



# UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel

## ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE EXUDADOS RADICULARES

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AMBIENTAL

P R E S E N T A

**EDUARDO DE JESÚS COUTIÑO  
GONZÁLEZ**



UNIVERSIDAD DEL MAR  
CAMPUS PUERTO ÁNGEL

PUERTO ÁNGEL, OAXACA.

JULIO 2005

A mis padres, Blanca y Alejandro, por que a ellos les debo la vida, todo lo que tengo y lo que soy. Muchas gracias por todo.

A mis hermanos (en orden de aparición): Alejandro (Alex), Gilberto (meco), Mariano (maya), Miguel (migue), Vidalchón (bombis), Lupita (pita), ahhhhhhhhh y a todos mis sobrinos y sobrinas, gracias por apoyarme y aconsejarme.

A la Dra. Beatriz Hernández, por todo el apoyo que me brindó y me sigue brindando, especialmente en la elaboración de este trabajo, muchas gracias maestra, no tengo como pagarle.

Al M. en C. Héctor López Arjona, por todo el apoyo recibido durante el lapso de mi carrera, especialmente en la culminación de ésta. Gracias por todo jefe, fue un placer trabajar contigo.

A la Dra. Judith Amador Hernández, por todas sus enseñanzas y atenciones prestadas en la realización de este trabajo.

A la I.Q.I. Ma. del Rocío Gutiérrez Ortiz, por su invaluable ayuda y dedicación depositada en el presente trabajo, muchas gracias por todo maestra.

Al Dr. Luc Dendooven, por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia, por su apoyo y consejos, desde el inicio de este trabajo.

A todos los profesores que influyeron en mi formación académica.

---

Al Dr. Pedro Joseph Nathan del Departamento de Química del Centro Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), por el apoyo en la obtención de los datos espectroscopicos.

A la M. en C. Alvina Bucio por el apoyo técnico en la determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.

A la Dra. Olivia Franco Hernández por las facilidades prestadas en la adquisición de bibliografía.

A mis cuates presentes y no presentes; Flaco (Marco), Manolo, Lobo (Luis), Toro (Angel), Viejito (Jairo), Duende (Gabo), Darius (Dario), Cholis (Gris), Edith, Elder, los Talivanes, Kari, Clau, Coral Reef, Bris, Coris, Liz y a todos aquellos que me brindaron su amistad desinteresadamente.

A todas aquellas personas que han dejado una huella en mi vida, especialmente a Gras, gracias por todo.

A todas las personas que confiaron en mi y a las que no confiaron en mi, también se los agradezco.

---

---

**ÍNDICE**

	Pag.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Generalidades	
2.1.1 Exudados radiculares	7
2.1.2 Importancia de los exudados radiculares	7
2.2 Antecedentes	
2.2.1 Métodos actuales de cuantificación de exudados radiculares	10
2.2.2 Sensibilidad de los métodos empleados en la cuantificación de exudados radiculares	12
2.2.3 Limitantes de los métodos empleados en la cuantificación de exudados radiculares	12
2.2.4 Esterificación de ácidos orgánicos, empleando la 2,4'-dibromoacetofenona como agente esterificante	12
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos	18

---

---

V.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
	5.1 Materiales y reactivos	20
	5.2 Equipos	21
	5.3 Obtención de los derivados de ácidos orgánicos	21
	5.4 Identificación estructural	
	5.4.1 Derivado del ácido ascórbico (DAASC)	23
	5.4.2 Derivado del ácido cítrico (DACIT)	24
	5.4.3 Derivado del ácido fumárico (DAFUM)	25
	5.4.4 Derivados del ácido <i>L</i> -málico (DALMAL)	26
	5.4.5 Derivados del ácido succínico (DASUCC, DASUCC1)	27
	5.4.6 Derivado del ácido tartárico (DATAR)	29
	5.5 Pruebas de cuantificación de los derivados	
	5.5.1 Espectrofotometría ultravioleta-visible y de fluorescencia de los derivados formados	30
	5.5.2 Cromatografía de líquidos	31
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
	6.1 Esquema general de los métodos actuales empleados en la cuantificación de exudados radiculares	33
	6.2 Obtención de los derivados y condiciones de reacción	36

---

6.3 Optimización de las condiciones de reacción	
6.3.1 Disolvente	39
6.3.2 pH	40
6.3.3 Tiempo de reacción	41
6.4 Identificación estructural	
6.4.1 Identificación del compuesto DACIT y asignación de 44 señales	44
6.4.2 Identificación del compuesto DALMAL y asignación de 53 señales	53
6.4.3 Identificación del compuesto DAASC y asignación de 58 señales	58
6.4.4 Identificación de los compuestos DAFUM, DASUCC, DASUCC1 y DATAR, y asignación de señales	72
6.5 Propuesta para la cuantificación de los derivados	
6.5.1 Pruebas de espectrofotometría ultravioleta-visible	75
6.5.2 Pruebas de espectrofotometría de fluorescencia	83
6.5.3 Pruebas de separación empleando cromatografía de líquidos	87
6.6 Propuesta para la posible cuantificación de los exudados radiculares empleando las metodologías probadas	97
VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	99
VIII. BIBLIOGRAFÍA	103
IX. ANEXO	108

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura	Pag.
1. Diversas interacciones llevadas a cabo por las raíces de las plantas y diversos microorganismos en la rizósfera, a través de los exudados radiculares	8
2. Reacción de derivatización descrita por Berger	13
3. Esquema general de los métodos actuales que se emplean en la cuantificación de exudados radiculares	34
4. Esquema planteado para el estudio de cuantificación de exudados radiculares	35
5. Reacciones llevadas a cabo para esterificar los ácidos de interés	36
6. Continuación de las reacciones llevadas a cabo para esterificar los ácidos de interés	37
7. Placas cromatográficas de los derivados formados y estructura del alcohol	38
8. Placas cromatográficas de las reacciones de algunos derivados; <b>A</b> , empleando como disolvente una mezcla de EtOH:H <sub>2</sub> O (80:20); <b>B</b> , reemplazando el agua por una disolución acuosa de CaCl <sub>2</sub> 0.5 mM en la mezcla de disolventes	43
9. Espectro IR de DACIT, empleando como disolvente CHCl <sub>3</sub>	44
10. <b>A</b> . Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de DACIT. <b>B</b> . Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del ácido cítrico, tomado del catálogo Aldrich	46
11. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de DACIT	47
12. Sección del espectro de HSQC de DACIT	48
13. Espectro de HMBC de DACIT	50

---

---

14. Espectro de masa de DACIT	51
15. Espectro IR de DALMAL	53
16. <b>A.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DALMAL. <b>B.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del ácido <i>L</i> -málico, tomado del catálogo Aldrich	55
17. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de DALMAL	56
18. Espectro IR de DAASC	58
19. Posible formación del cetónido entre un diol vecinal del residuo del ácido ascórbico con el AE	60
20. <b>A.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DAASC. <b>B.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del ácido ascórbico, tomado del catálogo Aldrich	61
21. Espectro COSY de DAASC	62
22. Espectro NOESY de DAASC	63
23. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de DAASC	65
24. Sección del espectro de HSQC de DAASC	66
25. Sección del espectro de HMBC de DAASC	67
26. Sección del espectro de HMBC de DAASC	68
27. Espectro de masas de DAASC	70
28. Espectro IR de DAFUM	72
29. Espectro IR de DATAR	73
30. Espectros de absorción de los ácidos puros considerados en este estudio	76
31. Espectros de absorción de DAASC y DACIT	77
32. Espectros de absorción de DAFUM y DALMAL	78

---

---

33.: Espectro de absorción de DASUCC y DARTAR.	79
34.A. Curva de calibración de DALMAL y DACIT	80
35. Gráfico que correlaciona los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) de los derivados con su peso molecular	81
36. Espectro de absorción del alcohol	82
37. Espectro de fluorescencia de DAASC	83
38. Espectro de fluorescencia de DACIT	84
39. Espectro de fluorescencia de DALMAL	85
40. Pruebas para DALMAL variando las relaciones de la fase móvil MeOH:H <sub>2</sub> O 90:10, 80:20 y 70:30	87
41. Cromatograma de todos los derivados formados	88
42. Cromatograma de la mezcla de reacción de los ácidos, empleando concentraciones de $10^{-5}$ y $10^{-6}$	90
43. Cromatograma de la mezcla de reacción, empleando como fase móvil MeOH:H <sub>2</sub> O (70:30)	91
44. Cromatograma de la mezcla de reacción del ácido succínico; sólido	92
45. Cromatograma de la mezcla de reacción del ácido succínico; sobrenadante	92
46. Cromatograma del producto de reacción del ácido L-málico; sólido	93
47. Cromatograma del producto de reacción del ácido L-málico; sobrenadante	94
48. Cromatograma de la mezcla de DAFUM-DALMAL	95
49. Cromatograma de la mezcla de reacción de todos los ácidos	96
50. Esquema propuesto para la posible cuantificación de los exudados radiculares	97

---

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla	Pag.
1. Concentraciones de compuestos utilizados, y rendimientos obtenidos de la reacción de esterificación	22
2. Cantidad de los derivados empleados para preparar las disoluciones de trabajo	30
3. Constantes de disociación ácida de algunos compuestos, a 25 °C	39
4. Optimización de disolvente en la reacción de esterificación del ácido fumárico	39
5. Optimización de pH en la reacción de esterificación del ácido fumárico	40
6. Optimización del tiempo de reacción de la reacción de esterificación del ácido fumárico	42
7. Asignación de las señales de los espectros de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de DACIT	52
8. Asignación de las señales de los espectros de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de DALMAL	57
9. Asignación de las señales de los espectros de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de DAASC	71
10. Obtención de los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) de los diversos derivados formados	81

---

---

**ANEXO**

Figura.	Pag.
51. Espectro COSY de DACIT	109
52. Espectro NOESY de DACIT	11
53. Espectro COSY de DALMAL	111
54. Espectro NOESY de DALMAL	112
55. Espectro HSQC de DALMAL	112
56. Espectro HMBC de DALMAL	114
57. Espectro de masas de DALMAL	115
58. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del ácido fumárico, tomado del catálogo Aldrich	116
59. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DAFUM	116
60. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de DAFUM	116
61. Espectro COSY de DAFUM	117
62. Espectro NOESY de DAFUM	118
63. Espectro HSQC de DAFUM	119
64. Espectro HMBC de DAFUM	120
65. Espectro de masas de DAFUM	121
66. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DASUCC	122
67. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de DASUCC	122

---

68. Espectro COSY de DASUCC	123
69. Espectro NOESY de DASUCC	124
70. Espectro HSQC de DASUCC	125
71. Espectro HMBC de DASUCC	126
72. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DASUCC1	127
73. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DATAR	128

---