



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"  
División de Estudios de Posgrado**

**MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

*Maestra en Ciencias de la Salud*

**PRESENTA:**

*Q.F.B. Saila Viridiana Cázares García*

**DIRECTORA DE TESIS:**

*D.C. Virginia A. Robinson Fuentes*

**MORELIA, MICHOACÁN. 2009.**

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

*A mi Hijo*

*A mi Padre*

*A mi Madre*

*A mi Esposo*

## *Agradecimientos*

D.C. Virginia A. Robinson Fuentes

D.C. Soledad Vázquez Garcidueñas

D.C. Gerardo Vázquez Marrufo

M.C. Edith Higuareda Mendoza

### *A mis amigas*

Q. F. B. Gliana Tafolla Muñoz

C. D. E. E. Gabriela López Torres

Q. F. B. Claudia Basaldúa Ponce

# MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS



## ÍNDICE GENERAL

	Pag.
Índice de figuras.	8
Índice de tablas.	10
Abreviaturas usadas.	11
Resumen.	12
1. Introducción.	13
2. Marco teórico.	15
2.1 Hongos.	15
2.1.1 Reproducción.	16
2.1.1.a Reproducción sexual y asexual.	16
2.2 Ciclos de vida de los diferentes filos.	16
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Zygomycota</i> .	16
2.2.2 Ciclo de vida de <i>Ascomycota</i> .	17
2.2.3 Ciclo de vida de <i>Basidiomycota</i> .	18
2.3 Esporas fúngicas.	19
2.4 Pared celular fúngica.	20
2.4.1 Composición química y organización de la pared celular fúngica.	21
2.5 Importancia biológica de los distintos filos.	24
2.5.1 Filo <i>Zygomycota</i> .	24
2.5.2 Filo <i>Ascomycota</i> .	24
2.5.3 Filo <i>Basidiomycota</i> .	25
2.6 Importancia del análisis de células fúngicas.	25
2.7 Técnicas empleadas en el análisis de hongos.	26
2.8 Electroforesis capilar.	28
2.8.1 Componentes de un sistema de electroforesis capilar.	29
2.9 Factores que causan la movilidad del analito en el sistema de electroforesis capilar.	30
2.9.1 Flujo electroosmótico (EOF).	30
2.9.2 Movilidad electroforética.	31
2.9.3 Movilidad electroforética aparente.	32
2.10 Aplicaciones generales de la EC.	33
2.11 Origen de la carga de un microorganismo.	33
2.12 Caracterización de un microorganismo por EC.	34
3. Planteamiento.	36
4. Justificación.	37
5. Hipótesis	38
6. Objetivos.	39
6.1 Objetivo general.	39
6.2 Objetivos particulares.	39
7. Parte experimental.	40
7.1 Materiales y Métodos.	40
7.1.1 Reactivos.	40
7.1.2 Medio de cultivo.	41
7.1.2.a Agar papa dextrosa (PDA) BD Bioxon®.	41

7.1.2.b Agar papa dextrosa (PDA) BD Difco ®.	41
7.2 Cepas estudiadas.	41
7.3 Preparación del buffer.	42
7.4 Observación microscópica.	43
7.5 Obtención de esporas.	43
7.5.1 <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Amylomyses rouxii</i> .	43
7.5.2 <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> .	43
7.6 Preparación de la muestra.	44
7.7 Instrumentación.	44
7.8 Condiciones electroforéticas.	44
8. Resultados y discusión.	46
8.1 Cultivo y obtención de esporas.	46
8.2 Esporas fúngicas como analitos electroforéticos.	46
8.3 Efecto del tipo de buffer en el análisis electroforético de las esporas fúngicas.	48
8.3.1 <i>Amylomyses rouxii</i> .	49
8.3.2 <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> .	51
8.3.3 <i>Trichoderma atroviride</i> .	54
8.4 Efecto de la concentración del buffer.	56
8.4.1 <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> .	57
8.4.1.a Efecto de la concentración del buffer sobre la $\mu_{ep}$ en esporas de <i>A. bisporus</i> .	61
8.4.2 <i>Amylomyses rouxii</i> .	63
8.4.2.a Efecto de la concentración del buffer sobre la $\mu_{ep}$ en esporas de <i>A. rouxii</i> .	68
8.4.3 <i>Trichoderma atroviride</i> .	70
8.5 Condiciones bajo las cuales se obtuvo la mejor señal electroforética.	75
8.6 Efecto del pH del buffer.	76
8.6.1 <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> .	76
8.6.2 <i>Amylomyses rouxii</i> .	78
8.6.3 <i>Trichoderma atroviride</i> .	81
8.7 Efecto del voltaje aplicado.	82
8.7.1 <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> .	83
8.7.2 <i>Amylomyses rouxii</i> .	85
8.7.3 <i>Trichoderma atroviride</i> .	86
8.8 Efecto de la suspensión de esporas fúngicas.	88
8.9 Efecto de la longitud del capilar.	90
8.10 Efecto del diámetro interno del capilar.	91
8.11 Efecto de tiempo de inyección de la muestra.	92
8.12 Separación de esporas en mezcla.	94
8.13 Viabilidad de las esporas fúngicas.	95
9. Resumen de resultados.	96
10. Conclusiones.	97
11. Perspectivas.	98
12. Referencias bibliográficas.	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1.	Hifas cenocíticas y septadas.	15
2.	Reproducción asexual y sexual de un <i>Zygomycota</i> .	17
3.	Reproducción asexual y sexual de un <i>Ascomycota</i> .	18
4.	Reproducción sexual de un <i>Basidiomycota</i> .	19
5.	Esporas sexuales de <i>Agaricus bisporus</i> .	20
6.	Esporas asexuales. Esporangios y esporangiosporas de <i>Mucor racemosus</i> .	20
7.	$\beta$ -1,3-glucano. Componente más abundante de la pared celular de los hongos.	21
8.	Quitina. Componente más representativo de la pared celular de los hongos.	22
9.	Organización de la pared celular fúngica.	23
10.	Componentes básicos del equipo de electroforesis capilar.	29
11.	Doble capa eléctrica que genera el EOF.	30
12.	Movilidad electroforética aparente.	32
13.	Sistema de Electroforesis Capilar.	44
14.	Desarrollo característico en PDA de las cepas de <i>Amylomyses rouxii</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> y Basidiocarpo de <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> .	46
15.	Esporas de <i>Amylomyses rouxii</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> .	47
16.	Efecto del tipo de BGE sobre la forma y tamaño de la señal electroforética en <i>A. rouxii</i> .	50
17.	Análisis microscópico de <i>A. rouxii</i> .	51
18.	Efecto del tipo de BGE sobre la forma y tamaño de la señal electroforética de <i>A. bisporus</i> .	52
19.	Análisis microscópico de <i>A. bisporus</i> .	53
20.	Efecto del tipo de BGE sobre la forma y tamaño de la señal electroforética en <i>A. rouxii</i> .	54
21.	Análisis microscópico de <i>T. atroviride</i> .	55
22.	Efecto de la concentración de fosfato de sodio sobre la resolución y tiempo de migración en esporas de <i>A. bisporus</i> .	57
23.	Efecto de la concentración de fosfato de potasio sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. bisporus</i> .	58
24.	Efecto de la concentración de borato de sodio sobre la forma y tamaño de la señal electroforética.	59
25.	Efecto de la concentración de TRIS sobre la resolución y movilidad electroforética en el estudio de esporas de <i>A. bisporus</i> .	59
26.	Efecto de la concentración de EDTA sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. bisporus</i> .	60
27.	Efecto de la concentración del BGE sobre la resolución y movilidad electroforética en el estudio de esporas de <i>A. bisporus</i> .	61
28.	Efecto de la concentración de fosfato de sodio y borato de sodio sobre la $\mu_{ep}$ en el análisis de esporas de <i>A. bisporus</i> .	62
29.	Efecto de la concentración de TBE y TRIS sobre la $\mu_{ep}$ en el análisis de esporas de <i>A. bisporus</i> .	63
30.	Efecto de la concentración de fosfato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. rouxii</i> .	64
31.	Efecto de la concentración de fosfato de potasio sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. rouxii</i> .	65

## MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS

32.	Efecto de la concentración de borato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. rouxii</i> .	66
33.	Efecto de la concentración de TRIS sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. rouxii</i> .	66
34.	Efecto de la concentración de EDTA sobre la forma de la señal electroforética en esporas de <i>A. rouxii</i> .	67
35.	Efecto de la concentración de TBE sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. rouxii</i> .	68
36.	Efecto de la concentración de fosfato de potasio, fosfato de sodio y borato de sodio, sobre la $\mu_{ep}$ de <i>A. rouxii</i> .	69
37.	Efecto de la concentración de fosfato de sodio en la forma de la señal electroforética de <i>T. atroviride</i> .	70
38.	Efecto de la concentración de fosfato de potasio en la forma de la señal electroforética de <i>T. atroviride</i> .	71
39.	Efecto de la concentración de borato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de <i>T. atroviride</i> .	71
40.	Efecto de la concentración de TRIS sobre la forma de la señal electroforética de <i>T. atroviride</i> .	72
41.	Efecto de la concentración de TBE sobre la forma de la señal electroforética de <i>T. atroviride</i> .	73
42.	Representación del efecto stacking de las esporas de <i>T. atroviride</i> .	74
43.	Influencia del pH de fosfato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de <i>Agaricus bisporus</i> .	77
44.	Influencia del pH de fosfato de potasio sobre la forma de la señal electroforética de <i>Agaricus bisporus</i> .	78
45.	Influencia del pH de fosfato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de <i>Agaricus bisporus</i> .	79
46.	Influencia del pH de borato de sodio en la forma de la señal electroforética de <i>A. rouxii</i> .	80
47.	Influencia del pH de fosfato de potasio en la forma de la señal electroforética de <i>A. rouxii</i> .	80
48.	Influencia del pH de fosfato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de <i>T. atroviride</i> .	81
49.	Influencia del pH de fosfato de potasio sobre la forma de la señal electroforética de <i>T. atroviride</i> .	82
50.	Efecto del voltaje aplicado sobre $\mu_{ep}$ de <i>A. bisporus</i> .	84
51.	Efecto del voltaje aplicado sobre la forma de la señal electroforética de <i>A. bisporus</i> .	84
52.	Efecto del voltaje aplicado sobre $\mu_{ep}$ de <i>A. rouxii</i> .	85
53.	Efecto del voltaje aplicado sobre la forma de la señal electroforética en <i>T. atroviride</i> . BGE TRIS.	86
54.	Efecto del voltaje aplicado sobre la forma de la señal electroforética en <i>T. atroviride</i> . BGE TBE.	87
55.	Efecto del tiempo de suspensión sobre la $\mu_{ep}$ de <i>A. bisporus</i> .	88
56.	Efecto del tiempo de suspensión sobre la $\mu_{ep}$ de <i>A. rouxii</i> .	89
57.	Efecto de la $L_t$ del capilar sobre el tiempo de migración de las esporas fúngicas de <i>Amylomyses rouxii</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Agaricus bisporus</i> .	90
58.	Efecto del d.i. del capilar sobre la forma la señal electroforética de <i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Amylomyses rouxii</i> .	92
59.	Efecto del tiempo de inyección de la muestra en <i>Agaricus bisporus</i> .	93
60.	Separación electroforética de <i>T. atroviride</i> y <i>Agaricus bisporus</i> en mezcla.	94
61.	Viabilidad de las esporas de <i>T. atroviride</i> luego del análisis electroforético. Cultivo en PDA.	95

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Constituyentes comunes de las divisiones del reino Fungi.	23
2.	Reactivos.	40
3.	Cepas estudiadas y condiciones de cultivo.	41
4.	Soluciones buffer.	42
5.	Valores de pKa de algunas soluciones buffer empleadas en EC.	48
6.	Influencia del tipo de buffer sobre el tiempo de migración en <i>A. rouxii</i> .	50
7.	Influencia del tipo de buffer sobre el tiempo de migración en <i>A. bisporus</i> .	53
8.	Condiciones para el análisis de células fúngicas.	75

## ABREVIATURAS

$\mu_{ep}$	Movilidad electroforética
$L_t$	Longitud total
$L_d$	Longitud efectiva
EOF	Flujo electroosmótico
BGE	Buffer de corrimiento
EC	Electroforesis Capilar
UV	Ultravioleta
Kv	Kilovoltios
$t_m$	Tiempo de migración
PDA	Agar papa dextrosa

**RESUMEN**

El análisis de los hongos contribuye al entendimiento de fenómenos biológicos relacionados con su superficie, como son interacciones célula-célula, respuesta inmune, resistencia a medicamentos; al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, así como al aprovechamiento de sus diversas propiedades en áreas de interés médico y biotecnológico, por ejemplo. Los componentes de la pared celular como quitina,  $\beta$ - $\alpha$ -glucanos, manoproteínas, lípidos, pigmentos y sales orgánicas e inorgánicas les confieren propiedades fisicoquímicas a las diferentes especies, con lo cual se logran identificar y caracterizar. En este trabajo proponemos la EC para el estudio de esporas fúngicas. La EC es una técnica de separación que se basa en la diferente movilidad o velocidad de migración de las partículas cargadas debido a la acción de un campo eléctrico. El análisis se realiza en función de las diferentes movilidades electroforéticas, tomando en cuenta para ello la composición química de la pared. Se empleó el *Sistema de Electroforesis Capilar P/ ACE MDQ Beckman Coulter®* con DAD a 201 nm, T=25°C, 10, 15, 17 y 20 Kv. Las cepas en estudio fueron *Amylomyses rouxii*, *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus*. Las esporas son suspendidas en buffer de corrimiento (BGE). Los BGE fueron citrato de sodio, borato de sodio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, EDTA, TRIS y TBE, a un intervalo de pH de 5 a 9 y concentraciones de 10 a 30 mM. Se probaron capilares de sílice fundida de 75 y 100  $\mu$ m de d.i., con 20 y 38 cm de  $L_d$ . Cada buffer ofreció diferentes resultados en términos de banda electroforética. Al variar el pH se observó que, a mayor pH el tiempo de migración disminuye modificándose, por tanto, la  $\mu_{ep}$ . El incremento de la concentración del BGE produjo una disminución de la  $\mu_{ep}$  de las esporas fúngicas. El capilar de 100  $\mu$ m de d.i. y 48 cm de longitud permite una mayor sensibilidad al análisis. La movilidad electroforética de las células fúngicas es constante en corridas sucesivas bajo las mismas condiciones electroforéticas, dando tiempos de migración característicos para cada tipo de spora. También fue posible separar esporas de *T. atroviride* y *A. bisporus* en mezcla. El empleo de la EC en el estudio de esporas fúngicas permite la determinación de sus características electroforéticas para una mejor comprensión y subsecuente aprovechamiento de sus propiedades. Además, estos estudios pueden marcar la pauta para en un futuro emplear la EC en la caracterización de hongos de importancia médica.

## MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS

### 1. INTRODUCCIÓN

El análisis, caracterización e identificación de los hongos, es crucial en diversas áreas del conocimiento, por ejemplo en la industria alimenticia, farmacéutica, en el área de la medicina y en el sector público. Desde el punto de vista médico-clínico, es imprescindible la búsqueda e identificación del factor etiológico de una enfermedad infecciosa, lo cual es un paso necesario para el control y tratamiento de la enfermedad. Así mismo, en la industria alimenticia la presencia de hongos y sus metabolitos en los alimentos y granos en almacenamiento, pueden traer como resultado pérdidas económicas considerables, aunado a esto, las enfermedades producidas por productos contaminados son el resultado directo de graves problemas en la salud. El análisis de los hongos puede llevar al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de dichas enfermedades. En el área de la biotecnología, se ha incrementado el uso de los hongos en la obtención de alimentos y bebidas. Además, los hongos filamentosos producen el 25% de los antibióticos conocidos hasta el momento.

La identificación de los hongos se realiza principalmente mediante cultivos y observación microscópica. De esta manera se obtiene información sobre la morfología del hongo; sin embargo, estas técnicas requieren de tiempos largos de análisis debido a la preparación de la muestra y su cultivo. Actualmente existen nuevas metodologías como la detección de antígenos y/o anticuerpos, y la biología molecular; aunque para éstas se requiere de instrumentos complejos y personal altamente especializado, además de que la preparación de la muestra requiere de pasos complicados, reactivos muy caros y gran consumo de tiempo. Debido a estos inconvenientes se hace indispensable el desarrollo de una técnica rápida para la identificación y caracterización de hongos. Los componentes de la pared celular fúngica pueden contribuir al desarrollo de métodos de diagnóstico basados en su identificación. La pared celular fúngica está constituida por polisacáridos como quitina,  $\beta$  y  $\alpha$  – glucanas, y glicoproteínas; además, contiene pequeñas cantidades de lípidos, pigmentos como la melanina y sales orgánicas e inorgánicas. La composición predominante de los constituyentes de la pared celular, varía según el grupo taxonómico y le confiere diversas características a cada tipo de hongo. Además, el conocimiento de los componentes de la pared fúngica contribuye al entendimiento de fenómenos biológicos relacionados con su superficie.

En este trabajo proponemos la EC para el estudio y caracterización de esporas fúngicas tomando en cuenta para ello los componentes generales de las paredes celulares de los hongos y con esto obtener información sobre su comportamiento electroforético.

La EC es una técnica de separación que se basa en la velocidad de migración de las partículas cargadas, debido a la acción de un campo eléctrico. La separación se lleva a cabo en tubos capilares. La detección se realiza mediante la lectura de la absorbancia en la región del ultravioleta-visible. Es ideal para manipular cantidades pequeñas de muestra y reactivos, por lo que resulta ser una técnica económica; además, posee facilidad de empleo. Las ventajas de la EC se han extendido a la determinación de entidades biológicas como células y microorganismos, incluyendo virus y bacterias. Sin embargo, y a pesar de su importancia, son casi nulas las referencias que emplean EC para el estudio de células fúngicas. El análisis electroforético de células y microorganismos (MO) puede llevarse a cabo, ya que éstos se consideran como partículas coloidales debido a su tamaño y comportamiento en suspensión acuosa. La carga de los coloides puede ser adquirida por adsorción, al fijar cargas eléctricas o iones de la solución; o puede ser propia, al ionizarse los grupos funcionales presentes en su superficie. Los grupos ionizables sobre la superficie de los MO son aminoácidos, sulfatos, fosfatos, aminas y carboxilos. Factores como el pH, temperatura, concentración y tipo de buffer afectan la carga de la superficie, siendo éstas propiedades las que permiten analizar al MO por EC.

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1 HONGOS

Los hongos son organismos eucarióticos, aerobios y heterótrofos que poseen paredes celulares rígidas; incluyen desde organismos unicelulares hasta organismos pluricelulares macroscópicos. Debido a que carecen de clorofila, requieren una fuente externa de carbono y, de acuerdo con la clase de sustancia orgánica que aprovechen, actúan como saprófitos, parásitos o simbióticos. Son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza; constituyen uno de los cinco reinos de los seres vivos, el reino Fungi (Eumycotas), el cual actualmente está clasificado en los filos *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*<sup>33</sup>. Los hongos poseen gran diversidad de formas y tamaños y pueden vivir en sustratos y condiciones ambientales muy variadas. Pueden subsistir en rangos de pH muy amplios, aunque la mayoría viven en medios ligeramente ácidos, entre 6.0 y 6.5. La temperatura más adecuada para su desarrollo es de 25 a 28 °C. Además, la humedad relativa de 60 a 80% es importante para el desarrollo y fructificación de los hongos filamentosos<sup>27</sup>.

La unidad celular fundamental de un hongo es la hifa, éstas pueden ser septadas o cenocíticas [Fig. 1]; al conjunto de hifas se les denomina micelio. De acuerdo a su función, el micelio se clasifica en vegetativo y reproductor. El primero, inmerso en el sustrato, se encarga de la absorción y transformación de nutrientes, mientras que el segundo, también llamado aéreo, soporta las estructuras y formas de reproducción. La reproducción de un hongo puede ser sexual o asexual. Las estructuras de reproducción, por tanto, pueden ser de tipo sexual, denominándose esporas, en tanto que las de tipo asexual se denominan conidias<sup>34</sup>.

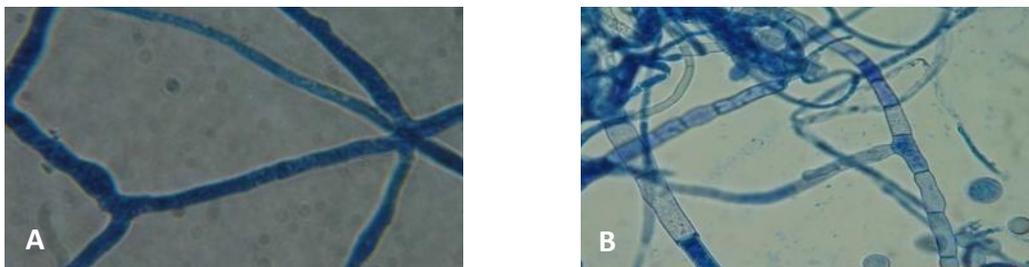


Fig. 1. A) Hifas cenocíticas; B) Hifas septadas.

### 2.1.1 REPRODUCCIÓN

Los hongos, como ya se mencionó, se reproducen de dos maneras: Sexual y Asexual. En la propagación de muchos hongos, la reproducción asexual tiene mayor influencia que la sexual, pues durante ésta se origina un mayor número de elementos reproductores y necesita condiciones menos críticas para efectuarse. Por otro lado, la reproducción sexual es indispensable para la formación de esporas con mayor capacidad de resistencia, lo que les permite sobrevivir en las condiciones más adversas<sup>27</sup>.

#### 2.1.1.a Reproducción Sexual y Asexual

La mayoría de los hongos poseen en su ciclo de vida tanto fase sexual como asexual. En la reproducción sexual, los hongos presentan órganos masculinos (-) y femeninos (+). El fenómeno completo comprende dos procesos: fecundación y meiosis, dando como resultado la formación de esporas sexuales con recombinación de material genético. La fase asexual involucra crecimiento vegetativo, que se efectúa por fragmentación de las hifas y el micelio, además no presenta unión de micelios sexuales o gametos<sup>27</sup>.

## 2.2 CICLOS DE VIDA DE LOS DIFERENTES PHYLA

### 2.2.1 Ciclo de Vida de *Zygomycota*

Los *Zygomycota* presentan reproducción sexual y asexual. La reproducción sexual inicia cuando las hifas especializadas, llamadas progametangios, de dos cepas compatibles se encuentran y se unen formando dos células apicales, los gametangios. Posteriormente se lleva a cabo la fecundación, donde ocurre la plasmogamia, que es la unión de los protoplasmas de las células sexuales y los núcleos de ambas se aproximan uno a otro; y la cariogamia, donde se lleva a cabo la fusión de los núcleos produciendo células diploides. La célula multinucleada resultante forma una pared dura y verrugosa, y se transforma en un zigosporangio latente que contiene una única zigospora. Cuando las condiciones ambientales son favorables, los núcleos diploides sufren meiosis. Luego ocurre la germinación, se rompe la pared del zigosporangio y emergen las zigosporas que serán transportadas por el viento y en condiciones adecuadas darán lugar a un nuevo micelio [Fig. 2].

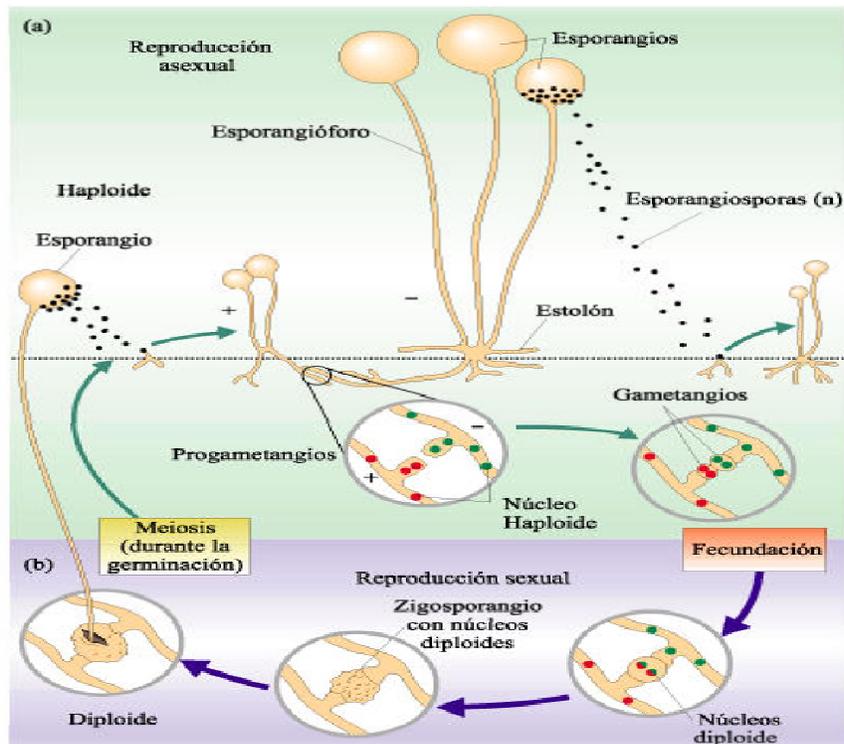


Fig. 2 Reproducción asexual y sexual de un *Zygomycota*.  
[www.botanica.cnba.uba.ar](http://www.botanica.cnba.uba.ar)

La reproducción asexual es mucho más sencilla; en ésta ocurre la formación de esporangióforos cuyos esporangios producen esporangiosporas del mismo tipo de compatibilidad sexual de la que les dio origen. Cuando los esporangios maduran, sus paredes se desintegran desprendiendo las esporas que son transportadas por el viento. En condiciones favorables de humedad y temperatura las esporas germinan y dan origen a un nuevo grupo de hifas<sup>27</sup>.

### 2.2.2 Ciclo de Vida de Ascomycota

La reproducción sexual de un *Ascomycota* es similar a la de *Zygomycota*. Incluye plasmogamia, cariogamia y meiosis. Sin embargo, el carácter esencial de estos hongos y al que deben su nombre es la formación de esporangios característicos de su estado de reproducción sexual, llamados ascas, en cuyo interior se generan esporas denominadas ascosporas. En ocasiones las ascas pueden quedar aisladas unas de otras, pero en la mayoría de los casos se agrupan en cuerpos fructíferos, microscópicos o macroscópicos llamados ascocarpos [Fig. 3].

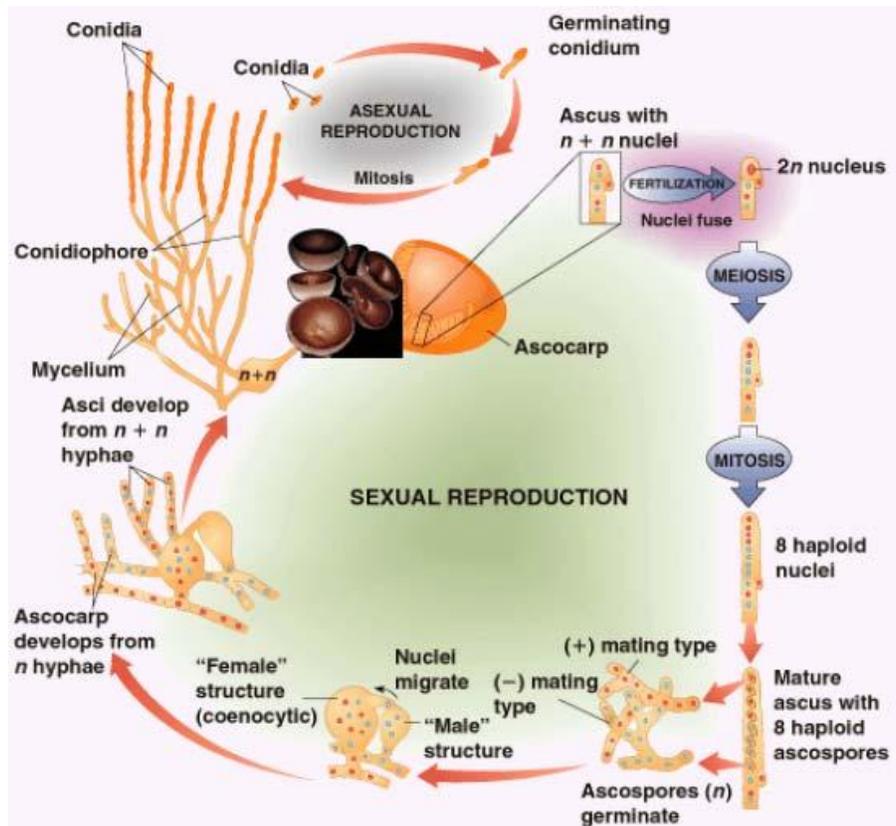


Fig. 3 Reproducción asexual y sexual de un *Ascomycota*.  
<http://images.google.es>

El resultado de la reproducción asexual es la formación de conidios o conidiosporas, los cuales se forman a partir de hifas somáticas llamadas conidióforos. A partir de la reproducción asexual de los *Ascomycota* también pueden desarrollarse cuerpos fructíferos con aspectos y colores muy diversos<sup>27</sup>.

### 2.2.3 Ciclo de Vida de un *Basidiomycota*

En los *Basidiomycota* la reproducción puede ser sexual o asexual, predominando o alternando una con respecto a la otra. Sin embargo, en muchos hongos de este filo no se conoce la reproducción asexual. Los *Basidiomycota*, durante su ciclo biológico, pasan por tres fases de desarrollo de su micelio, que corresponde a tres tipos: primario, secundario y terciario. Este último, es característico de la fase de reproducción sexual y se organiza en tejidos especializados para formar cuerpos fructíferos [Fig. 4].

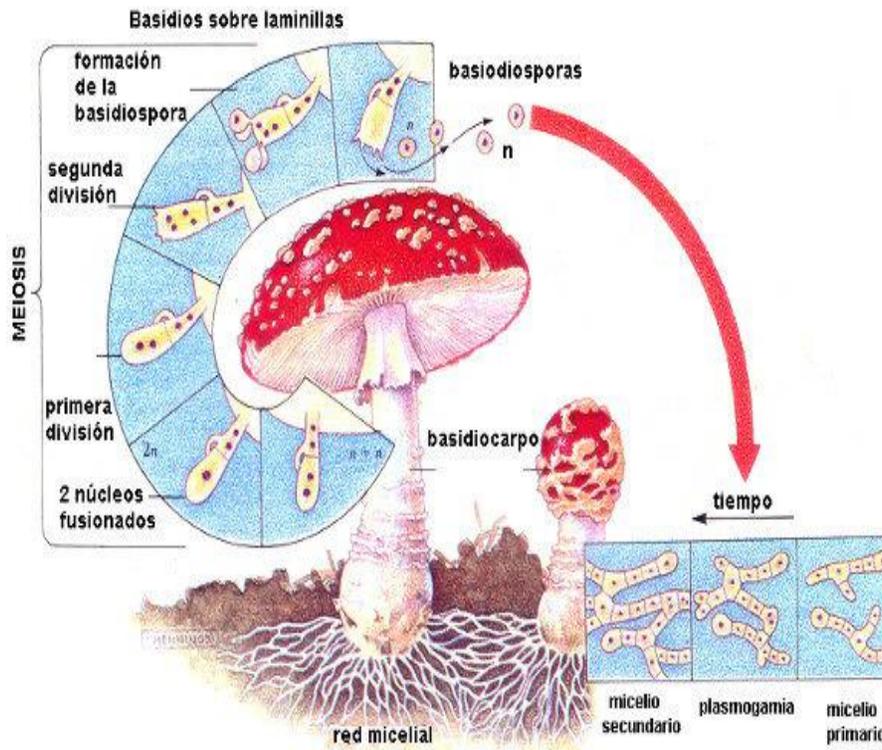


Fig. 4 Reproducción sexual de un *Basidiomycota*.  
<http://images.google.es>

La reproducción sexual inicia con la germinación de las basidiosporas y dan lugar a un micelio monocariótico primario. Esta fase suele ser corta, ya que pronto ocurre la somatogamia o fusión de hifas compatibles, en la cual se obtiene un micelio secundario, dicariótico. Este micelio, al agruparse en tejidos, se denomina terciario, dando lugar a cuerpos fructíferos, los basidiocarpos. Los basidios se disponen sobre y dentro del basidiocarpo, a menudo en el himenio, donde de cada uno dará lugar a cuatro basidiosporas externas<sup>27</sup>.

### 2.3 ESPORAS FÚNGICAS

Como resultado de la reproducción sexual y asexual, en los hongos se producen esporas características para cada grupo de hongo. En muchos hongos, las esporas no poseen pared celular y son flageladas, aunque la mayoría carecen de flagelos y tienen caracteres sumamente distintos. Todas son microscópicas, las hay muy pequeñas, de unos cuantos  $\mu\text{m}$  hasta  $20 \mu\text{m}$ . Poseen colores variables, desde hialinas hasta oscuras. Su forma puede ser esférica, cilíndrica u ovoide.

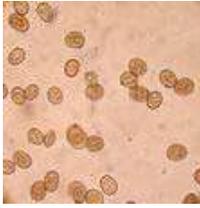


Fig. 5. Esporas sexuales de *Agaricus bisporus*.  
www.images.google.com.mx



Fig. 6. Esporas asexuales. Esporangios y esporangiosporas de *Mucor racemosus*.  
www.images.google.com.mx

Además tienen una amplia diversidad de aspecto externo conferido por su pared. De esta manera, pueden ser lisas, verrugosas o estriadas; en cuanto al número de células, pueden ser unicelulares, bicelulares o pluricelulares. Una característica importante de las esporas es que se originan en cantidades enormes, con lo cual se asegura la diseminación y propagación de la especie. Las esporas también constituyen formas de resistencia a las condiciones adversas del medio. La gran mayoría de las esporas fúngicas poseen pared sencilla o doble, protoplasma deshidratado y reservas; condiciones que les permiten vida latente en ambientes adversos de temperatura, humedad, pH y presión. Las esporas son elementos muy constantes, de tal forma que sus caracteres se han empleado en la identificación no solamente de clases, órdenes y familias, sino aún de géneros y especies. A partir de la reproducción sexual se producen esporas con diferentes nombres dependiendo de su origen y características. En los *Zygomycota* se denominan zigosporas, en los *Ascomycota* se producen ascosporas, y en los *Basidiomycota*, basidiosporas [Fig. 5]. Al igual que las esporas sexuales, las esporas asexuales se denominan de diversas formas. Ejemplos de esporas asexuales son: clamidosporas, esporangiosporas, clamidosporas y artrosporas [Fig. 6]<sup>27</sup>.

## 2.4 PARED CELULAR FÚNGICA

La mayoría de las células fúngicas ya sean hifas o esporas, están rodeadas por una pared celular, la cual es una estructura rígida que rodea la célula por la parte externa de la membrana plasmática y es esencial para el mantenimiento de la integridad del microorganismo. Constituye entre el 15 y 30% del peso seco de la célula. Es la encargada de dar la forma a la célula fúngica, así como de controlar la permeabilidad y protegerla de los daños químicos, mecánicos y osmóticos. Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella una amplia variedad de moléculas que actúan como receptores, que tras su activación, desencadenan una cascada de señalización en el interior de la célula. La interacción entre hongo y hospedero ocurre primeramente a nivel de la pared celular, por lo que juega un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica. Desde el punto de vista molecular, esta estructura rígida y aparentemente estática es realmente muy

dinámica, sufriendo modificaciones importantes a lo largo del ciclo celular o de procesos como la formación de septos, la esporulación y el crecimiento, por ejemplo<sup>35</sup>.

### 2.4.1 Composición Química y Organización de la Pared Celular Fúngica

El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared celular de los hongos y representa del 50 al 60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -1,3 (65-90%), aunque también están presentes glucanos con enlaces  $\beta$ -1,6,  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4. El  $\beta$ -1,3-glucano es el componente más abundante de la pared, compuesto por cadenas de unas 1500 unidades de glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,3-O-glucosídicos [Fig. 7]. En estas cadenas, cada 40 a 50 residuos se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces  $\beta$ -1,3, además contienen alrededor de un 3% de ramificaciones mediante enlaces  $\beta$ -1,6. El  $\beta$ -1,3-glucano puede estar unido a través de sus extremos no reductores a  $\beta$ -1,6-glucano, a quitina o a ambos.

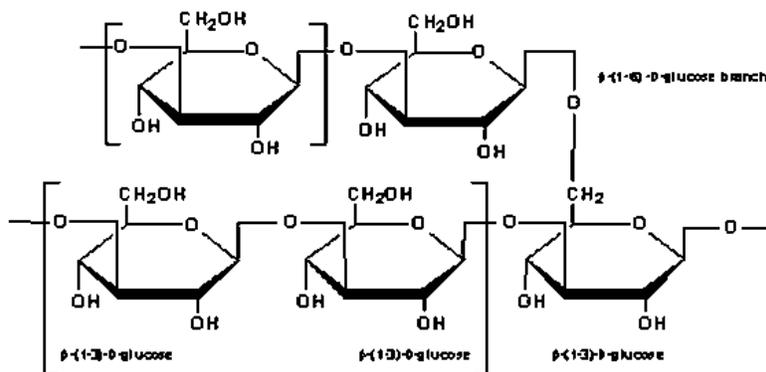


Fig. 7.  $\beta$ -1,3-glucano. Componente más abundante de la pared celular de los hongos.  
<http://images.google.es>

El  $\beta$ -1,6-glucano es un polímero muy ramificado constituido por aproximadamente 350 unidades de glucosa unidas entre sí mediante enlaces  $\beta$ -1,6 y una pequeña proporción de enlaces  $\beta$ -1,3. El  $\beta$ -1,6-glucano, juega un papel fundamental en la estructura de la pared celular, ya que enlaza todos los componentes de la misma. Otro componente indispensable en la pared celular de los hongos es la quitina, la cual representa de 1 a 2% del peso seco de la pared. La quitina es un polímero estructural formado por cadenas de 120 a 170 residuos de *N*-acetil-*D*-glucosamina con uniones  $\beta$ -1,4 [Fig. 8]. Las cadenas de quitina se localizan principalmente en

la zona próxima a la membrana plasmática. La función de los polímeros de glucano y de la quitina es la de proporcionar a la pared celular fuerza mecánica y rigidez, además de que contribuyen a la insolubilidad de éstos en álcali.

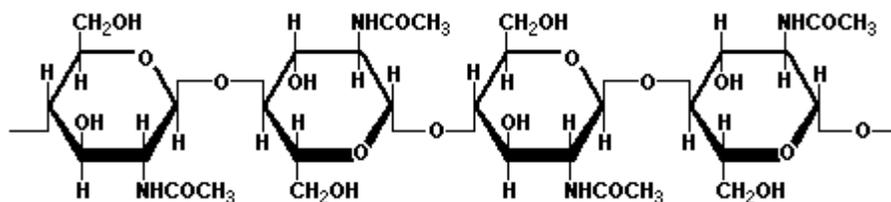


Fig. 8. Quitina. Componente más representativo de la pared celular de los hongos. Formado por residuos de N-cetil-D-glucosamina.  
<http://images.google.es>

Otros componentes importantes de la pared celular son las proteínas, las cuales representan del 20 al 30% del peso seco de la pared fúngica; en su mayoría se encuentran unidas a carbohidratos. Se trata de glicoproteínas con una porción glucosídica unida por medio de enlaces *O*-glucosídicos o *N*-glucosídicos. Las más estudiadas han sido las manoproteínas, polipéptidos que llegan a tener hasta 95% de carbohidratos. Funcionalmente se trata de proteínas que actúan como enzimas y antígenos de la pared, participan en el mantenimiento de la forma celular, en la transmisión de señales al citoplasma y en la remodelación de los componentes de la pared. Además, juegan un importante papel en la porosidad de la misma, participando en la absorción de moléculas y en ciertos hongos patógenos en aspectos relacionados con la patogenicidad como son la adhesión a tejidos y la inmunogenicidad que generan. Los lípidos se encuentran en una proporción del 2 al 10%, constituidos por ácidos grasos saturados, siendo los más abundantes C16 y C18. Son los encargados de dotar de flexibilidad, tersura y da carácter hidrofóbico a las células fúngicas. Además de estos componentes, se encuentran presentes en la pared celular pigmentos tales como la melanina, producto de la oxidación de diversos fenoles, cuya función es la de proteger a la hifa y esporas de la luz UV; es esencial para la patogénesis y anclaje a las diferentes superficies, se encuentra asociada a quitina y está relacionada con la resistencia a la lisis. En muy baja proporción, se encuentran sales inorgánicas y orgánicas que pueden estar constituidas tanto por cationes como por aniones. Los componentes de la pared celular fúngica, varían de acuerdo a las condiciones del medio que los rodea, además su composición puede variar con la edad del hongo. Por otro lado, el tipo y cantidad de polisacáridos varía según el grupo taxonómico [Tabla 1]<sup>35-41</sup>.

Tabla 1. Constituyentes comunes de las divisiones del reino Fungi.		
División	Compuestos fibrilares	Compuestos amorfos
Basidiomycota	Quitina	Xylomanoproteínas
	$\beta$ -1,3, $\beta$ -1,6-Glucano	$\alpha$ -1,3-Glucano
Ascomycota	Quitina	Galactomannoproteínas
	$\beta$ -1,3, $\beta$ -1,6-Glucano	$\alpha$ -1,3-Glucano
Zygomycota	Quitina	Acido poliglucurónico
	Quitosan	Glucuronomanoproteínas
		Polifosfato
Chytridiomycota	Quitina	Glucano
	Glucano	

En la organización de la pared fúngica se puede observar que está dispuesta en capas, según estudios de microscopía electrónica, con una región externa muy electrodensa de aspecto fibrilar y rica en manoproteínas y una capa interna amorfa, constituida básicamente por  $\beta$ -1,3-glucano, que a su vez consta de dos zonas: una interior menos amorfa vecina a la membrana plasmática y rica en proteínas, y una más externa, que contiene una proporción importante de  $\beta$ -1,6-Glucano. Las fibras insolubles de  $\beta$ -1,3-glucano se distribuyen alrededor de la superficie de la célula, uniéndose mediante un enlace covalente a las cadenas de quitina y conformando así la parte interna de la pared celular. Hacia el exterior de la pared se sitúan las manoproteínas unidas al extremo no reductor de las moléculas de  $\beta$ -1,3-glucano. También están presentes en la pared las proteínas unidas a quitina mediante cadenas cortas de  $\beta$ -1,6-glucano, aunque en menor proporción [Fig. 9].

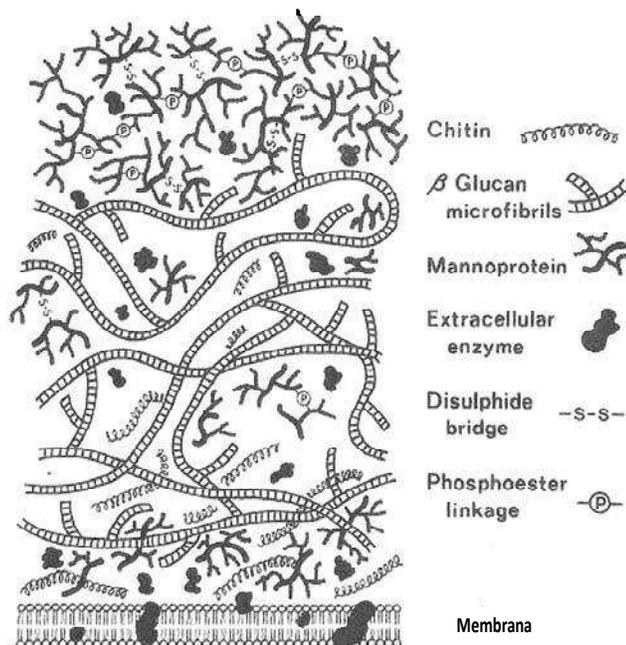


Fig. 9 Organización de la Pared Celular Fúngica  
<http://images.google.es>

El conocimiento de los componentes de la pared celular fúngica contribuye al entendimiento de fenómenos biológicos relacionados con su superficie, como son interacciones célula – célula, respuesta inmune, morfogénesis, resistencia a

medicamentos, entre otros. Por otro lado, contribuye al desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la identificación de dichos componentes<sup>35-41</sup>.

## 2.5 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS DISTINTOS PHYLA

### 2.5.1 Phylum *Zygomycota*

Incluyen aproximadamente el 1% de las especies de hongos descritas hasta el momento (~900 especies). Los *Zygomycota* están ampliamente distribuidos en la naturaleza como saprobios, parásitos o simbioses. Entre los saprobios los hay acuáticos y terrestres. Los acuáticos colaboran con las bacterias en la desintegración de los restos vegetales y animales, formando materiales sencillos que pueden utilizar numerosas plantas acuáticas. En cambio, los parásitos infectan algas y peces, así como crustáceos, ocasionando epidemias, especialmente en acuarios y estanques. Entre los *Zygomycota* terrestres se encuentran algunos que son temibles parásitos de plantas, destruyendo las cosechas y ocasionando pérdidas económicas considerables. Algunos, en cambio, como ciertas especies de *Mucorales*, son empleados en procesos industriales. Otros son parásitos de insectos, nemátodos y animales, así como del hombre, ocasionando infecciones oportunistas en personas diabéticas y pacientes inmunocomprometidos. Dos órdenes de importancia médica son los *Mucorales* (*Rhizopus sp.*) y *Entomophthorales* (*Conidiobolus coronatus*), agentes etiológicos de las zigomicosis.

### 2.5.2 Phylum *Ascomycota*

El fylum *Ascomycota* es cosmopolita y constituye el grupo mayor, con aproximadamente 75% de las especies de hongos descritas; viven en los medios más diversos y son de enorme importancia científica y práctica. Los *Ascomycota* pueden ser saprobios, parásitos y simbioses. Los saprobios colaboran con la degradación de compuestos orgánicos y en la producción de antibióticos. Los parásitos infectan plantas, provocando grandes pérdidas económicas; también parasitan animales silvestres, domésticos y al hombre. A este grupo pertenecen la mayoría de los hongos de importancia médica (*Histoplasma capsulatum*). Muchos *Ascomycota* son simbióticos y entre ellos se encuentran la mayor parte de los hongos que se asocian con las algas formando los líquenes. Otros forman micorrizas con plantas superiores (*Tuber*, *Morchella* y *Helvella*). Este fylum tiene especial importancia desde el punto de vista económico, puesto que contaminan y descomponen diversos alimentos y productos indispensables para el hombre. Por

otro lado, existen *Ascomycotas* que son de gran utilidad fermentativa, por lo que se emplean en la producción de alcohol etílico y en la elaboración de pan (*Saccharomyces cerevisiae*); otras levaduras se emplean como complementos alimenticios y en la producción de grasas y proteínas; ciertos mohos, como algunos *Penicillium* y *Aspergillus*, se utilizan en la fermentación y maduración de quesos<sup>27</sup>.

### 2.5.3 Fhylum *Basidiomycota*

Incluye a los hongos de mayor complejidad morfológica, contiene cerca de 30,000 especies descritas. Los basidiomicetes producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológica hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas; tales componentes son polisacáridos, glicoproteínas y ácidos nucleicos de los que se derivan sesquiterpenos, diterpenos, acetilenos, glicolípidos, policetonas, nucleósidos y sales de diazonio. Este fhylum constituye una clase de hongos cuyo metabolismo y capacidad de producción ha sido apenas investigada. Los basidiomicetes también producen infecciones oportunistas en pacientes con sistema inmune deprimido, por ejemplo *Criptococcus neoformans*, agente etiológico de la criptococosis<sup>27,43-44</sup>.

## 2.6 IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE CÉLULAS FÚNGICAS

El análisis, caracterización e identificación de los hongos es crucial en diversas áreas del conocimiento, así como en la industria alimenticia, farmacéutica, en el área de la medicina y en el sector público<sup>18</sup>. Desde el punto de vista médico-clínico, es imprescindible la búsqueda e identificación del factor etiológico de una enfermedad infecciosa, puesto que en las últimas dos décadas se ha observado un incremento en la patología fúngica, debido al aumento de pacientes inmunocomprometidos y al uso generalizado de numerosos medicamentos inmunosupresores para el tratamiento y control de enfermedades crónicas, neoplásicas, inmunológicas, etc.<sup>33,45-48</sup>. Su incidencia se ha tasado en un aumento de más del 300% en este corto periodo, presentándose cuadros de extrema gravedad y evolución aguda<sup>46</sup>. Aunque la mayoría de las micosis continúan siendo superficiales, factores climatológicos, socio-económicos y migratorios, pueden promover al desarrollo y generación de infecciones crónicas, las cuales son asintomáticas y regularmente no son tratadas, lo que en casos graves pueden ocasionar enfermedades sistémicas<sup>45-46</sup>. Recordemos que las micosis sistémicas

tienen un alto porcentaje de mortalidad, cifrado para algunas especies en el 100%; por lo que se deduce que es muy importante un diagnóstico rápido, además de la prescripción de un tratamiento específico que permita el uso racional de los antifúngicos, y con esto también, limitar la aparición de resistencias<sup>46</sup>. Así mismo, el análisis de los hongos puede llevar al desarrollo de nuevos fármacos con actividad antifúngica específica. En la industria alimenticia, la presencia de hongos y sus metabolitos (*Aspergillus flavus*: aflatoxinas) en los diversos alimentos y granos en almacenamiento pueden traer como resultado pérdidas económicas considerables, aunado a esto, las enfermedades producidas por productos contaminados son el resultado directo de graves problemas en la salud<sup>26</sup>. La mayoría de estos patógenos son capaces de crecer y desarrollarse en los alimentos, muchas de las veces sin producir cambios inmediatos en estos, como son olor, color o textura; por lo que el análisis mediante la identificación, monitoreo y cuantificación de los hongos y sus productos tóxicos es imprescindible<sup>21</sup>. Por otro lado, se ha incrementado el uso de los hongos en la obtención de alimentos y bebidas, ejemplo de ello es *Penicillium roquefortii* en la elaboración de quesos y *Aspergillus oryzae* para la producción de bebidas alcohólicas. En la industria farmacéutica una amplia variedad de hongos filamentosos son usados para la producción de antibióticos, entre los que se encuentran las penicilinas, producidas por *Penicillium notatum* y las cefalosporinas, sintetizadas por cepas de *Cephalosporium acremonium*<sup>27</sup>. El empleo de los hongos en la industria requiere de la identificación del organismo, un riguroso análisis de sus propiedades tanto superficiales como metabólicas, la determinación de su viabilidad y un total control microbiológico para evitar contaminación.

A pesar de los avances tecnológicos, la metodología del estudio e identificación de las células fúngicas continúa siendo insuficiente para lograr una mayor precisión y rapidez.

## 2.7 TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DE HONGOS

Los métodos usados tradicionalmente para el análisis fúngico son la microscopía y el cultivo, los cuales involucran la inoculación del MO en un medio de cultivo, seguido de incubación para su crecimiento y desarrollo, por varios días o hasta semanas. Posteriormente este medio es examinado para observar la presencia del hongo en cuestión. Esta técnica es capaz de determinar la presencia del microorganismo, permite su observación microscópica y la realización de estudios metabólicos. Sin embargo, presenta la gran desventaja de llevarse a cabo en un largo periodo de tiempo, así como su incapacidad para identificar al hongo a nivel de especie. Se han hecho algunas variaciones a este método para compensar el

tiempo que tarda en realizarse, sin embargo aún consume varios días para obtener resultados definitivos<sup>18,28</sup>. Por este motivo se han diseñado varias técnicas que poseen mayor rapidez y sensibilidad para el análisis, caracterización e identificación de células fúngicas. Estas técnicas incluyen, entre otras, pruebas serológicas, que permite la detección tanto de antígenos fúngicos como de la respuesta de anticuerpos que se producen durante el desarrollo de una infección y ELISA, con fines de diagnóstico. Por otro lado, técnicas como citometría de flujo, espectrometría de masas y de fluorescencia, análisis de proteínas y caracterización genotípica (PCR) se emplean primordialmente en investigación<sup>17,28-29</sup>. Muchos de estos procedimientos requieren la preparación de cultivos microbiológicos, con lo cual se alarga drásticamente el tiempo de análisis. Por ejemplo, los protocolos de citometría de flujo requieren del cultivo antes del estudio con la finalidad de incrementar la sensibilidad<sup>24</sup>. Las técnicas serológicas presentan una buena especificidad pero una baja sensibilidad, lo que dificulta la identificación, y se requiere de grandes concentraciones del hongo<sup>28</sup>. Recientemente, ha aumentado el empleo de técnicas moleculares como son la PCR para el estudio de los hongos a través de su material genético. El aspecto más interesante de estas técnicas reside en su gran especificidad, que permite, por una parte, la diferenciación de hongos muy similares y, por otra, la identificación de hongos poco conocidos, además se obtienen excelentes resultados de forma rápida<sup>2,28</sup>. Si bien, estas técnicas han sido de gran utilidad para el análisis de células fúngicas requieren de instrumentos complicados, gran consumo de reactivos y procedimientos complejos, por lo que en la mayoría de las ocasiones resultan ser técnicas muy caras. Es por ello que en años recientes se han desarrollado técnicas electrocinéticas como es la Electroforesis Capilar (EC) para el estudio de analitos microbiológicos. La EC se ha convertido en una importante herramienta para la identificación y estudio de las características de los MO gracias a sus propiedades como son, alto rendimiento, eficacia, sensibilidad y sobre todo rapidez<sup>25</sup>. Sin embargo, y a pesar del éxito obtenido en análisis de bacterias, virus y levaduras, son casi nulas las referencias que empleen la EC para el análisis de células fúngicas, ya sea en su forma micelial o como esporas. Dado la importancia que tienen las células fúngicas en la clínica, industria alimentaria y en biotecnología, así como en muchas otras áreas, se hace imprescindible su estudio. La EC promete ser una técnica adecuada para la caracterización, identificación y cuantificación de dichas células.

## 2.8 ELECTROFORESIS CAPILAR

La Electroforesis es en sus orígenes una técnica de separación basada en el fenómeno de la migración diferencial. Este fenómeno se describe como la velocidad que presentan partículas cargadas cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico<sup>4</sup>. Fue citado por primera vez en 1809 por *Reuss* en las memorias de la Sociedad Imperial Natural (Moscow, 1809)<sup>1</sup>; sin embargo, su importancia vino a incrementarse hasta 1937 cuando el químico sueco *Arne Tiselius* impulsó la electroforesis en solución libre, nombre que asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte. En los años siguientes, con la publicación de la doble hélice de DNA (Watson y Crick, 1953), la electroforesis se convierte en una herramienta indispensable para el estudio tanto de material genético como de péptidos y proteínas. Para 1967, *Hjerten* inicia el empleo de capilares milimétricos (3 mm) en la separación de sustancias neutras o iones cargados eléctricamente. Además, *Evereast* y cols., inician la medición de la absorción UV a través del capilar, lo que permitió obtener los espectros característicos de la separación. En 1969, *Virtanen* pudo reducir el diámetro capilar a 200 y 500  $\mu\text{m}$ , eliminando con esto, los problemas de convección. En la década de los 80's, *Mikkers* y cols., y *Jorgeson* y *Lukacs*, obtuvieron capilares de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  y utilizaron voltajes elevados para la separación de proteínas; además, se clarifica las relaciones entre los parámetros operacionales y las cualidades de la separación revelando el elevado potencial analítico de esta técnica. Con esto, se presenta el lanzamiento de la Electroforesis Capilar (EC)<sup>1,49</sup>.

La Electroforesis Capilar es una técnica de separación que se basa en la movilidad o velocidad de migración de partículas cargadas debido a la acción de un campo eléctrico. Permite la separación rápida y eficiente de compuestos con carga iónica, ideal para manipular cantidades pequeñas de muestra. Emplea tubos capilares donde se lleva a cabo una separación de alta eficiencia, ya sea de moléculas grandes o pequeñas<sup>2,23,31</sup>. La separación de las diferentes especies iónicas se realiza en función de sus distintas movilidades electroforéticas dentro del capilar, cuando se aplica una diferencia de potencial entre los extremos del mismo. La detección se realiza mediante la lectura de la absorbancia en la región del ultravioleta-visible, empleando lámparas de emisión discreta. La EC es fácilmente automatizada, precisa para el análisis cualitativo y cuantitativo, consume cantidades limitadas de reactivos, por lo que resulta ser una técnica económica; es aplicable a una amplia gama de analitos comparado con otras técnicas de separación analítica, además posee facilidad de empleo<sup>56</sup>.

### 2.8.1 COMPONENTES DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La configuración instrumental básica de la EC es relativamente simple. Se requiere de un capilar de sílice fundida de diámetro interno menor de 200  $\mu\text{m}$ , el cual posee una ventana visible o celda de detección, en éste se lleva a cabo la separación electroforética; una fuente de alto voltaje que proporciona de 0 a 60 Kv; dos electrodos de platino conectados a la fuente de voltaje, dos reservas de buffer donde puedan introducirse tanto los extremos del capilar como los extremos de los electrodos; un detector que puede ser de luz UV o de fluorescencia, donde es alineada la celda de detección del capilar y un sistema de administración de datos [Fig. 10].

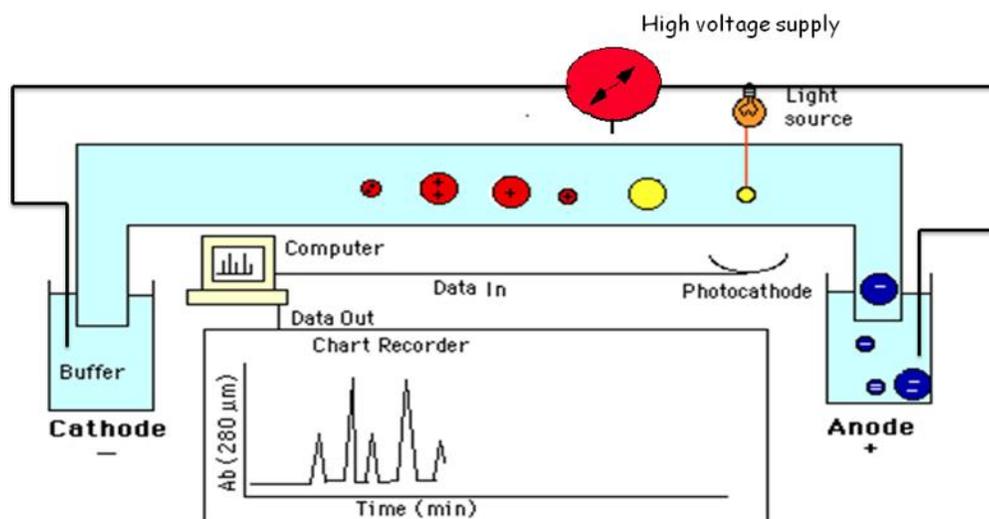


Fig. 10 Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar  
www.imagenesgoogle.com

El capilar es llenado con un electrolito con capacidad amortiguadora al pH deseado. La muestra que está constituida por un conjunto de aniones y cationes, se diluye en el buffer para ser introducida en el capilar, ya sea mediante vacío o presión, para posteriormente aplicar el voltaje; entonces las especies iónicas de la muestra migran a través del capilar de acuerdo a su movilidad electroforética, estableciendo un movimiento de iones, los cationes migran hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo, las especies neutras no migran. Eventualmente las moléculas pasan por el detector (UV, LIF) donde se realiza la lectura de la absorbancia en la región del UV - Vis. Posteriormente se registra la señal en el sistema de administración de datos.

## 2.9 FACTORES QUE CAUSAN LA MOVILIDAD DEL ANALITO EN EL SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR

### 2.9.1 FLUJO ELECTROSMÓTICO (EOF)

El EOF es el movimiento de todos los solutos presentes en la muestra en dirección al electrodo negativo (cátodo). Este fenómeno surge como consecuencia de aplicar un campo eléctrico que genera una doble capa eléctrica entre la solución y la pared del capilar. La pared interior de un capilar de sílice fundida está recubierta de grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) ionizables al contacto con el buffer, presentando una carga negativa ( $\text{SiO}^-$ ) por encima de un pH 2. Los cationes de la solución forman una capa inmóvil fuertemente adsorbida a las cargas negativas de la pared. Sobre ésta se forma una segunda capa, denominada capa móvil o difusa, constituida también por cationes aunque unidos de manera más débil a la superficie del capilar [fig. 11]. Los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el cátodo al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, generando un movimiento global del fluido, correspondiente al EOF<sup>49</sup>.

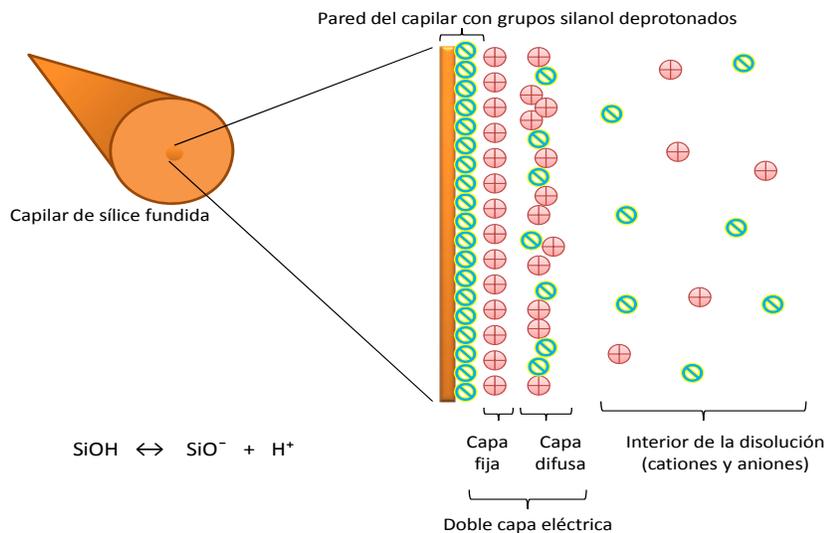


Fig. 11 Doble capa eléctrica que genera el EOF.

Como puede observarse, los cationes mantienen el balance de cargas y a este proceso se le conoce como *potencial Z*.

La movilidad electrosmótica o flujo electrosmótico está definido por:

$$u_{eo} = \frac{\zeta \epsilon}{4\pi\eta} E = \mu_{eo} E \quad (1)$$

Donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica de la solución,  $\eta$  es la viscosidad del buffer, y  $\zeta$  es el potencial zeta.

El EOF está en función del tipo de buffer, así como de su pH y concentración. De esta forma, una variación del pH del buffer origina un cambio en la ionización del capilar y un aumento de la concentración del buffer da lugar a una disminución del EOF. El EOF hace posible el análisis simultáneo de cationes, aniones y especies neutras en un solo análisis. Sin éste fenómeno, o sólo aniones, o sólo cationes migrarían hacia el detector. El ión de carga opuesta migraría retrocediendo al final de la inyección y los compuestos neutros se quedarían al final y se dispersarían por difusión. Con el EOF todas las especies pasan por el detector, siendo el orden de migración: cationes, especies neutras y aniones [Fig. 12].

### 2.9.2 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Bajo la acción de un campo eléctrico, los solutos iónicos se desplazan a través del capilar debido a dos razones: por un lado, ya se comentó que el EOF arrastra todo el seno de la disolución y por tanto, también los solutos iónicos. Por otro lado, la propia carga de un soluto hace que ésta muestre una movilidad por sí mismo, llamada movilidad electroforética. La velocidad de migración de un ion sometido a la acción de un campo eléctrico, es:

$$v = \mu_{ep} E \quad (2)$$

siendo,  $\mu_{ep}$  la movilidad electroforética del ión y  $E$ , la intensidad del campo eléctrico aplicado. La movilidad electroforética, depende a su vez de la carga del analito ( $q$ ), de su radio ( $r$ ) y de la viscosidad de la solución ( $\eta$ ), según la expresión:

$$\mu_{ep} = q / 6\pi r\eta \quad (3)$$

La movilidad es directamente proporcional a la fuerza eléctrica del ión e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento. Este último, se determina en un ión a partir de su tamaño y de la viscosidad del medio en el que migra. Las separaciones, por tanto, se basan en las diferencias en la relación carga/tamaño entre los diferentes analitos presentes en la muestra; para iones del mismo tamaño, el de mayor carga eléctrica migrará más rápidamente. En iones con la misma carga, migrará más rápido aquel de menor tamaño ya que tendrá una menor fuerza de retardo por rozamiento. La resistencia del medio al paso de

ión también influirá en su movilidad electroforética, siendo ésta menor cuanto mayor sea la viscosidad del medio. No obstante, la  $\mu_{ep}$  real, no coincide con lo predicho en la ecuación (3), debido a la existencia del flujo electroosmótico.

### 2.9.3 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA APARENTE

Para determinar la movilidad aparente ( $\mu_{ap}$ ) de un analito se toma en cuenta la  $\mu_{ep}$  del ión y la  $\mu_{eo}$  de la solución:

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} \pm \mu_{eo} \quad (4)$$

Debido a que las especies catiónicas se mueven en la misma dirección que el EOF, la  $\mu_{ap}$  será la suma de la  $\mu_{ep}$  y la  $\mu_{eo}$ , de tal manera que serán éstas las que alcancen primero la zona del detector. Para aniones la dirección de la  $\mu_{ep}$  es contraria a la  $\mu_{eo}$  de forma que la  $\mu_{ap}$  será la resta de las dos movilidades [Fig. 12].

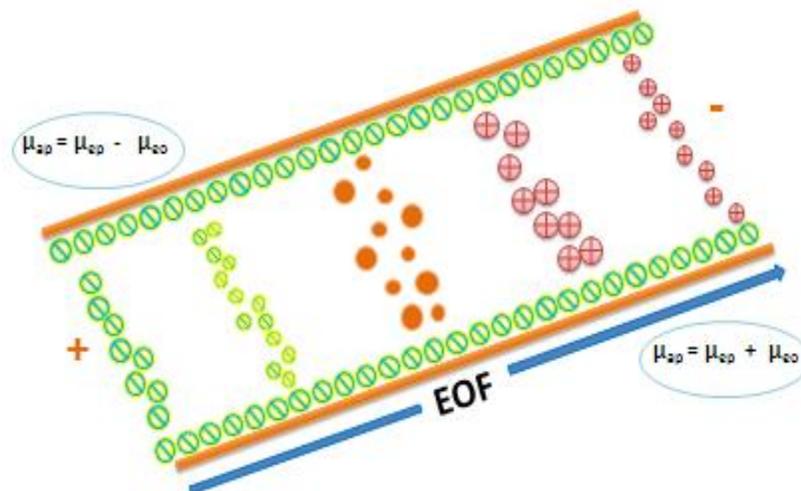


Fig. 12. Movilidad electroforética aparente

La movilidad aparente ( $\mu_{ap}$ ) puede calcularse a partir de datos experimentales, según:

$$\mu_{ap} = \frac{L_d/t}{V/L_t} \quad (5)$$

Donde  $L_d$  es la longitud de la columna desde la inyección al detector,  $L_t$  es la longitud total de la columna de un extremo a otro,  $V$  es el voltaje aplicado entre los dos extremos y  $t$  el tiempo necesario para que un soluto migre desde el

extremo de inyección hasta el detector, a lo que se conoce como *tiempo de migración* ( $t_m$ ).

La movilidad electroforética aparente es dependiente del voltaje y la longitud del capilar, así como de la composición del buffer, su concentración y pH, además de la temperatura debido a que ésta aumenta la energía cinética de los analitos<sup>49-51</sup>.

## 2.10 APLICACIONES GENERALES DE LA EC

El interés por la EC ha ido incrementando a pasos agigantados y prueba de ello es el desarrollo de nuevos métodos y aplicaciones a una amplia variedad de problemas analíticos. De esta manera se han realizado estudios en el área biomédica, en el campo de las proteínas<sup>5</sup>, DNA<sup>6</sup>, monitoreo de drogas<sup>7</sup> y pericias forenses<sup>20</sup>. En el área biofarmacéutica para control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos<sup>18</sup>. Ha sido de enorme utilidad en la determinación de contaminantes<sup>8</sup>, cuantificación de carbohidratos<sup>12</sup>, aminoácidos<sup>10</sup> y ácidos orgánicos<sup>11</sup>, así como en control ambiental mediante la identificación de contaminantes y sus metabolitos en aguas residuales<sup>9</sup>. Aplicaciones recientes de la EC es el análisis de entidades biológicas, lo que está permitiendo desarrollar un nuevo método para el estudio y caracterización tanto de células como de microorganismos.

## 2.11 ORIGEN DE LA CARGA DE UN MICROORGANISMO

La EC fue desarrollada inicialmente para el análisis de moléculas, pero sus ventajas se han extendido a la determinación de partículas y entidades biológicas como células y microorganismos, logrando la caracterización de bacterias<sup>2</sup>, virus<sup>15</sup>, levaduras<sup>13</sup> y hongos<sup>15</sup>. El análisis electroforético de células y microorganismos, puede llevarse a cabo ya que estos se consideran como partículas coloidales debido a su tamaño (en el rango de  $10 - 10^{-3}$   $\mu\text{m}$ ) y comportamiento en suspensión acuosa<sup>56</sup>. La carga de los coloides puede ser adquirida por adsorción, al fijar cargas eléctricas o iones de la solución; o propia, al ionizarse los grupos funcionales presentes en su superficie, como resultado de la protonación y deprotonación de moléculas ácidas o básicas<sup>32</sup>. La carga de la superficie de un MO se debe también, a la combinación de estos factores. El tipo y cantidad de iones adsorbidos depende del tamaño y naturaleza de la célula microbiológica, así como de la solución en la que se encuentra suspendida. Los grupos funcionales comúnmente ionizables sobre la superficie del microorganismo son aminoácidos, sulfatos, fosfatos, amins y carboxilos. Factores como el tipo de buffer, pH y concentración, afectan la carga de la superficie, siendo estas propiedades las que permiten analizar al microorganismo por EC<sup>24,56</sup>.

## 2.12 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS POR EC

El primer experimento que demostró la posibilidad de mover microorganismos a través de capilares bajo un campo eléctrico aplicado, consistió en el análisis de *Lactobacillus casei* y Virus del Mosaico del Tabaco (VMT). En ambos se emplearon capilares de sílice fundida recubiertos con metilcelulosa para evitar la adsorción de los MO en las paredes internas del capilar. La detección se realizó en el intervalo del UV-Vis, el VMT fue detectado a 260 nm, mientras que *L. casei* a 220 nm. Los electroferogramas resultantes mostraron picos agudos con un tiempo de migración menor a 4 minutos; sin embargo, no se logró su separación en mezcla<sup>49</sup>. La primer separación de bacterias en mezcla consiguió la separación total o parcial de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; el proceso, sin embargo, tomó 70 minutos<sup>24</sup>. Tiempo después, se reportaron separaciones análogas de tres diferentes bacterias, *Pseudomona putida*, *Pseudomona sp.* y *Alcaligenes eutrohus*<sup>17,24</sup>. La inyección individual de cada bacteria permitió la identificación de los picos y su correspondiente movilidad y por tanto, su caracterización.

Posterior a esto y a partir de muestras biológicas, se logró la separación e identificación de los principales patógenos responsables de infecciones del tracto urinario, *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophiticus*, inyectando en el capilar orina sin tratamiento previo, con un tiempo de análisis menor a 10 minutos<sup>23</sup>. En otro estudio, se desarrolló un método de separación para *Salmonella enteritidis* y otros serotipos, mediante EC y Fluorescencia Inducida por Laser (LIF) logrando la caracterización eficiente de cada bacteria<sup>57</sup>. Por otro lado, se obtuvieron resultados exitosos en la identificación de *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus* y *Helicobacter pylori*, obtenidas de muestras de orina y úlceras gástricas. Aunado a esto, se reportó gran reproducibilidad en los tiempos de migración en la separación de los patógenos en mezcla demostrando la enorme capacidad que tiene esta técnica en el diagnóstico microbiológico<sup>2</sup>. La EC, además, mostró ser un método alternativo en la detección de patógenos de plantas, al lograr la caracterización de 9 bacterias fitopatógenas en tan solo 40 minutos<sup>13</sup>.

También se han desarrollado métodos electroforéticos para la identificación y cuantificación de bacterias contaminantes de alimentos, logrando separar 8 tipos de bacterias de alimentos contaminados, entre las que se encuentran *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *S. aureus*, con un tiempo de análisis de 25 minutos<sup>56</sup>. Además, se desarrolló un método con aplicaciones biomédicas e industriales capaz de determinar la presencia o ausencia de contaminación microbiológica

produciendo una sola señal electroforética, mediante el uso de aditivos al buffer de corrimiento<sup>3,55</sup>. La EC también ha demostrado su potencial y versatilidad en el control de calidad de productos de consumo que tienen actividad bacteriana con efectos benéficos para la salud, mostrando eficacias extremadamente altas en la separación de *Bifidobacteria infantis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* en mezcla, además emplean poli(etilen-óxido) como aditivo con la finalidad de mejorar la separación de las especies en estudio. En este mismo trabajo, fue posible monitorear el comportamiento de migración de los MO mediante el empleo de una cámara acoplada al equipo<sup>19,25</sup>.

Sin embargo y a pesar del éxito obtenido en el análisis de bacterias, virus y levaduras, son casi nulas las referencias que empleen EC para el análisis de hongos. No obstante, en un estudio realizado recientemente se logró determinar de manera exitosa la factibilidad de analizar células fúngicas en su forma micelial mediante EC. Los hongos empleados en el estudio fueron *Botryosphaerea rhodina* y *Trichoderma sp.* logrando obtener un tiempo de migración característico para cada hongo, así como un pico definido y simétrico bajo las condiciones electroforéticas ensayadas<sup>15</sup>. Este estudio demostró que a pesar del tamaño de las células miceliales y su gran ramificación, se pueden analizar y caracterizar por EC.

Por otra parte, la EC ha mostrado capacidad para la evaluación de la interacción microorganismo-molécula<sup>52</sup>. Puede usarse para evaluar la conducta de asociación entre una amplia gama de ligandos y receptores, por ejemplo, se han estimado las constantes de asociación del virus del resfriado común y rinovirus humano serotipo 2 a anticuerpos monoclonales y otras biomoléculas por medio de EC<sup>53</sup>. Las constantes de asociación son útiles para cuantificación de toda asociación molecular, en estudios de actividad farmacéutica, toxicidad y estudios microbiológicos<sup>23</sup>. La medición de la movilidad electroforética está permitiendo el estudio de propiedades superficiales de las células microbianas, por medio de ésta ha podido detectarse la sutil, pero importante heterogeneidad que puede existir en una población monoclonal. Además, se han obtenido puntos isoeléctricos e información acerca de propiedades adhesivas y estabilidad en agua de varios microorganismos, como *E. coli*, oocitos de *Cryptosporidium parvum* y varios tipos de *Mycobacterium*<sup>25,57</sup>. La EC se ha empleado, además, para la identificación y cuantificación del VIH-1, ayudando a la optimización de la terapia antirretroviral, con lo cual se ha prolongado la supervivencia de pacientes con VIH<sup>54</sup>.

### 3. PLANTEAMIENTO

El análisis, caracterización e identificación de los hongos es crucial en diversas áreas del conocimiento; por ejemplo en la industria alimenticia, farmacéutica, en el área de la medicina y en el sector público. Desde el punto de vista médico-clínico, es imprescindible la búsqueda e identificación del factor etiológico de una enfermedad infecciosa, lo cual es un paso necesario para el control y tratamiento de la enfermedad. Así mismo, en la industria alimenticia la presencia de hongos y sus metabolitos en los alimentos y granos en almacenamiento pueden traer como resultado pérdidas económicas considerables. Aunado a esto, las enfermedades producidas por productos contaminados son el resultado directo de graves problemas en la salud. El análisis de los hongos puede llevar al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de dichas enfermedades. En el área de la biotecnología, ha incrementado el uso de los hongos en la obtención de alimentos y bebidas. Además, los hongos filamentosos producen el 25% de los antibióticos conocidos hasta el momento.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que tienen las esporas fúngicas, como elementos de diseminación y clasificación de los diferentes géneros y especies, se hace imprescindible su estudio. Al usar Electroforesis Capilar, se pueden investigar sus propiedades con el fin de obtener información de la forma en que se comportan e interactúan con el medio que las rodea. Ello proporcionaría información sobre la composición celular, adhesión a diferentes superficies o su aglutinación. Este tipo de estudio sentaría las bases para emplear la EC como herramienta de diagnóstico. Por otro lado permitiría conocer mejor las propiedades de los diversos hongos.....

## 5. HIPÓTESIS

Las esporas de *A. bisporus*, *T. atroviride* y *A. rouxii* poseen distintas características electroforéticas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la movilidad electroforética de esporas de especies representativas de los principales grupos de hongos.

### 6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la influencia de distintas variables del buffer de corrimiento en la movilidad electroforética de esporas fúngicas.
- Determinar la influencia de las características del capilar en la movilidad electroforética de esporas fúngicas.
- Determinar la capacidad de la EC para identificar y separar esporas en mezcla.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 7.1.1 REACTIVOS

**Tabla 2. Reactivos**

REACTIVO	NOMBRE	MARCA	GRADO
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de sodio. Monohidrato. Cristal	JT Baker ®	ACS
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de sodio. Dibásico. Heptahidrato. Cristal	JT Baker ®	ACS
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de potasio. Monobásico. Monohidrato. Cristal.	JT Baker ®	ACS
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Borato de sodio. Decahidrato. Cristal.	JT Baker ®	ACS
$\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Citrato de sodio. Dihidrato. Granular	JT Baker ®	ACS
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio. Perlas	JT Baker ®	ACS
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico.	JT Baker ®	ACS
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético	JT SIGMA-ALDRICH ® Baker ®	ACS
<b>TRIS</b>	tris(hidroximetil)aminometano	Invitrogen ®	ACS
<b>PDA</b>	Agar Papa Dextrosa	BD Bioxón	
<b>PDA</b>	Agar Papa Dextrosa	BD Difco	
<b>Vogel 50X</b>	Medio de cultivo Vogel 50X		
<b>Líquido refrigerante</b>	Fluorinert F77	3M	
<b>Agua destilada</b>			
<b>Agua desionizada</b>			

## 7.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

### 7.1.2.a AGAR PAPA DEXTROSA (PDA) BD Bioxon ®

Se resuspenden 19.5 g de polvo Agar en ½ litro de agua destilada. Se mezcla perfectamente y se procede a calentar con agitación frecuente hasta disolución completa. Se coloca en matraces Erlenmeyer y se esteriliza a 121° C por 15 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se vacía en placas Petri y en matraces Erlenmeyer de 50 ml. Tanto las placas como los matraces, se conservan en refrigeración hasta su uso.

### 7.1.2.b AGAR PAPA DEXTROSA (PDA) BD Difco ®

Se resuspenden 19.5 g de Agar en ½ litro de agua destilada. Se mezcla perfectamente y se procede a calentar con agitación frecuente hasta disolución completa y se esteriliza a 121° C durante 15 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se vacía en placas Petri, las cuales se mantienen refrigeración hasta su uso.

## 7.2 CEPAS ESTUDIADAS

En la tabla 3, se enlistan las cepas empleadas en el estudio y se describen las condiciones de cultivo.

**Tabla 3. Cepas estudiadas y condiciones de cultivo.**

Hongo	Filo	Medio de cultivo	Temperatura
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040*	Ascomycota	PDA BD Difco ®	28° C / Ambiente
<i>Amylomyses rouxii</i> 24905**	Zygomycota	PDA BD Bioxon ®	28° C
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>Portobello</i> ***	Basidiomycota		

\*Adquirido del Cepario del Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UMSNH.

\*\*De American Type Culture Collection (ATCC).

\*\*\*Obtenido comercialmente.

### 7.3 PREPARACIÓN DEL BUFFER

Las soluciones buffer empleadas en este trabajo se enlistan en la tabla 4.

**Tabla 4. Soluciones buffer.**

BUFFER	CONCENTRACIÓN	pH
Fosfato de Sodio	10 mM	7.0
	20 mM	7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0
	30 mM	7.0
Fosfato de Potasio	10 mM	7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0
	20 mM	7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0
	30 mM	7.0
Borato de Sodio	10 mM	8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0
	20 mM	8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0
	30 mM	8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0
Citrato de Sodio	20 mM	5.0
	50 mM	5.0
EDTA*	15 mM	8.0
	20 mM	8.0
	25 mM	8.0
TBE**	15 mM	8.5
	20 mM	8.5
	25 mM	8.5
TRIS***	15 mM	8.0
	20 mM	8.0
	25 mM	8.0

\* Ácido Etilendiaminotetraacético

\*\* Tris – Ácido Bórico - EDTA

\*\*\* Tris(hidroximetil)aminometano

Todas las soluciones buffer se preparan diariamente mediante disolución de las cantidades apropiadas de cada reactivo. Para fosfato de potasio, fosfato de sodio, borato de sodio y citrato de sodio se utiliza H<sub>2</sub>O destilada, y para EDTA, TBE y TRIS se usa H<sub>2</sub>O desionizada. El pH del buffer se ajusta con NaOH 1N o HCl 1M, con la ayuda de un potenciómetro (Accumen Basic, Fisher Scientific®). Todas las soluciones buffer se filtran con papel filtro y se sonicán (Branson 1510) durante 15 min para eliminar burbujas que pudieran interferir con los resultados.

## 7.4 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

El análisis microscópico de las esporas fúngicas se realiza con un microscopio LEICA CME con objetivo de 40 X. Las imágenes son capturadas con una cámara SONY CYBER-SHOT DSC-S80. Adicionalmente y para obtener mayor detalle de la superficie de las esporas se usa el microscopio LEICA DMLB con cámara integrada LEICA DC200.

## 7.5 OBTENCIÓN DE ESPORAS

### 7.5.1 *Trichoderma atroviride* y *Amylomyses rouxii*

Para la obtención de esporas de *Trichoderma atroviride* y *Amylomyses rouxii* se coloca la placa Petri en un tornamesa y se adiciona 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril, posteriormente con una espátula se frota la superficie del micelio con la finalidad de desprender las esporas. La solución obtenida se filtra usando papel filtro estéril (Whatman Chromatography paper. 1Chr). Esta última se coloca en tubos Eppendorf de 1.5 mL con la ayuda de una micropipeta y se procede a centrifugar durante 8 min a 12,000 rpm (Eppendorf 5415D). El sobrenadante se decanta y se adiciona 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se centrifuga nuevamente. El lavado se realiza tres veces para obtener esporas libres de restos de micelio y de medio de cultivo.

### 7.5.2 *Agaricus bisporus* var. *Portobello*

Para la obtención de las esporas de *Agaricus bisporus* se adiciona a las laminillas del basidiocarpo aproximadamente 15 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se frota suavemente con un agitador estéril. La solución se filtra para eliminar trozos de las laminillas u otras partículas que puedan interferir con el análisis. En seguida se coloca en tubos Eppendorf y se realiza el mismo proceso que para la obtención de las esporas de los hongos anteriores.

## 7.6 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las esporas de los diferentes hongos se resuspenden en el buffer de corrimiento con una dilución 1:10, bajo condiciones estériles. Todas las diluciones se colocan en vortex (IKA MS1 Minishaker ®) por 15 min para dispersar las células y evitar agregados; posteriormente se sonicán (Branson 1510) durante 10 min para eliminar las burbujas presentes en la suspensión. En seguida se colocan 400 µL de la muestra en viales para llevar a cabo el análisis electroforético.

## 7.7 INSTRUMENTACIÓN

Se utiliza el equipo: P/ ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System *Beckman Coulter*®, para el análisis electroforético de las esporas de los diferentes fhyla [Fig 13].



Fig. 13. Sistema de Electroforesis Capilar

## 7.8 CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS

Se probaron capilares de sílice fundida con recubrimiento de poliamida de 75 y 100  $\mu\text{m}$  de d.i., con 20 y 38 cm de  $L_d$ . En todas las corridas se mantiene una temperatura de 25° C, permitiendo buena estabilidad del proceso. La inyección de la muestra en el capilar fue a 0.5 psi, y para el lavado y la separación se utilizaron 20 psi. El equipo permite aplicar un voltaje de 0 hasta 30 Kv, por lo que se probaron 10, 15, 17 y 20 kV, variando el tiempo de inyección de muestra en 5, 7, 9 y 11 segundos. La longitud de onda fue de 201 nm en todas las corridas. Los capilares nuevos se acondicionan como se indica a continuación: 5 min con HCl 1M, seguido de 10 min de NaOH 1N, 5 min de H<sub>2</sub>O destilada y nuevamente NaOH 1N por 2 min, por último se inyecta BGE durante 10 min. Cada tres corridas el capilar se lava con NaOH 1N durante 2 min y H<sub>2</sub>O destilada por 1 min. Se cambia el BGE cada tres corridas. Después de la última corrida del día el capilar se lava con NaOH 1N por 2 min, H<sub>2</sub>O por 1 min y finalmente 2 min con aire. De esta manera, el capilar se mantiene con aire durante toda la noche.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se llevó a cabo el análisis de esporas de *Amylomyses rouxii* (Zygomycota), *Trichoderma atroviride* IMI (Ascomycota) y *Agaricus bisporus* var. *Portobello* (Basidiomycota) mediante Electroforesis Capilar.

### 8.1 CULTIVO Y OBTENCIÓN DE ESPORAS

Inicialmente, las cepas se cultivaron en diferentes medios debido a que cada hongo requiere nutrientes específicos para la producción de esporas *in vitro*. El seguimiento de las placas permitió observar el crecimiento de los hongos y el tiempo que cada uno de ellos requirió para la producción de esporas. En el caso de *A. rouxii* se obtuvo un mayor crecimiento en PDA Bioxón®, el desarrollo de las esporas se observó de 3 a 4 días después de su cultivo<sup>59</sup>; *T. atroviride* tuvo un mejor desarrollo en PDA Difco®. Conforme el hongo invadió la placa se produjeron anillos concéntricos de esporas, característica del crecimiento de este hongo<sup>62</sup>. El hongo *A. bisporus* se obtuvo comercialmente [Fig. 14].



Fig. 14. Desarrollo característico en PDA de las cepas de A) *Amylomyses rouxii*; y B) *Trichoderma atroviride* IMI. C) Basidiocarpo de *Agaricus bisporus* var. *Portobello*.

Una vez que se observó el desarrollo de las esporas en el medio de cultivo, se procedió a cosecharlas y a realizar el análisis microscópico. Las esporas fúngicas poseen una gran heterogeneidad morfológica presente entre células de una misma población, que incluye diferencias en el tamaño, forma, coloración, superficie y características químicas. Estas diferencias están determinadas por los

factores microambientales que actúan sobre las células, ya que se localizan en diferentes estructuras del micelio que las produce<sup>58</sup> [Fig. 15].

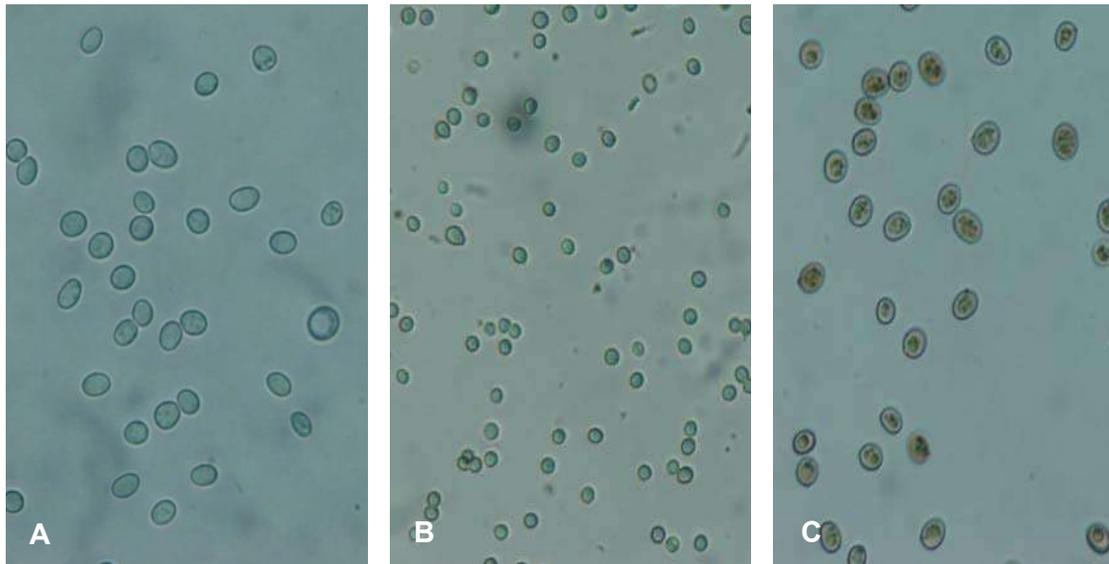


Fig. 15. Esporas de A) *Amylomyces rouxii*; B) *Trichoderma atroviridae* IMI; C) *Agaricus bisporus*.

El análisis microscópico mostró que en *Agaricus bisporus* var. *Portobello* el tamaño de las esporas se encuentra entre 5 y 8  $\mu\text{m}$ , presentando una coloración marrón y con forma elíptica; para *Amylomyces rouxii* el tamaño de las esporas va de 4.5 a 6  $\mu\text{m}$ , son translúcidas y de forma elíptica; y *Trichoderma atroviride* desarrolla esporas que van de los 3 a los 4  $\mu\text{m}$ , su color oscila de amarillo, en el caso de esporas jóvenes, a verde para esporas maduras, y presentan forma globosa.

## 8.2 ESPORAS FÚNGICAS COMO ANALITOS ELECTROFORÉTICOS

El análisis y caracterización de las esporas fúngicas mediante EC pudo llevarse a cabo gracias a su tamaño, el cual, como ya se mencionó está en el orden de los  $\mu\text{m}$ . Las esporas fúngicas, además, adquieren una carga neta al contacto con una solución acuosa. Esta carga es debida a la ionización de los grupos funcionales presentes en la pared celular y a la adsorción de iones de la solución. El tipo y cantidad de iones presentes depende del tamaño y naturaleza (composición química) de la superficie de las células fúngicas, así como también de las propiedades (composición, fuerza iónica y pH) de la solución en la que se encuentran suspendidas<sup>24</sup>. Por lo tanto, bajo la aplicación de un campo eléctrico, los hongos presentan una movilidad electroforética característica, la cual está en

función del tamaño de las esporas, la carga de la superficie y el tipo de buffer que se emplea en el análisis<sup>17</sup>.

Dado que el proceso electroforético separa los analitos en relación a su tamaño y su carga, es posible la obtención de más de un pico electroforético para un solo hongo, debido a la presencia de subpoblaciones dentro de la propia cepa<sup>31</sup>. Es por ello que se realizaron diferentes experiencias con el objetivo de lograr una sola señal electroforética con buena definición y tamaño que permitiera la caracterización del hongo mediante su tiempo de migración. Todos los análisis se realizaron por triplicado, cuando se obtuvieron picos electroforéticos sus tiempos de migración fueron reproducibles con desviación estándar relativa (DER) menor a 1.5% (n = 3).

### 8.3 EFECTO DEL TIPO DE BUFFER EN EL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS ESPORAS FÚNGICAS.

Dado que el buffer juega un papel muy importante en el análisis de las esporas fúngicas debido a que su naturaleza, pH y concentración, afectan considerablemente la selectividad y eficacia del proceso electroforético, se procedió a elegir los buffer para realizar el estudio. Un buffer debe elegirse dentro de un intervalo de dos unidades de pH alrededor del valor del  $pK_a$  de la sustancia, puesto que es dentro de estos valores donde tienen su mayor capacidad amortiguadora [Tabla 5].

**Tabla 5. Valores de pKa de algunas soluciones buffer empleadas en EC.**

Buffer	pKa	Intervalos de pH prácticos
Fosfato	2.12pKa <sub>1</sub> , 7.21pKa <sub>2</sub> , 12.32pKa <sub>3</sub>	1.14 - 3.14 // 6.20 - 8.20
Citrato	3.06pKa <sub>1</sub> , 4.74pKa <sub>2</sub> , 5.40pKa <sub>3</sub>	2.08 - 5.74
Borato	9.24	8.14 - 10.14
TRIS	8.30	7.30 - 9.30
EDTA	6.16pKa <sub>5</sub> , 10.24pKa <sub>6</sub>	5.16 - 7.16 // 9.24 - 11.24

Además de elegir el buffer con mejor capacidad tamponante al pH de trabajo, se deben de considerar otras cualidades como son baja absorbancia a la longitud de onda de la detección y baja conductividad eléctrica, factor indispensable para controlar el paso de la corriente<sup>4</sup>. Tanto la velocidad del EOF como la  $\mu_{ep}$  de las esporas fúngicas varían en función de los cambios que se produzcan en el tampón; por ejemplo, una variación del pH origina un cambio en la ionización de la pared interna del capilar y en la superficie de las esporas; y un aumento en la concentración del tampón da lugar a una disminución del EOF, que repercute en la

velocidad de migración de las esporas fúngicas<sup>15</sup>. Por lo tanto, la composición del buffer determina la migración de las especies en la muestra, así como su comportamiento estable y reproducible<sup>67</sup>.

Una amplia variedad de buffers son utilizados para el análisis electroforético de células y microorganismos. Los llamados tampones biológicos (TRIS, TBE, borato, etc.) son los más empleados, debido a que ofrecen valores de  $pK_a$  que permiten el uso de valores pH (próximos a la neutralidad) que mantienen el funcionamiento y supervivencia de las entidades biológicas<sup>70</sup>. Por otro lado, estos buffers poseen una baja conductividad eléctrica, por lo que pueden ser utilizados en alta concentración, sin que ello implique un aumento significativo en la corriente<sup>67</sup>. Se tiene en cuenta que elevadas concentraciones puede ocasionar rompimiento de las células como resultado de un desequilibrio en la presión osmótica<sup>69</sup>.

Los buffers empleados en el análisis electroforético de las esporas fúngicas se describen en la tabla 4.

### 8.3.1 *Amylomyses rouxii*

La constitución química general de la pared celular de las esporas de *A. rouxii* presenta, además de quitina y glucanas, componentes tales como ácido poliglucurónico y glucuronomanoproteínas. La protonación o deprotonación de tales componentes está dictado por el pH de la solución buffer y proporciona a la célula una carga electrónica neta<sup>17</sup>. Estas cargas están apantalladas en cierta medida por el microambiente que se genera alrededor de la célula por asociación con contraiones de la solución. De tal manera que la carga neta de las esporas de *A. rouxii* en un tampón particular a un pH determinado, está definida tanto por la protonación de los grupos funcionales de los componentes de la pared, como por el tipo de contraiones procedentes de la solución<sup>75,76</sup>. Alterando el tipo de buffer y su pH se altera la carga neta de las esporas fúngicas proporcionando diferentes resultados en cuanto a eficiencia de la señal electroforética.

En el análisis del tipo de buffer en *A. rouxii*, se observó que la forma de la señal electroforética varió significativamente con cada buffer, debido a que con cada uno de ellos están presentes diferentes iones que van a interactuar de diversas maneras tanto con la pared celular como con la pared interna del capilar, ofreciendo una mayor o menor sensibilidad al análisis.

En general, para *A. rouxii* no se logró obtener un pico totalmente definido. Con los BGE fosfato de potasio, borato y fosfato de sodio la señal se presentó ligeramente

más aguda, permitiendo la caracterización del hongo mediante su tiempo de migración [Fig. 16].

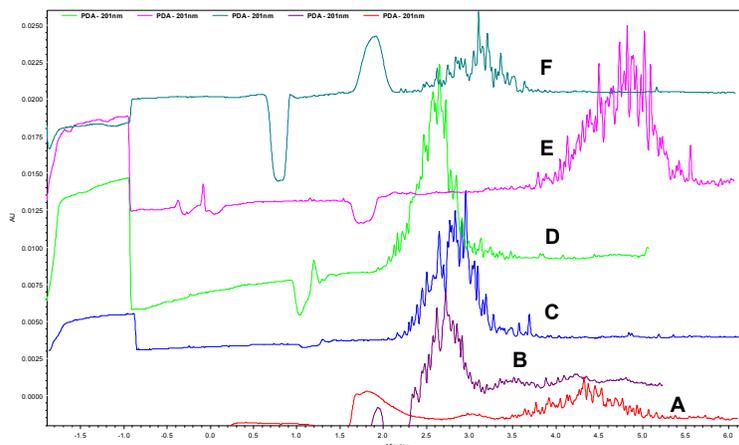


Fig.16. Efecto del tipo de BGE sobre la forma y tamaño de la señal electroforética en *A. rouxii*. A) TBE; B) EDTA; C) fosfato de sodio; D) borato de sodio; E) fosfato de potasio; F) TRIS. 20 mM; 17 Kv. Capilar 100  $\mu\text{m}$  d.i., 48 cm  $L_T$

Con TRIS se observaron dos señales electroforéticas. En este caso TRIS permite la ionización diferencial de las esporas, agrupándolas en dos poblaciones, presentando cada una de ellas diferentes movilidades electroforéticas. Con los BGE EDTA y TBE, resultó en señales pequeñas y distorsionadas. No se obtuvo señal electroforética con citrato de sodio.

Puesto que no con todos los buffers probados se obtuvo un solo pico, se determinó el tiempo de migración bajo las condiciones que permitieron la agrupación de las esporas fúngicas en una misma banda electroforética [Tabla 6].

**Tabla 6. Influencia del tipo de buffer sobre el tiempo de migración en *A. rouxii*.**

Buffer	pH	$t_m$ (minutos)
Citrato de sodio	5	----
Fosfato de sodio	7	4.63
Fosfato de potasio	7	6.7
Borato de sodio	8	4.58
TRIS	8	----
EDTA	8	4.47
TBE	8.5	----

BGE 20 mM; 17 Kv; capilar 100  $\mu\text{m}$  d.i., 48 cm  $L_T$ .  
Los datos son el resultado de la media de tres análisis.

Pocos son los estudios que hacen referencia a las características heterogéneas de los MO al analizarlos mediante EC. Algunos de los cuales reportan que el ensanchamiento de las bandas electroforéticas se debe a las diferencias en el tamaño y composición química de las células dentro de una misma cepa, descartando agregación celular, contaminación de la muestra o presencia de artefactos<sup>73</sup>. Tales diferencias en las características de las células se observan también en el análisis electroforético de las esporas fúngicas. Mostrando, además, un comportamiento bimodal bajo ciertas condiciones, por ejemplo, TRIS en *A. rouxii*.

Para tener la certeza de que las esporas migraron a través del capilar, se recuperaron en el vial de salida y se realizó análisis microscópico. La inspección visual confirmó que efectivamente las esporas estaban presentes y no presentaban cambios morfológicos apreciables al microscopio de luz. Por otro lado, las células estaban monodispersas, descartando que la obtención de más de un pico fuera consecuencia de la agregación celular. También se descarta la presencia de artefactos macroscópicos puesto que tanto las soluciones buffer como la muestra se filtraron a través de papel filtro estéril [Fig. 17].

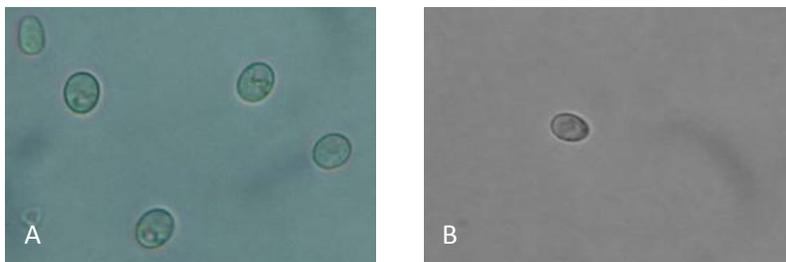


Fig.17. Análisis microscópico de *A. rouxii*. A) esporas antes del análisis electroforético. B) esporas recolectadas después del análisis, observándose la integridad de la pared celular. 40X

### 8.3.2 *Agaricus bisporus* var. *Portobello*

Según la organización de la pared celular de *A. bisporus*, en su parte más externa se encuentra una región muy electrodensa de aspecto fibrilar, rica en xilomanoproteínas, glucanos e iones orgánicos e inorgánicos<sup>37</sup>. Tales componentes les confieren diversas propiedades ácido-base a las esporas fúngicas permitiendo la obtención de una carga neta al contacto con la solución<sup>24</sup>. El uso de diferentes buffer en el análisis electroforético de este hongo permitió

emplear varios pH y observar cambios netos en la carga de la pared celular. Lo anterior se relaciona con el menor o mayor tiempo de migración observado en la señal electroforética, de tal forma que a mayor carga positiva la movilidad electroforética aumenta y por tanto el tiempo de migración disminuye<sup>66</sup>.

En el estudio del tipo de buffer sobre la forma de la señal de *A. bisporus*, se obtuvo un pico bien definido bajo las condiciones probadas. Esto se debe a que la mayoría de las soluciones buffers ofrecieron un microambiente adecuado para que las esporas migraran a través del capilar y formaran una sola banda electroforética. Los mejores picos se produjeron con los buffers fosfato de sodio, TRIS, TBE y EDTA. Sin embargo, no se logró el mismo resultado con fosfato de potasio y borato de sodio, dando señales ligeramente más pequeñas; no obstante modificando la concentración en ambos casos, se logró mejorar el tamaño del pico. Con citrato de sodio, no se obtuvo señal electroforética [Fig. 18].

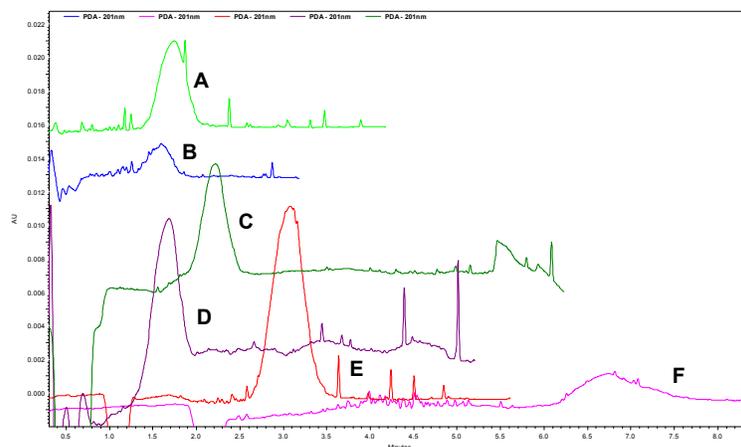


Fig. 18. Efecto del tipo de BGE sobre la forma y tamaño de la señal electroforética de *A. bisporus*. A) fosfato de sodio; B) borato de sodio; C) TBE; D) EDTA; E) TRIS; F) fosfato de potasio. 20 mM; 17 Kv. Capilar 100  $\mu\text{m}$  d.i., 48 cm  $L_T$

Se han reportado eficiencias extremadamente altas en el análisis electroforético de bacterias<sup>3</sup> y esporas fúngicas<sup>77</sup> con el empleo de capilares derivatizados y el uso de diferentes aditivos al buffer. Sin embargo, en el presente trabajo, no se utilizó ningún tipo de aditivo, siendo la polaridad del análisis positiva (del ánodo, hacia el cátodo). Obteniéndose señales con buena definición y tamaño bajo las condiciones electroforéticas ensayadas. Además, los tiempos de migración fueron reproducibles y menores a 10 min.

El tiempo de migración de *A. bisporus* es característico del hongo, y está en función del tipo de buffer que se emplea en el estudio. El mejor tiempo de análisis se obtuvo con el BGE borato de sodio, sacrificando la forma de la señal analítica [Tabla 7].

**Tabla 7. Influencia del tipo de buffer sobre el tiempo de migración en *A. bisporus*.**

Buffer	pH	t <sub>m</sub> (minutos)
Citrato de sodio	5	----
Fosfato de sodio	7	4.7
Fosfato de potasio	7	9.0
Borato de sodio	8	4.43
TRIS	8	5.45
EDTA	8	4.46
TBE	8.5	4.98

BGE 20 mM; 17 Kv; capilar 100 µm d.i., 48 cm L<sub>t</sub>.

Los datos son el resultado de la media de tres análisis.

También en este caso, se recuperaron las esporas en el vial de salida y se observaron al microscópico, corroborando la integridad celular [Fig. 19].

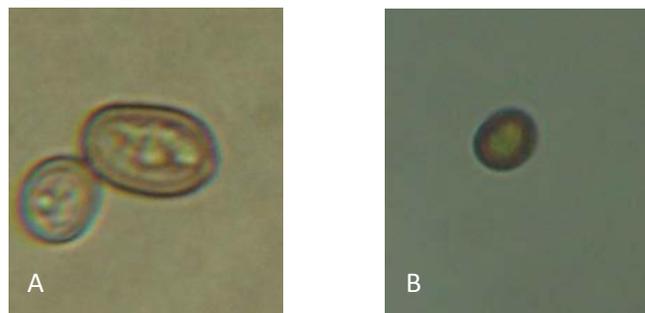


Fig. 19. Análisis microscópico de *A. bisporus*. A) esporas antes del análisis electroforético. B) esporas recolectadas después del análisis, observándose la integridad de las células fúngicas. 40X.

La importancia de obtener esporas íntegras, radica en la capacidad que tienen para resistir el proceso electroforético. Además, es importante que no haya lisis celular, ya que esto ocasionaría picos indeseables correspondientes al contenido celular y que afectan el análisis<sup>25</sup>.

### 8.3.3 *Trichoderma atroviride*

En el estudio de *T. atroviride* se probaron las mismas soluciones buffer que en los hongos anteriores, obteniéndose resultados muy variables en la forma de la señal electroforética con cada uno de ellos. En la composición química general de la pared celular de *T. atroviride* predominan galactomanoproteínas, quitina, glucanos, entre otros, que al igual que en *A. bisporus* y *A. rouxii*, le proporcionan a la célula fúngica una carga neta variable con los cambios de pH y del tipo de buffer que se emplea en el análisis.

Los electroferogramas procedentes del análisis electroforético con fosfato de sodio muestran un pico bien definido, en relación a su forma y tamaño, además permite la determinación del tiempo de migración del hongo, que fue de 7.41 min. Los resultados obtenidos con fosfato de potasio muestran una señal pequeña y separada en dos poblaciones. El mismo fenómeno ocurre con TBE, pero los picos obtenidos son más definidos y poseen mayor altura. Con los buffer borato de sodio y TRIS se agruparon las esporas dentro de una misma banda electroforética; sin embargo, la señal es ancha y distorsionada. El análisis con EDTA y citrato de sodio no produjo señal electroforética bajo ninguna condición [Fig. 20].

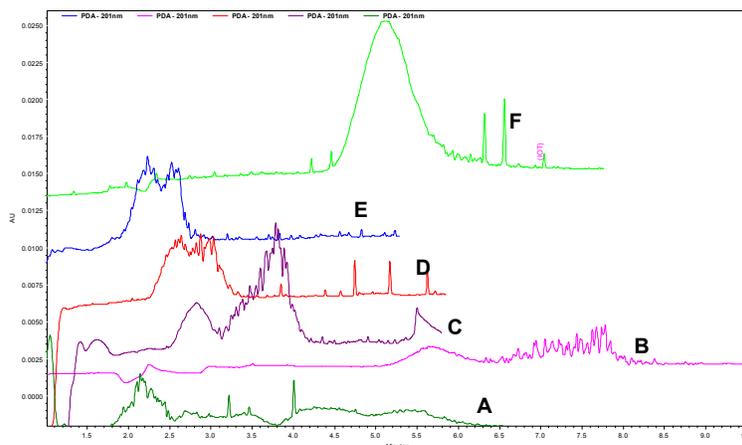


Fig. 20. Efecto del tipo de BGE sobre la forma y tamaño de la señal electroforética en *A. rouxii*. A) EDTA; B) fosfato de potasio; C) TBE; D) TRIS; E) borato de sodio; F) fosfato de sodio. 20 mM; 17 Kv. Capilar 100  $\mu\text{m}$  d.i., 48 cm  $L_T$

Las esporas de *T. atroviride*, como ya se mencionó, varían en relación a su tamaño que va de los 3 a los 4  $\mu\text{m}^2$ , aparentemente estas diferencias son insignificantes, pero, dada la sensibilidad de la electroforesis capilar para determinar pequeños cambios tanto en la ionización del analito como en el tamaño de éste, resultó imprescindible encontrar las condiciones adecuadas bajo las cuales se obtuvo una sola señal electroforética.

La forma de las señales obtenidas no permite determinar el tiempo de migración con todas las condiciones probadas, únicamente donde se obtuvo un pico con buena definición, que es el caso del análisis de *T. atroviride* con fosfato de sodio.

También en este caso, se recuperaron las esporas en el vial de salida comprobando que éstas estaban totalmente íntegras [Fig. 21].

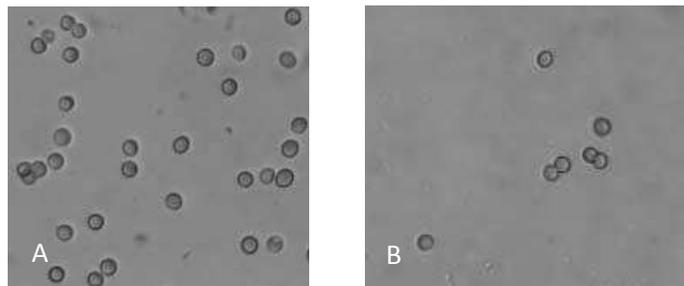


Fig. 21. Análisis microscópico de *T. atroviridae*. A) esporas antes del análisis electroforético. B) esporas recolectadas después del análisis, observándose la integridad de la pared celular. 40X

A la vista de los resultados ofrecidos por el tipo de solución electrolítica, se procedió a variar la concentración de cada buffer en un intervalo de 10 a 30 mM. Esto a partir del supuesto que indica que a mayor concentración, la definición del pico aumenta, debido a que una mayor cantidad de iones agrupan más eficazmente la banda de las esporas fúngicas dentro del capilar<sup>49</sup>.

#### 8.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL BUFFER

En cuanto a la concentración del buffer, se debe tomar en cuenta que el uso de una determinada concentración viene restringida por parámetros como la longitud del capilar y su diámetro interno, así como el campo eléctrico aplicado<sup>64</sup>. Generalmente, el uso de tampones con concentración moderadamente alta es deseable ya que aumenta su capacidad buffer<sup>32</sup>, lo que puede llevar a una disminución de los efectos de intercambio iónico entre los iones del analito con los grupos silanol de la pared del capilar<sup>64</sup>; sin embargo el uso de elevadas concentraciones puede generar un aumento de la corriente y por tanto, calentamiento por efecto Joule. Un calentamiento excesivo puede traer efectos indeseables en la eficiencia y estabilidad del analito<sup>49</sup>. Los buffers que pueden provocar efecto Joule son aquellos que poseen una elevada conductividad eléctrica permitiendo un paso excesivo de la corriente<sup>75</sup>. Esto puede controlarse aumentando la longitud del capilar o disminuyendo su d.i., ya que bajo estas condiciones el calor se disipa más fácilmente o se disminuye el potencial aplicado<sup>49</sup>. Además, considerando las células fúngicas como partículas coloidales, se debe tomar en cuenta que éstas se rodean por una capa contraiónica, cuyo espesor depende de la fuerza iónica del buffer. Por lo tanto, el espesor de dicha capa también contribuye a la movilidad electroforética de las esporas fúngicas<sup>56</sup>.

Como puede observarse, la concentración y fuerza iónica del electrolito es imprescindible en el sistema electroforético para establecer la corriente y para reducir la resistencia eléctrica del medio. De esta forma, la concentración correcta del BGE proporciona mejores resultados en términos de banda electroforética.

El impacto de la concentración del BGE sobre la forma del pico y la  $\mu_{ep}$ , se determinó en los tres tipos de hongos empleados en el estudio. Esto se llevó a cabo variando la concentración de las soluciones buffer de fosfato de sodio, borato de sodio y fosfato de potasio entre 10 y 30 mM; y de 15 a 25 mM para TRIS, TBE y EDTA. Todos los análisis se realizaron utilizando diluciones 1:10 del hongo en cuestión. El efecto de la fuerza iónica tanto en la eficiencia del pico como en la  $\mu_{ep}$  de las distintas cepas varió considerablemente.

### 8.4.1 *Agaricus bisporus* var. *Portobello*

En el caso de *A. bisporus*, el estudio de la influencia de la concentración del buffer sobre la eficiencia de la señal electroforética inició con el BGE fosfato de sodio. Se logró obtener una señal electroforética bien definida a 10, 20 y 30 mM. El fosfato de sodio juega un papel fundamental para el buen funcionamiento de los sistemas biológicos<sup>76</sup> y en el caso del análisis electroforético de las células fúngicas propicia un microambiente ácido-base estable, que se observa en la altura y área bajo la curva de la señal electroforética [Fig. 22].

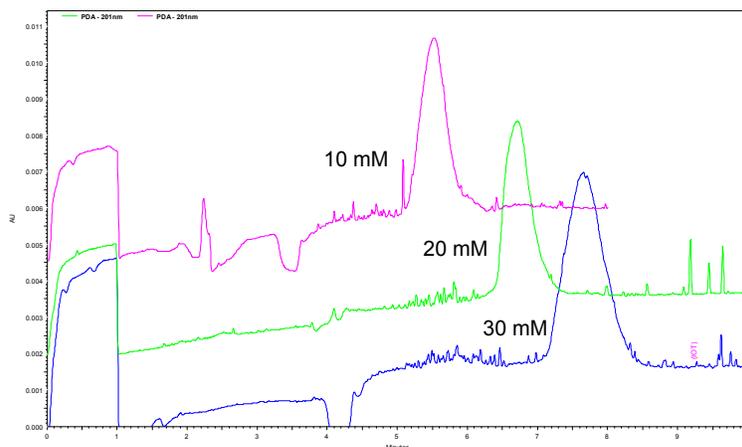


Fig. 22. Efecto de la concentración de fosfato de sodio sobre la resolución y tiempo de migración en esporas de *A. bisporus*. pH 7; 17 Kv.

La mayoría de los estudios que utilizan EC para el análisis de MO, describen el empleo de extremadamente bajas concentraciones del buffer (0.5 a 1.0 mM), con el fin de no dañar las células. Este fenómeno es más frecuente en bacterias<sup>1-3,13-14,16-25</sup>. A pesar de esto, una concentración elevada del buffer a veces es conveniente para evitar electrodispersión y obtener picos más definidos<sup>25</sup>.

Existe además, una relación estrecha con el catión unido al fosfato, ya que al realizar el análisis con fosfato de potasio, los resultados cambiaron considerablemente. A concentración de 10 mM se obtuvo un pico bien definido. Sin embargo, a concentraciones de 20 y 30 mM se observan picos distorsionados y pequeños, además de que presentan ensanchamiento de banda [Fig. 23].

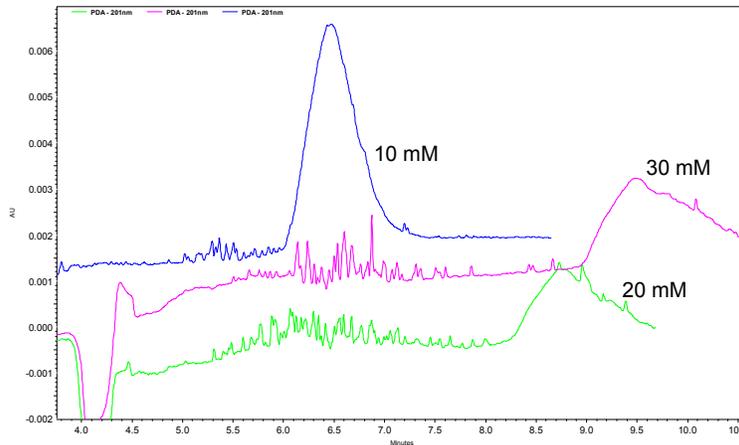


Fig. 23. Efecto de la concentración de fosfato de potasio sobre la forma de la señal electroforética de *A. bisporus*. pH 7; 17 Kv.

El tipo de señales obtenidas bajo estas condiciones, pueden deberse a una interacción electrostática diferencial entre los iones  $K^+$  de la solución con los componentes de la pared celular fúngica, provocando dispersión de las células dentro de la misma banda electroforética. Las atracciones electrostáticas de cationes sobre la superficie de la célula ya han sido reportadas en algunos estudios. Tal es el caso del análisis de diferentes cepas de *Escherichia coli*, donde el incremento de la fuerza iónica tuvo un fuerte impacto sobre las propiedades electrostáticas de las células<sup>71</sup>.

Por otro lado, el tiempo de migración obtenido con fosfato de potasio, bajo las tres concentraciones ensayadas, es mayor en relación a los tiempos de migración observados con fosfato de sodio, debido a que este último tiene un menor peso molecular.

Al emplear soluciones buffer con concentraciones ligeramente más elevadas, el espesor de la capa difusa de la doble capa eléctrica disminuye y el de la zona compacta aumenta, el potencial  $Z$  entonces disminuye y en la misma proporción disminuye el EOF, mejorando la eficiencia del pico<sup>65</sup>. Esto se demostró al realizar el análisis con borato de sodio, donde la señal analítica mejora al aumentar la concentración de 10 a 30 mM [Fig. 24].

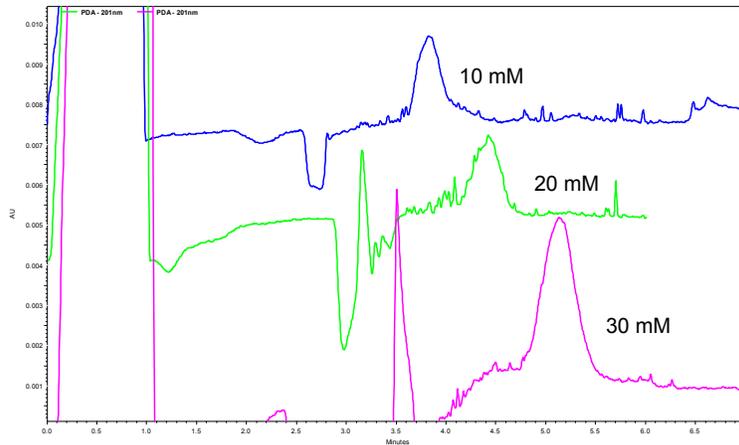


Fig. 24. Efecto de la concentración de borato de sodio sobre la forma y tamaño de la señal electroforética. pH 8; 17 Kv.

Además, al aumentar la concentración, los iones propician un incremento en la compactación de la banda de las esporas fúngicas, disminuyendo la difusión de la muestra a lo largo de la dirección de migración.

El buffer TRIS es uno de los más utilizados en EC para el análisis entidades biológicas tales como bacterias<sup>2</sup> y levaduras<sup>18</sup>, obteniendo buenos resultados en términos de banda; así como estabilidad del proceso. Sin embargo, las concentraciones utilizadas oscilan de 1 a 5 mM, para evitar aumento en la corriente eléctrica<sup>2</sup>. No obstante, en el caso del análisis de esporas de *A. bisporus* las concentraciones probadas superaron estos valores. Obteniéndose señales electroforéticas bien definidas a 15, 20 y 25 mM, sin observar un incremento significativo en la corriente eléctrica [Fig. 25].

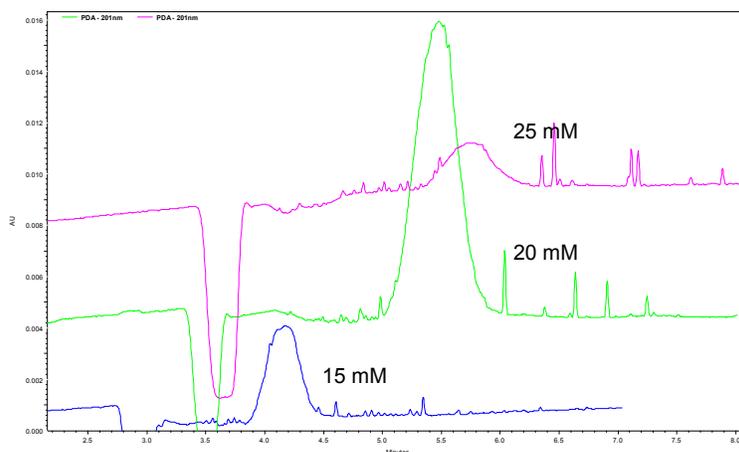


Fig. 25. Efecto de la concentración de TRIS sobre la resolución y movilidad electroforética en el estudio de esporas de *A. bisporus*. pH 8; 17 Kv.

La mejor concentración bajo la cual el área bajo la curva fue mayor es a 20 mM, esto puede deberse a que tal concentración favorece una mayor exhibición de los grupos más absorbentes presentes sobre la pared de la célula fúngica a la  $\lambda$  establecida. A 25 mM la sensibilidad de la detección disminuyó, debido a la mayor cantidad de iones que se encuentran apantallando a las células fúngicas a su paso por el detector<sup>75-76,66</sup>.

Pocas veces se ha hecho referencia al uso de EDTA como solución tamponante en EC. Sin embargo, en el estudio de esporas de *A. bisporus* se logró obtener un pico electroforético bajo concentraciones de 15 y 20 mM [Fig. 26]

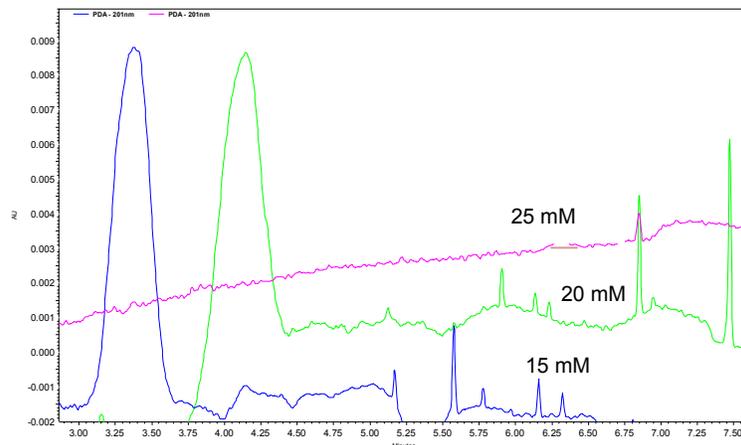


Fig. 26. Efecto de la concentración de EDTA sobre la forma de la señal electroforética de *A. bisporus*. pH 8; 17 Kv.

Aunque se lograron obtener señales analíticas con EDTA bajo dos de las tres concentraciones probadas, la línea base se presentó muy inestable.

Por último, también se probaron tres diferentes concentraciones con TBE, observándose el mismo fenómeno que con TRIS. Con 15, 20 y 25 mM se obtuvieron señales bien definidas, presentando un tiempo de migración característico [Fig. 27].

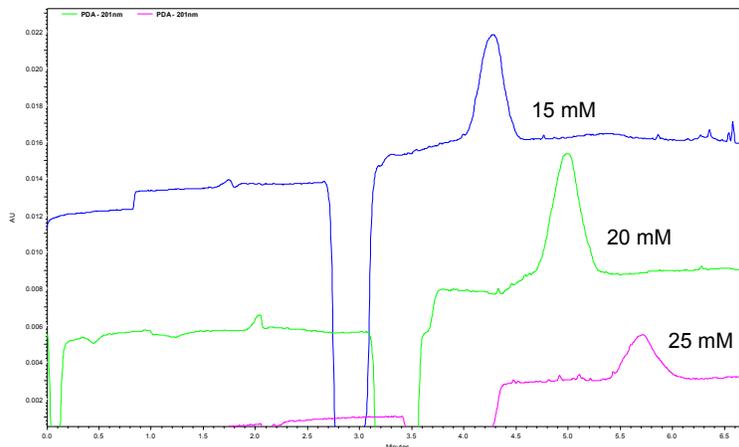


Fig. 27. Efecto de la concentración del sobre la resolución y movilidad electroforética en el estudio de esporas de *A. bisporus*. pH 8.5; 17 Kv.

La solución TBE se ha empleado frecuentemente con aditivos como PEO (polietilén óxido)<sup>2</sup>, surfactantes catiónicos y líquidos iónicos<sup>3</sup>, para obtener señales con alta eficiencia y resolución. Esto especialmente con la finalidad de determinar la presencia o total ausencia de MO dentro de una misma muestra. Tomando en cuenta las características heterogéneas de los MO, el perfil de los picos a partir de la migración de cada cepa es apto para obtener señales anchas. El ensanchamiento de los picos es un problema crítico especialmente cuando la EC se aplica a mezclas de MO. De esta forma, el aumento de la eficiencia del pico es necesario<sup>57</sup>.

#### 8.4.1.a EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL BUFFER SOBRE LA $\mu_{ep}$ EN ESPORAS DE *A. bisporus*.

Puesto que en la mayoría de las condiciones probadas se logró obtener un pico definido, se puede determinar el tiempo de migración y a partir de este la movilidad electroforética de *A. bisporus* [Fig. 26 y 27]. Este hongo mostró un comportamiento concreto con respecto al incremento de la concentración del buffer: *la movilidad electroforética disminuyó al aumentar la concentración de las soluciones electrolíticas*. Lo anterior se debe a que las esporas fúngicas se rodean de una capa contraiónica proveniente de los iones de la solución, al incrementar la concentración, se incrementa también dicha capa y el efecto neto es una mayor resistencia de las células al flujo electroforético<sup>75</sup>. Por otro lado, un aumento en la fuerza iónica del buffer, produce una disminución del espesor de la doble capa eléctrica, con subsiguiente reducción del EOF<sup>49</sup>.

En la Figura 28, se grafica la movilidad obtenida a partir del análisis realizado con los BGE fosfato de sodio y borato de sodio, mostrando que a mayor concentración disminuye la movilidad de las esporas de *A. bisporus*. Además, la movilidad está en función del tipo de buffer, presentando una mayor movilidad con borato de sodio, en relación a fosfato de sodio.

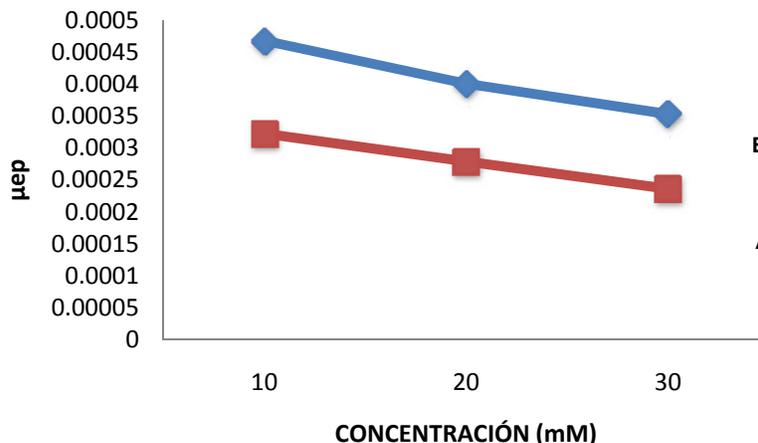


Fig. 28. Efecto de la concentración del BGE sobre la  $\mu_{ep}$  en el análisis de esporas de *A. bisporus*. A) fosfato de sodio; pH 7; B) borato de sodio; pH 8. Cada punto en la gráfica corresponde a concentraciones 10, 20 y 30 mM. 17 Kv.

Aún cuando al incrementar la concentración, aumentó el paso de la corriente eléctrica, ésta fue más estable. Adicionalmente, la mejor forma del pico se obtuvo al utilizar concentraciones ligeramente mayores, así como también se logró una mayor reproducibilidad. Aunado a esto, se observó integridad celular tanto en el examen microscópico, como en el electroferograma correspondiente a cada análisis (no se presentaron picos indeseables).

En la siguiente gráfica se observa el mismo comportamiento. En ésta se determinó la  $\mu_{ep}$  a partir del análisis realizado con TRIS y TBE. En este caso las diferencias en las movilidades electroforéticas entre ambos buffer están menos marcadas [Fig. 29].

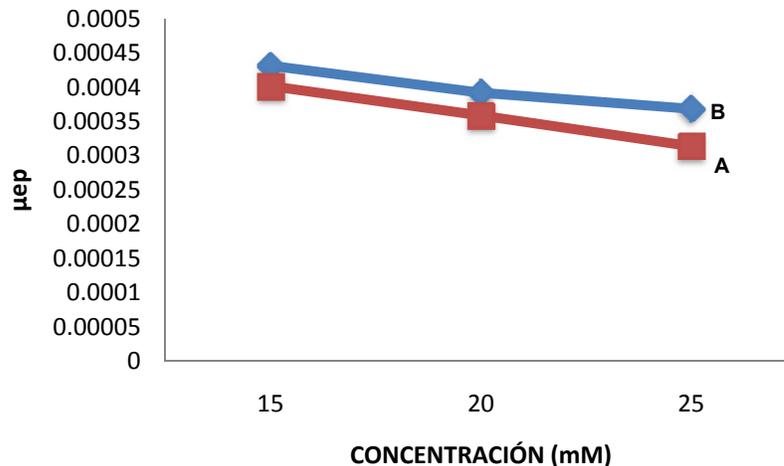


Fig. 29. Efecto de la concentración del BGE sobre la  $\mu_{ep}$  en el análisis de esporas de *A. bisporus*. A) TBE, pH 8.5 pH 7; B) TRIS, pH 8. Cada punto en la gráfica corresponde a concentraciones 15, 20 y 25 mM. 17 Kv.

La  $\mu_{ep}$  proporciona una estimación de la carga de la superficie<sup>68</sup>. Valores positivos de  $\mu_{ep}$  representan el movimiento de los microorganismos hacia el electrodo negativo y poseen una carga neta positiva<sup>71-72</sup>. Aún cuando la superficie de las esporas fúngicas contiene grupos ácidos ionizables al contacto con la solución, presentando una carga negativa, estas cargas están apantalladas por el microambiente del grupo cargado, por asociación con contraiones de la solución. La carga neta efectiva de la pared celular (que incluye la adquirida por la ionización de los grupos funcionales, así como la adsorción de iones de la solución), en un tampón particular a un pH determinado, es la que influye en la migración de las esporas fúngicas en EC<sup>64</sup>.

#### 8.4.2 *Amylomyses rouxii*

En el estudio electroforético de *A. rouxii* también se evaluó el efecto de la concentración de la solución tamponante sobre la eficiencia (forma y tamaño) de la señal electroforética. En cada caso, los resultados se mostraron significativamente diferentes, obteniendo desde un solo pico, hasta la separación de las esporas fúngicas en dos poblaciones.

La movilidad de los organismos individuales dentro de una misma población microbiológica, no es necesariamente la misma y, como ya se mencionó, esto se debe a que existen subpoblaciones dentro de la propia cepa<sup>31</sup>. En el estudio

electroforético de *A. rouxii* se observan claramente las características heterogéneas de las esporas fúngicas al obtener más de una señal analítica.

Al realizar el análisis con fosfato de sodio a concentraciones de 10, 20 y 30 mM, las esporas mostraron dos comportamientos. A 10 mM, las células fúngicas se agruparon en dos señales electroforéticas, como consecuencia de la variación en el tamaño de las esporas y por tanto las diferencias en la ionización de la pared celular [Fig. 30].

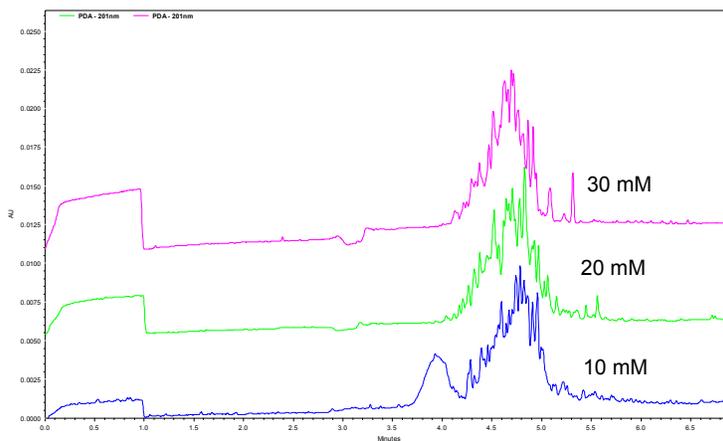


Fig. 30. Efecto de la concentración del fosfato de sodio sobre la forma de la señal electroforética *A. rouxii*. pH 7; 17 Kv.

Bajo concentraciones de 20 y 30 mM fue posible agrupar las esporas en una sola señal. Aún más, se pudo obtener un pico más estrecho con 30 mM, permitiendo una mayor compactación de las células en la banda electroforética durante la migración de éstas a través del capilar.

Durante la corrida, la zona de la muestra cambia constantemente para ser más estrecha y viaja como un único punto hacia el cátodo. Los MO, en general, poseen la tendencia de formar agrupaciones no covalentes. Esto, aunado a bajos coeficientes de difusión de las partículas grandes, como son los MO, indican la difusión longitudinal como el contribuyente principal del ensanchamiento de banda en EC. Varios reportes demuestran que la mejor forma del pico se obtiene al utilizar soluciones electrolíticas con concentraciones ligeramente mayores, lo que promueve la agrupación de las esporas dentro de la misma banda electroforética<sup>25</sup>.

Con fosfato de potasio, aun cuando se obtuvo una sola señal bajo las tres concentraciones probadas, ésta se presentó muy amplia, disminuyendo ligeramente este efecto conforme aumentó la concentración. Dado que la fuerza

iónica del buffer aumentó al incrementarse la concentración, fue posible aumentar la compactación de la banda de las esporas fúngicas [Fig. 31].

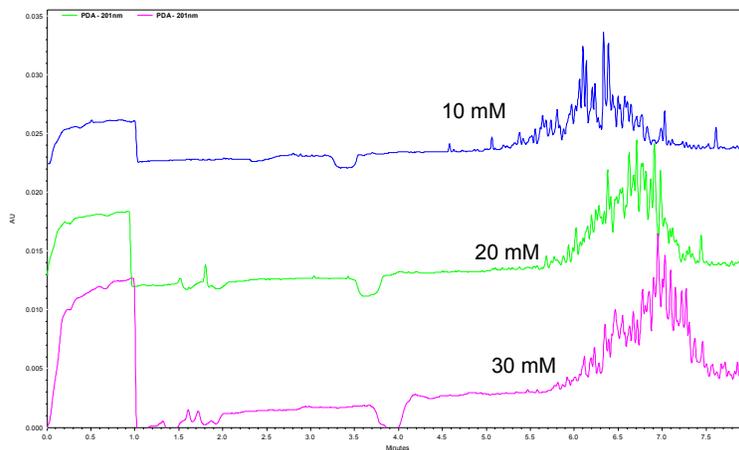


Fig. 31. Efecto de la concentración de fosfato de potasio sobre la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. pH 7; 17 Kv.

Ya se ha mencionado la baja eficiencia en la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. La anchura de los picos observada se debe a las características heterogéneas del MO, lo que promueve una mayor dispersión dentro de la misma banda electroforética. Es por esto que es esencial el entendimiento y control de las fuerzas de dispersión y de adhesión de las esporas fúngicas durante el proceso electroforético. Lo que puede traer efectos benéficos en la agrupación de las células dentro de una misma zona electroforética sin que éstas presenten agregación celular<sup>74</sup>.

Empleando borato de sodio, se observó el mismo comportamiento que con fosfato de sodio y de potasio en cuanto a la mejora de la forma del pico en relación a su tamaño y estrechez. Esto se dio al aumentar la concentración, y se obtuvo un pico más definido con fosfato de sodio 30 mM [Fig. 32].

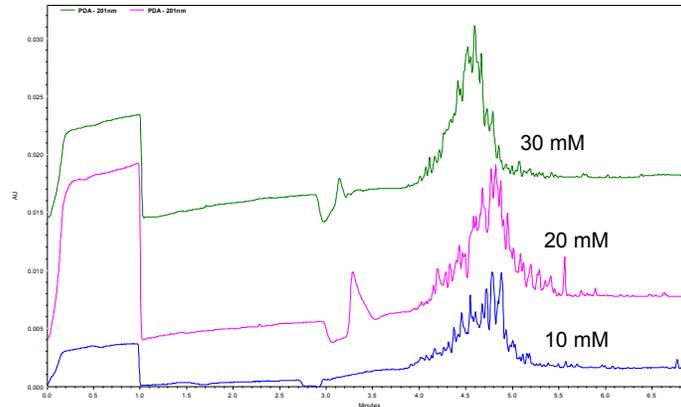


Fig.32. Efecto de la concentración de borato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de *A. rouxii* pH 8; 17 Kv.

Uno de los objetivos de probar diferentes concentraciones con TRIS fue observar si era factible obtener una sola señal electroforética modificando unicamente la concentración de la solución; sin embargo no fue posible con este buffer. En general, se observó que al incrementar la concentración de 15 a 25 mM, la separación entre las dos señales se redujo [Fig. 33].

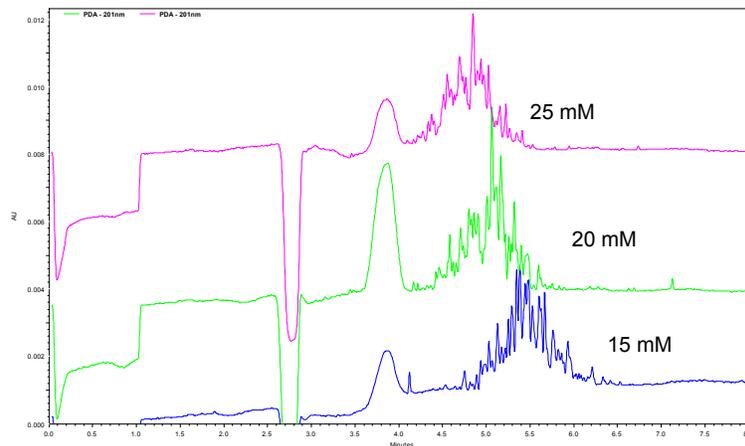


Fig. 33. Efecto de la concentración de TRIS sobre la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. pH 8; 17 Kv.

Dado que a mayor concentración hay menor separación de las bandas<sup>49</sup>, probablemente si se incrementara aún más la concentración de TRIS, se lograría obtener un solo pico; no obstante se debe tomar en cuenta que al aumentar tanto la fuerza iónica como la concentración puede incrementarse la resistencia al flujo de las esporas fúngicas provocando un aumento considerable en el tiempo de

migración<sup>75</sup>. Sin embargo, *A. rouxii* presenta un comportamiento contrario, ya que a mayor concentración el tiempo de migración disminuye, pero no se debe dejar de lado que otro efecto de aumentar excesivamente la concentración del buffer es un aumento de la corriente, que trae como consecuencia calentamiento por efecto Joule, provocando inestabilidad del proceso<sup>49</sup> y hasta lisis celular<sup>69,76</sup>.

Algunas teorías han indicado la formación de agregados celulares luego de la aplicación del campo eléctrico, debido sobretodo a la polarización de los analitos. Estas observaciones han sido principalmente en bacterias<sup>2,74</sup> y microesferas de látex<sup>73</sup>, alterando su  $\mu_{ep}$  y provocando la aparición de múltiples picos. No obstante, en el análisis de *A. bisporus*, *A. rouxii* y *T. atroviride*, las suspensiones fueron sonicadas previo a la inyección, garantizando la monodispersión de las esporas fúngicas. Por lo tanto, la diferencia en las movilidades electroforéticas de las esporas de *A. rouxii* en buffer TRIS no se debe a la formación de “clusters” sino a las variaciones en el tamaño y composición celular.

Con EDTA no se obtuvieron picos definidos a 15, 20 y 25 mM, solo se logró obtener señales anchas y muy pequeñas, además la línea base fue muy inestable [Fig. 34].

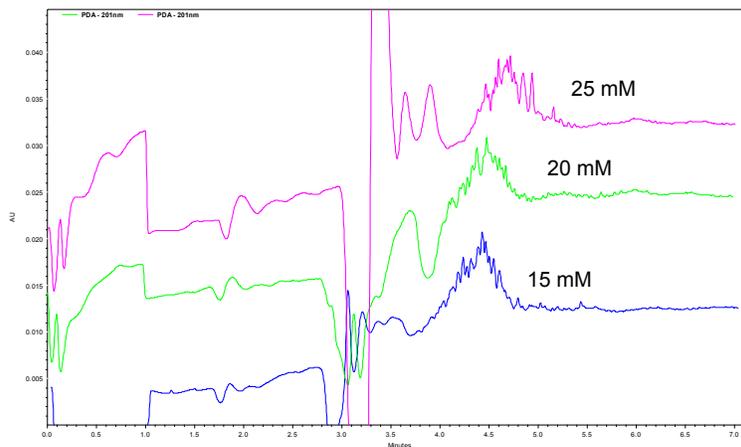


Fig. 34. Efecto de la concentración de EDTA sobre la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. pH 8; 17

Aunque EDTA se ha utilizado primordialmente en conjunto con TRIS y ácido bórico para constituir el tampón TBE<sup>24</sup>, se decidió probar únicamente EDTA en solución. Lo anterior debido a que EDTA forma complejos con metales<sup>75</sup>, los cuales pudieran formar parte de enzimas localizadas en la pared celular de las esporas fúngicas ( $Mg^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{++}$ , etc.), proporcionando a la superficie celular propiedades ácido-base que permiten el análisis mediante EC.

Con TBE tampoco fue posible la obtención de picos definidos, disminuyendo notablemente la sensibilidad del análisis [Fig. 35].

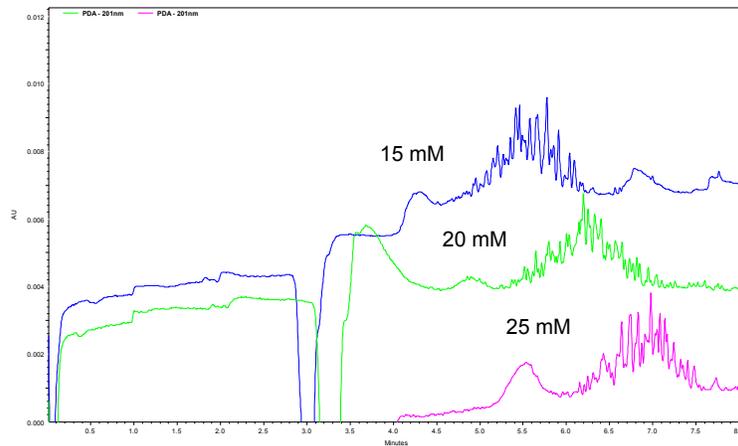


Fig. 35. Efecto de la concentración de TBE sobre la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. pH 8.5; 17 Kv.

Aun cuando TBE no permitió obtener picos estrechos, generó una fuerza iónica adecuada para la conductancia eléctrica, sin excederse cuando se emplearon voltajes elevados.

#### 8.4.2.a EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL BUFFER SOBRE LA $\mu_{ep}$ DE ESPORAS DE *A. rouxii*.

Toda vez que fue posible obtener una señal relativamente definida para *A. rouxii*, se determinó su  $\mu_{ep}$ . En la Figura 36 se presenta la movilidad obtenida a partir del análisis con fosfato de potasio, fosfato de sodio y borato de sodio. Los resultados muestran que con fosfato de potasio el tiempo de migración aumentó al incrementar la concentración de la solución buffer, disminuyendo así su  $\mu_{ep}$ . Este comportamiento no siempre se cumple; puesto que al variar la concentración de borato de sodio, la mayor movilidad se presentó bajo una concentración de 20 mM. En tanto que con fosfato de sodio la movilidad se aproximó a un valor constante con el incremento de la concentración.

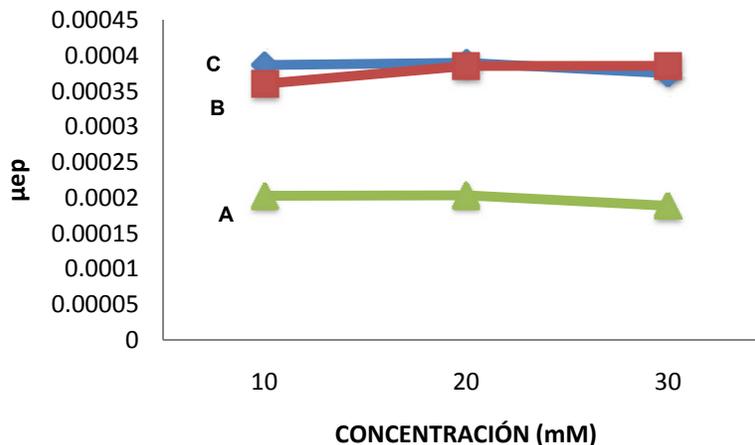


Fig. 36. Efecto de la concentración del BGE sobre la  $\mu_{ep}$  en el análisis de esporas de *A. rouxii*. A) Fosfato de potasio; pH 7; B) Fosfato de sodio, pH 7; C) Borato de sodio, pH 8. Cada punto en la gráfica corresponde a concentraciones 10, 20 y 30 mM. 17 Kv.

Es evidente que en el estudio de *A. rouxii*, la  $\mu_{ep}$  está en función directa del tipo de buffer que se utiliza para el análisis, así como también de su concentración.

Hipotéticamente, la habilidad de la población celular para expresar múltiples movilidades electroforéticas puede ser práctico para que las esporas fúngicas se adhieran a ambientes complejos. Por ejemplo, las vías respiratorias, que están conformadas por diferentes tejidos<sup>31</sup>, logrando de esta forma su supervivencia y reproducción. Por lo que, actualmente, además de la hidrofobicidad y el análisis microscópico, la  $\mu_{ep}$  se usa para describir la superficie y las propiedades de adhesión de una amplia variedad de MO bajo diferentes condiciones<sup>71</sup>.

Por otro lado, las características de adhesión de las esporas fúngicas, pueden contribuir a la adsorción de éstas en la pared interna del capilar, ocasionando sesgos en su  $\mu_{ep}$ . Estas interacciones están bien documentadas en proteínas y otras especies orgánicas<sup>64,73</sup>. En estos casos se emplean aditivos (PEO, CTAB) disueltos en el buffer que modifican tanto la  $\mu_{ep}$  del analito, como el EOF<sup>49</sup>. Sin embargo, en el caso de las células fúngicas, tales interacciones no se observaron, debido ante todo al lavado exhaustivo del capilar anterior y posterior a cada corrida. Aunado a esto, la reproducibilidad de la  $\mu_{ep}$  fue mayor.

### 8.4.3 *Trichoderma atroviride*

En la actualidad, existen diversos métodos de preconcentración de la muestra dentro del capilar denominados de “stacking”, los cuales, se utilizan para mejorar la sensibilidad y eficacia de la detección. El fenómeno de stacking se basa en la diferencia en la conductividad entre la muestra y el electrolito de separación<sup>65,66</sup>. Al realizar el análisis de *T. atroviride* con fosfato de sodio 20 mM se obtuvo un pico bien definido y con gran altura [Fig. 37]. En este caso, aún cuando no es posible saber la conductividad que presentó la muestra al paso de la corriente, se puede plantear la hipótesis de que bajo esta concentración la conductividad eléctrica de la solución es mayor a la de las esporas, permitiendo que la muestra se concentre en una sola banda electroforética<sup>50,65</sup>.

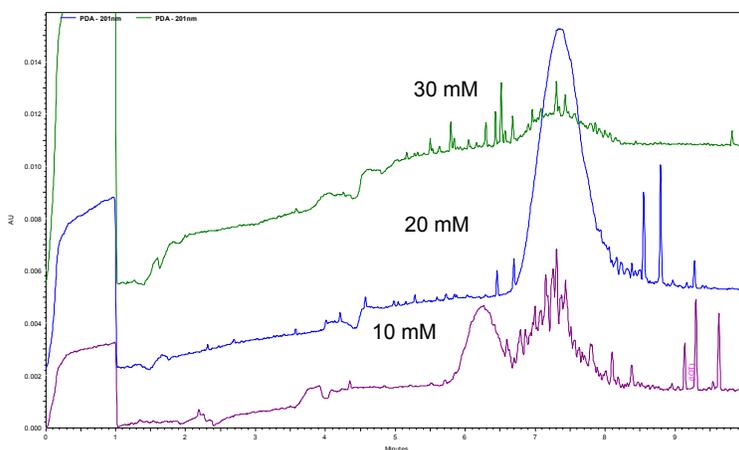


Fig. 37 Efecto de la concentración de fosfato de sodio en la forma de la señal electroforética de *T. atroviride*. pH7; 17 Kv.

Algunas ocasiones, la diferencia en las conductividades no es suficiente para agrupar a la población celular. En estos casos se emplean agentes bloqueantes que invierten el movimiento de los MO hasta que se agrupan dentro de una misma banda electroforética. Los aditivos usados no interfieren en la detección del analito, únicamente en su agrupación sin provocar agregación celular o “clusters”<sup>18</sup>.

En el análisis realizado con fosfato de potasio se obtuvieron dos señales con 10, 20 y 30 mM [Fig. 38]. Se observó que al aumentar la concentración, la distancia entre las señales disminuye, lo que sugiere el empleo de una mayor concentración, ya que esto podría dar como resultado una sola banda electroforética. Sin embargo, una mayor concentración de fosfato de potasio

elevaría de manera significativa la corriente eléctrica, ya que este buffer es muy conductivo y podría ocasionar lisis celular.

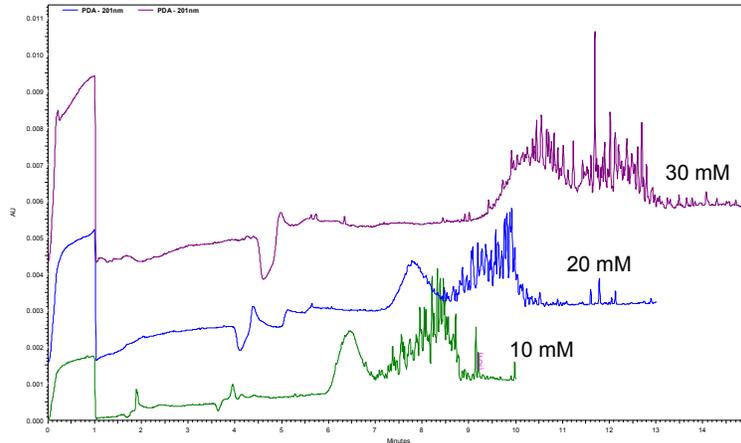


Fig. 38. Efecto de la concentración de fosfato de potasio en la forma de la señal electroforética de *T. atroviride*. pH 7; 17 Kv.

Al igual que en el análisis de *A. bisporus* y *A. rouxii* con el buffer borato de sodio, en el estudio de *T. atroviride*, la señal analítica mejoró considerablemente al aumentar la concentración de 10 a 30 mM [Fig. 39]. Bajo concentraciones de 10 y 20 mM se observa una señal ancha y asimétrica, producto de la separación ineficaz de las poblaciones celulares en dos bandas electroforéticas. Al incrementar la concentración a 30 mM, la integración de las esporas fúngicas en un solo pico es más efectiva, obteniéndose un pico más estrecho y definido.

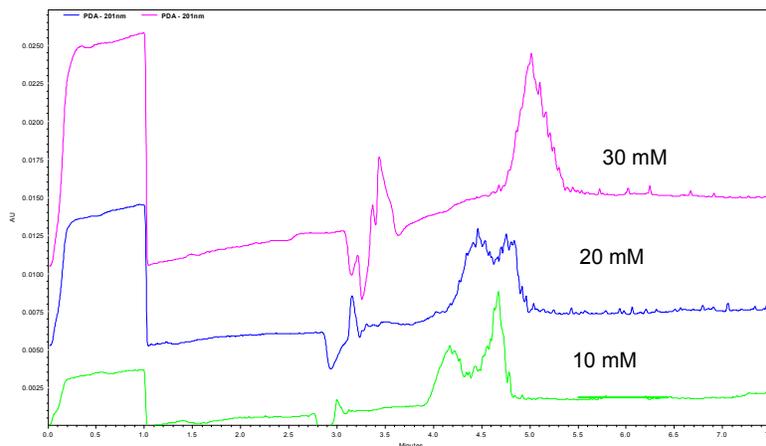


Fig. 39. Efecto de la concentración de borato de sodio sobre la forma de la señal electroforética de *T. atroviride*. pH 8; 17 Kv.

Como se ha venido viendo hasta el momento, cada buffer proporcionó diferentes eficiencias en cuanto a la forma y tamaño de la señal electroforética; además, la  $\mu_{ep}$  está en función del buffer de separación. La elección de un buffer en particular es importante desde la perspectiva de la generación del efecto Joule y del pH que permite utilizar<sup>49</sup>. El buffer borato de sodio, en el análisis de los tres hongos empleados en este trabajo, mostró gran estabilidad bajo las condiciones probadas, proporcionando corrientes menores a 150  $\mu$ A. Así mismo, conforme incrementó la concentración de la solución, la compactación de las esporas fúngicas fue más eficaz, mejorando en los tres casos la forma del pico y permitiendo la determinación de la  $\mu_{ep}$ . Otra observación importante en el empleo de este buffer, es que puede utilizarse para realizar más de tres corridas sin que haya depleción de la solución. A pesar de esto, todas las soluciones electrolíticas incluyendo borato de sodio, fueron remplazadas después de tres corridas (7-15 min en cada corrida).

Los resultados obtenidos con TRIS muestran el comportamiento inverso observado con borato de sodio, puesto que al aumentar la concentración, la señal se tornó más ancha. Esto se originó por una mayor electrodispersión de las células dentro del capilar [Fig. 40].

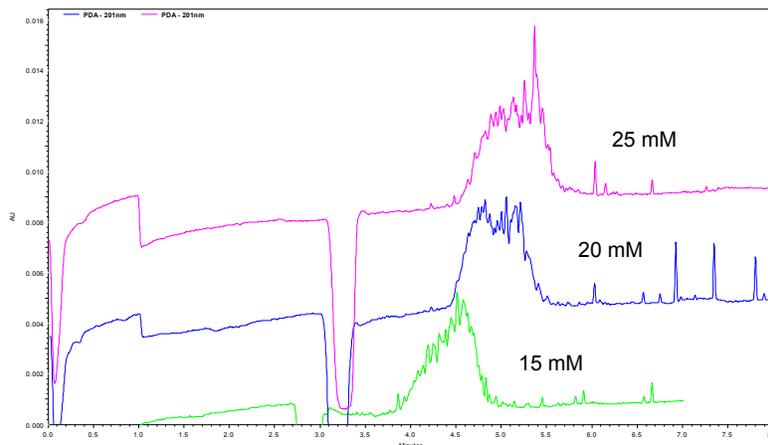


Fig. 40. Efecto de la concentración de TRIS sobre la forma de la señal electroforética de *T. atroviride*. pH 8; 17 Kv.

Con TBE la señal también se separó en dos picos. Sin embargo, con este buffer se logró observar de manera más clara del efecto que tiene el incremento de la concentración en la agrupación de la muestra dentro de una sola banda. En la

Figura 41, bajo concentraciones de 15 y 20 mM, se observa la separación de las esporas fúngicas en dos poblaciones, la primera señal corresponde a una población de esporas que presentan un tamaño más pequeño en relación a la segunda señal que pertenece a una población mayoritaria de células. Además, dada las diferencias de tamaño, existe una ionización diferencial que aumenta el efecto de la separación de las esporas en dos bandas electroforéticas.

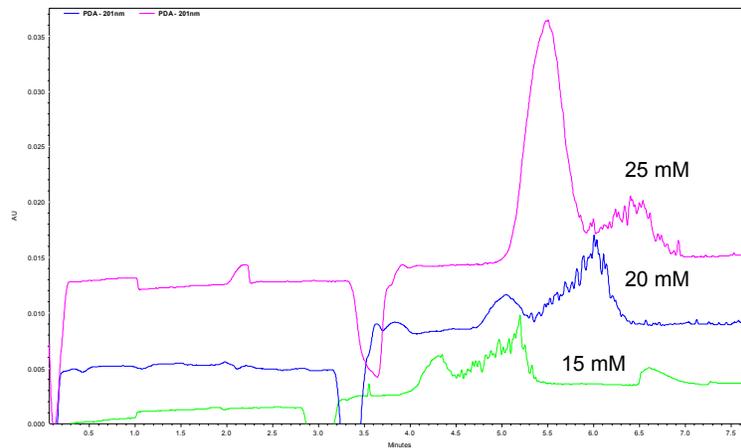


Fig. 41. Efecto de la concentración de TBE sobre la forma de la señal electroforética de *T. atroviride*. pH 8; 17 Kv.

El mismo comportamiento se obtiene con 25 mM; sin embargo, es claro que bajo estas condiciones la primera señal posee mayor altura. En este caso, puede estar sucediendo que al aumentar la concentración del electrolito se hace más evidente la diferencia en la conductividad entre la muestra y la solución buffer. Al aplicar el voltaje, la fuerza del campo eléctrico a través de la zona donde se encuentran las esporas será mayor que en la zona donde se localiza el electrolito, produciéndose un considerable aumento de la movilidad de las esporas, hasta que alcanzan la interface con el buffer de separación. Lo anterior es debido a que la movilidad electroforética de los solutos aumenta directamente con la fuerza del campo eléctrico aplicado. Una vez que las esporas llegan a la zona límite, su movimiento se hace más lento debido a que experimentan un campo eléctrico menor<sup>50,65-67</sup>. De este modo, las esporas se concentran en una sola banda electroforética [Fig. 42].

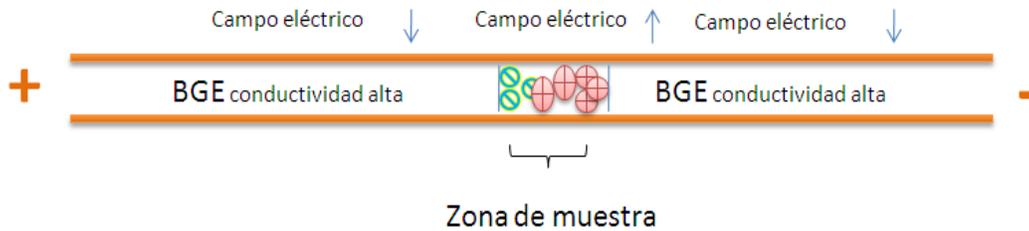


Fig. 42. Representación del efecto stacking de las esporas de *T. atroviride*. TBE. pH 8; 17 Kv.

En la Figura 41, también puede observarse que al lado de la señal mayoritaria se encuentra una población, ésta se debe a que no todas las células se concentraron en la misma zona, pasando por el detector antes de que esto sucediera.

El proceso electroforético es más complejo en MO en relación a otros analitos (proteínas, DNA, etc.), ya que su movilidad algunas veces no puede ser estimada debido a la variación en la composición de la superficie y no poseen una carga fija<sup>3,58</sup>. Frecuentemente los hongos presentan una distribución de movilidades electroforéticas debida a la variación en el tamaño y en la carga de la superficie. Esta cualidad se denomina *heterogeneidad electroforética*. Además, algunos hongos son más susceptibles a determinados valores de pH, altos campos eléctricos y diferencias en la osmolaridad<sup>3</sup>.

En el caso de *T. atroviride* no fue posible determinar la  $\mu_{ep}$  bajo las diferentes condiciones ensayadas, puesto que el tipo de señales obtenidas no permiten la caracterización del hongo mediante su tiempo de migración.

### 8.5 . CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE OBTUVO LA MEJOR SEÑAL ELECTROFORÉTICA

En la siguiente tabla, se recopilan las condiciones bajo las cuales se obtuvo la mejor señal analítica, en relación a su forma y tamaño, en el estudio electroforético de *A. bisporus*, *A. rouxii* y *T. atroviride* [Tabla 8].

<b>Tabla 8. Condiciones para el análisis de células fúngicas.</b>			
<b><i>Agaricus bisporus</i></b>			
<b>BGE</b>	<b>pH</b>	<b>Concentración (mM)</b>	<b>t<sub>m</sub> (minutos)</b>
Fosfato de sodio	7	10	5.54
	7	20	6.41
	7	30	7.56
Fosfato de potasio	7	10	6.80
Borato de sodio	8	30	5.06
TRIS	8	20	4.56
TBE	8.5	20	4.98
<b><i>Amylomyces rouxii</i></b>			
Fosfato de sodio	7	20	4.63
Fosfato de potasio	7	20	6.70
Borato de sodio	8	20	4.76
<b><i>Trichoderma atroviride</i></b>			
Fosfato de sodio	7	20	7.41
Borato de sodio	8	30	4.98
El t <sub>m</sub> es el resultado de la media de tres análisis.			

Es evidente que el tiempo de migración es propio de cada hongo y depende tanto del tipo de buffer que se utiliza en el análisis, como de su pH y concentración.

El principal beneficio de este método es el poco tiempo requerido para el análisis. En este estudio, después de tan solo 15 a 20 minutos del inicio de la corrida, se obtuvieron resultados concretos, arrojando picos electroforéticos con tiempos de migración menores a 10 minutos. Esta particular cualidad de la EC es una solución revolucionaria, especialmente frente a técnicas convencionales usadas en la detección de diversos MO, las cuales requieren de varios días o hasta semanas para proporcionar resultados específicos<sup>2</sup>.

A partir de las condiciones electroforéticas presentadas en la tabla 7, se procedió a modificar el pH de la solución, con la finalidad de producir un cambio en la ionización de la superficie celular y con esto, determinar el efecto sobre la forma del pico y la  $\mu_{ep}$ .

## 8.6 EFECTO DEL pH DEL BUFFER

La velocidad de migración de los analitos en el interior de la columna capilar depende, entre otros factores ya mencionados, del pH del tampón de separación, ya que éste influye tanto en la movilidad electroforética de los analitos, como en la electroosmótica<sup>66</sup>.

Al exhibir las células fúngicas propiedades ácido-base (debidas a la presencia de grupos funcionales ionizables sobre la pared celular), el pH de la solución buffer determina su grado de ionización y por tanto su movilidad electroforética, ya que ésta es proporcional a la carga neta de las especies. Por otro lado, el grado de ionización de los grupos silanol de la pared del capilar también depende del pH, modificando el EOF. Si el pH del buffer aumenta, la ionización de la pared interna del capilar será mayor, provocando un incremento en el EOF y por tanto la  $\mu_{ep}$  del analito. En cambio, si el pH es bajo, el EOF disminuye, induciendo el mismo efecto en la  $\mu_{ep}$ <sup>49-50,65-67</sup>.

En el análisis electroforético de los hongos es de gran importancia tener en cuenta este factor, no solamente por que es el que determina la movilidad, sino también porque pequeños cambios de acidez o basicidad pueden provocar lisis celular<sup>69-70</sup>. Además el pH del medio afecta la eficacia, eficiencia y sensibilidad del objeto de estudio, en este caso, esporas fúngicas.

### 8.6.1 *Agaricus bisporus var. Portobello*

En el análisis de *A. bisporus*, la variación del pH inició determinando el intervalo a utilizar. Puesto que el  $pK_a$  de fosfato es 7.21 y la mejor capacidad tamponante se encuentra alrededor de dos unidades de este valor<sup>1,50</sup>, se eligió modificar el pH entre 7 y 8. En la Figura 43 se puede observar claramente las enormes diferencias en el tamaño de la señal al variar el pH.

Al aumentar el pH en tan solo 0.2 unidades la ionización de la pared celular aumenta. De esta manera, el pH puede producir cambios conformacionales de las moléculas, promoviendo una estructura con mayor o menor capacidad de absorbancia a la longitud de onda del estudio<sup>76</sup>. Esto puede explicar por qué a pH 7.4 el pico es mucho mayor en relación a los otros valores de pH. Además, el aumento en el tamaño de la señal es gradual hasta llegar a 7.4 y a partir de éste valor, el pico vuelve a decrecer.

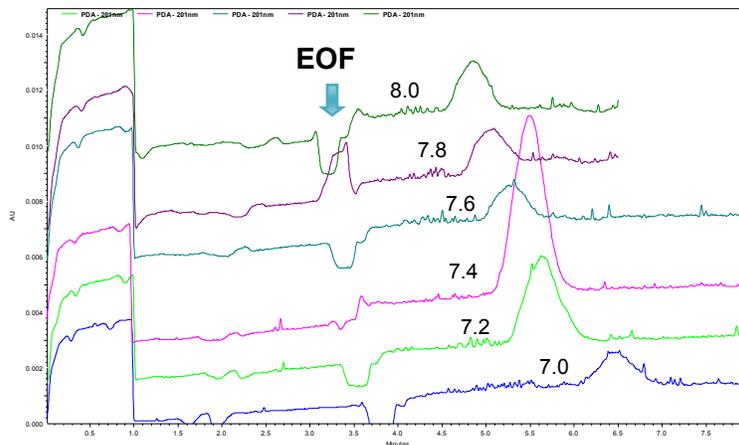


Fig. 43. Influencia del pH sobre la forma de la señal de *Agaricus bisporus*. Fosfato de Sodio, 20 mM; 17 Kv.

En el apartado 7.3.2, en la tabla 6, se indicó de manera general el pH elegido para el buffer de corrimiento. Los hongos presentan un mayor crecimiento y desarrollo a valores pH ligeramente ácidos, entre 6 y 6.5<sup>15</sup>; no obstante, la célula debe mantener el pH dentro del estrecho margen de entre 6.5 y 8.0<sup>70,76</sup>. Lo anterior se debe a que los constituyentes de las células, por ejemplo las proteínas, contienen grupos ácidos (carboxilos) y básicos (amino) en sus superficies. La respuesta de estos grupos a los cambios de pH a menudo tienen una importancia considerable para su función<sup>76</sup>.

Para la variación del pH fue necesario conocer en cierta medida las propiedades ácido base de las esporas fúngicas, lo cual se logró realizando experiencias a pHs ácidos y básicos, y comprobar la posición del pico electroforético respecto al EOF. Un analito con algún grupo básico estará protonado a pHs bajos y migrará antes del EOF; mientras que algún analito con grupos ácidos se comportará como un anión y migrará después del EOF en la experiencia a pHs básicos (en polaridad positiva)<sup>78</sup>. A partir de este supuesto, se puede decir que las esporas fúngicas contienen en su superficie una mayor cantidad de grupos ácidos, puesto que el pico electroforético, en todas las experiencias realizadas a valores de pH

superiores a 7, se presentó después del EOF. Sumado a esto, al realizar el estudio a pH 5, no se obtuvo señal electroforética.

El mismo intervalo de pH utilizado con fosfato de sodio, se empleo con fosfato de potasio 10 mM, observándose la mejor señal electroforética con un pH de 8 [Fig. 44].

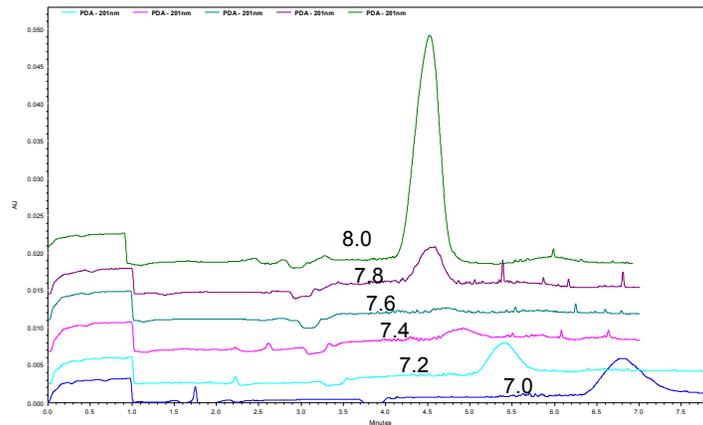


Fig. 44. Influencia del pH sobre la forma de la señal de *Agaricus bisporus*. Fosfato de potasio, 10 mM; 17 Kv

Con respecto a la  $\mu_{ep}$ , ésta incrementó al aumentar el pH. El incremento del pH de la solución buffer trajo efectos benéficos, el primero es un incremento en la velocidad del EOF, mejorando la eficiencia de la señal. Adicionalmente, la definición del pico indica una mayor uniformidad en la carga de la superficie de las esporas fúngicas, resultando en una disminución de la relación carga/masa y una  $\mu_{ep}$  más uniforme<sup>25</sup>.

### 8.6.2 *Amylomyces rouxii*

De igual manera que en el análisis del efecto del pH de la solución buffer sobre la eficiencia del pico electroforético y la  $\mu_{ep}$  de *A. bisporus*, para *A. rouxii* se tomó el buffer con el cual se obtuvo la mejor señal y a partir de esto se varió el pH. Siendo fosfato de sodio y borato de sodio a concentración 20 mM.

En el caso del análisis con fosfato de sodio, el pH vario en un intervalo de 7 a 8. La forma de la señal se modificó en cada caso, observándose que a mayor pH la banda electroforética se compacta dando como resultado un pico más estrecho y definido; no obstante se observa que conforme aumenta el pH del buffer, disminuye el tamaño de la señal [Fig. 45]. Por otro lado, la  $\mu_{ep}$  aumenta en

proporción al incremento del valor de pH; sin embargo la mayor  $\mu_{ep}$  se presentó con un pH de 7.

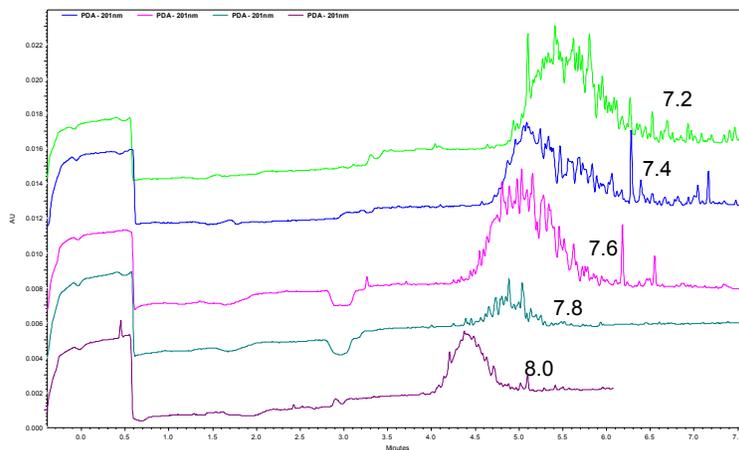


Fig. 45. Influencia del pH en la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. Fosfato de Sodio 20 mM; 17 Kv

El estudio de la influencia del pH en el análisis de otros MO ha revelado el fuerte impacto que tiene sobre la superficie y por tanto, en la  $\mu_{ep}$ . En algunos casos se reporta que al decrecer el pH, la  $\mu_{ep}$  aumenta<sup>71,72</sup>, corroborando la enorme variabilidad en la composición química de los MO<sup>72</sup>, lo que conlleva diversos comportamientos, propiedades, mecanismos de acción y patogenicidad.

El pH del tampón de borato de sodio se modificó en un intervalo entre 8 y 9. Esto debido a que el  $pK_a$  de la solución es 9.24. En este caso, no se logró aumentar la eficiencia de la señal electroforética, puesto que a mayor pH la sensibilidad del análisis disminuyó considerablemente. Siendo 8 el pH bajo el cual se obtiene un pico más definido [Fig. 46].

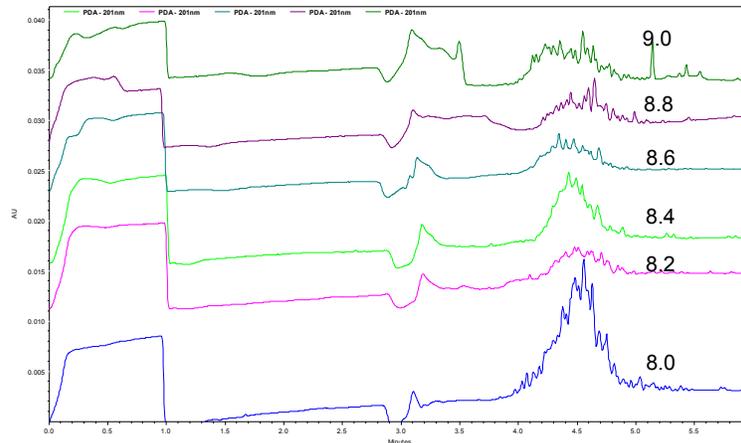


Fig. 46. Influencia del pH en la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. Borato de sodio. 20 mM; 17 Kv

Con fosfato de potasio, la eficiencia (tamaño y forma) de las señales obtenidas disminuyó a partir de pH 7.2. A pHs más alcalinos, la cantidad de grupos funcionales presentes en la superficie de la célula tales como carboxilos, fosfatos, hidroxilos, etc., se encuentran ionizados en una mayor proporción<sup>25</sup>. Esto debería de proporcionar una mayor estabilidad a las células fúngicas<sup>68</sup>; sin embargo, al incrementar el pH la sensibilidad del análisis fue menor [Fig. 47].

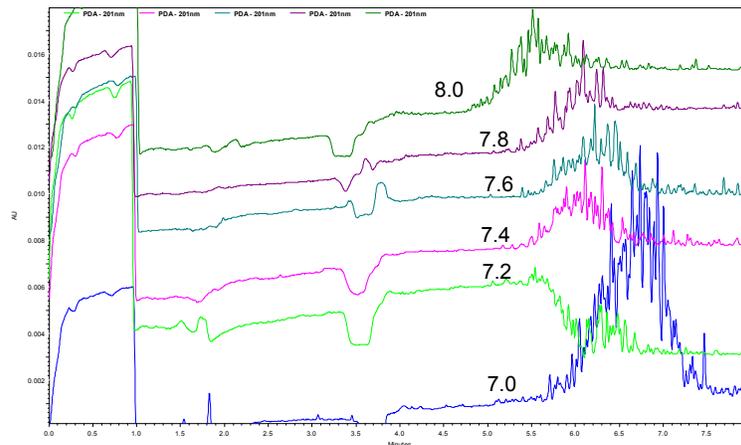


Fig. 47. Influencia del pH sobre la forma de la señal electroforética de *A. rouxii*. Fosfato de potasio. 20 mM; 17 Kv

### 8.6.3 *Trichoderma atroviride*

En el caso de *T. atroviride*, la mejor señal electroforética se obtuvo con fosfato de sodio 20 mM a un pH de 7; no obstante, se modificó el pH en el intervalo de 7 a 8 para determinar el efecto de éste sobre la  $\mu_{ep}$ . Al variar el pH se obtuvieron efectos indeseables en la forma de la señal, por lo que no fue posible determinar la  $\mu_{ep}$ . El incremento del pH del BGE produjo una ionización diferencial de la pared celular de las esporas de *T. atroviride* ocasionando un incremento en la relación carga/tamaño<sup>25</sup>, produciendo la separación de las células en dos bandas electroforéticas [Fig. 48].

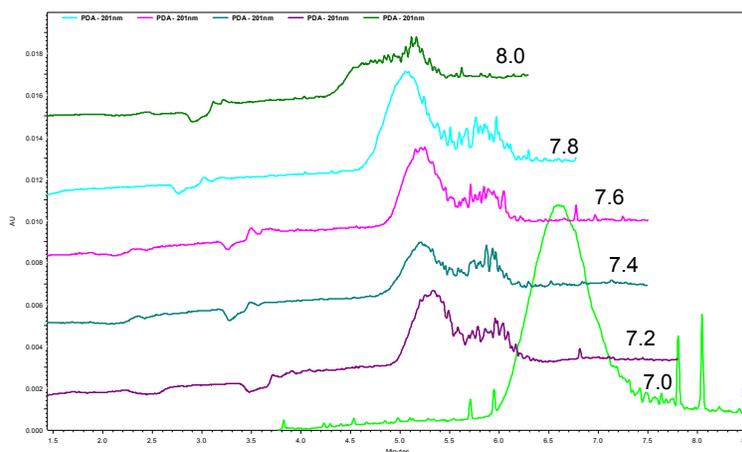


Fig. 48. Influencia del pH sobre la forma de la señal electroforética de *T. atroviride*. Fosfato de sodio. 20 mM; 17 Kv

Como ya se mencionó, con fosfato de potasio bajo las tres concentraciones probadas se obtuvieron dos señales correspondientes a la separación de las esporas en poblaciones. Sin embargo, al aumentar el pH del BGE fue posible obtener una mejora considerable en la forma de la banda electroforética [Fig. 49].

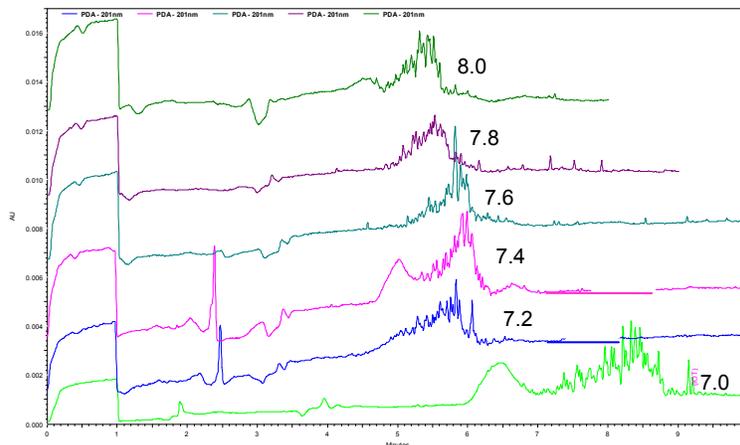


Fig. 49. Influencia del pH sobre la forma de la señal electroforética de *T. atroviridae*. Fosfato de potasio. 10 mM; 17 Kv

A valores pH de 7.6 y 7.8 las esporas de *T. atroviride* se agruparon en una sola banda electroforética; sin embargo, la definición del pico es pobre.

Es claro entonces, que la superficie de los MO, ya sean, bacterias<sup>72</sup>, virus<sup>24</sup>, levaduras<sup>13</sup> u hongos<sup>15,77</sup>, es altamente sensible al pH del medio.

Una vez que se encontraron y se optimizaron las condiciones del análisis en cuanto a tipo de buffer, concentración y pH, se determinó el efecto del voltaje sobre la  $\mu_{ep}$ .

## 8.7 EFECTO DEL VOLTAJE APLICADO

En EC, el voltaje de separación afecta en gran medida el tiempo y la eficacia del análisis. El incremento del voltaje de separación aumenta la velocidad del flujo electroosmótico, reduciendo por tanto los tiempos de análisis a la vez que mejora la eficacia del sistema. Este hecho, sugiere trabajar siempre a voltajes altos. Sin embargo y dado que el calor producido es proporcional al potencial aplicado, al aumentar el voltaje, se incrementa la corriente eléctrica y por tanto, la producción de calor. Si el calor no es disipado rápidamente, la temperatura en el interior del capilar aumenta dando lugar a una disminución de la viscosidad del buffer, lo que permitirá que la corriente fluya más fácilmente<sup>66</sup>. El aumento excesivo de calor da

lugar a ensanchamiento de los picos, tiempos de migración no reproducibles y posible lisis celular<sup>64</sup>.

Es conveniente emplear voltajes en un nivel intermedio, 10 a 20 Kv, para el análisis de las esporas fúngicas, debido a que propician un tiempo de análisis corto. Aparentemente estos valores de voltajes son elevados para células, puesto que puede ocurrir rompimiento celular debido al paso de la corriente eléctrica. Sin embargo, las esporas fúngicas de los tres hongos analizados mostraron gran resistencia al potencial aplicado. Esto se comprobó mediante análisis microscópico de las esporas fúngicas luego del análisis electroforético.

### 8.7.1 *Agaricus bisporus* var. *Portobello*

La modificación del voltaje en el estudio de *A. bisporus* se llevó a cabo aún cuando los análisis se produjeron con tiempos menores a 10 min. Sin embargo, con la finalidad de determinar el voltaje óptimo para el análisis, se probaron 10, 15, 17 y 20 Kv.

La ley de Ohm indica que la representación gráfica de la intensidad de corriente frente al voltaje aplicado debe ser lineal, según la expresión:

$$V = IR \quad (6)$$

donde,  $V$  es el voltaje,  $I$  la intensidad de la corriente y  $R$  la resistencia ofrecida por el conductor al paso de la corriente. Cuando hay una producción excesiva de calor, la resistencia disminuye, dando lugar a un aumento de la corriente, produciéndose una desviación de esta linealidad. El voltaje máximo permitido que se puede utilizar coincide con el punto en el cual se produce esta desviación y va a depender de la naturaleza, pH y concentración del buffer<sup>66,75</sup>.

El efecto que tuvo el voltaje sobre la  $\mu_{ep}$  de las esporas de *A. bisporus* con los buffer TBE, EDTA y TRIS, se observa en la Figura 50. El incremento del voltaje con los buffers TBE y EDTA mostró un comportamiento lineal hasta 17 Kv, presentando una disminución drástica de la  $\mu_{ep}$  a partir de este valor. Esto puede explicarse mediante la ley de Ohm, siendo 17 Kv el voltaje máximo permitido para realizar el análisis electroforético, sin presentar inestabilidad del proceso. Con TRIS el incremento de la movilidad de las esporas fue constante con el aumento del voltaje.

## MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS

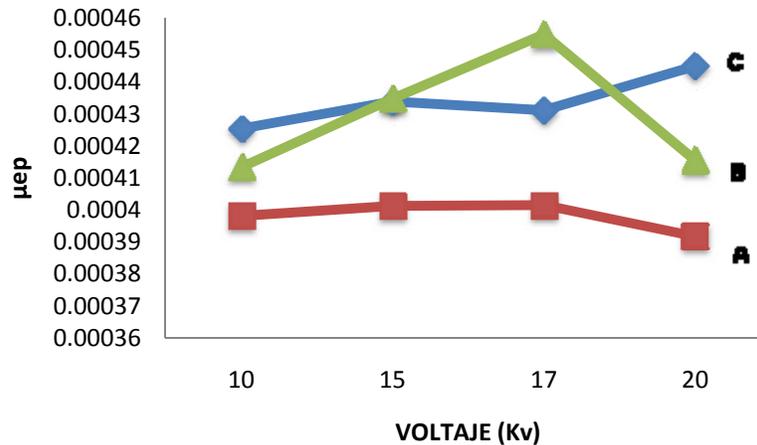


Fig. 50. Efecto del voltaje aplicado sobre  $\mu_{ep}$  de *A. bisporus*. A) TBE; B) EDTA; C) TRIS 15 mM; Los puntos en la gráfica corresponden al voltaje aplicado (10, 15, 17 y 20 Kv)

Los electroferogramas obtenidos no mostraron variabilidad en la eficiencia (tamaño y forma) de la señal electroforética, presentando buena definición bajo los cuatro voltajes aplicados [Fig. 51].

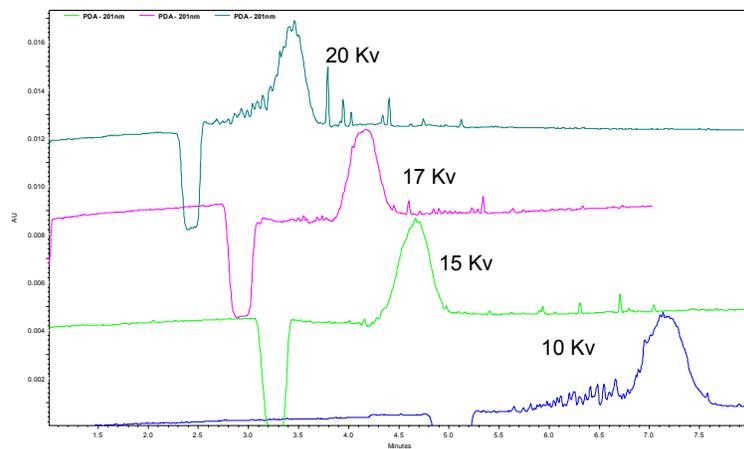


Fig. 51. Efecto del voltaje aplicado sobre la forma de la señal electroforética de *A. bisporus*. TRIS; 15 mM; pH 8.

### 8.7.2 *Amylomyses rouxii*

El comportamiento electroforético de *A. rouxii* con cada condición ensayada fue totalmente diferente, sin presentar una conducta específica. Ejemplo de ello, son los resultados obtenidos con la variación del voltaje, donde *A. rouxii* presentó una mayor  $\mu_{ep}$  bajo un voltaje de 15 kV [Fig. 52].

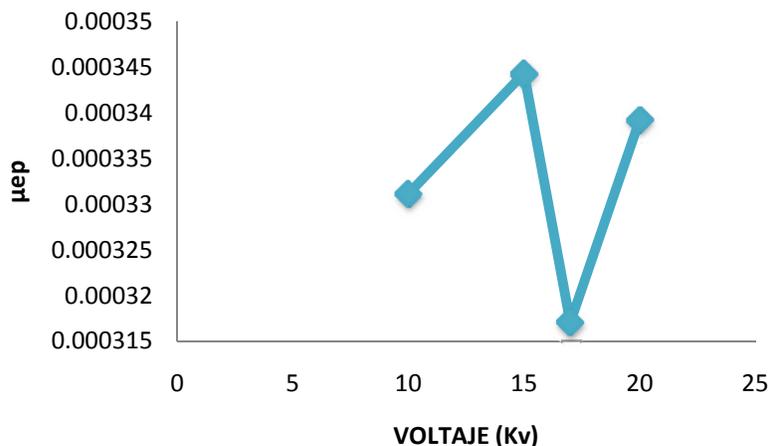


Fig. 52. Efecto del voltaje aplicado sobre  $\mu_{ep}$  de *A. rouxii*. Buffer TRIS 15 mM; pH 8. Los puntos en la gráfica corresponden al voltaje aplicado (10, 15, 17 y 20 Kv)

En los primeros análisis realizados a MO (bacterias y virus) mediante EC, se reportan voltajes de 10 hasta 30 Kv, utilizando polaridad positiva, dando elevadas resoluciones y eficiencias en las separaciones<sup>17</sup>. No obstante, con el desarrollo de nuevos equipos se ha podido invertir la polaridad (polaridad negativa), permitiendo disponer de más recursos para optimizar las separaciones, así como el uso de voltajes que van desde los -2 Kv<sup>3</sup>.

En *A. rouxii* no fue posible mejorar la forma de las señales con el cambio de voltaje, aunque la teoría predice que voltajes elevados darán eficacias más altas, puesto que la difusión es la característica más importante que contribuye al ensanchamiento de banda. El factor limitante aquí es el efecto Joule<sup>15</sup>. La  $\mu_{ep}$  y el EOF contienen un término de viscosidad en el denominador (ecuaciones 1 y 3). La viscosidad está en función de la temperatura; por lo tanto, el control preciso de la temperatura, es también un punto importante al incrementar el voltaje. Cuando la temperatura tiene un incremento moderado, la viscosidad disminuye ligeramente, así se tiene un aumento estable de la  $\mu_{ep}$ <sup>15,49</sup>.

En este trabajo todos los análisis se realizaron a una temperatura de 25° C (cerca de la temperatura ambiente) con el capilar termostataado para evitar gradientes de temperatura y obtener resultados reproducibles y con buena definición.

### 8.7.3 *Trichoderma atroviride*

También en *T. atroviride* se probaron voltajes de 10 a 20 Kv con los buffers TRIS y TBE. En el caso del análisis realizado con TRIS, sí fue posible mejorar la definición del pico con el incremento del voltaje, presentando las esporas fúngicas una mayor compactación con 20 Kv [Fig. 53].

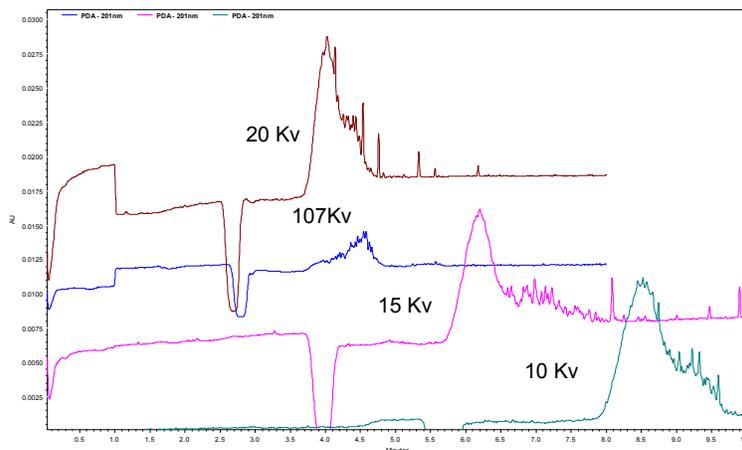


Fig. 53. Efecto del voltaje aplicado sobre la forma de la señal electroforética en *T. atroviride*. Buffer TRIS 20 mM; pH 8.

Con TBE las esporas de *T. atroviride* se separaron en dos poblaciones luego de la aplicación de los diferentes voltajes, sin presentar mejora en la definición de los picos [Fig. 54].

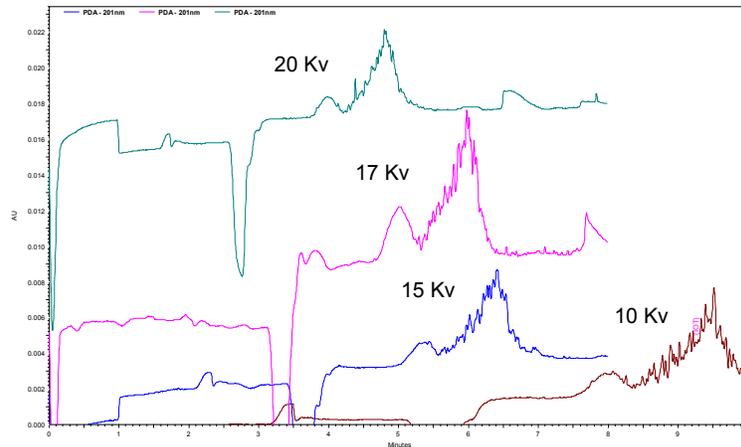


Fig. 54. Efecto del voltaje aplicado sobre la forma de la señal electroforética en *T. atroviride*. Buffer TBE 20 mM; pH 8.5

En un estudio electroforético donde se analizó el VTM, se encontró que la orientación del MO afecta su  $\mu_{ep}$ . La del VTM, un virus con forma elíptica, incrementa al aplicar altos voltajes. Entonces se pensó que la orientación de los MO dentro del campo eléctrico, también es responsable de las diferencias observadas en las movilidades al probar diferentes voltajes. En este caso, se reportó que el incremento en la movilidad fue el resultado del alineamiento de los virus con el campo eléctrico<sup>24</sup>. Un factor más a tomar en cuenta en el análisis de esporas fúngicas, ya que éstas, presentan una enorme variedad de formas<sup>27</sup>.

Hasta este punto, se ha cumplido con el primer objetivo de este trabajo. No obstante, existen otros factores que son importantes tener en cuenta en el análisis electroforético de los hongos. Estos factores incluyen el efecto que tiene el tiempo de suspensión de las células, por lo que el siguiente apartado muestra la modificación de la  $\mu_{ep}$  luego de la suspensión de las esporas fúngicas durante 24 horas en el buffer de corrimiento.

### 8.8 EFECTO DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS FÚNGICAS

Es claro que las esporas fúngicas son anfotéricas, presentando una carga característica bajo determinadas condiciones. Las suspensiones de las esporas pueden cambiar con el tiempo, dependiendo de la edad de la población microbiológica, del medio en el que se encuentran, así como el pH y la concentración de iones que las rodea. También pueden agregarse para formar clusters o cambiar su carga neta y durante el proceso electroforético, adherirse a las paredes internas del capilar. Todos estos factores alteran drásticamente los resultados<sup>24</sup>.

En la Figura 55, se presenta una comparación del efecto que tuvo el tiempo de suspensión de las esporas de *A. bisporus*. A una concentración de 10 mM la  $\mu_{ep}$ , con un tiempo en suspensión de 30 min y 24 hr, fue muy similar. Conforme incrementó la concentración, la diferencia en las movilidades aumentó. Siendo la  $\mu_{ep}$  de las esporas de *A. bisporus* mayor, cuando éstas estuvieron en suspensión durante 24 hr.

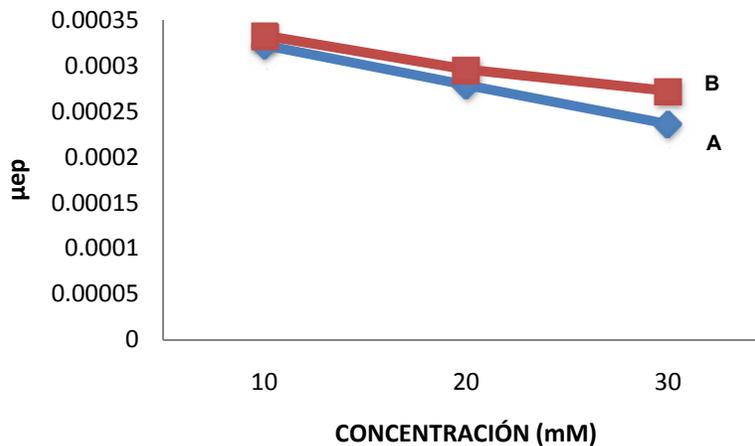


Fig. 55. Efecto del tiempo de suspensión sobre la  $\mu_{ep}$  de *A. bisporus* A) día de la suspensión; B) luego de 24 hr. Fosfato de sodio pH 7; 17 Kv.

Este comportamiento puede deberse a que conforme pasó el tiempo, la ionización de las paredes celulares de las esporas incrementó, promovida por la adsorción de una mayor cantidad de iones provenientes de la solución.

El comportamiento electroforético de *A. rouxii* fue contrario al observado en *A. bisporus*, puesto que la  $\mu_{ep}$  disminuyó al incrementar el tiempo de suspensión de las esporas fúngicas [Fig. 56]

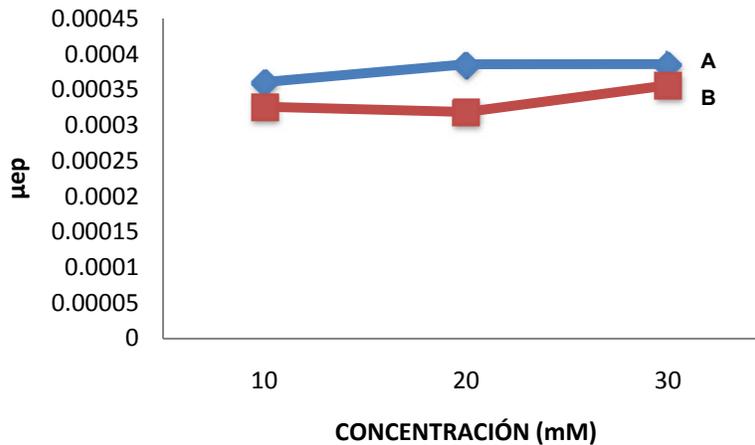


Fig. 56. Efecto del tiempo de suspensión sobre la  $\mu_{ep}$  de *A. rouxii*. A) día de la suspensión; B) luego de 24 hr. Fosfato de sodio pH 7; 17 Kv.

Tales diferencias en las movilidades se pueden explicar tomando en cuenta que, al estar las células fúngicas cargadas en suspensión acuosa desarrollan una esfera de solvatación, en la cual, las moléculas dipolares de agua e iones con cargas opuestas se acumulan, formando una doble capa eléctrica. De tal forma que el diámetro total de las esporas fúngicas incluye el diámetro de la célula en sí misma junto con el espesor de la capa de solvatación. Así, el espesor de la doble capa contribuye a un incremento en el tamaño neto de las células, disminuyendo su  $\mu_{ep}$ <sup>24</sup>.

Todos los análisis anteriores, se llevaron a cabo con capilares de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. y 48 cm de  $L_t$ . Debido a que tanto el d.i. como la longitud del capilar afectan considerablemente el proceso electroforético y por tanto los tiempos de migración, se probaron también capilares de 75  $\mu\text{m}$  de d.i. y 30 cm de  $L_t$ .

### 8.9 EFECTO DE LA LONGITUD DEL CAPILAR

Es recomendable comenzar los análisis con capilares cortos (20 a 50 cm al detector) para obtener tiempos breves de análisis. La longitud del capilar puede incrementarse para mejorar la resolución sobre todo en la separación de mezclas de analitos que tienen diferencias muy sutiles en sus  $\mu_{ep}$ . Aumentar la longitud del capilar permite que dichas especies se puedan separar. Otra consecuencia que se desprende del alargamiento, es la posibilidad de utilización de voltajes mayores, ya que la fuerza del campo eléctrico a un voltaje constante se ve disminuida. El límite práctico en la longitud de los capilares está en los 100 cm<sup>49,64</sup>.

A partir de esto, se puede decir que la  $\mu_{ep}$  de las esporas fúngicas está en función de la longitud del capilar. Puesto que el tiempo de migración se modifica en relación a la distancia que hay desde el punto de inyección de la muestra hasta el detector. A mayor longitud efectiva ( $L_d$ ) del capilar, el tiempo necesario para que el analito sea detectado es mayor, por lo tanto el tiempo de migración aumenta, disminuyendo así la  $\mu_{ep}$ <sup>49,51</sup>.

Aún cuando el tiempo total de análisis no sobrepasó los 20 min con el empleo de un capilar de 48 cm de  $L_t$ , se realizaron algunas experiencias para determinar la influencia de la longitud sobre el tiempo de análisis. De tal manera, que se disminuyó a 30 cm (20 cm de  $L_d$ ). Los electroferogramas resultantes muestran que las señales correspondientes a cada hongo presentan tiempos de migración menores a 3 minutos [Fig.57].

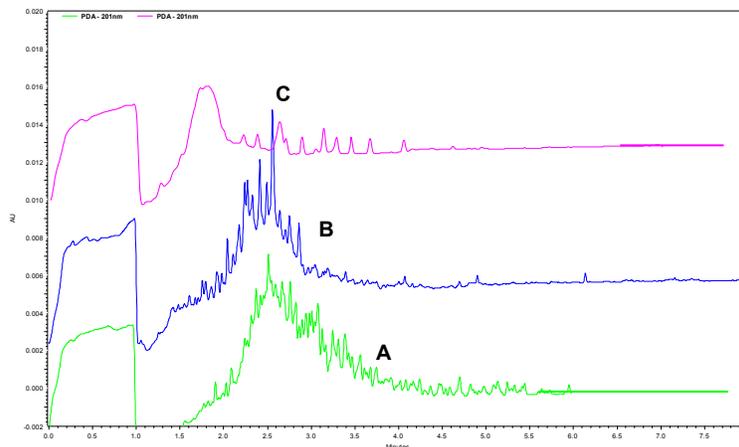


Fig. 57. Efecto de la  $L_t$  del capilar sobre el tiempo de migración de las esporas fúngicas; A) *Amylomyces rouxii*; B) *Trichoderma atroviride*; y C) *Agaricus bisporus*. Fosfato de sodio; 20 mM; pH 7. 17 Kv.

También se observó que bajo estas condiciones no es posible emplear voltajes elevados debido al calentamiento por efecto Joule, produciendo la caída de la corriente al final de la corrida.

La mayoría de los estudios reportan el empleo de capilares de 25 a 50 cm de  $L_d$  con buenos resultados en cuanto a la forma y resolución de los picos. Con respecto al d.i., éste oscila entre 25 y 100  $\mu\text{m}$ , dependiendo del tamaño del MO a analizar<sup>17</sup>.

### 8.10 EFECTO DEL DIÁMETRO INTERNO DEL CAPILAR

También se determinó la factibilidad de emplear capilares con menor d.i. El capilar de 75  $\mu\text{m}$  de d.i. permitió únicamente obtener un pico bien definido para *A. bisporus*. Esto no fue posible para *A. rouxii* y *T. atroviride*, disminuyendo considerablemente la sensibilidad [Fig. 58].

Esto se explica teniendo en cuenta la ecuación de *Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon b C \quad (7)$$

donde  $A$  es la absorbancia a una longitud de onda fija,  $b$  (cm) la longitud del paso óptico,  $\varepsilon$  ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) es la absorptividad del analito y  $C$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) es la concentración del analito.

La absorbancia del analito, a una concentración determinada y una longitud de onda fija es directamente proporcional a la longitud del paso óptico, que se corresponde con el ancho de la celda de detección<sup>66,75</sup>.

En EC, la celda de detección es el propio capilar, con un paso óptico igual al d.i. del mismo. Este hecho, unido a los pequeños volúmenes de muestra introducidos (nL), compromete la sensibilidad que puede alcanzarse en la detección de las esporas fúngicas<sup>66</sup>. En el análisis de hongos, el capilar de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. ofreció una mayor sensibilidad, debido a que con este diámetro, la longitud del paso óptico es mayor, observándose además, una mayor eficiencia de las señales electroforéticas.

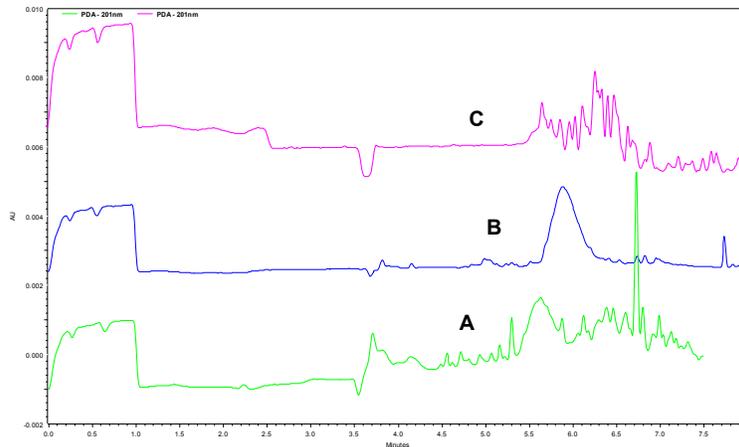


Fig. 58 Efecto del d.i. del capilar sobre la forma de la señal electroforética; A) *Trichoderma atroviride*. B) *Agaricus bisporus*. C) *Amylomyces rouxii*. Fosfato de sodio; 20 mM; pH 7. 17 Kv. Capilar 75  $\mu\text{m}$  d.i., 48 cm  $L_T$ .

Por otro lado, el capilar de 75  $\mu\text{m}$  de d.i. fue más propenso a bloquearse, debido sobre todo al tamaño de las células fúngicas que oscila entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ <sup>59,60,62</sup> y al agrupamiento de estas en bandas analíticas durante el proceso electroforético. Es bien sabido que capilares con menor d.i. disipan más fácilmente el calor generado por el paso de la corriente eléctrica, permitiendo la utilización de voltajes más elevados. Sin embargo, el capilar de 100  $\mu\text{m}$  disipo de forma eficaz el calor generado por el voltaje aplicado, observándose corrientes estables inferiores a 200  $\mu\text{A}$ .

### 8.11 EFECTO DEL TIEMPO DE INYECCIÓN DE LA MUESTRA

Las cantidades de muestra inyectadas en EC son muy pequeñas (del orden de los nanolitros) y mantienen una alta eficiencia del análisis. Las pequeñas cantidades inyectadas, al igual que el poco volumen de tampón consumido, son una ventaja de la técnica cuando se dispone de poca muestra o se utiliza un tampón caro. A la vez, resulta un inconveniente en cuanto al aspecto de la sensibilidad. Una sobrecarga de la muestra causa ensanchamiento de banda y por tanto, pérdida de la eficiencia, con consecuente distorsión de la forma del pico<sup>49,51</sup>. De tal manera, la cantidad de muestra inyectada está en función del tiempo. A mayor tiempo de inyección, la cantidad de muestra dentro del capilar es mayor<sup>25</sup>. Por este motivo, se probaron diferentes tiempos de inyección de la muestra para determinar el más adecuado. Siendo 5, 7, 9 y 11 segundos, los tiempos analizados. Los resultados

mostraron pequeñas diferencias en el área bajo los picos en los respectivos electroferogramas, lo que indica que el número de esporas inyectadas fue muy similar. Por este motivo, se trabajó en todas las corridas con un tiempo de inyección de muestra de 11 seg [Fig. 59].

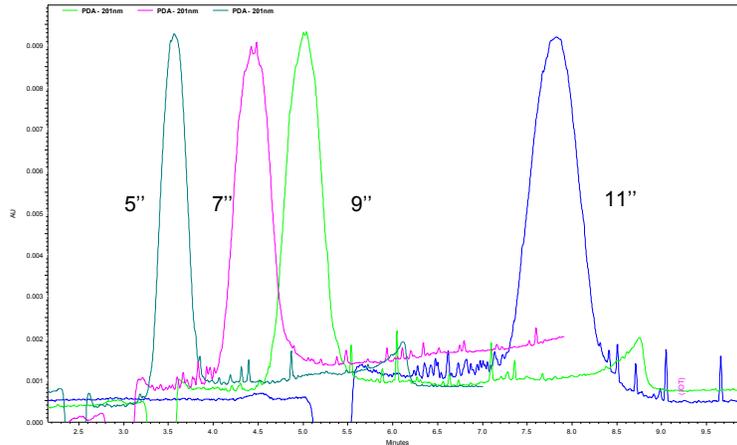


Fig. 59. Efecto del tiempo de inyección de la muestra en *Agaricus bisporus*. TRIS; 20 mM; pH 8. 17 Kv. Capilar 100  $\mu$ m d.i., 48 cm  $L_t$ .

Habiendo probado una gran variedad de condiciones electroforéticas y hallado el ambiente adecuado donde las esporas fúngicas migran a través del capilar de una forma estable, proporcionando picos electroforéticos bien definidos, se planteó la posibilidad de separar las esporas fúngicas en mezcla mediante EC.

### 8.12 SEPARACIÓN DE ESPORAS EN MEZCLA

Uno de los mayores logros obtenidos en este trabajo, es la separación de *T. atroviride* y *A. bisporus* en mezcla. Esto fue posible con fosfato de potasio 10 mM a pH 8. *T. atroviride* presentó una señal electroforética que va de los 4.2 a los 6 min. En tanto que *A. bisporus* tuvo un tiempo de migración de 7.46 min [Fig. 60].

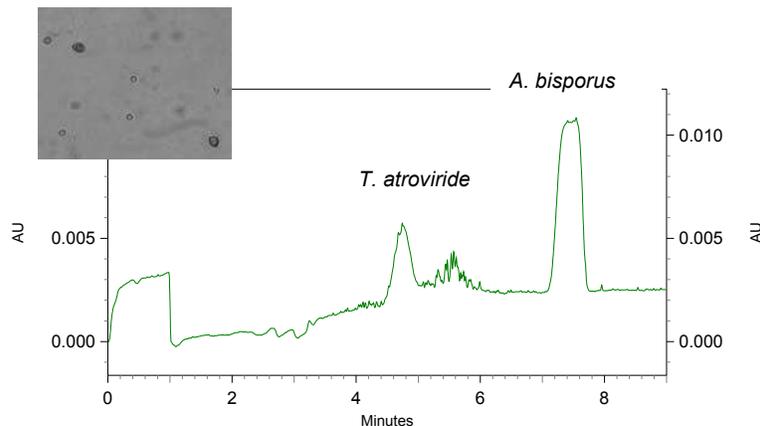


Fig. 60. Separación electroforética de *T. atroviride* y *Agaricus bisporus* en mezcla. Fosfato de potasio; 10 mM; pH 8. 17 Kv. Capilar 100  $\mu\text{m}$  d.i., 48 cm  $L_t$ .

Los picos correspondientes a cada hongo presentaron la forma característica de la inyección individual de cada uno de ellos. Los tiempos de migración variaron debido a la influencia entre ambos tipos de células<sup>2</sup>. Además la resolución entre las dos señales es muy alta, observándose aproximadamente 1.5 min de diferencia en el tiempo de migración.

Para obtener la separación de la mezcla de esporas, el parámetro clave fue el pH. Modificándolo, se obtuvieron diferentes relaciones carga/radio y por tanto distintas  $\mu_{ep}$ <sup>78</sup>. Otros investigadores han logrado la separación de mezclas de conidios provenientes de hongos filamentosos con eficacias extremadamente altas, mediante CIEF y EC. Los hongos separados fueron *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solany* y *Aspergillus flavus* presentando tiempos de migración menores a 15 min<sup>77</sup>.

Para comprobar que los picos obtenidos en el electroferograma corresponden a los hongos en cuestión, se realizó lo siguiente: 1) el experimento se repitió varias ocasiones, interdía e intradía; 2) recuperando las esporas en el vial de salida; 3) verificando la presencia de las esporas fúngicas mediante un microscopio de luz a

400X [Fig. 60], así como también; 4) cultivando las esporas fúngicas obtenidas del vial de salida [Fig. 61].

### 8.13 VIABILIDAD DE LAS ESPORAS FÚNGICAS

Los electroferogramas generados usando detección UV, permiten la identificación del MO y la cuantificación del número total de células. Sin embargo, no se obtiene información de la viabilidad celular. No obstante, la viabilidad celular puede ser determinada en EC mediante tratamiento de las células con diferentes colorantes<sup>23</sup>.

En este trabajo, la viabilidad de las esporas fúngicas luego del proceso electroforético, se constató mediante la recuperación de las esporas del vial de salida, su análisis microscópico y posterior cultivo en PDA. El seguimiento del medio de cultivo permitió observar el crecimiento y desarrollo característico de *T. atroviride* [Fig. 61].

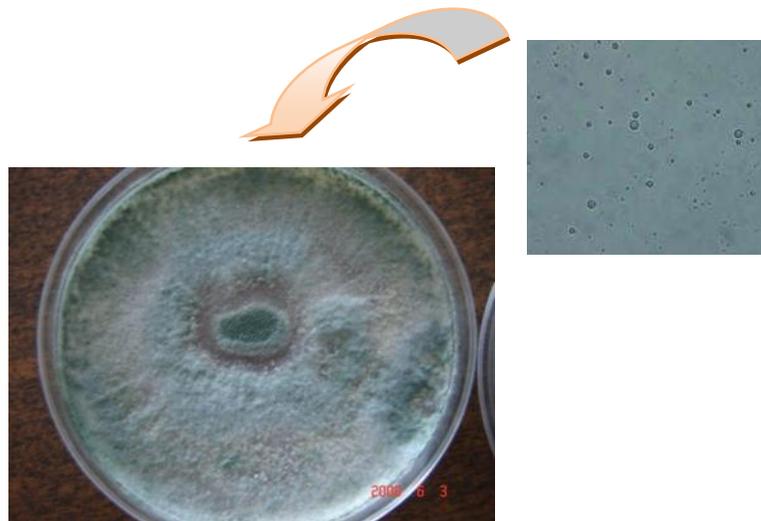


Fig. 61. Viabilidad de las esporas de *T. atroviride* luego del análisis electroforético. Cultivo en PDA.

En trabajos realizados en bacterias se encontró que más del 90% de los MO que fueron analizadas permanecían viables después del proceso electroforético<sup>73</sup>.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluaron diferentes condiciones electroforéticas para el análisis de esporas fúngicas de tres tipos de hongos, que representan tres phyla del reino Fungi. La variación de las condiciones permitió agrupar a las poblaciones celulares en bandas electroforéticas, logrando la caracterización de cada uno de los hongos. El tipo de buffer, su concentración y pH determinan la forma del pico electroforético. A pesar de la heterogeneidad en el tamaño de las esporas fue posible agruparlas en una sola banda electroforética, modificando únicamente la concentración del buffer. Respecto a la  $\mu_{ep}$ , ésta se determinó para *A. bisporus* y *A. rouxii*. En el caso de *T. atroviride* no fue posible debido a la forma de las señales obtenidas. En general, con los buffer fosfato de sodio, fosfato de potasio y borato de sodio se obtiene mayor eficiencia en la forma del pico electroforético. Por otro lado, se recomienda emplear capilares de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. y 48 cm de  $L_t$ , ya que garantizan una mayor sensibilidad a la detección, así como una corriente más estable. Además, la EC mostró gran capacidad para identificar y separar esporas en mezcla, siendo *A. bisporus* y *T. atroviride* los hongos separados. Las esporas fúngicas mantienen su viabilidad luego de ser sometidas al proceso electroforético.

## 10. CONCLUSIÓN

Las esporas de *T. atroviride*, *A. rouxii* y *A. bisporus*, mostraron un comportamiento electroforético característico, el cual está en función del tipo de buffer, su pH y concentración, así como también de la longitud y diámetro interno del capilar. Al presentar cada hongo una  $\mu_{ep}$  propia, es posible diferenciarlos y separarlos en mezcla. Esto permite utilizar la EC para la identificación y caracterización de esporas fúngicas.

## 11. PERSPECTIVAS

- ▣ Aplicar CIEF para determinar el  $pI$  de las esporas fúngicas.
- ▣ Utilizar reguladores con diferentes aditivos.
- ▣ Aislar paredes celulares con la finalidad de determinar su composición química.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castagnino JM. Electroforesis Capilar. 1999 Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 33 (3): 297 – 329.
2. Jackowski M, Szeliga J, Klodzinska E and Buszewski B. 2008. Application of capillary zone electrophoresis (CZE) to the determination of pathogenic bacteria for medical diagnosis. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 391: 2153-2160.
3. Bao Y, Lantz AW, Crank JA, Huang J and Armstrong DW. 2008. The use of cationic surfactants and ionic liquids in the detection of microbial contamination by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 29, 2587-2592.
4. Valverde MI. 2002. Desarrollo de nuevas metodologías analíticas mediante Electroforesis Capilar. De <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0406163-215825/>
5. Song M, Zhang Y, Li T, Wang Z, Yin J, Wang H. 2009. Highly sensitive detection of human thrombin in serum by affinity capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence polarization using aptamers as probes. Journal of Chromatography A. 30; 1216(5): 873-8.
6. Fogarty K, McPhee JT, Scott E, Van Orden A. 2009. Probing the ionic atmosphere of single-stranded DNA using continuous flow capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy. Analytical Chemistry. 1; 81(1): 465-72.
7. Chen HX, Deng QP, Zhang LW, Zhang XX. 2009. Quantification of testosterone and epitestosterone in biological samples by capillary electrophoresis with immunoaffinity extraction. Talanta. 30; 78(2): 464-70.
8. Yan N, Zhou L, Zhu Z, Chen X. 2009. Determination of melamine in dairy products, fish feed, and fish by capillary zone electrophoresis with diode array detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 11; 57(3): 807-11.
9. Villar M, Callejón M, Jiménez JC, Alonso E, Guiraúm A. 2009. New rapid methods for determination of total LAS in sewage sludge by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). Analytica Chimica Acta. 23; 634(2): 267-71.
10. Téllez N, Aguilera N, Quiñónez B, Silva E, González LE, Hernández L. 2008. Arginine and glutamate levels in the gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis. Brazilian Dental Journal. 19(4):318-22.
11. Tong P, Zhang L, He Y, Chi Y, Chen G. 2009. A simple capillary electrophoresis with electrochemical detection method for determination of the hydrolysis rate constant of chlorogenic acid. Talanta. 15; 77(5): 1790-4.
12. Volpi N, Maccari F, Linhardt RJ. 2008. Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides. Electrophoresis. 29(15): 3095-106.
13. Horká M, Růžička F, Holá V and Šlais K. 2007. CE separation of proteins and yeast dynamically modified by PEG pyrenebutanoate with fluorescence detection. Electrophoresis. 28(13):2300-2307
14. Margraf RL, Erali M, Liew M and Wittwer CT. 2004. Genotyping Hepatitis C Virus by Heteroduplex Mobility Analysis Temperature Gradient Capillary Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology. 42(10): 4545-4551.
15. Cázares-García SV. 2007. Estudio de la Factibilidad del Análisis de Células Fúngicas por Electroforesis Capilar. Tesis de Licenciatura. Escuela de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán. México.
16. Szumski M, Klodzinska E and Buszewski B. 2008. Application of a fluorescence stereomicroscope as an in-line detection unit for electrophoretic separation of bacteria. Mikrochimica Acta.

17. Simonet BM, Ríos A and Valcárcel M. 2008. Capillary Electrophoresis Separation of Microorganisms. From: Methods in Molecular Biology. Capillary Electrophoresis. Edited by: P. Schmitt-Kopplin Humana Press Inc. Totowa, NJ. 384: 569-590.
18. Lantz AW, Bao Y and Armstrong DW. 2007. Single – Cell Detection: Test of Microbial Contamination Using Capillary Electrophoresis. Analytical Chemistry. 79: 1720–1724.
19. García-Cañas V and Cifuentes A. 2007. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. Electrophoresis. 28: 4013–4030.
20. Taglio F. and Bortolotti F. 2006. Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2001-2004). Electrophoresis. 27: 231-243.
21. García CV and Cifuentes A. 2007. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. Electrophoresis. 28: 4013-4030.
22. Cifuentes A. 2006. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. Electrophoresis. 27: 283-303.
23. Armstrong DW, Schneiderheinze JM, Kullman JP and He L. 2001. Rapid CE microbial assays for consumer products that contain active bacteria. FEMS Microbiology Letters. 194: 33-37.
24. Desai MJ and Armstrong DW. 2003. Separation, Identification and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67(1): 38-51.
25. Girod M and Armstrong DW. 2002. Monitoring the migration behavior of living microorganisms in capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection with a charge-coupled device imaging system. Electrophoresis. 23: 2048-2056.
26. Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE and Tuzun S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. Journal of Applied Microbiology. 90: 622-629.
27. Herrera T y Ulloa M. 1998. Hongos de Importancia etnológica e industrial. Obtención de alimentos y bebidas fermentadas, fármacos y otros productos de importancia industrial. En El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 2ª Edición. Editorial UNAM, IB y FCE. pp. 461-481.
28. Pontón J. 2002. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Revista Iberoamericana de Micología. 19: 25-29.
29. Gadea I, Cuenca EM, Estrella M, Pemán J, Pontón J y Rodríguez T.J.L. 2007. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a los antifúngicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 25(5): 336-340.
30. Guzmán DAM. 2004. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. Revista Chilena de Infectología. 21(1): 39-47.
31. Van der Mei HC and Busscher HJ. 2001. Electrophoretic Mobility Distributions of Single-Strain Microbial Populations. Applied and Environmental Microbiology. 67 (2): 491 – 494.
32. Jiménez VJ y Macarulla JM. 1984. Físico-Química Fisiológica. 6ª Edición. Editorial Interamericana S. A. Madrid. p. 200 – 216.
33. James TY and co-workers. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature. 443: 818-822.
34. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC y Winn WC. 1999. Micología. En: Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color. 5ª Edición. Ed. Médica Panamericana. p: 955-1037.
35. Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología. 25: 78-82.
36. Ríos SI. 2001. Caracterización funcional de los genes ENG1 y ENG2 de *Candida albicans*. Memoria para optar el grado de Doctor en Farmacia. Departamento de Microbiología II. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

37. García MC. 2005. El micoparasitismo de *Verticilliosis fungicola* sobre carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o <<mole seca>> del champiñón. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 71: 571-586.
38. Masuoka J. 2004. Surfaces Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi: Physiological Roles, Clinical Uses, and Experimental Challenges. Clinical Microbiology Reviews. 17(2): 281–310.
39. Farkas V. 1979. Biosynthesis of Cell Walls of Fungi. Microbiological Reviews. 43(2): 117–144.
40. Durán A and Nombela C. 2004. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. Microbiology. 150: 3099–3103.
41. Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology. 150: 2029–2035.
42. Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycology Research. 105: 1422-1432.
43. Brizuela MA, García L, Pérez L y Mansur M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista Iberoamericana de Micología. 15: 69-74.
44. Blackwell M, Vilgalys R, James TY and WJ. 2007. Fungi. [www.tolweb.org/Fungi](http://www.tolweb.org/Fungi)
45. Rubio CMC, Gil TJ, Benito RR, Ramírez de OLI, Navarro LM. 2001. Micosis frecuentes en nuestro medio. En: Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Revista Iberoamericana de Micología. 2(2-1): 2-15.
46. Mayayo AE. 2004. Diagnóstico histopatológico de las micosis. Revista Iberoamericana de Micología. 17:S23-S28.
47. Delgado W y Aguirre JM. 1997. Las micosis orales en la era del sida. Revista Iberoamericana de Micología. 14: 14-22.
48. Quindós G. 2002. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Revista Iberoamericana de Micología. 19: 1-4.
49. Oda RP and Landers JP. 1997. Introduction to capillary electrophoresis. Handbook of Capillary Electrophoresis. Second Edition.
50. Harris CD. 2001. Métodos cromatográficos y Electroforesis Capilar. En: Análisis Químico Cuantitativo. 5ª Edición, correspondiente a al 5ª Edición original norteamericana. Editorial Reverté S.A. México. p. 733-761.
51. Grossman PD and Colburn JC. 1992. Capillary Electrophoresis: theory and practice. Academy Press, Inc. USA.
52. Berthod A, Rodriguez M, Armstrong DW. 2002. Evaluation of molecule-microbe interactions whit capillary electrophoresis procedures, utility and restrictions. Electrophoresis. 23(6): 847-57.
53. Okun VM, Ronacher B, Kenndler E. 1999. Separation and biospecific identification of subviral particle of human rhinovirus serotype 2 by capillary zone electrophoresis. Analytical Chemistry. 71(20): 4480-5.
54. Altria KD, Chen AB and Clohs L. 2001. Capillary Electrophoresis as a Routine Analytical Tool in Pharmaceutical Analysis. An Advanstar Publication. USA. 2001. 19(9).
55. Andrew W, Bao Y and Armstrong DW. 2007. Single-Cell Detection: Testo f Microbial Contamination Using Capillary Electrophoresis. Analytical Chemistry. 79: 1720-1724.
56. Palenzuela B, Simonet BM, García RM, Rios A and Varcarcel M. 2004. Monitoring of Bacterial Contamination in Food Samples Using Capillary Zone Electrophoresis. Analytical Chemistry. 76: 3012-3017.
57. Shintani T, Yamada K, Torimura M. 2002. Optimization of rapid and sensitive identification system for *Salmonella enteritidis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. FEMS Microbiology Letters. 210: 245-249.
58. Brehm SBF and Johnson AE. 2004. Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies and Applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68(3): 538-559.

59. Bartnicki GS and Nickerson WJ. 1962. Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Journal Bacteriology*. 84: 841-858.
60. Kuo, M. 2004. *Agaricus bisporus*: The button mushroom Retrieved from the *MushroomExpert.Com* Web site: [http://www.mushroomexpert.com/agaricus\\_bisporus.html](http://www.mushroomexpert.com/agaricus_bisporus.html)
61. Chaverri P, Castlebury LA, Overton EB and Samuels JG. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophores elongations and green conidia. *Mycologia*. 95(6): 1100-1140.
62. Samuels JG, Dodd LS, Gams W and Castlebury AL. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycology*. 94(1): 146-170.
63. Altria DK. General Guidelines to the Operation of Capillary Electrophoresis Methods and Instrumentation. From: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 52:Capillary Electrophoresis. Ed. Copyright Humana Press Inc. Totowa, NJ.
64. Albillos GSM. 2003. Aplicación de la electroforesis capilar para el análisis y seguimiento del grado de maduración de quesos de oveja y mezcla de la provincia de Burgos. Tesis doctoral. Universidad de Burgos. España.
65. Hernández BJ. 2006. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna. España.
66. Moreno BM. 2006. Aplicación de la electroforesis capilar con detección dual a la determinación de amitrol en muestras medioambientales y agroalimentarias. Estudio electrolítico y aplicaciones. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.
67. Herrero MJM. 2002. Desarrollo de métodos de electroforesis capilar para el control de calidad en problemas ambientales e industriales. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. España.
68. Butkus MA, Bays TJ and Labare PM. 2003. Influence of surface characteristics on the stability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(7): 3819-3825.
69. Lodish H y cols. 2005. *Biología celular y molecular*. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
70. Madigan TM, Martinko MJ y Parker J. 1999. *Brook. Biología de los microorganismos*. 8ª Edición. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid, España.
71. Lytle AD, Rice WE, Johnson HC and Fox RK. 1999. Electrophoretic Mobilities of *Escherichia coli* O157:H7 and Wild-Type *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7): 3222-3225.
72. Lytle AD, Frietch C and Covert T. 2004. Electrophoretic Mobility of *Mycobacterium avium* Complex Organisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(9): 5667-5671.
73. Glynn JR, Belongia BM, Arnold RG Ogden KL and Baygents JC. 1998. Capillary Electrophoresis Measurements of Electrophoretic Mobility for Colloidal Particles of Biological Interest. 64(7). 2572-2577.
74. Armstrong DW, Girod M, He L, Rodriguez MA, Wi W, Zheng J and Yeung ES. 2002. Mechanistic Aspects in the Generation of Apparent Ultrahigh Efficiencies for Colloidal (Microbial) Electrokinetic Separations. *Analytical Chemistry*. 74: 5523-5530.
75. Maron SH y Prutton CF. 2001. Coloides. En: *Fundamentos de fisicoquímica*. Ed. Limusa. Grupo Noriega Editores. México. p. 849-878.
76. Mathews CK y Van Holde KE. 1998. La matriz de la vida. En: *Bioquímica*. 2ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España. p. 28-54.
77. Horká M, Růžička F, Kubesová A, Holá V and Šlais K. 2009. Capillary Electrophoresis of Conidia form Cultivated Microscopic Filamentous Fungi. *Analytical Chemistry*. 30(20): 000-000 (A-H).
78. Rodríguez BD. 2007. Determinación de las constantes de acidez de la familia de los oxicams mediante electroforesis capilar en zona. Tesis doctoral. Pachuca Hidalgo, México.