



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“ESTUDIO DE LA FACTIBILIDAD DEL ANÁLISIS DE CÉLULAS
FÚNGICAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacobióloga

PRESENTA:

Saila Viridiana Cázares García

DIRECTORA DE TESIS:

D. C. Virginia Angélica Robinson Fuentes

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO DEL 2007.



El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Desarrollo Analítico, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, bajo la asesoría y dirección de la D. C. Virginia A. Robinson Fuentes.

DEDICATORIAS

A Dios, que me dio la vida y una vida llena de amor y felicidad.

A Mi Padre

Por haberme dado la oportunidad de soñar y las herramientas para lograr mis sueños, por haber caminado a mi lado y tomarme en tus brazos en los momentos difíciles. A Ti mi Padre, a quien debo cuanto soy, por colmarme de consejos y brindarme tu valiosa sabiduría. Por que eres mi héroe, este logro es por Ti y para Ti.

A Mi Madre

Que antes que todo has sido mi "mejor amiga". Gracias Amiga por amarme de sobremanera, por nunca haberme abandonado, por inspirarme a cumplir mis metas, por enseñarme a levantar después de haber caído. Gracias Mamá eres una maravillosa mujer, el pilar de mi vida y de mis sueños. Con todo mi cariño te dedico este trabajo, por que sin ti nada hubiese sido posible.

A Mi Hijo

Por que eres lo más importante en mi vida. Me acompañaste en las horas de trabajo inspirándome cada vez más y nunca me permitiste rendirme. Gracias Hijo, por haber nacido, por permitirme amarte, por enseñarme la majestuosidad de la naturaleza.

TE AMO.

A Mis Hermanos

Berenice y Gabriel, por alentarme, apoyarme y tenderme su mano durante mi carrera. Por que nunca me abandonaron, ofreciéndome consejos y críticas que me han ayudado a ser un mejor ser humano.

A Mis Sobrinos

Kyara y Lupita, por brindarme momentos llenos de juegos y sonrisas. Gabrielito, que a tus tres añitos me has enseñado una gran lección, el no rendirme ante la adversidad, el luchar por la vida y salir adelante a pesar de las cicatrices obtenidas en el camino.

A Mis Amigos

Kika y Gissela, amigas incondicionales. Me levantaron cuando caí, me acompañaron cuando estuve triste y creyeron en mí aún cuando yo dejé de creer en mí misma. Por los momentos de diversión desbordada que hemos compartido y por su hermosa amistad.

Omarr, por enseñarme el valor de la amistad, por ayudarme a ser valiente, paciente y comprensiva. Por tu cariño.

Tacho, por que me enseñaste el valor del esfuerzo y la dedicación. Por que siempre has sido constante en mí vida y nunca dejaste de ofrecerme tu apoyo y tu cariño.

Julio, por que a pesar de la distancia has sabido mantener nuestra amistad, por que siempre has estado a mi lado.

AGRADECIMIENTO

Con admiración a la D. C. Virginia A. Robinson Fuentes por la paciencia que siempre tuvo para conmigo, por su apoyo y comprensión. Por ofrecerme sus conocimientos y ayuda para resolver los problemas que se presentaron, por su entusiasmo en la realización de esta tesis y por brindarme su amistad. Mil Gracias.

A la Maestra Blanca Nateras Marín Por compartir conmigo sus experiencias, por su amistad, que se hizo acompañar de consejos y un sinnúmero de sonrisas.

A la Q.F.B. Leticia Padilla García por regalarme tiempo valioso para transmitirme sus conocimientos, por orientarme, apoyarme y brindarme su maravillosa amistad.

A la Q.F.B. Armida Sánchez Gallegos por sembrar en mí el amor por el conocimiento y proporcionarme parte de su experiencia y sabiduría. Gracias por su amistad.

A mis sinodales, D. C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y al D. C. Gerardo Vázquez Marrufo, por su apoyo, paciencia y comprensión.

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
Índice de figuras	iii
Abreviaturas usadas	v
Resumen	2
I. Introducción.	3
II. Marco teórico.	6
2.1 Hongos.	6
2.1.1 Reproducción de los hongos.	10
2.1.1.a Fase sexual y asexual.	10
2.1.2 Clasificación de los hongos.	17
2.1.2.a Phylum Chytridiomycota.	17
2.1.2.b Phylum Zygomycota.	18
2.1.2.c Phylum Ascomycota.	18
2.1.2.d Phylum Basidiomycota.	19
2.2 Electroforesis Capilar.	24
2.2.1 Componentes básicos de un sistema de Electroforesis Capilar.	25
2.2.2 Movilidad Electroforética.	26
2.2.3 Electroósmosis.	27
2.2.4 Movilidad aparente.	30
2.2.5 Inyección de la muestra.	31
2.1.5.a Inyección electrocinética.	31
2.1.5.b Inyección hidrodinámica.	32
2.2.6 Sistema de detección.	33
2.1.6.a Detector UV – Vis.	33
2.1.6.b Detector de fluorescencia inducida por láser.	34
2.1.6.c Detección por arreglo de fotodiodo.	34
2.1.6.d Detección electroquímica.	35
2.2.7 Eficiencia de la separación.	35
2.2.7.a Eficiencia de la columna.	35
2.2.8 Diámetro del capilar y efecto Joule.	38
2.2.9 Efecto del voltaje y la temperatura.	40
2.3 Formas de Electroforesis Capilar.	41
2.3.1 Electroforesis Capilar en Zona.	41
2.3.2 Polaridad.	42
2.3.3 Buffers.	42
2.3.4 Paredes del capilar.	43
2.4 Separación de analitos.	44
2.5 Origen de la carga de un microorganismo.	44
2.6 Caracterización de microorganismos por EC.	45
2.7 Otras aplicaciones.	47
III. Justificación.	48
IV. Objetivos.	49
4.1 Objetivo General.	49
4.2 Objetivos particulares.	49
V. Parte experimental.	50
5.1 Materiales y Métodos.	50

5.1.1 Instrumentación.	50
5.1.2 Reactivos.	50
5.1.3 Cepas estudiadas.	51
5.1.4 Medio de cultivo.	51
5.1.4.a. Caldo Papa Dextrosa.	51
5.1.4.b Agar Papa Dextrosa.	51
5.2 Cultivo.	51
5.3 Preparación de la muestra.	52
5.3.1 <i>Lactarius sp.</i>	52
5.3.2 <i>Pleurotus sp.</i>	52
5.4 Condiciones electroforéticas.	52
VI. Resultados.	54
6.1 Observación macroscópica.	54
6.1.1 <i>Lactarius sp.</i>	54
6.1.2 <i>Pleurotus sp.</i>	54
6.2 Observación microscópica.	55
6.2.1 <i>Lactarius sp.</i>	55
6.2.2 <i>Pleurotus sp.</i>	56
6.3 Electroferogramas.	57
6.3.1 Blanco	57
6.3.2 Electroferogramas de <i>Pleurotus sp.</i> usando capilar de 100 µm de d.i.	57
6.3.3. Electroferogramas de <i>Lactarius sp.</i> usando capilar de 100 µm de d.i.	59
6.3.4 . Electroferogramas de <i>Pleurotus sp.</i> y <i>Lactarius sp.</i> usando capilar de 75 µm de d.i.	61
VII. Discusión.	62
VIII. Conclusiones.	64
IX. Perspectivas	65
Glosario	66
Referencias bibliográficas	67

INDICE DE FIGURAS

Número	Nombre	Pág.
1	Ultraestructura de la célula fúngica.	7
2	Quitina (N-acetil-D-glucosamida)	7
3	Tipos de hifas	9
4	Tipos de esporas sexuales	10
5	Tipos de conidios	13
6	Tipos de conidios según su origen	14
7	Tipos de conidios blásticos	14
8	Tipos de conidios tálicos	15
9	Clasificación de los conidios en relación con la célula conidiógena.	15
10	Clasificación de los conidios de acuerdo con su posición con respecto a otros conidios.	16
11	Clasificación de las células conidiógenas de acuerdo con la modificación de tamaño o de forma que sufren durante la conidiogénesis.	16
12	Tipos especiales de células conidiógenas.	17
13	Phylum Crytridiomycota.	18
14	Ciclo reproductivo de Ascomicetes.	18
15	Crecimiento del micelio dicariótico por fabulación en basidiomicetos.	19
16	Tipos de basidiocarpo.	21
17	Ciclo reproductivo de Basidiomicetos.	21
18	Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar.	25
19	a) Grupos silanol presentes en las paredes del capilar; b) Doble capa eléctrica formada en la pared del capilar.	27
20	Electroósmosis.	28
21	Efecto del pH sobre la EOF.	29
22	Inyección electrocinética.	32
23	Inyección hidrodinámica	33
24	Corte de los extremos de un capilar.	39
25	Electroforesis Capilar en Zona.	41
26	<i>Lactarius sp.</i> en PDA.	54
27	<i>Pleurotus sp.</i> en PDA.	54
28	Observación microscópica de <i>Lactarius sp.</i> a diferentes horas de incubación.	55
29	Observación microscópica de <i>Pleurotus sp.</i> a diferentes horas de incubación.	56
30	Electroferograma del Caldo Papa Dextrosa, con inserto que muestran el área donde se presentan los picos correspondientes a <i>Lactarius sp.</i> y <i>Pleurotus sp.</i>	57
31	Electroferograma donde se observa el pico correspondiente a <i>Pleurotus sp.</i> BGE de fosfatos 20 mM, pH 7.0	57
32	Electroferograma de <i>Pleurotus</i> usando BGE pH 8.0, 20	58

	mM. A) corresponde a buffer de borato y; B) a buffer de fosfato.	
33	Electroferograma que muestra la influencia de la concentración del buffer. BGE de fosfato, pH 7.0 A) 30 mM; B) 20 mM y C) 10 mM.	58
34	Electroferograma que muestra la reproducibilidad del pico producido por <i>Pleurotus sp.</i> BGE de fosfato 20 mM, pH 7.0	58
35	Electroferograma que muestra el efecto del pH en el tiempo de migración para <i>Pleurotus sp.</i> BGE de fosfato 20mM, A) pH 8.0 y; B) pH 7.0	59
36	Electroferograma que muestra el pico producido por <i>Lactarius sp.</i> BGE de fosfato 10 mM, pH 7.0	59
37	Electroferograma que muestra el pico producido por <i>Lactarius sp.</i> BGE de fosfato 20 mM, pH 7.0	59
38	Electroferograma que muestra el pico producido por <i>Lactarius sp.</i> BGE de fosfato 30 mM, pH 7.0	60
39	Electroferograma que muestra el efecto de la concentración de BGE en el tiempo de migración. BGE de fosfato pH 7.0. A) 10 mM y; B) 20 mM.	60
40	Electroferograma que muestra la reproducibilidad del sistema en el pico mayoritario de <i>Lactarius sp.</i>	60
41	Electroferograma que muestra el efecto del pH del BGE en el tiempo de migración. A) Corresponde a pH 7.0 y; B) Corresponde a pH 6.0. BGE de fosfato 30 mM.	61
42	Electroferograma que muestra la respuesta obtenida por <i>Pleurotus sp.</i> en un capilar de 75 μ m de d.i.	61
43	Electroferograma que muestra la falta de respuesta de <i>Lactarius sp.</i> cuando se usa un capilar de 75 μ m de d.i. BGE de fosfato 30 mM, pH 7.0	61

ABREVIATURAS USADAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BGE	Buffer de corrimiento
CGE	Electroforesis Capilar en Gel
CIEF	Enfoque Isoeléctrico Capilar
CITP	Isotacoforesis Capilar
d.i.	Diámetro Interno
EC	Electroforesis Capilar
ECZ	Electroforesis Capilar en Zona
EOF	Flujo Electroosmótico
EPM	Movilidad Electroforética
HEPES	Ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LIF	Detector de Fluorescencia Inducida por Láser
MEKC	Cromatografía Capilar en Fase Micelar
MES	Ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico
MO	Microorganismo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Detector por Arreglo de Fotodiodo
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDC	Caldo Papa Dextrosa
PIPES	Ácido 1,4-Piperazindietasulfónico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TRIS	2-amino,2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UV	Ultravioleta

ESTUDIO DE LA FACTIBILIDAD DE ANÁLISIS DE CÉLULAS FÚNGICAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

RESUMEN

El uso de la Electroforesis Capilar para el análisis de Microorganismos es restringido, y aún más para el análisis de Células Fúngicas.

En este trabajo se propone el estudio de la factibilidad del análisis de hifas por Electroforesis Capilar en Zona para los hongos Basidiomicetos *Lactarius sp.* y *Pleurotus sp.* Inicialmente se obtuvieron los hongos en agar, para después cultivarlos en medio líquido, en el cual se observó su crecimiento y desarrollo para así obtener los tiempos adecuados para su análisis, resultando estos en 14, 28 y 30 horas para *Lactarius sp.* y; 28 y 29.5 horas para *Pleurotus sp.* Se probaron diferentes condiciones electroforéticas para su estudio, variando los tiempos de inyección de muestra, los tipos de buffer, sus concentraciones y valores de pH, además del diámetro interno del capilar.

Se encontró que sí es factible analizar hifas por Electroforesis Capilar, y los mejores resultados obtenidos en este trabajo se presentaron con un tiempo de inyección de muestra de 5 segundos, buffer de fosfato a una concentración 30 mM a pH 7, y el uso de un capilar de 100 μm de diámetro interno. Tales condiciones favorecieron la observación del pico en el electroferograma correspondiente a cada hongo.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la década pasada la Electroforesis Capilar (EC) tuvo un gran auge como técnica estándar en múltiples disciplinas. La química, biología, biotecnología y microbiología, entre muchas otras, se han servido de ésta para el análisis de una amplia variedad de moléculas, con o sin carga. Las distintas modalidades de electroforesis capilar han permitido el estudio de carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, iones, moléculas de interés clínico y farmacológico, y recientemente entidades biológicas tales como células y microorganismos.

La EC es una poderosa herramienta analítica que produce separaciones rápidas y altamente eficientes con un mínimo de preparación y consumo de muestra; y aunque es predominantemente usada para el análisis de moléculas, recientemente ha posibilitado la separación, identificación y cuantificación de microorganismos [1, 2, 7]. Además, usando EC se pueden investigar las propiedades de las células microbianas con el fin de obtener información de la manera en que se comportan e interactúan con el medio ambiente. Las propiedades superficiales proporcionan información sobre la composición celular, sus puntos isoeléctricos, velocidad con la que captan nutrientes y fármacos antimicrobianos del medio, adhesión a diferentes superficies o su aglutinación [1,2]. A través de estos estudios se pueden hacer modificaciones que permitan aprovechar mejor las propiedades de tales microorganismos.

Si bien es sabido, que el uso indiscriminado de antibióticos ha promovido el surgimiento de una gran cantidad de cepas microbianas resistentes; y que por otro lado, el aumento de pacientes inmunodeprimidos, ya sea porque son pacientes que han tenido algún trasplante de órganos o porque padecen de SIDA, ha ocasionado que sean sujetos de algún tipo de micosis. Es por esto que ahora se requiere que los ensayos microbiológicos sean más rápidos, más sensibles y más selectivos. Varios autores se han enfocado a estudiar la posibilidad de analizar los microorganismos como células usando diferentes técnicas tales como los inmunoensayos, la fluorescencia así como la detección por PCR [7]. Todas estas técnicas instrumentales, que pueden considerarse sofisticadas se están volviendo cada vez más comunes por las razones antes descritas; sin embargo, no podrán sustituir las técnicas tradicionales que involucran cultivos, microscopía, etc. pero si

representan una herramienta para el diagnóstico rápido de microorganismos. Toda vez que se ha observado la utilidad de utilizar la EC para estudiar las propiedades superficiales de las células microbianas, se vio que era posible analizarlos directamente de diferentes muestras. Actualmente, la EC y los dispositivos de análisis de microfluidos representan los métodos de ensayo microbiológico más prometedores [1]. Sakamoto y colaboradores, reportaron un sistema de cuantificación rápido y simple para a cuantificación de bacterias en muestras en cultivo y ambientales [45]. Las cuentas bacterianas obtenidas fueron similares a aquellas que se obtuvieron por microscopia directa, con la diferencia que con este método, que incluye un dispositivo de microfluidos, se podían analizar 6 muestras en 30 min. Girod y Armstrong obtuvieron eficiencias extremadamente altas para los picos que obtuvieron por EC en la separación de dos bacterias y de una levadura que generalmente se adicionan como suplementos en alimentos [3]. En otro estudio, Armstrong y Schneiderheinze [5] pudieron distinguir los patógenos responsables de la mayor parte de las infecciones de tracto urinario, inyectando en el instrumento orina sin tratar. Palenzuela y colaboradores. [9] desarrollaron un método para la separación de bacterias que contaminan alimentos. Para lograr una mejor resolución, usaron iones calcio y mioinositol y de esta manera pudieron analizar 8 diferentes tipos de bacterias en tan solo 25 min.

En general, son pocos los estudios electroforeticos que se refieren a la determinación de células microbianas, bacterias y virus, y casi nulos los que se refieren a células fúngicas. Aunque, por otro lado, para estas ultimas, existen varios estudios en los que se utiliza EC con otras técnicas moleculares, pero para analizar los productos de PCR o determinar componentes celulares o metabolitos [46, 47, 48], principalmente de hongos patogénicos.

Si bien son de suma importancia los estudios sobre hongos de carácter patogénico, también tomemos en cuenta que ciertas clases representan importantes alternativas en la terapéutica, una clase de creciente interés biomédico son los basidiomicetos, ya que son fuentes importantes de compuestos con propiedades antibióticas, anticancerígenas, inmunomoduladoras, reguladoras de la presión arterial, etc. [8]. Estos compuestos no solo implican metabolitos excretados al medio ya que muchos de estos forman parte de sus paredes

celulares [49], por ello es importante toda información que pueda conducir al conocimiento de sus propiedades externas que permiten suponer su comportamiento e interacción biológica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 HONGOS

Los hongos son microorganismos eucarióticos no fotosintéticos que poseen paredes celulares rígidas, incluyen desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macroscópicos [16]. Son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza; constituyen uno de los cinco reinos de los seres vivos, el reino Fungi (Eumicotas), cuyo origen es polifilético (Whitaker, 1969), del período Precambriano (1 billón de años atrás) (Cook, 1979) (19). Tal reino está clasificado actualmente en Zigomicetes (clase *Zygomycetes*), Ascomicetes (clase *Ascomycetes*), Hongos imperfectos (clase *Deuteromycetes*), Basidiomicetes (clase *Basidiomycetes*) y Quitridiomycetes (clase *Chtridiomycetes*).

Tienen una gran diversidad de formas y tamaños y pueden vivir en los sustratos y condiciones ambientales muy variadas; aprovechan elementos nutritivos muy simples. Son organismos heterótrofos y se alimentan por absorción. Carecen de clorofila, y por eso no son fotosintéticos y por lo tanto requieren una fuente externa de carbono, por lo que son clasificados como **saprofitos** (toman sus nutrientes de materia orgánica muerta o en descomposición), **parásitos** (se nutren de materia viva como plantas, animales y humanos [17]) y **simbióticos** (unidos a otro vegetal al que micorrizan ampliando la red capilar, lo que le aporta agua y nutrientes). Su fuente primordial de nutrientes es a base de $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{O}$, sales de nitrógeno y de carbohidratos (glucosa, sacarosa y maltosa). Pueden sintetizar proteínas que le son necesarias para su crecimiento y reproducción. Almacenan ácidos grasos, acilgliceroles y glucógeno en vacuolas. Pueden subsistir en rangos de pH muy amplios, la mayoría viven en medios ligeramente ácidos, entre 6.0 y 6.5. La temperatura más adecuada para su desarrollo es de 25-28° C, sin embargo, algunos se encuentran viables a temperaturas de congelación y otros resisten hasta 55° C. La mayor parte de los hongos son **aerobios**, aunque algunos se desarrollan en tensiones altas de CO_2 . La humedad relativa, también es importante para su desarrollo y fructificación; la humedad relativa de 60-80 % favorece el desarrollo de la mayoría de los hongos filamentosos.

Existen dos tipos de células fúngicas, las *somáticas*, que contienen núcleos muy pequeños y su proceso de división es a base de mitosis ordinaria, el segundo tipo de células son las *reproductoras* con núcleos más grandes y división celular a base de meiosis; la célula puede ser uni o multinucleada [19]. En el citoplasma se encuentran varios organelos como mitocondrias, ribosomas, lisosomas, retículo endoplásmico, microfibrillas, núcleo, aparato de Golgi, etc. (Figura 1) [18].

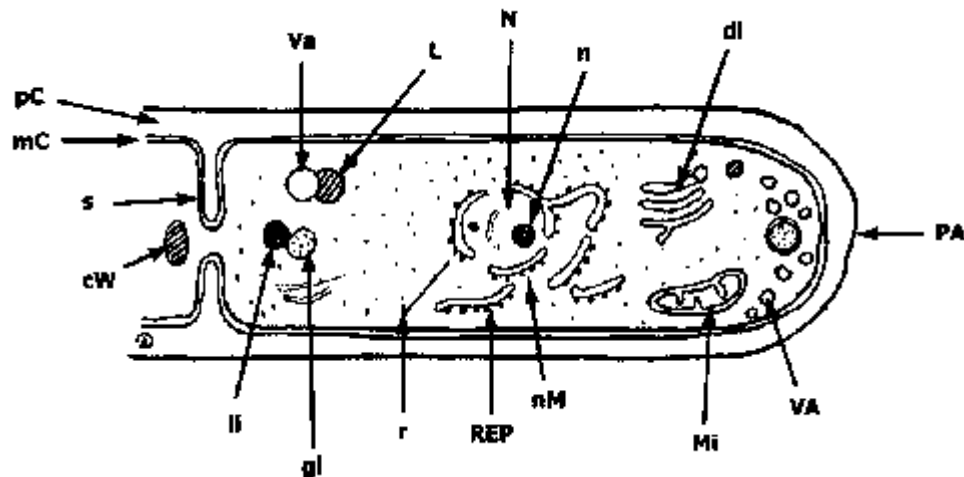


Figura 1. Ultraestructura de la célula fúngica.

PA: polo apical; **VA:** vesícula apical; **N:** núcleo; **n:** nucleolo **di:** dictiosomas; **Mi:** mitocondria; **REP:** retículo endoplásmico; **r:** ribosomas; **li:** liposoma; **gl:** pared celular; **mN:** membrana nuclear; **Va:** vacuola; **L:** lisosoma; **pC:** pared celular; **mC:** membrana citoplásmica; **s:** septum; **cW:** cuerpo de Woronin.

Su pared celular y membrana están formadas por varias capas. La pared celular está compuesta de un 80-90% de polisacáridos, siendo el más importante la Quitina (N-acetil-D-glucosamida) (Figura 2), unida por puentes glucosídicos β 1-4.

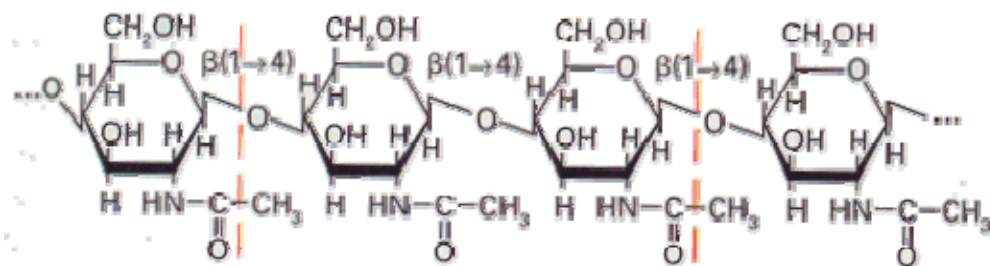


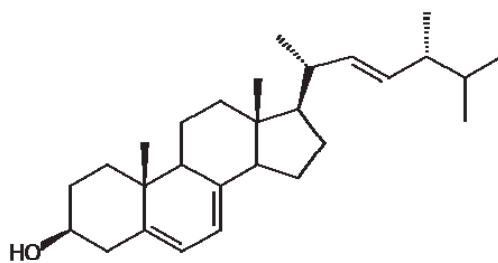
Figura 2. Quitina (N-acetil-D-glucosamida)

Es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula. La quitina se vuelve soluble en ácidos

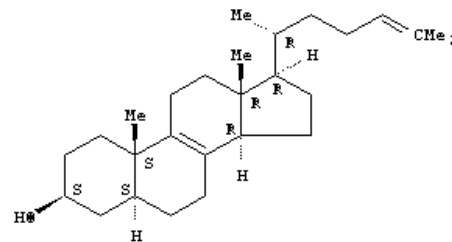
minerales diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosana.

Pueden estar presentes otros polímeros polisacáridos como mananos (polímeros α -1,6 ramificados de manosa), celulosa (polímero β -1,4 de glucosa), galactanos (polímeros de galactosamida) y quitosán en algunos tipos de hongos, además de proteínas, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos actuando estos como material sementante. Estos compuestos dan rigidez a la pared celular y son de importancia en la taxonomía y propiedades antigénicas [17].

La membrana celular basal está bien organizada y tiene gran cantidad de esteroides que son Ergosterol y Zymosterol. El ergosterol es un lípido en el cual actúan la mayor parte de los fármacos antimicóticos, es el esteroide que predomina en las células fúngicas. Da fluidez e integridad a la membrana, permite la función apropiada de muchas enzimas unidas a ellas, favorece la función de la quitina sintetasa, permite el crecimiento y división celular [19].



Ergosterol



Zymosterol

La unidad microscópica fundamental de un hongo es la estructura filiforme denominada **hifa** (Figura 3). Generalmente miden de 3 a 8 μm de diámetro y su longitud es variable. Las hifas que están subdivididas en células individuales por paredes transversales o tabiques se denominan tabicadas (septadas) y las que no tienen paredes son no tabicadas (cenocíticas o aseptadas), estas pueden ser en espiral, nodosas, pectinadas, en candelabro fávico, en raquetas, hifas unicelulares (levaduriformes), pseudohifas y vesiculosas [18].



Figura 3. Tipos de hifas: a) septadas; b) cenocíticas; c) en espiral; d) nodosas; e) pectinadas; f) en candelabro fávico; g) en raqueta; h) hifas unicelulares; i) pseudohifas; j) vesiculosas.
 Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Varias hifas se combinan para formar la masa de desarrollo conocida como **micelio**. Por su función el micelio se clasifica en: **micelio vegetativo** (también llamado de nutrición, se encarga de la absorción y transformación de nutrientes), y **micelio reproductivo o aéreo** (la porción que se proyecta por encima del sustrato, se encarga de soportar las estructuras y formas de reproducción). Por su forma se clasifica en: **filamentoso** (propio de los hongos mohos o filamentos), y **unicelular** (propio de las levaduras). Por el diámetro de las hifas se divide en: **macrosifonado** (diámetro mayor a 1 μ , lo presentan la mayor parte de los hongos filamentosos), y **microsifonado** (diámetro menor a 1 μ , característico de actinomicetos). De acuerdo a la ausencia o presencia de pigmento: **micelio hialino** el cual carece de pigmento, y **micelio pigmentado**, posee pigmento, sobre todo melánico y lo presentan hongos dematiáceos o fuliginosos. De acuerdo a la presencia o ausencia de divisiones o tabiques de las hifas: **septado** o **cenocítico**.

Al conjunto de micelio organizado y compacto se le conoce como **plectenquima** y se divide en dos grupos: **prosénquima** que es un tejido de hifas paralelas y laxas, del cual existen dos tipos, **estroma**, formado por un tejido similar al de un colchón que tiene fructificaciones y **esclerocio** o **esclerote**, que se forma cuando hay condiciones adversas, es una estructura de resistencia compuesta por un cuerpo duro que puede pasar largos periodos de tiempo en latencia y germinar hasta que las condiciones sean favorables. El segundo tipo de tejido es el **pseudoprosenquima**, constituido por células compactas, apretadas y bien organizadas [19].

2.1.1 Reproducción de los hongos

2.1.1.a Fase sexual y asexual

A excepción de los Deuteromicetes, los cuales no tienen fase sexual conocida, la mayoría de los hongos poseen una fase asexual y una fase sexual en su ciclo de vida. La fase asexual involucra crecimiento vegetativo y en muchos casos la producción de esporas asexuales (conidias). La fase sexual involucra los procesos de plasmogamia, cariogamia y meiosis, y la formación de esporas sexuales con recombinación de material genético. Existen especies de hongos en las que el micelio es autocompatible, y por tanto pueden llevar a cabo la reproducción sexual con un solo tipo de micelio. Estas especies se denominan **homotáticas**. Por el contrario, las especies **heterotáticas** requieren de la unión de núcleos provenientes de hifas diferentes compatibles [20].

Los tipos de esporas sexuales (Figura 4) son: a) zigosporas, b) oosporas, c) ascosporas y d) basidiosporas.

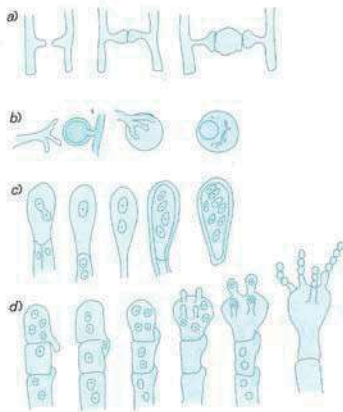


Figura 4. Tipos de esporas sexuales. a) zigosporas; b) oosporas; c) ascosporas; d) basidiosporas.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Zigosporas: Se forman por la unión de dos hifas sexualmente diferenciadas, donadoras (+) y receptoras (-), aunque morfológicamente iguales (homotáticas), una vez que se lleva a cabo la unión se inicia el fenómeno de plasmogamia, de donde se forma un huevo o zigospora, del que posterior a la meiosis nace el nuevo hongo. Reproducción propia de mucorales (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*).

Oosporas: Si las células reproductivas fusionantes provienen de dos células diferentes, que suelen ser de segmentos de hifas separados.

Ascosporas: Esporas que resultan de la meiosis y se forman a partir de una bolsa o asca que produce un número determinado y característico de esporas (*Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*). Dependiendo de la forma de las ascas o estructuras estromáticas, se dividen en cuatro tipos: ascostromas o ascas desnudas, apotecios, cleistotecios y peritecios.

Basidiosporas: Propias de las setas u hongos macroscópicos, son estructuras unicelulares y haploides, se forman de una bolsa o basidio, contenido en un cuerpo fructífero llamado basidiocarpio, del basidio nacen estigmas que producen las basidiosporas.

La forma sexuada de un hongo se conoce como **teleoforma**, en contraposición al término **anamorfa**, que se refiere a las diferentes formas o estructuras reproductivas asexuadas producidas por los hongos imperfectos (fiálides, anillos, cadenas ramificadas y similares) [17].

La reproducción asexual o imperfecta, se presenta un sinnúmero de veces, en un mismo hongo, contrario a la reproducción sexuada, que es una sola vez. Sin embargo las estructuras de reproducción asexual si bien son numerosas, tienen una menor capacidad de adaptación si se comparan con las estructuras sexuales. En la reproducción asexual se reconoce la **reproducción vegetativa** y **reproducción aérea**.

En la reproducción vegetativa existen tres tipos de esporas o conidias que pueden originarse directamente a partir del micelio vegetativo:

Blastoconidias: son formas brotantes características producidas por levaduras. Con frecuencia en el lugar del que se desprende la conidia queda una cicatriz de brotación. Se forman por gemación, pueden ser únicas como en el caso de *C. albicans* o múltiples como *P. brasiliensis*.

Clamidoconidias: se forman a partir de células preexistentes de las hifas, que se engrosan y suelen agrandarse. Pueden encontrarse dentro de las hifas (intercalantes), o a lo largo de sus lados (sésiles) o en su extremo (terminales).

Son propias de los hongos mohos. No se consideran formas de reproducción sino de resistencia, por que generalmente nacen en condiciones adversas y

Artroconidias: las cuales se forman de la fragmentación de las hifas. Al alcanzar la madurez, estas conidias se liberan por lisis de las células adyacente de la hifa. Este tipo de esporulación es característica de la forma filamentosa del *Coccidioides immitis* y especies de *Geotrichum* [19].

En la reproducción aérea existen cuerpos de fructificación especializados que se originan de las hifas y se extienden hacia la superficie del micelio, dando origen a una variedad de esporas o conidias. Los cuerpos de fructificación pueden formar sacos cerrados denominados **esporangios**, que son estructuras membranosas en forma de bolsa o saco, en cuyo contenido se albergan y producen esporas denominadas **esporangiosporas**, cuando éstas alcanzan su madurez la membrana se debilita y rompe, por lo que son liberadas (*Mucor*, *Rhizopus*). El segmento especializado de la hifa que sostiene o mantiene al esporangio se denomina **esporangióforo**. Este tipo de esporulación es característico de Zygomycetes. Muchos otros hongos producen cuerpos de fructificación elaborados que dan origen a esporas producidas en la superficie, a los cuales se les aplica el término **conidia** (polvo) [17]; estas estructuras especializadas son esteríngmas, vesículas y conidióforos. Los esteríngmas son una pequeña ramificación o estructura hifal que puede estar unida al conidióforo; de estas nacen las esporas (*Penicillium*, *Aspergillus*); Los conidióforos son una prolongación del talo que soporta a las conidias. Las vesículas, son una prolongación del conidióforo de forma bulbosa o burbuja.

El conidióforo puede dividirse en segmentos secundarios, productores de esporas, denominados **fiálides**. Una fiálide es una célula conidiógena que produce conidias a partir de un punto localizado En el extremo, que no aumenta de espesor o longitud durante la conidiogénesis. Esta propiedad de ramificarse en fiálides es característica de los cuerpos de fructificación digitiformes de las especies de *Penicillium*, esta estructura nace del micelio en forma de botella y que internamente produce las esporas asexuales, espulsándolas cuando estas alcanzan su madurez [19].

Las conidias (Figura 5) pueden organizarse en forma aislada, en largas cadenas o en cúmulos densamente unidos. Las conidias pequeñas unicelulares, que en general se originan directamente de los lados de las hifas o están unidas por un conidióforo capilar, se denominan **microconidias**, se presentan de diferentes formas y se encuentran en muchos hongos mohos o filamentosos. Las **macroconidias** son multicelulares, mucho más grandes que las microconidias y adoptan gran variedad de formas y tamaños (*H. capsulaum*, *Fusarium*, *Microsporum* y *Epidermophyton*) (19). Una macroconidia multicelular que está dividida por tabiques transversales y longitudinales que le otorgan un aspecto en mosaico, es un **dictiosporo** (o muriforme, por que recuerda a una pared de piedra). El término **aleurósporo** se refiere a una conidia, generalmente una macroconidia, que por definición está unida a las hifas por medio de una célula de sostén que se fragmenta cuando es liberada (*Microsporum canis*, *Trichophyton*) [17].

Cuando las conidias forman cadenas, el proceso por el que se produce por el vértice de una conidia, de tal manera que la célula más antigua se encuentra en la base, se denomina **acrópeto**; la esporulación **basípeta** se refiere al proceso por el cual las nuevas conidias se forman en la base de la cadena, empujando a todas las de la cadena hacia delante, de forma que la más antigua se forma en el extremo.

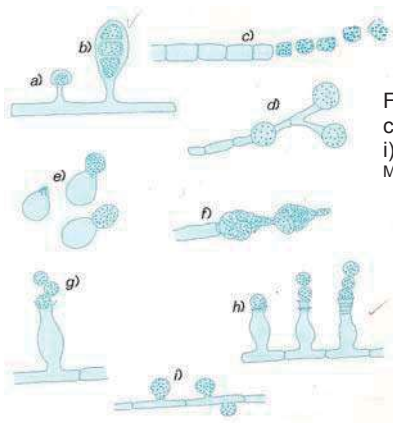


Figura 5. Tipos de conidias: a) microconidias; b) macroconidias; c) artroconidias; d) clamidoconidias; e) blastoconidias; f) dictioconidias g) fialoconidias; h) aneloconidias; i) aleurioconidias.

Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Hay dos tipos de conidias **blásticas y tálicas** (Figura 6), en las blásticas hay un proceso de neoformación por síntesis y lisis de material y a partir de una porción

de la célula conidiogénica hay un agrandamiento del **primordio**. Posteriormente se forma el **septo** que va a delimitar el nuevo conidio. En la formación de las conidias tállicas, participa la célula conidiógena completa, dándose un proceso de transformación de material.

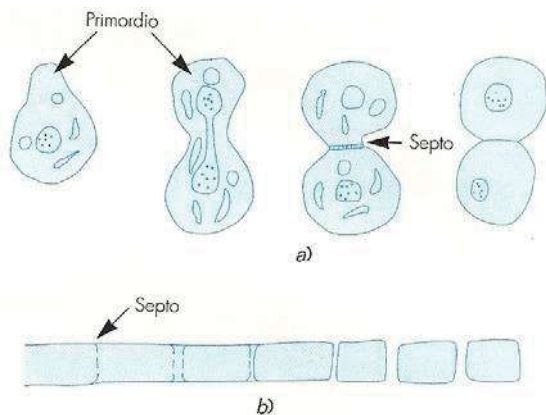


Figura 6. Tipos de conidio según su origen. a) conidio blástico; el septo se forma después de iniciado el proceso de conidiogénesis; b) conidio tállico; el septo se forma antes del proceso de conidiogénesis.

Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

El septo se forma antes del proceso de formación y la separación del nuevo conidio se da por **rexólisis** (con referencia a la secesión conidial, ruptura circunstancial de la pared celular por debajo del septo basal de la conidia; la ruptura puede resultar por tensión mecánica, actividad lítica o enzimática), o **esquizólisis** (proceso enzimático de separación conidial, conidio-célula conidiógena o conidio-conidia a través de la fisión de un septo doble).

Las conidias blásticas (Figura 7) pueden ser **holoblásticas** (si en el proceso de formación del conidio participan todas las capas de la pared de la célula conidiógena), o **enteroblásticas** (si solo participa la capa interna de la pared).

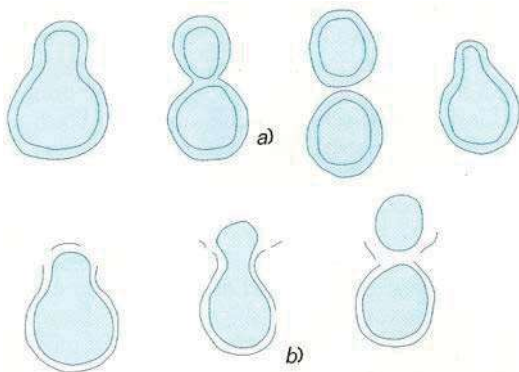


Figura 7. Tipos de conidios blásticos. a) conidio holoblástico; en el proceso de formación del nuevo conidio, participan las dos capas de la pared de la célula conidiógena; b) conidio enteroblástico; en el proceso de formación del nuevo conidio participa solamente la capa interna de la pared de la célula conidiógena.

Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

A la vez, las conidias tálicas (Figura 8) pueden ser **halotáticas**, **haloártricas** y **enteroártricas**.

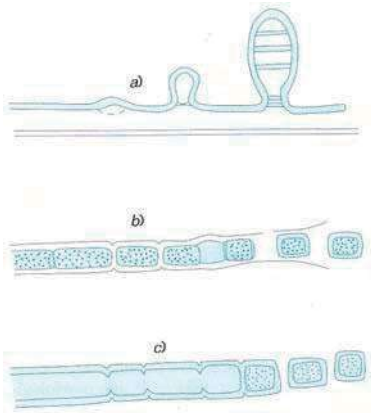


Figura 8. Tipos de conidios tálicos. a) conidio holotático; participan las dos capas de la célula conidiógena; b) conidio enteroártrico; solamente participa la capa interna de la pared de la célula conidiógena; los fragmentos se separan, generalmente por rexólisis; c) conidio holoártrico; donde participan las dos capas de la pared de la célula conidiógena y se separan por esquizólisis.

Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Tomando en cuenta la posición de la conidia (Figura 9), respecto a la célula conidiógena, puede ser del tipo **Terminal** (cuando el conidio se origina en el extremo distal de una hifa); **basípeta** (cuando el conidio más joven se localiza en la base de una cadena de conidios); **acrópeta** (cuando el conidio más joven se localiza en el extremo distal de una cadena de conidios); y **sincronógena** (varios conidios se desarrollan al mismo tiempo a partir de la célula conidiógena).

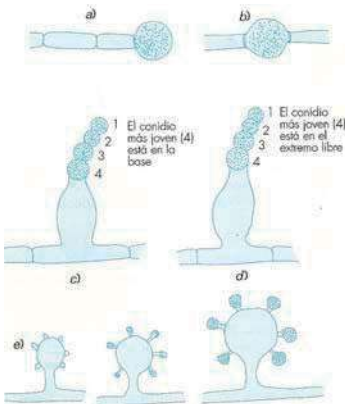


Figura 9. Clasificación de los conidios en relación con la célula conidiógena: a) terminal; b) intercalar; c) basípeta; d) acrópeta; e) sincronógena.

Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Según el orden de distribución del conidio en relación con otros conidios (Figura 10) puede ser: **solitario** (se origina de manera aislada), **en cadena** (los conidios están colocados y unidos uno después del otro) y **botrioso** (se originan varios conidios al mismo tiempo a partir de la misma célula conidiógena en diferentes puntos).

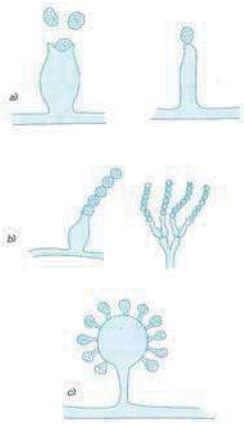


Figura 10. Clasificación de los conidios de acuerdo con su posición con respecto a otros conidios. a) solitario; b) catenuado; c) botrioso.
Micolgía Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Según las modificaciones de tamaño que sufre la célula conidiógena (Figura 11) en el proceso de la conidiogénesis, esta puede ser **determinada** (el tamaño de la célula conidiógena no se modifica), **proliferativa** (cuando después de haber producido un conidio, la célula conidiógena sufre un alargamiento antes de originar un nuevo conidio, este proceso puede ser de tipo simpudial, percurrente o basáuxico) y **progresiva** (cuando la célula conidiógena sufre una disminución de tamaño después de la producción de cada conidio).

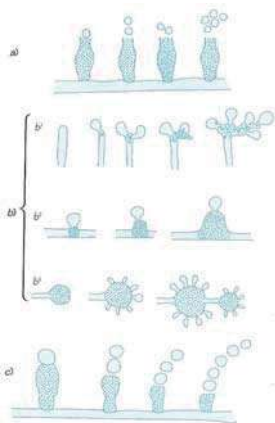


Figura 11. Clasificación de las células conidiógenas de acuerdo con la modificación de tamaño o de forma que sufren durante la conidiogénesis. a) determinada; b) proliferativa; b.1) simpudial; b.2) basáuxica; b.3) percurrente; c) retrogresiva.
Micolgía Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Las células conidiógenas (Figura 12) pueden tener ciertas características especiales de tipo morfológico y pueden ser **porógenas** (cuando el punto de origen del nuevo conidio es muy estrecho en comparación con el diámetro del conidio), **fialídicas** (cuando la célula conidiógena presenta una forma de florero o botella y en su extremo distal se puede observar una estructura llamada

callarete), **anelídicas** (cuando la célula conidiogénica tiene forma tubular y en su extremo distal se observa la formación de una cicatriz en forma de anillo) y **simpodiales** (cuando son el resultado del crecimiento continuo de la célula conidiogénica después de producir cada conidio; este proceso da resultado a una célula de forma y tamaño irregular).

La mayoría de los conidios se forman de manera aislada directamente de la hifa, o bien a partir de un conidióforo, el cual es generalmente una estructura alargada que se forma por la transformación de la hifa y en cuyo extremo se producen los conidios. Los conidios pueden estar contenidos en una estructura llamada **cuerpos fructíferos**, como son los **picnidios**, **acérvulos**, **esporodoquios** y **synemas** [18].

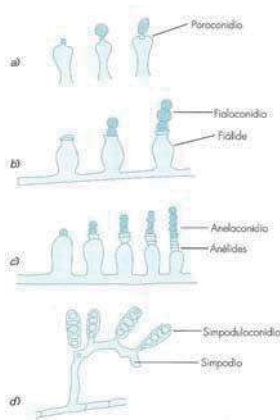


Figura 12. Tipos especiales de células conidiogénicas. a) porógenas; b) fialídicas; c) anelídicas; d) simpodiales.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

2.1.2 Clasificación de los hongos

2.1.2.a Phylum Chytridiomycota

Dentro del reino Fungi, los Chytridiomycetes (Figura 13) son los únicos que producen células móviles en su ciclo de vida, aunque con un solo flagelo posterior en forma de látigo.

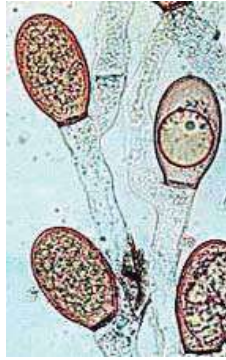


Figura 13. Phylum Crytridiomycota.
Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungiclas.htm>

2.1.2.b Phylum Zygomycota

Entre los Zygomycetes quizá los más conocidos sean algunos representantes del orden Mucorales como *Mucor* o *Rhizopus*.

Están caracterizados por un micelio aseptado, cenocítico, con septos en la base de las estructuras reproductoras o septos secundarios. El nombre del grupo proviene de la presencia en parte de su ciclo de una zigospora característica. Pero en todo el grupo también es muy importante la reproducción asexual.

2.1.2.c Phylum Ascomycota

Los Ascomycetes están caracterizados por la presencia en su ciclo de vida (Figura 14), de una célula fértil, llamada célula ascógena, denominada asco, que producirá endógenamente 8 ascosporas (típicamente).

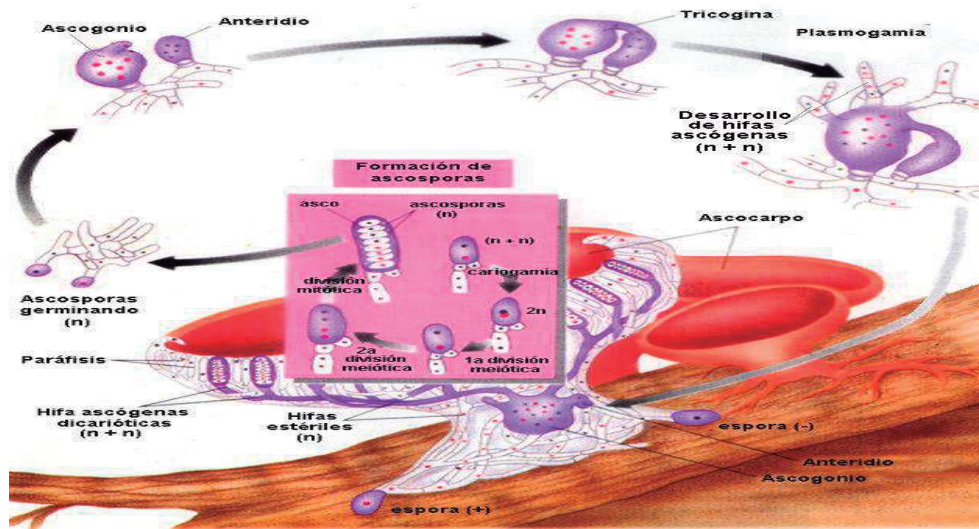


Figura 14. Ciclo reproductivo de Ascomicetes.
Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungiclas.htm>

Los representantes de este grupo prácticamente se encuentran poblando todo tipo de hábitat, y pueden presentar cualquier tipo de forma de nutrición.

2.1.2.d Phylum Basidiomycota

Incluye a los hongos de mayor complejidad morfológica, entre los que figuran las conocidas setas, yesqueros, cuescos de lobo, hongos gelatinosos, royas, carbones, etc. Su papel en la naturaleza es esencial, ya que degradan la materia orgánica muerta o en descomposición; por ejemplo, entre los yesqueros se encuentran especies capaces de degradar la lignina. Otros, como royas y carbones, son peligrosos fitoparásitos. Por otro lado, el micelio de muchas setas forma ectomicorrizas con árboles; su papel para la supervivencia de los bosques es esencial. Finalmente, muchos de estos hongos son cultivados para obtener setas comestibles (*Lactarius índigo*, *Pleurotus ostreatus*), o bien son recolectados en el campo.

La característica común a los basidiomicetos es la presencia de **basidios**, células especializadas que tras la cariogamia y la meiosis producen 4 (a veces más o menos) **basidiósporas** en su parte exterior.

El ciclo vital (Figura 17) de un basidiomiceto típico es simple. Aunque hay especies levaduriformes, lo más corriente es que las basidiósporas (haploides) germinen y den lugar a un micelio primario, monocariótico. Esta fase suele ser corta, ya que pronto ocurre la somatogamia o fusión de hifas y se obtiene un micelio secundario, dicariótico, que crece mediante fibulas (Figura 15).

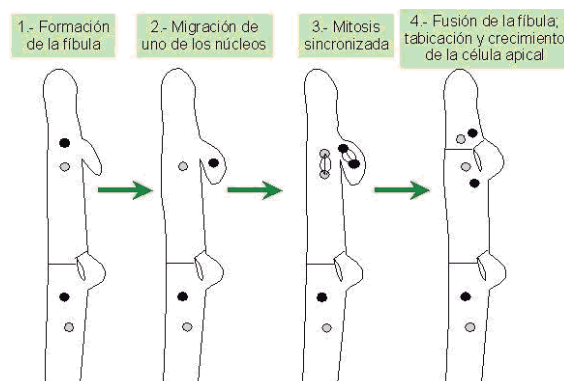


Figura 15. Crecimiento del micelio dicariótico por fibulación en basidiomicetos.

Fuente: <http://www.aloj.us.es/optico/carronzar/botanical/fibulacion.JPG>

Este micelio es el más abundante en la naturaleza. Los septos son complejos, ya que presentan un poro central (dolíporo) rodeado de una serie de membranas (parentosoma). En ocasiones, el micelio puede formar cordones o rizomorfos.

Aunque no es tan corriente como la somatogamia, el micelio secundario puede originarse por un proceso de espermatización. Algunos hongos producen oídios, en unas hifas especiales, los oidióforos. Estos oídios están rodeados de una gotita de mucus, para su dispersión por el agua o los insectos. Tarde o temprano, contactarán con una hifa compatible y ocurrirá la dicarionización.

En cuanto a la compatibilidad sexual, las especies homotálicas son raras, y las heterotálicas abundan. De estas últimas, casi el 25% regulan el tipo de sexo mediante alelos en un único locus (heterotalismo unifactorial o bipolar).

En cambio, la mayoría de basidiomicetos regulan el tipo sexual mediante más de un par de genes, localizados en diferentes cromosomas (heterotalismo bifactorial o tetrapolar, aunque, a pesar de lo que indica el nombre, puede implicar a más de dos pares de genes).

El micelio secundario puede reproducirse asexualmente por medio de conidios (raro), por gemación (en levaduras y carbonos), por esporas especiales (en royas), e incluso mediante esclerocios. Como en otros hongos, la fragmentación del micelio es un método de dispersión frecuente.

Sin embargo, lo más típico es la reproducción sexual (aunque existen especies que no la presentan). El micelio secundario puede agruparse en "tejidos" especializados plectenquimáticos, aún dicarióticos, y el micelio se denomina entonces terciario. Da lugar a cuerpos fructíferos (Figura 16), los basidiocarpos o basidiomas, algunos de los cuales son bastante grandes, hermosos y comestibles: las conocidas setas.

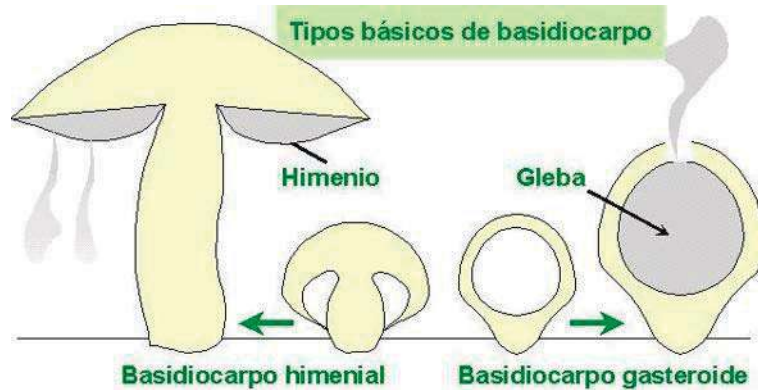


Figura 16. Tipos de basidiocarpo.

Fuente: <http://www.fepade.edu.sv/cra/institutos/infravenz/docs/ciencias/reinofunji.pdf>

En el campo es frecuente encontrar grupos de setas dispuestas en anillo, los gorros de brujas, debido al crecimiento en todas direcciones del micelio y la aparición de basidiocarpos en la periferia. En cambio, otros basidiocarpos son muy diferentes a las setas: leñosos, gelatinosos, inconspicuos...

Los basidios se disponen sobre o dentro del basidiocarpo, a menudo en una capa fértil, el himenio. Entre los basidios pueden existir estructuras estériles, como los basidiolos (recuerdan a los basidios, pero no producen esporas) o los cistidios, de mayor tamaño y muy útiles como carácter taxonómico. Cada basidio dará lugar a 4 (pero pueden ser 2, 8 ó más) basidiosporas externas [21].

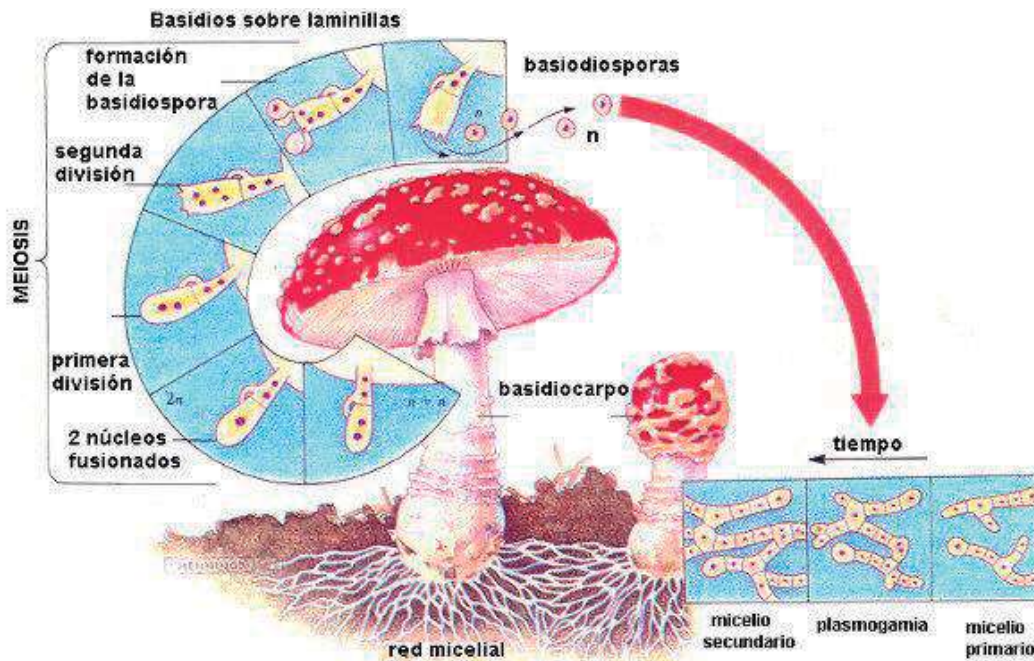


Figura 17. Ciclo reproductivo de Basidiomicetos.

Fuente: <http://www.fepade.edu.sv/cra/institutos/infravenz/docs/ciencias/reinofunji.pdf>

Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológica hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas; tales componentes son polisacáridos, glicoproteínas y ácidos nucleicos de los que se derivan sesquiterpenos, diterpenos, acetilenos, glicolípidos, policetonas, nucleósidos y sales de diazonio. Los basidiomicetos Constituyen una clase de hongos, representada por más de 30000 especies, cuyo metabolismo y capacidad de producción ha sido apenas investigada [22].

Dos de los hongos basidiomicetos que resultan de mayor interés nutricional y médico son *Lactarius sp.* y *Pleurotus sp.*

Pleurotus sp., resulta particularmente interesante desde el punto de vista nutricional en función de su contenido de proteína (27-48 %), lípidos (2-8 %), ácidos nucleicos y por la presencia, además, de vitaminas, minerales, fibra dietética, β -glucanos, compuestos con actividad antioxidante, ácido oléico en su cuerpo fructífero, además de ácidos orgánicos como ácido fórmico, málico, acético y cítrico [22 - 24].. *Pleurotus sp.* posee propiedades antibióticas por la producción de terpenos.

Lactarius sp. contiene, al igual que *Pleurotus*, proteínas (27-42%), lípidos (6.72%), carbohidratos (27.6%); los cuerpos fructíferos de algunas especies de *Lactarius* son consideradas no comestibles debido a su sabor acre y picante; este sabor está determinado por la presencia en ellos de aldehídos sesquiterpénicos con marasmanos y lactaranos en su esqueleto, que se forman enzimáticamente a partir de ácidos grasos. Estos aldehídos insaturados poseen alta actividad antimicrobiana y mutagénica.

Tabla 1. Algunos basidiomicetos y su actividad farmacológica.

Naturaleza química	Microorganismos	Actividad biológica
Sesquiterpenos y compuestos relacionados	<i>Merullus, Marasmius, Naematoloma, Pleurotellus, Lentinelus, Planaelus</i>	Antimicrobiana, antifúngica, antiviral, citotóxica, mutagénica
Diterpenoides	<i>Cyathus, Crinipellis</i>	Citotóxica, antifúngica, antibacteriana
Acetilenos	<i>Marasmius, Clitocybe, Coprinus, Pleurotus</i>	Antibacterial, antifúngica, citotóxica
Glicolípidos	<i>Ustilago, Sxhzonella</i>	Antimicrobiana, citotóxica
Policetonas	<i>Merullius, Phlebia</i>	Antimicrobiana, hemolítica
Nucleósidos	<i>Clitocybe, Lentinus</i>	Antibacteriana, antiviral
Sales de diazonio	<i>Agaricus xanthodermus</i>	Antibacteriana, citotóxica

Los Basidiomicetos, por lo tanto, representan una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad farmacológica.

2.2 ELECTROFORESIS CAPILAR

Técnica de separación que se basa en la diferente movilidad o velocidad de migración de partículas cargadas debido a la acción de un campo eléctrico [1-15]. El desplazamiento de una sustancia bajo la acción de un campo eléctrico fue citado por *Reuss* (Memorias de la Sociedad Imperial Natural. Moscow, 1809), sin embargo, su importancia vino a incrementarse hasta 1937, cuando el químico sueco *Arne Wilhelm Kaurin Tiselius* (1902-1971) impulsó la electroforesis en disolución libre, nombre que asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte [10]. Para 1967, *Hjerten* inicia el empleo de capilares milimétricos (3.0 mm), y en el mismo año *Martin & Everaerts* utilizan tubos abiertos de vidrio y rellenos con hidroximetilcelulosa para la separación de cloruro, aspartato y glutamato por isotacoforesis. En 1969, *Virtanen* pudo reducir el diámetro capilar a 200 y 500 μm . Más adelante, en 1981, *Jorgeson & Lukacs* obtuvieron capilares de sílice fundida de 75 μm y utilizaron voltajes elevados para la separación de proteínas, además se clarifica las relaciones entre los parámetros operacionales y las cualidades de la separación revelando el elevado potencial analítico de esta técnica. Con estos avances, se presenta el lanzamiento de la Electroforesis Capilar [27-28].

La EC es una técnica poderosa que permite la separación rápida y eficiente de compuestos con carga iónica, ideal para manipular cantidades pequeñas de muestra, emplea tubos capilares donde se lleva a cabo una separación de alta eficiencia ya sea de moléculas grandes o pequeñas [10,13]. La separación de las diferentes especies iónicas se realiza en función de sus distintas movilidades electroforéticas dentro del capilar cuando se aplica una diferencia de potencial entre los extremos del mismo. La detección se realiza mediante la lectura de la absorbancia en la región del ultravioleta-visible, empleando lámparas de emisión discreta. La EC es fácilmente automatizada, precisa para el análisis cualitativo y cuantitativo, consume limitadas cantidades de reactivos, por lo que resulta ser una técnica económica, es aplicable a una amplia gama de analitos comparado con otras técnicas de separación analítica, además posee facilidad de empleo [28-32].

2.2.1 COMPONENTES BÁSICOS DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La configuración instrumental básica de la EC es relativamente simple (Figura 18). Es requerido un capilar de sílice fundida con una ventana visible y un diámetro interno menor de 200 μm , una fuente de alto voltaje que proporciona de 0 a 60 kV, dos electrodos de platino conectados a la fuente de voltaje, dos reservas de buffer donde puedan introducirse los extremos del capilar, un detector donde es alineada la ventana del capilar y un sistema de administración de datos.

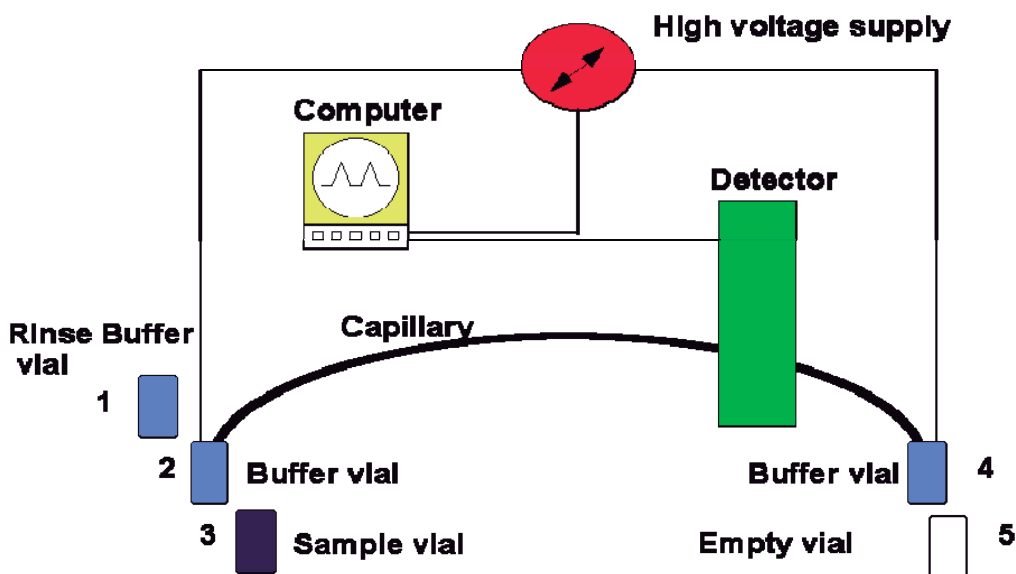


Figura 18. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar

El capilar es llenado con un electrolito con capacidad amortiguadora al pH deseado, la muestra que está constituida por un conjunto de aniones y cationes, se diluye en el buffer para ser introducida en el capilar y se aplica el voltaje, entonces las especies iónicas de la muestra migran a través del capilar de acuerdo a su movilidad electroforética, estableciendo un movimiento de iones. Eventualmente las moléculas pasan por el detector (UV, LIF) y se registra la señal del detector [10,11].

2.2.2 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EPM)

El movimiento de las moléculas está gobernado por dos fuerzas, inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone. Por otro lado, las moléculas se moverán de forma aleatoria (o con movimiento browniano) debido a que poseen energía cinética propia, denominada difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura, mayor difusión [29,31].

Cuando un ión de carga q (coulombios) se coloca en un campo eléctrico E (V/m), la fuerza sobre el ión es qE (N). En disolución, la fuerza de disolución de retardo es $f u_{ep}$ donde u_{ep} es la velocidad del ión y f es coeficiente de fricción. El subíndice ep significa electroforesis. El ión alcanza casi instantáneamente una velocidad constante cuando la fuerza de aceleración iguala a la de fricción:

$$\text{Movilidad electroforética} \quad \mu_{ep} = \frac{q}{f} E \equiv \mu_{ep} E \quad (1)$$

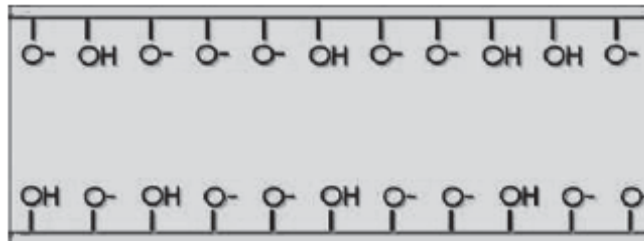
La movilidad electroforética es la constante de proporcionalidad entre la velocidad del ión y la fuerza del campo eléctrico. La movilidad es proporcional a la carga del ión e inversamente proporcional al coeficiente de fricción. En moléculas de tamaño parecido, el valor de la movilidad aumenta con la carga. Para partículas esféricas el radio r que se mueve a través de un fluido de viscosidad η , el coeficiente de fricción, f , vale

$$\text{Ecuación de Stokes} \quad f = 6\pi\eta r \quad (2)$$

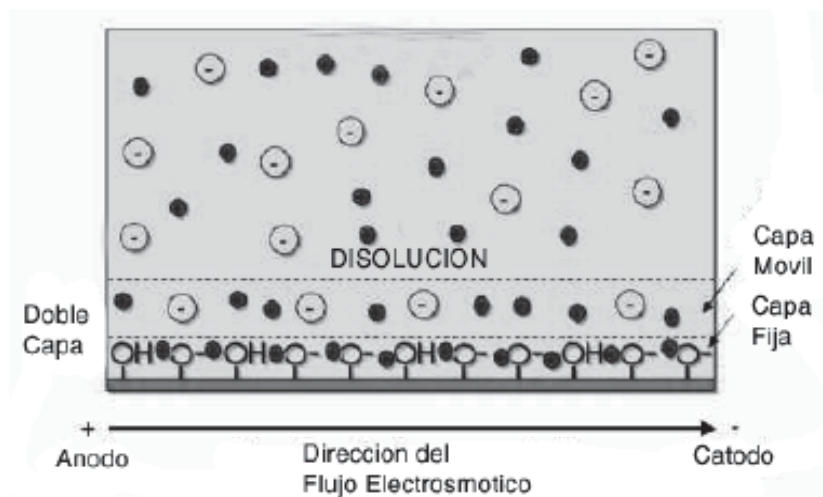
Como la movilidad vale q/f , cuanto mayor es el radio, menor es la movilidad. La mayoría de las moléculas no son esféricas, pero la ecuación de Stokes se puede utilizar para definir un radio hidrodinámico efectivo de una molécula basado en su movilidad [14].

2.2.3 ELECTROÓSMOSIS (EOF)

Este fenómeno es una consecuencia de la carga de la superficie sobre la pared del capilar. La pared interior de un capilar de sílice fundida está recubierta de grupos silanol (Si-OH) ionizables (Figura 19 a) en contacto con el buffer contenido dentro del capilar, tienen una carga negativa (SiO⁻) por encima de un pH 2.



a)



b)

Figura 19. a) Grupos silanol presentes en las paredes del capilar; b) doble capa eléctrica formada en la pared del capilar.

Una doble capa eléctrica (Figura 19 b) se forma en la pared del capilar. Una capa inmóvil fuertemente adsorbida de cationes adyacente a la superficie negativa neutraliza parcialmente la carga negativa. El resto de carga negativa se neutraliza por un exceso de cationes solvatados por la fase móvil (buffer) en la doble capa de la disolución próxima a la pared. El grosor de la capa móvil va de 10 nm cuando la fuerza iónica es 1 mM a 0.3 nm cuando la fuerza iónica es 1 M.

Los cationes mantienen el balance de cargas, a lo que se conoce como potencial Z. En un campo eléctrico los cationes son atraídos por el cátodo, y los aniones por el ánodo transportando agua con ellos. Por consiguiente, la doble capa eléctrica

tiene un balance que está a su vez en equilibrio con la pared, que corresponde al potencial Z . El exceso de cationes en la parte difusa (móvil) de la doble capa confiere un momento neto hacia el cátodo. Esta acción de bombeo, llamada electroósmosis (electroendoósmosis), es impulsada por los cationes solvatados que se encuentran en la franja de 10 nm cerca de las paredes y crea una especie de frente uniforme de *flujo electrostático* de toda la disolución hacia el cátodo (Figura 20), se da pues, un fuerte contraste con el *flujo hidrodinámico* ordinario, que es impulsado por una diferencia de presión entre los extremos del capilar. En el flujo hidrodinámico, el perfil de velocidades a través de una sección transversal del fluido es parabólico: la velocidad es máxima en el centro y disminuye a 0 en las paredes del capilar. Este gradiente de velocidad da como resultado un considerable ensanchamiento de banda.

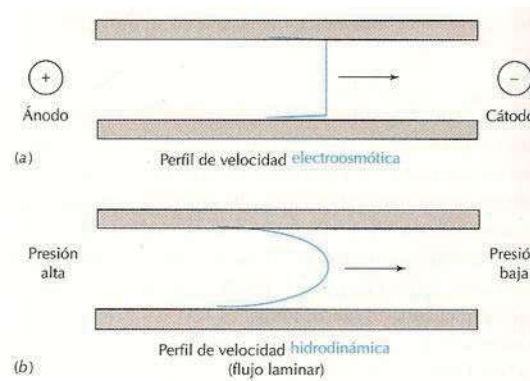


Figura 20. Electroósmosis produce un flujo uniforme en más del 99.9% de la sección transversal del capilar. La velocidad disminuye en las inmediaciones de la pared del capilar; b) perfil parabólico de velocidad de un flujo hidrodinámico (flujo laminar), con velocidad máxima en el centro del tubo y velocidad 0 en las paredes.

La movilidad electroosmótica o flujo electroosmótico está definido por:

$$u_{eo} = \frac{\zeta \epsilon}{4\pi\eta} E = \mu_{eo} E \quad (3)$$

Donde ϵ es la constante dieléctrica, η es la viscosidad del buffer, y ζ es el potencial zeta medido al nivel de corte cercano a la interfase líquido-sólido.

El potencial Z es relacionado a la inversa de la carga por unidad de superficie, el número de balance de electrones y la raíz cuadrada de la concentración del

electrolito. Hay una relación inversa, incrementando la concentración del electrolito se reduce la EOF.

El pH controla la EOF (Tabla 1). A pH neutro a alcalino, la EOF es lo suficientemente fuerte que la migración electroforética hace que todas las especies sean barridas hacia el electrodo negativo. La EOF hace posible el análisis simultáneo de cationes, aniones y especies neutras en un solo análisis. Siendo el orden de migración: cationes, especies neutras y aniones.

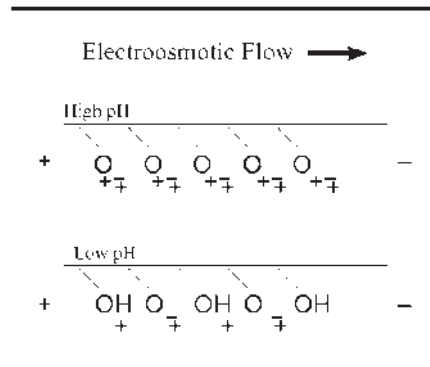


Figura 21. Efecto del pH sobre la EOF.

Un ejemplo sobre el efecto del pH sobre la EOF, es la separación de un zwitterion (péptido) bajo cada una de las condiciones descritas en la figura 21. A pH alto, la EOF es grande y el péptido está cargado negativamente. A pesar de la migración electroforética del péptido hacia el electrodo positivo (ánodo), la EOF es reducida y el péptido migra hacia el electrodo negativo (cátodo). A pH bajo, el péptido está cargado positivamente y la EOF es muy pequeña. De esta manera la migración electroforética del péptido y la EOF van hacia el electrodo negativo a pesar de la carga cuando el pH del buffer está sobre 7.0. A un pH ácido del buffer, más zwitteriones y cationes pueden migrar también hacia el electrodo negativo.

Tabla 2. Métodos para controlar el flujo electroosmótico

VARIABLE	RESULTADO	OBSERVACIONES
Campo eléctrico (E)	Cambios en la EOF	Al aumentar E aumenta el efecto Joule
pH del tampón	Si el pH aumenta, la EOF crece	Método más adecuado para variar la EOF
Fuerza iónica o [buffer]	Un aumento de cualquiera de las dos disminuye el potencial Z	Puede provocar aumento del efecto Joule. Fuerzas iónicas bajas pueden provocar adsorción de la muestra
Temperatura	Al aumentarla disminuye la viscosidad (2-3%/° C) y aumenta la EOF	Facilidad de control debido a la automatización y termostatación
Adición de modificadores orgánicos	Modifican el potencial Z y la viscosidad	Generalmente disminuyen el EOF y pueden alterar la selectividad

2.2.4 MOVILIDAD APARENTE

La movilidad aparente (u observada) (μ_{ep}) de un ión es la suma de la movilidad electroforética del ión más la movilidad electroosmótica de la disolución

$$\text{Movilidad aparente} \quad \mu_{ap} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (4)$$

Para un catión analito que se mueve en la misma dirección que el flujo electroosmótico, μ_{ep} y μ_{eo} tienen el mismo signo, y por tanto μ_{ap} es mayor que μ_{ep} . La electroforesis transporta los aniones en dirección opuesta a la electroósmosis (figura 19), de forma que para aniones los dos términos de la ecuación 3 tienen signos opuestos. A pH neutro o alto, una fuerte electroósmosis transporta aniones al cátodo porque la electroósmosis es normalmente más rápida que la electroforesis. A pH bajo, la electroósmosis es débil y los aniones no pueden llegar al detector (si se desea separar aniones a pH bajo se debe invertir la polaridad del instrumento haciendo negativo el compartimiento de muestra y positivo el del detector).

La movilidad aparente (μ_{ap}) de una especie dada es la velocidad neta (u_{neta}) de la especie dividida por el campo eléctrico (E):

$$\text{Movilidad aparente} \quad \mu_{ap} = \frac{u_{neta}}{E} = \frac{L_d/t}{V/L_t} \quad (5)$$

Donde L_d es la longitud de la columna desde la inyección al detector, L_t es la longitud total de la columna de un extremo a otro, V es el voltaje aplicado entre los dos extremos y t el tiempo necesario para que un soluto migre desde el extremo de inyección hasta el detector. El flujo electroosmótico se mide añadiendo a la muestra un soluto neutro que absorba en el UV y midiendo el tiempo de migración (t_{neutra}) hacia el detector. La movilidad electroosmótica es la velocidad de las especies neutras (u_{neutra}) dividido por el campo eléctrico:

$$\text{Movilidad electroosmótica} \quad \mu_{eo} = \frac{u_{neutra}}{E} = \frac{L_d/t_{neutra}}{V/L_t} \quad (6)$$

La movilidad electroforética de un analito es la diferencia $\mu_{ap} - \mu_{eo}$.

Para una máxima precisión, las movilidades se miden en relación con un estándar interno. Las variaciones absolutas entre dos análisis no deben afectar a las movilidades relativas, a menos que existan interacciones dependientes del tiempo (no del equilibrio) entre el soluto y las paredes.

La movilidad es independiente del voltaje y la longitud del capilar, pero es sumamente dependiente del tipo de buffer y pH, así como también de la temperatura [10, 11, 14].

2.2.5 INYECCIÓN DE LA MUESTRA

Existen diferentes sistemas de inyección de muestra en EC, que se basan en aplicar un gradiente de voltaje (electrocínética) o un gradiente de presión (hidrodinámica o hidrostática). En todos los casos, para introducir la muestra dentro del capilar se cambia el vial de entrada por un vial con muestra y se aplica la inyección durante 10 - 30 segundos, introduciéndose en el capilar un volumen de muestra del orden de nanolitros.

2.2.5.a Inyección electrocínética

Está basada en el hecho de que el voltaje puede causar movimientos electroforéticos y electrostáticos (Figura 22). Se introduce un extremo del capilar en el vial que contiene la muestra y el otro extremo en el vial que contiene el electrolito, y se aplica un voltaje elevado durante un breve periodo de tiempo. En

este caso, los compuestos se introducen en el capilar por la acción conjunta de la migración y del efecto de la movilidad electroosmótica. Si el voltaje se aplica solamente durante un periodo de tiempo corto, la muestra se introducirá principalmente por el movimiento electroforético. En este sistema de inyección, la cantidad inyectada es función de la movilidad electroosmótica de cada componente individual de la muestra.

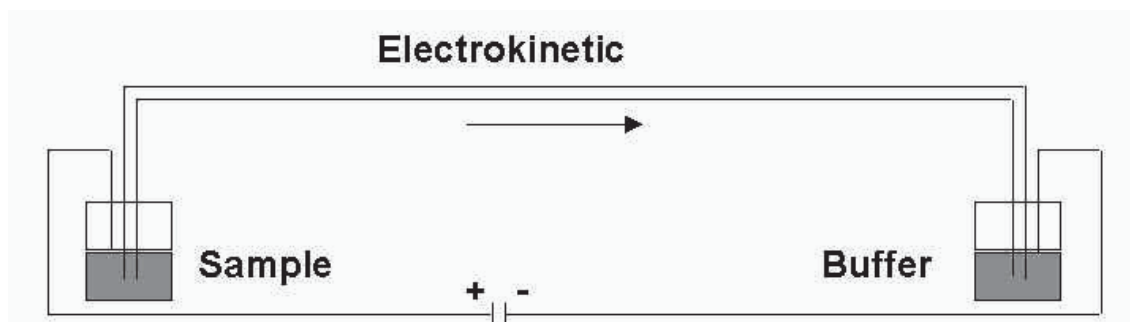


Figura 22. Inyección electrocinética.

2.2.5.b Inyección hidrodinámica

Se inyecta la muestra mediante una diferencia de presión entre los dos extremos del capilar, es el método más común de inyección (Figura 23). Existen diferentes formas de producir una presión superior al extremo del capilar en contacto con la disolución de la muestra: por *flujo gravitatorio* (sifonación) de la solución electrolítica mediante la elevación del vial con la muestra, mediante la aplicación de *presión* sobre la muestra, y por *succión* de la muestra mediante aplicación de vacío al vial de salida. Este tipo de inyección no depende de la movilidad electroforética de los solutos ni de la composición de la disolución de la muestra. El volumen de muestra inyectada está definido por las dimensiones del capilar, la viscosidad del electrolito, la presión aplicada y el tiempo. Se ha de controlar la temperatura del capilar, ya que la viscosidad del electrolito puede verse afectada y variar la cantidad de muestra que se inyecta [11, 27, 29, 31, 32].

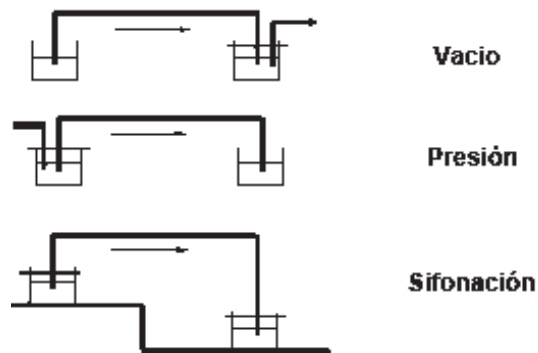


Figura 23. Inyección hidrodinámica.

2.2.6 SISTEMA DE DETECCIÓN

En general, la detección se realiza directamente sobre el capilar, lo cual significa que el capilar actúa como celda de detección. El tipo de detector dependerá de los analitos a determinar y siempre que se pueda se escogerá uno que proporcione la mayor sensibilidad a todos los compuestos.

2.2.6.a Detector UV – Visible

Incluye una fuente de luz ultravioleta, la cual es una lámpara de deuterio con filtros y detecciones con longitudes de onda seleccionadas. El rango de longitud de onda es de 190 a 600 nm. Dos lentes enfocan y dirigen la potencia de la lámpara a la longitud de onda seleccionada hacia los filtros localizados en una rueda que se localiza detrás del cartucho del capilar. El haz continúa a través de la ventana del capilar, donde se ha eliminado el recubrimiento de poliamida (ventana de detección), siguiendo a través de un cable de fibra óptica a un fotodiodo. La señal de luz es convertida a una señal eléctrica, es digitalizada y enviada a un sistema de administración de datos. Las longitudes de onda más empleadas en este sistema son 200 nm, 214 nm, 254 nm y 280 nm [11]. La detección UV – Vis se emplea para determinar una amplia variedad de compuestos, como son, drogas, tiaminas, fenoles, bifenilos policlorados (PCBs), plaguicidas organofosforados, etc. [33 - 37]. También se emplea para determinar compuestos que no tienen grupos cromóforos, en este caso, un electrolito o sustancia se adiciona absorbiendo la radiación, y el compuesto de interés se determina por la disminución de

absorbancia. Esta detección se llama UV – Vis indirecta, y se emplea en la determinación de aniones y cationes inorgánicos [38].

2.2.6.b Detector de fluorescencia inducida por láser

Utiliza un láser como fuente de luz. Un cable de fibra transmite la luz excitada del láser al capilar que se encuentra dentro del cartucho. Las sustancias dentro del capilar que tienen características fluorescentes son detectadas a una determinada longitud de onda. El detector mide y recolecta esta fluorescencia, dando un pico que se guarda en la computadora o se presenta el electroferograma impreso. El detector de fluorescencia (LIF) puede ser usado además, en forma indirecta. De esta manera, un sistema de buffer fluorescente (la especie fluorescente se adiciona al electrolito [39-40]) es usado para detectar compuestos no fluorescentes [11]. La detección de fluorescencia es ampliamente utilizada en los campos de bioquímica y clínica.

2.2.6.c Detección por arreglo de fotodiodo (PDA)

Utiliza la absorbancia de la luz para detectar la presencia de sustancias cuando pasan a través de la ventana de detección, proporcionando el análisis espectral. Las características espectrales obtenidas pueden ser útiles para la identificación de los componentes de la muestra. En la detección por PDA, la luz de la lámpara ilumina el tubo capilar. La luz que no es absorbida por las muestras es dirigida por un cable de fibra óptica a una rejilla que la rompe en un espectro, el cual es proyectado sobre un arreglo de 256 fotodiodos. Con este arreglo, la absorbancia de la muestra es medida. El detector de PDA también permite la medida simultánea de la luz en diversas longitudes de onda discretas. Recogiendo datos espectrales en un tiempo determinado, dando diagramas en tres dimensiones de la absorbancia. El arreglo de fotodiodo convierte la señal de luz en una señal eléctrica, la cual es digitalizada y se envía a la computadora para ser procesada por el software. El detector de PDA está calibrado a una longitud de onda usando bandas discretas generadas por una lámpara del mercurio.

2.2.6.d Detección electroquímica

Se utiliza la detección conductimétrica y la *amperométrica*. La conductimétrica se emplea para pequeños iones inorgánicos y ácidos carboxílicos. Hay diferentes diseños para los detectores conductimétricos, por un lado los de *columna (on-column)*, no presentan pérdida de eficacia, y por otro lado los de *final de columna (end-column)*, que se pueden acoplar a cualquier instrumento de EC sin necesidad de modificaciones. Estos detectores pueden actuar conjuntamente con el detector UV – Vis, aumentando el poder analítico de la técnica. La conductividad amperométrica posee gran selectividad, ya que solo detecta aquellos compuestos electroactivos al voltaje aplicado, facilitando la determinación en aquellas situaciones en que los compuestos de interés se han de estudiar en matrices más o menos complejas, como son los fluidos corporales [41].

2.2.7 EFICIENCIA DE LA SEPARACIÓN

Dos factores determinan el grado con que se pueden separar los compuestos por electroforesis capilar. Uno es la diferencia de tiempos de elusión de los respectivos picos, cuanto más distantes sean, mejor será la separación. El otro factor es la anchura de los picos, cuanto más anchos sean los picos, peor será la separación.

2.2.7.a Eficiencia de la columna

La altura de plato o platos teóricos, es la medida de la eficacia de la columna. Los platos teóricos es un término que relaciona la anchura de una banda con la distancia que ha recorrido a través del capilar. Cuanto más pequeña es la altura del plato, más estrecha es la banda. La capacidad de un capilar para separar componentes de una mezcla mejora al disminuir la altura del plato. Los distintos solutos que pasan a través de un mismo capilar tienen diferentes alturas de plato, por que tienen diferentes coeficientes de difusión. Las alturas de platos en electroforesis capilar son de menos de 1 μm .

La eficacia del sistema de electroforesis puede derivarse de principios fundamentales. La velocidad de migración v_{ep} es simplemente:

$$v_{ep} = \mu_{ap} E = \mu_{ap} \frac{V}{L} \quad (7)$$

El número de platos teóricos se define mediante la ecuación:

$$N = L^2 / \sigma^2 \quad (8)$$

Donde σ es la desviación estándar de la banda. Considerando un capilar de longitud L . Si el único mecanismo de ensanchamiento de zona es la difusión longitudinal, la desviación estándar viene dada por la ecuación:

$$\sigma = \sqrt{2Dt} \quad (9)$$

Donde D es el coeficiente de difusión y t es el tiempo de migración. Cambiando estas ecuaciones con la definición del campo eléctrico:

$$E = V / L \quad (10)$$

Donde V es el voltaje aplicado, se obtiene una expresión del número de platos de electroforesis capilar:

$$N = \frac{\mu_{ap} V}{2D} \quad (11)$$

Esta ecuación dice que cuanto mayor es el voltaje, mayor es el número de platos. Esta ecuación también indica que el número de platos es independiente de la longitud del capilar a un voltaje constante. Sin embargo, un capilar más largo permite usar un voltaje mayor, lo que aumenta el número de platos. El voltaje óptimo se halla representando la corriente frente al voltaje con electrolitos de fondo en el capilar. En ausencia de sobrecalentamiento, se debe originar de acuerdo con la ley de Ohm una línea recta. El voltaje máximo permitido es el valor al que la curva se desvía de la linealidad (5%). La concentración y composición del buffer, la temperatura y el enfriamiento activo juegan un papel en el voltaje que se puede tolerar. Hasta un cierto punto, el voltaje más alto da mejor resolución y separaciones más rápidas.

La dispersión, σ^2 , en este sistema simple es asumida a un tiempo relacionado solo con la difusión. La ecuación indica que las macromoléculas como son proteínas y ADN, la cuales tienen coeficientes de difusión pequeños, D , generarán el número más alto de platos teóricos. A pesar de la limitación difusional, la electroforesis capilar es usada para la separación de moléculas pequeñas por que μ_{ep} está en función de la proporción carga-masa. Las moléculas pequeñas tienden a ser más móviles. Por ejemplo, la movilidad del sulfato de quinina es $4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$. A pesar de su alto coeficiente de difusión de $0.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, la ecuación se soluciona por $N = 857,000$ platos teóricos, donde $V = 15,000$ voltios.

La resolución, R_s , entre dos especies está dada por la expresión:

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta \mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep}} \sqrt{N} \quad (12)$$

Donde $\Delta \mu_{ep}$ es la diferencia de la movilidad electroforética entre las dos especies, $\bar{\mu}_{ep}$ es el promedio de la movilidad electroforética entre dos especies y N es número de platos teóricos. Si sustituimos la ecuación de los platos teóricos, tenemos:

$$R_s = (0.177) \frac{\mu_{ep} \sqrt{V}}{\bar{\mu}_{ep} \sqrt{D_m}} \quad (13)$$

Esta expresión indica que el incremento del voltaje es una limitante para mejorar la resolución. Para duplicar la resolución el voltaje debe ser cuadruplicado. La llave para aumentar la resolución es incrementar $\Delta \mu_{ep}$. El control de la movilidad se logra lo mejor posible con la selección de la forma apropiada de electroforesis capilar junto con la selección de los buffers apropiados [13,14].

2.2.8 DIÁMETRO DEL CAPILAR Y EFECTO JOULE

La producción de calor en la EC es el resultado inevitable de la aplicación de un campo eléctrico fuerte. Este calentamiento aumenta la conductividad eléctrica de la disolución, las movilidades de las especies, la anchura de los picos y hasta puede afectar la operatividad del aparato bajo condiciones críticas. El efecto Joule está en relación directa con la longitud del capilar y la cantidad del voltaje aplicado. Cualquier incremento en la longitud del capilar o una disminución del voltaje, tiene un efecto dinámico sobre la producción de calor. El control de este fenómeno es necesario, particularmente en el uso de buffers altamente conductivos. Los gradientes de temperatura a través del capilar son una consecuencia de la disipación del calor. Puesto que el calor es disipado por difusión, la temperatura es mayor en el centro que en las paredes del capilar.

Puesto que la viscosidad es baja a altas temperaturas, la EOF y la movilidad electroforética (EPM) pueden incrementarse también. La movilidad para los iones incrementa en un 2% por grado Kelvin. El resultado es un perfil de flujo parecido al flujo hidrodinámico y ocurre un ensanchamiento de banda. Operando con un capilar de diámetro reducido se mejora la situación por que el paso de la corriente a través del capilar es reducida y el calor se disipa más fácilmente a través de una trayectoria radial más estrecha. El gradiente térmico que resulta es proporcional al cuadrado del diámetro del tubo capilar, que puede ser forma aproximada la ecuación siguiente:

$$\Delta T = 0.24 \frac{Wr^2}{4K} \quad (14)$$

Donde W es el poder, r es el radio del capilar, y K , la conductividad térmica.

Si el calor no es removido a una velocidad igual a su producción, un gradual, pero progresivo aumento en la temperatura puede ocurrir hasta que el equilibrio es alcanzado. Dependiendo de las condiciones específicas experimentales, la imprecisión sobre el tiempo de migración puede resultar debido a la variación de la EOF y la velocidad electroforética. Los capilares con diámetro interno reducido ayudan a la disipación de calor, pero se requiere un sistema de enfriamiento eficaz

para asegurar la eliminación del calor. El líquido refrigerante es el más efectivo para remover el calor y controlar la temperatura del capilar.

El diámetro interno del capilar es de 20 – 200 μm . Desde el punto de vista de la resolución, los capilares de diámetro interno pequeño son mejores para la separación. Sin embargo, tubos capilares de diámetro pequeño producen límites pobres de detección debido a la reducida longitud del detector y a la carga de la muestra. Los tubos capilares estrechos son también más propensos a atascarse [27, 13].

El material que constituye el capilar ha de ser química y eléctricamente estable, transparente a la luz UV y flexible. La sílice fundida es el material que más se utiliza. Para aumentar la flexibilidad de los capilares se protegen con una capa externa de poliamida, pero este recubrimiento no es transparente a la luz UV, por lo cual, se debe eliminar de la parte del capilar que actúa como celda de detección.

Un parámetro importante en la reproducibilidad de los resultados de los análisis es la forma física que tienen los extremos de los capilares (Figura 24). Extremos de capilares cerrados o con inclinación pueden provocar picos con colas y resultados pocos reproducibles.

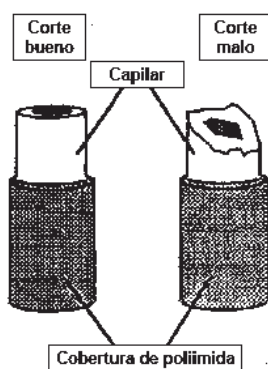


Figura 24. Corte de los extremos del un capilar.

El acondicionamiento del capilar antes de usarlo, afecta directamente la reproducibilidad de los resultados. Un acondicionamiento inicial a pH alcalino es suficiente para obtener un valor constante de la velocidad electroosmótica y una reproducibilidad satisfactoria en los tiempos de migración. Los pasos para el acondicionamiento son los siguientes: 5 minutos con Metanol (grado HPLC), 2

minutos con agua destilada o desionizada, 5 minutos con HCl 1N , NaOH al 1% por 10 minutos, nuevamente una corrida con agua durante 2 minutos y finalmente una corrida con buffer por 5 minutos. El proceso se lleva a 60° C a una presión de 20 psi. Las condiciones en que se mantienen los capilares cuando no se utilizan son también importantes para la reproducibilidad de los resultados. Es recomendable mantenerlos con aire, sin ninguna disolución, para evitar la formación de cristales o precipitaciones del electrolito [10,11,13].

2.2.9 EFECTO DEL VOLTAJE Y LA TEMPERATURA

Las velocidades electroforéticas y electroosmóticas son directamente proporcional al campo eléctrico, tanto el uso de altos voltajes si se desean separaciones en corto tiempo. Los tiempos cortos de la separación darán eficacias más altas puesto que la difusión es la característica más importante que contribuye al ensanchamiento de banda. El factor limitante aquí es el efecto Joule, experimentalmente, el voltaje óptimo es determinado por la realización de corridas incrementando el voltaje hasta observar deterioro en la resolución.

La movilidad electroforética y el flujo electroosmótico contienen un término de viscosidad en el denominador. La viscosidad está en función de la temperatura; por lo tanto, el control preciso de la temperatura es importante. Cuando la temperatura incrementa, la viscosidad disminuye, así, el incremento de la movilidad electroforética es bueno.

Muchas separaciones son realizadas a 25° C (cerca de la temperatura ambiente). Con el líquido refrigerante del capilar es posible mantener el control de la temperatura. Incluso a concentraciones altas del buffer y capilares de diámetro grande. Siempre que el control de la temperatura empiece a convertirse en un problema, la estrategia usual es el uso de capilares con diámetro pequeño (menor corriente reduce el calor producido) o un capilar grande (mayor área de superficie disipa el calor generado). Una alternativa es reducir la concentración del buffer, pero esto además reduce la eficacia del pico. El control inadecuado de la temperatura es la principal razón para el uso de una baja concentración del buffer (20 mM) [13].

2.3 FORMAS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La EC comprende una familia de técnicas que tienen diferentes características operativas y separativas. Las técnicas son:

- Electroforesis Capilar en Zona (ECZ)
- Enfoque isoeléctrico capilar (CIEF)
- Electroforesis Capilar en Gel (CGE)
- Isotacoforesis Capilar (CITP)
- Cromatografía Capilar en Fase Micelar (MEKC)

2.3.1 ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA (ECZ)

La ECZ también es conocida como electroforesis capilar en solución libre, es la forma más simple de la electroforesis capilar (EC). El mecanismo de separación está basado en las diferencias en la porción carga/masa. Los fundamentos de la ECZ son homogenización de la solución buffer y campo eléctrico constante a través de la longitud del capilar. Siguiendo la inyección y aplicación del voltaje, los componentes de una mezcla de la muestra se separan en zonas discretas (figura 25). El parámetro fundamental, es la movilidad electroforética, μ_{ep} [13].

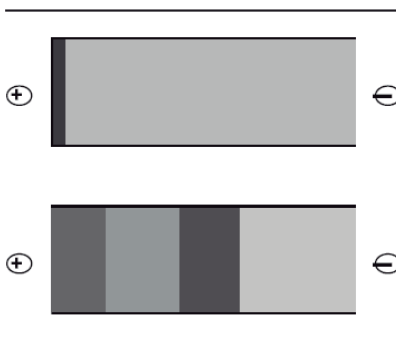


Figura 25. Electroforesis Capilar en Zona.

2.3.2 POLARIDAD

La separación de compuestos aniónicos y catiónicos se puede hacer posible gracias a la EOF. Si la magnitud de la EOF es suficiente, los compuestos aniónicos son arrastrados hacia el detector colocado en el cátodo (polaridad positiva). En caso contrario, por ejemplo aniones de dimensiones reducidas y muy cargados es necesario cambiar la polaridad (trabajar con voltajes negativos) de tal manera que estos aniones son detectados en el Ánodo (polaridad inversa o negativa). El conocimiento del pKa

para distintos componentes de la muestra, así como pl para proteínas, permite seleccionar los buffers apropiados para determinar el sentido de la migración y el grado de ionización. Los analitos neutros no migran y por tanto coeluyen con la EOF.

2.3.3 BUFFERS

Una amplia variedad de buffers pueden ser empleados para ECZ (Tabla 2). Un buffer es más efectivo dentro de 2 unidades de pH de su pKa, por ejemplo, el fosfato es utilizado aproximadamente a un pH 2.5 y pH 7.0 y el borato aproximadamente a pH 9. La concentración típica del buffer es 10 – 100 mM. El buffer elegido debe poseer una buena capacidad tamponante al pH de trabajo, además debe tener baja absorbancia a la longitud de onda de la detección y baja movilidad electroforética para minimizar el paso de corriente.

Los buffers para zwitteriones se emplean para las separaciones de proteínas y péptidos. La ventaja de estos buffers es su baja conductividad, reduciendo la corriente y el efecto Joule. En ciertas preparaciones de buffers, particularmente aquellas dirigidas a la separación de proteínas se adicionan sales de cloruro, sulfato y fosfato. Estas sales afectan la conformación de la proteína con lo cual se afecta la separación, así como su concentración afecta la EOF debido, a la interrupción de la doble capa cargada sobre las paredes del capilar.

Tabla 3. Buffers para Electroforesis Capilar en Zona

Buffer	pKa	Rangos de pH prácticos
Fosfato	2.12 _{pKa1} , 7.21 _{pKa2} , 12.32 _{pKa3}	1.14 - 3.14 // 6.20 – 8.20
Citrato	3.06 _{pKa1} , 4.74 _{pKa2} , 5.40 _{pKa3}	2.08 – 5.74
Acetato	4.75	3.76 – 5.76
Borato	9.24	8.14 – 10.14
Buffers zwitteriónicos		
MES*	6.15	5.15 – 7.15
PIPES**	6.80	5.80 – 7.80
TRIS***	8.30	7.30 – 9.30
TRICINA	8.15	7.15 – 9.15
HEPES****	7.55	6.55 – 8.55

* Ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico

** Ácido 1,4-Piperazindietaosulfónico.

*** 2-amino,2-hidroximetil-1,3-propanodiol.

**** Ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico.

Varios aditivos de buffer pueden ser empleados para cambiar la selectividad de la separación y modificar la movilidad electroforética (Tabla 3). En otras palabras, dos componentes que tienen idénticas movilidades en un sistema simple de buffer pueden ser diferenciados con un aditivo.

Tabla 4. Aditivos para Electroforesis Capilar en Zona

Aditivos	Función
Sales inorgánicas	Cambio conformacional proteico
Solventes inorgánicos	Solubilizan y modifican la corriente endosmótica
Urea	Desnaturaliza oligonucleótidos y solubiliza proteínas
Ácido sulfónico	Relaciona agentes iónicos e hidrofóbicos
Surfactantes catiónicos	Producen el cambio reverso en la pared capilar
Derivados de celulosa	Reducen la corriente electroendosmótica y actúan como tamiz
Aminas	Cubren los grupos silanol

2.3.4 PAREDES DEL CAPILAR

Un problema en la ECZ es la vinculación electrostática de sustancias catiónicas en las paredes del capilar. Este efecto es observado en proteínas cuando se opera con un buffer que tiene un pH más bajo que el pK_a del analito. Este problema puede ser superado operando a dos unidades menores de pH sobre el pK_a de la proteína, pero en algunos casos, el pH elevado puede ser adecuado para la separación. A pesar de estos problemas, las proteínas, especialmente aquellas con tamaños similares, pueden ser bien separadas en solución libre. El uso de capilares tratados es uno de varios caminos que pueden servir para reducir la vinculación con la pared.

Otro desarrollo recientemente producido incluye el uso de altas concentraciones de buffer de fosfato para ocultar la carga en el interior de la pared del capilar y capilares cortos (20 cm.), diámetro pequeño (25 μm) operando con un campo eléctrico alto lo cual permite separaciones muy rápidas, de ese modo se minimiza el tiempo de estancia de las proteínas en el capilar. Esta propuesta requiere un excelente sistema de control de la temperatura dentro del capilar para remover el calor generado por el alto voltaje y la corriente [10-14, 26-41].

2.4 SEPARACIÓN DE ANALITOS

Es necesario conocer las propiedades ácido – base de los analitos, cuando esto no es posible, es aconsejable realizar dos experiencias a pH ácido y básico, y comprobar la posición de los analitos respecto a la EOF. Un analito con algún grupo básico estará protonado a pHs bajos y migrará antes del EOF mientras que algún analito con algún grupo ácido se comportará como un anión y migrará después de la EOF en la experiencia a pHs básicos.

Una vez que se han hallado unas condiciones de separación donde los analitos migren y puedan ser detectados se optimiza el método en cuanto a resolución entre picos, tiempo de análisis, etc. La optimización del método implica en primer término obtener una resolución suficiente de todos los analitos y para ello el pH del buffer es el parámetro clave. Modificándolo, se obtienen relaciones carga / masa y por tanto diferentes movilidades. Para separaciones de mezclas complejas, puede ser necesario el uso de aditivos en el buffer (solventes orgánicos, ciclodextrinas, surfactantes catiónicos, etc.). Una vez que la resolución de los analitos es suficiente, se intenta disminuir el tiempo de análisis mediante el aumento de voltaje o la disminución de la longitud del capilar, aunque estos parámetros también pueden afectar la resolución.

2.5 ORIGEN DE LA CARGA EN UN MICROORGANISMO

Es aceptable caracterizar a la mayoría de los microorganismos como partículas coloidales debido a su tamaño (10^{-4} μm). Los coloides deben el origen de su carga a dos motivos: el primero ocurre debido a la ionización de los grupos funcionales de superficie como resultado de la protonación o deprotonación de moléculas ácidas y básicas de la superficie. La carga de la superficie puede además ser obtenida por absorción de iones de la solución. Esto es casi siempre una absorción diferente de iones por las partículas coloidales. Los tipos y cantidades de un ion absorbido son controlados por el tamaño y naturaleza (superficie química) de la partícula coloidal, también como por las propiedades de la solución (por ejemplo, pH, fuerza iónica y composición iónica). La carga de superficie de un MO es debida usualmente a la combinación de estos factores. Los grupos más

comúnmente ionizables sobre la superficie de los microbios son ácidos carboxílicos, fosfatos, aminas y sulfatos.

La química de las paredes externas de la célula determina no solo la carga de la superficie, además si los organismos son gram-positivos o gram-negativos.

Las membranas y las paredes celulares de los hongos contienen proteínas y lípidos moleculares dando una carga característica. Esta carga puede ser alterada dependiendo del pH, fuerza iónica, la composición del electrolito y la temperatura [1,9]. La movilidad electroforética de microbios, en un campo eléctrico constante, es dependiente sobre todo de la fuerza iónica de la solución circundante. La protonación o deprotonación de la superficie externa de entidades biológicas es dictado por el pH de la solución circundante. Por lo tanto, alterar el pH puede también afectar la movilidad electroforética de microbios. El radio de un microbio también afecta su movilidad [1].

2.6 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS POR EC

El primer experimento que demostró la posibilidad de mover microorganismos a través de capilares bajo un campo eléctrico aplicado, consistió en el análisis de *Lactobacillus casei* y el virus mosaico del tabaco. Ambos se detectaron en UV-visible, *Lactobacillus casei* a 220nm y el virus mosaico del tabaco a 216nm, en corridas separadas. Los electroferogramas resultantes mostraban picos agudos y un tiempo de migración de 4 min, sin embargo, en mezcla no hubo separación de los microorganismos. La primera separación de bacterias por electroforesis capilar consiguió la separación total o parcial de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Staphylococcus aureus* en bandas discretas, en 70min. Poco después se reportaron separaciones análogas *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp*, y *Alcaligenes eutrophus*. La inyección individual de cada bacteria permitió la identificación de los picos y su correspondiente movilidad, y por lo tanto su caracterización [1]. Recientemente se han demostrado separaciones eficientes y rápidas de otros microorganismos intactos como *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Alcaligenes fecalis* [45,46].

De la misma forma que moléculas los microorganismos han mostrado grandes eficiencias en la altura de pico, ya que se alcanzando eficiencias 10^6 - 10^9 platos teóricos/m, en la separación de *Bifidobacteria infantis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* [47]. Además de la rápida separación, identificación y cuantificación de estos microorganismos, también ha podido determinarse la viabilidad (porcentaje de células vivas y muertas) por medio de CE y fluorescencia inducida por láser [2].

Estos avances eventualmente permitirán el desarrollo de métodos rápidos de análisis para muestras microbianas específicas, las cuales puedan servir de base para establecer pruebas con valor diagnóstico. Por ejemplo, se ha establecido un sistema de identificación de *Salmonella enteritidis* y otros serotipos por medio de un marcador y electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser [48]. Además, los patógenos responsables de la mayoría de la infecciones de tracto urinario, *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus*, ya han podido distinguirse uno de otro después de la inyección directa de muestras de orina no tratadas en tan solo 10 min de análisis.

Es posible adaptar el análisis de microorganismos por CE a muestras complejas de productos de consumo. Se ha identificado y cuantificado *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* en píldoras y jarabes usados como suplementos alimenticios [5].

La EC ha mostrado capacidad para la evaluación de la interacción microorganismo-molécula [6]; puede usarse para evaluar la conducta de asociación entre una amplia gama de ligandos y receptores; por ejemplo, se han estimado las constantes de asociación del virus del resfriado común y rinovirus humano serotipo 2, a anticuerpos monoclonales y otras biomoléculas por medio de EC [49, 59]. Las constantes de asociación son útiles para cuantificación de toda asociación molecular, en estudios de actividad farmacéutica, toxicidad y estudios microbiológicos [5]. La medición de la movilidad electroforética esta permitiendo el estudio de propiedades superficiales de las células microbianas, por medio de esta ha podido detectarse la sutil, pero importante, heterogenicidad que puede existir en una población monoclonal. Además, se han obtenido puntos isoelectrónicos e información acerca de propiedades adhesivas y estabilidad en agua de varios

microorganismos, como *Escherichia coli*, oocitos de *Cryptosporidium parvum* y varios tipos de *Mycobacterium* [1,3,4].

La EC se ha empleado además, para la identificación y cuantificación del VIH-1, ayudando a la optimización de la terapia antirretroviral, con lo cual se ha prolongado la supervivencia de pacientes con VIH [51].

2.7 OTRAS APLICACIONES

La Electroforesis Capilar es una herramienta analítica estándar, imprescindible en la bioquímica moderna y biología molecular; los procedimientos electroforéticos son usados en casi todos los aspectos de la investigación biomédica y clínica básica o aplicada [1,10]. Usada en biotecnología para la caracterización y análisis de macromoléculas como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos [54]. En la industria farmacéutica para el estudio de nuevos y diversos fármacos, proteínas con actividad farmacológica, control de calidad y estructuras quirales. En el área de los alimentos se aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes. En control ambiental permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos [52]. Además su uso en la toxicología forense ha resultado en la identificación de drogas y venenos que han causado daño o muerte en víctimas [53].

3. JUSTIFICACIÓN

Si bien el estudio de las características electroforéticas esta sirviendo como una base prometedora para múltiples ensayos microbiológicos de interés biomédico, en general, son pocos los estudios que se refieren a la determinación de células microbianas. Debido a la falta de estudios por electroforesis capilar en hifas, lo que se pretende con este trabajo es observar si es posible analizar estas estructuras por electroforesis capilar.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la factibilidad de analizar hifas por electroforesis capilar

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer los tiempos de crecimiento de *Pleurotus sp.* y *Lactarius sp.* en que es posible medir su comportamiento electroforético.

Probar diferentes condiciones electroforéticas: composición de las soluciones buffer, concentración y pH, para determinar si es posible el análisis de hifas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 INSTRUMENTACIÓN

Equipo: P/ ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System *Beckman Coulter*®.



5.1.2 REACTIVOS

- Fosfato de Sodio Monobásico, Monohidratado, cristal. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Reactivo JT Baker® ACS.
- Dextrosa. $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. BD Bioxon®
- Hidróxido de Sodio, perlas. NaOH . Reactivo JT Baker® ACS.
- Ácido Clorhídrico. HCl . Reactivo Baker® ACS.
- Borato de Sodio 10-Hidrato, Cristal. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Reactivo JT Baker® ACS.
- Citrato de Sodio Dihidrato, Granular. $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Reactivo JT Baker® ACS.
- Agar Papa Dextrosa. BD Bioxon®
- Líquido refrigerante *Beckman & Coulter*®.

5.1.3 CEPAS ESTUDIADAS

Se utilizaron las cepas *Lactarius sp.* y *Pleurotus sp.*, precultivos aislados de micelio de ambos hongos proporcionados por el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

5.1.4 MEDIO DE CULTIVO

5.1.4.a Caldo Papa Dextrosa (PDC)

Se pesan 250 g. de papa, las cuales son lavadas perfectamente y posteriormente picadas para así colocarse en un vaso de precipitado de 1000 mL agregando agua destilada, aproximadamente 300 mL, para proceder a hervir durante 20 minutos a partir del primer hervor. El producto acuoso se filtra en un vaso de precipitado, usando un embudo y una gasa, el residuo de papa filtrado se lava con agua destilada. Al filtrado se le agregan 20 g de dextrosa y se afora a 1 L con agua destilada. Se vierte 25 mL del producto en matraces Erlenmeyer de 50 mL, se tapan y se procede a esterilización en autoclave a 121° C (15 lb/in²) durante 15 minutos. Una vez esterilizado y enfriado, será conservado en refrigeración para su posterior uso.

5.1.4.b Agar Papa Dextrosa (PDA)

Se suspendieron 19.5 g de polvo BD Bioxon ® en ½ litro de agua destilada. Se mezcló perfectamente y se procedió a calentar con agitación frecuente hasta disolución completa. Se colocó en vasos de precipitados y se esterilizó a 121° C por 15 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se vacía en placas Petri, las que son conservadas en refrigeración hasta su uso.

5.2 Cultivo

Se toman 2 matraces de 50 mL que contienen PDC previamente preparado, cada uno se inocula con cinco cilindros de 0.5 cm de diámetro obtenidos de un micelio fresco proveniente de un precultivo realizado en medio PDA de *Lactarius sp.* y *Pleurotus sp.* Posteriormente los matraces se incuban a 28° C a 1500 rpm. Se

detiene el crecimiento del hongo a las 14, 28 y 30 horas de incubación para *Lactarius sp.*; 28 y 29.5 horas para *Pleurotus sp.*

5.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

5.3.1 *Lactarius sp.*

Se extrajeron del medio de cultivo fragmentos de micelio a las 14, 28 y 30 horas de incubación con la ayuda de una pinza en ambiente estéril. El micelio se colocó en 20 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente para separar el micelio, posteriormente se procedió a desgasificar la muestra en un sonificador durante 10 minutos. De esta disolución se tomaron 400 μ L, colocándose en un vial, al cual se adicionó 100 μ L de la solución buffer a prueba.

5.3.2 *Pleurotus sp.*

Se extrajeron del medio de cultivo fragmentos de micelio a las 28 y 29.5 horas de incubación con la ayuda de una pinza en ambiente estéril. El micelio se colocó en 20 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente para separar el micelio, posteriormente se procedió a desgasificar la muestra en un sonificador durante 10 minutos. De esta disolución se tomaron 400 μ L, colocándose en un vial, al cual se adicionó 100 μ m de la solución buffer a prueba.

Se introdujeron al sistema de Electroforesis Capilar los viales para llevar a cabo el análisis.

5.4 CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS

Capilar: Se utilizaron capilares de sílice fundida con diámetro interno de 75 y 100 μ m, con una longitud efectiva de 28 y 20 cm, respectivamente. Con cubierta de poliamida.

Temperatura: En todas las corridas se mantuvo a 25° C.

Temperatura del cartucho: 25° C.

Detector: Arreglo de Diodos.

Longitud de onda: 214 nm.

Voltaje: 15.0 kV en todas las corridas.

Presión: 20.0 psi para lavado y separación.

Polaridad: Positiva.

Composiciones del Buffer ensayadas:

Tabla 5. BGE.

Hongo	Buffer	Concentración	pH
<i>Lactarius sp.</i>	De fosfatos	10 mM	7.0
		20 mM	7.0
		30 mM	6.0, 7.0, 8.0
	De boratos	20 mM	8.0
	De citratos	20 mM	5.0
<i>Pleurotus sp.</i>	De fosfatos	10 mM	7.0
		20 mM	7.0
		30 mM	6.0, 7.0
	De boratos	20 mM	8.0
	De citratos	20 mM	5.0

6. RESULTADOS

6.1 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

6.1.1 *Lactarius sp.*

Color	Blanco
Reverso	Amarillo claro
Textura	Algodonoso
Consistencia	Dura



Figura 26. *Lactarius sp.* En agar papa dextrosa. Incubado a 28° C por 24 horas.

6.1.2 *Pleurotus sp.*

Color	Blanco
Reverso	Café claro
Textura	Algodonoso
Consistencia	Dura

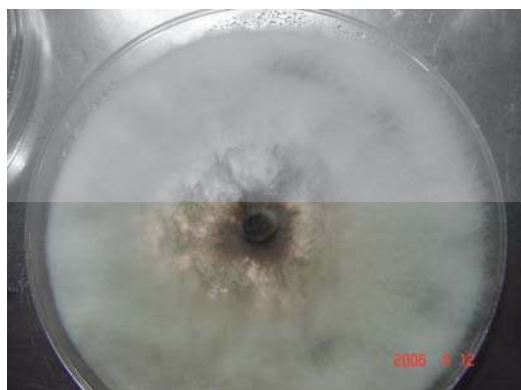
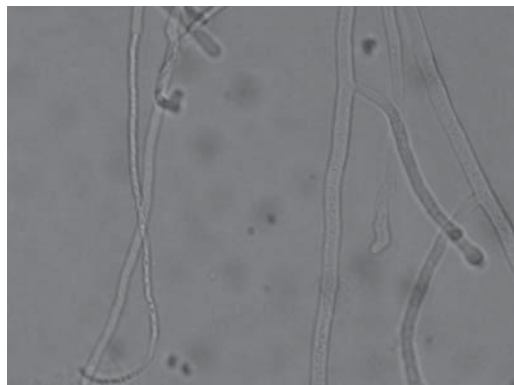


Figura 27. *Pleurotus sp.* En agar papa dextrosa a 28° C por 24 horas.

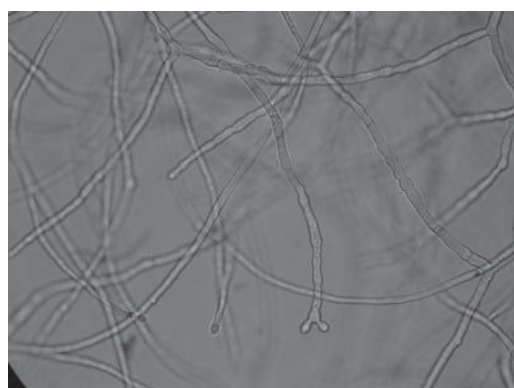
6.2 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

El crecimiento fúngico se observó mediante microscopio Leica CME con objetivo 40X en suspensión acuosa.

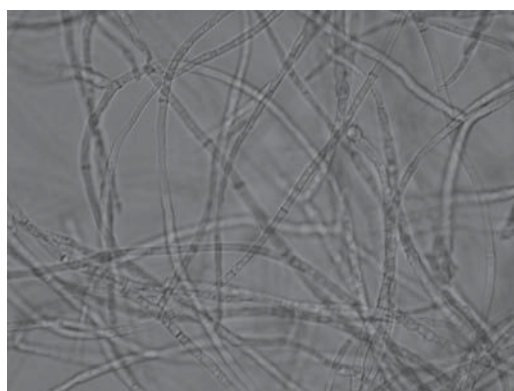
6.2.1 *Lactarius sp.*



A



B



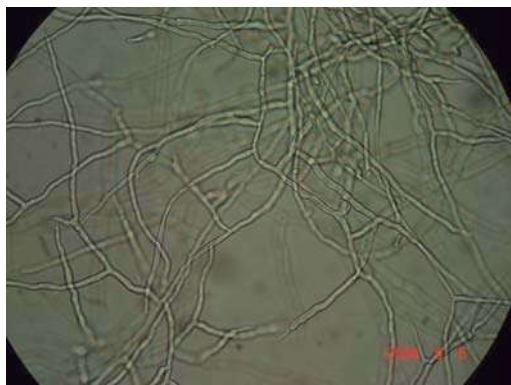
C

Figura 28. (A) *Lactarius sp.* a 14 horas de incubación, (B) *Lactarius sp.* a 28 horas de incubación. (C) *Lactarius sp.* a 30 horas de incubación.

6.2.2 *Pleurotus* sp.



A



B

Figura 29. (A) *Pleurotus* sp. a 28 horas de incubación, (B) *Pleurotus* sp. a 29.5 horas de incubación.

6.3 ELECTROFEROGRAMAS DE PLEUROTUS Y LACTARIUS

6.3.1 Blanco

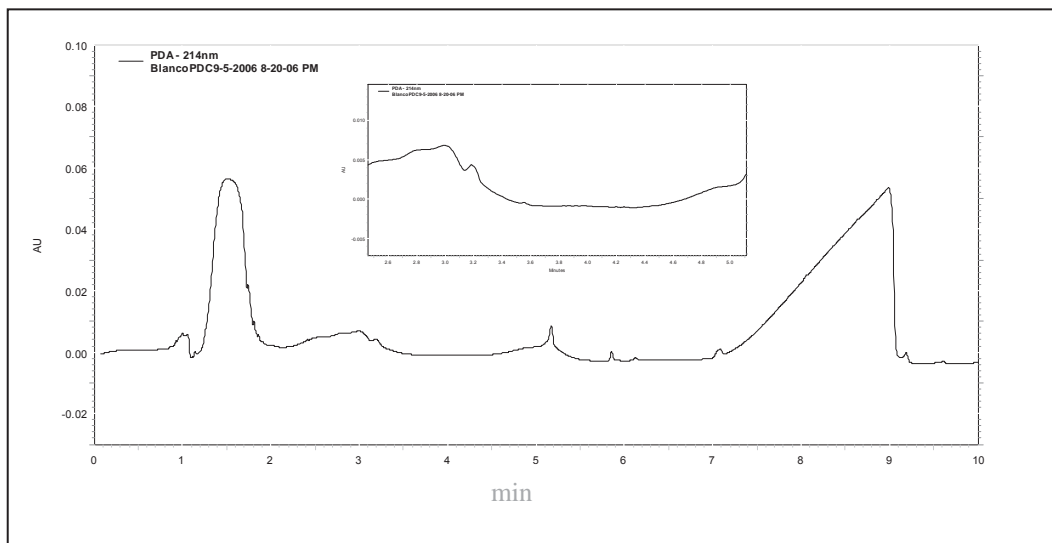


Figura 30. Electroferograma del Caldo Papa Dextrosa. El inserto muestran el área donde se presentan los picos correspondientes a *Lactarius sp.* y *Pleurotus sp.*

6.3.2 Electroferogramas de *Pleurotus sp.* usando capilar de 100 μm de d.i.

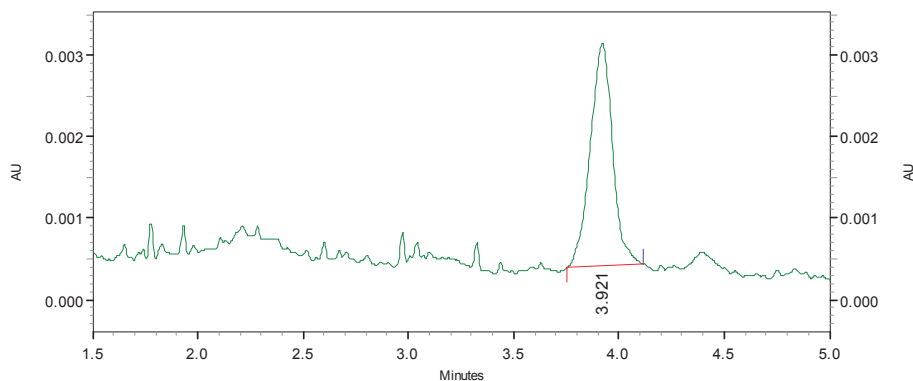


Figura 31. Electroferograma donde se observa el pico correspondiente a *Pleurotus sp.*
BGE de fosfatos 20 mM, pH 7.0

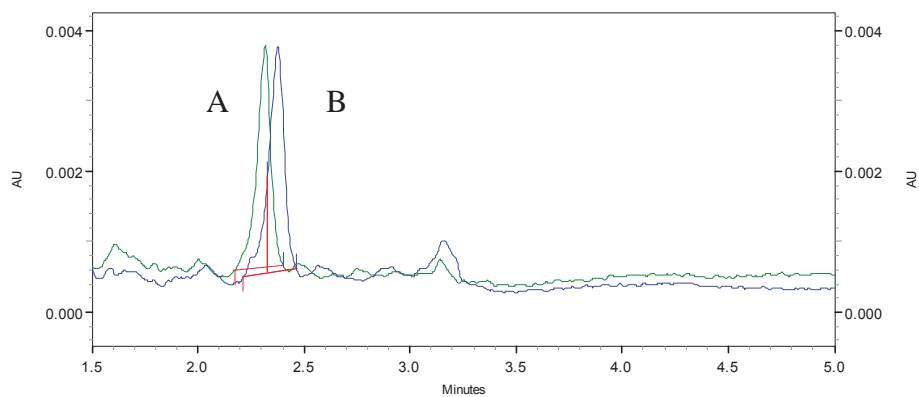


Figura 32. Electroferograma de *Pleurotus* usando BGE pH 8.0, 20 mM.
A) Corresponde a buffer de borato y; B) a buffer de fosfato.

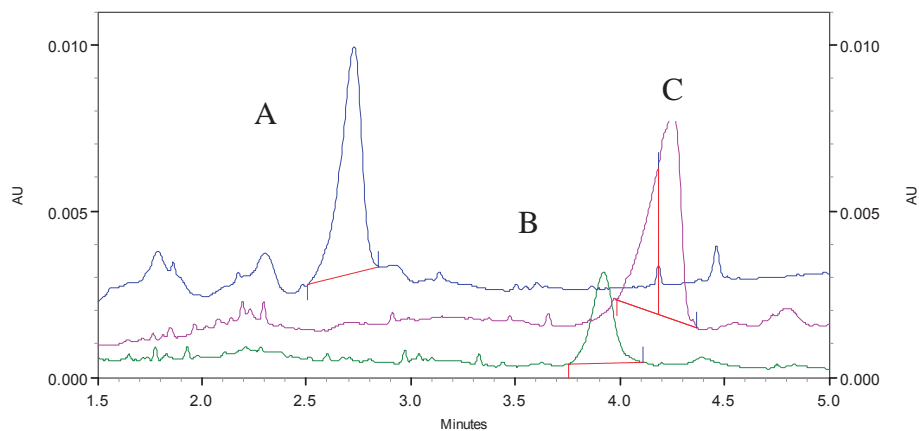


Figura 33. Electroferograma que muestra la influencia de la concentración del buffer.
BGE de fosfato, pH 7.0 A) 30 mM; B) 20 mM y C) 10 mM.

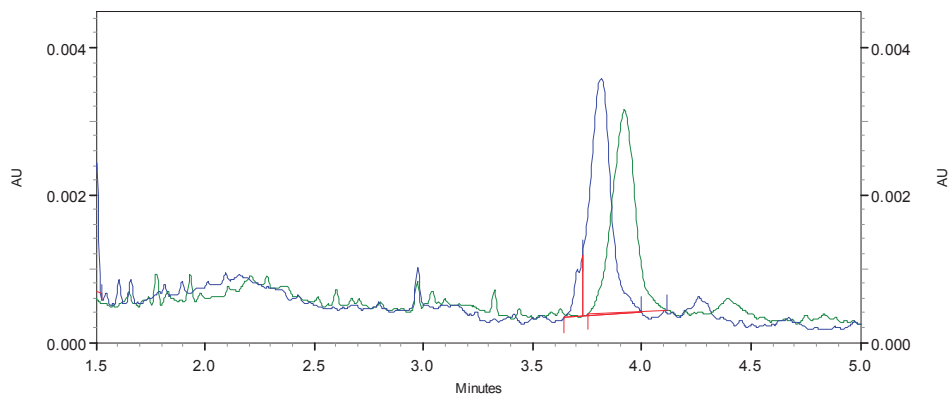


Figura 34. Electroferograma que muestra la reproducibilidad del pico producido por *Pleurotus sp.*
BGE de fosfato 20 mM, pH 7.0

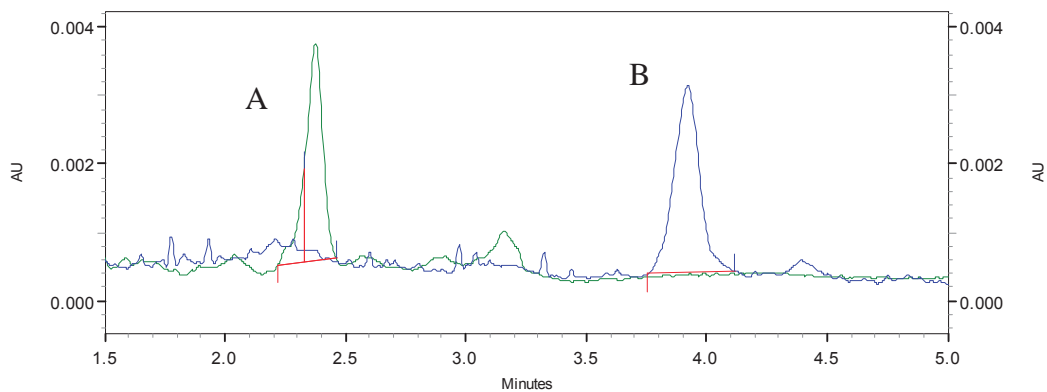


Figura 35. Electroferograma que muestra el efecto del pH en el tiempo de migración para *Pleurotus sp.* BGE de fosfato 20mM, A) pH 8.0 y B) pH 7.0

6.3.3 Electroferogramas de *Lactarius sp.* usando capilar de 100 μm de d.i.

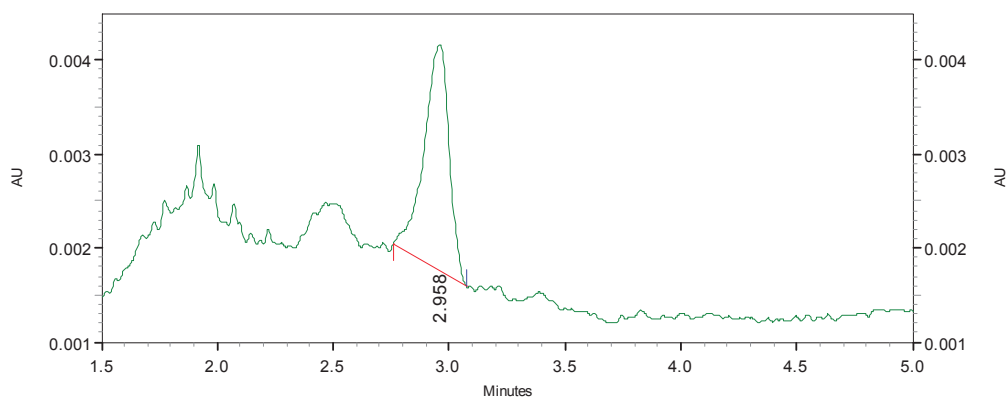


Figura 36. Electroferograma que muestra el pico producido por *Lactarius sp.* BGE de fosfato 10 mM, pH 7.0

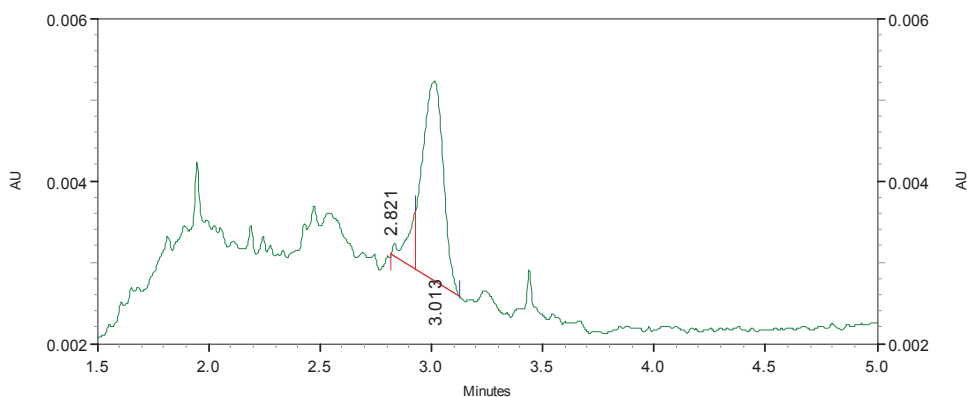


Figura 37. Electroferograma que muestra el pico producido por *Lactarius sp.* BGE de fosfato 20 mM, pH 7.0

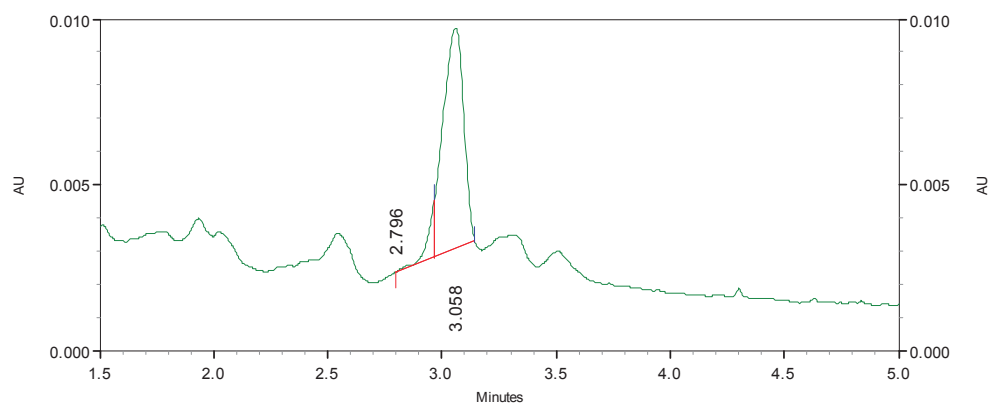


Figura 38. Electroferograma que muestra el pico producido por *Lactarius sp.* BGE de fosfato 30 mM, pH 7.0

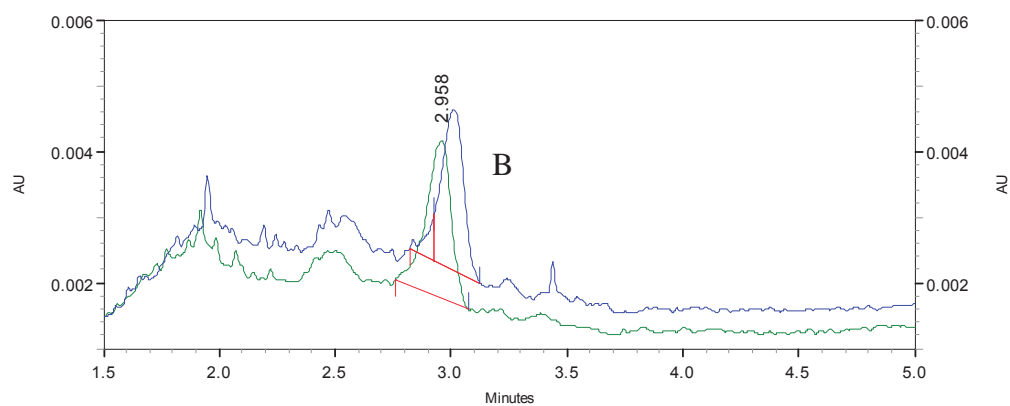


Figura 39. Electroferograma que muestra el efecto de la concentración de BGE en el tiempo de migración. BGE de fosfato pH 7.0. A) 10 mM y; B) 20 mM.

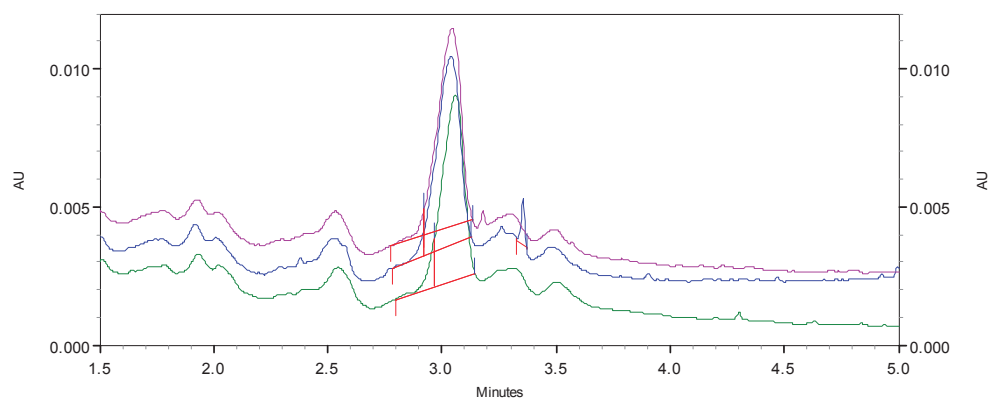


Figura 40. Electroferograma que muestra la reproducibilidad del sistema en el pico mayoritario de *Lactarius sp.* BGE de fosfato 30 mM, pH 7.0

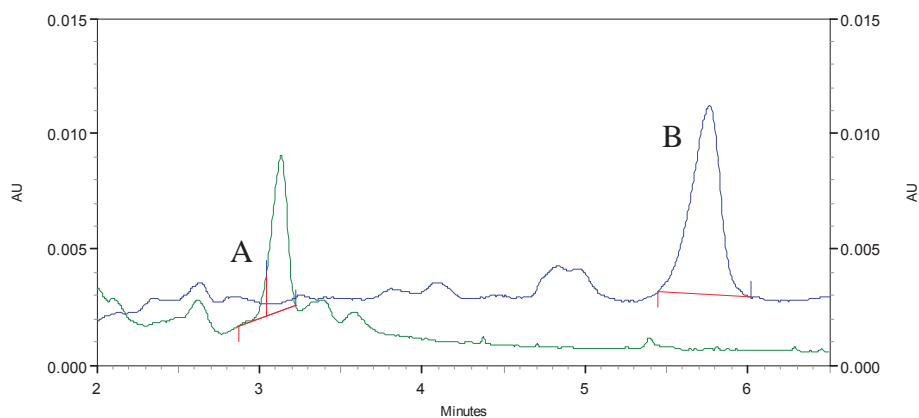


Figura 41. Electroferograma que muestra el efecto del pH del BGE en el tiempo de migración. A) Corresponde a pH 7.0 y; B) Corresponde a pH 6.0. BGE de fosfato 30 mM.

6.3.4 Electroferogramas usando capilar de 75 μ m de d.i.

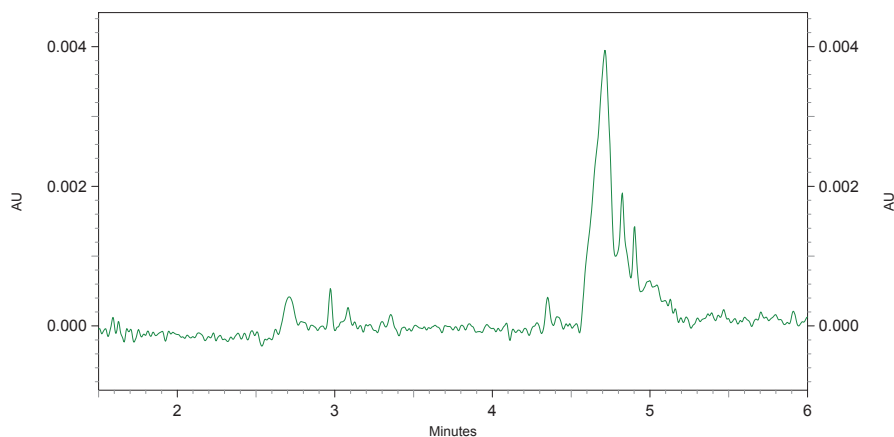


Figura 42. Electroferograma que muestra la respuesta obtenida por *Pleurotus sp.* en un capilar de 75 μ m de d.i.

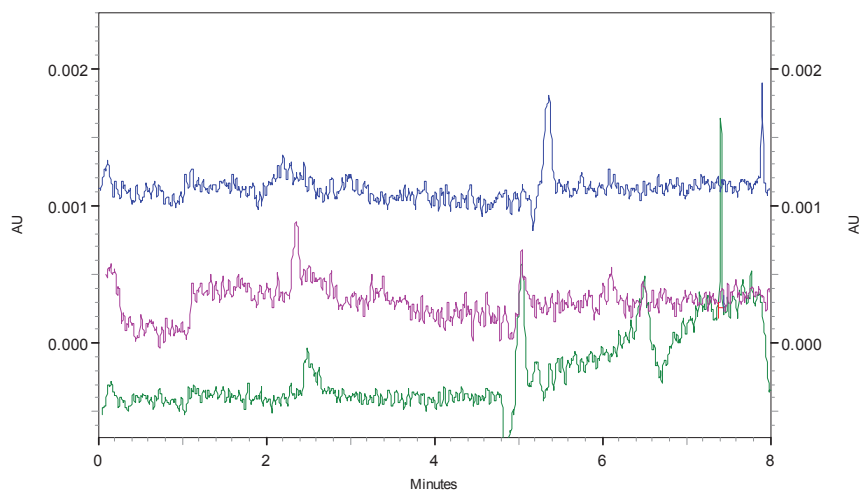


Figura 43. Electroferograma que muestra la falta de respuesta de *Lactarius sp.* cuando se usa un capilar de 75 μ m de d.i. BGE de fosfato 30 mM, pH 7.0

7. DISCUSIÓN

Son pocos los estudios electroforéticos que se refieren a la determinación de células microbianas, como bacterias y virus y casi nulos los que se refieren a células fúngicas. Para estas últimas existen varios estudios en los que se utiliza EC para analizar los productos obtenidos mediante técnicas moleculares [46,47,48] en el análisis de los hongos; sin embargo los trabajos sobre células fúngicas se han enfocado a levaduras [3,46] y ninguno al de hifas.

En este trabajo se estudió la posibilidad de analizar por EC hifas provenientes de dos hongos Basidiomicetos: *Pleurotus sp.* y *Lactarius sp.* Ambos hongos se cultivaron en PDC para de ahí tomar muestras para análisis directo y se observó que para *Lactarius sp.* los tiempos de crecimiento notorio fueron de 24 horas y para *Pleurotus sp.* de 29 horas. Estos tiempos representan los adecuados para cosechar los hongos y llevarlos al análisis. Después de estos tiempos se forman agregados compactos difíciles de manipular. Las observaciones microscópicas muestran claramente la formación de hifas ramificadas.

El análisis del PDC por EC dio un electroferograma que muestra dos picos grandes que aparecen en un área donde no se observó la presencia de los picos ocasionados por los hongos, tal y como se muestra en la figura 30 y el inserto muestra que no aparece ningún pico relacionado al medio de cultivo.

Las figuras 31 y 36 muestran los picos obtenidos por *Pleurotus sp.* y *Lactarius sp.*, respectivamente. En ambas se observa un pico mayoritario que se atribuye al hongo; sin embargo hay otros pequeños picos que pueden deberse a distintas estructuras de los mismos hongos.

Toda vez que se observó la aparición de un pico para cada hongo, se probaron diferentes tipos de buffer, concentraciones y pH, además de variar el tiempo de inyección de la muestra. En cuanto a este último, se probaron 3, 5 y 7 segundos, sin encontrar diferencias significativas en los resultados, por lo que se decidió usar 5 segundos.

Se emplearon buffers de citrato, borato y fosfato. El buffer de citrato se descartó por que ocasionaba la caída de la corriente en el instrumento, además de ocasionar picos distorsionados. Los otros dos buffers ofrecieron mejores

resultados pero el de fosfato siempre ofrecía una mejor forma del pico. El buffer de fosfato 30 mM a pH 7.0 producía picos más simétricos.

Con respecto al diámetro del capilar el de 100 μm favorece la entrada de las hifas, no así con el capilar de 75 μm , ya que al parecer estas se encuentran muy ramificadas y aún más en el caso de *Lactarius sp.* puesto que no se logra observar ningún pico en el electroferograma, pero sí se logró obtener un pico para *Pleurotus sp.*

8. CONCLUSIONES

Se observó que sí es posible analizar hifas tomadas directamente del cultivo por Electroforesis Capilar en Zona, bajo las condiciones ensayadas, obteniendo mejores resultados con buffer de fosfato a una concentración 30 mM y pH 7.0 ya que ofrece un pico definido y simétrico en los electroferogramas correspondientes a cada hongo. Además del uso de un capilar con diámetro interno de 100 μm , que favorece la entrada de las hifas.

9. PERSPECTIVAS

- Buscar la manera de controlar el desarrollo y crecimiento de una estructura mayoritaria del hongo, para corroborar lo presentado en esta tesis.
- Probar distintos aditivos para el buffer con la finalidad de controlar el tiempo de migración de cada hongo.
- Emplear diferentes longitudes efectivas del capilar.

GLOSARIO

Absorbancia	Cifra sin dimensiones que indica hasta qué punto absorbe una solución de una sustancia la luz de una determinada longitud de onda. Se define como el logaritmo negativo de la fracción de luz de longitud de onda λ que pasa a través de una muestra de la solución. Su valor depende de la longitud del paso de la luz, la concentración de la solución y el coeficiente de excitación de la sustancia a esa longitud de onda.
Acrópeta	Producido hacia el ápex. Con referencia a la cadena de conidios, el conidio más joven está en la punta y el más viejo en la base.
Adsorción	Proceso mediante el cual átomos, moléculas o iones se adhieren a una superficie.
Aerobio	Indica la presencia de oxígeno o la necesidad de éste.
Anélido	Célula conidógena generalmente en forma de botella, caracterizada por presentar una cicatriz en forma de anillo después de cada conidiación.
Ánodo	Electrodo en el que se lleva a cabo la oxidación.
Apotecio	Ascarpo abierto plano o en forma de copa. Las ascas están en un himenio.
Arthroconidio	Conidio tático producido por fragmentación de la hifa y que se libera por un proceso de rexólisis o de esquizólisis.
Asca	Estructura en forma de asca que contiene ascosporas que se forman como resultado de cariogamia o meiosis.
Ascarpo	Cuerpo fructífero complejo que contiene ascas.
Ascomycetes	Grupo de hongos que se reproduce por medio de ascosporas.
Ascospora	Espora haploide producida generalmente dentro de una asca.
Aseptado	Referente al filamento fúngico, que carece de septos. Sinónimo de cenocítico.
Autótrofo	Organismo con capacidad para utilizar el bióxido de carbono como única fuente de carbono.
Balistoconidio	Conidio que se descarga a presión.
Basidio	Estructura a partir de la cual se forman las basidiosporas como resultado de la cariogamia y meiosis; o los basidios son característicos de Basidiomycetes.
Basidiospora	Espora haploide producida sobre el basidio después de la plasmogamia y cariogamia.
Basípeta	Producida en la base; se refiere a una cadena de conidios en donde el conidio más joven se localiza en la base.
Blastoconidio	Conidio holoblástico que se produce en forma solitaria, sincronógena o en cadenas.
Botriosa	Forma de reproducción en la que se forman sincrónicamente varios conidios en la superficie de la célula conidógena.
Candelabro fávico	Hifas ramificadas e hinchadas en los extremos.
Carga formal	Diferencia entre los electrones de valencia de un átomo aislado y el número de electrones asignados al átomo de una estructura de Lewis.
Carpóforo	Cuerpo fructífero de los basidiomicetos que contiene a los basidios y basidiosporas.
Catenulada	Forma de conidiación en la cual se forman cadenas de conidios.
Cátodo	Electrodo en el que se lleva a cabo la reducción.
Célula	Unidad orgánica fundamental de todo ser vivo, constituida por una masa discontinua de protoplasma limitada por una membrana plasmática.
Célula conidógena	Célula que produce conidios.
Clamidoconidio	Conidio tático, redondo, de pared gruesa y de gran tamaño, producido por modificación de una célula hifal preexistente, considerada de

	reproducción o de resistencia.
Cleistotecio	Ascocarpo cerrado, generalmente con las ascas dispuesta en forma irregular en el interior.
Columnela	Estructura en forma de de domo, estéril, localizada en el Extremo distal del esporangióforo.
Conidio	Propágalo originado por un proceso de reproducción asexual.
Conidióforo	Hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.
Dimorfismo	Propiedad que tienen algunos hongos patógenos de presentar una morfología en vida libre y otra diferente, en la fase parasitaria.
Diodo	Dispositivo semiconductor que consta de una unión <i>p-n</i> a través de la cual puede pasar la corriente en una única dirección. La corriente pasa cuando el material de tipo <i>n</i> se hace negativo y el material de tipo <i>p</i> se hace positivo. Para que pase corriente, se debe aplicar antes un voltaje suficiente para vencer la energía de activación para que se mueva el portador. En el caso de diodos de Si este potencial vale aproximadamente 0,6 V. si se aplica un potencial suficientemente grande, en dirección inversa, pasa corriente en dirección contraria a través del diodo.
Diploie	Células eucariotas que poseen dos copias de cada cromosoma.
Electroforesis capilar	Técnica de separación que se basa en la diferente movilidad o velocidad de migración de partículas cargadas debido a la acción de un campo eléctrico. Cada sustancia cargada migra hacia el cátodo o ánodo a una velocidad que depende de su carga neta y de su interacción de fricción con el medio.
Electrolito	Sustancia que produce iones cuando se disuelve.
Endospora	Espora producida en el interior de una esférula o de un esporangio cerrado.
Enteroblástico	Conidio producido por un proceso blástico en donde sólo participa la pared interna del hongo.
Esclerote	Masa densa de hifas o pseudoparénquima que forma una unidad reproductora
Espectro absorción	de Grafica de absorbancia o transmitancia de luz en función de la longitud de onda, frecuencia o número de onda.
Espora	En micología, estructura producida por un proceso asexual (oospora, zigospore, ascospore, basidiospora).
Esporangio	Estructura generalmente vesiculosa que contiene a las esporangiosporas.
Esporangióforo	Hifa especializada portadora de un esporangio.
Esporangiospora	Espora asexual que se produce dentro de un esporangio.
Esquizólisis	Proceso enzimático de separación conidial conidio – célula conidiógena o conidio – conidio, a través de la fisión de un septo doble.
Estado imperfecto	Condición de los hongos que presentan reproducción asexual (anamorfismo).
Estado perfecto	Condición de los hongos que presentan reproducción sexual (teleomorfismo).
Esterigma	Punto de estrechamiento que origina una basidiospora sobre un basidio.
Eucariota	Célula que posee compartimientos delimitados por membranas.
Fiálide	Estructura conidiógena generalmente en forma de botella en la cual se producen los conidios en forma basípeta; el primer conidio es holoblástico y los siguientes son enteroblásticos.
Fluorescencia	Emisión de radiación electromagnética por un átomo o una molécula, de manera particular en la región visible, después de la absorción de un fotón.

Fluorescencia	
Gemación	Forma de multiplicación de las levaduras en donde la célula hija se desarrolla a partir de un brote (gema o yema) de la célula madre.
Haploide	Células procarióticas que contienen una sola copia de su cromosoma.
Heterotálico	Talo fúngico de un sexo determinado y que requiere de otro talo compatible para llevar a cabo la reproducción de tipo sexual.
Hifa	Elemento estructural fundamental de los hongos; puede ser unicelular como las levaduras o pluricelular tomando la forma de filamento septado o aseptado. El conjunto de hifas forma el micelio.
Hifa en espiral	Hifa torcida en espiras.
Hifa en raqueta	Filamento fúngico formado por una sucesión de células piriformes.
Holoártrica	Reproducción asexual por artroconidios que involucra a todas las capas e la pared celular y donde la fragmentación se lleva a cabo por un proceso de esquizólisis.
Holoblástica	Reproducción asexual por blastoconidios que involucra a toda la pared fúngica a través de un proceso blástico.
Holotática	Tipo de conidiación en donde los conidios se originan a partir de las dos capas de la célula conidiógena a través de un proceso tálico.
Homotálico	Talo fúngico el cual no necesita de otro talo compatible para llevar a cabo la reproducción sexual.
Hongo	Organismo eucarionte, perteneciente al reino Fungi.
Ion	Partícula cargada que se forma cuando un átomo o un grupo de átomos neutros ganan o pierden uno o más electrones.
Macroconidio	Conidio que presenta un tamaño mayor de cinco micras y que generalmente presenta septos.
Mananos	Polímeros de glucosa con puentes glucosídicos α o β .
Meiosis	En eucariontes, un tipo especial de división celular que tiene lugar durante la maduración de las células germinativas; comprende dos divisiones nucleares y celulares sucesivas con sólo una ronda de replicación de DNA. El resultado es la producción de cuatro células haploides no equivalentes, desde el punto de vista genético (gametos) a partir de una célula diploide.
Membrana	Barrera de permeabilidad que rodea células u organelas; consta de una bicapa fosfolipídica, proteínas de membrana asociadas y en el caso de los hongos esteroides como ergosterol, además de glucolípidos.
Micelio	Conjunto de hifas que constituye el cuerpo (talo) de un hongo.
Micelio aéreo	Micelio que se desarrolla sobre el sustrato y en el cual se encuentran las estructuras reproductoras.
Micelio cenocítico	Micelio cuyas hifas no presentan septos (micelio continuo) y en donde los núcleos y demás organelos circulan libremente.
Micelio septado	Micelio en donde las hifas presentan tabicaciones dispuestas en forma más o menos regular; cada tabicación presenta uno o varios poros que permiten la comunicación citoplasmática intercelular.
Micelio vegetativo	Conjunto de hifas que se desarrollan en el interior del sustrato y su función principal es nutricional.
Micosis	Infección producida por hongos patógenos.
Microconidio	Conidio de un tamaño menor de tres micras, generalmente unicelular.
Mitosis	En las células eucariontes, el proceso a través del cual se divide el núcleo para producir dos núcleos hijos, genéticamente equivalentes, con número diploide de cromosomas.
Molécula	Agrupación ordenada y definida de átomos, constituye la menor porción de un compuesto que puede existir en libertad conservando su naturaleza química.
Movilidad	Velocidad última que una molécula alcanza en un campo de 1 V/m. Velocidad = movilidad x campo.
Movilidad aparente	Constante de proporcionalidad entre la velocidad neta de un ion presente

	en una disolución y el campo eléctrico aplicado. Es la suma de la movilidad electroforética y electroosmótica.
Movilidad electroforética	Constante de proporcionalidad entre la velocidad electroforética de un ion presente en la disolución y el campo eléctrico aplicado.
Movilidad electroosmótica	Constante de proporcionalidad entre la velocidad electroosmótica de un fluido en un capilar y el campo eléctrico aplicado.
Pared celular	Matriz extracelular rígida especializada que se encuentra a continuación de la membrana plasmática, con la finalidad de proteger la célula y mantener su forma.
Partícula	Unidad estructural del átomo.
Pectinado	En forma de peine.
Penicilado	En forma de pincel.
Peritecio	Ascocarpo provisto de un ostíolo, generalmente en forma de botella y que contiene ascas con ascosporas.
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno.
Plato teórico	Concepto imaginario en cromatografía que denota un segmento de columna en el que tiene lugar un equilibrio del soluto entre la fase móvil y estacionaria.
Potencial eléctrico	Es la energía (en J) necesaria para llevar un culombio de carga positiva del infinito a ese punto. La diferencia de potencial entre dos puntos es la energía necesaria para transportar 1 C de carga positiva desde el punto positivo al punto negativo.
Punto isoelectrico	pH al cual la molécula posee una carga cero.
Quimiolitotrofo	Organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos.
Quimioorganotrofo	Organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos.
Reproducción asexual	Multiplicación celular por mitosis y que en los hongos da por resultado la producción de conidios.
Reproducción sexual	Involucra la fusión de dos núcleos haploides compatibles y en los hongos da por resultado la producción de esporas.
Rexólisis	Con referencia a la secesión conidial, ruptura circunstancial de la pared célula por debajo del septo basal del conidio. La ruptura puede resultar por tensión mecánica, actividad lítica, enzimática o ambas.
Rizoide	Rama corta y delgada de un talo semejante a una raíz vegetal.
Septo	Elemento formado de la pared de la hifa, limitando una articulación pero permitiendo la circulación citoplasmática entre las células por uno o varios poros.
Seudohifa	Estructura filamentosa resultante del desarrollo de blatoconidios que permanecen unidos por sus extremos, aunque la separación ente cada célula es completa y n existe comunicación citoplasmática.
Sinema	Conjunto de conidióforos dispuestos en forma paralela.
Tálico	Tipo de conidiación en el cal el conidio se forma por transformación de la célula conidiogena, previa formación de un septo.
Tampón	Mezcla e un ácido y su base conjugada que resiste a variaciones de pH cuando se le añaden ácidos o bases.
Tubo germinal	Primordio hifal a partir de un conidio.
Ultravioleta	Posee menor longitud de onda que la radiación luminosa y se pone de manifiesto por su acción química y por la propiedad que tiene de excitar la fluorescencia de numerosos cuerpos. Para producir estas radiaciones se emplean lámparas de cuarzo con vapor de mercurio.
Verticilado	Ramificaciones hifales dispuestas alrededor de un eje y al mismo nivel.
Viscosidad	Resistencia a fluir en un fluido.
Voltaje	Diferencia del potencial eléctrico entre el ánodo y el cátodo de una celda electroquímica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Desai MJ, Armstrong DW 2003. Separation, Identification, and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. *Microbiology and molecular biology reviews* 67 (1): 38–51.
2. Armstrong DW, He L. 2001. Determination of Cell Viability in Single or Mixed Samples Using Capillary Electrophoresis Laser-Induced Fluorescence Microfluidic Systems. *Anal. Chem* 73: 4551-4557.
3. Girod M, Armstrong DW. 2002. Monitoring the migration behavior of living microorganisms in capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection with a charge-coupled device imaging system. *Electrophoresis*, 23: 2048–2056.
4. Shintani T, Yamada K, Torimura M. 2002. Optimization of a rapid and sensitive identification system for *Salmonella enteritidis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *FEMS Microbiology Letters*; 210: 245-249.
5. Armstrong DW, Schneiderheinze JM. 2000. Rapid identification of the bacterial pathogens responsible for urinary tract infections using direct injection CE. *Anal Chem*; 72 (18): 4474-6.
6. Berthod A, Rodriguez M, Armstrong DW. 2002. Evaluation of molecule-microbe interactions whit capillary electrophoresis procedures, utility and restrictions. *Electrophoresis*; 23(6): 847-57.
7. Armstrong DW, Schneiderheinze MJ, Kullman JP, He L. 2001. Rapid CE microbial assays for consumer products that contain active bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 194: 33-37.
8. Jaimes García J. 2005. Búsqueda y caracterización de metabolitos con actividad farmacológica en basidiomicetes silvestres. Tesis de maestría.
9. Palenzuela B, Simonet BM, García RM, Ríos A, and M Valcárcel. 2004. Monitoring of Bacterial Contamination in Food Samples Using Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 76:3012-3017.

10. Schwartz H, Guttman A. Separation of DNA by Capillary Electrophoresis. Beckman Instruments, Inc.
11. 32 Karat™ 5.0 User's Guide for CE Systems 2001. Beckman Coulter, Inc.
12. Brizuela MA, García L, Pérez L y Mansur M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista Iberoamericana de Micología. 1998; 15: 69 – 74.
13. Introduction to Capillary Electrophoresis. Beckman Coulter, Inc.
14. Harris CD. 2001. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª Ed. Correspondiente a la 5ª Ed. original norteamericana. Ed. Reverté S. A. México. p. 747 – 761.
15. Electroforesis Capilar (EC).
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/análisis/EC-2005-2006.pdf
Revisión: Noviembre/ 2006.
16. Brock. Madigan MT, Martinko JM y Parker J. 1999. Biología de los Microorganismos. 8ª Ed. Editorial Prentice Hall Iberia, Madrid. p. 774 – 780.
17. Koneman EW, Stephen DA, William MJ, Schieckenerger PC y Winn WC. 1999. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana. p. 955 – 1037.
18. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F y Castañón Olivares R. 1995. Micología Médica. Procesamientos para el diagnóstico de laboratorio. 1ª Ed. Editorial Trillas. p. 11 – 23.
19. Bonifaz Alejandro. 1998. Micología Médica Básica. 3ª reimpresión. Méndez Editores S.A. de C.V.
20. Arauz Cavallini LF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Ed. Universidad de C. R.
21. <http://www.fepade.edu.sv/cra/institutos/infravenz/docs/ciencias/reinofunji.pdf>
Revisión: 16/Dic/2006.
22. Carrillo Leonor. Microbiología Agrícola. 2003.
23. <http://www.fao.org/docrep/u9145S/u9145S05.htm>. Revisión: 27/Oct/2006.
24. <http://uab-gt.p.uab.es/Apuntesmicro/hongos.pdf>. Revisión: 27/Oct/2006.
25. Solomons Graham TW. 2000. Química Orgánica. Segunda edición. Ed. Limusa. p. 104 – 107, 1236, 1268.
26. Castagnino JM. 2000. Electroforesis Capilar. Revista No.28-29. Asociación de Química y Farmacia, del Uruguay.

27. Chicharro Santamaría Manuel. 2005. Electroforesis Capilar. Técnicas avanzadas de separación. Presentación.
28. Matissek R, Schnepel FM, Steiner G. 1998. Análisis de los alimentos; fundamentos, métodos y aplicaciones: Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
29. Skoog D, Leary J. 1994. Análisis Instrumental. McGraw-Hill. 4a edición.
30. Adrian J, Potus J, Poiffait A, Dauvillier P. 2000. Análisis nutricional de los alimentos. Ed Acribia S.A. Zaragoza.
31. Rubinson KA, Rubinson A. 2001. Análisis instrumental. Editorial Pearson education S.A. 2a Edición.
32. Heiger DN. 1992. High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction, Hewlett- Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E.
33. Havel J, Janos P, Jandik P. 1996. Journal Chromatography A. 745: 127.
34. Martínez RC, Gonzalo ER, Álvarez JD, Méndez JH. 1997. Analytical Chemistry. 69: 4437.
35. Masselter SM, Zemann AJ. 1995. Journal Chromatography A. Determination of inorganic anions in Kraft pulping liquors by capillary electrophoresis. 693: 359.
36. Benito I, Saz JM, Marina ML, Barbero JJ, González MJ, Masa JCD. 1997. Journal Chromatography. A. 778: 77.
37. Aguilar M, Farran A, Serra C, Sepaniak MJ, Whitaker KW. 1997. Journal Chromatography A. 778:2001.
38. Buchberger W, Cousing SM, Haddad PR. 1994. Trends Analytical Chemistry 13: 313.
39. Bergquist J, Gilman SD, Ewing AG, Ekman R. Analysis Chemist. 66 (1994) 3512.
40. Chao YC, Whang CW. 1994. Journal Chromatography A. Capillary electrophoresis of arsenic compounds with indirect fluorescence detection 663 (1994) 229.
41. Fermier AM, Gostkowski ML, Colon LA. 1996. Analytical Chemistry 68:259.
42. Liu X, Sosic Z, Krull SI. 1996. Journal Chromatography A. 735:165-190.
43. Nishi H, Terabe S. 1996. Journal Chromatography A. 735: 3-27.

44. Schneiderheinze JM, Armstrong DW, Schulte G, and Westenberg DJ 2000. High efficiency separation of microbial aggregates using capillary electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett.*; 189(1): 39-44.
45. Shen Y, Berger SJ, Smith RD. 2000. Capillary isoelectric focusing of yeast cells. *Anal Chem.* 72(19): 4603-7.
46. Armstrong DW, Girod M, He L, Rodríguez MA, Zheng J, Yeung ES. 2002. Mechanistic aspects in the generation of apparent ultrahigh efficiencies for colloidal (microbial) electrokinetic separations. *Anal Chem*; 74 (21): 5523-30.
47. Shintani T, Yamada K, Torimura M. 2002. Optimization of a rapid and sensitive identification system for *Salmonella enteritidis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *FEMS Microbiology Letters*; 210: 245-249.
48. Okun VM, Ronacher B, Blaas D, Kenndler E. 1999. Analysis of common cold virus (human rhinovirus serotype 2) by capillary electrophoresis: the problem of peak identification. *Anal Chem.*; 71(10): 2028-32.
49. Okun VM, Ronacher B, Kenndler E. 1999. Separation and biospecific identification of subviral particle of human rhinovirus serotype 2 by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*; 71(20): 4480-5.
50. Kelesar JM and Allen PG. 1998. Advances in the quantification of HIV-1 viral load. *The Newsletter for Capillary Electrophoresis.* 2(1).
51. Altria KD, Chen AB and Clohs L. 2001. Capillary Electrophoresis as a Routine Analytical Tool in Pharmaceutical Analysis. An Advanstar Publication. U.S.A. 19(9).
52. Aludson JC, Murray JM and Golin M. 1998. Advancements in forensic toxicology. *The News letter for Capillary Electrophoresis.* 2(4).
53. Chapman J and Hobbs J. 1999 Putting Capillary Electrophoresis to Work. Reprinted form *LC.GC.* 17(3): 86 - 99.
54. Fox MA, Whitesell JK. 2000. *Química Orgánica. Segunda edición.* Ed. Pearson Educación. p. 17 – 15, 710.
55. Mathews CK, Van Holde KE. 2000. *Bioquímica. Segunda edición.* Ed. McGraw-Hill Interamericana. p. 14 – 20.

56. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D y Darnell J. 2002. Biología Celular y Molecular. Cuarta edición. Ed. Médica Panamericana. G1 – G17.
57. Chang R. 1999. Química. Sexta edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. p. 761 – 765.
58. Enciclopedia Misión 10. 2004. Ed. Alba Americana de Ediciones Ltda.