



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

Facultad de Químico Farmacobiología

TESIS:

**INFLUENCIA DE SURFACTANTES EN LA MOVILIDAD
ELECTROFORETICA DE CONIDIAS DE TRICHODERMA
SPP.**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Química Farmacobióloga

PRESENTA:

Lilia Yunuen Salazar Alcantar

DIRECTORA DE TESIS:

Doctora en Ciencias de la salud Virginia A. Robinson Fuentes

Morelia, Michoacán, Junio del 2015.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS.....	7
ABSTRACT	8
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 Electroforesis.....	14
2.2 Tipos de electroforesis.	14
2.2.3 Electroforesis capilar.	14
2.2.4 Electroforesis capilar de zona.	17
a. Configuración del equipo de electroforesis capilar.	18
b. Tratamiento de capilares utilizados:	19
c. Efecto del pH en el FEO.	19
d. Buffers utilizados en ECZ.	21
2.2.5 Cromatografía capilar micelar electrocinética.....	22
a Aplicaciones de MECC.	24
2.3 Inyección de muestras.....	24
2.3.1 Inyección electrocinética.....	24
2.3.2 INYECCIÓN POR PRESIÓN.	25
2.3.2 Características del buffer de corrimiento.	25
2.4 Factores que causan movilidad en los analitos.	26
2.4.1 Movilidad electroforética aparente.....	27
2.4.2 Detección de analitos.	28
a. Detección indirecta.	28
b. Detección directa por arreglo de diodos (PDA)	29
2.5 Hongos.	29
2.5.1 Estructura de los hongos.....	30
a. Pared celular.....	31
b. Nutrición.	32
c. Reproducción.....	33
2.6 <i>Trichoderma atroviride</i>	33
2.6.1 Nutrición de <i>Trichoderma</i>	35

2.6.2 Ciclo de vida de <i>Trichoderma</i>	35
2.6.3 Producción de antibióticos.....	35
2.6.4 Control biológico.....	36
2.6.5 Usos y aplicaciones de <i>Trichoderma</i>	36
2.7 Identificación de hongos.....	36
2.7.1 Identificación de <i>Trichoderma</i>	37
2.8 Agentes surfactantes.....	37
2.8.1. Surfactantes catiónicos.....	37
CTAB.....	38
2.8.2. Surfactantes aniónicos.....	39
HSS.....	39
2.8.3. Surfactantes no iónicos.....	40
TRITON X-100.....	40
Antecedentes de identificación de microorganismos y células fúngicas por Electroforesis capilar.....	41
Proyectos de identificación de células fúngicas por EC en el Laboratorio de Desarrollo Analítico.....	42
III. JUSTIFICACIÓN.....	44
IV. HIPOTESIS.....	46
V. OBJETIVOS.....	46
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	47
6.1 Medio de cultivo: Medio Mínimo Vogel.....	47
6.2 Cepas utilizadas.....	47
6.3 Cultivo.....	47
6.4 Tratamiento de las cepas.....	47
6.5 Preparación de la muestra.....	47
6.6 Condiciones Electroforéticas.....	48
6.7 Buffers utilizados en corrimientos.....	48
6.8 Mezclas realizadas para corrimientos.....	49
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1 Cepas utilizadas.....	50
7.2 Conidias en presencia de surfactantes.....	50
7.3 Electroferogramas de las conidias en presencia de surfactantes.....	52
7.4 Análisis de conidias usando mezclas de surfactantes.....	58

7.5	Análisis de la movilidad electroforética de las conidias.	58
VIII.	RESUMEN DE RESULTADOS	60
IX.	CONCLUSIÓN.....	60
X.	PERSPECTIVAS	61
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Descripción	Pág.
1	Detección de moléculas con distinta carga.	16
2	Distribución de las cargas en la interfaz del capilar.	19
3	Formación de la doble capa eléctrica.	19
4	Interacción entre micelas y solutos neutros.	22
5	Separación utilizando MECC.	23
6	Esquema de inyección electrocinética.	24
7	Esquema de inyección por vacío.	24
8	Movilidad electroforética aparente.	27
9	Electroferograma obtenido utilizando la detección indirecta, mezclando seis aniones.	28
10	Hifas cenocíticas e hifas septadas.	30
11	Componente más abundante de la pared celular de los hongos β -1,3-glucano.	31
12	Características macro y microscópicas de <i>Trichoderma</i> spp.	34
13	Estructura química del Bromuro de hexadeciltrimetil amonio.	38
14	Estructura química del Heptano sulfonato de sodio.	39
15	Estructura química del Triton X-100.	40
16	Cepas de <i>Trichoderma</i> utilizadas.	49
17	Conidias de las cepas de <i>Trichoderma</i> en suspensión con H ₂ O.	49
18	Conidias de CMU221 en presencia de HSS 5mM(a), 10mM (b), 15mM(c), 20mM (d), 25mM (e).	50
19	Conidias de CMU221 en presencia del surfactante CTAB 5mM (f), 10mM (g), 15mM (h), 20mM (i).	50
20	Conidias de CMU221 en presencia de Triton X-100 a concentración de 0.1% (j), 0.5% (k), 0.9% (l).	51
21	Observación del comportamiento de las conidias en presencia de surfactantes catiónico (CTAB) y no iónico (Triton X-100), en microelectroforesis capilar adaptada a microscopio óptico.	52
22	Electroferograma de la cepa CMU-8 usando buffer de fosfatos 10 mM pH 8 con 10 mM CTAB, polaridad reversa	53
23	Electroferogramas de la cepa CMU-218 usando 10 mM de HSS en buffer de fosfatos 10mM pH 8, en polaridad normal (A) y reversa (B).	54
24	Electroferograma de la cepa CMU-8 con 0.9 % de Triton X-100 en buffer de fosfatos 10mM pH 8, en polaridad normal.	54
25	Comportamiento de las conidias de cepas de <i>Trichoderma</i> CMU1, CMU8 y CMU221 conforme aumenta la concentración del surfactante catiónico CTAB.	58
26	Comportamiento de las conidias de cepas de <i>Trichoderma</i> CMU1 y CMU8 conforme aumenta la concentración del surfactante no iónico Triton X100.	58

INDICE DE TABLAS

Núm.	Descripción	Página.
1	Buffers para ECZ.	20
2	Aditivos para buffers utilizados en ECZ.	21
3	Buffer utilizados en EC.	25
4	Condiciones electroforéticas.	47
5	Surfactantes utilizados en corrimientos electroforéticos.	47
6	Mezcla de surfactantes utilizados en corrimientos	48
7	Señales electroforéticas obtenidas con las cuatro cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	53.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal.
CMC	Concentración Micelar Crítica.
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio.
d.i.	Diámetro interno.
EC	Electroforesis capilar.
ECZ	Electroforesis capilar de zona.
FEO	Flujo electroosmótico.
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> .
HSS	Heptano Sulfonato de Sodio.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
L_d	Longitud al detector.
L_t	Longitud total del capilar.
MECC	Cromatografía electrocinética micelar.
μ_{ep}	Movilidad electroforética.
μm	Micrómetro
mM	Milimolar
PCR	Reacción en cadena de polimerasa.
Ph	Potencial de Hidrógenos.
SDS	Sulfonato de Sodio.
UV	Ultravioleta.

ABSTRACT

Introduction: Over the last few years, there has been an increase in fungal species potentially pathogenic to humans that mainly affect immunocompromised patients. Therefore, they can easily suffer from mycoses. There has also been an increase of resistant strains of microorganisms due to the indiscriminate use of antibiotics and antifungals. Thus, it is essential to perform an accurate identification of the pathogenic microorganism causing a disease in order to provide patients with the proper treatment. Capillary Electrophoresis (CE) is a technique where analytes migrate in a narrow capillary tube driven by an electric field. Microorganisms can be studied by CE because they have surface charges and these charges can be altered by the media in which they are suspended. In this way, it is possible to understand how fungal cells such as conidia can repel each other, aggregate between themselves and to other surfaces. **Objective:** To determine the influence of ionic and non-ionic surfactants on the aggregation and electrophoretic mobility of *Trichoderma spp* conidia. **Materials and methods:** Capillary tube: 100 μm i.d., 50 cm L_t ; $I = 201 \text{ nm}$ and $\pm 17 \text{ KV}$. Four wild strains of *Trichoderma* were studied: *Hypocrea lixii*, *T. gamsii*, *H. rufa* and *T. tormentosum*. All strains were grown in Vogel agar, incubated at 28°C for 90 h, they were then subjected to mechanical damage to induce conidiation and left for 48 h more. Conidia were harvested using sterile distilled water. They were analysed in a commercial CE system (P/AC Glycoprotein system, Beckman Coulter) using as background electrolyte, phosphate buffer 10 mM, pH 6.8 that was added with different concentrations of surfactants: Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), sodium heptan sulphonate (HSS) and Triton TX-100. Positive and negative voltages were also assayed. The effect of surfactants on aggregation and mobility of conidia of *Trichoderma* was also observed by optic microscopy. **Results:** Using CTAB, conidia aggregate between themselves and to the capillary wall. Electrophoretic signals were obtained when normal polarity was used and only *T. gamsii* produced signals in reverse polarity. Conidia do not aggregate between themselves or to the capillary wall using Triton X-100. All strains produce electrophoretic signals in all concentrations using normal polarity. On the other hand, conidia group between themselves and to the capillary wall when HSS was used, none of the strains produced any electrophoretic signal. Mixed surfactants were also used and only the mixture CTAB-Triton X-100 produced good signals. **Conclusion:** Surfactants can affect aggregation and mobility of all four wild strains of *Trichoderma*.

Keywords: *Trichoderma*, conidia, electrophoretic mobility, surfactants, capillary electrophoresis

RESUMEN

Introducción: En los últimos años el número de especies fúngicas potencialmente patógenas para el hombre ha aumentado considerablemente siendo los pacientes inmunocomprometidos los que están más expuestos a sufrir algún tipo de micosis. Por otro lado, el uso indiscriminado de antibióticos o antimicóticos, ha promovido la resistencia a estos de gran cantidad de cepas microbianas. Por lo que su correcta identificación es de especial importancia para el adecuado tratamiento del paciente. La electroforesis capilar (EC) es una técnica en la que los analitos se mueven a través de un tubo capilar como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico. Los microorganismos pueden analizarse por EC debido a que su superficie contiene cargas, que pueden alterarse con sustancias que se encuentran en el medio en el que estén suspendidas. Entonces, usando ésta propiedad es posible estudiar la manera en que células fúngicas, tales como las conidias, se pueden agregar entre sí mismas, a otras superficies o repelerse. **Objetivo:** Determinar la influencia de surfactantes iónicos y no iónicos en el agrupamiento y movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma* spp. **Materiales y métodos:** Capilar de sílice fundida de L_t de 50cm y 100 μm de d.i.; λ de 201nm y un voltaje de $\pm 17\text{Kv}$; se utilizaron las conidias de las cepas silvestres *Hypocrea lixii*, *T. gamsii*, *H. rufa* y *T. tomentosum*; las cepas fueron sembradas en agar Vogel e incubadas a 28° C por 90h, posteriormente sometidas a daño mecánico para inducir la conidiación a las 48h. Se colectaron las conidias con H_2O destilada estéril y se analizaron en un equipo comercial de EC (P/ACE Glycoprotein system, Beckman Coulter) con buffer de fosfatos 10 mM pH 6.8 con los surfactantes bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), heptán sulfonato de sodio (HSS) y Triton X-100 en diferentes concentraciones; también se ensayaron voltajes positivos y negativos y mezclas de surfactantes. Se observó el comportamiento de las conidias en presencia de los surfactantes, con ayuda del microscopio óptico. **Resultados:** Con CTAB las conidias se agrupan entre si y se adhieren a la pared interna del capilar; en polaridad normal se obtienen señales electroforéticas para todas las cepas en todas las concentraciones. Sólo se obtuvo señal para *T. gamsii* en polaridad inversa. Con Triton X-100 no hay adhesión de las conidias a la pared del capilar ni entre ellas; las señales electroforéticas están presentes en todas las concentraciones y en las cuatro cepas en polaridad normal. Con el HSS las conidias se agrupan entre sí y se adhieren a la pared interna del capilar pero no muestra señales electroforéticas de alguna de las cuatro cepas a ninguna concentración. Al realizar mezclas de surfactantes únicamente se mejoraron las señales electroforéticas con la solución CTAB + Triton X-100. **Conclusión:** Los surfactantes ejercieron un efecto en la movilidad y en la agrupación de las conidias de las cepas silvestres de *T. atroviride*.

Palabras clave: *Trichoderma*, conidias, movilidad electroforética, surfactantes, electroforesis capilar.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la taxonomía de los hongos causantes de infecciones en el hombre ha cambiado de manera significativa, especialmente debido al rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN que ha permitido avanzar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre estos microorganismos. El número de especies fúngicas potencialmente patógenas ha sufrido un espectacular aumento, ello ha ocurrido en diferentes géneros de mucorales y especialmente de ascomicetos tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix* y *Scedosporium*, entre otros. Es frecuente que dichas especies difieran en virulencia y en su respuesta a los antifúngicos por lo que su correcta identificación es de especial importancia para el adecuado tratamiento del paciente [James y col., 2006].

Los hongos son organismos eucarióticos caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen el micelio. Dichas estructuras representan la forma invasiva de los hongos patógenos y son las que se observan en las preparaciones histológicas del tejido infectado [Hibbett, 2007].

El aumento de pacientes inmunodeprimidos a causa de enfermedades, incluso SIDA o el trasplante de órganos, ha ocasionado que estén expuestos a algún tipo de micosis, y el uso indiscriminado de antibióticos o antimicóticos ha promovido la resistencia de gran cantidad de cepas microbianas a estos compuestos. Debido a esto se requiere que la identificación de los microorganismos sea más rápida, más sensible y más selectiva [Hoyos-Carbajal, 2011].

Para llevar a cabo el análisis e identificación de los hongos microscópicos se utiliza principalmente el cultivo y la observación de las características macro y microscópicas, aunque es el método más utilizado tiene una desventaja en la identificación basada en las características propias del hongo ya que está sujeta a las condiciones a las que está expuesta [Hoyos-Carbajal, 2011].

En conjunto con el método de cultivo son utilizadas las pruebas bioquímicas basadas en la fermentación y asimilación de alguna fuente de carbono [García Aguilar, 2009].

Otras técnicas de identificación utilizadas son sistemas automatizados, métodos génicos, secuenciación de genes ribosomales, análisis de perfiles de restricción de ADNr, PCR y FISH [García Aguilar, 2009].

Un hongo microscópico de amplia distribución es *Trichoderma*; típicamente se encuentra en suelo y madera en descomposición, es un hongo muy estudiado ya que tiene una gran capacidad de metabolismo produciendo enzimas industriales como pigmentos industriales y quinona; más de 100 metabolitos con actividad antibiótica, incluyendo policétidos, polipéptidos, pironas, terpenos y metabolitos derivados de aminoácidos. Entre los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* se encuentra el ácido-3-indolacetico (AIA) una hormona inductora del crecimiento, que induce el aumento de la altura de las plantas [Ortuño y Col, 2013; Klein y col, 2002]. El género *Trichoderma* contiene especies con importancia biotecnológica, algunas de ellas utilizadas como biocontrol contra enfermedades presentes en plantas, otras para la producción de enzimas y antibióticos, en la bioremediación de ambientes contaminados, y como fuente de genes para la obtención de plantas transgénicas. Sin embargo se han identificado especies de *Trichoderma* como *T. pleutorum*, *T. aggresivum* y *T. pleuroticola*, que atacan plantaciones comerciales de champiñones, y otras que tienen la habilidad de crecer a 40° C, tal es el caso de *T. longibrachiatum*, la cual es considerada un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos [Harman, 2000; Harman y col., 2004].

Existen bases de datos muy completas con información de *Trichoderma*, que incluye secuencias de nucleótidos, lista de enzimas y dendogramas, todos ellos obtenidos mediante diferentes técnicas de estudio destacando las pruebas morfológicas y moleculares [Taxonomy ISoTaG, 2013].

Se ha obtenido una gran cantidad de información con la ayuda de técnicas instrumentales, como la HPLC. En los últimos años, se ha empleado la Electroforesis Capilar (EC). Con esta técnica se pueden conocer las cargas

eléctricas de superficie, en este caso de hongos microscópicos; según el valor de la carga neta de superficie, las células pueden adherirse a células de otros organismos o superficies, o también ocasionar repulsión hacia células o superficies [-Armstrong y Desái, 2003].

Armstrong y colaboradores [2000] lograron observar la migración a través del capilar en suspensiones de *S. cerevisiae*; Moon y Kim [2003] estudiaron dos cepas de *S. cerevisiae* empleadas como probióticos con la ayuda de ECZ y al igual que Bao y col. [2008], utilizó esta técnica para analizar muestras con células de *S. cerevisiae*. Horka y col. [2009] lograron la separación de una mezcla de conidias de diferentes especies fúngicas utilizando ECZ; en el mismo año Petr y colaboradores separaron células de *S. cerevisiae* y *Escherichia coli*. Horka y col. [2011] separaron mediante ECZ una mezcla de conidias de 4 especies de *Monilinia*. En el laboratorio de Desarrollo Analítico [2007] se realizó el primer análisis utilizando la EC para el análisis de cepas de *Botryosphaerea rhodina* y *Trichoderma sp.* García Aguilar [2009] buscó controlar la longitud de las células miceliales utilizando germinulas de *Trichoderma sp.* y *Neurospora crassa*. Cázares [2009] logró caracterizar tanto conidias de *T. atroviride* como esporas de *Amylomyces rouxii* y *Agaricus bisporus*. Ávila en el [2011] estudió el comportamiento electroforético de macroconidias de *Alternaria* y *Pestalotiopsis*. Los últimos análisis se realizaron en el 2013; Castillo y Robinson evaluaron el efecto de surfactantes catiónicos en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*; mientras que, en el mismo año, Farías y Robinson evaluaron el efecto de dos surfactantes un aniónico y uno no iónico en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*, estos últimos análisis se realizaron utilizando la técnica de microelectroforesis capilar adaptada a un microscopio óptico para poder observar el comportamiento [Armstrong y Schneiderheinze, 2000; Moon y Kim, 2003; Bao y col, 2008; Horka y col., 2009; Petr y col., 2009; Horka y col., 2012; Cázares, 2007; García Aguilar, 2009; Cázares, 2009; Ávila, 2011].

En este proyecto se quiere complementar la información obtenida en los últimos análisis realizados con la técnica de microelectroforesis capilar, utilizando la técnica de EC que nos permite conocer más a detalle las propiedades fisicoquímicas de la pared celular fúngica, particularmente sus propiedades de

adherencia y repulsión que tienen entre las mismas células y las superficies; con esta técnica se obtendrán resultados en periodos de tiempo cortos, de manera económica y con una buena sensibilidad. Las cepas de *Trichoderma* son útiles para realizar este análisis ya que tienen un rápido crecimiento, presentan abundante conidiación y la pared celular de estos hongos es muy parecida a la que presentan la mayoría de los Ascomicetos filamentosos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Electroforesis

Esta técnica utiliza la metodología clásica que se usó durante muchos años y se sigue usando hasta la fecha; se encarga de la separación de moléculas complejas de elevado peso molecular. Estas separaciones se llevan a cabo en una capa delgada de gel semisólido y poroso que contiene un tampón en el interior de sus poros. Al igual que las placas de la cromatografía en capa fina, está es capaz de separar varias muestras simultáneamente, y cuenta con dimensiones de pocos centímetros de lado. Para realizar la separación las muestras se adicionan a la placa en forma de manchas o bandas, posteriormente se les aplica el potencial de corriente continua en un periodo de tiempo fijo. Al terminar la separación las sustancias separadas son teñidas para poder observarse al igual que se realiza en la cromatografía de capa fina [Skoog, 2001].

2.2 Tipos de electroforesis.

Las separaciones electroforéticas pueden llevarse a cabo en varias modalidades que difieren notablemente, tales como:

- ° Electroforesis convencional.
- ° Electroforesis capilar de zona.
- ° Electroforesis capilar de enfoque isoelectrico.
- ° Electroforesis capilar en gel.
- ° Isotacoforesis.
- ° Electroforesis micelar electrocinética.

2.2.3 Electroforesis capilar.

El término Electroforesis Capilar se refiere a una técnica que tiene como función separar moléculas cargadas utilizando un campo eléctrico aplicado provocando su movimiento a través de un capilar. Ciencias como la química, biología, biotecnología y microbiología han utilizado esta técnica para analizar una amplia variedad de moléculas, con o sin carga [Armstrong, 2003].

En el año 1809 fue citado por primera vez por Reuss el desplazamiento de sustancias por acción de un campo eléctrico, allí describe el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena en un ámbito de agua transparente contenido en un recipiente de vidrio con un lecho de arena fina en el fondo y dos electrodos de una batería. Al aplicarle la corriente se producía un enturbiamiento cerca del polo positivo producido por la migración de partículas de arena movilizadas por su carga eléctrica negativa. Este experimento mostró la polarización del sílice, ya que la arena es dióxido de silicio y al ser fundida permite obtener los capilares utilizados en esta técnica de EC [Castagnino, 1997].

La técnica de electroforesis fue desarrollada en la década de los años treinta por el químico Sueco Arne Tiselius, quien la aplicó en el estudio de proteínas secas. En 1967 Hjerten logró evitar los efectos de la convección, utilizando capilares milimétricos cubiertos en su sección longitudinal. Virtanen y Mikkers en 1979 desarrollaron separaciones en capilares de vidrio y teflón respectivamente con diámetro de 200 μ m. Los precursores en el uso de capilares y la medición de la absorción UV son Konstantinov y Oshukoba, ya que en 1964 esto les permitió obtener los espectros característicos de la separación. Más adelante, ya en 1980 Jorgenson y Lukacs utilizan capilares de 75 μ m de diámetro [Castagnino, 1997].

El lanzamiento de la EC como técnica fue gracias a la separación de péptidos realizada sobre un capilar de sílice fundida, a potenciales elevados, con un campo eléctrico refrigerado por aire [Skoog, 2001; Castagnino, 1997].

A lo largo del tiempo la EC se ha utilizado en las separaciones de aminoácidos, fármacos, vitaminas, carbohidratos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, polinucleótidos y otras numerosas moléculas. [Skoog, 2001].

Las aplicaciones de la Electroforesis capilar han abarcado campos en el área biomédica, logrando separaciones de ADN, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de fármacos, marcadores genéticos tumorales y neuroquímicos, sustancias xenobióticas y de abuso. En el área biofarmacéutica se utiliza para tener un control de calidad de los productos farmacéuticos y biotecnológicos. En el área de alimentos es aplicada al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono y contaminantes. En el área de control

ambiental, la EC ayuda a identificar contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos [Castagnino, 2000].

Esta técnica ha tenido diversas aplicaciones, así como ha hecho posible la separación, identificación y cuantificación de microorganismos celulares. Sin embargo los estudios electroforéticos de estas células microbianas utilizando la EC son escasos y lo son aún más aquellos en los que se utilizan células fúngicas, a pesar de que los hongos son de gran importancia clínica y biológica para el hombre [Armstrong, 2008].

Es de suma importancia poder realizar estudios de células fúngicas utilizando la EC, que posteriormente podrá permitir el desarrollo de métodos de análisis de células microbianas mucho más rápidos y que podrán servir de base para establecer pruebas con valor diagnóstico. A pesar de esto en la actualidad, la Electroforesis capilar es una técnica poco utilizada en el estudio de hongos filamentosos [Horka, 2009].

La EC ha sido y continúa siendo de gran utilidad en la actualidad. A diferencia de la Electroforesis convencional, esta técnica realiza las separaciones con volúmenes de muestra extremadamente pequeñas (0.1-10nL) con una elevada resolución y con mayor rapidez. La diferencia que tiene esta modalidad es que las especies separadas eluyen de los extremos del capilar utilizado y se emplean detectores como los empleados en HPLC para obtener electroferogramas, y permite descartar las incómodas técnicas de coloración de la electroforesis convencional [Skoog, 2001].

Se utilizan capilares con 50-75cm de longitud o menor, con d.i. de 50-100µm que le proporcionan la capacidad de alta resolución, estos están fabricados de sílice fundida. Los grupos silanol que contiene la superficie interna del capilar forman una corriente electroosmótica que provoca una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución. La ventaja de esta técnica es que el capilar utilizado se encuentra cubierto por una capa de poliamida para brindarle mayor rigidez y resistencia,

cuenta con una ventana que permite el paso de la luz UV a través de ella, por lo que se obtiene una visualización en línea [Schwartz, 1994].

Gracias a esta técnica es posible separar cationes, aniones y sustancias no cargadas en forma simultánea (Fig. 1) [Castagnino, 2000; Skoog, 2001].

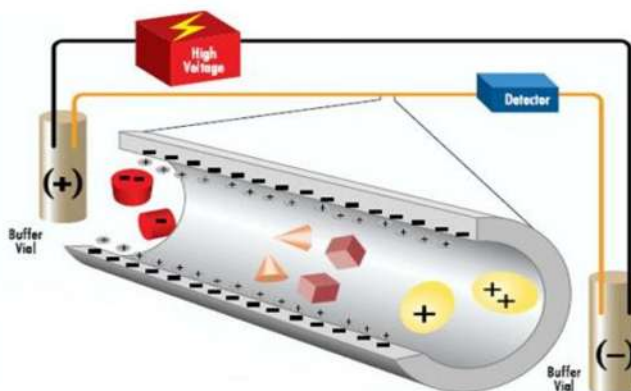


Figura 1. Detección de moléculas con distinta carga [Cázares, 2009].

En el siguiente trabajo nos enfocamos principalmente en dos técnicas que fueron las que utilizamos en la presente investigación, estas son: Electroforesis capilar de zona (ECZ) y Electroforesis micelar electrocinética (MECC).

2.2.4 Electroforesis capilar de zona.

La ECZ también es conocida como electroforesis capilar en solución libre. Su metodología para realizar separaciones se basa en las diferencias que existen entre la relación masa/carga. Al inyectar la muestra al capilar y aplicar el voltaje se provoca que los componentes de dicha muestra se separen en zonas discretas; para lograr este efecto es fundamental que la solución buffer sea homogénea y el campo eléctrico se mantenga constante a lo largo de la longitud del capilar [Beckman, 2000].

La movilidad electroforética, que explica la migración de los analitos, (μ_{ep}) en esta metodología se puede conocer de la teoría Debye-Huckel-Henry que dice:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta R}$$

Donde:

q = Carga neta.

R = radio de Stokes

η = viscosidad

La carga neta va a depender del pH de la solución buffer que se esté utilizando; por ejemplo, en el caso del glutamato que es una especie cargada negativamente en un intervalo de pH de 4 a 10 se va a producir una movilidad negativa migrando hacia el electrodo positivo [Beckman, 2000].

Con esta técnica de ECZ se pueden lograr separaciones de moléculas grandes o pequeñas con gran facilidad, sin importar que la diferencia entre su relación masa/carga sea muy pequeña.

Esta técnica tiene aplicaciones en la separación de proteínas y péptidos, cationes, aniones inorgánicos y moléculas pequeñas de uso farmacéutico siempre y cuando estén cargadas [Skoog y col., 2001; Castillo y col, 2005].

a. Configuración del equipo de electroforesis capilar.

La configuración de este equipo es relativamente simple lo único que requiere es un capilar de sílice fundido de d.i. de 50 a 100 μ m que cuente con una ventana óptica, una fuente de poder que proporcione voltaje controlado, dos recipientes para colocar la solución amortiguadora, dos electrodos y un detector apropiado que puede ser de luz ultravioleta (UV) o de arreglo de diodos (DAD), por ejemplo.

El capilar contiene el buffer de corrimiento y es inyectado con la muestra para después colocar ambos extremos del capilar en los recipientes que contienen la solución amortiguadora. Con la ayuda de dos electrodos se le aplica un voltaje para llevar a cabo la separación. Una vez separados los analitos pasan por la ventana del capilar alineada con el detector. Gracias al uso de altos voltajes es favorecida la separación de los analitos [Schwartz y Guttman, 1994].

Las separaciones de iones utilizando la técnica de EC dependen de las velocidades de migración que obtienen los analitos al aplicarles un campo eléctrico y esto en función de la relación masa/carga. Debido a esto, esta técnica de EC es aplicable con analitos de cualquier naturaleza, utilizando una solución buffer que los contenga dentro del capilar [Skoog y col, 2001].

b. Tratamiento de capilares utilizados:

Los capilares utilizados son de sílice fundida esto debido a la transparencia al UV de este material. Antes de utilizar un capilar nuevo o para limpiar uno muy sucio, se debe tratar con NaOH 0.1M por 10 minutos, 5 minutos con H₂O destilada y 10 minutos con el buffer de corrida, este procedimiento se realiza para asegurar que la pared del capilar se encuentre cargada completa y uniformemente. Cuando se trabaja con buffers que tengan un pH entre 2-6, se recomienda realizar regeneración con NaOH entre cada corrida. [Beckman, 2000]

c. Efecto del pH en el FEO.

El flujo electroosmótico (FEO) es el movimiento de todos los solutos presentes en la muestra hacia el electrodo negativo, se presenta como consecuencia de aplicar un campo eléctrico entre la solución y la pared del capilar. Lo que sucede es que la pared interna del capilar se presenta como la fase sólida, cuenta con grupos silanol (Si-OH) que al ser sometida a condiciones acuosas presenta un exceso de cargas negativas (Fig.2). Este proceso se lleva a cabo en el interior del capilar gracias a la aplicación del campo eléctrico, formando una doble capa eléctrica inmóvil adsorbida de cationes para neutralizar parcialmente la carga negativa. Con el FEO es posible analizar aniones, cationes y especies neutras en un solo análisis. Sin la presencia del FEO la migración se realizaría de solo aniones, o solo cationes sin pasar todos los analitos por el detector. Con el FEO todas las especies pasan por el detector con el orden de migración de cationes, aniones y especies neutras [Cázares, 2009; Hayes y col, 1993].

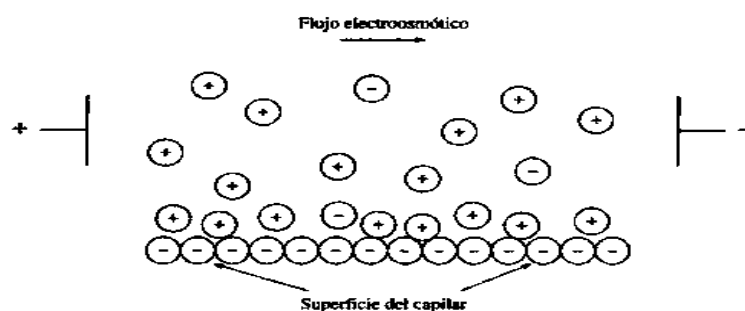


Figura 2 Distribución de las cargas en la interfaz del capilar y el flujo electroosmótico resultante [Skoog y col, 2001]

El buffer de corrimiento se presenta como la fase móvil que se encarga de neutralizar el resto de la carga negativa por un exceso de cationes como se observa en la figura 3. Estos cationes son los encargados de mantener el balance de cargas, a este proceso se le conoce como potencial Z [Cázares, 2007].

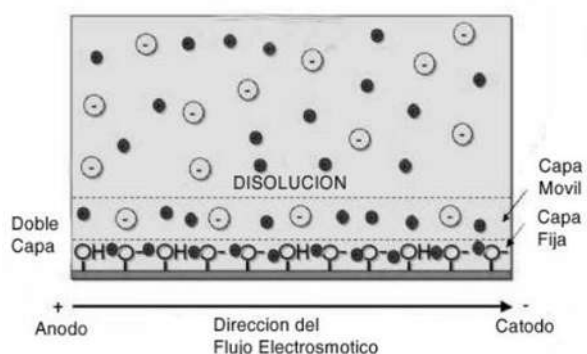


Figura 3. Formación de la doble capa eléctrica [Cázares, 2007]

Entre más elevado sea el valor de pH más alto será el flujo electroosmótico. Por lo tanto a valores de pH elevados los aniones migraran hacia el cátodo debido a que el FEO es mayor que la migración electroforética, cuando el pH sea menor el FEO se encontrará reducido y permitirá la identificación de aniones y cationes en diferentes corridas. Para la identificación de aniones, el ánodo deberá ser colocado más lejos de la ventana del detector, en el caso de los cationes, el cátodo es el que debe encontrarse alejado de la ventana del detector. El pH tiene efecto sobre los analitos a separar ya que de éste dependen la carga y la selectividad de la separación. Se tiene que elegir un pH que se encuentre dos unidades arriba o abajo del pKa del analito para que se pueda asegurar una

completa ionización. Si se trabaja con un pH muy alcalino el FEO puede ser demasiado rápido y no permitirá la separación completa de los analitos [Castagnino, 2000].

d. Buffers utilizados en ECZ.

En la ECZ se pueden utilizar una gran variedad de buffers que tengan un pH con una o dos unidades alrededor de su pKa para obtener una mejor selectividad en la separación. Por ejemplo se utilizan buffer de fosfatos a un pH de 2.5 a 7, de boratos con pH de 9. También son utilizados buffer zwiterionicos (Tabla 1) para la separación de proteínas y péptidos, tales como tricina, CAPS, MES y Tris. [Schwartz y Guttman, 1994].

Tabla 1. Buffer para ECZ

Buffer	Intervalo de Ph
Fosfato	1.14 – 3.14
Acetato	3.76 – 5.76
Fosfato	6.20 – 8.20
Borato	8.14 – 10.14
Buffer zwiterionicos	
MES	5.15 – 7.15
PIPES	5.80 – 7.80
HEPES	6.55 – 8.55
Tricina	7.15 – 9.15
Tris	7.30 – 9.30

[Robinson, 2006]

Además de las soluciones buffer, existen varios aditivos (Tabla 2) que ayudan a cambiar la selectividad de la separación. Los aditivos pueden alterar las movilidades electroforéticas de los analitos permitiendo diferenciarlos aunque originalmente hayan tenido una movilidad electroforética idéntica [Castagnino, 2000].

Tabla 2. Aditivos para buffer utilizados en ECZ.

Aditivo.	Función del aditivo.
Sales inorgánicas	Cambios en la conformación de proteínas.
Solventes orgánicos	Disolver, modificar el FEO.
Urea	Solubilizar proteínas y desnaturalizar oligonucleótidos.
Ácidos sinfónicos, reactivos formadores de pares de iones	Agentes de interacción hidrofóbica.
Surfactantes catiónicos	Inversión de carga en la pared del capilar.
Derivados de celulosa	Reducción del FEO. Proveen un medio de tamizaje.
Aminas	Cubren grupos silanoles libres.

[Robinson, 2006]

2.2.5 Cromatografía capilar micelar electrocinética.

Utilizando la ECZ no pueden ser separados los solutos neutros debido a que no presentan movilidad electroforética, se puede lograr la separación formando un sistema micelar en el Buffer de corrimiento (BGE) que interactúe con las micelas para que gracias a este procedimiento dichos solutos puedan ser separados.[Skoog y col,2001]

Esta técnica conocida como MECC se puede considerar un híbrido entre la electroforesis y la cromatografía. Fue presentada por primera vez por Terabe en 1984, y permite la separación de sustancias neutras o cargadas. Esta técnica tiene como principio emplear soluciones homogéneas que contengan tensoactivos en el buffer de corrida provocando la formación de micelas. Las micelas son agregados de moléculas individuales tensoactivas. Son moléculas largas de 10 a 50 unidades de forma esférica y se caracterizan por tener una cola larga hidrófoba orientadas hacia el centro y una cabeza hidrófila hacia afuera. Existe una concentración conocida como concentración micelar crítica (CMC) que al sobrepasarse los agregados se encuentran completamente formados. Con la presencia del agregado se provocan cambios físicos tales como la tensión superficial, la viscosidad y la formación de luz que se hace presente en la formación de las micelas [Skoog y col, 2001; Robinson, 2006].

Las micelas formadas por los surfactantes constituyen una pseudofase en donde es particionada la molécula del analito debido a las interacciones hidrofóbicas

presentes en el interior de la micela. Con la ayuda del FEO estas micelas son transportadas en dirección del detector.

En esta técnica el surfactante comúnmente utilizado es el dodecil sulfato de sodio (SDS), con un PM de 288g/mol y una CMC de 8mM. En un corrimiento normal utilizando como tensoactivo aniónico el SDS, las micelas migran hacia el ánodo, es decir en contra del FEO. Estos tensoactivos y las micelas cargadas pueden migrar a favor o en contra del FEO [Skoog y col, 2001].

Mientras se está presentando la migración de las micelas, éstas pueden presentar interacciones hidrofóbicas y electrostáticas con los solutos como se observa en la figura 4.

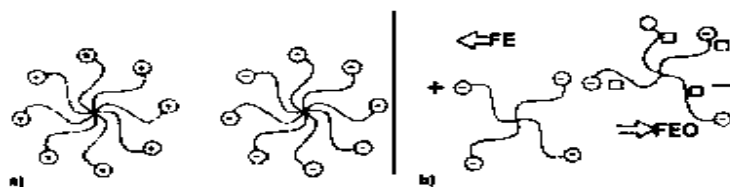


Figura 4 Interacción entre micelas y solutos neutros [Castagnino, 2000].

Para que se lleve a cabo la interacción entre el soluto y la micela el compuesto debe tener un carácter hidrofóbico, ya que entre más hidrofóbico interactúa con más fuerza y es mayormente retenido. Entre más interacción exista mayor será también el tiempo de migración debido a que las micelas son atraídas en contra del FEO (Fig. 5). Si la interacción con las micelas es nula el soluto es transportado en el sentido del FEO [Castagnino, 2000].

La selectividad en estas separaciones puede ser manipulada variando la naturaleza física de la micela, como tamaño y carga, gracias al uso de dichos tensoactivos que pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos. Dependiendo de la carga que presenten estos tensoactivos el FEO puede aumentar o invertirse.

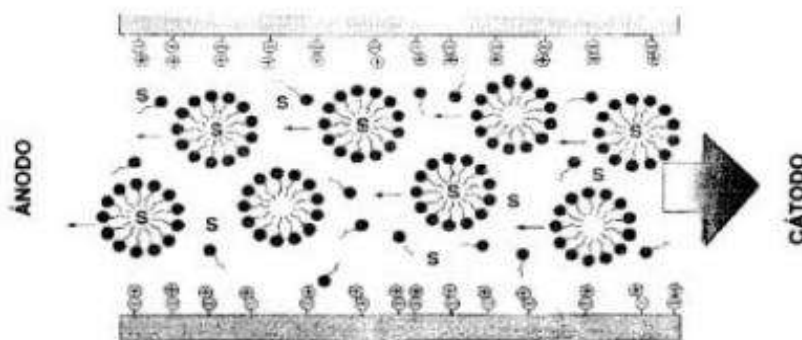


Figura 5. Separación utilizando MECC [Castagnino, 2000].

a Aplicaciones de MECC.

Las recientes aplicaciones de MECC incluyen el análisis de plaguicidas sin carga, aminoácidos esenciales y de cadena ramificada, hidrocarburos y contenidos de alcohol de la hierba de mejorana. Esta técnica no es adecuada para el análisis de proteínas, debido a que éstas son por lo general demasiado grandes para la partición de una micela del agente tensoactivo y tienden a unirse a los monómeros del tensoactivo para formar complejos [Johnstone, 2012].

2.3 Inyección de muestras.

El capilar que se utiliza en la EC tiene un d.i. de 50 a 100 μm por lo tanto la cantidad de líquido que puede introducirse en su interior es muy pequeña, se habla de 4-5 μL por lo que el volumen que necesita se mide en nL. Debido al diámetro tan pequeño se presentan varias dificultades para llenar el capilar, y se utilizan métodos que puedan facilitar la inyección [Bañez, 2010].

2.3.1 Inyección electrocinética.

En un recipiente que contenga la muestra a analizar se coloca uno de los extremos del capilar junto con el electrodo, se le aplica un potencial de corriente lo que provoca que la muestra se introduzca al capilar con ayuda del FEO, cuando se termina de introducir la muestra el extremo del capilar y el electrodo son retirados y colocados en el recipiente que contiene la solución buffer (Fig.6). Una desventaja que tiene este tipo de inyección es que se introducen mayor cantidad de los iones más rápidos con respecto a los más lentos [Bañez, 2005].

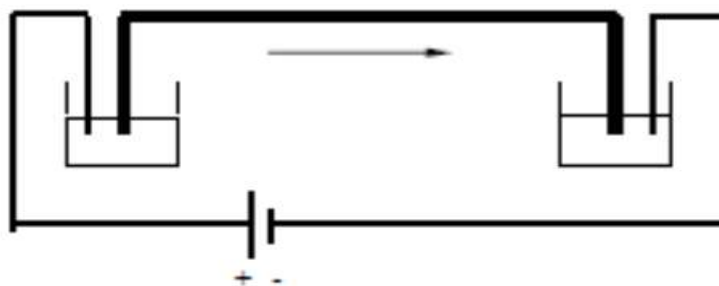


Figura 6. Esquema de inyección electrocinética.

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3141/ivm02de14.pdf?sequence=2>

2.3.2 INYECCIÓN POR PRESIÓN.

En esta modalidad de inyección se utiliza la diferencia de presión provocada por aplicar vacío en el extremo del detector o bien aplicar presión al recipiente que contiene la muestra, a este recipiente se introduce el capilar y por dicha diferencia de presión la muestra es introducida al capilar (Fig.7). Esta modalidad de inyección no es discriminativa de iones ya que todos por igual se introducen en el capilar [Rubinson y Rubinson, 2001; Heiger 1992].



Figura 7. Esquema de inyección por vacío.

http://www.ing.ula.ve/patrones.electroforesis/Seminarios/Electroforesis_capilar.pdf

2.3.2 Características del buffer de corrimiento.

Para llevar a cabo las separaciones en la EC es necesario la utilización de soluciones buffer, existe una gran variedad de sistemas amortiguadores o buffer y aditivos. Entre ellos están los fosfatos, boratos, TRIS, etc., son sustancias que no presentan toxicidad [Skoog y col, 2001; Castillo y col, 2005].

Tabla 3. Buffers utilizados en EC

Buffers.	Rango de pH.
Fosfato.	1.14 - 3.14
Acetato.	3.76 - 5.76
Fosfato.	6.20 – 8.20
Borato.	8.14 – 10.14
Mes.	5.15 – 7.15
Pipes	5.80 – 7.80
Hepes.	6.55 – 8.55
Tricina.	7.15 – 9.15

[Robinson, 2006]

En la ECZ la solución buffer es necesaria porque es la encargada de estabilizar el pH del medio de soporte, también afecta la movilidad electroforética esto debido a sus propiedades fisicoquímicas como su viscosidad, fuerza iónica y pH. Gracias a la fuerza iónica de la solución buffer, se incrementa la intensidad global de corriente por lo que el FEO disminuye. El pH determina el grado de ionización en el sistema, por lo tanto, a mayor pH es mayor el FEO.

En la técnica MECC se hace uso de surfactantes a una elevada concentración que corresponde a la CMC, formando micelas que son las encargadas de transportar analitos cargados o neutros para llevar a cabo la separación al mismo tiempo [Cázares, 2007].

2.4 Factores que causan movilidad en los analitos.

Existen dos factores que causan la movilidad de los analitos en el sistema de EC que son el flujo electroosmótico (FEO) y la movilidad electroforética (μ_{ep}).

La μ_{ep} es el movimiento provocado por la aplicación de un campo eléctrico, lo que produce la migración del analito por su relación masa/carga. La μ_{ep} solo tiene efecto en aniones y cationes, discriminando las especies neutras. La velocidad de migración de un ion sometido a la aplicación de un campo eléctrico es:

$$V = \mu_{ep} E$$

Donde:

V= velocidad de migración.

μ_{ep} = movilidad electroforética.

E = intensidad del campo eléctrico aplicado.

La movilidad depende también de la carga del analito, de su radio y de la viscosidad de la solución, y se puede conocer de la teoría Debye-Huckel-Henry que dice:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta R}$$

Donde:

q = Carga neta.

R = radio de Stokes

η = viscosidad

Que dice que la μ_{ep} es directamente proporcional a la fuerza eléctrica del ion e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento. Estos factores de rozamiento pueden ser determinados por el tamaño y la viscosidad del medio en el que migran los analitos. Las separaciones se llevan a cabo basándose en la relación masa/carga por lo que los analitos que tengan una carga mayor migraran más rápido, pero lo harán aún más aquellos de menor tamaño ya que tendrán menor rozamiento que retarde el movimiento. En el caso de la viscosidad la movilidad será menor mientras más viscosidad presente el medio [Cázares, 2009; Skoog y col, 2001].

2.4.1 Movilidad electroforética aparente.

Para poder determinar la μ_{ap} se debe de tomar en cuenta la movilidad electroforética aparente μ_{ep} , del ion y la μ_{eo} de la solución.

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} \pm \mu_{eo}$$

Debido a que los cationes migran en el mismo sentido que el FEO, la movilidad electroforética aparente será la suma de la μ_{ep} del ion y μ_{eo} de la solución como se muestra en la figura 8. En el caso de los aniones la μ_{ep} es en dirección contraria a la μ_{eo} por lo que se determinara μ_{ap} con la resta de ambas movilidades.

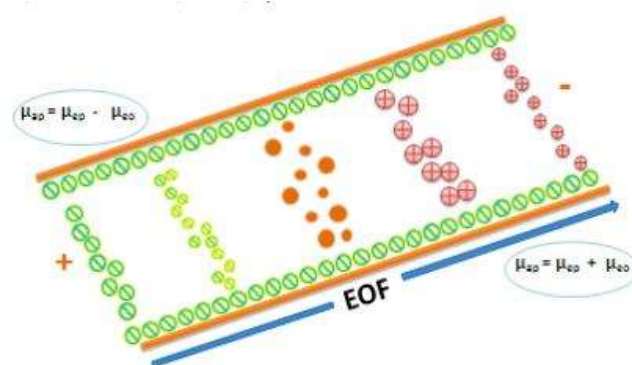


Figura 8. Movilidad electroforética aparente.

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3141/ivm02de14.pdf?sequence=2>

La movilidad aparente puede también calcularse partiendo de datos experimentales como son la longitud del capilar desde el inyector al detector (L_d), la longitud total del capilar de un extremo a otro (L_t), el voltaje aplicado entre los dos extremos (v) y el tiempo necesario para que un soluto migre desde el inyector hasta el detector.

$$\mu_{ap} = \frac{L_d/t}{v/L_t}$$

2.4.2 Detección de analitos.

En las diferentes técnicas de EC los analitos separados se desplazan a diferentes velocidades debido a su movilidad electroforética pasando por un mismo punto donde se ubica el detector. Las bandas del analito atraviesan el detector a diferentes velocidades lo que provoca que las áreas de los picos sean ligeramente dependientes de los tiempos de migración.

a. Detección indirecta.

Existen especies que tienen una poca absorción molar lo que provoca que no sean fáciles de detectar, en este caso se realiza una detección indirecta de absorbancia. Este tipo de detección se basa en incorporar un cromóforo iónico a la solución buffer del sistema, lo que provoca que el detector reciba una señal constante debido a la presencia de esta sustancia. El analito desplaza a algunos

iones como en la cromatografía de intercambio iónico, de tal forma que la señal detectada desciende cuando una banda del analito atraviesa el detector. El analito se cuantifica midiendo el descenso en el valor de la absorbancia. En la figura 9 se observa un electroferograma obtenido utilizando el método de detección indirecta de absorbancia logrado con la presencia de un ion cromato 4mM como cromóforo [Skoog y col, 2001].

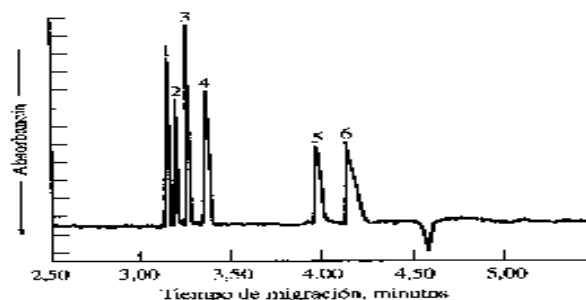


Figura 9. Electroferograma obtenido utilizando la detección indirecta, mezclando seis aniones. [file:///C:/Users/DAYDENT/Downloads/Electroforesis_Capilar_2011.pdf]

b. Detección directa por arreglo de diodos (PDA)

Utiliza la absorbancia de la luz para detectar la presencia de sustancias cuando pasan a través de la ventana de detección. En este tipo de 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 cuál es proyectado sobre un arreglo de 256 fotodiodos. Con este arreglo, la absorbancia de la muestra es medida. El detector de PDA permite la medida de la absorbancia a determinadas longitudes de onda [Cázares, 2007].

2.5 Hongos.

Micología es la ciencia encargada del estudio de los hongos, su nombre proviene del prefijo *mico* del griego “mykes” que significa seta, y del sufijo *logia* del griego “logos” que significa tratado [Harman, 2000].

Los hongos son organismos eucarióticos, aerobios y heterótrofos, pueden ir desde organismos unicelulares hasta pluricelulares macroscópicos. Su pared celular es rígida y está conformada principalmente por glucanos, glicoproteínas y quitinas este último polisacárido se encuentra presente en todas las especies

fúngicas, en su membrana celular contienen ergosterol. Su alimentación es por medio de una digestión externa y posterior ingesta de nutrientes [López y col, 2006; Fischer y Kües, 2006].

Los hongos carecen de clorofila y debido a esto requieren de una fuente externa de carbono y actúan como saprofitos (obtienen sus nutrientes de materia orgánica muerta o en descomposición), parásitos (se nutren de materia viva como plantas, animales y humanos) o simbióticos (se encuentran unidos a otro vegetal del cuál toman sus nutrientes) de acuerdo a la sustancia orgánica que aprovechen [Koneman y col, 1999].

Estos organismos en su mayoría son aerobios pero también existen los anaerobios facultativos, pueden ser unicelulares como las levaduras o pluricelulares. Los hongos son muy abundantes y ubicuos en la naturaleza, constituyen uno de los cinco reinos de los seres vivos, el reino fungí (Eumicotas). En la actualidad dicho reino está clasificado en los filos Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Zygomycota y Chtridiomycota [López y col, 2006].

Los hongos son organismos sumamente importantes para la vida del ser humano, ya que estos son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica aumentando su disposición en el suelo. Estos organismos pueden ser comestibles, venenosos o psicotrópicos, algunos son patógenos, producen ciertas sustancias beneficiosas o intervienen en procesos de elaboración de algunos alimentos [Alexopoulos y Mims, 1985].

Los hongos poseen una gran diversidad de formas y tamaños, pueden vivir en sustratos y condiciones ambientales muy variadas. La mayoría de estos organismos viven en pH ácido entre 6.0 y 6.5 y la temperatura adecuada para su desarrollo es de 25 a 28°C. La humedad relativa que necesitan para su desarrollo y fructificación de los hongos filamentosos es de 60 a 80% [Alexopoulos y Mims, 1985].

2.5.1 Estructura de los hongos.

La gran mayoría de los hongos están formados por filamentos individuales o tubos llamados **hifas**, que son las unidades vegetativas de los hongos. Su forma es filamentosa y de tipo tubular con paredes celulares, pudiendo presentar tabiques

llamadas hifas septadas (Fig. 10b) o no presentándolos llamadas hifas aseptadas (Fig. 10a). Contienen en su interior citoplasma con pequeñas estructuras con morfologías y determinadas denominadas organoides [Harman y col, 2004].

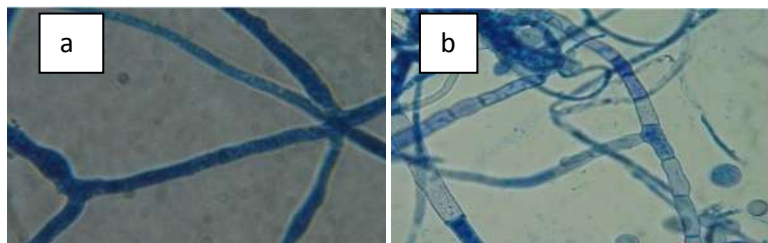


Figura 10a. Hifas cenocíticas, b. hifas septadas [Cázares, 2009]

Conforme las hifas van creciendo se van ramificando formando una red compleja conocida como **micelio** o cuerpo del hongo que puede extenderse en todas direcciones [Koneman, 1999].

De acuerdo a su función el micelio puede clasificarse en **micelio vegetativo** o de nutrición que es el encargado de la absorción y transformación de los nutrientes; o en **micelio reproductivo** o aéreo que se trata de la porción que se proyecta por encima del sustrato y es el encargado de soportar las estructuras y formas de reproducción. Las conidias son una forma de reproducción asexual inmóvil, formada mediante mitosis por una célula conidiógena o mediante una modificación de una célula hifal ya existente. La palabra conidia proviene del griego “konis = polvo” e “idion = pequeño”. Los organismos que emergen de estas conidias son genéticamente idénticos al individuo que las produjo. Son las principales estructuras utilizadas para la identificación de especies fúngicas [Alexopoulos y Mims, 1985; Fischer y Kües, 2006].

De acuerdo a su forma se clasifican en **filamentosos** en donde pertenecen los hongos mohos o filamentos; y en **unicelulares** que son propios de las levaduras [Bonifaz, 1998].

Al madurar el hongo, el micelio puede convertirse en una estructura especializada en la reproducción llamada **cuerpo fructífero**.

a. Pared celular.

Las esporas son células especializadas que encontrándose en las condiciones adecuadas de humedad, temperatura, luz y nutrientes, germinan y producen hifas,

que son estructuras filamentosas que son la unidad estructural fundamental de la mayoría de los hongos [Aguilar y col, 1999].

En su mayoría las células fúngicas ya sean hifas o esporas se encuentran rodeadas por una pared celular, la cual es una estructura rígida que rodea la célula por la parte externa de la membrana plasmática y tiene el funcionamiento de mantener la integridad del microorganismo, regula su permeabilidad y la protege de daños químicos, biológicos y osmóticos. Constituye entre el 15 y el 30% del peso seco de la célula [Szpoganicz y col, 2002].

La pared celular de los hongos está formada de un 80 a 90% de polisacáridos, el 10% restante le corresponde a lípidos y proteínas. El componente más habitual es el glucano, la mayoría de sus polímeros están compuestos por unidades de glucosa. Las cadenas de glucano que conforman la pared celular están formadas por 1500 unidades de glucosa unidas mediante enlaces 1,3-O-glucosídicos como se muestra en la figura 11 [Butler y Day, 1998].

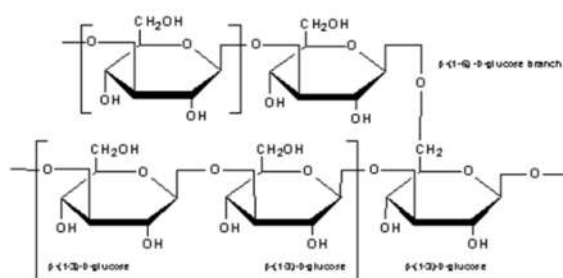


Figura 11. Componente más abundante de la pared celular de los hongos. β -1,3-glucano.

www.google.com/images

Participan en la estructura los lípidos que van en una proporción del 2 al 10%, constituidos por ácidos grasos saturados, siendo los encargados de dotar de flexibilidad, tersura y le da el carácter hidrófobo a las células fúngicas. Dentro de su pared celular se encuentran pigmentos tales como la melanina, producto de la oxidación de diversos fenoles, que tiene como función proteger a las hifas y esporas de la luz UV. [Carzaniga y col, 2002; Youngchim y col, 2004]

b. Nutrición.

Los hongos son organismos desprovistos de clorofila por lo tanto son incapaces de sintetizar los glúcidos que necesitan para vivir, debido a esto han desarrollado tres distintas formas de nutrición. **Saprobios** pueden descomponer residuos

orgánicos para alimentarse, en este grupo de hongos se encuentran comúnmente aquellos hallados sobre troncos como los *Pleurotos* u hongos ostra, e incluso el más conocido champiñón. **Parásitos** que extraen las sustancias orgánicas que necesitan de un hospedador que debilitan y a la larga matan. **Simbióticos** extraen las sustancias orgánicas de un hospedador pero al contrario que los pasitos, estos les proporcionan ciertas ventajas [Kubicek, 2002].

c. Reproducción.

Los hongos tienen dos formas de reproducción: Sexual y asexual. La reproducción asexual tiene una mayor influencia que la sexual ya que por medio de ella se obtienen una mayor cantidad de elementos reproductores y necesitan condiciones menos críticas para poder efectuarse. En el caso de la reproducción sexual es considerada indispensable para la formación de esporas con mayor capacidad de resistencia que les da la capacidad de resistir condiciones más adversas [Commission, 2008; Carlile y col, 2001].

Los hongos en su mayoría presentan los dos tipos de reproducción en dos fases, primeramente la fase sexual, en donde los hongos presentan órganos masculinos (-) y femeninos (+). Para completar el fenómeno se llevan a cabo dos procesos: la fecundación y la meiosis, dando como resultado la formación de esporas sexuales con recombinación de material genético. En la fase asexual se presenta el crecimiento vegetativo en donde se involucran las hifas y el micelio, en esta fase no se presenta la unión de micelios sexuales o gametos [Jaklitsch, 2009].

2.6 *Trichoderma atroviride*.

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Persoon en 1794. *Trichoderma atroviride* es un hongo filamentoso que se encuentra comúnmente en el suelo. Este tipo de hongos es de rápido crecimiento y presentan pigmentos conidiales de color verde brillante o blanco. Las cepas de *Trichoderma* interactúan con las plantas de manera mutualista protegiéndolas de organismos fitopatógenos y raramente son relacionadas con enfermedades de algunas plantas. Este hongo es mejor conocido por sus capacidades de control biológico contra hongos fitopatógenos entre ellos *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinérea*, que son plagas de cientos de cultivos vegetales como los tomates, pepinos, fresas, algodón y uvas [Klein y Eveleigh, 2002; Gams y Bissett, 2002].

El hongo *Trichoderma* crece formando colonias de color blanco que simulan una película sobre el medio. El micelio está conformado por hifas septadas, y sus conidióforos por segmentos cortos que se encuentran al lado de las hifas, y en la parte terminal de éstas están presentes pequeñas conidias redondas. La conidiación se caracteriza por mostrarse en forma de parches verdosos sobre las colonias [Harman, 2000]

La palabra conidia proviene del griego *konis* (polvo) e *idion* (pequeño), es una estructura formada mediante mitosis por una célula conidiógena o mediante la modificación de una célula hifal ya existente, los individuos que emergen de estas conidias son genéticamente idénticos al individuo que las produjo. Son las principales estructuras utilizadas para la identificación de especies fúngicas. Todas las conidias son microscópicas, las hay muy pequeñas de unos cuantos μm hasta $20\mu\text{m}$. Poseen colores variables, desde hialinas hasta oscuras. Su forma puede ser esférica, cilíndrica u ovoide [Carlile y col, 2001; Cázares, 2009].

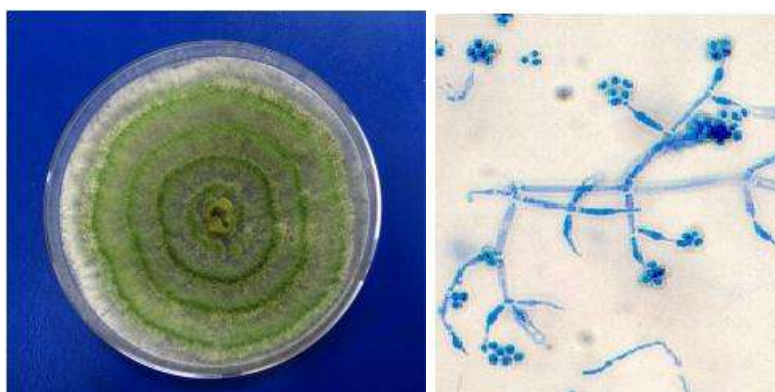


Figura 12. Características macro y microscópicas de *Trichoderma* spp [Arias y col, 2008].

La clasificación taxonómica del genero *Trichoderma* corresponde al Reino Mycetozoa (Fungi), división Eumycota, subdivisión Ascomycota, Clase Euscomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae y genero *Trichoderma* e *Hypocrea* [Samuels, 2005].

El hongo *Trichoderma atroviride* es un micoparásito que responde a estímulos externos. En la presencia de un huésped fúngico. *Trichoderma atroviride* produce enzimas hidrolíticas alrededor de las hifas tales como β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, quitinasas, y proteasas, para penetrar en el anfitrión y utilizar su

contenido celular como una fuente de nutrientes. . En respuesta a la luz o al agotamiento de los nutrientes es inducida la esporulación asexual [Chaverri y cols, 2003].

2.6.1 Nutrición de *Trichoderma*.

Trichoderma utiliza una gran variedad de fuentes de carbono para su crecimiento, utilizando como fuente principal la glucosa, seguido de fructosa, manosa, celobiosa, trealosa, galactosa y xilosa, también degradan una gran variedad de polisacáridos y otros biopolímeros. Requieren de una fuente de nitrógeno que generalmente la obtiene de diferentes aminoácidos, principalmente de alanina, ácido aspártico y ácido glutámico [Horka y col, 2012].

2.6.2 Ciclo de vida de *Trichoderma*.

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* no están relacionadas con estados sexuales y son considerados hongos mitóticos estrictos. Su ciclo de vida inicia con la germinación de la espora o conidia, ésta involucra la iniciación de actividades bioquímicas y son llevadas a cabo con un incremento gradual en la velocidad de metabolismo hasta llegar a su nivel normal. Los requerimientos para la germinación son agua y humedad relativa suficientes, oxígeno, bióxido de carbono, nutrientes de bajo peso molecular como el azúcar como fuente de carbono y aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Terminada la etapa germinación se forma la primera hifa conocida como “tubo germinativo” que al expandirse forma hifas ramificadas que conforman una colonia micelial. Su crecimiento es en forma radial, cuando existen los nutrientes suficientes el micelio vegetativo crece de forma continua, pero cuando los nutrientes van disminuyendo el micelio deja de crecer y comienza la conidiación. La conidiación se lleva a cabo en el micelio aéreo en forma de conidias y en el micelio vegetativo en forma de clamidioconidias [Carlile y col, 2001].

2.6.3 Producción de antibióticos.

El género *Trichoderma spp* es utilizado en la producción de antibióticos y metabolitos secundarios tóxicos para otros organismos, los cuales son encargados de detener la acción de toxinas y de otros compuestos generados por los patógenos [Harman y col, 2004].

2.6.4 Control biológico.

El hongo *Trichoderma* se utiliza como control biológico en el estudio de hongos Fitopatógenos. Los metabolitos anti fúngicos que produce *Trichoderma spp* son gliotoxina, gliovirina, viridina, así como metabolitos volátiles o solubles que afectan de forma negativa el desarrollo de los patógenos, seguido de una fagocitosis del contenido celular. Otros metabolitos producidos por *Trichoderma* son el viridiol-9-epivirediol y la gliovirina, con propiedades herbicidas y efectos citotóxicos en células de carcinoma epidermoide [Stefanova y col, 1999; Bayley y Lumsden, 2004].

La secreción de enzimas líticas le permiten a *Trichoderma* degradar la pared celular de los patógenos y a nivel celular causa granulación, coagulación, desintegración y lisis [Ait-Lashen y col, 2001].

2.6.5 Usos y aplicaciones de *Trichoderma*.

Las propiedades del género *Trichoderma* lo han convertido en el hongo de mayor importancia económica para la industria, así como biofúngicida comercial, se usa en la degradación de xenobióticos, como estimulante de crecimiento vegetal ya que facilita de absorción de nutrientes [Monte, 2003].

Las enzimas producidas por el género *Trichoderma* son utilizados por la industria alimenticia para la degradación de polisacáridos complejos, así como la producción y transformación de los alimentos. También se utiliza en la industria textil, industria de papel y fabricación de pastas, y sus enzimas hidrolíticas son usadas para la hidrólisis de material celulósico [Galante, 1998].

2.7 Identificación de hongos.

La identificación de hongos principalmente se ha llevado a cabo utilizando la observación de características macro y microscópicas del hongo, identificando la forma del micelio que es característico de cada especie, el aspecto macroscópico de la colonia, el tipo de hifa, la colocación de los esporangios, y la forma y el tamaño de las esporas. La desventaja de este método de identificación es que las características propias del hongo pueden presentar variaciones debidas a las

condiciones de sustrato, temperatura, humedad, iluminación, incluso a las condiciones en que la cepa sea cultivada [Hoyos-Carbajal, 2011].

Las pruebas bioquímicas también son utilizadas como técnica de identificación de hongos, éstas son utilizadas en conjunto con los aspectos macroscópicos y microscópicos en el análisis de taxa, cercanos a la fermentación y asimilación de alguna fuente de carbono [García Aguilar, 2009].

Otras técnicas de identificación utilizadas son sistemas automatizados, métodos génicos, secuenciación de genes ribosomales, análisis de perfiles de restricción de ADNr, Reacción en cadena de Polimerasa (PCR), Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) [García Aguilar, 2009]

2.7.1 Identificación de *Trichoderma*.

La identificación de cepas de *Trichoderma* se lleva a cabo observando los caracteres morfológicos, la forma de su micelio puede tener forma distintiva y característica de cada especie, su forma de crecimiento puede diferenciar cada especie, así como los pigmentos que presenten. Esta técnica de identificación es poco certera ya que varios factores pueden alterar sus características morfológicas [López y col, 2006].

En las últimas dos décadas se han utilizado comúnmente técnicas más sofisticadas para la identificación de *Trichoderma*, éstas son citometría de flujo, cromatografía de líquidos (HPLC), dispositivos de microfluidos y técnicas basadas en electroforesis capilar (EC). Los métodos que se basan en la técnica de EC nos brindan una opción prometedora para la rápida identificación y separación de moléculas, ya que gracias a su corto tiempo de análisis nos arroja datos en menor tiempo y una separación de alta resolución de moléculas biológicamente importantes, utilizando pocas cantidades de reactivos [Armstrong y Desai, 2003].

2.8 Agentes surfactantes.

2.8.1. Surfactantes catiónicos.

Los surfactantes catiónicos no son considerados buenos detergentes ni espumantes, su uso cotidiano representa un 5% del total consumo, mucho menor el consumo comparados con los surfactantes aniónicos y no iónicos. En mezcla con surfactantes aniónicos forman compuestos insolubles debido a su

incompatibilidad entre ellos. Este tipo de surfactantes tiene dos funciones importantes una es como bactericida y la otra es la capacidad de absorberse en sustratos cargados negativamente.

Existen tres surfactantes catiónicos que se utilizan como referencia: cloruro de alquil-dimetil-amonio mejor conocido como cloruro de benzalconio, bromuro de tetradecil-trimetil-amonio (TTAB) y el bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB) que es el surfactante catiónico utilizado en el presente trabajo [Salager y Fernández, 2004].

Los surfactantes catiónicos bajan la tensión superficial y forman micelas en medio acuoso, y no acuoso, aunque son muy poco utilizados por sus propiedades detergentes ya que no son buenos detergentes ni espumantes.

La adsorción de los surfactantes catiónicos se realiza en superficies cargadas negativamente y lo hacen muy por debajo de su concentración micelar crítica.

CTAB.

Como surfactante catiónico se utilizó el Bromuro de hexadeciltrimetil amonio mejor conocido como CTAB por sus siglas en ingles. Es una sal de amonio cuaternario, uno de sus grupos alquilo es de gran longitud, que le proporciona actividad detergente. El CTAB es un tensoactivo catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica. Este surfactante tiene propiedades bactericidas y dichas propiedades se activan en pH alcalino en contra de bacterias Gram (+) y Gram (-). Se ha utilizado para la determinación de pesos moleculares de proteínas en sistemas de EC. La CMC del CTAB es de 1mM. Su estructura se muestra en la figura. 13. [Hoja de seguridad SIGMA ALDRICH®.]

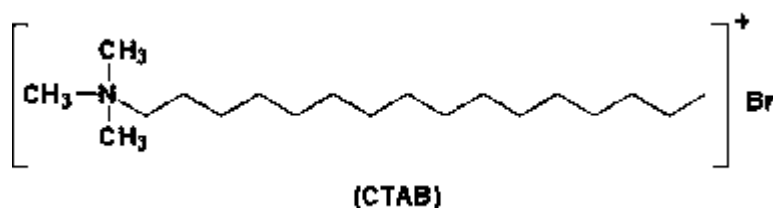


Figura 13. Estructura del Bromuro de hexadeciltrimetil amonio.

2.8.2. Surfactantes aniónicos

Los tensoactivos aniónicos tienden a ionizarse en solución pero su grupo hidrófobo queda cargado negativamente. Este tipo de tensoactivos está constituido por una cadena alquílica lineal o ramificada que va de 10 a 14 átomos de carbono y en el extremo polar se encuentra un anión. Estos compuestos son derivados del ion sulfato o de sulfanatos. Algunos ejemplos de estos surfactantes son el Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS) y el heptano sulfanato de sodio (Fig.14) que es utilizado en el presente trabajo. [http://docsetools.com/articulos-utiles/article_101979.html]

HSS.

En los surfactantes aniónicos el más utilizado es el dodecil sulfato de sodio (SDS), es un compuesto tensoactivo aniónico. Su molécula está conformada por una cola de 12 átomos de carbono adheridas a un grupo sulfato que le brinda las propiedades necesarias para ser detergente. El uso del SDS en los laboratorios es en la preparación de proteínas para electroforesis en gel de poliacrilamida. El SDS actúa rompiendo enlaces covalentes en la proteína, desnaturalizándolas, provocando que las moléculas pierdan su composición nativa, esto debido a que el SDS se une a las zonas apolares de los polipéptidos. El SDS tiene una cadena ramificada de 12 carbonos unidos a un grupo sulfato, debido a esto se decidió cambiar este surfactante por uno con las mismas de propiedades, el Heptano Sulfanato de Sodio que cuenta con una cadena lineal de 7 carbonos, ya que la degradación de una cadena lineal es mucho más efectiva.

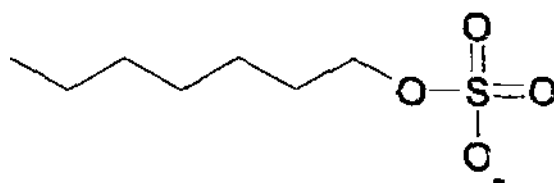


Figura 14. Estructura química Heptano sulfanato de sodio.

2.8.3. Surfactantes no iónicos.

Los surfactantes no iónicos son aquellos que sin ionizarse pueden solubilizarse gracias a grupos solubilizantes débiles (hidrófilos) mediante un efecto combinado, tales como enlaces tipo éter o grupos hidroxilo en la molécula. Algunos representantes de estos tensoactivos son los alcoholes grasos o fenoles [Salager, 2004].

Los surfactantes deben sus propiedades y comportamiento al carácter dual de sus moléculas, un grupo hidrófilo y uno hidrófobo, que gracias al antagonismo y equilibrio entre estas dos partes de la molécula tienen las propiedades activas de superficie. El grupo hidrófilo tiene un efecto solubilizante y lleva a la molécula a disolución completa. En el caso del grupo hidrófobo debido a su insolubilidad tiende a contrarrestar el efecto del grupo hidrofílico. Si se logra obtener el equilibrio entre ambos grupos de la molécula se tiene que la sustancia no tiene una completa disolución pero tampoco se vuelve insoluble, lo que provoca que las moléculas del grupo hidrófobo se orienten hacia la fase no acuosa o la fase vapor y los del grupo hidrofílico hacia la fase acuosa [Salager y Fernández, 2004].

TRITON X-100.

Tritón X-100 es un agente tensoactivo no iónico que está formado por una cadena de óxido de polietileno hidrófilo y un hidrocarburo aromático, su estructura química se muestra en la figura. 15. Este tensoactivo es ampliamente utilizado para lisar las células y extraer las proteínas, para solubilizar proteínas de membrana en su estado nativo en combinación con detergentes zwiteriónicos, forma parte de la solución tampón en el sistema de extracción de ADN, se encarga de reducir la tensión superficial de las soluciones acuosas. Además de su utilización en laboratorios el Tritón X-100 puede encontrarse en productos de limpieza que van desde los industriales hasta los detergentes suaves. El valor de la CMC del Tritón X-100 es de 0.2mM [Johnson, 2013].

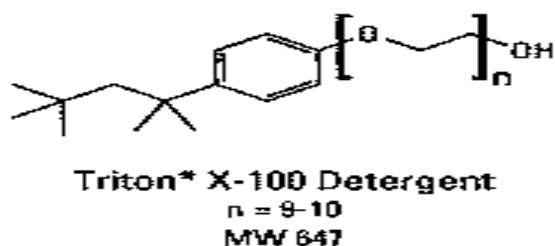


Figura 15. Estructura química del Triton X-100.

<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/28314#/legacy=www.piercenet.com>

Antecedentes de identificación de microorganismos y células fúngicas por Electroforesis capilar.

En el año 2000, Armstrong y col., Observaron el comportamiento en la migración de *S. cerevisiae* a través del capilar en una suspensión sin sonicar y otra suspensión sonicada. Demostraron la importancia de la sonicación para romper aglomerados celulares, obteniendo señales muy eficientes [Armstrong, 2000]. Moon y Kim, 2003 Estudiaron mediante ECZ dos cepas de *S. cerevisiae* empleadas como probióticos. Obtuvieron una sola señal muy eficiente en los corrimientos con sonicación [Moon y Kim, 2003]. Para el año 2008 Armstrong utilizó CZE para analizar muestras con células de *S. cerevisiae*. Encontraron que a 280nm tiene poca absorbancia el caldo nutritivo y buena abs. En levaduras a 214nm abs. Considerable en m.o. y caldo nutritivo. La cantidad mínima de células detectadas fue de 200 [Bao y col, 2008]. Horka y col. (2009) Lograron mediante ECZ la separación en mezcla de conidias de diferentes especies fúngicas, obtuvieron excelente eficiencia y resolución en la separación [Horka, 2009]. También en el año 2009 Petr y col separaron mediante CZE, células de *S. cerevisiae* y *Escherichia coli*, Obtuvieron buena eficiencia y excelente resolución. Conforme aumenta la fuerza iónica disminuye la μ_{ep} en *E. coli*, se mantiene en *S. cerevisiae*. Conforme aumenta el pH incrementa la μ_{ep} en *E. coli* y ligeramente en *S. cerevisiae* [Petr y col., 2009]. En el año 2011 Horka y col. separó mediante CZE una mezcla de conidias de 4 especies de *Monilinia* previamente identificadas por secuenciación. La concentración obtenida de conidias de cepas aisladas y las aisladas de la manzana fue de 1×10^8 células/mL. [Horka, 2012]

Proyectos de identificación de células fúngicas por EC en el Laboratorio de Desarrollo Analítico.

En el año 2007, Cazares. Realizó un estudio mediante EC, utilizando *Botryosphaerea rhodina* y *Trichoderma sp*, Obtuvo señales características de células fúngicas en su forma micelial con t_m característicos para cada cepa, así como un pico definido y simétrico, demostrando la factibilidad de estudios células fúngicas mediante esta técnica. [Cazares, 2007]. Aguilar en el 2009, Aguilar buscó controlar la longitud de las células miceliales, encontró que se obtenían señales electroforéticas características en tiempos de migración relativamente cortos, utilizando germinulas de *Trichoderma sp* [Aguilar, 2009]. Para el año 2009 Cázares Logró caracterizar tanto conidias de *T. atroviride* como esporas de *Amylomyces rouxii* y *Agaricus bisporus*, Obtuvo excelentes resultados en las diferentes condiciones (pH, longitud de capilar, d.i. del capilar, tipo de buffer y voltaje) para obtener las mejores condiciones y tiempos de migración, de esta manera separaron conidias de *T. atroviride* y esporas de *Agaricus bisporus* en mezcla con excelente resolución [Cazares, 2009]. En el año 2011 Ávila, estudió el comportamiento electroforético de macroconidias de los hongos fitopatógenos *Alternaria* y *Pestalotiopsis*, aislados de hojas y frutos enfermos de guayaba, logro encontrar señales características para una de las cepas de *Alternaria* pero no para las cepas de *Pestalotiopsis*. Se demuestra que no pierden su viabilidad las macroconidias después de migrar a lo largo del capilar durante el proceso electroforético [Ávila, 2011]. Castillo y Robinson en el 2013, evaluaron el efecto de surfactantes catiónicos en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*, observaron que en presencia del CTAB las conidias se agrupan y se adhieren al capilar y conforme aumenta la conc. Disminuye la velocidad de migración, con T X-100 las conidias no presentan adhesión a la pared del capilar, la velocidad de migración es mayor pero disminuye conforme aumenta la conc.[Memorias verano de investigación, 2013]. En el mismo año Farías y Robinson, evaluaron el efecto de un surfactante aniónico y uno no iónico en la movilidad electroforética de conidias de una cepa silvestre de *Trichoderma*, En presencia del Tx100 observaron que la migración de las conidias a conc. Bajas

era abundante e iba disminuyendo conforme aumenta la concentración, [Memorias de Verano de investigación, 2013].

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años las especies fúngicas potencialmente patógenas para el hombre ha sufrido un aumento considerable, especialmente los ascomicetos tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix* y *Scedosporiu*, provocando que dichas especies difieran en virulencia y en su respuesta a los antifúngicos. El aumento de pacientes inmunocomprometidos por causas de enfermedades o trasplantes de órganos los expone a un peligro constante de sufrir micosis; el uso indiscriminado de antibióticos y antifúngicos para combatirlos ha creado gran resistencia a estos, por lo que es necesaria la pronta y correcta identificación de la especie para el adecuado tratamiento del paciente. En la actualidad existen técnicas de identificación con equipos sistematizados, métodos génicos, secuenciación de genes ribosomales, análisis de perfiles de restricción de ADNr, PCR, FISH. En el este trabajo se propone utilizar la técnica de Electroforesis capilar para conocer las propiedades de adherencia y repulsión que presentan las conidias de *Trichoderma spp*, así como evaluar el efecto que tienen estas en su movilidad electroforética en presencia de surfactantes iónicos como el CTAB (hexadeciltrimetilamonio), HSS (heptano sulfato de sodio y surfactantes no iónicos como el Triton X-100).

La elección de esta técnica se debió a que con ella es posible separar cationes, aniones, y sustancias no cargadas simultáneamente. Algunos aspectos que se tomaron en cuenta para esta elección fueron que la EC utiliza la tecnología de detector moderno y los electroferogramas obtenidos se asemejan a los cromatogramas, requiere cantidades mínimas de muestra y reactivos, tiene eficiencia de la cromatografía de gases capilar e incluso mayor, es fácilmente automatizable para su análisis preciso; es de fácil manejo y puede ser aplicada a una selección más amplia de analitos, a diferencia de otras técnicas de separación analítica [Beckman, 2000].

En este trabajo se propone utilizar la EC porque nos permitirá conocer más a detalle las propiedades fisicoquímicas de pared celular fúngica, particularmente sus propiedades de adherencia y repulsión que tienen entre las mismas células y las superficies, con esta técnica se obtendrán resultados en periodos de tiempo cortos, de manera relativamente económica y con una buena sensibilidad,

logrando una rápida identificación de especies fúngicas. Se espera que la EC sirva como una herramienta de diagnóstico.

IV. HIPOTESIS

La adición de surfactantes al buffer de corrimiento permite el agrupamiento de las conidias provocando señales más definidas en los electroferogramas

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la influencia de surfactantes iónicos y no iónicos en el agrupamiento y movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma* spp.

Objetivos específicos

1. Establecer el efecto de un surfactante aniónico, uno catiónico y uno no iónico sobre el agrupamiento y movilidad electroforética de las conidias de *Trichoderma* spp.
2. Establecer el efecto de mezclas de surfactantes iónicos y no iónicos en el agrupamiento y movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma* spp.
3. Determinar el efecto de los surfactantes en la integridad de las conidias de *Trichoderma* spp.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Medio de cultivo: Medio Mínimo Vogel.

Se pesan 7.5g de agar, 7.5g de Dextrosa DIBICO® para elaborar 500mL de medio de cultivo. En un matraz Erlenmeyer se coloca el agar, la Dextrosa DIBICO® y 10 mL de solución medio mínimo Vogel, se le adicionan 480mL de H₂O bidestilada para completar un volumen total de 500mL, se cubre el matraz con tapón de aluminio y se lleva a esterilizar en autoclave a 121°C (15lb/in²) durante 15 minutos. Se deja enfriar y posteriormente se vacía en cajas de Petri, ya solidificados se deben guardar en refrigeración hasta su uso.

6.2 Cepas utilizadas.

Se utilizaron cuatro cepas de *Trichoderma* identificadas como CMU1 (*H. lixii*), CMU8 (*T. gamsii*), CMU218 (*H. rufa*) y CMU221 (*T. tomentosum*) proporcionados por el Cepario del Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB).

6.3 Cultivo

Se realizaron subcultivos de las 4 cepas de *Trichoderma* en el medio mínimo Vogel; se tomó un bocado de 5 mm de ancho y se inoculó en tres cajas Petri para cada una de las especies, también se utilizó 1mL de agua estéril para re suspender las conidias de las cepas y vaciarlas en tres nuevos medios de cultivo para cada una.

6.4 Tratamiento de las cepas.

Se sometieron a incubación a 25°C, transcurridas 72 h se realizó daño mecánico al micelio de cada cepa con la ayuda de una espátula, para estimular la conidiación de las cepas, tardando un aproximado de 24 h en comenzar la conidiación.

6.5 Preparación de la muestra.

Al presentarse la conidiación, aproximadamente a las 120 h, se procedió a recolectar las conidias utilizando 1 mL de agua estéril con agitación manual ladeando la caja de Petri por 1 minuto, recolectando el líquido con pipeta Pasteur

para colocarla en un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente se somete a agitación en un equipo Vórtex b. Por último, se introdujo en un sonicador para eliminar las burbujas contenidas en los tubos.

6.6 Condiciones Electroforéticas.

Después de darles el tratamiento a las muestras se procedió a realizar los corrimientos electroforéticos en un Equipo EC P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter®.

Tabla 4. Condiciones electroforéticas.

Capilar.	El capilar utilizado es de sílice fundida recubierto de poliamida para darle mayor flexibilidad con un d.i. de 100 µm, con una longitud total de 50cm.
Temperatura.	Trabajó con una temperatura constante de 25°C.
Detector.	DAD (Detector de arreglo de Diodos)
Longitud de onda.	201nm
Voltaje.	Polaridad normal (+17kV), inversa (-17kV).
Presión.	20.0 psi.
Polaridad.	Positiva (+), inversa (-).

6.7 Buffers utilizados en corrimientos.

Se preparo solución buffer de fosfatos JT. Baker® ACS 10Mm a pH 6.8, la cual se utilizo para preparar soluciones de los surfactantes CTAB SIGMA ALDRICH®. Y HSS SIGMA ALDRICH® en concentraciones de 5,10, 15, 20 y 25Mm; y soluciones con Triton X-100 al 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9%, utilizadas en individual en las condiciones electroforéticas para cada cepa.

Tabla 5. Surfactantes utilizados en EC.

Hongo	Buffer	Surfactante	Concentración.
CMU1 CMU8 CMU218 CMU221	De fosfatos 10mM pH 8.	CTAB.	5, 10, 15, 20, 25mM.
		HSS.	5, 10, 15, 20, 25mM.
		Triton X-100.	0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9%

6.8 Mezclas realizadas para corrimientos.

Se realizaron mezclas de surfactantes en solución; CTAB y HSS a las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25Mm con Triton X-100 en una de sus concentraciones 0.1, 0.5 y 0.95.

Tabla 6. Mezcla de surfactantes utilizados en corrimientos

CEPA	Mezcla de Surfactantes.		
CMU1 CMU8 CMU218 CMU221	CTAB 5, 10, 15, 20, 25mM.		Tx100 0.1%
			Tx100 0.5%
			Tx100 0.9%
	HSS 5, 10, 15, 20, 25mM.		Tx100 0.1%
			Tx100 0.5%
			Tx100 0.9%

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cepas utilizadas

La morfología colonial de las cepas utilizadas se muestra en la figura 16.

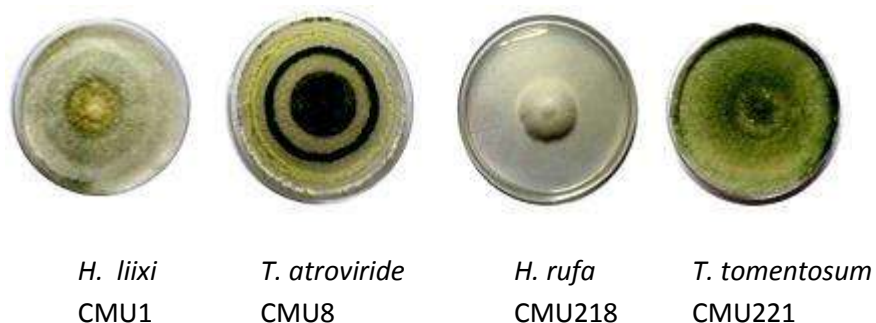


Figura 16. Cepas de *Trichoderma* utilizadas en este estudio

El crecimiento de cada una de ellas fue diferente y se sabe, de estudios anteriores (Ávila, 2013) que para inducir la conidiación de las cepas en un tiempo aproximadamente igual, es necesario sembrar y dejar crecer por 90 h y entonces, inducir daño mecánico al micelio y dejar por 48 h a que aparezcan las conidias (Fig. 18).

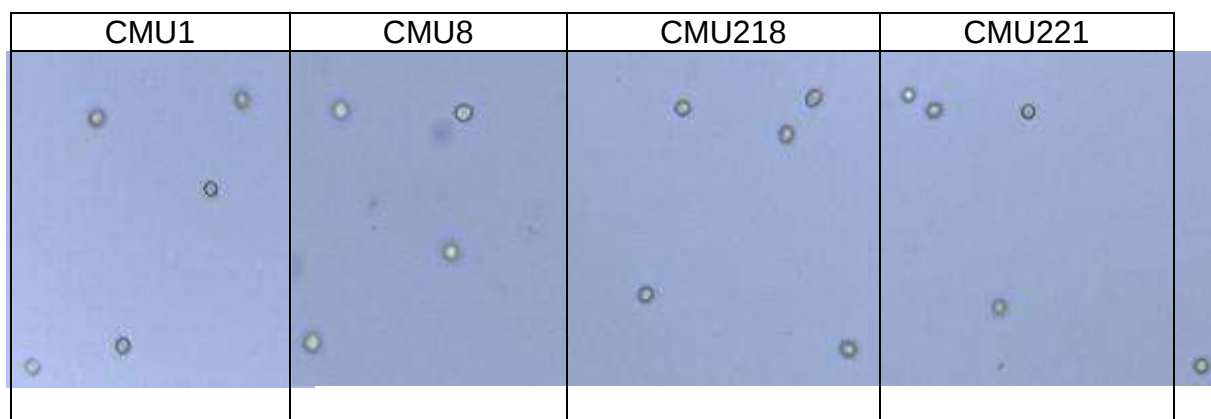


Figura 17. Conidias de las cuatro cepas de *Trichoderma* spp en suspensión con agua.

7.2 Conidias en presencia de surfactantes

En este estudio se usaron tres surfactantes para establecer su efecto en la movilidad electroforética de las conidias. Sin embargo, se sabe que los

surfactantes, en general, y los usados en este trabajo (HSS, CTAB y Triton X-100) pueden ocasionar lisis celular, así que se comenzó por evaluar si ocasionaban algún cambio aparente por microscopía óptica en la superficie de las conidias, resuspendiéndolas en los tres surfactantes a diferentes concentraciones. Ninguno de los surfactantes ejerció un efecto aparente en la morfología de las conidias (Fig. 18,19 y 20).

En presencia del surfactante aniónico HSS. Aumenta la agrupación de conidias conforme aumenta la concentración de surfactante (Fig. 18). De igual manera las conidias en presencia de CTAB muestran mayor agrupación de conidias conforme aumentaba la concentración (Fig. 19).

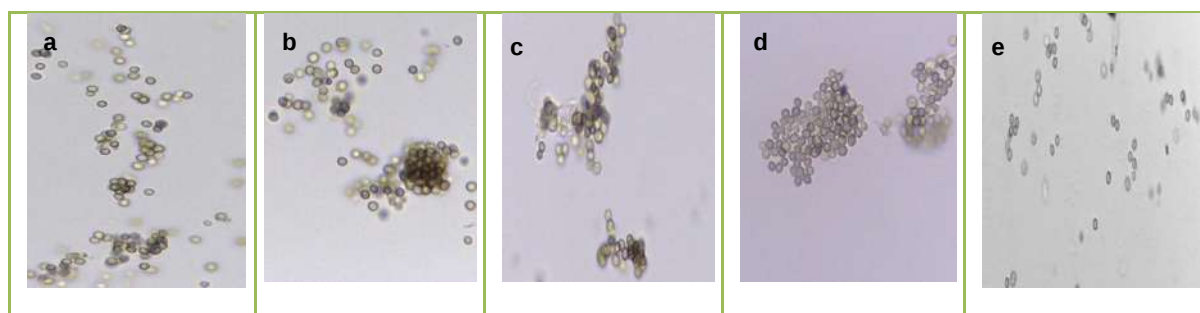


Figura 18. Conidias de CMU221 en presencia de a) HSS 5Mm, b) 10Mm, c) 15Mm, d) 20mM y e) 25mM

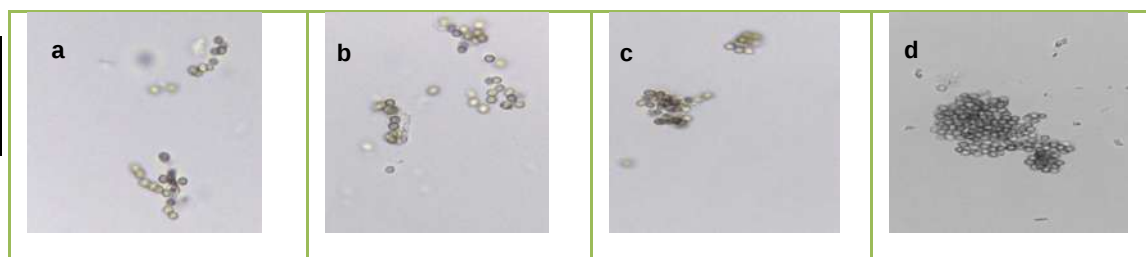


Figura 19. Conidias de CMU221 en presencia del surfactante a) CTAB 5Mm, b) 10Mm c) 15Mm y d) 20Mm



Figura 20. Conidias de CMU221 en presencia de Triton TX100 a concentración de a) 0.1%, b) 0.5% y c) 0.9%.

Cabe señalar que de acuerdo con la bibliografía, la lisis celular debe producirse cuando se utilizan concentraciones cercanas a la concentración micelar crítica. Considerando que los dos surfactantes que pueden formar micelas (CTAB y Triton X-100) se usan por arriba de esas concentraciones (1 mM y 0.2 mM, respectivamente) y no se produce daño aparente en las conidias, por lo que se comprueba el efecto protector que confiere la pared celular a las conidias. Un surfactante aniónico que puede formar micelas es el SDS; en este trabajo se decidió usar el HSS, debido a que el primero no es soluble en el buffer de corrimiento que ya se tenía (fosfatos 10 mM pH 8). Entonces, se decidió usar un compuesto de la misma familia pero de cadena más corta.

7.3 Electroferogramas de las conidias en presencia de surfactantes

De experimentos anteriores en los que se usó un equipo de microelectroforesis capilar con detección óptica (Castillo y Robinson, 2014), se sabe que las conidias en presencia de CTAB se agrupan y se adhieren a la pared del capilar, la migración de las conidias es hacia el polo negativo (Fig. 22) y conforme aumenta la concentración del CTAB, disminuye la velocidad de migración. Cabe señalar que el presente experimento y los subsecuentes, con otros surfactantes, se realizaron con los capilares llenos con la suspensión de las conidias.

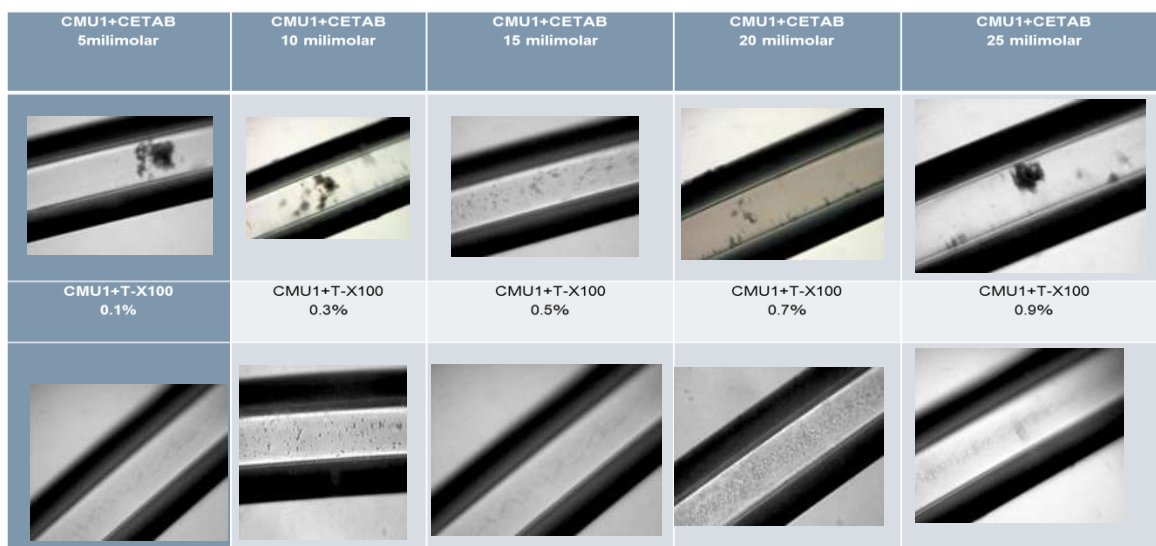


Figura 21. Comportamiento de las conidias en presencia CTAB) y Triton X-100, en microelectroforesis capilar adaptada a microscopio óptico.

Con Triton X-100 no se presenta adhesión de las conidias a la pared del capilar. La velocidad de migración es visiblemente mayor que con el CTAB. Al igual que con CTAB, a mayor concentración disminuye la velocidad de migración al grado de que en la concentración al 0.9% es casi nulo. La migración es de polo positivo al negativo. Ya que con HSS las conidias tienden a adherirse entre sí ya la pared del capilar y cuando migran, lo hacen hacia el polo positivo (Farías Rivero y Robinson Fuentes, 2014).

El siguiente paso era probar esas condiciones en el equipo comercial de electroforesis capilar para observar la movilidad electroforética y la adhesión a la pared interna del capilar. Para esto, se hicieron mediciones en polaridad normal (del polo positivo al negativo) y en polaridad inversa (del polo negativo al positivo) en este caso se llevó a cabo la inyección de las muestras de manera convencional en el equipo, que consiste en aplicar presión de 20 psi al vial de muestra por 5 segundos. Podemos observar que hay ciertas diferencias en el comportamiento de las diferentes cepas en los corrimientos electroforéticos. Ninguna de las cepas produce una señal ni en polaridad negativa ni positiva cuando se usa HSS (Tabla.7).

Tabla 7. Señales electroforéticas obtenidas con las cepas CMU1,CMU8, CMU218 y CMU221 de Trichoderma spp.

Surfactante	Concentración	Polaridad	Respuesta			
			CMU-1	CMU-8	CMU-218	CMU-221
CTAB	5 Mm	N	-	-	-	-
		R	Sí	Sí	-	-
	10 mM	N	-	-	-	-
		R	-	Sí	-	-
	15 mM	N	-	-	-	-
		R	Sí	Sí	-	Sí
	20 mM	N	-	-	-	-
		R	Sí	Sí	-	-
	25 mM	N	-	-	-	-
		R	Sí	Sí	Sí	Sí
HSS	Todas	N	-	-	-	-
		R	-	-	-	-
TX-100	0.1%	N	-	-	Si	-
		R	-	-	-	-
	0.3 %	N	Si	Si	Si	Si
		R	-	-	-	-
	0.5 %	N	Si	Si	Si	Si
		R	-	-	-	-
	0.7 %	N	Si	Si	Si	Si
		R	-	-	-	-
	0.9 %	N	Si	Si	Si	Si
		R	-	-	-	-

(N)= polaridad normal, (R)= polaridad inversa, (-)= ninguna señal electroforética, (Sí)= Buena señal electroforética.

En las figuras 22,23 y 24 podemos observar algunos ejemplos de las señales electroforéticas obtenidas con los diferentes surfactantes que son atribuidas únicamente a la movilidad de las conidias.

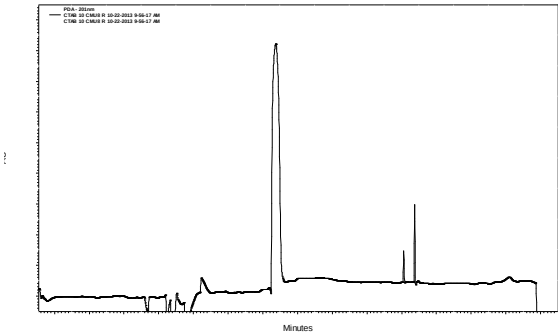


Figura 22. Electroferograma de la cepa CMU-8 usando buffer de fosfatos 10 mM pH 8 CTAB 10 mM y polaridad reversa.

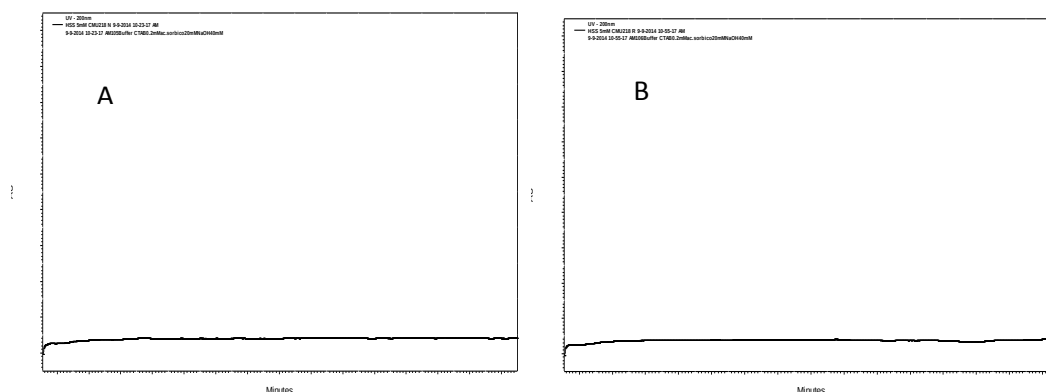


Figura 23. Electroferogramas de la cepa CMU-218 usando HSS 10 mM en buffer de fosfatos 10Mm pH 8, en A) polaridad normal y B) reversa .

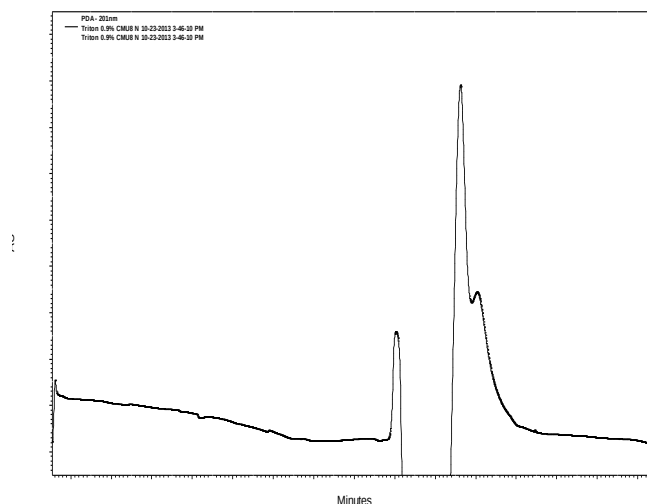


Figura 24. Electroferograma de la cepa CMU-8 con 0.9 % de TX-100 en buffer de fosfatos 10Mm pH 8, en polaridad normal.

De la tabla 7 Se sabe que el HSS más que ser un surfactante, es un formador de pares de iones altamente usado en HPLC para producir compuestos no polares que sean más fácilmente analizados por dicha técnica. Se menciona en algunos artículos que la familia de los sulfatos de sodio, entre ellos el heptano sulfonato de sodio muestra una alta efectividad en la desnaturalización de tejidos provenientes de hongos filamentosos [Rojas, 2011]. Este compuesto funciona mediante la interrupción de enlaces no covalentes, provocando que las moléculas pierdan su forma nativa y aportándoles sus cargas negativas. Esta nueva carga negativa es

significativamente mayor que la carga original, produciendo una repulsión electrostática. Esto podría explicar la ausencia de señales electroforéticas en las cepas tratadas con dicho surfactante, ya que el capilar en el que se lleva a cabo los corrimientos electroforéticos contiene en su pared interna grupos silanol (SiO^-) con carga negativa, al contar ambos grupos con la misma polaridad se produce una fuerza de repulsión electrostática lo que provoca que los grupos silanol con carga negativa que conforman la pared interna del capilar repelan a las partículas con carga negativa que intentan entrar al capilar, desviando su trayectoria [Vicente, 2010; Cázares, 2009; Rojas y col, 2011].

Con el CTAB se tiene un comportamiento distinto para las diferentes concentraciones y las diferentes cepas. La mayor concentración de CTAB, 25 mM, ocasiona una señal para todas las cepas; mientras que las cepas CMU-1 y CMU-8, producen señales en prácticamente todas las concentraciones. La cepa CMU-218, produce señales solo en la mayor concentración mientras que la cepa CMU-221, las produce en otras concentraciones menores. Esto indica que hay ciertas diferencias en las superficies celulares. A pesar de estas diferencias en las superficies celulares de las conidias, la mayoría muestra similitud en las señales electroforéticas obtenidas que nos indica la movilidad electroforética de las conidias y podría corroborar el agrupamiento de éstas, observadas en experimentos anteriores de microelectroforesis capilar adaptada a microscopio óptico. Los surfactantes forman agregados micelares dependiendo de su concentración en solución, lo cual determina su grado de asociación de los unímeros. Para la formación de micelas esféricas en solución es necesario alcanzar la CMC del surfactante, que en el caso del CTAB es de 0.0015 mM. Al aumentar la concentración del surfactante es posible llegar a una concentración de formación de rodillos y cilindros (CRC) a partir de la cual el nivel de agregación aumenta y es posible formar estas estructuras que además tienen diferentes longitudes. El Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) puede formar estructuras tipo rodillo y gusano a una CRC de 300 mM, pudiendo inducir la formación de micelas gusano a concentraciones más bajas adicionando al sistema una sal, en este caso se utilizó la solución de fosfato de potasio monobásico 10mM en mezcla con dicho surfactante, lo que permite que pueda formar una estructura cilíndrica empaquetada, que también presentan la capacidad de interactuar entre sí y

formar ramificaciones y enredos para formar estructuras interconectadas a altas concentraciones. Esto podría ser la explicación a la causa del agrupamiento de las conidias suspendidas en CTAB a concentraciones de 5-25mM, mayores a su CMC [Rojas, 2006; Castillo y Robinson, 2013]

Por otro lado, el Triton X-100 produce señales en todas las cepas a concentraciones mayores al 0.3%. La altura de la señal cambia ligeramente conforme se aumenta la concentración del surfactante. Todas las señales se observan cuando la polaridad usada es normal. Las señales se observan después de la señal correspondiente al flujo electroosmótico lo que indica la carga negativa de las conidias/agregados de conidias. Los surfactantes se clasifican de acuerdo a la carga que aporta el grupo polar, en el caso del Triton X-100 el grupo polar no contiene carga por lo que pertenece a los surfactantes no iónicos. Las moléculas anfifílicas minimizan las interacciones solvofóbicas desfavorables formando agregados espontáneamente y generando una variedad de nanoestructuras, siendo la micela la más simple de estas. Las micelas del surfactante al estar presentes en el sistema se agregan entre sí formando complejos con las conidias, en las que las cadenas de hidrocarburos se separan de los solventes polares y quedan orientadas hacia el centro del agregado, mientras que los grupos polares quedan interactuando con los solventes polares. El crecimiento de los agregados tiene límites específicos, dejando de crecer cuando han alcanzado un cierto tamaño. Por encima de su CMC el aumento de concentración del tensoactivo produce un número mayor de micelas, en lugar del crecimiento de las micelas ya existentes, esto explica el aumento en la señal electroforética conforme va aumentando la concentración ya que a la adición de surfactante aumenta la formación de agregados. Los agregados formados por micelas/conidias no presentan carga, por lo que no existe atracción electrostática con los grupos silanol (SiO^-) que contiene la pared del capilar, lo que explica que no se observe adherimiento de conidias a la pared del capilar [<http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI118990.pdf>].

7.4 Análisis de conidias usando mezclas de surfactantes.

En vista de que los surfactantes iónicos ocasionan el agrupamiento de las conidias y su adherencia a las paredes del capilar, mientras que el Triton X-100, no permite que se agreguen pero tampoco que se adhieran al capilar, se decidió usar mezclas de los surfactantes para utilizar ambas propiedades. Se preparó BGE que contenía Triton X-100 a diferentes concentraciones y se usaron los surfactantes iónicos en la suspensión de las conidias. En el caso de las mezclas HSS-TX-100, no se obtuvieron mejores señales que las obtenidas con el HSS de manera individual, esto debido a que el Triton X100 al ser un surfactante no iónico no modifica la carga negativa de las conidias ni del sistema permaneciendo la fuerza de repulsión electrostática. En el caso de las combinaciones CTAB-Triton X-100 se obtuvieron señales mucho más grandes, lo que indica un mayor agrupamiento de conidias, tanto en polaridad normal como inversa, debido a que el Triton X-100 impide la atracción electrostática entre las cargas del CTAB y los grupos silanol (SiO^-), permitiendo mayor movilidad electroforética de las micelas gusano formadas por el surfactante catiónico CTAB.

7.5 Análisis de la movilidad electroforética de las conidias.

Se analizó la movilidad electroforética de las conidias de acuerdo al aumento de la concentración de los surfactantes en los que se encuentra en suspensión (Fig. 26) . Se muestra la μ_{ep} de las cepas CMU1, CMU8 y CMU221 presentando un ligero cambio en la movilidad pero con comportamiento similar, lo que nos indica que presentan pequeñas diferencias en su pared celular. El comportamiento de las conidias de las cepas CMU1 y CMU8 en presencia del CTAB fue diferente mostrando una línea totalmente distinta que corrobora la diferencia en la pared celular entre ambas cepas, pero de igual manera muestran disminución en su μ_{ep} conforme va aumentando la concentración del surfactante (Fig. 27), dicho comportamiento puede deberse a que a mayor concentración de la solución mayor disponibilidad de moléculas que interaccionen formando conglomerados de mayor tamaño que provocan mayor rozamiento y por lo tanto disminuye su movilidad electroforética.

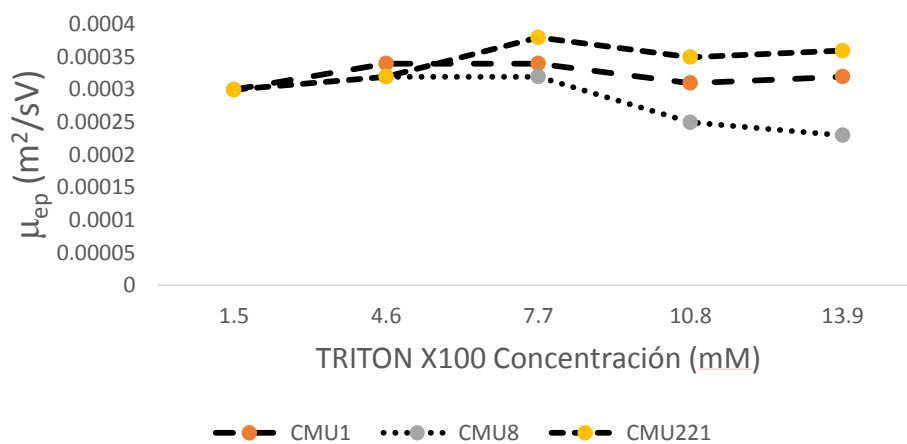


Figura 25. Comportamiento de las conidias de las cepas de *Trichoderma* CMU1, CMU8, CMU221 conforme aumenta la concentración de T X-100.

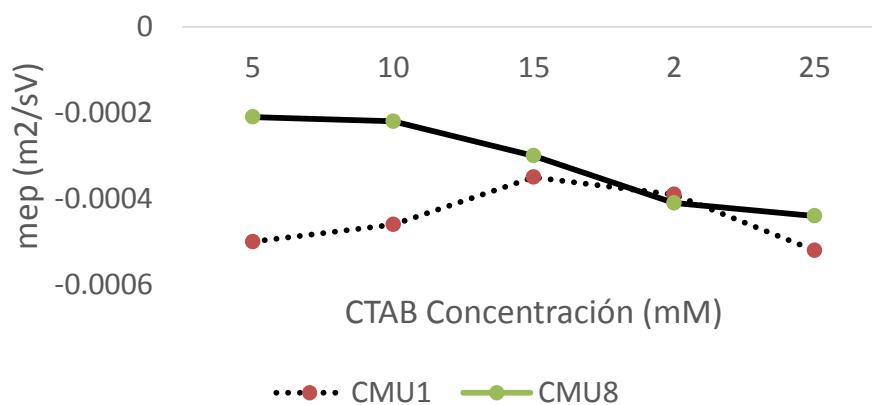


Figura 26. Comportamiento de las conidias de cepas de *Trichoderma* spp CMU1 y CMU8 conforme aumenta la concentración de CTAB.

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

Con el surfactante aniónico HSS no se lograron buenas señales electroforéticas. En presencia del surfactante catiónico CTAB se observó agrupamiento de las conidias y adherencia a la pared del capilar y se obtuvieron buenas señales electroforéticas. Con el surfactante no iónico Triton X100 se observó mayor movilidad sin adherencia a la pared ni agrupamiento entre las conidias.

Las mezclas con CTAB y Triton X100 mejoraron las señales electroforéticas.

Los surfactantes no tuvieron efecto sobre la viabilidad de las conidias,

IX. CONCLUSIÓN

Los surfactantes ejercieron un efecto en la movilidad y en la agrupación de las conidias de la cepa silvestre de *T. atroviride*.

X. PERSPECTIVAS

Disminuir la concentración en muestras de conidias de las cepas de *Trichoderma* spp, para obtener señales electroforéticas más pequeñas y mejor definidas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Aguilar, K.; M. Mata; Umaña, L. 1999. Fungi Notas. Santo Domingo de Heredia, Instituto Nacional de Biodiversidad. P 70.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., De la Cruz, J., Monte, E. and Llobell, A. (2001) An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13Æ1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 67, 5833–5839.
- Alexopoulos CJ, Mims CW. 1985. Introducción a la micología. 3ª edición ed. Barcelona, España: Ediciones Omega.
- Armstrong DW, Schneiderheinze JM. 2000. Rapid identification of the bacterial pathogens responsible for urinary tract infections using direct injection CE. *Analytical chemistry*; 72(18):4474-6.
- Avila Quintero JL. 2011. Hongos fitopatógenos aislados de cultivar de guayaba (*Psidium guajava*): Sensibilidad a fungicidas y caracterización electroforética de conidios. Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Báñez Chicharro F. 2010. "CONTROL DE FILTROS ACTIVOS DE POTENCIA SERIE EN SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA". UNIVERSIDAD PONTIFICIA COMILLAS.
- Bao Y, Lantz AW, Crank JA, Huang J, Armstrong DW. 2008. The use of cationic surfactants and ionic liquids in the detection of microbial contamination by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 29(12):2587-92.
- Bonifaz A. 1998. Micología Médica Básica. 3ª reimpresión. Méndez Editores S.A de C.V. Pág.
- Butler MJ, Day AW. 1998. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol.*;44:1115-36.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The Fungi. 2a ed. CA,USA: Academic Press. Pág.
- Carrero I, Herráez A. El mundo de los lípidos. Sede web Biomodel, <http://biomodel.uah.es/model2/lip/inicio.htm>. 15/marzo/2015.
- Carzaniga R, Fiocco D, Bowyer P, O'Connell RJ. 2002. Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 15(3):216-24.
- Castagnino JM. 2000. Electroforesis capilar. *Bioquímica.*; 25(1):13-32, 13-16, 28-29.
- Castillo Najar W, Robinson Fuentes VA. 2013. "Evaluación del efecto de surfactantes catiónicos en la movilidad electroforética de conidios de *Trichoderma* spp". Artículo MEMORIA IN EXTENSO. 2º Verano Nicolaita de Investigación. UMSNH. Pág.37.
- Castillo Rodríguez MA, Revilla Vázquez AL, López Arellano R, Rivera García P. 2005. Fundamentos de electroforesis capilar. 1a ed. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. P 180.
- Cázares García SV. 2007. Estudio de la Factibilidad del Análisis de Células Fúngicas por Electroforesis Capilar. Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- Cázares García SV. 2009. Movilidad electroforética de células fúngicas. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Chaverri P, Castlebury LA, Overton BE, Samuels GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*. 95(6):1100-40.
- CHEMICO ESPECIALIDADES QUIMICAS S.A. DE C.V, <http://chemico.mx/DREAMWEAVER/CONTACTO.htm>. Fecha de consulta: 28/febrero/2015.
- Desai MJ, Armstrong DW. Separation, identification, and characterization of microorganisms by capillary electrophoresis. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2003;67(1):38-51, table of contents. Epub 2003/03/11.
- Farias Rivero NA, Robinson Fuentes VA. 2013. "Evaluación de la presencia de surfactantes aniónicos en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma*". 2ª Verano Nicolaita de Investigación. MEMORIA IN EXTENSO. UMSNH. Pág. 45.
- Fischer R, Kües U. Asexual Sporulation in Mycelial Fungi. In: Esser K, editor. *The Mycota*. 2da ed. New York, EUA: Springer; 2006. p. 263-92.
- Fuentes de Piedrahita. 1980. Los surfactantes: Clases, propiedades y usos en herbicidas. Tesis. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Gams W, Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocadium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis; 2002. p. 3-34.
- García Aguilar L. Determinación de las características electroforéticas de células miceliales. Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2009.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*. 84:377–393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature, Reviews* 2:43-56.
- Hayes MA, Kheterpal I, Ewing AG. 1993. Effects of buffer pH on electroosmotic flow control by an applied radial voltage for capillary zone electrophoresis. *Analytical chemistry*. 65(1):27-31.
- Heiger DN. 1992. High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction, Hewlett- Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 111:509-47.
- Horka M, Ruzicka F, Kubesova A, Hola V, Slais K. 2009. Capillary electrophoresis of conidia from cultivated microscopic filamentous fungi. *Analytical chemistry*. 81(10):3997-4004.
- Horka M, Kubesova A, Salplachta J, Zapletalova E, Horky J, Slais K. 2012. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS--suitable

- tools for identification of filamentous fungi. *Analytica chimica acta*. 716:155-62.
- Hoyos-Carbajal L, Bissett J. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. In: Grillo O, Venora G, editors. *The Dynamical processes of biodiversity-Case studies of evolution and spatial distribution*. 1a ed. Rijeka, Croacia: In Tech; 2011. p. 303-20.
- http://docsetools.com/articulos-utiles/article_101979.html. 20/febrero/2015.
- Introduction to Capillary Electrophoresis. Beckman Coulter, Inc. 2000.
- Jaklitsch WM. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in mycology*. 63:1-91.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443:818-22.
- Johnson M. 2013. Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States. DOI <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.163> original version : 2013-01-18. 13/febrero/2015.
- Johnstone Ralph, 2012. http://centrodeartigo.com/articulos-informativos/article_66372.html
- Koneman EW, Stephen DA, William MJ, Schieckenerger PC y Winn WC. 1999. *Diagnostico Microbiológico. Texto y Atlas a color*. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana. P. 955-1037.
- Kubicek Pranz EM. 2002. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis. p. 95-119.
- Klein D, Eveleigh DE. 2002. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis. p. 57-74.
- López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares R. 2006. *Micología médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 2ª edición ed. México, D.F.: Editorial Trillas; 192 p.
- Monte E, Llovel A. 2003. "TRICHODERMA IN ORGANIC AGRICULTURE". V Congreso Mundial del Aguacate.
- Ortuño Noel , Miranda Claudia , Claros Mayra, 2013. "Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. Artículo de Investigación. *Journal of the Selva Andina Biosphere*. Pág. 16-19.
- Pérez Arévalo JF. "Síntesis de materiales nanoestructurados de sílice a partir de tensoactivos orgánicos iónicos y no iónicos". Doctorado en ciencias de la división de ciencias básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Pág. 6-8, 16.
- Moon G, Kim Y. 2003. Analysis of health-related microbes by capillary electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*. 24(8):1203-6.
- Petr J, Ryparova O, Ranc V, Hinnerova P, Znalezona J, Kowalska M, et al. 2009. Assessment of CE for the identification of microorganisms. *Electrophoresis*. 30(3):444-9.

- Rojas Cardozo M. R. Reología De fluidos complejos formados por mezclas de surfactantes y mezclas polímero-surfactante. Tesis de Maestria. Universidad Simon Bolivar. 2006. Pág 2-5, 8-12.
- Rojas L., Orelvis Portal, Jiménez E. Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos, *Autor para correspondencia, octubre - diciembre, 2011, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.
- Robinson Fuentes VA. Introducción a la Electroforesis capilar. Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2006; pág. 33, 34.
- Rubinson, K. A., Rubinson, J. F. 2001. "Análisis Instrumental". Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 2ª edición.
- Salager JL, Fernández A. 2004 Surfactantes. PLAN PILOTO en ESPECIALIDADES QUIMICAS Universidad de los Andes. Mérida, Valenzuela. Pág. 2-3, 9.
- Schwartz H, Guttman A. Separation of DNA by Capillary Electrophoresis. Beckman Instruments, Inc. Palomar Analytical Services Redwood City, CA. Pág.1-15.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2001. Principios de análisis instrumental. Capitulo 30 Electroforesis capilar y electrocromatografía. 5ta ed. Madrid, España: McGraw-Hill. Pág. 847
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., y Coronado, M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía (Luz) 16:509-516
- Szpoganicz B, Gidanian S, Kong P, Farmer P. Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions. Journal of inorganic biochemistry. 2002;89(1-2):45-53. Epub 2002/04/05.
- Teglia CM; Robles JC.; De Zan MM.; Camara MS. Desarrollo, optimización y validación de un método por cromatografía líquida con apareamiento iónico para la determinación de nicarbazina en preparaciones de uso veterinario. Universidad Nacional del Sur, 2009. http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=glifosato&id=41203&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1334237. Fecha de consulta: 25/Enero/2015.
- Taxonomy ISoTaG. Viena, Austria 2013 [cited 2013 Abril]; Available from: <http://isth.info/>. Fecha de consulta. 12/marzo/2015.
- Vicente P. 2010 Repulsión electrostática. http://ia601tesvg.blogspot.mx/2010/06/cuadro-de-contenido-1_13.html. Fecha de consulta. 13/abril/2015
- Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. Journal of medical microbiology. 2004;53(Pt 3):175-81.