procedió a colocar el DIU en una placa de agar MacConkey y se incubó durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, desarrollaron una mezcla de colonias pigmentadas y no pigmentadas de color púrpura, seleccionando las primeras para hacer resiembras y obtener la cepa pura.

### 3.2.2 Identificación bioquímica

La clasificación de las bacterias se basa principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de determinadas enzimas, codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano.

Los sustratos sobre los cuales actúan estas enzimas se incorporan al medio de cultivo junto con un indicador, que puede detectar ya sea el consumo de un nutriente o la generación de productos metabólicos específicos.

En primera instancia, se realizaron tres pruebas características (las cuales se describen en la Tabla 6), para determinar si la colonia seleccionada pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Todos los miembros de esta familia presentan las siguientes características:

- Metabolizan la glucosa mediante fermentación
- Carecen de actividad citocromo oxidasa
- Reducen los nitratos a nitritos

Existen varios sistemas utilizados para la identificación de especies de Enterobacterias, de entre los cuales se seleccionó el de los diagramas de ramificación. Para el uso óptimo de estos diagramas, es necesario determinar todas las características de identificación incluidas en el esquema. El diagrama utilizado para la identificación de *Enterobacter spp.* se muestra en la Figura 17 y las pruebas bioquímicas se especifican en la Tabla 6.

**Tabla 6. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de la colonia bacteriana aislada en laboratorio a partir de un DIU.**

<b>Técnica</b>	<b>Medio utilizado</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Resultados</b>
Tinción de Gram	Colorantes: cristal violeta, Iodo, alcohol-acetona y safranina.	Se utilizan colorantes que se unen a la pared celular bacteriana, para teñir las células e incrementar su contraste al ser observadas en microscopio de campo claro.	Se hace una extensión de la colonia y se fija pasando el portaobjetos por la flama del mechero. Se adicionan las soluciones una a una, dejándolas actuar por un minuto y enjuagando con agua entre cada adición.	Se observan al microscopio bacilos de coloración roja (Gram negativos). Estas bacterias no fijan el cristal violeta pero si la safranina en su pared celular, debido a un mayor contenido lipídico.
Fermentación de carbohidratos	Agar MacConkey	Determina el metabolismo fermentativo de las bacterias mediante el consumo de lactosa y producción de ácidos.	Mediante un asa bacteriológica, se inocula la colonia de interés y se incuba a 37°C durante 24-48 horas.	Se aprecia el desarrollo de colonias redondas con tonalidades de rojo-rosa, debido al vire del indicador lo cual nos indica la generación de ácidos mixtos y disminución del pH a menos de 6.8
Citocromo oxidasa	Tiras reactivas de oxidasa	Identifica los organismos que carecen de la enzima oxidasa o son anaerobios estrictos.	Se toma una asada del microorganismo y se realiza una extensión sobre la tira.	No hay presencia de coloración en la tira, por lo que la prueba es negativa.
Reducción de nitratos	Agar nitrato (en pico)	Los organismos que reducen nitratos tienen la capacidad de obtener oxígeno a partir de éstos y formar nitritos y otros productos de reducción.	Se inocula el medio con el microorganismo y se incuba a 35 °C por 24 horas. Después de la incubación se procede a la adición de reactivos para el desarrollo de coloración.	Se desarrolla una coloración roja en el área de inoculación después de la adición de los reactivos, lo cual indica que la reacción es positiva. Los nitratos fueron reducidos a nitritos.
Producción de H <sub>2</sub> S	Agar entérico Hektoen (HE)	Las bacterias liberan azufre de aminoácidos y otros compuestos, que se acoplan con el ion H <sup>+</sup> para formar H <sub>2</sub> S.	Se inocula el microorganismo y se incuba a 35°C.	No hay producción de H <sub>2</sub> S debido a que no se aprecian colonias de coloración negra.
Producción de indol	Movilidad-indol-ornitina (MIO)	El indol es un producto de degradación metabólica del aminoácido triptófano.	Se inocula el microorganismo a la solución y se inocula por 24 horas. Posteriormente se adiciona el reactivo de Kovac.	No hay desarrollo de coloración después de la adición del reactivo.
Movilidad	Observación directa en placa	La movilidad bacteriana se lleva a cabo por medio de flagelos, cuyo número y ubicación varía en las diferentes especies.	Preparar una suspensión de la bacteria de interés y colocar una gota sobre un portaobjeto para su observación directa al microscopio.	Se puede apreciar la movilidad de los microorganismos en el interior de la suspensión bacteriana.
Ornitina descarboxilasa	Caldo descarboxilasa de Moeller	Se basa en la descarboxilación del aminoácido ornitina, con la formación de aminas de reacción alcalina.	Se adiciona la ornitina al medio antes de inocular. Los tubos se incuban anaerobiamente a 35 °C por 18-24 horas, cubriéndolos con una capa de aceite mineral estéril sobre el caldo.	Durante las primeras horas se observa un color amarillo, pero posteriormente el tubo regresa a su color azul púrpura, indicando una reacción positiva, debido a la liberación de aminas por descarboxilación de ornitina.

### 3.2 DESARROLLO DE LA BIOPELÍCULA POR *Enterobacter sp.*

Una vez aislada e identificada la bacteria, se procedió a preparar una suspensión de la misma. Posteriormente la suspensión fue transferida al medio uterino sintético, el cual, a su vez, sirvió como medio de cultivo. Este medio fue enriquecido con 1.0 g de infusión cerebro corazón, a fin de proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo de *Enterobacter sp.* y facilitar el crecimiento y desarrollo de la biopelícula. Se aplicó también calor con la ayuda de un baño de temperatura, a fin de alcanzar el intervalo óptimo de temperatura de la bacteria y simular la temperatura corporal (37 °C).

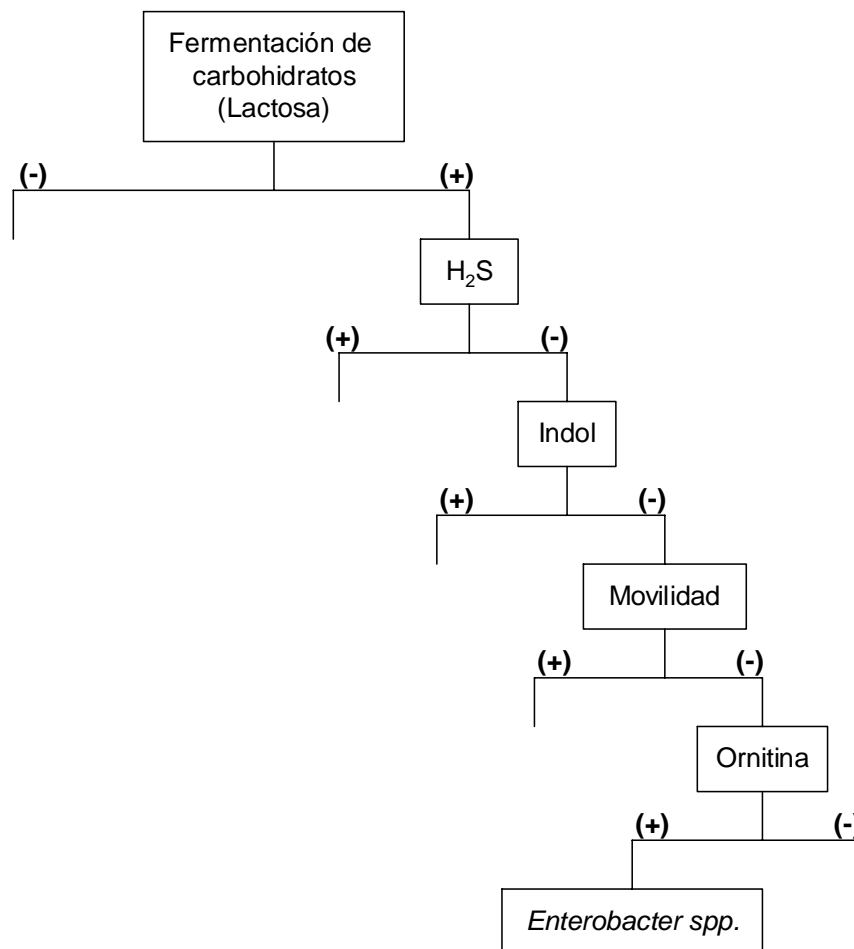


Figura 18. Diagrama de ramificación para la identificación de enterobacterias

### 3.3 ESPECÍMENES DE PRUEBA

Se utilizaron placas de cobre y dos diferentes dispositivos como especímenes para las mediciones y ensayos de corrosión. Los DIUs evaluados se muestran en la Figura 18. Estos fueron el TCu380A y Nova T, que consisten de alambre de cobre el primero y alambre de cobre con alma de plata el segundo.

En el caso de los DIUs se utilizaron las espirales de cobre soportadas en su base de polietileno, con un área aproximada de 200 mm<sup>2</sup>. Las placas de cobre se utilizaron con la finalidad de facilitar y mejorar la observación microscópica.

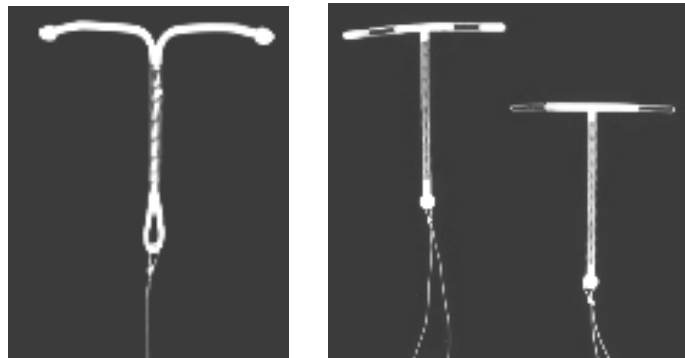


Figura 19. Dispositivos Nova T y TCu380A utilizados para la realización de los ensayos

### 3.4 ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS

Las técnicas utilizadas fueron polarización electroquímica (la región de Tafel), voltametría cíclica (VC) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Esto, con el fin de reunir la mayor información posible que nos lleve a plantear el mecanismo real del proceso de disolución del cobre en el medio uterino, en presencia de una biopelícula.

### 3.4.1 Preparación de los electrodos

Se utilizaron electrodos de cobre para la realización de los ensayos electroquímicos. Los electrodos utilizados se esquematizan en la Figura 20 y están constituidos por las espirales de los DIUs en estudio - TCu380A y Nova T, así como de placas rectangulares de lámina de cobre. La preparación de los electrodos se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) A partir de lámina de cobre 99.99% de pureza, se cortaron piezas con geometría cuadrada de manera tal que proporcionaran un área superficial de  $1 \text{ cm}^2$  (especímenes de 0.7 cm. x 0.7 cm.), dejando una pequeña cejilla para fijación.
- b) Sobre la cejilla se colocó un alambre de cobre, el cual se unió con soldadura Estaño-Plomo 60-40.
- c) Una vez soldados se colocaron en el interior de tubos de vidrio (porta electrodos). Para evitar el contacto entre la solución y la conexión exterior del electrodo, se relleno el interior de la parte inferior con silicón.
- d) Posteriormente, los electrodos fueron pulidos con papel abrasivo de SiC grado 360, 400 y 600 para dar un acabado final, tanto en la superficie como en los bordes de la lámina.
- e) Los electrodos pulidos se lavaron con acetona para eliminar la grasa depositada sobre la superficie, proveniente de su manipulación.

**Nota:** En el caso de las espirales de los DIUs de estudio (TCu 380A y Nova T) éstos se montaron directamente en los porta electrodos de vidrio, debido a que los DIUs vienen sellados herméticamente y bajo condiciones estériles.

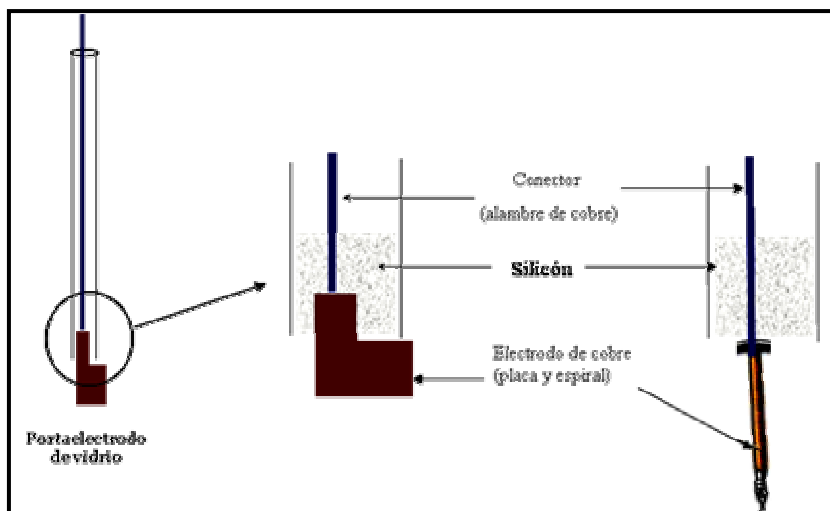


Figura 20. Esquema de los electrodos utilizados durante los ensayos electroquímicos

### 3.4.2 Preparación del medio intrauterino sintético (solución electrolítica )

La composición del medio sintético<sup>7</sup> utilizado para la simulación del ambiente intrauterino se muestra en la Tabla 7. La evaluación electroquímica se llevó a cabo a una temperatura de  $37.0 \pm 0.1$  °C. El medio fue enriquecido con 1.0 g/L de infusión cerebro corazón, a fin de proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo de *Enterobacter sp.*, facilitando la generación y desarrollo de la biopelícula. Posteriormente, el medio se esterilizó para asegurar que el crecimiento bacteriano correspondiese únicamente a la bacteria inoculada (*Enterobacter sp.*).

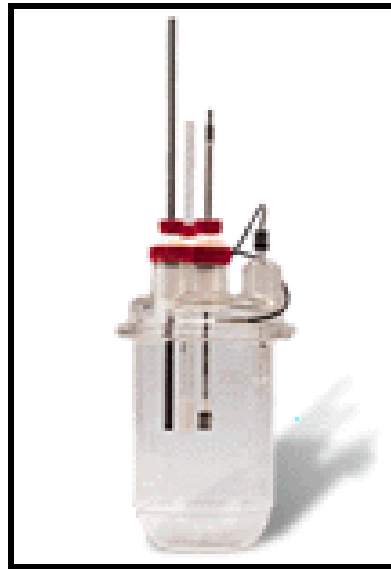
Tabla 7. Composición de medio uterino simulado

Componente	Concentración (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	0.25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.072
Glucosa	0.50
NaCl	4.97
CaCl <sub>2</sub>	0.167
KCl	0.224

### 3.4.3 Preparación de la celda electroquímica

La celda de vidrio y sus accesorios deben estar en condiciones estériles, lo cual se logró mediante lavados con etanol. Se utilizó una celda de vidrio PYREX 1000 mL, modelo 6947 para los ensayos de corrosión. El arreglo de la celda fue el clásico de tres electrodos, utilizando como electrodo de trabajo placas y espirales de cobre, platino como electrodo auxiliar y un electrodo de calomel saturado (ECS), como electrodo de referencia (Fig. 21).

Los electrodos de trabajo y auxiliar se envolvieron en papel humedecido con etanol para mantener su esterilidad hasta antes de ser introducidos en la celda.



**Figura 21. Celda de prueba para ensayos electroquímicos**

La inoculación se llevó a cabo al segundo día de correr los ensayos como blancos, utilizando una jeringa estéril con 10 ml de suspensión de *Enterobacter sp.* El monitoreo electroquímico de la celda se llevó a cabo cada 24 horas durante una semana. Terminados los ensayos se desmontó la celda para analizar la superficie.

#### **3.4.4 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)**

Se utilizó la técnica de impedancia para conocer el comportamiento electroquímico de cobre al estar cubierto por una biopelícula bacteriana, en condiciones simuladas del ambiente intrauterino. Se utilizó un potenciostato galvanostato Gamry PC4 y un paquete de software CMS 300. Los barridos se hicieron contra circuito abierto ( $E_{ocp}$ ), aplicando una amplitud de polarización anódica de 30 mV en un rango de frecuencia desde 0.01 a 100,000 Hz.

#### **3.4.5 Voltametría cíclica**

Las placas de cobre se sometieron a mediciones de voltametría cíclica para obtener información acerca de las especies químicas formadas durante el proceso electroquímico de oxidación del cobre. Para ello se utilizó un potenciostato galvanostato Gamry PC4 y un paquete de software CMS 130. El intervalo de polarización utilizado para ambos DIUs fluctuó entre -1000 a 1000 mV, con respecto al potencial de circuito abierto ( $E_{ocp}$ ), utilizando una velocidad de barrido de 2 mV/s y aplicando barridos sencillos y múltiples.

#### **3.4.6 Polarización electroquímica**

Con la técnica de polarización electroquímica se obtienen datos de velocidades de corrosión. Se realizaron estudios de potencial abierto utilizando un potenciostato galvanostato Gamry PC4 y un paquete de software CMS 100.

Para evaluar la velocidad de corrosión del cobre de los DIUs se elaboraron curvas de potencial contra densidad de corriente. El rango de potencial aplicado fue de -500 a 500 mV con respecto al potencial de circuito abierto ( $E_{ocp}$ ).

### **3.5 ANÁLISIS DE SUPERFICIE**

Las superficies de cobre sometidas a ensayos de corrosión se observaron en microscopios de barrido electrónico, metalográfico y estereoscópico para observar la formación y características de la biopelícula, así como la morfología de ataque sobre la superficie de las placas de cobre y DIUs.

Para evaluar la composición química de los depósitos se utilizó la microsonda de rayos X adaptada en el microscopio de barrido electrónico JEOL JSM-6360JEOL.

#### **3.5.1 Microscopia óptica**

Las muestras observadas bajo el microscopio metalográfico fueron previamente montadas en resina, pulidas y atacadas químicamente a fin de conocer acerca de la morfología de ataque y revelar si la micro-estructura del metal fue atacada. Se utilizó un microscopio metalográfico marca Leica DMILM con capacidad hasta 500 X y un estereoscopio VWR Vista Vision BS-745 con capacidad de hasta 40 X, el cual no requiere de un tratamiento previo para la observación de la muestra.

#### **3.5.2 Microscopía de barrido electrónico (SEM)**

Las muestras de espirales y placas de cobre, así como de polvos de incrustaciones y productos de corrosión, se observaron en un SEM JEOL JSM-6360. El pre-tratamiento de las muestras consiste en fijarlas con glutaraldehído y tetraóxido de osmio, secarlas mediante la técnica de deshidratación con alcohol y aplicar un baño metálico de oro, si es necesario, para mejorar su observación en la cámara de vacío. Este tratamiento permite una buena resolución en la observación de la población microbiana de las biopelículas generadas.

### **3.5.3 Preparación de las placas para su observación en SEM**

1. Lavado con agua.
2. Fijación con glutaraldehído al 2.5% durante 2 horas.
3. Lavado con fosfato (tampón de fosfato al 0.1M, pH 7.2 por inmersión)
4. Post-fijación con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2% durante una hora.
5. Lavado con fosfato (5 minutos por inmersión)
6. Deshidratación con etanol
  - a. 50% 10 minutos
  - b. 70% 10 minutos
  - c. 90% 10 minutos
  - d. 100% 10 minutos
  - e. 100% 10 minutos
  - f. 100% 10 minutos
7. Desecado con pistola de aire caliente

### **3.5.4 Análisis de Rayos-X de electrones dispersados (EDS)**

Se utilizó la microsonda de rayos X adaptada en el microscopio de barrido electrónico JEOL JSM-6360, la cual brindó un análisis químico semi-cuantitativo de la composición de los productos de corrosión e incrustaciones formados en la superficie de cobre, así como también de los componentes de las biopelículas. Estos análisis se realizaron en locaciones específicas, previamente identificadas por SEM.

## 3.6 CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS

### 3.6.2 Espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La interpretación de espectros IR de compuestos biológicos se basa principalmente en el análisis de estructuras de composición conocida. Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos se encuentran presentes constantemente en diferentes cantidades en células microbianas. Se desea identificar y caracterizar los exopolisacáridos (EPS) producidos como resultado del metabolismo celular. El equipo empleado es Perkin-Elementer Spectrum One con accesorio universal de muestreo ATR de ZnSe.

Se realizaron barridos en el intervalo de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , a fin de obtener las bandas características de macromoléculas orgánicas, que indican la presencia de la biopelícula y bacterias depositadas. Utilizando el ATR, se colocó la placa de cobre que estuvo inmersa en el medio uterino y que presentó el desarrollo de la biopelícula, y se le hizo un barrido. Posteriormente se colocó una placa de cobre pulida y lavada (blanco), sobre la cual también se realizó un barrido en las mismas condiciones. Con la ayuda del software del equipo, se realizó una diferencia de ambos espectros, obteniendo de esta manera el espectro de la biopelícula generada.

La caracterización se llevó a cabo mediante la interpretación de las bandas más importantes relacionadas con los grupos funcionales más comunes en compuestos exopoliméricos.

# Capítulo 4

## Resultados y Discusión

## 4.1 ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS

La bacteria *Enterobacter sp.*, aislada a partir de un DIU retirado es capaz de adaptarse, crecer y desarrollarse en un medio uterino simulado. La fase de adaptación y acondicionamiento de la superficie se da en las primeras horas; es a partir de las 18-24 horas que se presenta el crecimiento exponencial.

Esto se puede apreciar físicamente en el interior de la celda, por la formación de una nata sobrenadante y coincide con las formas de las curvas obtenidas electroquímicamente. Posteriormente se alcanza un equilibrio dinámico de adsorción y desorción de la biopelícula formada.

### 4.1.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

Las curvas obtenidas por espectroscopia de impedancia electroquímica indican cómo evoluciona la biopelícula generada metabólicamente por *Enterobacter sp.* sobre la superficie de una placa de cobre.

La Figura 22 muestra los resultados obtenidos por EIS en la forma de Nyquist, en donde se aprecia, al inicio del experimento, un semi-círculo bien definido, lo cual es indicativo de que el proceso electroquímico está controlado por transferencia de carga (comportamiento resistivo). Durante las primeras horas de inmersión se presenta el fenómeno de acondicionamiento de la superficie, en donde el electrodo se recubre con material orgánico e inorgánico, facilitando así la adsorción de microorganismos.

A las 18 horas se presenta un incremento de tres órdenes de magnitud en los valores de impedancia (real e imaginaria), lo cual se asocia con dicho proceso de acondicionamiento y con la fase de crecimiento exponencial de *Enterobacter sp.*, ya que en este momento se puede apreciar a través de la celda que la solución presenta turbidez.

Este incremento modifica la escala de la grafica y minimiza la apreciación de las curvas posteriores, por lo que se realizó una ampliación de esta zona para evaluar el comportamiento hasta el final del ensayo.

A partir de las 42 horas de inmersión, los valores de impedancia ( $Z_{imag}$ ) disminuyen dos órdenes de magnitud, el semi-círculo ya no es tan definido y no tiende a cerrar, sino que se prolonga formando una línea recta.

Este comportamiento se mantiene hasta el final del experimento, el cual se debe a la adsorción de moléculas orgánicas y microorganismos, que utilizan los exopolisacáridos (EPS) producidos para adherirse a la superficie del cobre en forma de biopelícula. Conforme se incrementa el tiempo de inmersión en el medio, el crecimiento de la colonia y su producción de EPS es mayor.

La obtención de semi-círculos en las curvas se relacionan con la generación de una película sobre la superficie del electrodo, como es el caso de los aceros inoxidable, solo que en este caso la película es de naturaleza orgánica y porosa.

La generación de productos de corrosión también contribuye al incremento del espesor de la biopelícula y favorece su porosidad. Esto se ve reflejado en las colas de difusión de las curvas, mostrando un comportamiento mixto que se mantiene durante el seguimiento del experimento hasta su terminación.

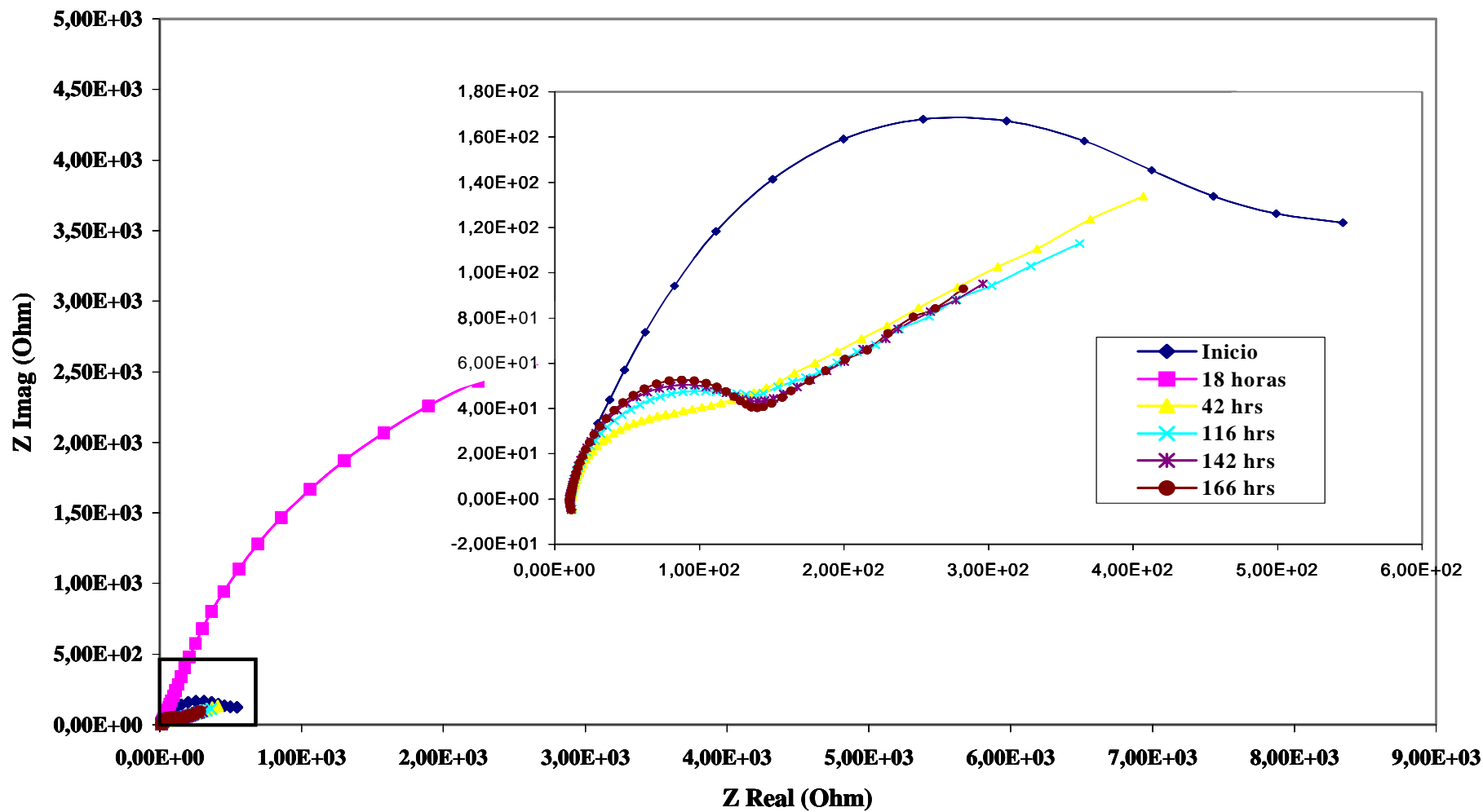


Figura 22. Curvas de Nyquist de una placa de cobre inmersa en medio uterino enriquecido con peptona e inoculado con *Enterobacter sp.*

La Figura 23 muestra los diagramas de Bode obtenidos durante los 8 días de ensayo. Después de las primeras 18 horas de acondicionamiento se aprecia un incremento en el módulo y una disminución del ángulo de fase. Es a partir de las 42 horas que el comportamiento se invierte y gradualmente se estabiliza hasta la culminación del experimento, indicando la formación de una nueva interfase que se estabiliza después de 5 días. Las ligeras variaciones se deben al establecimiento de un equilibrio dinámico donde se desprenden y renuevan pequeñas zonas de la biopelícula.

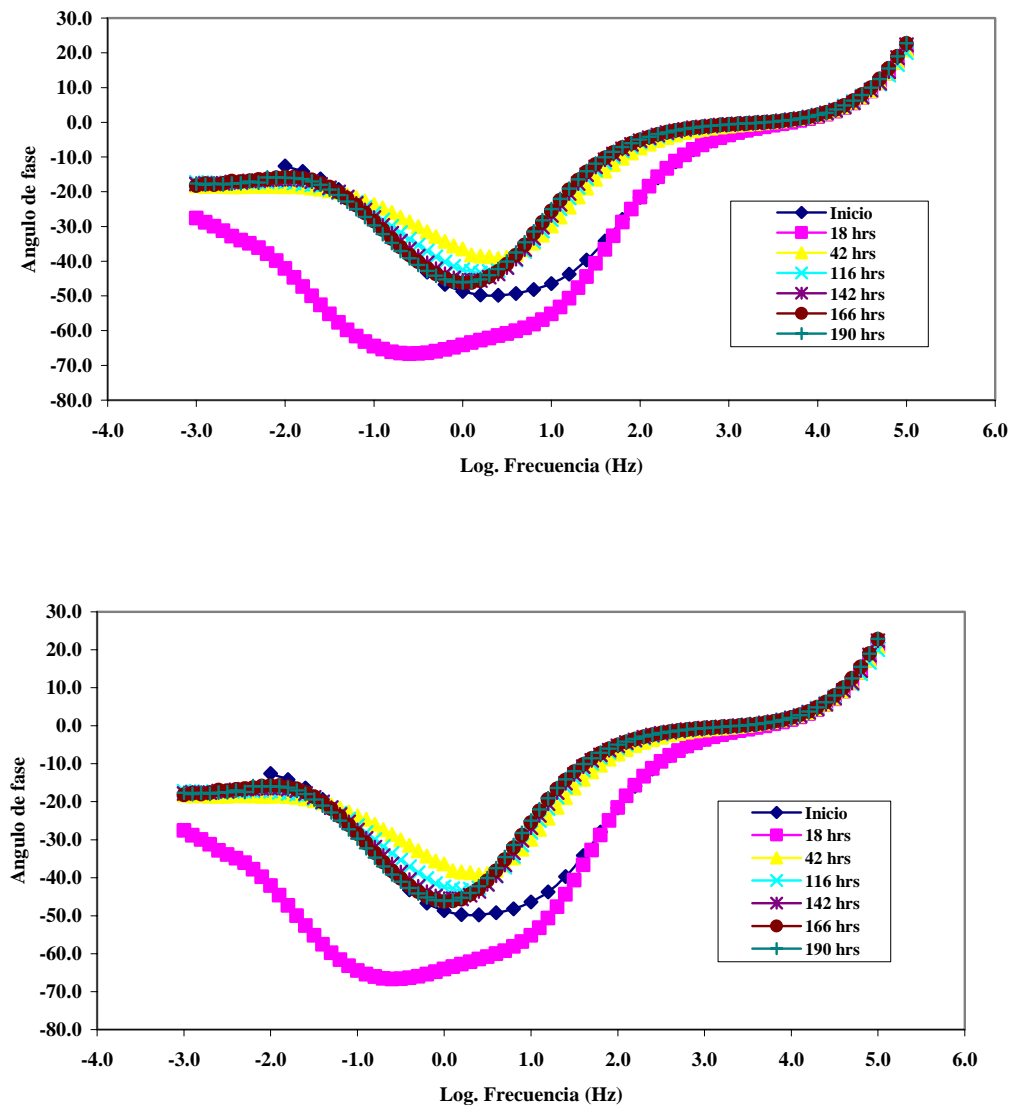


Figura 23. Diagramas de Bode de una placa de cobre inmersa en medio uterino enriquecido con peptona e inoculado con *Enterobacter sp.*

#### 4.1.2 Voltametría cíclica

A partir de una placa de cobre, se obtuvieron una serie de voltamogramas durante 167 horas de exposición en el medio uterino inoculado. Los resultados obtenidos se pueden clasificar en dos etapas. La etapa inicial (0-65 hrs), se muestra en la figura 24; durante las primeras 24 horas se presenta la generación de una película acondicionadora, que se establece principalmente por los procesos de adsorción y desorción de moléculas orgánicas sobre la superficie del electrodo.

Después 24 horas (48 horas de inmersión), la oxidación del cobre continúa, de modo que al cambiar el sentido del barrido, la curva cruza por arriba en el retorno con el correspondiente incremento de la corriente, mostrando la presencia de una picadura e indicando que se trata de un proceso autocatalítico.

Este comportamiento se mantiene hasta el final del experimento después de 7 días, como se puede observar en la figura 25. En esta segunda etapa (137-167 hrs), los picos máximos de oxidación son cada vez más definidos aún cuando los rangos de valor de corriente se mantienen.

Los picos de reducción son más anchos; en este estado la especie Cu(II) empieza a ser importante. Esto es debido a la adsorción de moléculas orgánicas, generación de exopolisacáridos y formación de metaloenzimas y complejos organometálicos con el cobre, que junto con las bacterias forman un consorcio llamado biopelícula.

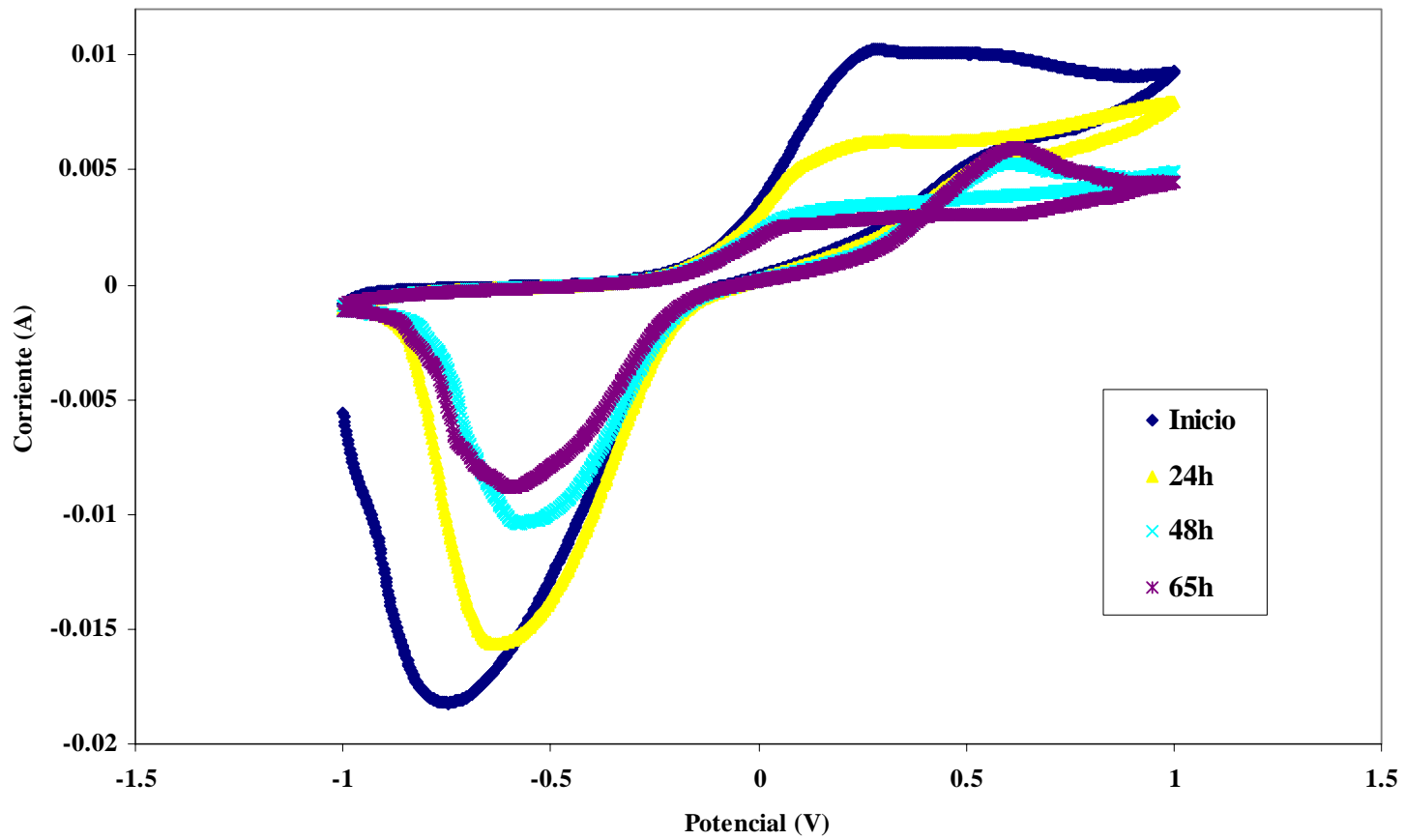


Figura 24. Voltametría cíclica de placa de cobre en presencia de *Enterobacter sp.* durante la primera etapa de desarrollo de la biopelícula.

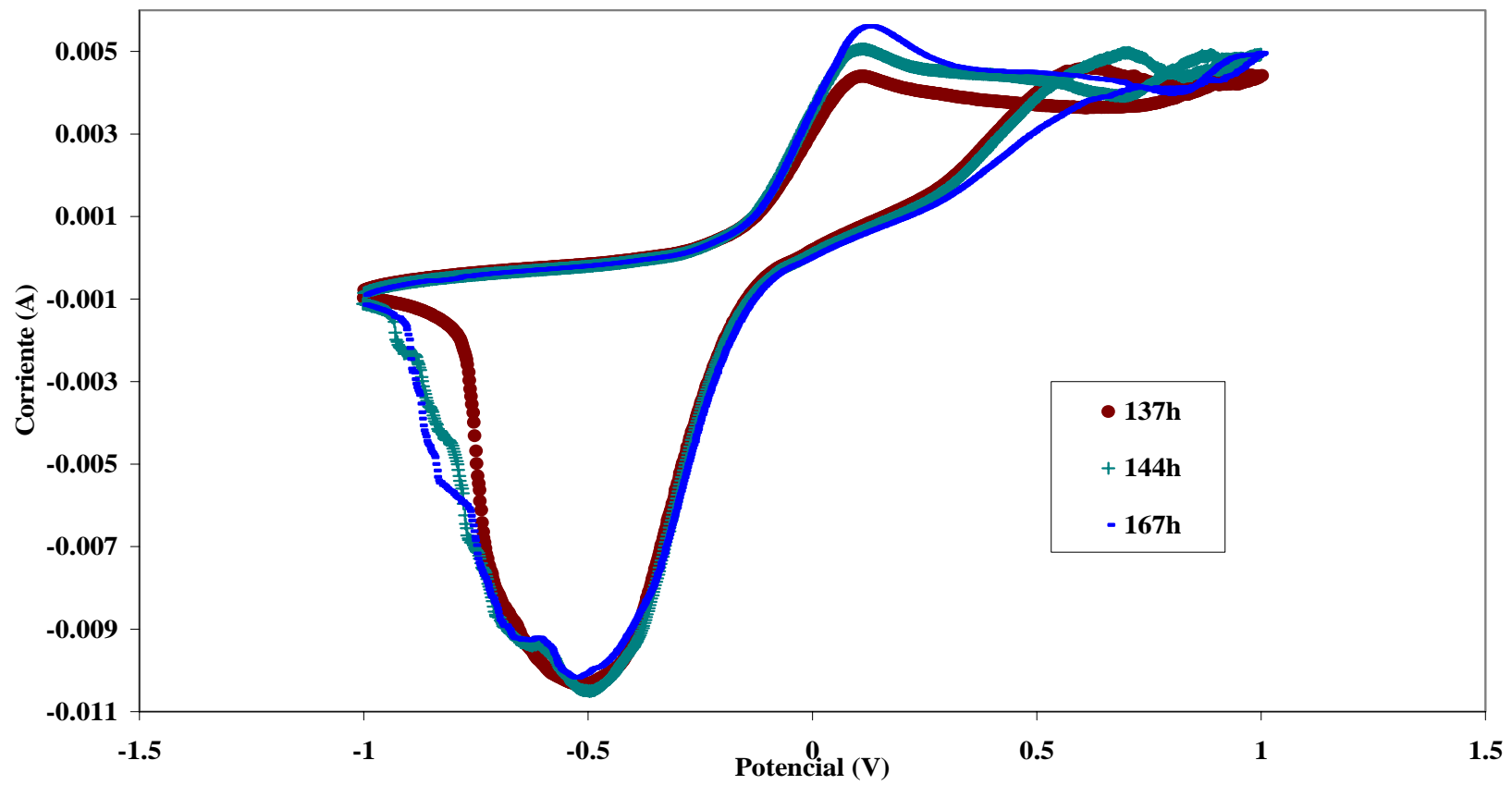


Figura 25. Voltametría cíclica de placa de cobre en presencia de *Enterobacter sp.* durante la segunda etapa.

### 4.1.3 Polarización electroquímica

Las curvas de polarización electroquímica muestran la formación de una biopelícula que se genera sobre la superficie de los DIUs evaluados conforme se incrementa el tiempo de permanencia en el medio inoculado. Esto se debe al crecimiento acelerado de la colonia bacteriana, con la consecuente producción de residuos metabólicos, que se adsorben sobre el cobre y facilitan la adherencia de nuevas células, formando una biopelícula densa sobre el electrodo.

En las Figuras 26 y 27 se aprecia un comportamiento pasivo, confirmando que la biopelícula se genera y se adsorbe sobre la superficie de los DIUs. Sin embargo, hay una disminución en la densidad de corriente de la curva anódica con respecto al tiempo. Los potenciales de corrosión de la Figura 28 tienden hacia valores más negativos, indicando que, incluso con la formación de la biopelícula, el metal sigue siendo activo y la corrosión continúa.

La biopelícula generada es porosa, y a través de estos poros se lleva a cabo la disolución continua de iones de cobre, manteniendo el efecto contraceptivo del DIU durante su tiempo vida útil. La porosidad de la biopelícula y el efecto de la corrosión localizada se comprueban por la observación microscópica.

Ambos dispositivos presentaron esta misma tendencia, pero a diferentes tiempos. En el caso del Nova T el comportamiento pasivo aparece luego de 19 horas de inmersión en el medio, mientras que el T 380A muestra una ligera pasivación a las 19 horas pero presenta una desorción de la biopelícula que lo hace activo nuevamente; a partir de las 68 horas se incrementa el espesor de la biopelícula para adquirir un comportamiento pasivo, con la subsiguiente disminución de corriente (Figura 26), y permanece así hasta el final del ensayo (165 hrs).

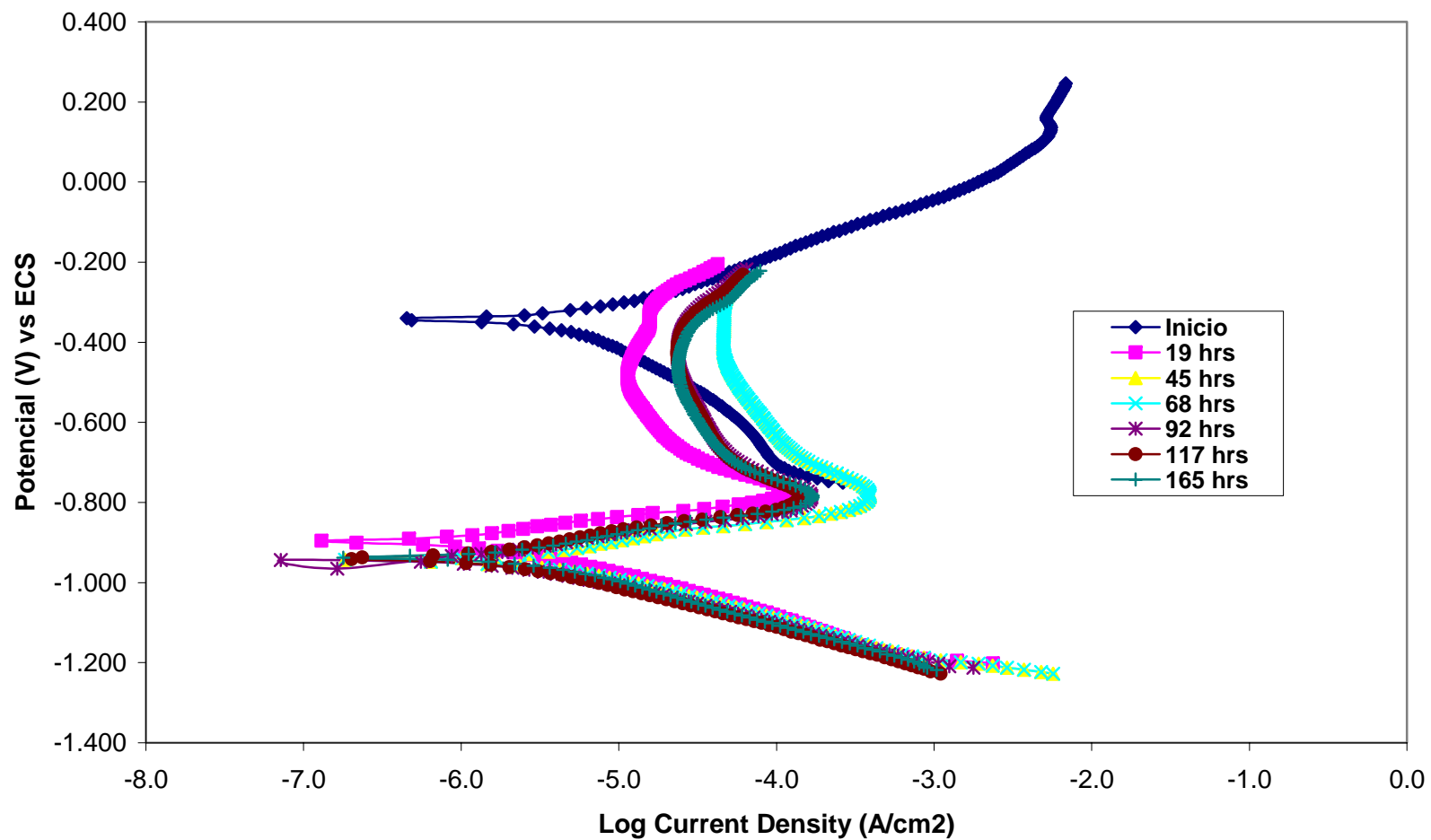


Figura 26. Curvas de polarización de DIU NovaT inmerso en medio uterino sintético enriquecido con peptona e inoculado con *Enterobacter sp.*

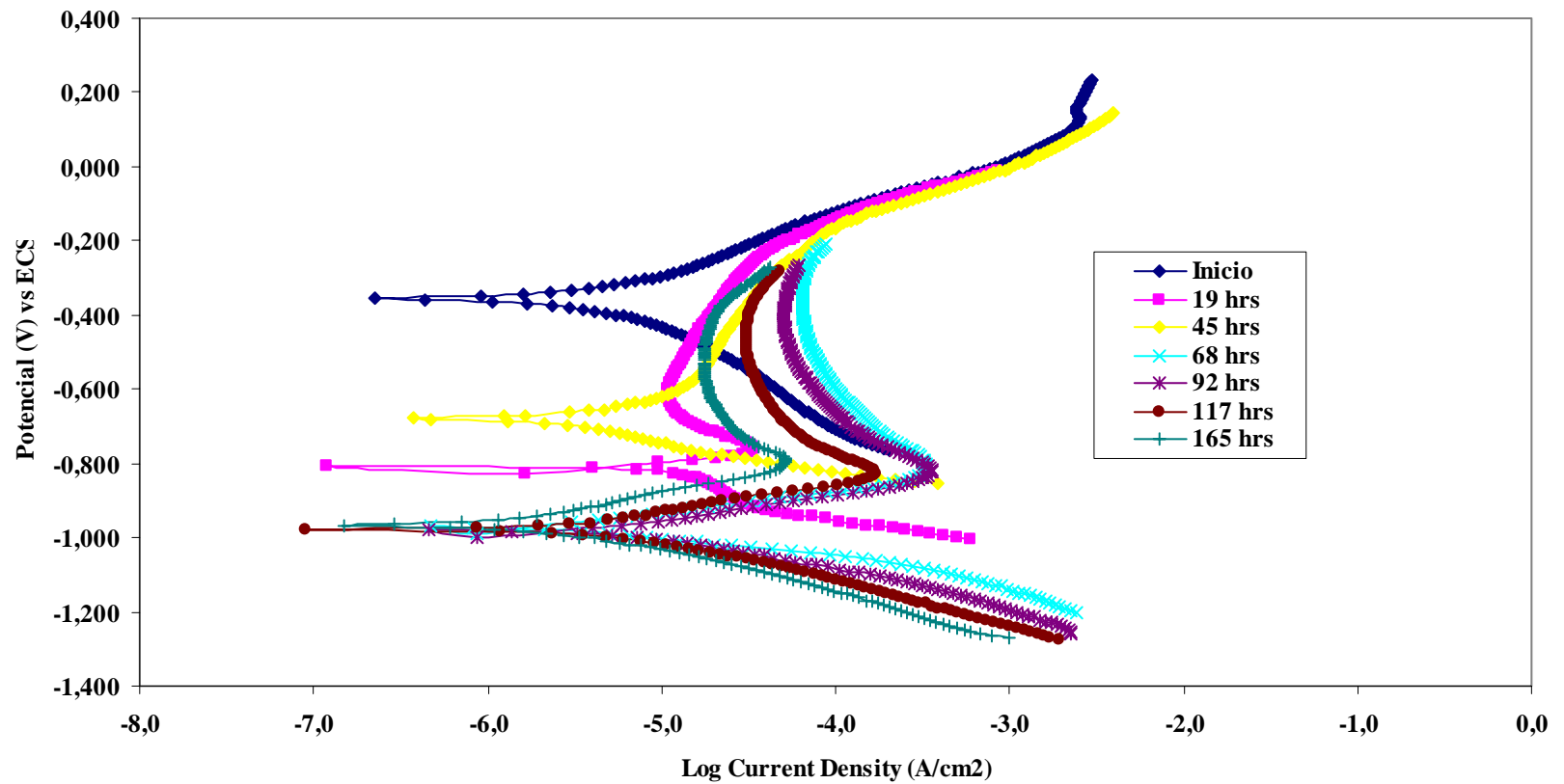


Figura 27. Curvas de polarización obtenidas de DIU TCu380A inmerso en medio uterino sintético enriquecido con peptona e inoculado con *Enterobacter sp.*

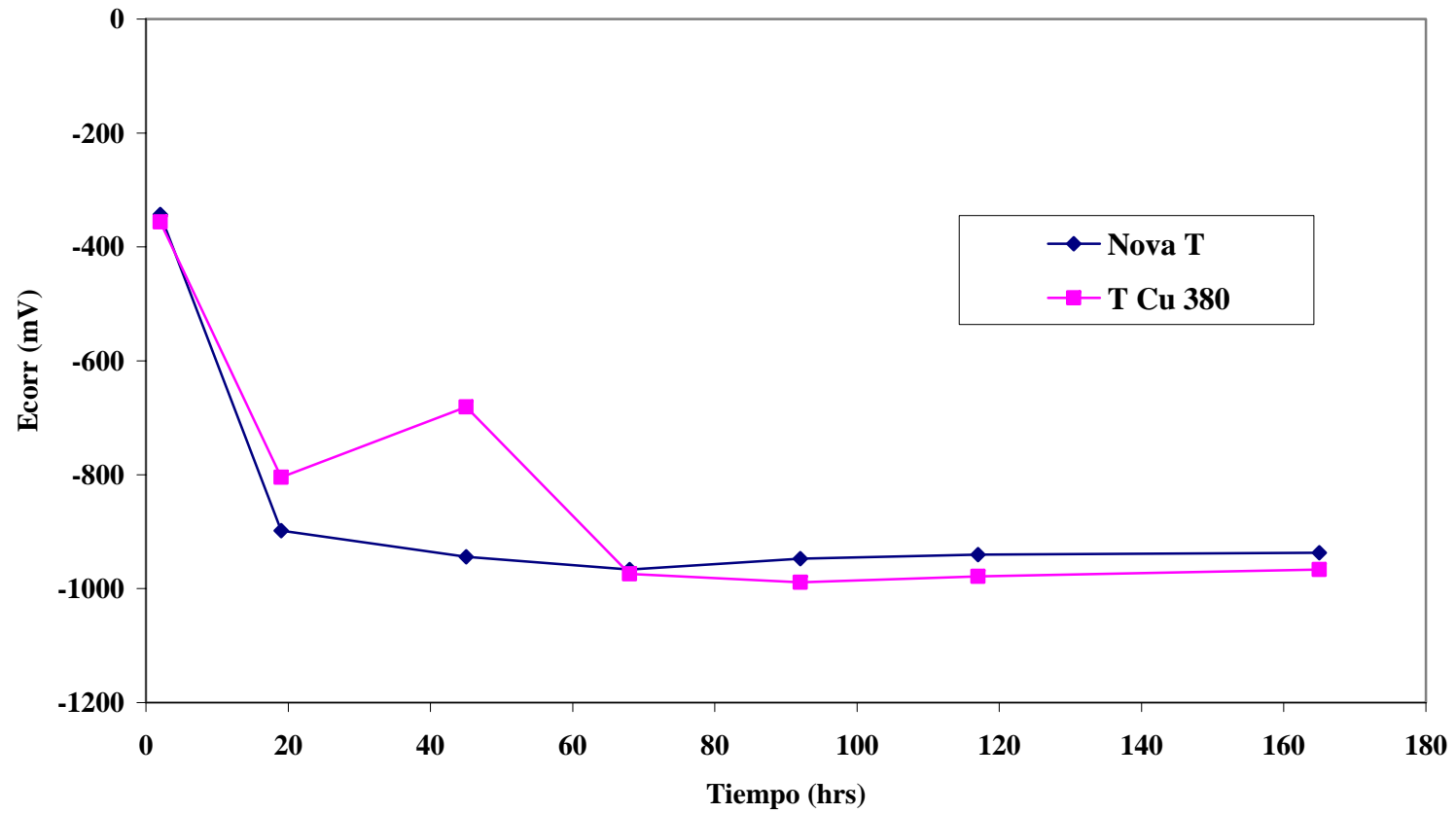


Figura 28. Variación del potencial de corrosión ( $E_{corr}$ ) con respecto al tiempo de una placa de cobre expuesta al medio uterino sintético enriquecido con peptona e inoculado con *Enterobacter sp.*

## 4.2 ANÁLISIS DE SUPERFICIE

### 4.2.1 Microscopía óptica

Con el estereoscopio se observaron las placas y los DIU evaluados para conocer las características morfológicas de la superficie de los especímenes de prueba, inmediatamente después de retirarlos de la celda. Se presentan picaduras sobre toda la superficie de las placas, así como deposición de la biopelícula. Debido a que la capacidad del equipo es pequeña (40X), se dio tratamiento a las muestras para su observación en microscopio electrónico de barrido, a fin de observar con mayor detalle las características de la biopelícula y el ataque sobre el sustrato.

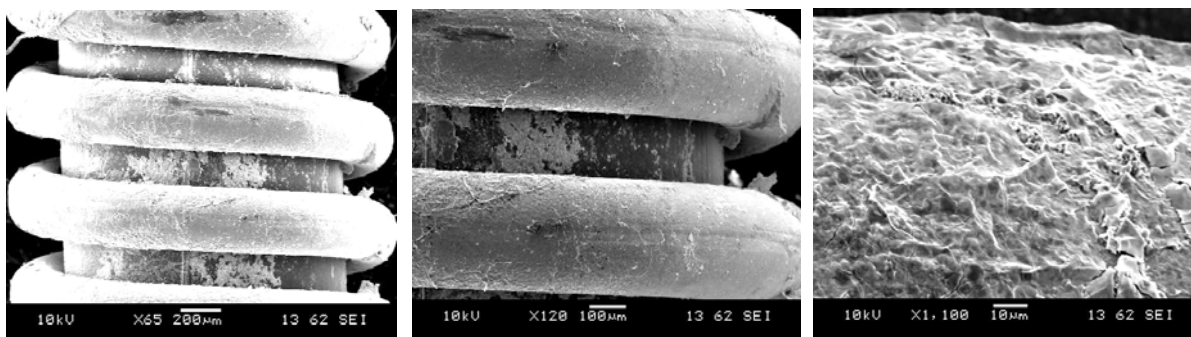
### 4.2.2 Microscopía de barrido electrónico

Se realizaron microscopías de barrido electrónico sobre los dos DIUs de estudio para corroborar la generación y morfología de la biopelícula. Asimismo, se tomaron micrografías de placas de cobre para apreciar con mayor detalle las características de la biopelícula generada por *Enterobacter sp.* y el daño localizado producido sobre el sustrato.

Debido a que se aplica vacío, es necesario fijar la biopelícula formada sobre el cobre. Para esto, se emplearon soluciones de glutaraldehído, solución reguladora de fosfatos y tetraóxido de osmio. Las muestras posteriormente fueron deshidratadas con diluciones seriadas de etanol y se secaron utilizando aire caliente y seco. Finalmente, las muestras se recubrieron con baño de oro para mejorar su observación y análisis de composición química.

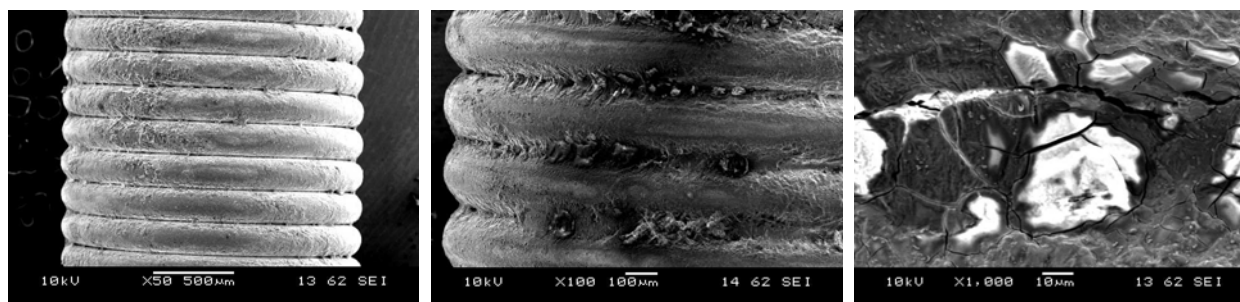
En la Figura 29 se muestran las micrografías tomadas sobre el DIU Nova T. Las diferentes magnificaciones permiten observar la adsorción de una película de composición variada sobre el espiral y la superficie del cuerpo de polietileno, a través de las hendiduras de la espiral de cobre. El fenómeno de desorción de la biopelícula se

presenta de manera cíclica sobre el cobre en determinadas zonas, dejando al metal desnudo y haciéndolo activo nuevamente.



**Figura 29. Formación de la biopelícula sobre la espiral del DIU Nova T**

La longitud del alambre del DIU T380A es mayor y la espiral es más compacta, por lo que la formación de hendiduras es difícil, cubriendo totalmente la base de polietileno. La figura 30(a,b) muestra con aumentos graduales, la deposición de la biopelícula y su acumulación en los pequeños espacios entre las espirales. A mayores aumentos (Figura 30 c), se observan también algunas estructuras cristalinas sobre dichos espacios, que revelan la presencia de productos de corrosión en consorcio con la biopelícula.



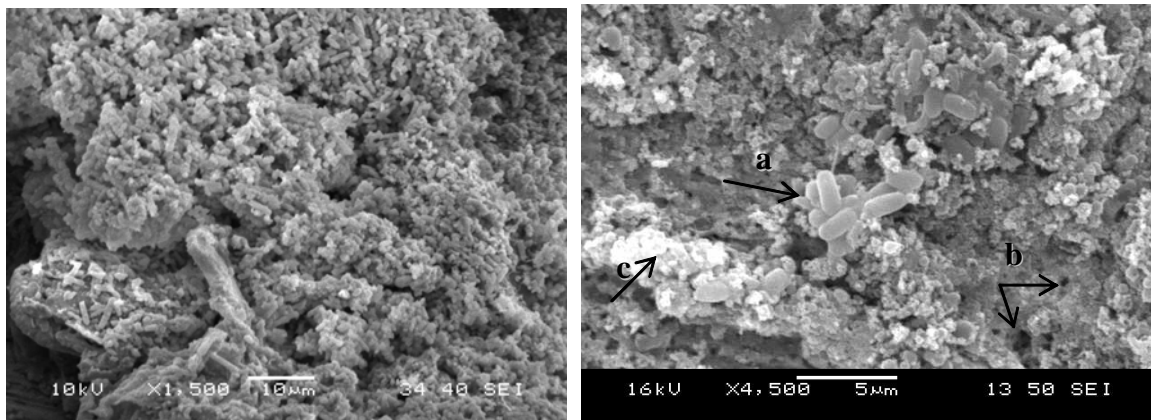
**(a)**

**(b)**

**(c)**

**Figura 30. Formación de la biopelícula sobre la espiral del DIU T380A**

Las micrografías obtenidas de las placas de cobre muestran la presencia de cúmulos bacterianos cuya morfología y dimensiones corresponden a *Enterobacter sp.* En la Figura 31-I se presenta la biopelícula desarrollada, la cual tiene una apariencia esponjosa y porosa. En un acercamiento sobre la misma placa se puede distinguir en la Figura 31(II) la morfología de *Enterobacter sp.* (a), los poros de la biopelícula (b) y los productos de corrosión (c).



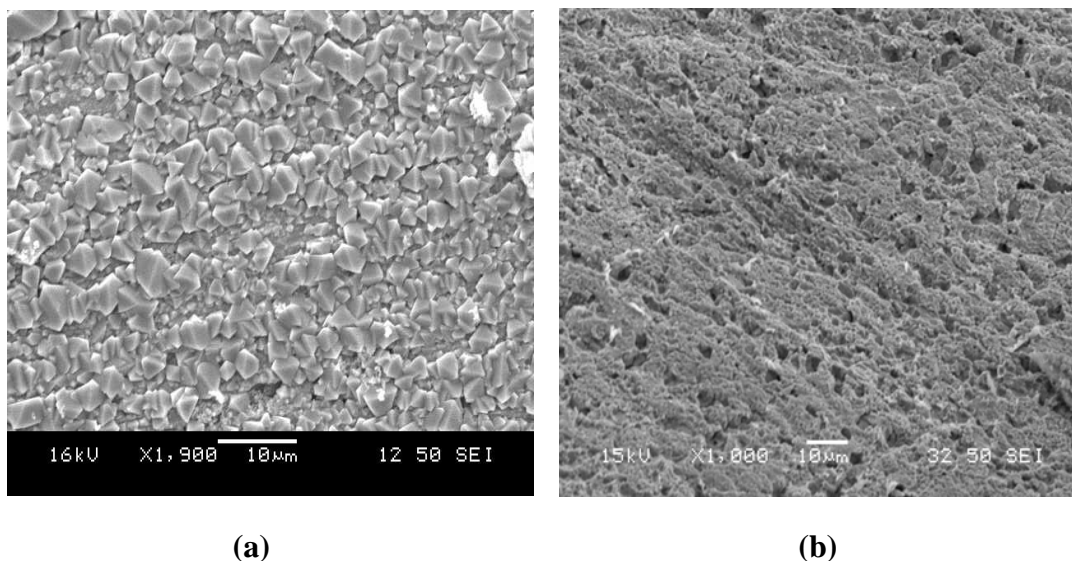
(I)

(II)

**Figura 31. Micrografía de la biopelícula generada por *Enterobacter sp.* sobre placas de cobre. En (II) se observan los cúmulos bacterianos (a), los poros de la biopelícula (b) y los productos de corrosión (c) formados sobre la superficie de una placa de cobre.**

Debido a que el proceso de corrosión se sigue llevando a cabo a través de los poros, el ataque sobre el sustrato es muy localizado; esto se puede observar después de la remoción de la película. La Figura 32 muestra dos placas de cobre expuestas en medio uterino en ausencia y en presencia de una biopelícula bacteriana.

En un medio uterino estéril se presenta un proceso de corrosión moderado, con la formación de productos de corrosión (óxidos e hidróxidos) como resultado de la acción de los iones cloruro presentes en el medio.



**Figura 32. Ataque sobre cobre metálico de DIUs en ausencia (a) y en presencia (b) de una biopelícula bacteriana.**

En presencia de la biopelícula bacteriana se presenta un severo ataque localizado, con alta densidad de picaduras, inducido por la colonia de *Enterobacter sp.* Esto corrobora que la biopelícula es porosa y que la disolución del cobre se mantiene durante la vida útil del dispositivo, ya que el tránsito de especies iónicas reactivas se da a través de estos conductos porosos, mediante un proceso de difusión, lo cual es congruente con los resultados del análisis por EIS, cuando la biopelícula se ha desarrollado.

#### **4.2.3 Análisis de Rayos-X de electrones dispersados (EDS)**

El análisis de la composición química de los DIU después de 168 horas de inmersión en el medio uterino, se muestra en la Figura 33. El análisis cualitativo de la biopelícula presenta elementos minerales como cloro, sodio, potasio y calcio, provenientes del medio de cultivo.

El oxígeno se encuentra presente en una proporción elevada debido a la formación de productos de corrosión, tales como óxidos e hidróxidos de cobre. Cabe destacar también la presencia de un elevado porcentaje de carbono, que indica la presencia

de materia orgánica, ya sea directamente de las células bacterianas o de los productos metabólicos exopoliméricos generados por éstas (aminoácidos, polisacáridos, etc).

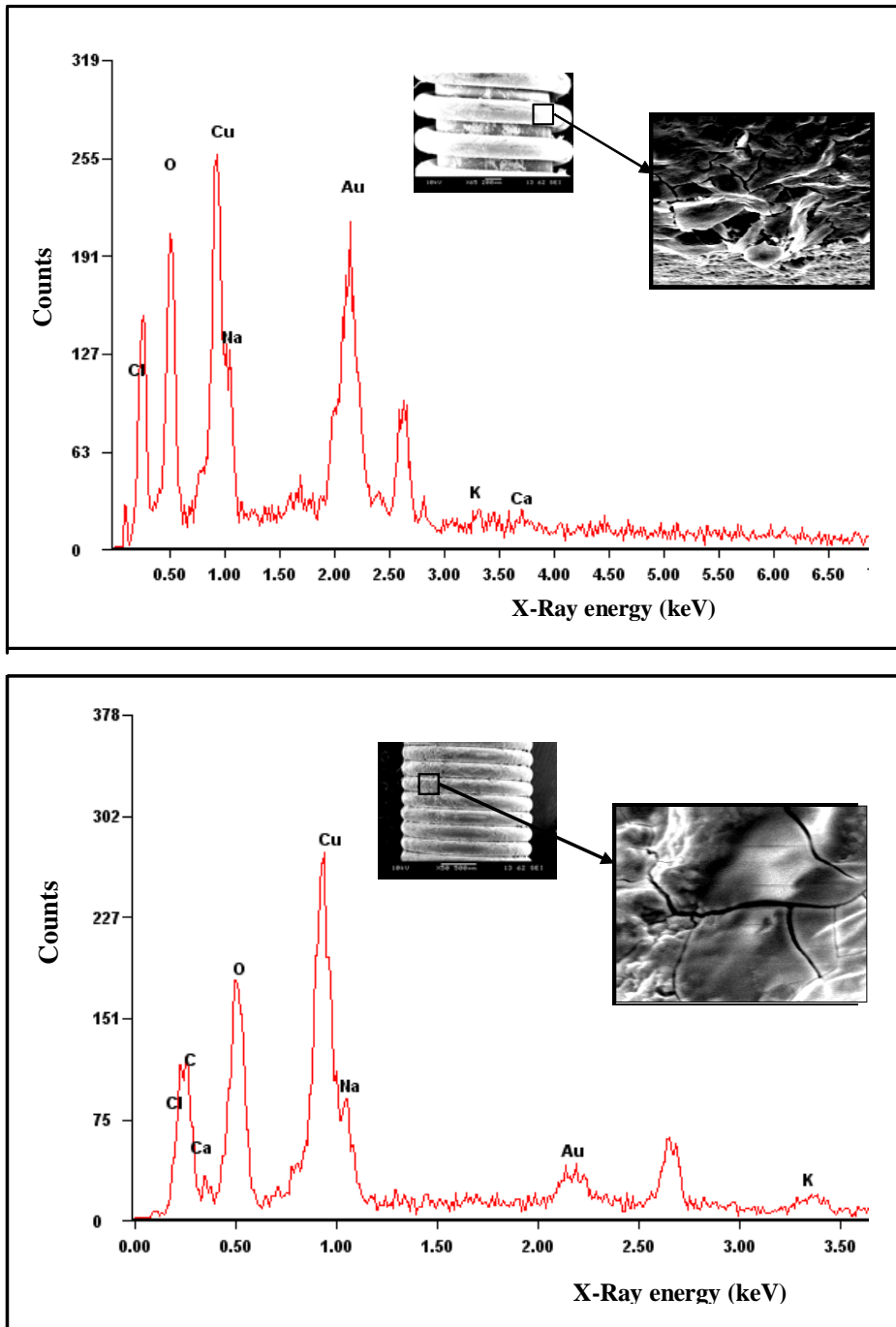


Figura 33. Composición química de la biopelícula generada por *Enterobacter sp.* sobre las espirales de cobre de los DIUs evaluados.

Se realizó un análisis sobre un área de la biopelícula, seleccionando un cúmulo bacteriano. La composición química de las bacterias se presenta en la Figura 34, destacando: carbono, nitrógeno, oxígeno y fósforo, que son los principales elementos que constituyen los fosfolípidos de las membranas celulares.

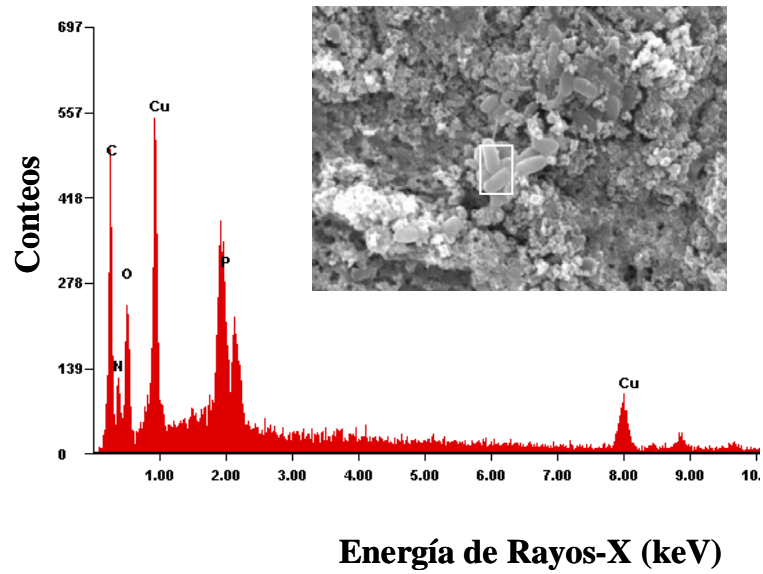


Figura 34. Composición química de las bacterias formadoras de la biopelícula

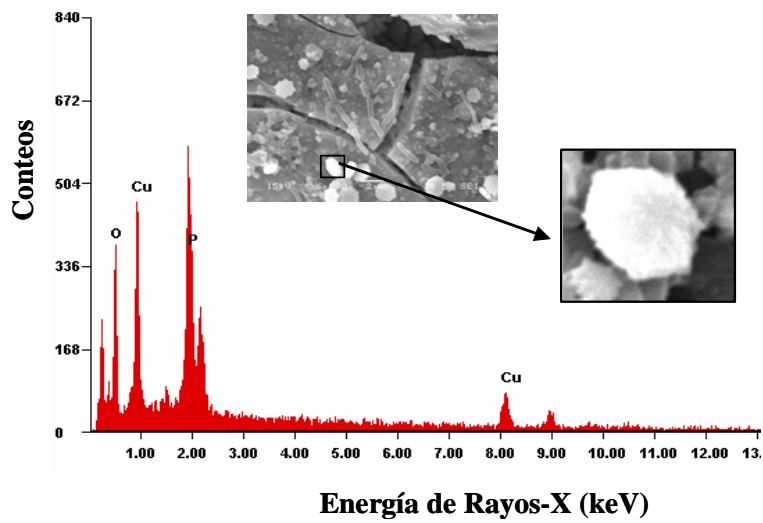


Figura 35. Composición química de los cristales presentes sobre la biopelícula

Sobre la biopelícula se desarrollan cristales amorfos, cuya composición se presenta en la Figura 35.

La presencia de únicamente fósforo y oxígeno, indica que se trata de fosfatos de naturaleza inorgánica, provenientes del medio uterino simulado y/o de los lavados realizados al utilizar una solución amortiguadora de fosfatos durante la fijación de las placas para su observación en SEM.

Al remover la biopelícula y analizar el sustrato, el análisis de la Figura 36 demuestra únicamente la presencia de oxígeno y cobre, que confirma los principales productos de corrosión sobre la superficie metálica, en base a las siguientes reacciones anódicas:

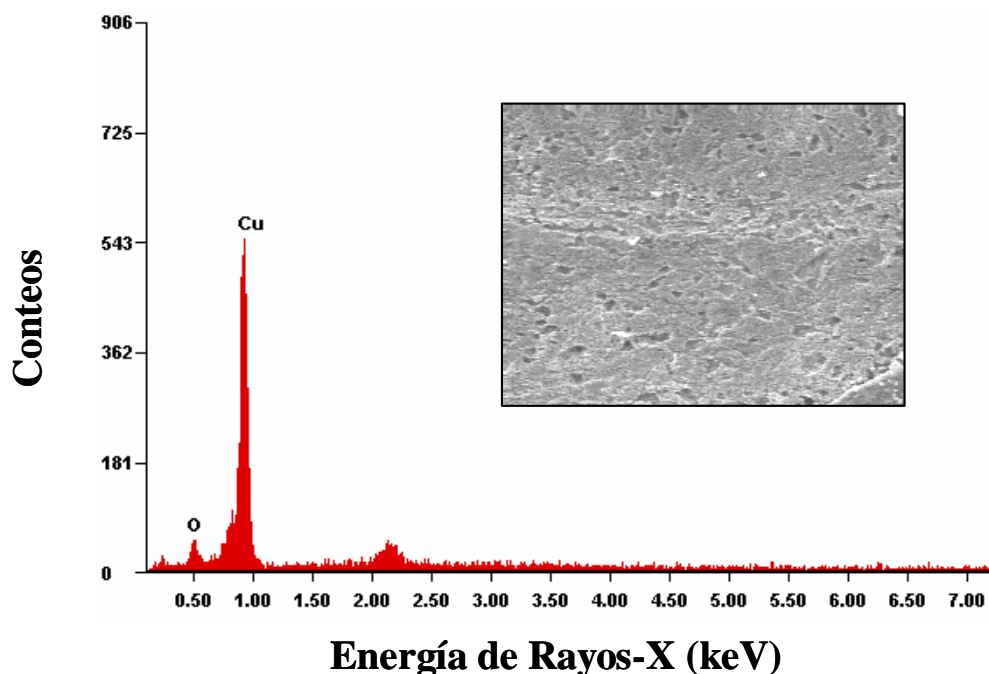
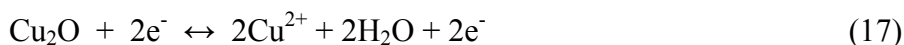
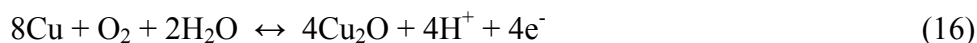


Figura 36. Composición química del sustrato metálico después de la remoción de la biopelícula bacteriana

## 4.3 CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS

### 4.3.1 Espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó un barrido por FTIR para obtener un espectro de los exopolisacáridos generados durante el metabolismo de la colonia de *Enterobacter sp.*, mostrándose en la Figura 37.

Para la obtención de este espectro, se recolectó todo el material sobrenadante en el medio de cultivo cuando la celda electroquímica fue desactivada.

Posteriormente, se realizaron varios lavados con éter de petróleo con la finalidad de eliminar la mayor parte de impurezas inorgánicas y mejorar la definición de los picos obtenidos. El extracto obtenido se colocó en el accesorio ATR y se procedió a la realización de los barridos para obtener los espectros.

Las bandas obtenidas en escala de transmitancia en la figura 37 son características de macromoléculas orgánicas, particularmente de proteínas: estiramiento N-H (amida) en  $3278\text{ cm}^{-1}$ ; estiramiento asimétrico C-H alifático a  $2519\text{ cm}^{-1}$ ; amida primaria y secundaria en  $1636$  y  $1542\text{ cm}^{-1}$  respectivamente;  $1403\text{ cm}^{-1}$  para el estiramiento simétrico C=O del grupo  $\text{COO}^-$ ;  $1238$  y  $1027\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento asimétrico P=O de fosfodiésteres.

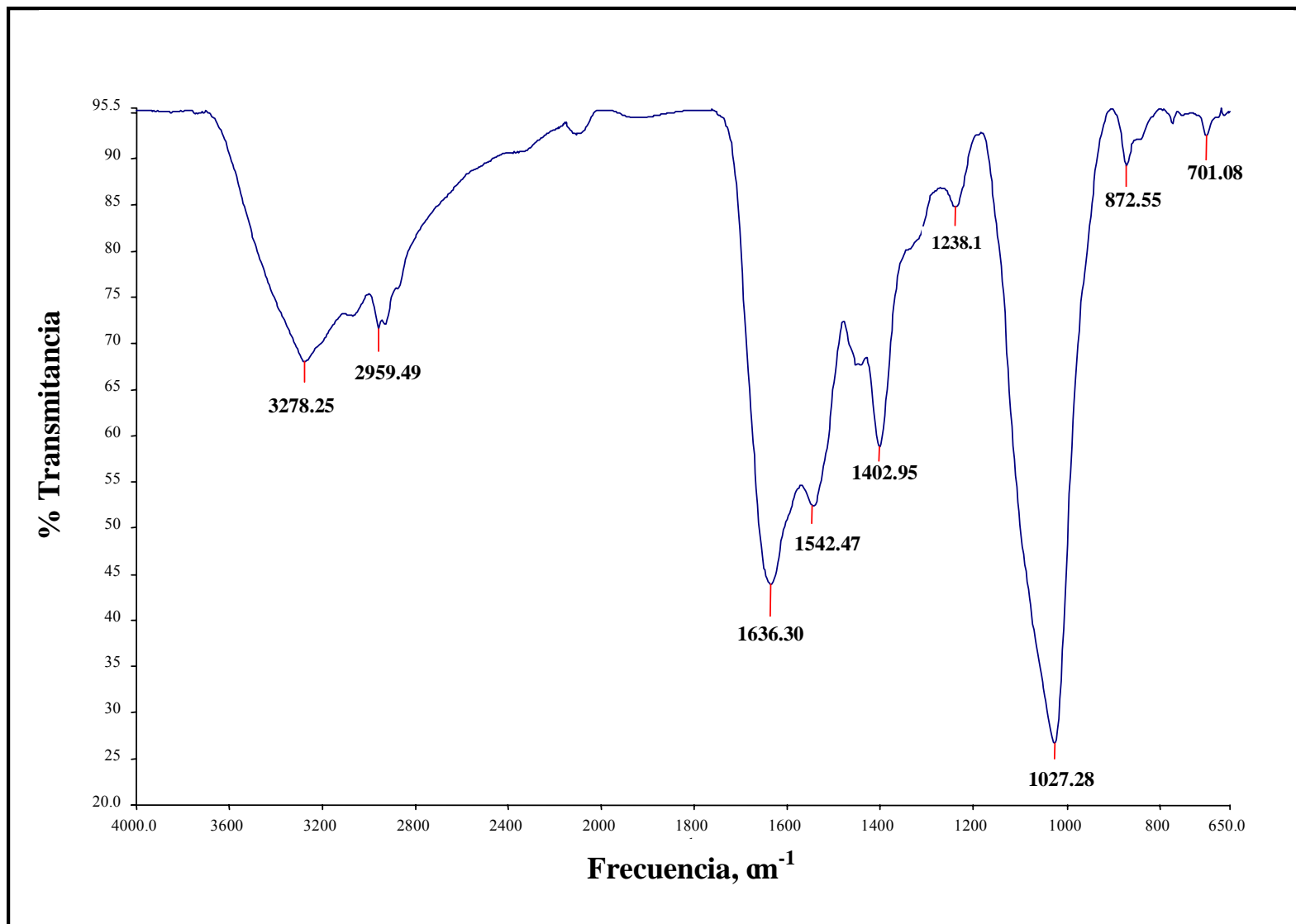


Figura 37. Espectro infrarrojo de los exopolisacáridos generados por *Enterobacter sp.* sobre la superficie de cobre.

# Capítulo 5

# Conclusiones

## Conclusiones

- El microorganismo *Enterobacter sp.*, aislado de a partir de un DIU retirado, es capaz de adaptarse, crecer y desarrollarse en un medio uterino simulado y es capaz de resistir la toxicidad de los iones cobre liberados por los DIUs.
- La fase de adaptación del microorganismo y la adsorción de moléculas orgánicas (acondicionamiento de la superficie), se realiza durante las primeras horas. Es a partir de las 18-24 horas que se presenta el crecimiento exponencial. Esto se puede apreciar físicamente en el interior de la celda, por turbidez de la solución y la formación de una nata sobrenadante.
- La adsorción de moléculas orgánicas, generación de EPS, la formación de complejos organometálicos con cobre y el desarrollo de colonias bacterianas, forman un consorcio llamado biopelícula.
- El análisis de la composición química de la biopelícula depositada sobre las espirales de cobre de los DIU, reporta la presencia de elementos minerales como Cl, Na, K y Ca, provenientes del medio de cultivo y algunos óxidos productos de corrosión. Asimismo la presencia de C, N y P componentes de las macromoléculas orgánicas y/o productos metabólicos (proteínas, ac. nucleicos, EPS, etc), sales minerales provenientes principalmente del medio de cultivo.
- La caracterización electroquímica del proceso de corrosión del DIU muestra como se forma y deposita una biopelícula sobre las superficies de cobre, lo que incluye los procesos de adsorción y desorción de moléculas orgánicas hasta alcanzar un equilibrio dinámico de la biopelícula formada.
- La formación de la biopelícula se puede demostrar por las características de las curvas obtenidas. Las curvas de polarización muestran un comportamiento pasivo en ambos DIU evaluados, mientras que en los diagramas de Nyquist que resultan

del análisis de EIS se aprecia un comportamiento mixto. Por otra parte, las curvas de voltametría cíclica indican que el proceso de oxidación, aunque en menor grado, se sigue llevando a cabo.

- La formación de una biopelícula favorece un ataque localizado del tipo picaduras sobre las placas y DIU de cobre, debido a que se modifican las condiciones interfaciales metal-disolución.
- Las velocidades de corrosión son menores que aquellas en ausencia de microorganismos. Por observación microscópica se logran apreciar las características de la biopelícula, lo que comprueba su porosidad, la presencia de *Enterobacter sp.*, y los productos de corrosión desarrollados. Es a través de dichos poros que la corrosión del cobre se sigue llevando a cabo, lo que mantiene así el efecto contraceptivo del DIU.
- En el caso del dispositivo intrauterino T Cu 380A los microorganismos pueden acelerar la fractura de la espiral. Esto no sucede en el dispositivo Nova T donde la espiral de cobre posee alma de plata.
- Las bandas obtenidas durante la caracterización por ATR-FTIR son características de macromoléculas orgánicas, particularmente de proteínas y son congruentes con otras reportadas en el estudio de EPS relacionados con procesos de corrosión microbiana.
- El efecto contraceptivo del DIU se mantiene, aún con la generación de la biopelícula, debido a que a través de sus poros continúa llevándose a cabo la disolución de los iones cobre. Este además, es el proceso determinante para el control de la velocidad de corrosión.

# Capítulo 6

## Referencias

1. Bombay Hospital Journal –Case reports –Bare retained copper IUDs, [http://www.bhj.org/journal/1998/4002\\_apr/case\\_293.htm](http://www.bhj.org/journal/1998/4002_apr/case_293.htm)
2. Shobokshi, A., Shaarawy, M., Cervical mucus granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin-2 soluble receptor in women using copper intrauterine contraceptive devices, *Contraception*, Vol. 6, Issue 2, August 2002, p.129-132.
3. Roblero, L., Guadarrama, A. and López, T. (1996), “Effect of copper ion on the motility, viability, acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa in vitro”, *Reprod. Fertil. Develop.*, Vol. 8, pp. 871-874.
4. Anjalika, Gupta, I., Sushil, K., Ganguly, N.K. and G., Reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates in copper intrauterine device users, *Contraception*, Vol. 59, Issue 1, January 1999, p.67-70.
5. Beltrán-García, M.J., Espinosa, A., Herrera, N., Pérez, A., Betrán-García, C. and Ogura, T. (2000), “Formation of copper oxychloride and reactive species as causes of uterine injury during copper oxidation of Cu-IUD”, *Contraception*, Vol. 61, pp. 99-103 .
6. Bastidas, J.M. and Simancas, J. (1997), “Characterization of corrosion products on a copper containing intrauterine device during storage at room temperature”, *Biomaterials*, Vol. 58, pp. 247-250.
7. Zhang, C., Xu, N., and Yang, B., “The corrosion behavior of copper in simulated uterine fluid”, *Corrosion Science*, Vol. 38, pp. 635-641, 1996.
8. Zhu, J., Xu, N., and Zhang, C., “Characteristics of copper corrosion in simulated uterine fluid in the presence of protein”, *Adv. Contracept.*, Vol. 15, pp. 179-190, 1999.

9. Reinprayoon, D., et. al, UTERINE HISTOPATHOLOGIC CHANGES AFTER Cu-FIX INTRAUTERINE DEVICE INSERTION, *Contraception*, Vol. 59, Issue 1, January 1999, p.63-65.
10. Xue, H., Xu, N., and Zhang, C., “Corrosion behavior of copper in a copper bearing intrauterine device in the presence of indomethacin”, *Contraception*, Vol. 57, pp. 49-53, 1999.
11. Valdez B. et al. (2003), “Corrosion characteristics of copper-based IUDs”, *Anti-Corrosion Methods and Materials*, Vol. 50 (2), pp. 129-135.
12. Valdez B., et. al,(2003), “Corrosion of copper in contraceptive intrauterine implants”, *Corrosion Reviews*, Vol. 21, Nos. 2-3, pp. 215-230.
13. Pruthi, V., Al-Janabi, A., Pereira, BMJ. (2003), “Characterization of biofilm formed on intrauterine devices”, *Indian Journal of Medical Microbiology*, Vol. 21, pp. 161-165.
14. Donlan, R.M., Costerton, J.W., Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microb. Rev.*, Vol. 15, pp. 167-193, 2002.
15. Lappin-Scott, H.M., Costerton, W., MICROBIAL BIOFILMS, Plant and microbial biotechnology research Series: 5, Cambridge University Press, Cap.1.
16. CORROSION, Understanding the Basics, ASM International, Cap. 1-2.
17. <http://www.qws-online.co.uk/12119/78142.html>
18. [http://www.edstrom.com/Resources.cfm?doc\\_id=158](http://www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=158)
19. Risk, M., Shaban, N., Medhat, I., El Dien, M.Y., Ollo, M.A., Electrón micsocopic and chemical study of the deposits forme don the copper and inert IUCDs, *Contraception*, Vol 42, No. 6, pp. 643-653, 1990.
20. Tratado de Ginecología de Novak, 11ª. Edición, Editorial Interamericana-McGraw-Hill, México, D.F., 1991, pp. 198-202

21. Ripa, L. E., Corrosión del DIU de cobre y el cáncer en el sistema reproductor de la mujer, Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México, 2003.
22. Massey, A.G., Thompson, N.R., Johnson, B.F.G., Davis, R., THE CHEMISTRY OF COPPER, SILVER and GOLD, Pergamon Texts in Inorganic Chemistry, Volume 17, Pergamon Press, pp. 1-78, 1973.
23. ASM 13 CORROSION
24. Webster, B.J., Werner, S.E., Wells, D.B., Bremer, P.J., Microbiologically influenced corrosion of copper in water systems –pH effects, Corrosion, Vol. 56, No. 9, 2000, pp. 942-950.
25. Vallet, M., Faus, J., García-España, E., Moratal, J., Introducción a la química bioinorgánica, Editorial Síntesis, Capítulo 1.
26. Baran, E. J., Química bioinorgánica, Editorial McGraw-Hill, Capítulo 3.

## **BIBLIOGRAFIA ADICIONAL**

- Bahamondes, L., Del Castillo, S., Tabares, G., Espejo, X., Perrotti, M., Petta, C., “Comparison of weight increase in users of depot medroxyprogesterone acetate and copper IUD up to 5 years”, *Contraception*, Vol. 64, Issue 4, August 2001, p.223-225.
- Beltran-Garcia, M.J., Espinosa, A., Perez-Zapata, A. and Ogura, T. (1998), “In vitro cell toxicity and catalase activation by metallic copper of the intrauterine device”, *Pathophysiol.*, Vol. 5, pp. 82 .
- Berthou, J., Chrétien, F.C., Driguez, P.A. (2003), “Degradation of copper IUDs in utero. The process of metallic corrosion. A scanning electron microscope study”, *Ginécologie, Obstétrique & Fertilité*, Vol. 31, pp. 29-42.
- Bonacho, I., Pita, S., Gómez-Besteiro, M.I., “Eight years with the same IUD”, *Contraception*, Vol. 59, Issue 4, April 1999, p.233-236.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., “Microbiología”, Sexta edición, Editorial Prentice Hall, 1993.

- Chantler, E.N., Scott, K., Filho, C.I., Elstein, M., Faragher, E.B., Lorimer, G.W. and Brough, I. (1984), "Degradation of the copper releasing intrauterine contraceptive and its significance", *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, Vol. 91, pp. 172-181.
- De Alba, L. M., "Simulación en laboratorio del desarrollo de biopelículas inductoras de deterioro en materiales compuestos", Tesis profesional, Universidad Autónoma de Guadalajara, México, 1998.
- Días, B. L., "Corrosión microbiológicamente inducida por Enterobacterias", Tesis profesional, Universidad Autónoma de Guadalajara, México, 1995.
- Donlan R.M. (2002), "Biofilms: Microbial Life on Surfaces", *Emerging Infectious Diseases*, Vol 8, pp. 881-890.
- Donlan R.M. and Costerton, J. W. (2002), "Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms", *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 15, pp. 167-193.
- Donlan, M. R., "Biofilms and device associated infections, *Emerging Infectious Diseases*", Vol. 7, No. 2, March-April 2001, pp. 277-281.
- Espey, E., Ogburn, T., "Perpetuating negative attitudes about the intrauterine device: Textbooks lag behind the evidence", *Contraception*, Vol. 65, Issue 2, June 2002, p.389-395.
- Farr, G., et. al., "Clinical performance of the TCU 380A and Lippes Loop IUDs in three developing countries", *Contraception*, Vol. 52, Issue 1, July 1995, p.17-22.
- Faúndes, A., et. al., "The risk of inadvertent intrauterine device insertion on women carriers of endocervical *Chlamydia trachomatis*", *Contraception*, Vol. 58, Issue 2, August 1998, p.105-109.
- Faúndes, D., et. al., "T-Shaped IUD move vertically with endometrial growth and involution during the menstrual cycle", *Contraception*, Vol. 57, Issue 6, June 1998, p.413-415.
- Faúndes, D., Perdigao, A., et. al, "T-Shaped IUDs accommodate in their position during the first 3 months after insertion", *Contraception*, Vol. 62, Issue 4, October 2000, p.165-168

- Ferrari, M. D., de Mele, M. F. L., Videla, H. A., eds., “Manual práctico de Biocorrosión y Biofouling para la industria / Subprograma XV. Red. Temática XVc. BIOCORR”, 1995.
- Ford T., Black T. and Mitchel R. (1991), “Relationship between bacterial exopolymers and corroding metal surfaces”, *Corrosion 190*, Paper No. 110, NACE, Houston Texas, USA.
- Geesey G. and Bremer P. (1991), “Evaluation of copper corrosion under bacterial biofilms”, *Corrosion 191*, Paper No. 111, NACE, Houston Texas, USA.
- Goebe L., Matthes E. and Kurtsman M. (1990), “Detection of Actinomyces on an IUD”, *Zentra (b) Cynakol*, Vol. 112, No. 3, pp 167-169.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T., BERGEY’S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 9<sup>th</sup> Edition, Williams & Wilkins, 1994.
- Holland, M. and White, I. (1988), “Heavy metals and human spermatozoa III. The human toxicity of copper ions for spermatozoa”, *Contraception*, Vol. 14, pp. 25-38.
- Hora L., Nenoff P., Ziegert M. and Höckel M. (2001), “Missed abortion complicated by Candida infection in a woman with rested IUD”, *Archive of Gynaecology and Obstetrics*, Vol. 264, pp 215-217.
- <http://www.corrosion-doctors.org/Electrochem/Frames.htm>
- [http://www.gamry.com/App\\_Notes/DC\\_Corrosion/GettingStartedWithEchemCorrMeasurements.htm](http://www.gamry.com/App_Notes/DC_Corrosion/GettingStartedWithEchemCorrMeasurements.htm)
- <http://www.gineconet.com/articulos/920.htm> (Sep-7-2004, DIU)
- Little, B., Ray, R., “A perspective on corrosion inhibition by biofilms”, *Corrosion*, Vol. 58, No. 5, Mayo, 2002, 424-428.
- Markovitch, O., Klein, Z., Gidoni, Y., Holzinger, M., Beyth, Y., “Extrauterine mislocated IUD: is surgical removal mandatory?”, *Contraception*, Vol. 6, Issue 2, August 2002, p.105-108.
- Mora, N., Cano, E., Bastidas, L. M., “Influence of pH and oxygen on copper corrosion in simulated uterine fluid”, *Biomaterials* 23 (2002), 667-671.

- Naumman, D. (2000), "Infrared spectroscopy in microbiology", *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, pp. 102-131.
- Ortiz, M., Croxato, H. and Bardin, C. (1996), "Mechanism of action of intrauterine device", *Obstet. Gynecol. Surv.*, Vol. 51, pp. 42-51.
- Pascuale, S.A., Tusser, T.J., Foldes, R., Mezrich, R.S., "Lack of interaction between magnetic resonance imaging and the copper-T380A IUD", *Contraception*, Vol. 55, Issue 3, March 1997, p.169-173.
- Reinprayoon, D., et. al, "Uterine histopathologic changes after Cu-fix intrauterine device insertion", *Contraception*, Vol. 59, Issue 1, January 1999, p.63-65.
- Rioseco, L., "Deterioro microbiológicamente inducido en materiales de uso geotérmico", Tesis profesional, Universidad Autónoma de Guadalajara, México, 1995.
- Rivera, R., Chen-Mok, M., McMullen, S., "Analysis of client characteristics that may affect early discontinuation of the TCU-380A IUD", *Contraception*, Vol. 60, Issue 3, September 1999, p.155-160.
- Rodriguez, C., Dorea, J.G., Cantuaria, A., "Intrauterine device and maternal copper metabolism during lactation", *Contraception*, Vol. 63, Issue 1, January 2001, p.37-39.
- Rosenberg, M. J., "Performance of the TCU380A and Cu-fix IUDs in an international randomized trial", *Contraception*, Vol. 53, Issue 4, April 1996, p.197-203.
- Rowe, P.J., Boccard, S., Farley, T.M.M., Peregoudov, S., "Long-term reversible contraception", *Contraception*, Vol. 56, Issue 6, December 1997, p.341-352.
- Shoubnikova, M., et. al., "Contraceptive use in women with bacterial vaginosis", *Contraception*, Vol. 55, Issue 6, June 1997, p.355-358.
- Sivin, I., et. al., "Contraceptives for lactating women: a comparative trial of a progesterone releasing vaginal ring and the copper T-380A IUD", *Contraception*, Vol. 55, Issue 4, April 1997, p.225-232.
- Thonneau, P., Goulard, H., Goyaux, N., "Risk factors for intrauterine device failure: A Review", *Contraception*, Vol. 64, Issue 1, July 2002, p.33-37.

- Tsanadis G., Kalantoridou S., Kaponis A., Paraskevaïdis E., Zikopoulos K. (2002), “Bacteriological cultures of removed IUD’s and Pelvis Inflammatory Disease”, *Contraception*, Vol. 65, No. 5., pp. 339-342.
- Welkovic, S., Bregiero, L.O., Faúndes, A., de Alencar, R., Ferreira, C., “Post-partum bleeding and infection after post-placental IUD insertion”, *Contraception*, Vol. 63, Issue 3, March 2001, p.155-158.