



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICÓLAS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**“EFECTO DE DISTINTOS TIPOS DE BUFFER DE
CORRIMIENTO SOBRE LA MOVILIDAD
ELECTROFORÉTICA DE CONIDIAS DE *Trichoderma spp*”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

M A E S T R O EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Ingeniero Bioquímico

CHRISTIAN JOSÉ GALLEGOS NUÑEZ

Directora de tesis:

D.C. Virginia A. Robinson Fuentes

Morelia, Michoacán. Julio del 2016



El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la tesis presentada por:

Ingeniero Bioquímico CHRISTIAN JOSÉ GALLEGOS NUÑEZ

Doctora en Ciencias (Biología)

Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Doctor en Biotecnología de Plantas

Gerardo Vázquez Marrufo

Doctor en Ciencias (Biología Celular)

Carlos Cortés Penagos

Doctora en Ciencias Biológicas

Saila V. Cázares García

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad-
CONACYT como programa consolidado

El autor de esta tesis, estudiante de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada para la realización
de la
Maestría en Ciencias de la Salud

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de estudios de Posgrado
Laboratorio de Desarrollo Analítico

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1.- HONGOS FILAMENTOSOS	4
2.1.1.- Generalidades.....	4
2.1.2.- Pared celular fúngica.....	4
2.1.3.- Importancia del estudio de los hongos filamentosos.....	8
2.2.- <i>Trichoderma</i> spp	11
2.2.1.- Características.....	11
2.2.2.- Taxonomía y ciclo de vida.....	12
2.2.3.- Importancia de estudiar el género <i>Trichoderma</i>	14
2.3.- ELECTROFORESIS CAPILAR	16
2.3.1.- Componentes de un sistema de electroforesis capilar.....	17
2.3.2.- Factores que causan la movilidad del analito en la electroforesis capilar.....	18
A).- Flujo electroosmótico y doble capa eléctrica.....	18
B).- Movilidad Electroforética (μ_{ep}).....	20
C).- Movilidad Electroforética Aparente, Observada o Total (μ_{ap}).....	21
2.3.3.- Origen de la Carga de un Microorganismo: Partículas Coloidales.....	22
2.3.4.- Buffers.....	23
A).- Buffers Zwitteriónicos.....	24
2.3.5.- Modificadores del EOF.....	24
A).- pH.....	25
B).- Concentración y fuerza iónica.....	25
C).- Recubrimiento dinámico del capilar.....	26
2.3.6.- Cromatografía capilar electrocinética micelar.....	27
A).- Surfactantes.....	28
2.3.7.- Inyección de la muestra.....	29
2.4.- APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR	31
2.4.1.- Electroforesis capilar aplicada a células fúngicas intactas.....	32
2.4.2.- Antecedentes en Investigación en Células Fúngicas Intactas en el Laboratorio de Desarrollo Analítico.....	34
2.5.- DISEÑO EXPERIMENTAL	36
2.5.1.- Diseño factorial.....	36
2.5.2.- Diseños factoriales 3^k	36
2.5.3.- Metodología de superficie de respuesta.....	37

2.5.4.- Diseño de Box-Behnken.....	37
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. HIPÓTESIS.....	39
5. OBJETIVOS	39
6. ESTRATEGIA.....	40
7. MATERIALES Y MÉTODOS	41
7.1.- Reactivos y medio de cultivo.....	41
7.2.- Material Biológico.....	42
7.3.- Instrumentación.....	42
7.4.- Obtención de las conidias.....	44
7.5.- Preparación de la muestra	44
7.6.- Observación microscópica y conteo.....	45
7.7.- Acondicionamiento del capilar.....	45
7.7.- Diseño Experimental	46
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
8.1.- Efecto de distintos valores de pH utilizando buffers fisiológicos sobre la movilidad electroforética de conidias de <i>Trichoderma spp</i>.....	47
8.1.1.- Buffer Tricina.....	48
8.1.2.- Buffer MOPS	52
8.1.3.- Buffer HEPES	54
8.1.4.- Valores de pH seleccionados para cada tipo de buffer.....	56
8.2.- Efecto de un recubrimiento dinámico del capilar y de la utilización de surfactantes sobre la movilidad electroforética de conidias de <i>Trichoderma spp</i>.....	59
8.2.1.-Diseño experimental.....	61
A).-Diseño factorial 3 ⁴	61
B).-Diseño de Box-Behnken.....	63

8.2.2.- Condiciones seleccionadas utilizando aditivos	65
A). Ensayo de recubrimiento dinámico con PEO 0.125% y polaridad inversa.	67
B).- Efecto de la adición de CTAB tanto al BGE como a la muestra en polaridad inversa.	69
C).- Efecto de utilizar CTAB 15 mM en la muestra, Tricina 7.8, y polaridad inversa.	71
D).- Efecto del uso de CTAB 1% como recubrimiento, Tritón X-100 1% en muestra, y polaridad inversa.	73
8.2.3.- Análisis del diseño experimental mediante la metodología de superficie de respuesta	75
8.2.4.- Ensayos con cepas silvestres.	77
A).-Ensayos sin recubrimiento ni aditivo en muestra y polaridad normal.	78
B).-Ensayos con recubrimiento dinámico del capilar y/o aditivo en muestra.	79
8.2.5.- Ensayos con la cepa de referencia y las cepas silvestres en conjunto.	84
A).-Ensayos con recubrimiento dinámico del capilar y/o aditivo en muestra.	88
8.1.- Observación microscópica y sensibilidad del análisis.	89
9. RESUMEN DE RESULTADOS.....	93
10. CONCLUSIONES	94
11. PERSPECTIVAS	95
12. REFERENCIAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Representación de la pared celular fúngica.	7
2. Representación de los elementos del sistema de EC.	17
3. Factores que causan la movilidad de los analitos en la EC.	21
4. Estrategia experimental	40
5. Cultivos de distintas cepas de <i>Trichoderma spp</i> en Medio Mínimo Vogel incubados durante 120 h	42
6. Equipo comercial de electroforesis capilar.	43
7. Proceso de obtención de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 en Medio Mínimo Vogel.	44
8. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 utilizando tricina como BGE a diferentes valores de pH.	49
9. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de una conidia en polaridad normal y sin aditivos.	50
10. Movilidad electroforética aparente o total en función del pH utilizando Tricina.	51
11. Efecto del pH sobre la señal de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 utilizando tricina como BGE.	52
12. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 utilizando MOPS como BGE a diferentes valores de pH.	53
13. Efecto del pH sobre la señal de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 utilizando MOPS como BGE.	54
14. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 utilizando HEPES como BGE a diferentes valores de pH.	55
15. Efecto del pH sobre la señal de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 utilizando HEPES como BGE.	56

16. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 de cada tipo de buffer y sus respectivos valores de pH seleccionados.	57
17. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 empleando las mejores condiciones obtenidas.	66
18. Señal electroforética de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040. HEPES 7.0, PEO 0.125% como recubrimiento (paso de enjuague), polaridad inversa.	67
19. Efecto de la utilización de PEO sobre las señales de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 con distintos BGE.	68
20. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de una conidia, en polaridad inversa y con PEO como enjuague.	69
21. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de conidas, en polaridad inversa, y con CTAB 15mM como recubrimiento y adicionado a la muestra.	70
22. Señal electroforética de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040. HEPES 7.0, CTAB 15mM como recubrimiento (adicionado en el BGE), CTAB 15mM adicionado en muestra, y polaridad inversa.	71
23. Señal electroforética de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040. Tricina 7.8, CTAB 15mM adicionado en muestra, y polaridad inversa.	72
24. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de conidias, en polaridad inversa, y con CTAB 15mM adicionado a la muestra.	73
25. Señal electroforética de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040. Tricina pH 7.8, CTAB al 1% como recubrimiento, Tritón X-100 al 1% adicionado a la muestra; y polaridad inversa.	74
26. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de conidias, en polaridad inversa, CTAB 15mM como recubrimiento y Tritón X-100 al 1% adicionado a la muestra.	74
27. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el pico electroforético en función del recubrimiento capilar y el aditivo en la muestra.	75

28. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el pico electroforético en función del recubrimiento capilar y el tipo de buffer.	77
29. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. HEPES pH 7.0; polaridad normal.	78
30. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. HEPES pH 7.0; polaridad inversa y PEO 0.125% como recubrimiento del capilar.	80
31. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. HEPES pH 7.0, CTAB 15 mM en BGE y en muestra; polaridad inversa.	81
32. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. Tricina pH 7.8, CTAB 15 mM en muestra; polaridad inversa.	83
33. Señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. Tricina pH 7.8, CTAB 1% como recubrimiento, Tritón X-100 al 1% adicionado a la muestra; polaridad inversa.	84
34. Comparación de las señales electroforéticas, individuales y en mezcla, de 5 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. HEPES pH 7.0; polaridad normal.	85
35. Proceso de optimización de CZE de conidias de 5 cepas de hongos filamentosos dinámicamente modificadas por PB-PEG.	87
36. Señales electroforéticas de 5 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en mezcla.	89
37. Conidias de <i>Trichoderma</i> spp. recuperadas en el vial de salida post corrimiento.	92

INDICE DE TABLAS

1. Géneros de hongos filamentosos y efectos adversos en la salud.....	10
2. Taxonomía de <i>Trichoderma</i>	12
3. Sistemas buffer utilizados en electroforesis capilar	23
4. Clases de surfactantes y sus propiedades	28
5. Buffers utilizados para los corrimientos electroforéticos	41
6. Cepas estudiadas	42
7. Acondicionamiento inicial del capilar	46
8. Lavado inicial del capilar previo a su uso	46
9. Método utilizado para llevar a cabo un corrimiento electroforético.....	46
10. Intervalos de pH utilizados para cada tipo de buffer	47
11. Aditivos utilizados en ensayos de recubrimiento de capilar	60
12. Aditivos utilizados en ensayos adicionando surfactantes a la muestra	60
13. Factores y niveles experimentales seleccionados para evaluar su efecto en la señales electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma</i> spp.	61
14. Diseño factorial para la determinación de las mejores condiciones electroforéticas de conidias de <i>Trichoderma</i> spp.....	62
15. Base del diseño Box-Behnken	63
16. Diseño Box-Behnken para la determinación de las mejores condiciones electroforéticas de análisis de conidias de <i>Trichoderma</i> spp., y variable de salida para cada ensayo.....	64
17. Condiciones electroforéticas seleccionadas para el análisis de conidias de <i>T. atroviride</i> IMI-206040.	66
18. Muestras de conidias de <i>Trichoderma</i> spp., diluidas 1:100 bajo diferentes condiciones y cantidad de células por inyección.....	90

19. Número de células post corrimiento para cada una de las condiciones seleccionadas.....	92
---	----

RESUMEN

Los hongos filamentosos y sus conidias se encuentran en todo tipo de ambientes. La exposición a sus antígenos se asocia con efectos adversos para la salud: reacciones alérgicas e infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Además, pueden producir micotoxinas que contaminan alimentos y tienen efecto carcinogénico. Debido a esto y a la sensibilidad variable a los antifúngicos, la detección temprana y la correcta identificación de estos microorganismos es importante. La electroforesis capilar (EC) es una técnica de separación que se basa en la velocidad de migración de los analitos al ser sometidos a un campo eléctrico; en la que se aprovechan las propiedades de la pared celular fúngica, con características fisicoquímicas propias de cada especie, y ante ciertas condiciones, una carga eléctrica diferente. El análisis de conidias de *Trichoderma* spp por EC, modificando la composición del buffer de corrimiento (BGE), permite encontrar condiciones adecuadas para la identificación y cuantificación de especies fúngicas de diversos orígenes, con buena sensibilidad, en poco tiempo, y de forma relativamente económica. **Objetivo.** Evaluar el efecto del BGE, en las propiedades superficiales de conidias de *Trichoderma* spp por EC. **Materiales y Métodos.** HEPES, MOPS y Tricina. Surfactantes: CTAB y Tritón X-100. Recubrimiento del capilar: PEO y CTAB. Material biológico: cepa de referencia *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y 4 cepas silvestres: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. viride* y *T. tomentosum*. **Resultados.** Se probaron distintos valores de pH en el intervalo de máxima capacidad amortiguadora de cada buffer, encontrando señales apropiadas para Tricina 7.8, MOPS 7.5, y HEPES 7.0. Se realizó un diseño experimental para determinar, con un mínimo de ensayos, las condiciones de recubrimiento de capilar y aditivos, que arrojaron señales estrechas y definidas. Se probaron las condiciones obtenidas en ensayos individuales con las cepas silvestres agrupándolas en picos representativos. No fue posible separar adecuadamente las cepas en mezcla con las condiciones probadas. El volumen de inyección fue de 95 nL, inyectando en promedio 12.8×10^3 conidias/ μL . Dependiendo de la condición utilizada, las conidias detectadas por corrimiento fueron entre 9.52×10^3 y 4.55×10^3 . **Conclusión.** El uso de buffers zwitteriónicos y de aditivos como los empleados en este estudio, así como del diseño experimental, contribuye a mejorar el análisis de células fúngicas por EC.

Palabras Clave: (Electroforesis capilar, Buffer de corrimiento, *Trichoderma* spp)

ABSTRAC

Filamentous fungi and their conidia are found in all types of environments. The exposure to their antigens is associated with adverse health effects: Allergic reactions and nosocomial infections in immunocompromised patients. They also can produce mycotoxins that contaminate food and have carcinogenic effect. Due to this, and to the variable sensitivity to antifungals, early detection and accurate identification of these organisms is important. Capillary electrophoresis (CE) is a separation technique based on the rate of migration of the analytes under an electric field; in which the fungal cell wall properties are utilized, with physicochemical characteristics of each species, and by certain conditions, a different electrical charge. The analysis of *Trichoderma* spp conidia by EC, and the modification of the background electrolyte (BGE), allow to find suitable conditions for the identification and quantification of fungal species from diverse backgrounds, with good sensitivity, in a short time and relatively inexpensively. Objective: To evaluate the effect of BGE in the surface properties of *Trichoderma* spp conidia by EC. Materials and Methods: HEPES, MOPS and Tricine. Surfactants: CTAB and Triton X-100. Capillary coating: PEO and CTAB. Biological material: reference strain *Trichoderma atroviride* IMI-206040 and 4 wild strains: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. viride* and *T. tomentosum*. Results: Different pH values were tested in the range of maximum buffer capacity of each buffer, finding appropriate signals to Tricine 7.8, MOPS 7.5 and HEPES 7.0. An experimental design to determine, with a minimum of tests, capillary coating and additive conditions, that yielded narrow and defined signals was performed. The conditions obtained in individual trials were tested with wild strains grouped in representative peaks. It was not possible to adequately separate the strains mixture under the conditions tested. The injection volume was 95 nL injecting average 12.8×10^3 conidia / μL . Depending on the condition used, conidia were detected by shift between 9.52 and 4.55×10^3 . Conclusions: The use of zwitterionic buffers and additives such as those used in this study, as well as the experimental design, helps to improve the analysis of fungal cells by EC.

Keywords: (capillary electrophoresis, background electrolyte, *Trichoderma* spp)

ABREVIATURAS

BGE	Buffer de Corrimiento
CMC	Concentración Micelar Crítica
CMEB	Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
EC	Electroforesis Capilar
ECZ	Electroforesis Capilar de zona
ECEI	Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico
EOF	Flujo Electroosmótico
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[etanosulfónico]
L_d	Longitud al detector
L_t	Longitud total
μ_{ap}	Movilidad electroforética aparente, observada o total
μ_{ep}	Movilidad electroforética
MECC	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
PEO	Óxido de Polietileno
pH	Potencial de Hidrogeno
Tricina	N-[Tris(hidroximetil)-metil]-glicina
T_m	Tiempo de migración

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos y sus conidias se encuentran en todo tipo de ambientes, tanto al aire libre como en interiores. La exposición a sus antígenos se asocia con una amplia gama de efectos adversos para la salud, desde la génesis de reacciones alérgicas hasta infecciones nosocomiales con una alta tasa de mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Además, los hongos filamentosos microscópicos son capaces de producir micotoxinas que contaminan alimentos y representan un grave riesgo para los seres humanos, principalmente por su efecto carcinogénico. Debido a esto y a la sensibilidad variable a los agentes antifúngicos de estos patógenos, su detección temprana y correcta identificación es importante¹.

Los hongos también repercuten de manera negativa en la agricultura, puesto que suelen causar serias devastaciones en distintos tipos de cultivos. Un ejemplo de ello es la enfermedad del moho verde causada por *Trichoderma*, la cual ha afectado gravemente la producción de los hongos comestibles *Agaricus bisporus* y de *Pleurotus ostreatus*².

La industria alimenticia y farmacéutica, por ejemplo, requieren determinar si en una muestra existe la presencia de contaminación microbiana. De los numerosos métodos para detectar la presencia de microorganismos potencialmente dañinos se tiene el método de inoculación directa, así como adaptaciones de esta técnica, Estos son procedimientos universalmente aceptados para la determinación de contaminación microbiana. Sin embargo, dichos métodos implican el crecimiento del agente contaminante en un medio de cultivo, por lo que involucran largos tiempos de análisis. Otros enfoques, como la hibridación, amplificación, y el inmunoensayo, requieren tiempos de análisis cortos, aunque son técnicas complejas que requieren de personal altamente capacitado. En los últimos años, las técnicas instrumentales utilizadas para el análisis y caracterización de

microorganismos, se han convertido en las más comunes. En particular, los métodos basados en Electroforesis Capilar (EC) son prometedores al ser conocidos por sus análisis rápidos, de alto rendimiento y bajo consumo de la muestra³.

El método estándar para la identificación y clasificación de los hongos filamentosos se basa en la morfología colonial y celular (cuerpo fructífero, forma de las esporas, color, medidas, disposición de hifas, etc.), ya que los hongos filamentosos tienen morfologías más distintivas que, por ejemplo, las bacterias unicelulares y levaduras. En contraste con las bacterias, las paredes celulares de los hongos y las esporas se componen principalmente de polisacáridos (80-90%), incluyendo la quitina que mantiene la rigidez y la estabilidad estructural de las células y de β - α -glucanos; aunque también están presentes péptidos, proteínas, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos. Dichos compuestos le confieren propiedades fisicoquímicas a cada tipo de especie, y ante determinadas condiciones, una carga eléctrica diferente⁴.

Además, la superficie celular de las conidias de hongos filamentosos, también está constituida por hidrofobinas que se encuentran generalmente en la superficie exterior de las conidias y de la pared de las hifas. Las hidrofobinas son una clase de proteínas pequeñas, ricas en cisteína que solo son expresadas por hongos filamentosos. Son conocidas por su capacidad de formar un recubrimiento hidrófobo en la superficie de un objeto y pueden estar implicados en la mediación de contacto y la comunicación entre el hongo y su entorno¹.

Es por ello que la EC surge como una técnica de separación, que puede aprovechar las propiedades de la pared celular para el análisis de diferentes microorganismos; que se basa en la velocidad de migración de los analitos al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico. La migración está en función de la relación masa/carga de las partículas al fluir a través de un capilar. El uso

adecuado de técnicas de electromigración para la distinción de diferentes especies de hongos se propone como una herramienta apropiada para la caracterización, identificación y cuantificación de dichas células debido a sus ventajas y propiedades como alta eficiencia, selectividad y rapidez de los tiempos de análisis^{1,4,5}.

Sin embargo, en el análisis de conidias hidrófobas por EC, se pueden esperar algunas dificultades tales como, la agregación entre las conidias y los aditivos en la solución buffer, su adsorción en la pared del capilar y la sensibilidad de la detección. El estudiar las características de las conidias nos permite entender cómo es que se agrupan entre ellas y se adhieren a diferentes superficies, permitiendo aprovechar eventualmente dichas propiedades en su análisis¹.

2. MARCO TEÓRICO

2.1.- HONGOS FILAMENTOSOS

2.1.1.- Generalidades

Los hongos son organismos eucarióticos complejos. Éstos son aerobios, heterótrofos y pueden reproducirse sexual y/o asexualmente formando esporas o conidias respectivamente. La unidad fundamental de los hongos filamentosos es la hifa, filamento microscópico que se ramifica en diferentes direcciones y que está constituida por una sucesión de células intercomunicadas. Las hifas, en conjunto, forman el micelio y pueden ser cenocíticas o septadas. Las formas de reproducción sexual se conocen como teleomorfos y las asexuales como anamorfos. El organismo en conjunto se conoce como holomorfo. La mayoría de hongos patógenos pertenecen a la división Ascomycota^{6,7}.

2.1.2.- Pared celular fúngica

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da forma a la célula y la protege de los cambios osmóticos, controla la permeabilidad celular, y participa en la reproducción fúngica, así como en la formación esporas. Además de estas importantes funciones, la pared celular constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que, tras su activación, desencadenan una compleja cascada de señalizaciones en el interior de la célula^{8,9}.

La pared es el primer lugar de interacción con el hospedero, jugando un papel importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica. Algunos componentes de la pared son fuertemente inmunogénicos y estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante una infección⁸.

La pared es una estructura específica de la célula fúngica y es muy diferente de la pared de las células vegetales, compuesta fundamentalmente de celulosa. La pared celular fúngica básicamente está compuesta de polisacáridos y proteínas, y puede ser organizada esquemáticamente en dos capas: Una capa interna estructural y una capa externa cuya composición varía en relación al morfotipo, la etapa de crecimiento y la especie fúngica. Entre los polisacáridos que la componen destacan la quitina y el glucano, mientras que las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas^{8,10}.

- Quitina. La quitina se sintetiza a partir de N-acetil-D-glucosamina por la enzima quitin sintetasa, que deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. El contenido en quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo. La quitina representa del 10 al 20% del peso seco de la pared celular de los hongos filamentosos.^{8,10}. Se considera que la mayoría de la quitina se localiza cerca de la membrana plasmática¹⁰.
- Glucano. Es el polisacárido estructural más importante de la pared celular fúngica 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 β -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces β -1,6, β -1,4, α -1,3 y α -1,4. El β -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura (Figura 1). El β -1,3-D-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetisas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1.500 residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada. Estas ramificaciones pueden

unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas, proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular^{8,11}. El beta-1.3-glucano se extiende a lo largo de la pared celular¹⁰.

- Glicoproteínas. Las proteínas representan del 20 al 30% del peso seco de la pared celular de los hongos filamentosos. La mayoría de las proteínas están asociadas a glúcidos por enlaces O-glucosídicos ó N-glucosídicos, formando glicoproteínas, y en muchas instancias, contienen un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las proteínas de la pared tienen diversas funciones, al participar en el mantenimiento de la forma celular, en los procesos de adhesión, protegiendo a la célula de sustancias extrañas, participando en la absorción de moléculas, transmitiendo señales al citoplasma y sintetizando y remodelando los componentes de la pared^{8,10}. Algunas de las glicoproteínas tienen anclajes GPI que las traban a la membrana plasmática, mientras que otras glicoproteínas son secretadas dentro del espacio de la pared celular¹⁰.

Aunque existen variaciones intra e interespecie, se cree que los componentes de la pared celular se disponen como se muestra en la figura 1.

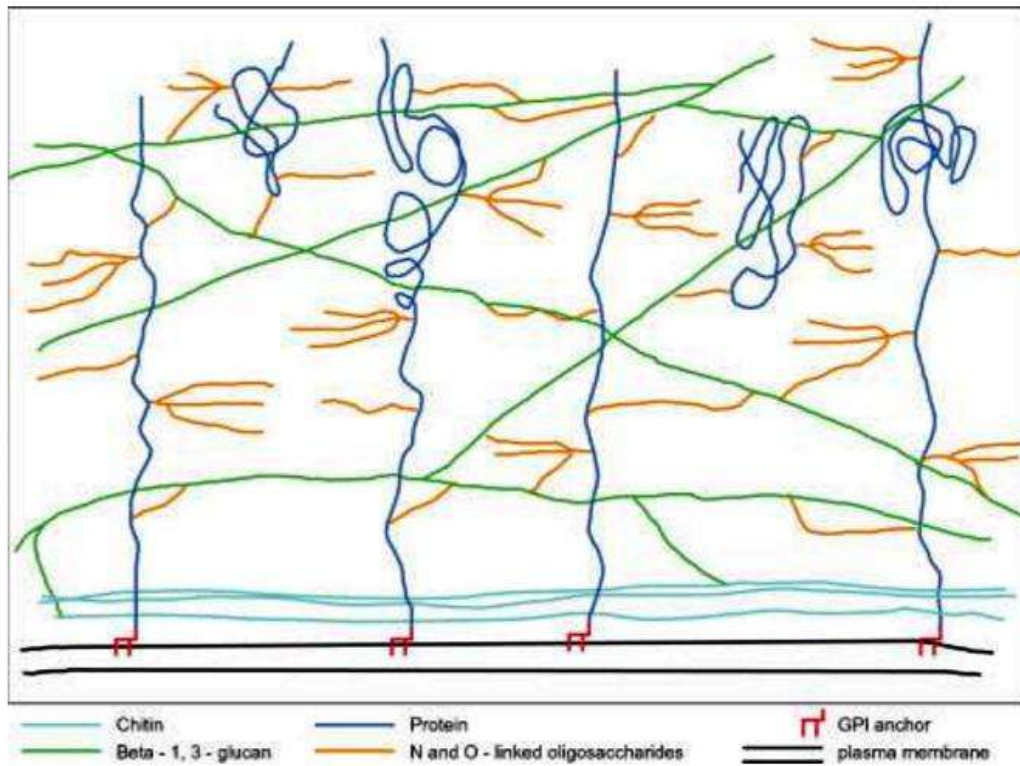


Figura 1. Representación de la pared celular fúngica. Tomado de la referencia 10.

Además de los componentes ya descritos, se han detectado proteínas denominadas hidrofobinas en la superficie de las hifas, en esporas o conidias, y en el cuerpo fructífero. La función biológica de las hidrofobinas es coordinar la adherencia de la hifa al sustrato sólido y se han relacionado a los procesos de adsorción de las conidias a distintas superficies⁹.

Por otro lado, la pared celular fúngica puede estar cubierta con melanina, un pigmento fenólico negro. Se asume que este pigmento presenta funciones de protección debido a la presencia de electrones desapareados en su molécula y tiene una actividad antioxidante significativa. La principal función es proteger a la célula de radiación UV que puede cambiar la permeabilidad iónica de sus membranas, resultando en hinchazón celular y ruptura⁹.

Una característica esencial de la pared celular, a menudo poco reconocida, es que es una estructura en continua evolución en respuesta al ambiente y durante el ciclo celular. Las modificaciones estructurales más importantes observadas durante los cambios dimórficos están principalmente asociadas con la modificación de la capa externa. Por ejemplo, las conidias de *Aspergillus fumigatus* están cubiertas por hidrofobinas y melanina, mientras que las que se encuentran en germinación exponen α -1,3-glucanos, galactomanano, galactosaminogalactano y proteínas *N*-glicosiladas, como las galactomanoproteínas. Modificaciones del ambiente nutricional también inducen cambios en la composición de la pared celular¹¹.

2.1.3.- Importancia del estudio de los hongos filamentosos

Los hongos son organismos que desarrollan un papel fundamental en términos ecológicos, ya que son los principales descomponedores y transformadores de la materia orgánica. De acuerdo al papel que desarrollan en la naturaleza, los hongos se pueden clasificar en tres grupos principales^{12,13}:

- **Simbiontes:** Organismos que establecen alguna asociación biológica en la que cada uno de los asociados cohabita en un equilibrio que ofrece ventajas para ambos, como la disponibilidad de nutrientes y hormonas^{12,13}.
- **Saprobios:** Aquellos que se alimentan de materia orgánica muerta, en descomposición o en vías de descomposición^{12,13}.
- **Parásitos:** Cuya principal característica es penetrar las células de los tejidos vegetales o animales y alimentarse de ellos, algunos pueden llegar a ser tan perjudiciales que sus efectos pueden ser fatales para el huésped^{12,13}.

Otra característica importante de los hongos es la producción de metabolitos secundarios de interés en medicina y en biotecnología. Los hongos producen una enorme cantidad de productos que se utilizan en la fabricación de medicamentos (vitaminas, anticancerígenos, antivirales, metabolitos secundarios, etc.) y en la industria de los alimentos (enzimas, polisacáridos, colorantes, ácidos orgánicos, aromatizantes, levaduras, etc.)^{12,13}.

Sin embargo, los hongos también producen sustancias peligrosas conocidas como micotoxinas, las cuales son tóxicas para el hombre, animales y algunas plantas. Las micotoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales, principalmente en maíz, trigo y arroz, subproductos de cereales y oleaginosas, frutos secos, embutidos, especias, vinos, leguminosas, frutas, leche y sus derivados. Otro importante campo de estudio de la micología comprende los hongos que atacan a las plantas, la fitopatología¹³.

Por otro lado, en los últimos años la incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado considerablemente. Además, las características epidemiológicas de las micosis invasoras están cambiando, ya que se describen nuevas especies patógenas y aparecen con más frecuencia cepas y especies resistentes a los antifúngicos¹².

El aumento en la incidencia de patologías en donde los hongos aparecen como microorganismos emergentes, se ha asociado con pacientes que presentan cierto grado de inmunodeficiencia. Entre los principales factores de riesgo para las infecciones oportunistas se encuentran: neutropenia, diabetes, tratamientos extensivos con antibióticos y uso de inmunosupresores, entre otros¹⁴.

El espectro de las enfermedades micóticas va desde las micosis superficiales y enfermedades alérgicas (aspergilosis broncopulmonar), a las micosis profundas como la meningitis criptocócica. Las enfermedades micóticas se presentan tanto

en huéspedes normales como inmunocomprometidos, aunque en estos últimos se muestran con mayor incidencia¹⁴.

Existen una gran cantidad de géneros fúngicos que están relacionados con efectos adversos para la salud (Tabla 1). *Aspergillus fumigatus* es uno de los principales agentes involucrados en las infecciones fúngicas, si bien *A. flavus*, *A. terreus*, *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Mucorales* también son patógenos frecuentes^{13,15}.

Tabla 1. Géneros de hongos filamentosos y efectos adversos en la salud^{13,15}.

GENERO	EFFECTO NEGATIVO EN LA SALUD
<i>Aspergillus</i> spp	Alergias e infecciones (aspergilosis invasiva). Producción de micotoxinas.
<i>Fusarium</i> spp	Frecuente patógeno de plantas e infecciones en humanos. Producción de micotoxinas
<i>Scedosporium</i> spp	Infecciones cutáneas, subcutáneas y diseminadas.
<i>Penicillium</i> spp	Producción de micotoxinas
<i>Alternaria</i> spp	Patógeno de plantas. Enfermedades respiratorias alérgicas e infecciones oportunistas en humanos
<i>Monilinia</i> spp	Patógeno de plantas y frutas
<i>Trichoderma</i> spp	Patógeno oportunista de humanos. Enfermedades respiratorias e infecciones en Pacientes inmunocomprometidos.

El género *Aspergillus* incluye más de 250 especies, a 20 de las cuales se les atribuyen infecciones oportunistas en el hombre, aunque algunas de ellas solo ocasionalmente. El género *Fusarium* agrupa un gran número de especies, la mayoría saprobia o parásita de plantas; sin embargo, comprende especies capaces de infectar humanos y animales, con un aumento significativo en el número de fusariosis en pacientes inmunocomprometidos. Por otro lado, *Sporothrix schenckii*, es un hongo dimórfico que ha sido considerado como el agente causal de la esporotricosis, una infección subaguda o crónica que afecta a la dermis y al tejido celular subcutáneo y con una distribución mundial^{6,12}.

Especies del género *Alternaria* se han descrito en piel y en conjuntiva de humanos y animales, y está frecuentemente asociado con infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos¹⁵.

Recientemente se han descrito distintas especies fúngicas, anteriormente no consideradas patógenas, como causantes de micosis oportunistas; tales como *Trichoderma spp.*, y muchas de ellas presentan multirresistencia frente a los antifúngicos de uso clínico^{6,12}.

Las herramientas disponibles para el diagnóstico de las infecciones fúngicas tienen un bajo rendimiento, por lo que para paliar este déficit, el protocolo de tratamiento de la enfermedad base incluye la profilaxis con antifúngicos. Es evidente que esta situación va a facilitar el desarrollo de resistencias secundarias a los fármacos empleados, por lo que el laboratorio debe implementar técnicas que ayuden al diagnóstico precoz de las micosis, así como a identificar los hongos a nivel de especie, ya que en la actualidad muchas especies tienen una sensibilidad predecible a los antifúngicos^{6,12}.

2.2.- *Trichoderma spp.*

2.2.1.- Características

La primera descripción de un hongo llamado *Trichoderma* data de 1794, cuando dicho término fue establecido por Persoon¹⁶. *Trichoderma spp.*, es un colonizador ubicuo de materiales celulósicos y por lo tanto, se encuentra sobre material vegetal en descomposición. El género *Trichoderma* se caracteriza por un rápido crecimiento¹⁶, su habilidad para asimilar una gran variedad de sustratos y por su capacidad para degradar compuestos tóxicos¹⁷. Presenta conidias verde brillantes y una estructura repetitiva conidiófora ramificada, siendo colonizador de gran éxito de sus hábitats, lo cual se refleja tanto por su utilización eficiente del sustrato en cuestión, como también por la capacidad de algunas especies de secretar

antibióticos y enzimas¹⁶, con usos industriales¹⁸. Responden a su entorno mediante la regulación del crecimiento, la formación de conidias y la producción de enzimas, lo que puede ser explotado en beneficio de la humanidad¹⁶.

2.2.2.- Taxonomía y ciclo de vida

Las especies del género *Trichoderma* se consideran los estados anamorfos del género *Hypocrea*, la fase sexual que se encuentra dentro del orden Hypocreales y la familia Hypocreaceae¹⁹. Así pues, el género *Trichoderma* es un ascomiceto del orden Hypocreales (Tabla 2) que comprende una gran diversidad de especies saprobias, con un ciclo de vida prioritariamente asexual. En la reproducción asexual o vegetativa, las células que se originan por mitosis son las encargadas de generar a los nuevos individuos, que serán genéticamente idénticos a su progenitor, ya que en este tipo de reproducción no existe intercambio de material genético. Los hongos a través de la reproducción asexual, generan mitosporas a partir de células vegetativas. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* no están asociadas a estados sexuales, y se consideran hongos mitóticos estrictos²⁰⁻²².

Tabla 2. Taxonomía de *Trichoderma*²³.

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma/Hypocrea</i>

El proceso mediante el cual se da origen a las esporas asexuales denominadas conidias, es conocido como conidiogénesis. Este tipo de reproducción se lleva a cabo a través de un programa de diferenciación de hifas que culmina con la formación de conidias, las cuales tienen funciones de propagación y reposo. Las conidias, caracterizadas por su forma ovoide y pigmentación verde, se originan en fiálides dispuestas en conidióforos ramificados típicos de la especie²⁰⁻²².

El ciclo inicia con la germinación de la espora, conidia o clamidoconidia; inmediatamente a la germinación se forma la primer hifa que recibe el nombre de tubo germinativo, este tubo germinativo se expande y forma hifas ramificadas, generando una colonia micelial que crece comúnmente de manera radial, aunque ciertos estímulos externos pueden dictar una alteración en esa forma de crecimiento. Las hifas vegetativas o micelio producen aparatos reproductivos asexuales llamados conidióforos que generan conidias cuando los factores ambientales limitan la fase vegetativa^{22,24}.

Cuando las condiciones son ideales para el hongo, el micelio crece de manera continua; cuando los nutrientes comienzan a disminuir, el crecimiento del micelio vegetativo disminuye dando lugar a la conidiación. El ambiente representa un conjunto de estímulos que no llegan de manera individual. Éstos son detectados por los microorganismos emitiendo una respuesta a cada uno de ellos de forma integral para sobrevivir y proliferar. La conidiación en *Trichoderma* puede ser estimulada por factores que propician un ambiente de estrés, como son: exposición a la luz, elestrés nutricional, cambios en el pH del medio, y/o daño o herida micelial^{20,21}.

La producción de conidias es un factor crítico en el ciclo de vida de los hongos filamentosos, ya que las esporas asexuales contribuyen a sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, al ser un medio de dispersión hacia sitios potencialmente viables. Las conidias permanecen latentes hasta que dichas condiciones se tornan favorables. Este tipo de reproducción se realiza en repetidas ocasiones dentro del ciclo de vida fúngico, por lo que se genera una gran cantidad de propágulos, permitiendo la dispersión hacia nuevos sustratos, asegurando de esta manera su supervivencia²⁴.

2.2.3.- Importancia de estudiar el género *Trichoderma*

Trichoderma spp., ha tenido un alto impacto en el bienestar humano, puesto que algunas de sus especies se han utilizado como biofungicidas y modificadores del crecimiento en plantas, mientras que otras son fuente importante de enzimas de utilidad industrial como celulasas y xilanasas. Además, especies del género son prolíficas productoras de metabolitos secundarios, algunos de los cuales tienen importancia clínica, mientras que otras especies se han utilizado en la producción heteróloga de proteínas recombinantes. En el suelo, las especies de *Trichoderma* se utilizan en la biorremediación de residuos orgánicos e inorgánicos, incluyendo metales pesados²⁵.

La acción benéfica de *Trichoderma* spp., no se limita únicamente a la lucha contra los agentes patógenos; también ha demostrado ser simbiote oportunista de plantas, mejorando la resistencia sistémica de las mismas. Cepas adecuadamente seleccionadas interactúan con la planta mediante la colonización de las raíces, estableciendo comunicación química y sistémicamente modificando la expresión de numerosos genes de la planta. Estos cambios alteran la fisiología vegetal y puede resultar en la mejora de la resistencia al estrés abiótico, la absorción de fertilizantes nitrogenados, la resistencia a los patógenos y la eficiencia fotosintética²⁶. Sin embargo, también ha impactado negativamente en la agricultura, con varios informes sobre epidemias que causaron estragos en cultivos de setas²⁵.

Los crecientes costos de la energía y el cambio climático inminente han llevado a una creciente atención a la producción de biocombustibles. Debido a su capacidad para producir altos niveles de celulasas, hoy en día, la investigación sobre *T. reesei*, se ha enfocado en mejorar la eficiencia de la mezcla de enzimas secretadas, con el fin de disminuir los costos globales de producción de bioetanol a partir de material de desecho celulósico, aunque las aplicaciones en la industria de la pulpa y papel, y de la industria textil también son importantes¹⁶.

Trichoderma spp., también se ha utilizado en la producción de aditivos alimentarios y productos relacionados. Actualmente, diversas enzimas de *Trichoderma* se aplican para mejorar el proceso de elaboración de la cerveza (β -glucanasas), en la maceración de enzimas en la producción de jugo de fruta (pectinasas, celulasas, hemicelulasas), como aditivo en el alimento del ganado (xilanasas) y para alimentos de mascotas. Las celulasas se aplican principalmente en la cocción, el malteado y la producción de alcohol de grano Sin embargo, no sólo enzimas, sino también metabolitos de *Trichoderma* spp., se utilizan como aditivos¹⁶. El uso regular de *Trichoderma* spp., puede ayudar a mejorar la seguridad alimentaria debido a que posibilita la disminución en el uso de pesticidas y puede proporcionar una ventaja económica para los agricultores²⁶.

Trichoderma spp., también es importante desde el punto de vista del medio ambiente. Estos hongos juegan un papel importante en la biodegradación y el reciclaje de polímeros complejos, como los desechos lignocelulósicos. También son capaces de reducir metales pesados, toxinas (tales como cianuros) y compuestos xenobióticos, disminuyendo las cargas de residuos en el ambiente²⁵.

Además de las especies altamente beneficiosas y de uso frecuente, el género *Trichoderma* también comprende especies patógenas oportunistas de humanos que muestran un crecimiento eficiente a temperatura corporal. Se han reportado especies de *Trichoderma* que causan problemas respiratorios debido a los compuestos orgánicos volátiles que producen, pero lo más importante es que pueden infectar a pacientes inmunocomprometidos (*Trichoderma citrinoviride*, *T. harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Hypocrea orientalis*). El mal pronóstico de estas infecciones es debido a la baja susceptibilidad de estos microorganismos a los agentes antimicóticos comúnmente usados (anfotericina B), además de un diagnóstico tardío^{16,27}.

Entre los reportes de infecciones relacionadas al género *Trichoderma* destaca el de un acceso cerebral atribuido al desarrollo de *T. longibrachiatum* en un paciente leucémico con neutropenia prolongada²⁸. Además, se han reportado infecciones invasivas por *Trichoderma pseudokoningii* en un paciente sometido a trasplante de hígado, y por *Trichoderma konigii* en un paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar. De igual manera se mencionan casos de peritonitis causada por *Trichoderma* spp., en diálisis peritoneal continua ambulatoria e infecciones invasivas en pacientes inmunocomprometidos con neoplasia hematológica o trasplante de órgano sólido²⁷. En 2008 se reportó por primera vez la infección por la especie saprófita *T. atroviride* en un paciente receptor de trasplante de hígado, lo que sugiere que las infecciones invasivas por *Trichoderma* spp., continuaran desarrollándose, por lo que las especies de dicho género pueden sumarse a la lista en crecimiento de patógenos humanos emergentes²⁹.

2.3.- ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica que permite la separación y cuantificación de una amplia gama de analitos (iones, péptidos, proteínas, carbohidratos, esteroides, ácidos nucleicos, vitaminas, fármacos, células, etc.), que se basa en la migración diferencial de las partículas cargadas, es decir, en el movimiento o desplazamiento que las partículas presentan al ser sometidas a la acción de un campo eléctrico³⁰⁻³². La EC consiste en un capilar de sílice con un diámetro interno de $\leq 200 \mu\text{m}$ donde se introduce la muestra previamente tratada con una solución buffer de corrimiento (BGE), y posteriormente se aplica un campo eléctrico utilizando electrodos en ambos lados del capilar que a su vez tendrá acoplado un detector. El interior del capilar está formado por grupos silanol (Si-OH), los cuales al ser desprotonados (Si-O⁻), elevan considerablemente el potencial de hidrógeno (pH). Los cationes fluyen hacia la terminal negativa, mientras que los aniones fluyen hacia la positiva, pero la inducción del alto potencial eléctrico permite que la separación sea más sensible entre las diferentes moléculas (resolución) y que el tiempo de análisis sea bastante corto. Además, la

EC consume cantidades limitadas de reactivos por lo que resulta ser relativamente económica³³⁻³⁵.

2.3.1.- Componentes de un sistema de electroforesis capilar

La configuración del instrumento de EC es relativamente simple (Figura 2). Los componentes básicos incluyen una fuente de alimentación de alto voltaje (0 a 60 kV), un capilar de sílice fundida recubierto con poliamida con un diámetro interno menor o igual a 200 μm , dos depósitos de solución buffer donde se pueden acomodar tanto el capilar como los electrodos conectados a la fuente de poder, y un detector. La termorregulación del capilar es un factor crítico para llevar a cabo separaciones eficientes y reproducibles, por lo tanto, debe utilizarse un sistema de termorregulación³⁶.

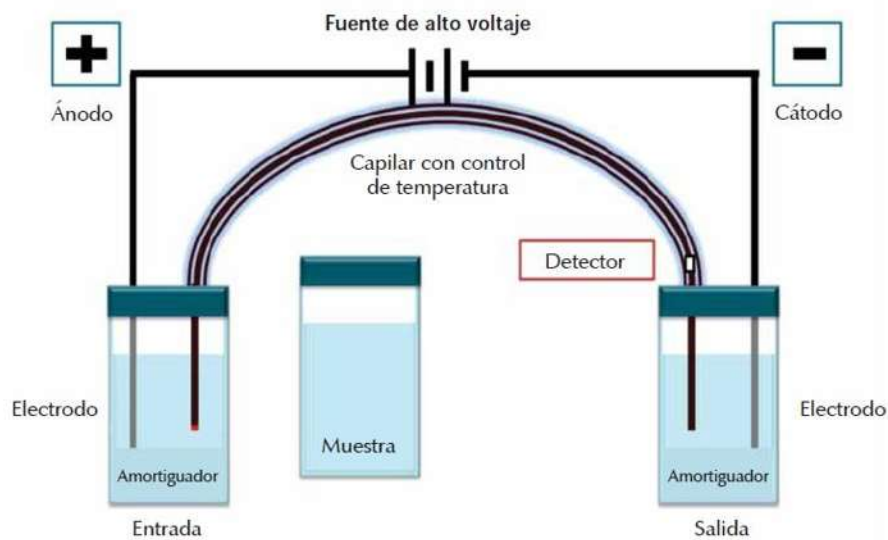


Figura 2. Representación de los elementos del sistema de EC. Tomado de la referencia 37.

Para realizar una separación por Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), inicialmente el capilar se llena mediante presión con una solución buffer apropiada (fosfatos, boratos, citratos, tris, etc) al pH deseado. Cuando el capilar se encuentra lleno y acondicionado con la solución amortiguadora, se inyecta la muestra de forma hidrodinámica (aplicando presión) o electrocinética (aplicando un campo

eléctrico). Ambos extremos del capilar y los electrodos conectados a la fuente de alimentación de alta tensión se colocan en los depósitos del buffer. Posterior a la inyección de la muestra se aplica al sistema un voltaje de hasta 30 KV, permitiendo así que se realice la migración y la separación de los analitos dentro del capilar por la acción del campo eléctrico. La separación de los analitos se basa en la diferencia de relación carga/masa y por la afinidad a los diferentes aditivos (surfactantes, ciclodextrinas, aminas, solventes orgánicos, etcétera) de la solución amortiguadora. La detección de los analitos se realiza dentro del capilar en su parte distal, en una sección a la que se le ha removido el polímero, permitiendo así, el paso de luz hacia el detector donde la información es recolectada y almacenada por un sistema de adquisición y análisis de datos^{30,36,37}. Tradicionalmente, los métodos de detección empleados para EC incluyen absorbancia, fluorescencia y electroquímica³⁸.

2.3.2.- Factores que causan la movilidad del analito en la electroforesis capilar

A).- Flujo electroosmótico (EOF) y doble capa eléctrica

El componente efector más importante en la EC es la electroósmosis o EOF. Surge como consecuencia de aplicar un campo eléctrico que genera una doble capa eléctrica entre la solución y la pared del capilar. En condiciones acuosas, la fase sólida (pared interna del capilar) posee un exceso de cargas negativas como resultado de dos procesos físico-químicos, la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base) y la adsorción de especies iónicas sobre la superficie del capilar^{30,36,37,39}.

Los grupos silanol (Si-OH) de la superficie de la pared interna del capilar son ionizados a un $\text{pH} \geq 3$, por lo que la pared del capilar presentará una carga negativa (Si-O⁻). De acuerdo con la teoría de la doble capa eléctrica, en la pared del capilar se formará una primera capa (capa fija) de contraiones (cationes)

provenientes del buffer, que son atraídos por la carga negativa del capilar, seguida por una segunda (capa móvil), que se compone principalmente de cationes que están adyacentes a la capa fija y, hacia el centro del capilar, el número de cationes y aniones son equivalentes, lo que mantiene el balance de cargas. Al aplicar un campo eléctrico el exceso de cationes de la capa móvil establece un flujo neto de migración hacia el polo negativo (cátodo), generando el EOF. El EOF se refiere a la migración de un líquido (solución amortiguadora) respecto a una superficie cargada (pared del capilar) al aplicar un campo eléctrico. La doble capa eléctrica tiene un balance que está a su vez en equilibrio con la pared que corresponde al potencial zeta (Figura 3c) ^{30,36,37,39}.

El EOF se define como:

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

Donde ϵ es la constante dieléctrica del medio, η es la viscosidad del buffer, y ζ es el potencial zeta medido en el plano de corte cercano a la interfase líquido-sólido³⁹.

La electroósmosis conduce a un flujo en la disolución que tiene un perfil plano, perpendicular al capilar, a diferencia del perfil parabólico del flujo en cromatografía líquida cuyo origen es la presión. La velocidad del EOF es generalmente mayor que las velocidades de migración electroforética de los iones individuales y llega a ser, en la práctica, el mecanismo de bombeo de la fase móvil en la ECZ. Aunque los analitos migran según sus cargas dentro del capilar, la velocidad del EOF es normalmente suficiente como para arrastrar a todas las especies, las cargadas positivamente, las neutras y las cargadas negativamente hacia el mismo extremo del capilar, de tal forma que todas ellas puedan detectarse al pasar por un punto común³⁹.

B).- Movilidad Electroforética (μ_{ep})

La separación por electroforesis está basada en la diferencia de velocidades de los solutos en un campo eléctrico. La velocidad de migración de un ion sometido a la acción de un campo eléctrico está dada por:

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

Donde μ_{ep} es la movilidad electroforética del ión, y E, es la intensidad del campo eléctrico aplicado.

La fuerza eléctrica está representada en la siguiente ecuación:

$$F_E = qE \quad (3)$$

Y para un ión esférico la fuerza friccional está determinada por la ecuación:

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (4)$$

Donde η es la viscosidad de la solución y r es el radio iónico. En el estado estacionario, las fuerzas son iguales y opuestas y, por lo tanto, la movilidad electroforética está dada por la ecuación (5):

$$\begin{aligned} qE &= 6\pi\eta r v \\ \mu_{ef} E &= \frac{qE}{6\pi\eta r v} \\ \mu_{ef} &= \frac{q}{6\pi\eta r v} \end{aligned} \quad (5)$$

La μ_{ep} es directamente proporcional a la carga eléctrica del ión e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento. Este último se determina en un analito cargado a partir del tamaño y de la viscosidad del medio en el cual migran. Así pues, la relación carga/masa de los analitos determina la velocidad de migración con la que migran en el seno de la solución (Figura 3a). Si dos especies difieren en la carga y/o en las fuerzas de rozamiento, se moverán a través del buffer y se separarán. Las especies neutras no se separan mediante este mecanismo, por lo que es necesario utilizar aditivos, como por ejemplo, surfactantes para poder separar analitos de esta naturaleza^{30,37,39-43}.

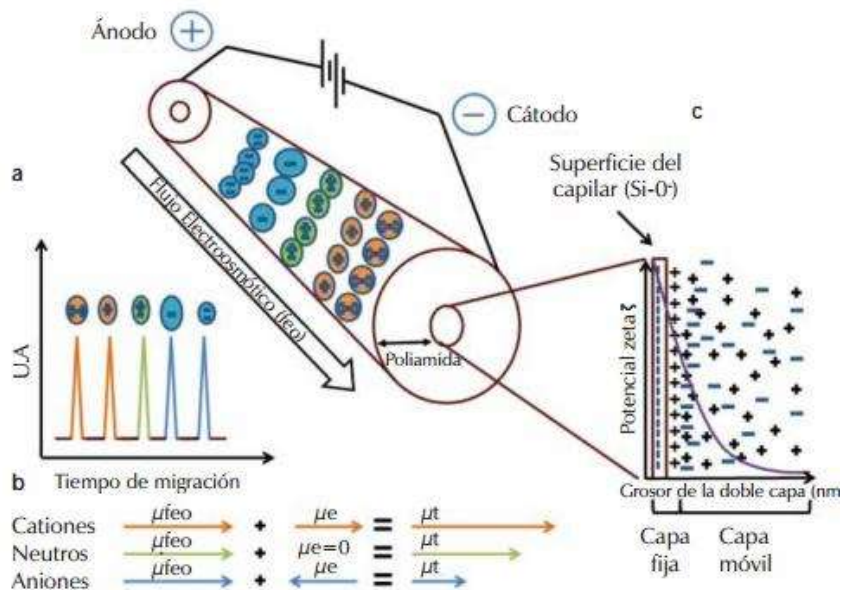


Figura 3. Factores que causan la movilidad de los analitos en la EC.
a) Separación relación carga-masa, b) Movilidad total de los analitos μ_t ,
c) Representación de la doble capa eléctrica. Tomado de la referencia 37.

C).- Movilidad Electroforética Aparente, Observada o Total (μ_{ap})

La movilidad aparente (μ_{ap} o μ_t) de un analito es la suma de la movilidad electroforética de este, más la movilidad electroosmótica de la solución.

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} \pm \mu_{eo} \quad (6)$$

Para un catión que se mueve en la misma dirección que el EOF, la μ_{ep} y la μ_{eo} tienen el mismo signo, y por lo tanto la μ_{ap} es mayor que la μ_{ep} . La electroforesis transporta los aniones en dirección opuesta a la electroósmosis de forma que para los aniones los términos de la ecuación (6) tienen signos opuestos (Figura 3b). A pH neutro o alcalino, una fuerte electroósmosis transporta aniones al cátodo, porque la electroósmosis es generalmente más rápida que la electroforesis^{39,43}.

2.3.3.- Origen de la Carga de un Microorganismo: Partículas Coloidales

Un coloide es una partícula o grupo de partículas que varían en tamaño desde aproximadamente 10^{-4} m a unos pocos micrómetros. Son suficientemente pequeños por lo que normalmente no sedimentan únicamente en virtud de la influencia de la gravedad, es decir, el movimiento browniano o de la solución circundante es suficiente para mantenerlos suspendidos. Por lo general están cargados y presentan altas proporciones superficie-volumen, por lo tanto, basándose únicamente en su tamaño, es aceptable caracterizar a la mayoría de los microorganismos como partículas coloidales. Los coloides pueden obtener la carga de su superficie de al menos dos maneras. La primera ocurre debido a la ionización de grupos de superficie como resultado de la protonación o desprotonación de moléculas de superficie ácidas o básicas. La carga de la superficie también puede ser adquirida por la adsorción de iones de la solución circundante. Tanto el tipo como la cantidad de un ion adsorbido están controlados por el tamaño y la naturaleza (química de la superficie) de la partícula coloidal, así como también por las propiedades de la solución circundante (por ejemplo, pH, fuerza iónica y composición iónica). La carga superficial de un microorganismo, generalmente se debe a la combinación de estos factores. Los grupos ionizables

más comunes en la superficie exterior de los microorganismos son los ácidos carboxílicos, fosfatos, aminas y en ocasiones, residuos de sulfatos⁴⁴.

2.3.4.- Buffers

La elección del buffer de corrimiento es un factor crítico para la separación exitosa de los analitos por EC. Una amplia variedad de buffers puede ser empleada en la ECZ (Tabla 3). El buffer modifica la μ_{ap} debido a sus propiedades fisicoquímicas como viscosidad, fuerza iónica, pH y constante dieléctrica^{30,36,42}.

Tabla 3. Sistemas buffer utilizados en electroforesis capilar³⁰.

Nombre	pKa	Nombre	pKa
Fosfato	2,12 (pKa ₁)	TES	7,50
Citrato	3,06 (pKa ₁)	Hepes	7,55
Formato	3,75	Hepps	8,00
Succinato	4,19 (pKa ₁)	Tricina	8,15
Citrato	4,74 (pKa ₂)	Glicina amida	8,20
Succinato	5,57 (pKa ₂)	Hidroclorhídrico	
MES	6,15	glicilglicina	8,25
ADA	6,60	TRIS	8,30
BIS-TRIS	6,80	Bicine	8,35
propano			
Pipes	6,80	Morfolino	8,49
ACES	6,90	Borato	9,24
MOPSO	6,90	CHES	9,50
Imidazol	7,00	Chapso	9,60
MOPS	7,20	CAPS	10,40
Fosfato	7,21 (pKa ₂)	Fosfato	12,32 (pKa ₃)

La selección de un buffer es una de las etapas básicas en la EC. La sensibilidad del EOF al pH requiere buffers que mantengan el pH constante. Los buffers efectivos tienen un intervalo de aproximadamente dos unidades de pH alrededor del valor de pKa. Los buffers polibásicos como fosfato y citrato tienen más de un pKa para usar, y pueden ser utilizados en un rango de pH más amplio. El buffer que se emplea en EC debe reunir una serie de propiedades:

- Buena capacidad amortiguadora en el intervalo de pH seleccionado.
- Baja absorbancia en la longitud de onda empleada en la detección.
- Baja movilidad (para lo cual se necesita baja concentración iónica)³⁰.

A).- Buffers Zwitteriónicos

TRIS, MES, CAPS, HEPES, Tricina y bicina son buffers zwitteriónicos en los que su característica más importante es su baja conductividad cuando el pH del buffer es cercano a su pKa. Esto trae como consecuencia una baja corriente y, por lo tanto, baja generación de calor de Joule^{30,36,41}.

Amortiguadores como MOPS, HEPES y Tricina son buffers biológicos zwitteriónicos, desarrollados en 1966 por Good y col., que presentan ciertas características que los hacen ideales para la investigación con sistemas biológicos. Dichas características son:

- Alta solubilidad en agua.
- Alta estabilidad química.
- Baja permeabilidad a la membrana celular.
- Baja capacidad quelante con metales.
- Valores de pKa en o cercanos al pH fisiológico (entre 6.0 y 8.0).
- No tóxicos para las células.
- Resistentes a la degradación enzimática y no enzimática.
- Baja absorción de espectros en las regiones UV y visible⁴⁵.

2.3.5.- Modificadores del EOF

El control del EOF puede tener un gran efecto en el mejoramiento de la resolución y la eficiencia de la EC. El EOF está en función, entre otros factores, del tipo de buffer, de su pH y de la concentración.

A).- pH

Una variación del pH del buffer origina un cambio en la ionización del capilar y puede esencialmente detener el EOF a valores bajos ($\text{pH} < 2.5$) e incrementar su magnitud a valores elevados de pH, y así, en condiciones alcalinas inducir un flujo máximo en el que el EOF será usualmente mayor que la velocidad de migración de los iones de la muestra^{30,36,40,46}. Por otro lado, la protonación o desprotonación de las moléculas de la superficie de las entidades biológicas está en función del pH de la solución circundante, y por consiguiente, la modificación del pH puede también alterar la μ_{ep} de los microorganismos⁴⁴.

B).- Concentración y fuerza iónica

El EOF puede ser modificado ajustando la concentración y la fuerza iónica del buffer. Elevadas concentraciones del buffer son útiles para la limitación de las interacciones entre los iones presentes y la pared interna del capilar aunque el calentamiento de los capilares (Efecto Joule) limita el uso de concentraciones elevadas de los buffers, las cuales deben oscilar entre 10 y 50 mM. Al incrementar la fuerza iónica del buffer de separación se incrementa el grosor de la doble capa eléctrica reduciendo así el EOF, por lo que aumentará el tiempo de análisis. Además, el incremento de la fuerza iónica desembocará en la disminución de las interacciones de los analitos con la pared del capilar. De acuerdo a lo anterior, el efecto neto en la separación, será el aumento de la resolución, siempre y cuando la capacidad de termorregulación del capilar no sea superada y que no se lleven a cabo procesos de disociación no deseados de los analitos^{30,36,41}.

El potencial zeta está relacionado con el inverso de la carga por unidad de área superficial, el número de electrones de valencia y la raíz cuadrada de la concentración del electrolito. Dado que esta es una relación inversa, al aumentar la concentración de la solución buffer disminuirá el EOF^{30,41}.

C).- Recubrimiento dinámico del capilar

El EOF también puede ser controlado mediante el recubrimiento dinámico del capilar, agregando aditivos al buffer, o con recubrimientos covalentes. El uso de un recubrimiento dinámico disminuye la adsorción de los microorganismos al capilar y puede invertir o detener el EOF, modificando la μ_{ap} de los analitos, dependiendo la naturaleza del recubrimiento^{30,41,47}.

a).- Utilización de Óxido de Polietileno (PEO)

El PEO es un polímero que ha sido utilizado en EC como un recubrimiento de la pared interna del capilar con el propósito de modificar el EOF. Diversos estudios han demostrado que una solución diluida de polímero es necesaria para lograr el agrupamiento de la muestra, y así obtener separaciones de microorganismos de alta eficiencia mediante EC. La adición de polímero en el proceso de separación actúa de tres maneras: Disminuyendo el EOF, agrupa eficientemente a los microorganismos cuando se encuentran bajo la acción de un campo eléctrico, y provoca que el tiempo de migración (μ_{ap}) se incremente, lo que puede explicarse por la disminución en el EOF. Tanto el polímero como la alta tensión son necesarios para alcanzar un proceso de enfoque eficaz⁵.

Sin PEO, el EOF es demasiado rápido, resultando en la elución de todas las especies junto con el EOF. Después de la adición de PEO, los microorganismos se agrupan en picos de alta eficiencia mostrando tiempos de migración diferenciales. Mayores concentraciones de PEO producen tiempos de migración más largos y diferentes μ_{ap} para los microorganismos⁴⁴.

b).- Efecto de la utilización de un recubrimiento catiónico

Para este sistema se utiliza comúnmente el surfactante catiónico CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) con la finalidad de invertir el EOF. Las moléculas de CTAB recubren la superficie de sílice mediante interacciones electrostáticas y entonces se forma una segunda capa eléctrica por asociación con cadenas no polares,

dando como resultado que la superficie del capilar esté cargada negativamente, lo que invierte el EOF. Bajo estas condiciones, teóricamente las células se moverán como aniones desde el cátodo al ánodo usando polaridad inversa (La migración se lleva a cabo desde el polo negativo al positivo) e invirtiendo el EOF. Además, al usar CTAB se observa una alta tendencia de las conidias a formar agregados celulares debido a que las moléculas del CTAB afectan la doble capa eléctrica que se encuentra alrededor de células cargadas negativamente^{47,48}.

2.3.6.- Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar

En la ECZ la separación de los analitos se basa en las diferencias de μ_{ap} . Si la pared del capilar es negativa, el EOF se dirige al cátodo, y el orden de elución es cationes antes que las moléculas neutras, y éstas antes que los aniones. Si se invierte la carga de la pared del capilar recubriéndola con un tensioactivo catiónico y se invierte la polaridad del instrumento, el orden de elución es aniones antes que las moléculas neutras, y éstas antes que cationes. Sin embargo, ninguno de estos esquemas separa las moléculas neutras puesto que éstas no muestran μ_{ep} , y por lo tanto, migran a la misma velocidad que el EFO^{43,49,50}.

Para separar analitos neutros mediante EC, Terabe introdujo en 1984 una técnica híbrida entre la EC y la cromatografía de líquidos, denominada cromatografía electrocinética micelar (MEKC) o cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC). La separación de compuestos neutros por MEKC se basa en la adición al BGE de un tensioactivo cargado a una concentración suficiente para formar micelas (concentración micelar crítica: CMC). Estos analitos neutros se distribuyen entre la fase micelar y la fase acuosa del buffer de corrimiento en diferente extensión dando lugar a su separación. Las moléculas neutras interactúan con la micela en distinto grado en función de su hidrofobicidad y adquieren μ_{ep} ^{30,32,50}.

Las micelas son agregados anfólicos de surfactantes, constituidas por largas cadenas de moléculas (10 a 50 unidades de carbono) que poseen colas

hidrofóbicas y cabezas hidrofílicas. La cola del surfactante no puede ser solvatada en solución acuosa. Cuando se conoce la CMC, el agregado micelar puede ser total, lo que produce cambios físicos en la tensión superficial, viscosidad y la habilidad para dispersar la luz³⁰.

La separación de las especies neutras se efectúa por partición dentro y fuera de las micelas. Cuando el soluto interactúa más con la micela, mayor será su tiempo de migración, pues la micela es atraída en dirección opuesta al EOF; en cambio, cuando no está en contacto con la micela, es transportado por el EOF. Los compuestos hidrofóbicos interactúan con mayor fuerza con la micela, por lo que serán retenidos por más tiempo³⁰.

A).- Surfactantes

La selectividad de la separación en MECC puede ser manipulada con facilidad, variando la naturaleza física (tamaño, carga, geometría) de la micela, usando diferentes tensioactivos. Estos cambios en selectividad son comparables a los que obtendríamos si modificásemos la fase estacionaria en cromatografía líquida. Existen cuatro clases de surfactantes: aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos, siendo los dos primeros los más utilizados. A una concentración baja, la concentración de moléculas de surfactantes iónicos produce la CMC que puede actuar como agente solubilizante por la formación de pares iónicos, o por interacciones hidrofóbicas. Dependiendo de la carga del surfactante, puede ser que el EOF se incremente, aumente o se invierta^{30, 32, 41,43, 50}.

Tabla 4. Clases de surfactantes y sus propiedades⁴¹.

Surfactante	Tipo	CMC	# de agregación
SDS	Aniónico	8.1×10^{-3}	62
CTAB	Catiónico	9.2×10^{-4}	170
Brij-35	No-iónico	1.0×10^{-4}	40
Sulfobetaina	Zwitteriónico	3.3×10^{-3}	55

SDS = dodecil sulfato de sodio; CTAB = bromuro de cetiltrimetilamonio; Brij-35 = 23-lauril ether de polioxietileno; sulfobetaina = ácido N-dodecil-N,N dimetilamonio-3-propano-1-sulfónico.

El CTAB, es un tensioactivo catiónico, que a temperatura ambiente tiene una CMC de 0.92 mM, número de agregación medio de 60 y posee una cadena hidrocarbonada de 16 átomos de carbono. Por otro lado, el Tritón X-100 es un preparado comercial de p(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxipolioxietilenglicoles que contiene una media de 10 unidades de óxido de etileno por molécula. La temperatura (de 5 a 25°C) influye en la CMC y el número de agregación de las micelas de este surfactante⁵¹.

2.3.7.- Inyección de la muestra

Existen dos métodos para introducir la muestra al capilar: Inyección hidrodinámica e inyección electrocinética. En el primer caso, la muestra es impulsada por una diferencia de presión en el capilar; mientras que en la inyección electrocinética la muestra se introduce aplicando un voltaje, usualmente más bajo que durante la separación, por un tiempo corto en la entrada del capilar⁵².

Cuando se aplica una diferencia de presión entre la entrada del capilar depositado en la solución de la muestra y la salida, cierto volumen de la solución de muestra fluirá dentro del capilar. La inyección de la muestra, mediante la respectiva diferencia de presión, puede lograrse mediante presión de gas en el vial de la muestra en el extremo de inyección, por succión de vacío en el extremo final del capilar, o aplicando una diferencia de altura entre la entrada y la salida (acción de sifón) como consecuencia de la elevación del depósito de inyección con respecto al depósito en el extremo de detección del capilar. Los tres modos de inyección son comunes en sistemas comerciales de EC^{52, 53}.

El volumen de inyección hidrodinámica (mL) puede ser cuantificado utilizando la ecuación de Poiseuille para el flujo de líquido a través de un tubo circular:

$$Volumen = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8 \eta L} \quad (7)$$

Donde ΔP es igual a la diferencia de presión a través del capilar (dina/cm²), r es el radio interno del capilar (cm), t es el tiempo de inyección (s), η representa la viscosidad del buffer (dina•s/cm²), y L es igual a la longitud total del capilar (cm). El tiempo de inyección y la diferencia de presión son los factores principales para el control del volumen de muestra inyectado⁵³.

Para soluciones acuosas de BGE a 25 °C, la longitud de la zona de inyección puede ser calculada mediante la siguiente ecuación⁵²:

$$L_{inj} = (3.5) \left(\frac{d^2}{L} \right) (\Delta P) (t_{inj}) \quad (8)$$

El valor numérico es válido cuando la longitud y el diámetro se expresan en centímetros, la presión en dinas y el tiempo en segundos. A partir de la longitud es posible calcular el volumen de inyección para soluciones de BGE acuosas mediante la ecuación (9)⁵²:

$$V = \pi L_{inj} (r^2) \quad (9)$$

O bien partiendo de la modificación de la ecuación para soluciones acuosas de BGE (7):

$$Volumen = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8(8.9286 \times 10^{-3})L} \quad (10)$$

La longitud de la zona de muestra con inyección hidrodinámica depende de la viscosidad de la solución dentro del capilar durante la inyección, por ejemplo, de la viscosidad del BGE. El parámetro se mantiene fácilmente constante cuando el capilar tiene control de la temperatura. La viscosidad de la solución de muestra es de menor importancia, debido a que ocupa únicamente una porción muy pequeña de la longitud del capilar. Por lo tanto, la repetitividad puede ser excelente aun cuando existan grandes diferencias de viscosidad entre muestras⁵².

2.4.- APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

La EC es una herramienta de separación de biomoléculas, virus, bacterias, levaduras y hongos, que en los últimos años ha tenido gran importancia en medicina; presenta la versatilidad de separar aminoácidos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, tioles, contaminantes alimenticios, material genético, y algunos fármacos importantes en el estudio de diferentes ramas en el área de la salud (diagnósticos molecular y de laboratorio clínico)³⁴.

El considerable avance de la EC se ha extendido al área médica, en el campo de las proteínas, péptidos, ADN, análisis de líquidos de perfusión, diagnóstico de enfermedades infecciosas, análisis de metabolitos y sustancias prohibidas en fluidos biológicos, monitoreo de drogas xenobióticas y de abuso, determinación de mutaciones puntuales, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, y análisis forenses^{30,34}.

La EC ha contribuido al fortalecimiento de la ciencia y la medicina moderna, permitiendo conocer la secuencia completa del genoma humano. Debido a las ventajas de la EC, la secuenciación del ADN ha podido automatizarse, lo que permite en la actualidad el conocimiento de las secuencias genómicas del hombre y otras especies con una mayor velocidad y especificidad. La información acumulada gracias a la EC comienza a vislumbrar las causas genéticas de

muchas enfermedades, fortaleciendo el diagnóstico y reemplazando muchas de las metodologías clásicas para el estudio de la medicina genómica³⁴.

En el área farmacéutica, la EC ha sido utilizada para la determinación de principios activos, en el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, en el estudio de quimioterápicos y en la determinación de la estructura quiral de compuestos isoméricos³⁰.

En el área de alimentos, la EC se ha aplicado al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes; mientras que en control ambiental ha permitido la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos³⁰.

2.4.1.- Electroforesis capilar aplicada a células fúngicas intactas

Los primeros estudios de células fúngicas utilizando EC fueron realizados en levaduras. Armstrong *et al.*, (1999) reportaron dos técnicas de EC que permitieron la primer identificación y separación de alta eficiencia de mezclas de distintos tipos de bacterias y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae.*, por EC. La primera técnica consistió en ECZ utilizando una solución de un polímero de alto peso molecular, el PEO. La segunda consistió en una separación de enfoque isoeléctrico basándose en la diferencia de carga de la superficie de los microorganismos⁵⁴.

Posteriormente, Moon y Kim (2003) llevaron a cabo un estudio en el que *S. cerevisiae*, en su carácter de probiótico importante, fue analizado cuantitativa y cualitativamente mediante EC. Se comparó la movilidad electroforética de una cepa pura de la levadura en relación a una contenida en una tableta de suplemento alimenticio a la cual se le removieron mediante ultracentrifugación la mayoría de las enzimas y compuestos orgánicos. La caracterización del probiótico en el suplemento fue simple y rápida. La cuantificación (*S. cerevisiae*) mostró una

buena linealidad entre el área del pico y la concentración del microorganismo, evidenciando el alto potencial de ésta técnica para la rápida y exacta cuantificación de los probióticos⁵⁵.

Armstrong *et al.*, (2008) examinaron cuatro tipos de células fúngicas (*Candida albicans*, *Cryptococcus albidus*, *S. cerevisiae*, y *Rhodotorula* spp) mediante EC utilizando un método de triple inyección con dos aditivos catiónicos (CTAB y OTAB). Bajo estas condiciones se logró el barrido de todos los microorganismos contenidos en una muestra, y se agruparon produciendo un pico simple para todas las células sin importar su heterogeneidad electroforética. Además, utilizaron un líquido iónico monocatiónico sustituyendo al CTAB para una mezcla de cuatro bacterias y cuatro células fúngicas y la sometieron al método antes mencionado, obteniendo un solo pico. Con los datos obtenidos fue posible constituir la base para un test de contaminación-esterilidad³.

Para el año 2009, Horká *et al.*, verificaron la posibilidad de agrupar y separar conidias de los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Fusarium solani* y *Penicillium chrysogenum*, por medio de ECZ y ECEI. La detección fue optimizada mediante la modificación dinámica de las conidias utilizando pirenobutanoato, y hasta diez conidias marcadas fueron detectadas fluorométricamente, demostrando así, el proceso de optimización para la sensibilidad en la detección de las conidias marcadas¹.

En el mismo año, Petr *et al.*, trataron más a fondo la separación e identificación de microorganismos por EC utilizando *Escherichia. coli* y *S. cerevisiae*. La separación se llevó a cabo empleando tanto capilares recubiertos con óxido de polietileno (PEO), como no recubiertos, y la reproducibilidad fue estudiada para obtener los resultados más fiables. Los microorganismos separados fueron cultivados luego de la separación y analizados mediante una técnica basada en

espectrometría de masas y un segundo análisis por EC con la finalidad de mejorar la identificación⁴⁷.

Ya en el año 2011, Horká *et al.*, observaron la posibilidad de separar e identificar mediante EC especies de *Candida* fenotípicamente indistinguibles, formadoras y no formadoras de biofilm. Las especies separadas fueron *C. orthopsilosis* biofilm-negativo, así como, *C. metapsilosis* y *C. parapsilosis*; ambas tanto biofilm-negativo como biofilm-negativo. Al utilizar electroforesis capilar de enfoque isoelectrico, las especies de levaduras fueron separadas de acuerdo a sus puntos isoelectricos, los cuales difieren por pocas centésimas de la unidad de punto isoelectrico tanto para cepas no formadoras como formadoras de biofilm. Al utilizar ECZ, regiones estrechas de las células de las especies de *Candida* fueron detectadas con buena resolución⁵⁶.

En el año 2012, Horká y su grupo de trabajo utilizaron, entre otras técnicas instrumentales, la ECZ para la caracterización de una mezcla de esporas de *Monilinia* spp. Los resultados fueron comparados con los electroferogramas de de esporas obtenidas a partir de frutas infectadas, lo que permitió establecer que la que la ECZ puede ser utilizada para la rápida, efectiva y rentable identificación de diferentes especies de *Monilinia* similares morfológicamente. Además, determinaron que las velocidades de migración de las esporas de las diferentes especies, son independientes del lugar de recolección de las mismas, por lo que pueden ser usadas como marcadores para su identificación⁴.

2.4.2.- Antecedentes en Investigación en Células Fúngicas Intactas en el Laboratorio de Desarrollo Analítico

En 2009, Cázares logró la caracterización de esporas fúngicas pertenecientes a tres phyla del reino Fungi, mediante ECZ. Las cepas de estudio fueron *Amylomyses rouxii*, *T. atroviride* y *Agaricus bisporus* (cepa comercial). En este estudio se utilizaron citrato de sodio, borato de sodio, fosfato de sodio, fosfato de

potasio, EDTA, TRIS y TBE como buffers de corrimiento en un intervalo de pH de 5 a 9, a concentraciones de 10 a 30 mM. La variación de las condiciones de análisis permitió agrupar a las poblaciones celulares en bandas electroforéticas, logrando la caracterización de cada uno de los hongos. El buffer utilizado, la concentración y el pH determinó la forma del pico electroforético. Además, se identificaron y separaron esporas de *A.bisporus* y *T. atroviride* en mezcla. De igual manera, se demostró la viabilidad de las esporas fúngicas luego de ser sometidas al proceso electroforético⁴⁰.

En 2013, Ávila estudió el efecto de las soluciones buffer HEPES, MOPS, MES, Tricina y fosfato de potasio, sobre la movilidad electroforética de conidias de *T. atroviride* IMI-206040, a una concentración de 10 mM y pH=pKa de los respectivos buffer⁴². Sin embargo, la modificación de la concentración, el pH y el voltaje, solo se llevó a cabo para el buffer de fosfatos.

Para el año 2015, Salazar evaluó el efecto de surfactantes iónicos y no iónicos sobre las propiedades de agrupamiento y movilidad electrorética de conidias de *Trichoderma spp.*, Se utilizaron distintas concentraciones de los surfactantes, así como buffer de fosfatos 10mM con un valor de pH de 6.8, obteniendo que el surfactante catiónico CTAB agrupó las conidias, y tanto su uso, como el de Tritón X-100, permite la obtención de señales electroforéticas propias de las células fúngicas⁵⁷.

Debido a que se han realizado estudios exhaustivos con buffers de fosfatos y no ha sido así con los llamados buffer zwitteriónicos, es que se busca utilizar éstos últimos en intervalos que abarquen su máxima capacidad de amortiguamiento, así como aprovechar las propiedad de distintos surfactantes con la finalidad de obtener picos electroforéticos, estrechos definidos y propios de un género y/o especie.

2.5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente. Un aspecto fundamental del diseño de experimentos es decidir cuáles pruebas o tratamientos se van a realizar y cuántas repeticiones de cada uno se requiere, de manera que se obtenga la máxima información al mínimo costo posible. El arreglo formado por los diferentes tratamientos que serán corridos, incluyendo las repeticiones, recibe el nombre de diseño⁵⁸.

2.5.1.- Diseño factorial

El objetivo de un diseño factorial es estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. Los factores pueden ser de tipo cualitativo o cuantitativo. Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la variable de respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos. Con el diseño factorial completo se corren aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar. Así pues, la matriz de diseño o arreglo factorial es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores⁵⁸.

2.5.2.- Diseños factoriales 3^k

El diseño factorial 3^k considera k factores con tres niveles cada uno y tiene 3^k tratamientos. De esta forma, cuando se tienen cuatro o más factores, prácticamente es prohibitivo pensar en correr un diseño 3^k . Sin embargo, cuando se tienen pocos factores, tres como máximo, o en el peor de los casos cuatro, hay algunas situaciones prácticas en las que el diseño 3^k es una buena alternativa, por ejemplo, cuando los factores son categóricos o discretos y de manera natural tienen tres niveles cada uno. Esto ocurre en factores como tipo de material, tipo de reactivo o medio de cultivo⁵⁸.

2.5.3.- Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

La MSR es una estrategia experimental y de análisis que permite determinar las condiciones de operación óptimas de un proceso, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación. La MSR es utilizada con éxito en la industria química y en los últimos años se le ha dado aplicación en microbiología para la formulación de medios de cultivo. Se basa en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas, a través de las cuales es posible modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es determinada por varias variables, siendo el objetivo de la misma optimizar esta respuesta. Esta metodología tiene la particularidad de determinar la influencia e importancia de los parámetros estudiados y las interacciones entre estos con un mínimo de ensayos. Este tipo de diseños pueden ser de valor considerable cuando es importante reducir el número de corridas tanto como sea posible⁵⁸⁻⁶⁰.

2.5.4.- Diseño de Box-Behnken

Este diseño se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas. Se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental. El diseño Box-Behnken es una buena alternativa porque tienen un número competitivo de tratamientos, además de que por su construcción los puntos de prueba no son extremos, en el sentido de que cualquiera de ellos siempre tiene, al menos uno de los factores en su nivel intermedio. Este tipo de experimentos permiten el estudio del efecto de cada factor sobre la variable de respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre la dicha variable⁵⁸.

3. JUSTIFICACIÓN

La exposición a hongos filamentosos y sus conidias se asocia con una amplia gama de efectos adversos para la salud, infecciones nosocomiales con alta tasa de mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, génesis de reacciones alérgicas, y producción de micotoxinas que contaminan alimentos y representan un grave riesgo para los seres humanos por su carácter carcinogénico. Debido a esto y a la sensibilidad variable a los agentes antifúngicos de estos patógenos, la detección temprana y la correcta identificación de estos organismos es importante. La EC surge como una técnica rápida, de alta eficiencia, y que requiere cantidades relativamente pequeñas de reactivos y muestra, que proporciona datos muy precisos, permite la identificación, separación y cuantificación de analitos, siendo en este caso, células fúngicas intactas.

Los hongos del género *Trichoderma* tienen gran importancia biotecnológica y recientemente se ha observado que afectan la salud de los humanos. La comprensión plena de sus características, tales como propiedades de pared celular, permite diseñar estrategias que sean utilizadas en nuestro beneficio.

Mediante el análisis de conidias de *Trichoderma spp.*, por esta técnica y al variar las condiciones del buffer de corrimiento, se conocerán las condiciones de agrupamiento de las mismas, permitiendo aumentar la sensibilidad del método y por consiguiente la posibilidad de crear una metodología que permita separar, identificar y cuantificar especies fúngicas provenientes de diferentes orígenes, con buena sensibilidad, corto tiempo, y de forma relativamente económica.

4. HIPÓTESIS

La composición adecuada del buffer de corrimiento permite agrupar conidias de *Trichoderma spp.*, y por consiguiente, aumentar la sensibilidad de su análisis mediante EC.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la composición del buffer de corrimiento, en las propiedades superficiales de conidias de *Trichoderma spp* mediante electroforesis capilar.

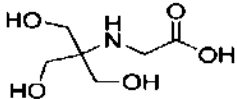
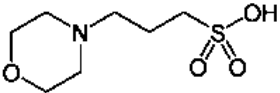
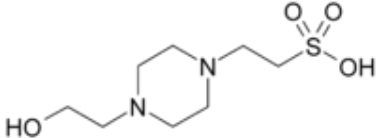
OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.*, en el intervalo de máxima capacidad amortiguadora usando de buffers fisiológicos.
- Determinar la influencia de agentes que forman un recubrimiento dinámico, en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.*
- Determinar el efecto de surfactantes en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.*

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.- Reactivos utilizados

Los buffers utilizados, así como su valor de pKa y el intervalo de pH seleccionado se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Buffers utilizados para los corrimientos electroforéticos			
Buffer	Fórmula	Valor de pKa	Intervalo de valor de pH utilizado
TRICINA		8.15	7.4-8.8
MOPS		7.20	6.5-7.9
HEPES		7.56	6.5-8.5

Para la preparación de las soluciones buffer fisiológicas se emplearon reactivos grado analítico. Los buffers utilizados fueron MOPS, HEPES, y Tricina (Sigma-aldrich. St Louis, MO), con valores de pH en su máxima capacidad de amortiguamiento alrededor de su pKa. Con lo que respecta a la composición del buffer donde se colocó la muestra, se utilizó el surfactante catiónico CTAB (Sigma-aldrich. St Louis, MO) y el no iónico Tritón X-100 (Sigma-aldrich. St Louis, MO). Por otra parte, se utilizó CTAB y óxido de polietileno (PEO) para recubrir la pared interna del capilar. Para el lavado del capilar y ajuste del pH se utilizaran NaOH 1M, HCl 1M y metanol. El pH de las soluciones buffer fue ajustado por medio de un potenciómetro Hanna Instrument pH 211 Microprocessor pH meter.

7.2.- Material Biológico

Las cepas utilizadas (Tabla 6) provienen del Cepario Michoacano Universitario (CMU) perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), y fueron sembradas en Medio Mínimo Vogel (MM) (Figura 5)^{21,61}.

Tabla 6. Cepas estudiadas

CEPA DE REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none">• <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040
CEPAS SILVESTRES
<ul style="list-style-type: none">• <i>Hypocrea lixii/T. harzianum</i> CMU 1• <i>H. atroviridis/T. atroviride</i> CMU 8• <i>H. rufal/T. viride</i> CMU 218• <i>T. tomentosum</i>. CMU 221

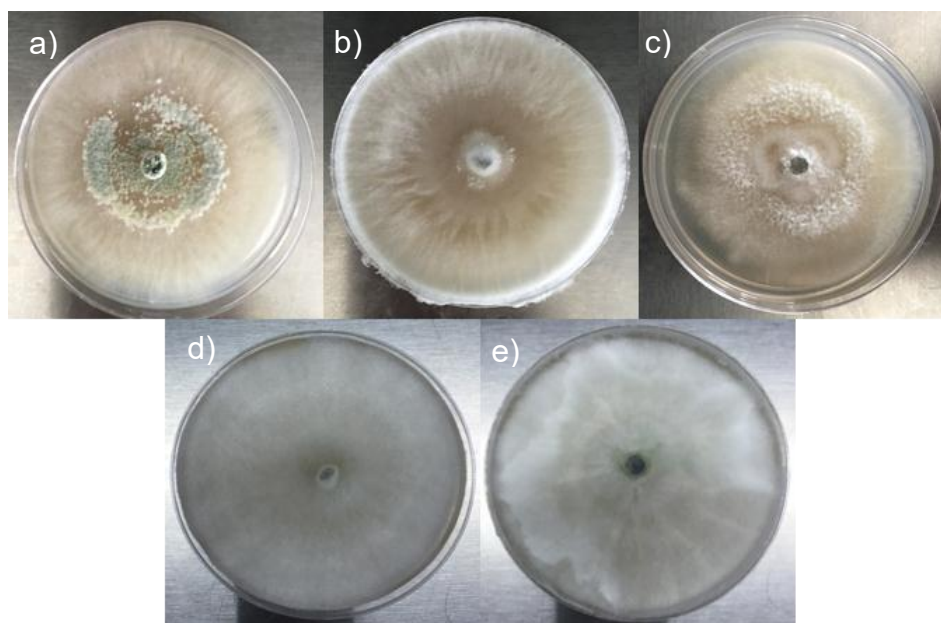


Figura 5. Cultivos de distintas cepas de *Trichoderma spp* en Medio Mínimo Vogel incubados durante 120 h a) *T. atroviride* IMI-206040, b) *H. lixii/T. harzianum*, c) *H. atroviridis/T. atroviride* d) *H. rufal/T. viride*, y e) *T. tomentosum*.

De igual manera, se utilizó MM para el mantenimiento del micelio vegetativo de los aislados de *Trichoderma spp.*, así como para la generación de inóculos y la

obtención de las conidias. La solución stock (50X) de MM está compuesta por (g/L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 150; KH_2PO_4 , 250; NH_4NO_3 , 100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5; biotina (5 mg/100 mL de etanol al 50%), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL. La solución de oligoelementos contiene (g/0.1 L): Ácido cítrico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.072; H_3BO_3 , 0.05; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05. Para la siembra de las cepas, el stock se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final 1X y se adicionó 1.5% de glucosa y agar bacteriológico (23 g/L). Los medios se esterilizaron a 121 °C (15 lb/in²) por 15 minutos^{21,61}.

7.3.- Instrumentación

Los corrimientos electroforéticos se realizaron utilizando el equipo BECKMAN COULTER P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter® (Figura 6). Se empleó un capilar de sílice fundida de 100 µm de diámetro interno, 50 cm de L_t y 40 cm de L_d . Un detector de arreglo de diodos. Las lecturs se realizaron a una λ de 201 y 280 nm. La temperatura del sistema se mantuvo constante a 25°C.



Figura 6. Equipo comercial de electroforesis capilar.

7.4.- Obtención de las conidias

Se realizaron cultivos de las 5 cepas de *Trichoderma* en Medio Mínimo Vogel incubándolos a 28°C y provocando un daño mecánico a las 96 h para estimular la conidiación. A las 120 h se llevó a cabo la cosecha de las conidias agregando 3 mL de agua destilada estéril al cultivo y frotando la superficie del micelio con una espátula estéril con la finalidad de desprender las conidias. Se colocó 0.5 mL de la suspensión de conidias en microtubos estériles de 1.5 mL, y se agregó 1 mL de agua destilada estéril a cada tubo, para finalmente agitar en Vórtex (ICA MS1 Minishaker®) durante 5 minutos para desprender las células.

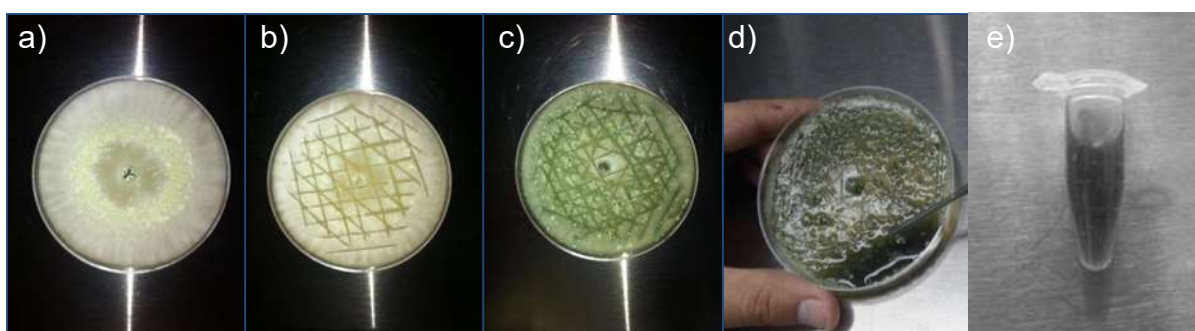


Figura 7. Obtención de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 en Medio Mínimo Vogel. **a)** Incubación durante 96 h, **b)** Daño mecánico a las 96 h de incubación **c)** Conidiación posterior al daño mecánico a las 120 h **d)** Recuperación de la suspensión de conidias y, **e)** Colocación de la suspensión en tubos Eppendorf.

Las conidias obtenidas se lavaron 3 veces con 1 mL de agua destilada estéril, centrifugando a 13,300 g durante 10 minutos. La pastilla obtenida se preparó como se indica en el apartado 7.5.

7.5.- Preparación de la muestra

Una vez obtenidas las conidias, fueron resuspendidas en el buffer de corrimiento en una relación 1:3 bajo condiciones estériles; posteriormente se colocaron 400 µL de la muestra en viales especiales para llevar a cabo el análisis electroforético. Antes del corrimiento las muestras fueron sonicadas en un sonicador Branson 1510 durante 10 minutos para eliminar las burbujas presentes en la suspensión.

7.6.- Observación microscópica y conteo.

El conteo de células se realizó utilizando una cámara de Neubauer Improved Optik Labor y un microscopio Leica DM 750 con una cámara acoplada Leica ICC 50 HD. El conteo se realizó para las muestras de las mejores condiciones electroforéticas, utilizando diluciones 1:100 de la muestra que se inyecta en el equipo. Mediante el uso de la ecuación de Poiseuille ajustada para la utilización de soluciones acuosas como BGE, se calculó el volumen teórico de muestra que se introduce al equipo en cada ensayo y al relacionar dicho valor con la cantidad de conidias contadas, pre corrimiento, en cada una de las muestras se obtuvo el valor de células totales que se introducen al equipo por inyección hidrodinámica al equipo de EC.

Para el conteo de células post corrimiento se realizaron 5 ensayos de cada una de las condiciones utilizadas. Se recuperó el contenido del vial de salida que contiene el buffer y las conidias que migraron, siguiendo con un paso de centrifugación a 13,300 g por 10 minutos. Posteriormente se retiró el sobrenadante dejando 350 μ L del buffer conteniendo las conidias. Se tomó una alícuota para realizar el conteo de las células analizadas por μ L, que finalmente permitió determinar el total de células en el vial de salida producto del proceso electroforético y que fueron detectadas.

7.7.- Acondicionamiento del capilar.

Los métodos de acondicionamiento de un capilar nuevo (Tabla 7), el lavado diario del capilar (Tabla 8) y el método de corrimiento electroforético utilizado en el presente trabajo (Tabla 9) se describen a continuación. Cada tratamiento consistió en hacer pasar individualmente, a través del capilar, las soluciones bajo las condiciones que se indican:

Tabla 7. Acondicionamiento inicial del capilar

SOLUCIÓN	Tiempo (min)	Presión (psi)
Metanol	5	20
Agua Destilada	2	20
HCl 1N	5	20
Agua Destilada	2	20
Solución Regeneradora (NaOH) 1N	10	20
Agua Destilada	2	20
Solución Buffer	5	20

Tabla 8. Lavado inicial del capilar previo a su uso

SOLUCIÓN	Tiempo (min)	Presión (psi)
Solución Regeneradora (NaOH) 1N	10	20
Agua Destilada	2	20
Solución Buffer	5	20

Tabla 9. Método utilizado para llevar a cabo un corrimiento electroforético

SOLUCIÓN	Tiempo	Presión (psi)	Voltaje (kV)
Solución Regeneradora (NaOH) 1N	2 min	20	-
Agua Destilada	2 min	20	-
Recubrimiento del Capilar (En caso de utilizarlo)	3 min	20	-
Solución Buffer	3 min	20	-
Muestra	12 seg	0.5	-
Plug de Muestra	5 seg	0.5	-
Solución Buffer	15 min	-	17

7.7.- Diseño Experimental

Para realizar el diseño experimental que permitió obtener las condiciones que arrojaron los mejores resultados se utilizó el software STATGRAPHICS Centurion XV Version 15.1.02.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1.- Efecto de distintos valores de pH utilizando buffers fisiológicos sobre la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*.

Los valores seleccionados de pH para cada tipo de buffer se muestran a continuación:

Tabla 10. Intervalos de pH utilizados para cada tipo de buffer

Solución Buffer	Valores de pH probados	Concentración
TRICINA	<ul style="list-style-type: none">• 8.7• 8.4• 8.1 (pKa)• 7.8• 7.5	10 mM
MOPS	<ul style="list-style-type: none">• 7.8• 7.5• 7.2 (pKa)• 6.9• 6.6	10 mM
HEPES	<ul style="list-style-type: none">• 8.8• 8.2• 7.6 (pKa)• 7• 6.4	10 mM

Debido a que cada buffer tiene un valor de pKa específico, así como una capacidad de amortiguamiento determinada, es que los valores de pH seleccionados para cada uno, como también el intervalo en el que se encuentran, no son iguales entre los distintos buffers.

El cambio en el valor de pH se llevó a cabo con el objetivo de que esta variación produjera, al realizar el análisis mediante EC, cambios en la ionización del capilar, así como en la protonación y desprotonación de las conidias de *Trichoderma spp*,

siendo el efecto respectivo, el cambio en la movilidad electroforética de las células y la modificación de su carga superficial, resultando en el agrupamiento y la migración conjunta de las mismas; obteniendo así, el valor de pH óptimo de cada uno de los buffers para ser utilizado en el análisis.

Las pruebas con diferentes valores de pH se realizaron únicamente para la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040 con la finalidad de encontrar los valores de pH óptimos para el análisis, y utilizarlos con el resto de las cepas. Las señales electroforéticas propias de cada buffer para cada uno de los valores de pH se muestran a continuación.

8.1.1.- Buffer Tricina

El uso de Tricina como BGE agrupó las conidias en un solo pico electroforético independientemente del valor de pH utilizado. Los picos obtenidos son simétricos, aunque no totalmente definidos y estrechos, lo que sugiere que la ionización de las células fúngicas no es uniforme. No obstante la ionización alcanzada permite que las conidias adquieran una carga que provoca que migren en conjunto (Figura 8).

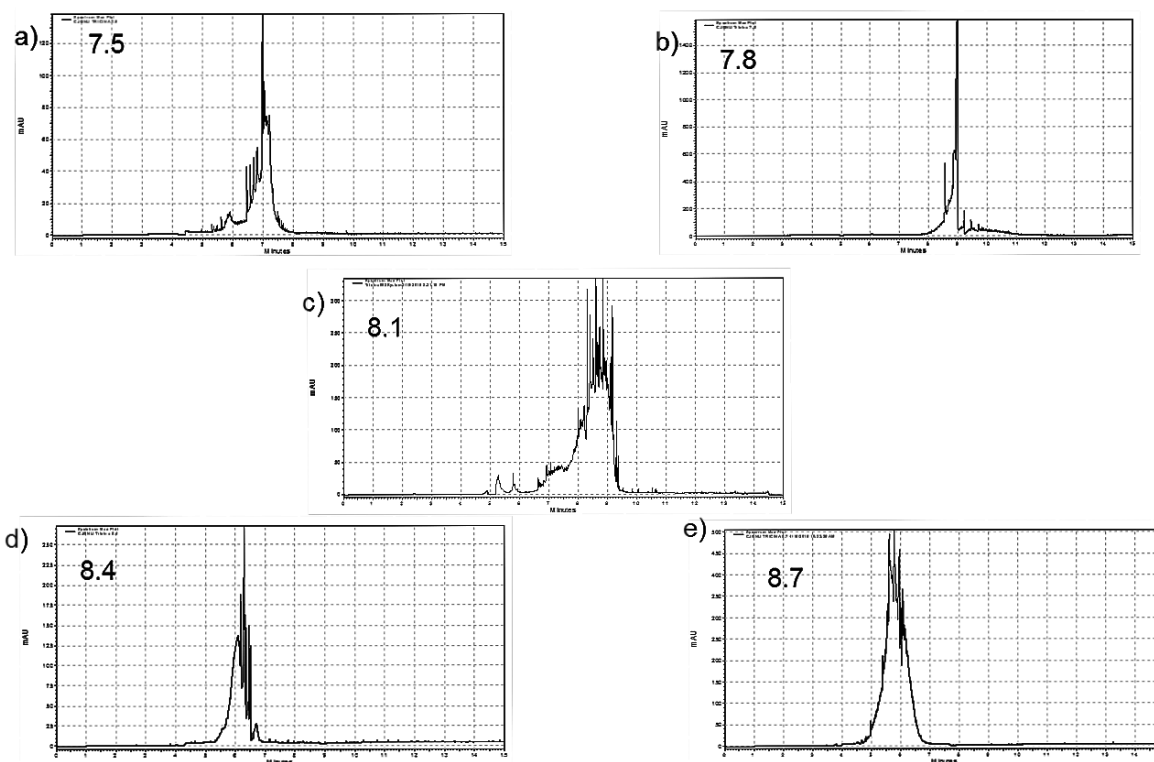


Figura 8. Señales electroforéticas de conidias de *T. atroviride* IMI-206040 utilizando Tricina 10 mM como BGE a diferentes valores de pH. a) pH 7.5; b) pH 7.8; c) pH 8.1; d) pH 8.4, y e) pH 8.7.

La movilidad electroforética sufrió cambios al utilizar diferentes valores de pH; ésto es debido a la ionización del capilar que, como ya se ha mencionado, se encuentra más ionizado en función de qué tan alcalino es el valor del pH del buffer que se utilice, provocando que el EOF aumente y por ende, también lo haga la movilidad electroforética total u observada. Este es el caso de los valores seleccionados, con tendencia a la alcalinidad y dando como resultado un capilar muy ionizado.

La condición descrita se cumple cuando los analitos migran en polaridad normal, es decir, desde el polo positivo al negativo. Debido a que las conidias cuentan con una carga neta negativa, el aumento del EOF produce un aumento en la movilidad electroforética observada y una disminución en el tiempo de migración, puesto que

la migración se lleva a cabo únicamente como resultado del EOF y éste es contrario al movimiento resultado de la relación masa/carga (movilidad electroforética), que en polaridad normal solo impulsa a los analitos positivos a pasar por el detector (Figura 9).

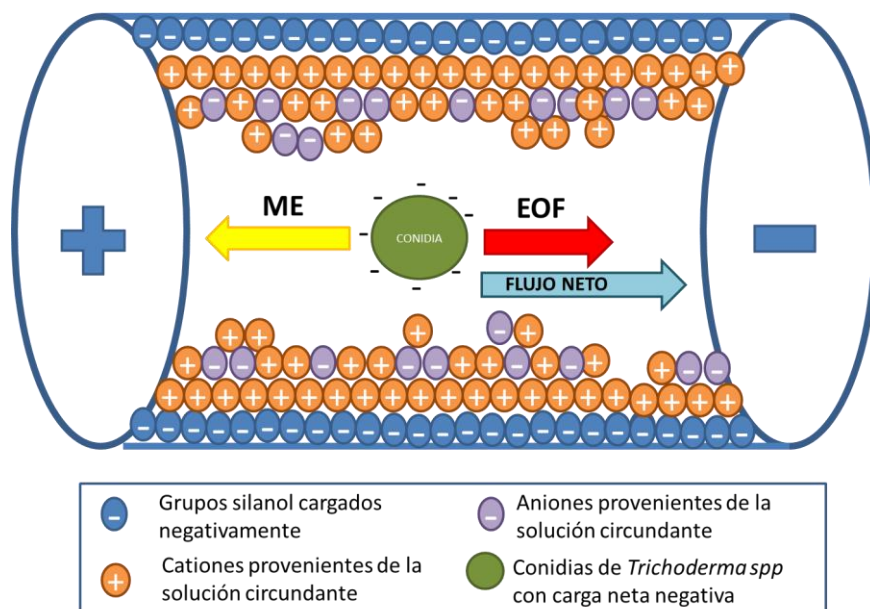


Figura 9. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de un conidia en polaridad normal y sin aditivos.

Al aumentar el valor de pH hacía un valor más alcalino, la ionización de los grupos silanol de la pared interna del capilar es mayor, lo que a su vez produce que aumente el flujo electroosmótico resultando en una mayor movilidad electroforética total de los analitos, con la respectiva disminución del tiempo de migración en relación directa al aumento del pH, Fig. 10.

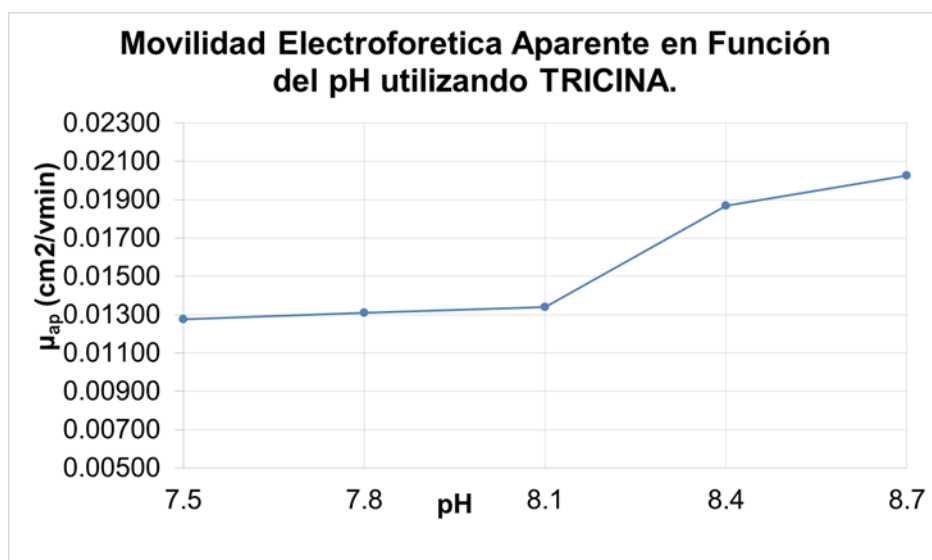


Figura 10. Movilidad electroforética aparente o total en función del pH utilizando Tricina.

Es importante mencionar el papel que juega el pH en la ionización de los grupos funcionales de la pared celular de los microorganismos, puesto que dependiendo de la naturaleza de dichos grupos y el valor de pH que se utilice, se obtendrán diferentes resultados en ensayos por ECZ. Adicionalmente, el aumento en la ionización, producto de la utilización de un pH más alcalino, conlleva a una mayor uniformidad en la carga de superficie de las conidias, y a la formación de un pico más definido, como se muestra en los valores de pH correspondiente a 8.4 y 8.7 (Figura 11).

Así pues, utilizando Tricina y a medida que el valor de pH es más alcalino, el tiempo de migración disminuyó y la movilidad electroforética aparente o total aumentó (Figuras 10 y 11).

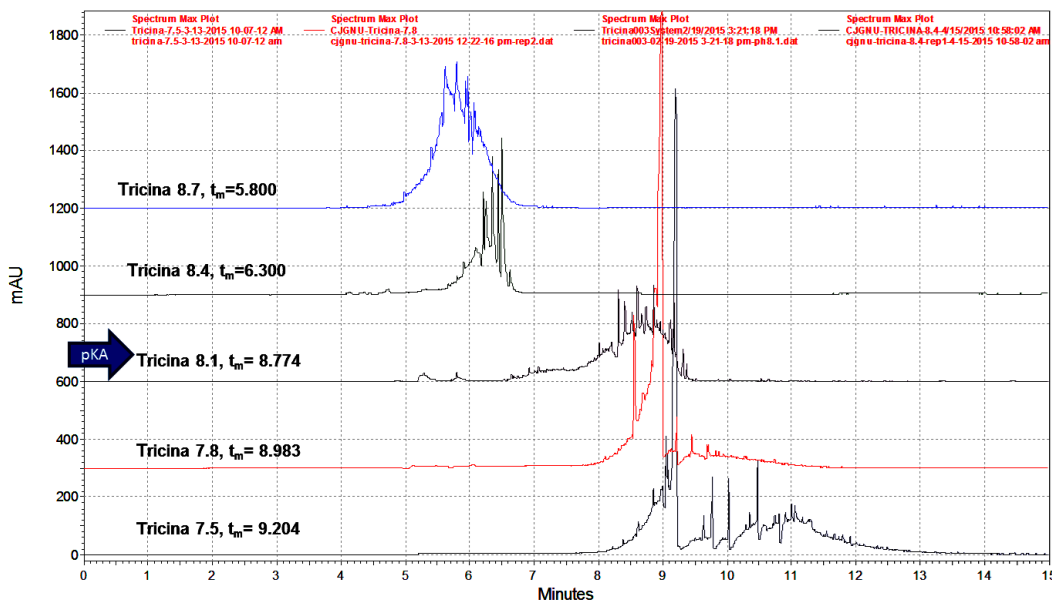


Figura 11. Efecto del pH sobre la señal de conidias de *T. atroviride* IMI-206040 utilizando Tricina como BGE.

Al aumentar el valor de pH las conidias se agrupan en un solo pico, lo que sugiere que la ionización de la pared celular de las conidias es más homogénea, sin embargo, cuando se utilizan valores de pH por debajo del pKa, las señales electroforéticas son más estrechas aunque también son menos simétricas (Figura 11). Finalmente se seleccionó el valor de pH correspondiente a 7.8, puesto que a pesar de que el pico no es completamente simétrico y definido, dicha condición arrojó un pico estrecho y reproducible.

8.1.2.-Buffer MOPS

Al utilizar MOPS como BGE, se observó que para un pH de 6.9, las células fúngicas formaron dos grupos como consecuencia de una ionización diferencial, que resultó en la formación de una señal con dos picos electroforéticos (Figura 12b). Es decir, para dicho valor, no fue posible agrupar la totalidad de las conidias

en un pico representativo. Sin embargo, todas las demás señales muestran el agrupamiento de las conidias en picos estrechos y en definidos (Figura.12).

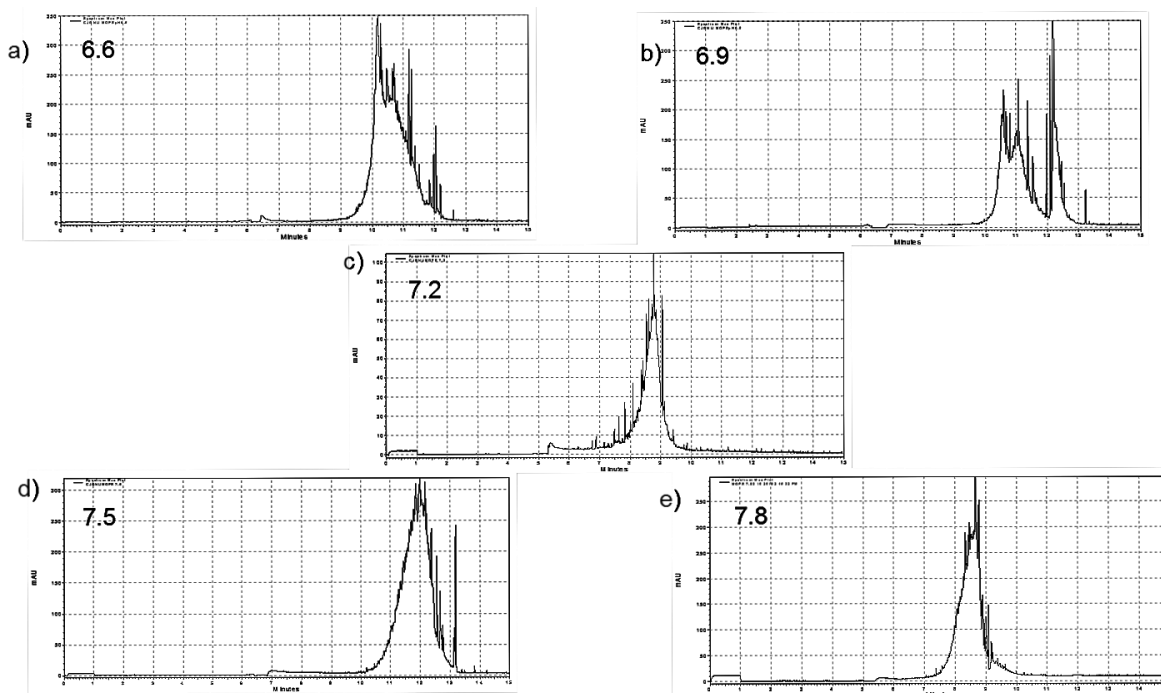


Figura 12. Señales electroforéticas de conidias de *T. atroviride* IMI-206040 utilizando MOPS como BGE a diferentes valores de pH. a) pH 6.6; b) pH 6.9; c) pH 7.2; d) pH 7.5, y e) pH 7.8.

En la figura 13, se puede apreciar que a medida que el pH es más alcalino la señal se define y se vuelve más estrecha, obteniendo los mejores resultados con valores de pH por encima del pKa del buffer seleccionado.

Bajo estas condiciones se observa un comportamiento diferente al presentado al utilizar el buffer de Tricina, ya que el valor de pH correspondiente al del pKa no sigue la tendencia esperada, en la que el aumento del valor de pH produce una disminución en el tiempo de migración y un aumento en la movilidad electroforética total. Es posible que al utilizar un pH de 7.2, que es igual a su pKa,

se lleve a cabo una mayor ionización de grupos funcionales de superficie que favorezcan el aumento de la movilidad electroforética total.

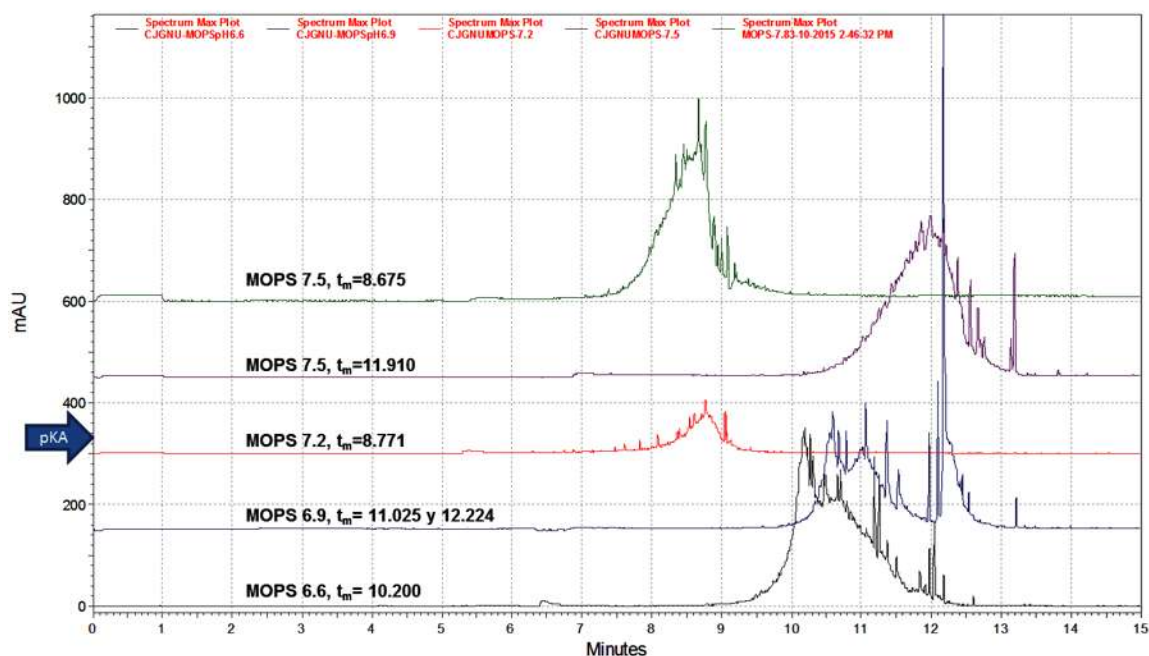


Figura 13. Efecto del pH sobre la señal de conidias de *T. atroviride* IMI-206040 utilizando MOPS como BGE.

8.1.3.- Buffer HEPES

Al igual que con los otros dos buffers seleccionados, al utilizar HEPES fue posible agrupar a las conidias de *T. atroviride* en un solo pico electroforético propio de las células fúngicas analizadas. Las señales obtenidas bajo estas condiciones fueron estrechas y simétricas; con un grado de definición aceptable tomando en cuenta que no se utilizó ningún tipo de aditivo en estas pruebas. Si bien es cierto que el valor de 6.4 (Figura 14a) logró la agrupación de las conidias, es notoria la dispersión de la señal en la línea base, producto de la ionización heterogénea de las conidias. Es de resaltar la señal que se obtuvo utilizando un valor de pH de 7.0 (Figura 14b), ya que la agrupación de las conidias en un solo pico se muestra bien definida, simétrica y estrecha, constituyendo el mejor valor para realizar el análisis mediante EC utilizando este buffer. Por otro lado, las señales indican un

comportamiento similar entre los valores evaluados a partir del pH de 7.0; no obstante, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar los valores de pH de 7 y 7.6 (Figura 14b y 14c).

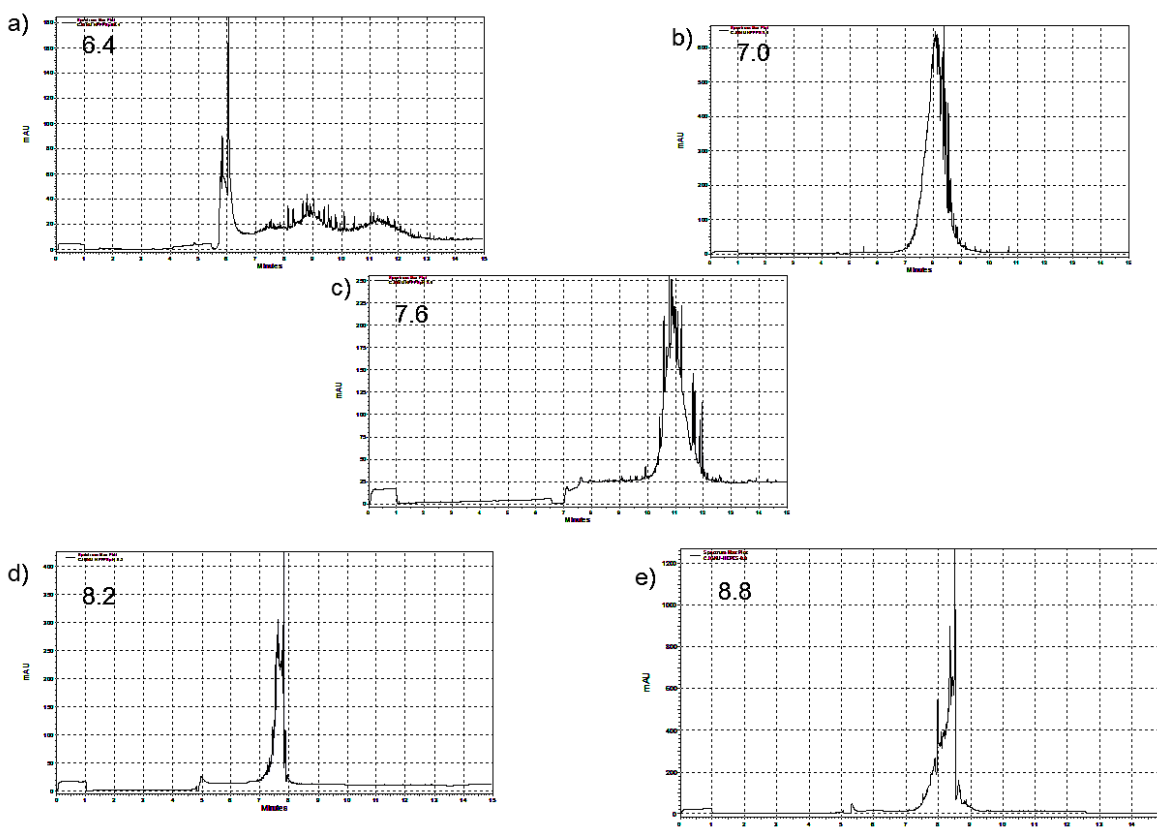


Figura 14. Señales electroforéticas de conidias de *T. atroviride* IMI-206040 utilizando HEPES como BGE a diferentes valores de pH. a) pH 6.4; b) 7.0; c) pH 7.6; d) pH 8.2, y e) pH 8.8.

Con lo que respecta a los tiempos de migración, se puede observar que a un pH de 6.4, valor correspondiente al punto inferior del intervalo de la máxima capacidad de amortiguamiento, no se presenta el comportamiento esperado, en el que al aumentar el valor de pH el tiempo de migración disminuya, además de que la señal se puede considerar pequeña en relación a las otras, lo cual puede indicar que bajo el pH mencionado las conidias no se ionizaron homogéneamente, no se agrupan y por lo tanto son detectadas de forma individual. Es probable que la

señal que se obtuvo con el valor más bajo de pH, produzca una mayor ionización de grupos funcionales de superficie que favorezcan la disminución del tiempo de migración. Por otro lado, el resto de las señales presentan tiempos de migración menores a medida que el pH aumenta (Figura 15).

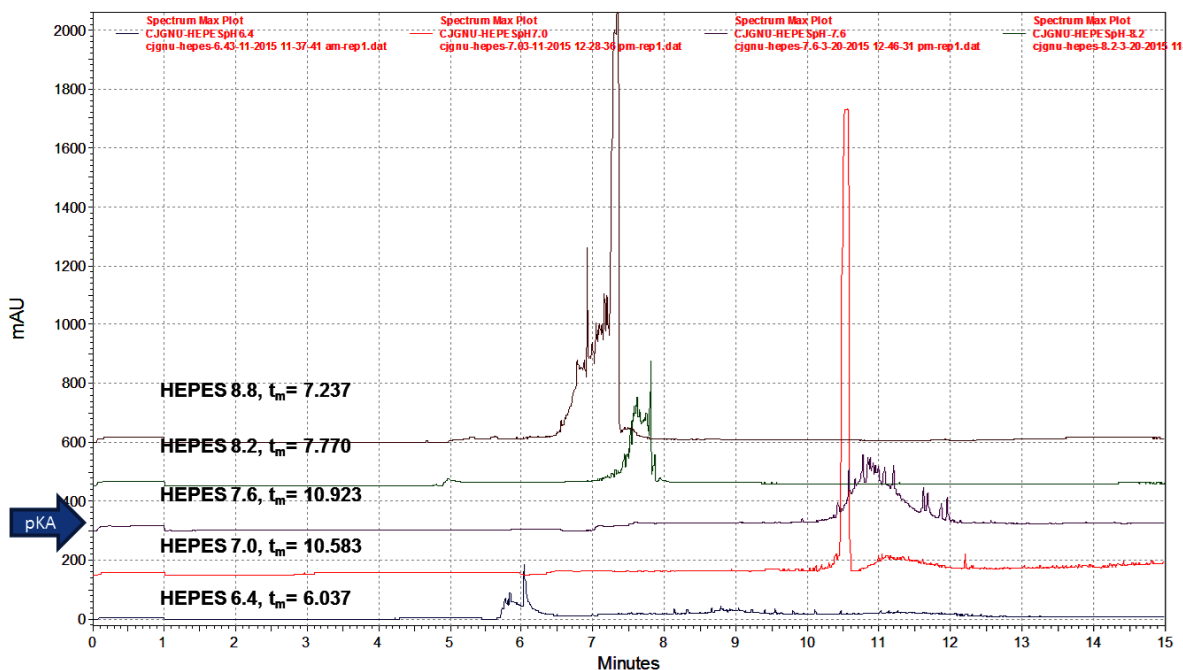


Figura 15. Efecto del pH sobre la señal de conidias de *T. atroviride* IMI-206040 utilizando HEPES como BGE.

8.1.4.- Valores de pH seleccionados para cada tipo de buffer.

Los valores de pH que arrojaron las mejores señales muestran el agrupamiento de las células fúngicas en un pico electroforético estrecho, simétrico y definido de cada uno de los buffers utilizados en el estudio (Figura 16).

Debido a que la separación tiene lugar en el BGE, diferentes condiciones pueden provocar variaciones en la movilidad electroforética. La interacción entre el BGE y los analitos pueden cambiar su carga efectiva y por lo tanto su velocidad de

migración. Además, la formación de pares iónicos también puede ocurrir entre las moléculas del buffer y los analitos afectando la separación⁶².

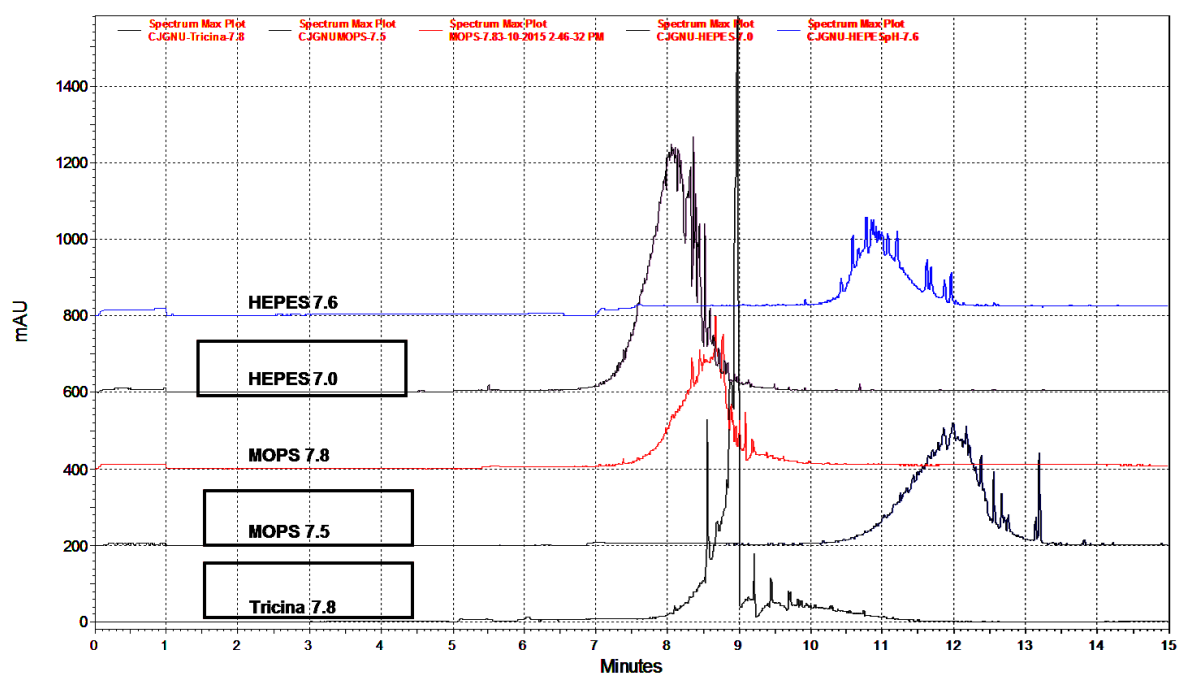


Figura 16. Señales electroforéticas de conidias de *T. atroviride* IMI-206040 de cada tipo de buffer y sus respectivos valores de pH seleccionados.

Los electrolitos débiles usados como buffers en la naturaleza y en la tecnología cumplen el rol fundamental de evitar cambios abruptos de pH cuando un ácido/base fuerte es añadido a una solución acuosa. Sin embargo, no solo establecen el pH, sino que dirigen efectos de iones específicos cuando electrolitos fuertes se añaden al sistema. A partir de datos experimentales realizados en fracciones biológicas cargadas se desprende que diferentes buffers, al mismo pH nominal, pueden adsorberse específicamente a la superficie cargada. La adsorción específica del buffer modifica propiedades moleculares y macroscópicas, entre las que se tienen la movilidad electroforética, y por lo tanto, las cargas de superficie efectivas son particularmente significativas⁶³.

De hecho, hay efectos de amortiguación específicos, incluso en ausencia de cualquier reacción química. Estos se deben al hecho de que, al igual que los electrolitos fuertes, los electrolitos débiles interactúan con interfaces polares cargadas y en particular con los de naturaleza biológica. Esas interacciones se producen en sitios cargados, así como partes no cargadas de biomacromoléculas como resultado de una interacción delicada entre fuerzas electrostáticas, de dispersión, y de hidratación⁶³.

Las interacciones de tipo electrostático y las fuerzas hidrofóbicas que dependen en último término de las características fisicoquímicas de la superficie celular, juegan un importante papel en los fenómenos de adhesión entre células y también en sus interacciones con diversos substratos inertes. Existen moléculas como las hidrofobinas que parecen desempeñar una función importante en dicho proceso⁶⁴, y que además podrían interactuar de cierta forma con buffers a un mismo valor de pH nominal, con base en la estructura química de los mismos. Es decir que es probable que los grupos ionizables de la pared celular fúngica como, por ejemplo, los ácidos carboxílicos, interactúen con los grupos hidroxilo, carbonilo y amina de la Tricina, o con los grupos correspondientes al ácido sulfónico o al anillo de piperazina de HEPES, de manera diferencial, siendo un mecanismo que pudiese influir en las propiedades electroforéticas de las células.

Así pues, además de que la movilidad electroforética de las conidias se modifica por la utilización de distintos valores de pH, también existe variabilidad en la movilidad de las células al utilizar valores muy cercanos de pH pero con diferentes sistemas buffer. Esto surge como consecuencia de procesos de adsorción de las moléculas del electrolito a los componentes de la pared celular fúngica.

Aunado a lo anterior, el agrupamiento de las células, como se puede observar en la figura 16, no obedece el mismo comportamiento a pesar de que el valor de pH para los 3 sistemas buffer es similar, lo cual probablemente se debe a procesos de adsorción que ocurren entre las moléculas del buffer y las de la pared celular, por medio de interacciones fisicoquímicas que se encuentran determinadas por la naturaleza del tipo de buffer y que resulta en picos con formas diferentes, producto de procesos de agrupación que involucran no solo a las entidades biológicas protonadas o desprotonadas, sino también modificadas por la adsorción del buffer a los elementos de la pared celular de las conidias.

La selección de los valores de pH que produjeron los mejores picos electroforéticos permitió la utilización de los mismos en pruebas que involucraron diversos tipos de aditivos y recubrimientos del capilar, con la finalidad de mejorar las señales obtenidas al utilizar únicamente buffer en el análisis electroforético.

8.2.- Efecto de un recubrimiento dinámico del capilar y la utilización de surfactantes sobre la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*.

Una vez que se probaron los distintos buffers con valores de pH que cubrieran su máxima capacidad de amortiguamiento, se seleccionó para cada uno el valor que produjera la señal más estrecha, simétrica y definida, para posteriormente, utilizar estas condiciones y evaluar el efecto del uso de aditivos en la forma de las señales y en la μ_{ap} de conidias de *Trichoderma spp*. Las pruebas se realizaron buscando aprovechar las propiedades de distintos tipos de surfactantes y recubrimientos del capilar (Tabla 11 y 12), con el objetivo de mejorar las señales ya obtenidas. Los aditivos se utilizaron de tres maneras distintas: 1) Llevando a cabo un recubrimiento dinámico del capilar, 2) Agregando el aditivo directamente a la muestra, o 3) Involucrando simultáneamente el recubrimiento dinámico y la adición del aditivo en la muestra. En el caso del recubrimiento, éste se realizó

como un paso de enjuague con uno de los dos tipos diferentes de aditivos, o bien, adicionándolos directamente al BGE.

Tabla 11. Aditivos utilizados en ensayos de recubrimiento de capilar^{43,47}.

	Concentración	Método de empleo	Función
PEO (Óxido de polietileno)	0.125%	Paso de enjuague	Agente de recubrimiento dinámico que previene la adsorción de las células al capilar y provoca la disminución del EOF (la migración se lleva a cabo como consecuencia de la relación masa/carga)
	0.0125%	Adicionado en el buffer de corrimiento.	
CTAB (Bromuro de hexadecil trimetilamonio)	1%	Paso de enjuague	Recubrimiento dinámico del capilar que permite invertir el EOF y lograr una preconcentración “on-line” de los microorganismos
	15 mM	Adicionado en el buffer de corrimiento	

Por otro lado, los surfactantes que se adicionaron directamente a la muestra fueron el CTAB y el surfactante no iónico Tritón X-100 (Tabla 12)^{32,47,57}.

Tabla 12. Aditivos utilizados en ensayos adicionando surfactantes a la muestra^{32,47,57}.

	Concentración	Método de empleo	Función
CTAB (Bromuro de hexadecil trimetilamonio)	15 mM	Adicionado en la muestra	Agrupación de los microorganismos. Modificación de la doble capa eléctrica alrededor de células originalmente negativas, modificando su movilidad electroforética total.
Tritón X-100	1%	Adicionado en la muestra	Disminución de las interacciones iónicas de las células fúngicas con la pared interna del capilar.

Cada uno de los aditivos utilizados tiene una función determinada y se incorpora al sistema de una forma particular (Tablas 11 y 12).

8.2.1.-Diseño experimental

Considerando que se quería evaluar el efecto de un recubrimiento dinámico y de la adición de surfactantes a la muestra, tanto de manera particular como en conjunto, fue necesario llevar a cabo un diseño experimental; el cual no solo consideró el efecto que tendría la utilización individual de cada uno de los aditivos, sino que también tomaría en cuenta cómo influirían al utilizarlos de manera simultánea, en la variable de respuesta. El diseño experimental involucró el valor de pH adecuado para cada buffer seleccionado, el recubrimiento o no del capilar, así como la adición o no de surfactantes a la muestra, para en conjunto determinar las condiciones que produjeran las mejores señales electroforéticas, en términos de lo estrecho, definido, simétrico y representativo de la señal.

Tabla 13. Factores y niveles experimentales seleccionados para evaluar su efecto en la señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma spp.*

Tipo de Buffer	Recubrimiento del Capilar (Enjuague)	Aditivo en muestra	Aditivo en BGE
Tricina 7.8	CTAB	CTAB	CTAB
HEPES 7.0	NO	NO	NO
MOPS 7.5	PEO	TRITÓN X-100	PEO

A).-Diseño factorial 3⁴.

En primera instancia, el determinar las condiciones apropiadas que permitieran obtener las mejores señales, significó el desarrollo de un diseño experimental factorial 3⁴, debido a que se contaba con cuatro factores con tres niveles distintos; requiriendo establecer la influencia de cada uno de ellos en la movilidad electroforética de las conidias, y por consecuencia, en la señal electroforética. Lo anterior implicaba realizar el total de tratamientos resultantes de la combinación de los factores y niveles seleccionados, con la evidente desventaja de la utilización de una mayor cantidad de reactivos, así como de tiempo invertido.

Tomando en cuenta que el total de los ensayos debe realizarse por triplicado, el obtener las condiciones apropiadas mediante el diseño experimental 3⁴ (Tabla 14), para llevar a cabo el análisis por EC, significaba un total de 243 pruebas. Por lo anterior, se propuso otro tipo de diseño, mismo que se explica en el siguiente apartado.

Tabla 14. Diseño factorial para la determinación de las mejores condiciones electroforéticas de conidias de *Trichoderma spp.*

Tipo de Buffer	Recubrimiento del capilar. (Enjuague)	Aditivo en la muestra	Aditivo en el BGE	
<ul style="list-style-type: none"> • TRICINA 7.8 • HEPES 7.0 • MOPS 	CTAB 1%	CTAB 1%	CTAB 1%	
			NO	
			PEO 0.0125%	
		NO	CTAB 1%	CTAB 1%
				NO
				PEO 0.0125%
		Tritón x-100	CTAB 1%	CTAB 1%
				NO
				PEO 0.0125%
	SIN RECUBRIMIENTO	CTAB 1%	CTAB 1%	CTAB 1%
				NO
				PEO 0.0125%
		NO	CTAB 1%	CTAB 1%
				NO
				PEO 0.0125%
		Tritón x-100	CTAB 1%	CTAB 1%
				NO
				PEO 0.0125%
	PEO 0.0125%	CTAB 1%	CTAB 1%	CTAB 1%
				NO
				PEO 0.0125%
		NO	CTAB 1%	CTAB 1%
				NO
				PEO 0.0125%
Tritón x-100		CTAB 1%	CTAB 1%	
			NO	
			PEO 0.0125%	

B).-Diseño de Box-Behnken.

Se optó por la utilización de un diseño Box-Behnken, con la finalidad de estudiar el efecto que cada uno de los factores seleccionados tendría sobre el pico electroforético, así como la repercusión que tendrían las interacciones entre los mismos sobre la variable de respuesta (el pico electroforético). Lo anterior se debió a que este tipo de diseños se aplican comúnmente cuando se tienen tres o más factores, siendo éste el caso del presente estudio, y a pesar de ser un diseño relativamente robusto, tiene un número menor de corridas en relación al diseño factorial (Tabla 15).

Tabla 15. Base del diseño Box-Behnken	
Número de factores experimentales	4
Número de variables de respuesta	1 (Pico Electroforético)
Número de réplicas	3
Número total de corridas	81
Aleatorio	Sí

Mediante el software STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.1.02 se llevó a cabo el diseño que arrojó las condiciones que debieron probarse (Tabla 16), siendo éstas un total de 27 ensayos por triplicado, mismas que permitieron encontrar los mejores tratamientos de análisis; los cuales se analizan más adelante. En la tabla 16 se aprecian el total de ensayos mínimos necesarios para encontrar la interacción entre los factores que produciría los mejores señales, y también se resalta cuáles fueron las condiciones que influyeron de mejor manera en la variable de salida, es decir, el pico electroforético.

Tabla 16. Diseño Box-Behnken para la determinación de las mejores condiciones electroforéticas de conidias de *Trichoderma spp.*, y variable de salida para cada ensayo.

TIPO DE BUFFER	RECUBRIMIENTO CAPILAR	ADITIVO MUESTRA	ADITIVO BGE	Variable de Salida
MOPS 7.5	NO	TRITÓN X-100	NO	70
HEPES 7.0	PEO	CTAB	NO	65
HEPES 7.0	PEO	NO	NO	90
TRICINA 7.8	CTAB	NO	NO	70
TRICINA 7.8	NO	NO	PEO	65
HEPES 7.0	NO	NO	NO	85
HEPES 7.0	NO	TRITÓN X-100	PEO	75
HEPES 7.0	CTAB	NO	CTAB	65
MOPS 7.5	NO	NO	CTAB	65
HEPES 7.0	NO	CTAB	PEO	70
MOPS 7.5	CTAB	NO	NO	70
HEPES 7.0	NO	NO	NO	85
TRICINA 7.8	NO	NO	CTAB	65
HEPES 7.0	PEO	NO	CTAB	20
HEPES 7.0	CTAB	NO	PEO	20
HEPES 7.0	NO	TRITÓN X-100	CTAB	60
TRICINA 7.8	NO	CTAB	NO	90
HEPES 7.0	CTAB	CTAB	NO	75
MOPS 7.5	NO	CTAB	NO	75
HEPES 7.0	NO	CTAB	CTAB	97
TRICINA 7.8	CTAB	TRITÓN X-100	NO	90
HEPES 7.0	NO	NO	NO	85
TRICINA 7.8	NO	TRITÓN X-100	NO	75
HEPES 7.0	PEO	NO	PEO	65
HEPES 7.0	PEO	TRITÓN X-100	NO	85
MOPS 7.5	PEO	NO	NO	85
MOPS 7.5	NO	NO	PEO	65

Las condiciones sombreadas indican aquellas que arrojaron las mejores señales electroforéticas en ensayos con *Trichoderma atroviride* IMI-206040.

Es importante mencionar que el valor que se le asignó a la variable de respuesta, se definió en función de qué tan estrecho, simétrico, definido, y representativo resultara el pico, y se estableció en una escala cualitativa del 0 al 100 que incluye

todos los criterios. Por otro lado, no fue posible utilizar otras variables de salida como por ejemplo, el tiempo de migración o el área del pico obtenido, puesto que estos factores no toman en cuenta el agrupamiento de las conidias en un solo pico o la definición que tenga la señal.

A partir de las condiciones propuestas, y con base al valor que obtuvo el pico electroforético producto de cada ensayo, se seleccionaron los 5 tratamientos con el valor más alto de la variable de salida, y que produjeron las mejores señales.

Además de lo anterior, y debido a que es un diseño aleatorio, éste propuso combinaciones de los factores experimentales que teóricamente involucrarían efectos contrarios, y que por ende, no produjeron una señal adecuada. Ejemplos de esto último, son los ensayos consistentes en un recubrimiento con PEO y la adición de CTAB al BGE, y viceversa. La intención de realizar un enjuague con PEO es suprimir el EOF, mientras que al recubrir con CTAB se busca invertirlo. Entonces pues; debido a que el enjuague y la adición al BGE de alguno de estos agentes, tiene la intención de recubrir el capilar con efectos distintos, al realizar un recubrimiento con ambos se provoca que la función de ninguno de ellos se lleve a cabo adecuadamente y la señal sea deficiente.

8.2.2.- Condiciones seleccionadas utilizando aditivos

Se seleccionaron las mejores condiciones utilizando conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040, producto de las pruebas con distintos valores de pH y del diseño experimental (Tabla 17), mismas que produjeron las mejores señales electroforéticas (Figura 17)

Tabla 17. Condiciones electroforéticas seleccionadas para el análisis de conidias de *T. atroviride* IMI-206040.

- HEPES 7.0, y polaridad normal.
- HEPES 7.0, PEO 0.125% como recubrimiento (paso de enjuague), y polaridad inversa
- HEPES 7.0, CTAB 15mM como recubrimiento (adicionado en el BGE), CTBA 15mM adicionado en muestra, y polaridad inversa
- Tricina 7.8, CTAB15mM adicionado en muestra, y polaridad inversa.
- Tricina 7.8, CTAB 1% como recubrimiento (paso de enjuague), Tritón X-100 1% adicionado en muestra, y polaridad inversa.

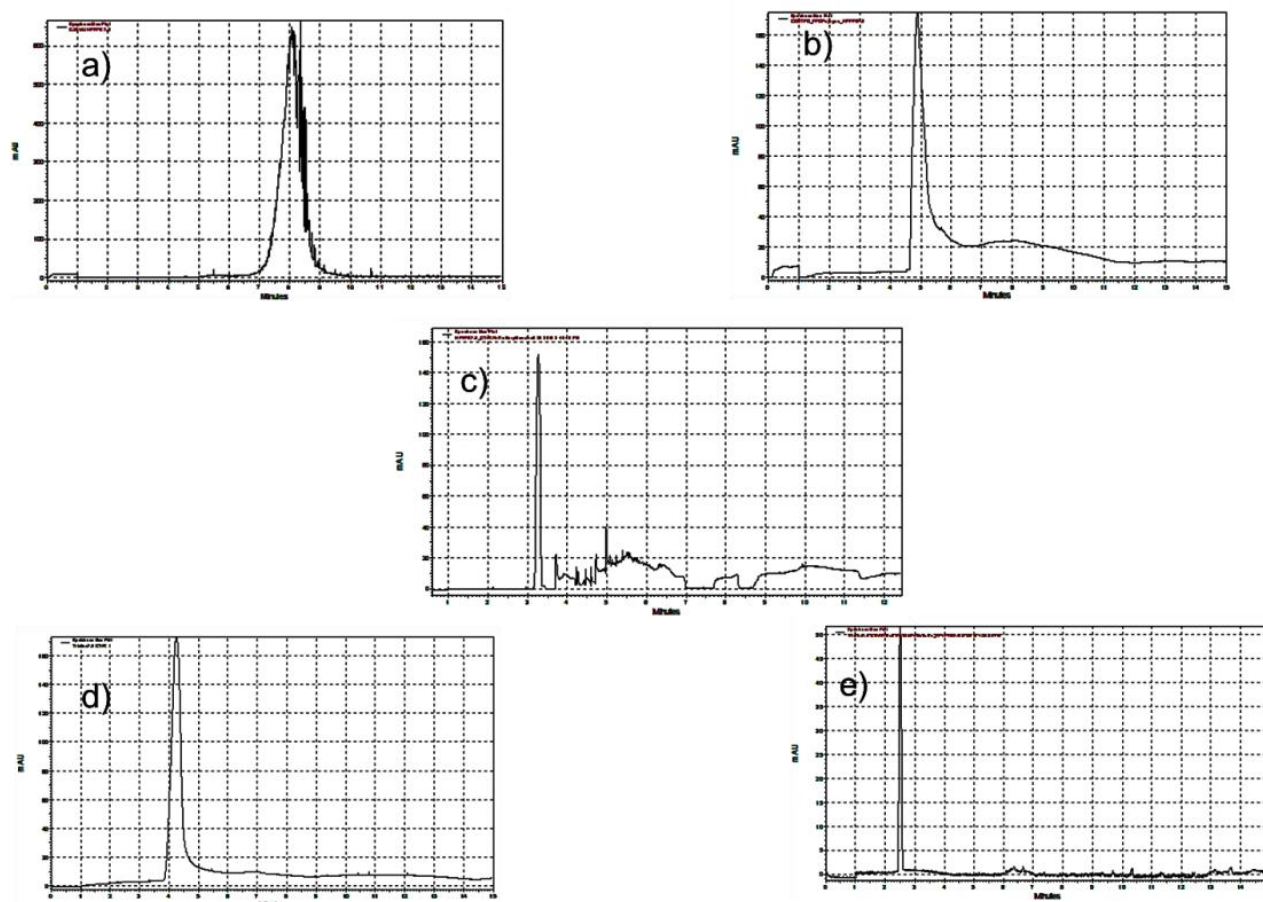


Figura 17. Señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 empleando las mejores condiciones obtenidas. **a)** HEPES 7.0, polaridad normal. **b)** HEPES 7.0, PEO 0.125% como recubrimiento (paso de enjuague), polaridad inversa. **c)** HEPES 7.0, CTAB 15mM como recubrimiento (adicionado en el BGE), CTBA 15mM adicionado en muestra, polaridad inversa

d) Tricina 7.8, CTAB15mM adicionado en muestra, polaridad inversa. e) Tricina 7.8, CTAB 1% como recubrimiento (paso de enjuague), Tritón X-100 1% adicionado en muestra, polaridad inversa.

A). Ensayo de recubrimiento dinámico con PEO 0.125% y polaridad inversa.

El recubrimiento dinámico con PEO, mediante un paso de enjuague, HEPES 7.0 como BGE y en polaridad inversa, dio como resultado una señal que agrupó las conidias de la cepa de referencia (figura 18), con un pico más definido que cuando éste no fue utilizado.

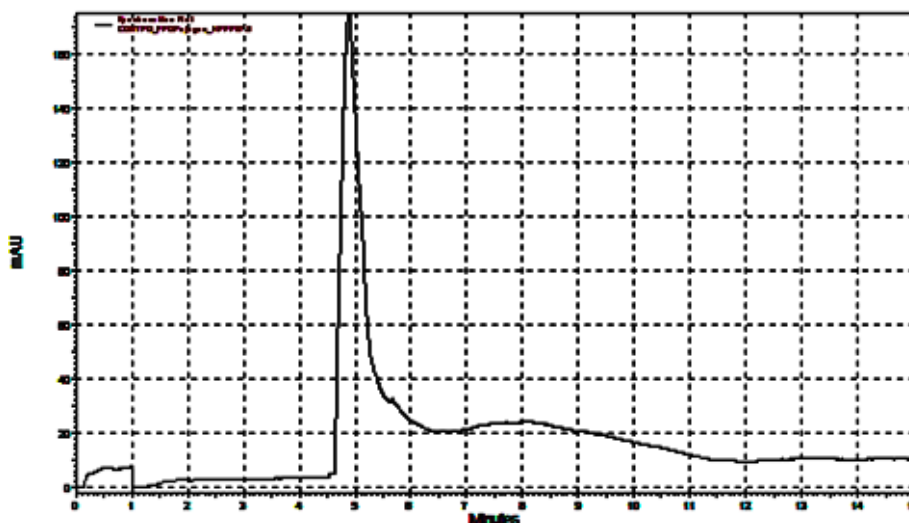


Figura 18. Señal electroforética de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040. HEPES 7.0, PEO 0.125% como recubrimiento (paso de enjuague), polaridad inversa.

Además de esta condición, se corroboró este comportamiento utilizando algunos otros valores de pH que anteriormente habían arrojado señales aceptables sin ningún aditivo. La señal obtenida mediante el diseño experimental continuó siendo la mejor, y a pesar de la utilización de otros buffers y valores de pH, las señales permanecieron bajo la misma tendencia. Los picos obtenidos con la utilización de PEO fueron comparados con los que no incluían el recubrimiento en el sistema (Figura 19). Bajo esta comparación, es evidente que para todas las condiciones, el

PEO hace que los picos se encuentren más definidos, lo que indica que la migración de las conidias es más uniforme, como consecuencia del movimiento dependiente únicamente de la relación masa/carga.

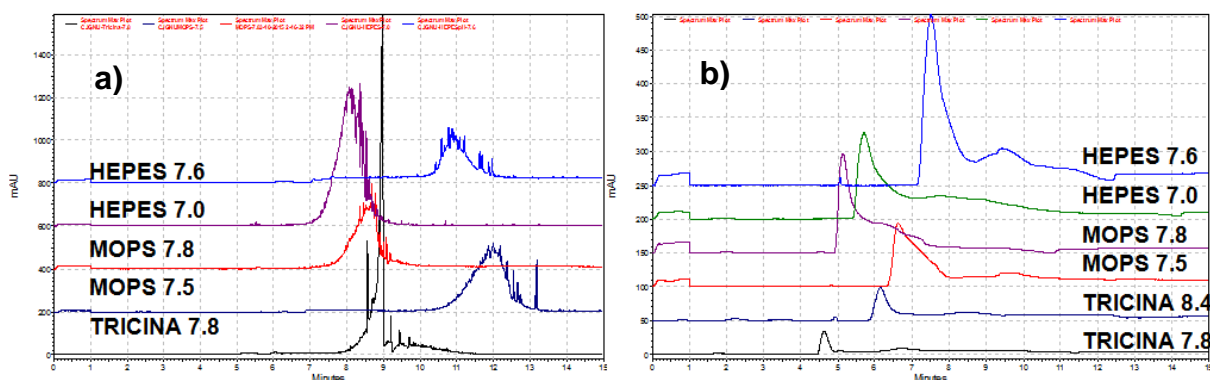


Figura 19. Efecto de la utilización de PEO sobre las señales de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 con distintos BGE. a) Sin recubrimiento del capilar, polaridad normal. b) Con recubrimiento del capilar con PEO 0.125%, polaridad inversa.

El fundamento teórico de la utilización del PEO consiste en una reducción considerable del EOF como consecuencia de la disminución de la doble capa eléctrica, que produce que los analitos migren prácticamente como consecuencia de la relación masa/carga (movilidad electroforética), y así las células se agrupan en picos estrechos.

Es muy importante mencionar que el haber realizado los ensayos con PEO permitió confirmar, que en efecto, las conidias presentan una carga neta negativa, puesto que si se adiciona el polímero al sistema, como ya se mencionó, el EOF disminuye y éstas solo migran de acuerdo a la movilidad electroforética. Es decir que bajo esta premisa, si se trabaja en polaridad normal, en la que los analitos se desplazan desde el polo positivo al negativo, solo migrarán aquellos con carga positiva; y si por otro lado, se utiliza polaridad inversa, en la que las especies migran desde el polo negativo hacia el positivo, solo serán detectadas aquellas

que presenten carga neta negativa. Las pruebas que se realizaron utilizando PEO en polaridad normal no arrojaron señal alguna, indicando que la carga de las conidias no les permitió ser detectadas bajo estas condiciones, sin embargo al utilizar polaridad inversa se obtuvieron señales más definidas y estrechas que al utilizar solo buffer (Figura 20).

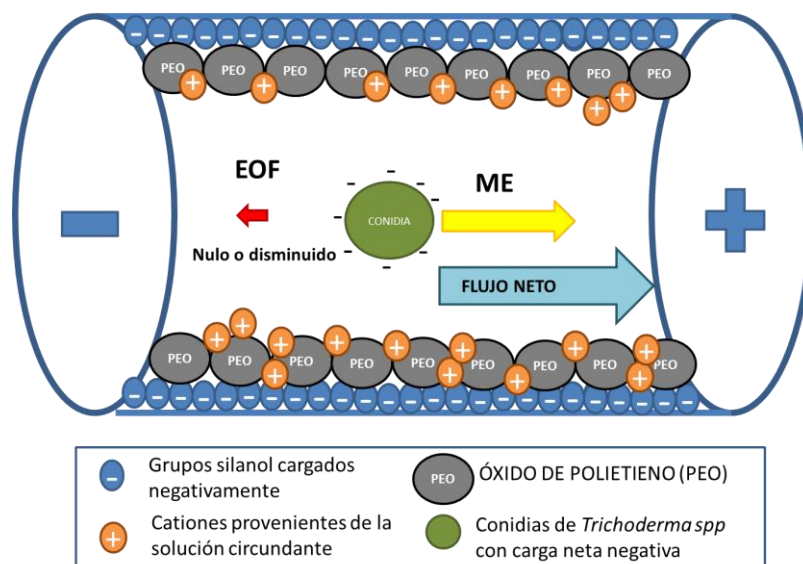


Figura 20. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de una conidia, en polaridad inversa y con PEO como enjuague.

B).- Efecto de la adición de CTAB tanto al BGE como a la muestra en polaridad inversa.

El recubrimiento dinámico del capilar mediante la utilización de CTBA 15 mM con HEPES 7.0 como BGE, CTAB 15 mM en la muestra y polaridad inversa, provocó la inversión del EOF. Al utilizar el surfactante catiónico CTAB, los grupos silanol de la pared del capilar son recubiertos, lo que genera una superficie cargada positivamente y la formación de la doble capa eléctrica a partir de los aniones de la solución circundante, y no de los cationes, como es normal cuando no se adicionan surfactantes al sistema. Esto provoca que el EOF se lleve a cabo desde el polo negativo al positivo utilizando polaridad inversa (figura 21). Además de lo

anterior, el efecto de adicionar CTAB a la muestra en una concentración por encima de su concentración micelar crítica, provoca la formación de micelas, que mediante la interacción diferencial de éstas con las conidias modifica la carga neta de las células fúngicas y su agrupación en agregados conidia-surfactante. El resultado neto de la condición descrita es la inversión del EOF y la formación de micelas que agrupan las conidias con base en su afinidad con las mismas (figura 21).

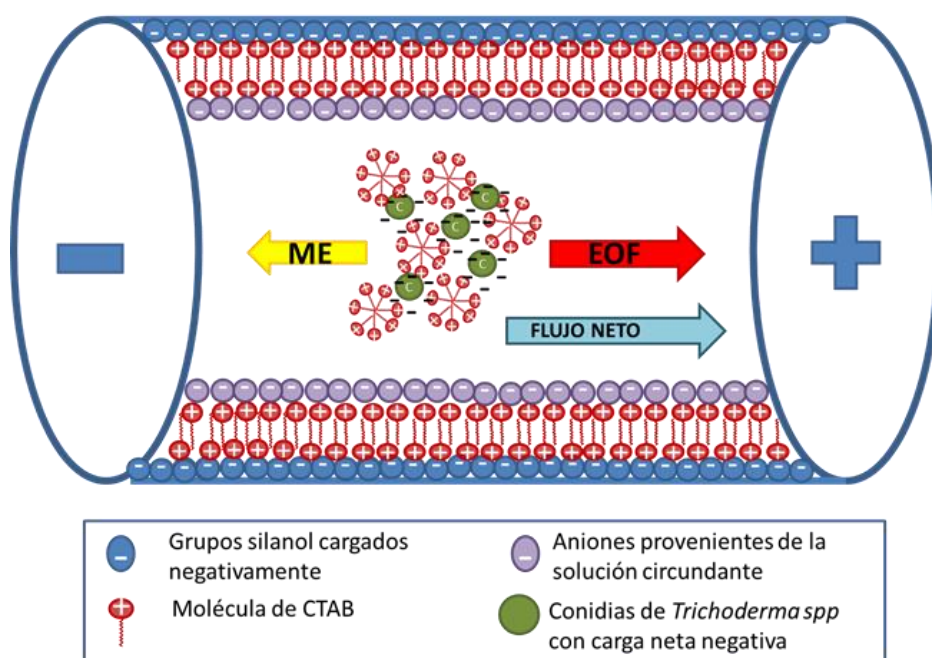


Figura 21. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de conidias, en polaridad inversa, y con CTAB 15mM como recubrimiento y adicionado a la muestra.

Las conidias se distribuyen entre la fase micelar y la fase acuosa del buffer de corrimiento en diferente extensión. Mientras la interacción de las células con la micela sea mayor, mayor será su tiempo de migración, puesto que la micela migra solo como consecuencia del EOF; en cambio, cuando no están en contacto con la micela, son transportadas por el EOF y la relación masa/carga. Es decir, una micelia individual migra debido al EOF, una conidia como consecuencia del EOF y

de la movilidad electroforética, y los agregados de surfactantes con conidias en función de la carga prioritaria.

Ésta condición propició una señal que agrupo las conidias casi en su totalidad, estrecha, definida y simétrica. Sin embargo, la línea base presento ruido, lo que podría explicarse por una distribución no uniforme de las conidias entre la fase micelar y la acuosa, que resultó en que algunas de ellas se agruparan y migraran con las micelas, y otras individualmente como consecuencia del EOF y la relación masa/carga (figura 22)

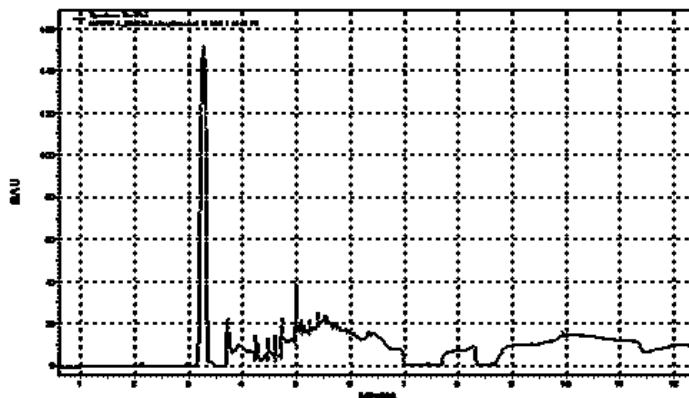


Figura 22. Señal electroforética de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040. HEPES 7.0, CTAB 15mM como recubrimiento (adicionado en el BGE), CTAB 15mM adicionado en muestra, y polaridad inversa.

C).- Efecto de utilizar CTAB 15 mM en la muestra, Tricina 7.8, y polaridad inversa.

La adición de CTBA 15 mM únicamente a la muestra, no favorece la formación de un recubrimiento dinámico del capilar, pero si permite la formación de las micelas en las que se distribuyen diferencialmente las conidias, y por tanto la agrupación de las mismas. Así pues, esta condición no modifica el EOF pero la formación de agregados conidia-surfactante si provee de una carga diferente al conjunto de células y permite su agrupación. El resultado es una señal propia de las conidias, aguda, definida y simétrica (figura 23)

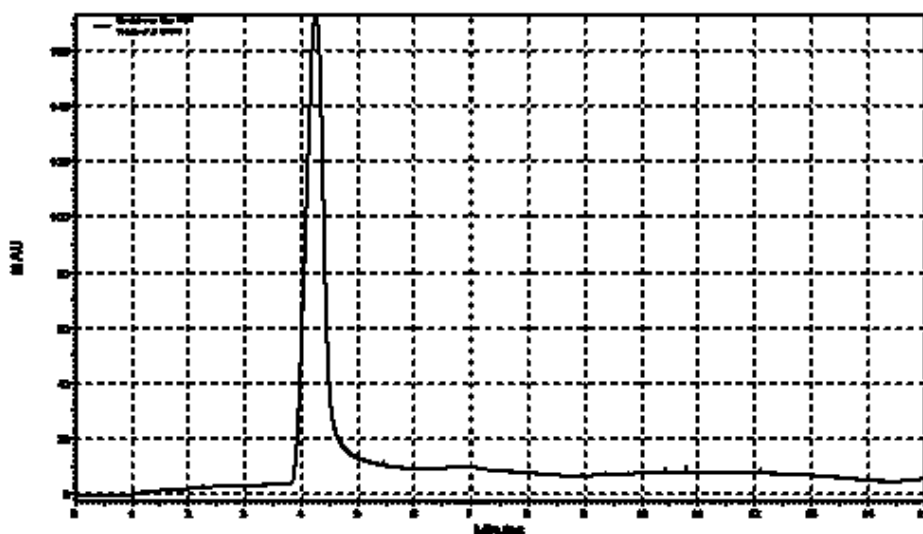


Figura 23. Señal electroforética de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040. Tricina 7.8, CTAB 15mM adicionado en muestra, y polaridad inversa.

Al no realizar un recubrimiento con el CTAB el EOF sigue siendo consecuencia del movimiento de los cationes de la capa móvil al aplicar el campo eléctrico, pero la carga superficial de las conidias si es modificada por interacción con las moléculas de CTAB en la que la doble capa eléctrica de las mismas es modificada. Debido a que se usa polaridad inversa y no existe inversión del EOF, este impulsará los analitos en sentido contrario al detector, y solo serán detectadas las conidias que no formen parte de agregados con surfactante, o aquellos que a pesar de interactuar con las micelas, mantengan una carga negativa que los impulse hacia el polo negativo (Figura 24).

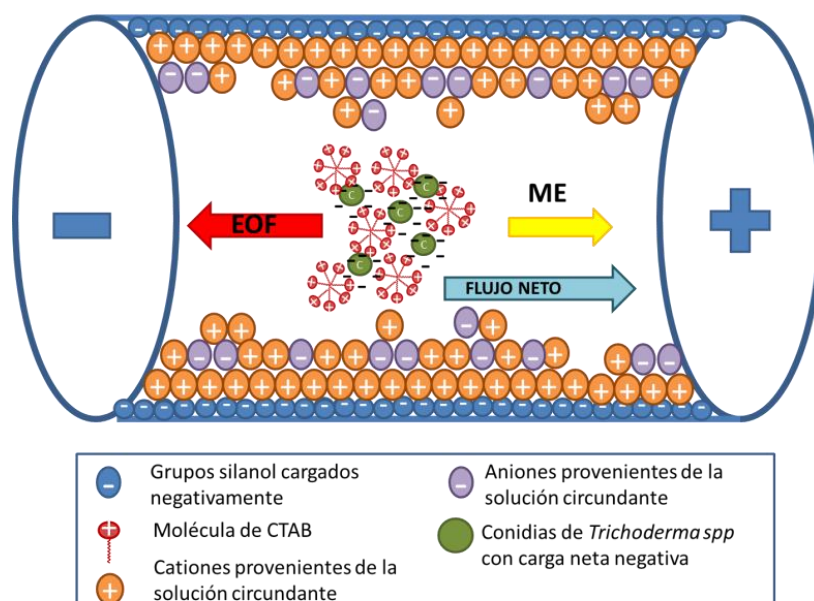


Figura 24. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de conidias, en polaridad inversa, y con CTAB 15mM adicionado a la muestra.

D).- Efecto del uso de CTAB 1% como recubrimiento, Tritón X-100 1% en muestra, y polaridad inversa.

Las señales producidas por el uso de Tricina 7.8, enjuague con CTAB y Tritón X-100 adicionado al 1% a la muestra resultaron muy estrechas, definidas y simétricas (figura 25); con tiempos de migración por debajo del resto de las condiciones. Lo cual puede ser entendido a partir del efecto que produce cada uno de estos agentes al ser incluidos en el sistema. Por un lado, el CTAB invierte el EOF provocando que el flujo neto de aniones arrastre junto consigo al resto de analitos, y por otro, el hecho de que el Tritón x-100 disminuye la adsorción de las células fúngicas con la pared del capilar. Como resultado se observa que las conidias migran hacia el polo negativo como consecuencia tanto del EOF como de la relación masa carga y los fenómenos de adsorción disminuyen, produciendo señales representativas y estrechas (Figura 26).

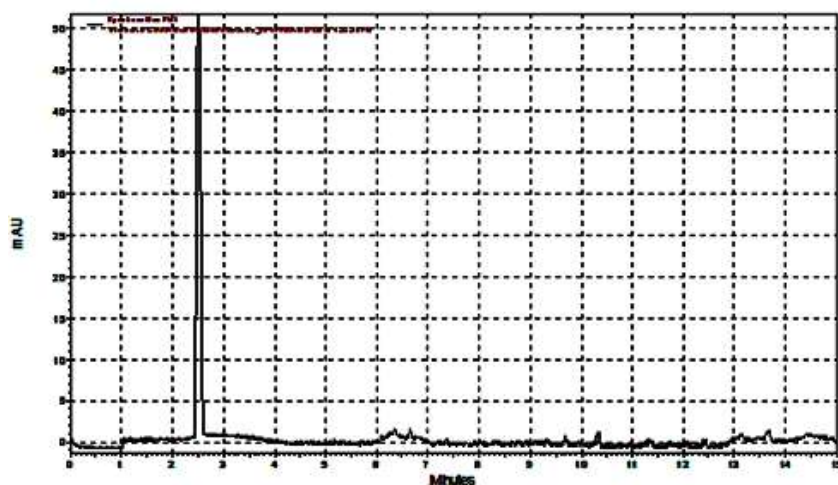


Figura 25. Señal electroforética de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040. Tricina pH 7.8, CTAB 1 % como recubrimiento, Tritón X-100 al 1% adicionado a la muestra; polaridad inversa.

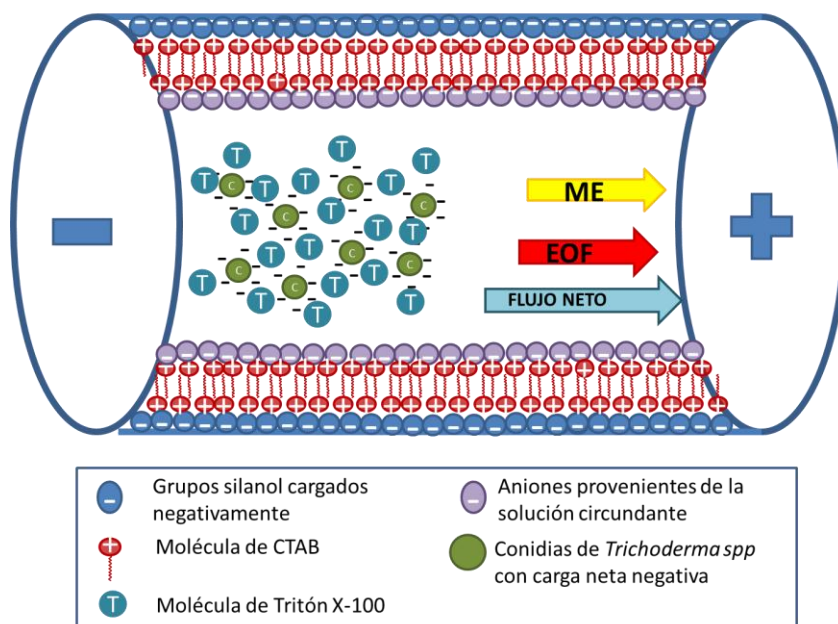


Figura 26. Esquema teórico de la movilidad electroforética total u observada de conidias en polaridad inversa, CTAB 15 mM como recubrimiento y Tritón X-100 al 1% adicionado a la muestra.

8.2.3.- Análisis del diseño experimental mediante la metodología de superficie de respuesta

Las gráficas de la figura 27 muestran la interacción entre el recubrimiento del capilar y el aditivo en la muestra. A medida que las zonas se vuelven más cálidas, la interacción resulta más favorable sobre el pico electroforético, y por otro lado, mientras la región se torna más fría, la interacción de los factores en ese punto o nivel es negativa para la variable de salida.

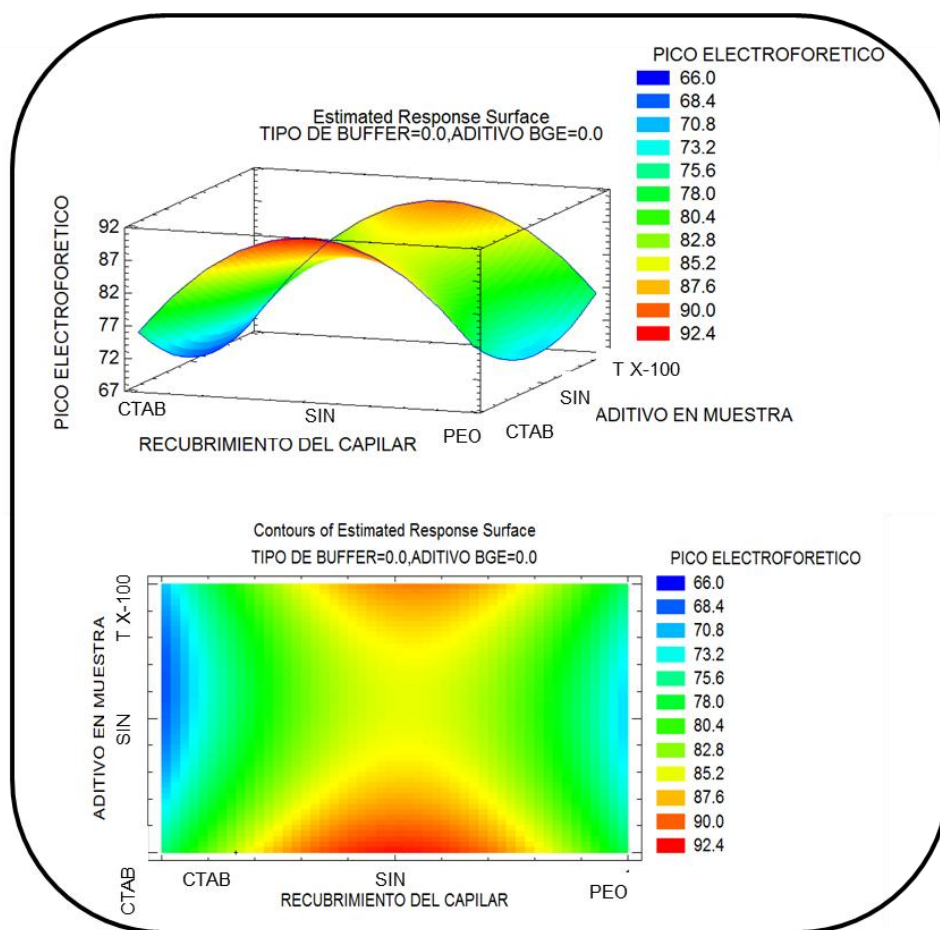


Figura 27. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el pico electroforético en función del recubrimiento capilar y el aditivo en la muestra.

En las gráficas de la figura 27 también se puede observar que los mejores niveles de operación, para estos factores en conjunto, se constituyen en la ausencia de recubrimiento dinámico y con presencia de alguno de los aditivos en la muestra. Por otro lado, la zona más fría está conformada por aquella en las que se utiliza CTAB únicamente como recubrimiento pero sin ningún tipo de aditivo en la muestra. Finalmente, la zona con CTAB como enjuague y en la muestra permitirá la obtención de buenas señales y aquellas condiciones en las que no se utiliza ningún tipo de aditivos aparecen en un tono amarillo indicando señales aceptables pero susceptibles de ser mejoradas. En conclusión, este tipo de diagramas ejemplifica de manera gráfica cómo interactúan ciertos factores, ya sea de manera positiva o negativa, sobre el pico electroforético.

Por otro lado, en la figura 28 se tienen las gráficas que relacionan la influencia del tipo de buffer y del recubrimiento de capilar en la variable de respuesta. Si se toman en cuenta únicamente estos dos factores, la mejor condición es aquella en la que se utiliza Tricina 7.8 y ningún tipo de recubrimiento, considerando que no aparecen zonas cálidas cuando se utiliza únicamente recubrimiento sin aditivo en muestra independientemente del buffer seleccionado. Sin embargo, bajo estos parámetros, es posible obtener señales aceptables con Tricina 7.8 y HEPES 7.0, y PEO como enjuague. El tipo de buffer con la peor repercusión en la señal parece ser MOPS 7.5. Es importante recalcar que para la construcción de estos diagramas el resto de los factores incluidos en el diseño experimental no es involucrado. El hecho de que no existan zonas cálidas indica que la utilización y variación de estos factores no es suficiente para generar señales cercanas al valor deseado.

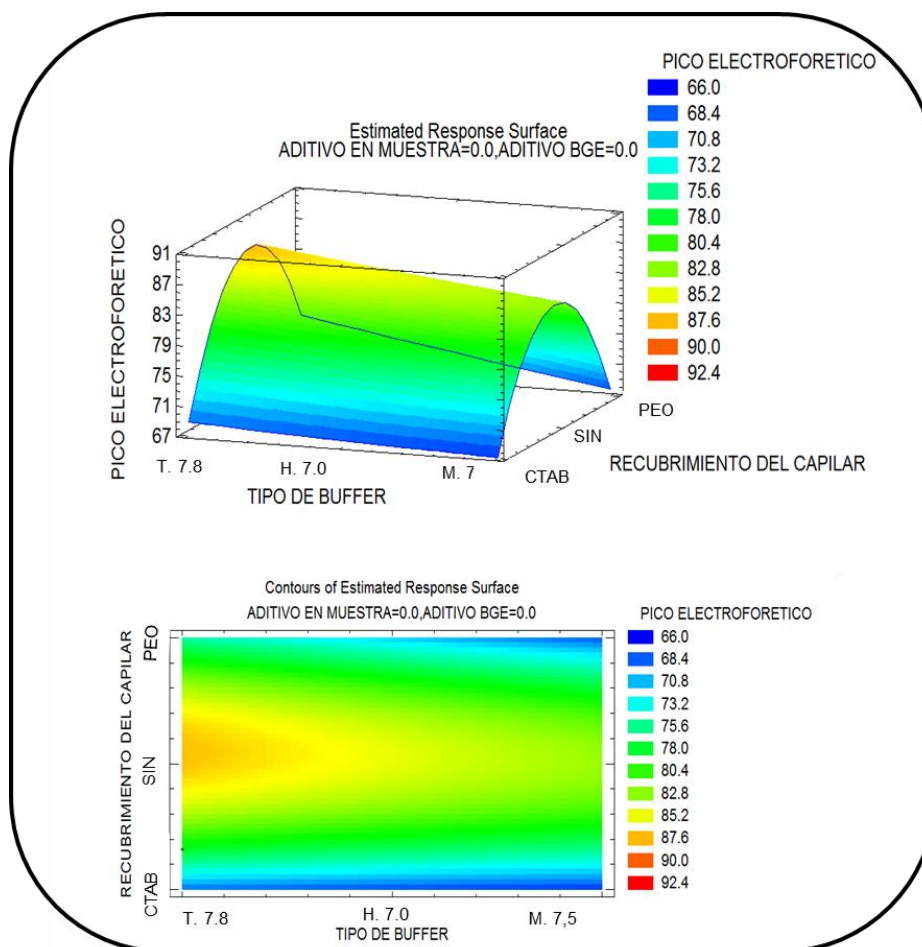


Figura 28. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el pico electroforético en función del recubrimiento capilar y el tipo de buffer.

8.2.4.- Ensayos con cepas silvestres

Una vez que se determinaron las mejores condiciones de análisis para la cepa de referencia, se procedió a probar las mismas con 4 cepas silvestres de *Trichoderma*, para así determinar el efecto que tendría su utilización en la movilidad electroforética de cada una y si permitirían agrupar a las células en un solo pico representativo de cada especie. Cada una de las condiciones de análisis seleccionada se utilizó para llevar a cabo el análisis en el total de cepas.

A).-Ensayos sin recubrimiento ni aditivo en muestra y polaridad normal.

Con lo que respecta a la utilización de HEPES 7.0 en polaridad normal, se logró agrupar todas las cepas en un solo pico para cada cepa. Los picos son simétricos y agrupan a las células de cada especie. Los tiempos de migración aparecen sutilmente diferentes entre sí, situándose en un intervalo que comprende desde aproximadamente desde los siete a los diez minutos.

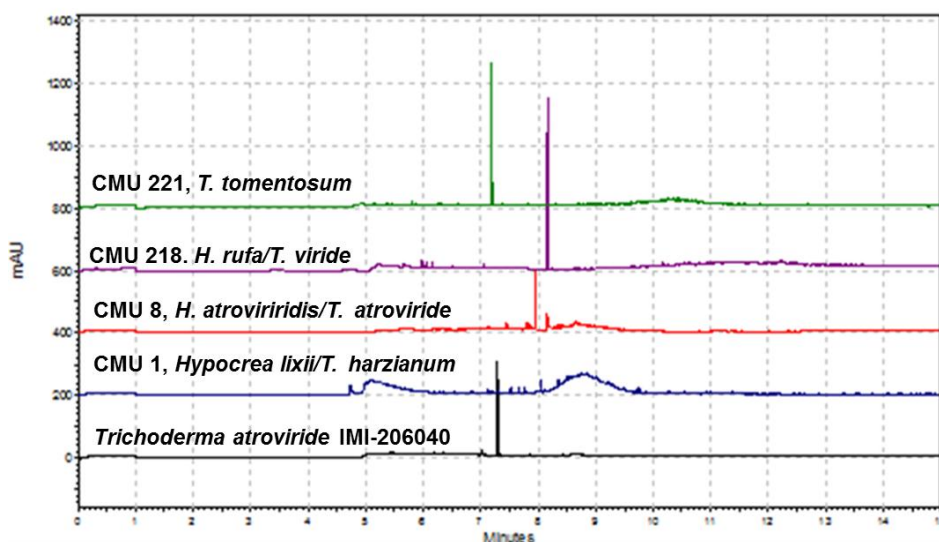


Figura 29. Señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de *Trichoderma spp.* HEPES pH 7.0; polaridad normal.

Como se puede observar en la figura 29, la señales correspondiente tanto a la cepa de referencia, como a *T. tomentosum* y *T. viride*, se muestran bien definidas y simétricas, mientras que la señal de *T. harzianum* aparece ancha y por lo tanto su altura es menor, como consecuencia de la distribución amplia de la células que migran en total durante un tiempo mayor. En el caso de *T. atroviride*, las conidias no se agruparon por completo y se puede apreciar un proceso de ionización diferencial que culminó en la formación de un pico principal y tres más secundarios.

El hecho de que los tiempos de migración sean parecidos, indica que bajo esta condición, y debido a que los grupos superficiales que se encuentran en la pared celular de estas especies son similares, los procesos que dan carga a las células se lleven a cabo de manera parecida, produciendo que las movilidades electroforéticas entre especies, y por lo tanto, el tiempo de migración, no sean tan diferentes entre sí.

Así pues, el uso del buffer HEPES 7.0 a un valor de pH de 7.0 agrupa individualmente a todas las cepas en polaridad normal, en tiempos de migración diferenciales, aunque cercanos, debido a la similitud de la composición de su pared celular, como es de esperarse puesto que pertenecen al mismo género. Cada uno de los picos representa una especie en particular y la mayoría de ellos se encuentran bien definidos y estrechos. Sin embargo, es importante señalar que el agrupamiento de las conidias en ninguno de los casos fue completamente homogéneo y al observar las señales individualmente se observa algo de ruido en las líneas base.

B).-Ensayos con recubrimiento dinámico del capilar y/o aditivo en muestra.

En general, los experimentos que involucraron las condiciones que consistieron en un recubrimiento dinámico, tanto con óxido de polietileno como con CTAB, permitieron agrupar las cinco cepas seleccionadas en picos individuales, estrechos y propios de cada una de las especies.

Con lo que respecta a las señales propias de la utilización de PEO (Figura 30), cada una de las cepas se agrupó por completo en un pico individual, simétrico y estrecho, en los que los tiempos de migración oscilaron aproximadamente entre 3.5 y 4 min. La cercanía de estos valores indica la similitud de la composición de la pared celular entre las cepas escogidas, y debido a que bajo la condición probada

las células migran solo debido a la carga que poseen; y esta es adquirida mediante la ionización de grupos superficie, la carga neta será similar y por tanto su movilidad electroforética y tiempos de migración también. Lo anterior constituye un problema al intentar separar distintas especies de un mismo género, puesto que si la ionización de los grupos de superficie no provoca que cada una de las poblaciones correspondientes a una especie en particular presente un valor de carga determinado, entonces las diferentes células de diferentes especies pudiesen terminar agrupándose en un solo pico y la separación no se llevaría a cabo.

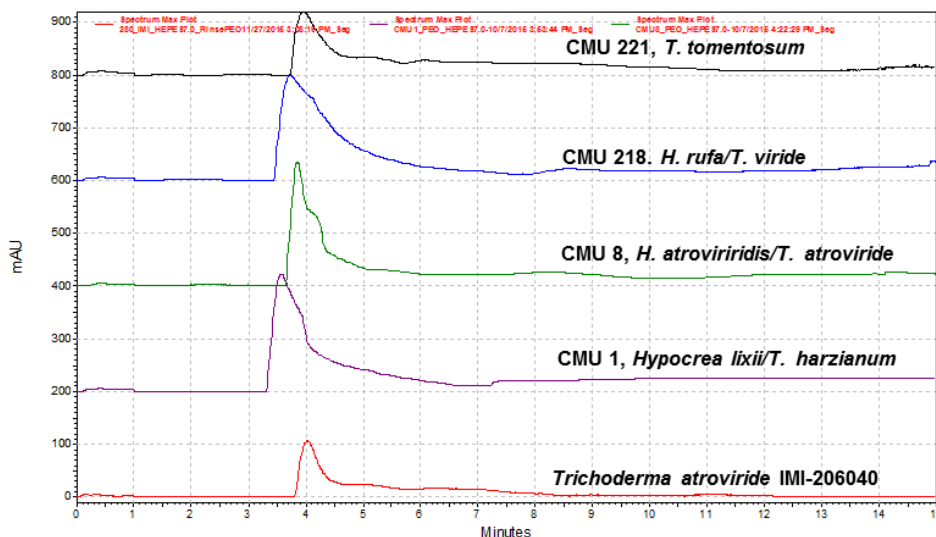


Figura 30. Señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de spp. HEPES pH 7.0; polaridad inversa, y PEO 0.125% como recubrimiento del capilar.

Por otro lado, la condición que involucró utilizar CTAB tanto en BGE como en la muestra, arrojó señales particulares para cada una de las cepas tratadas. Los electroferogramas de la condición mencionada muestran un pico bien definido, estrecho y simétrico para todas las especies correspondiente a un tiempo de migración muy cercano entre sí, en un valor de entre 3.2 y 3.4 min (Figura 31). Dicho pico pudiese corresponder a las conidias que interactúan con las micelas de CTAB y migran en conjunto con las mismas como consecuencia del EOF. Además

de este pico, en los ensayos con todas las cepas se observan otros picos con tiempos de migración aproximadamente entre 4.5 y 6 minutos, los cuales probablemente corresponden a la migración de conidias que no interactuaron con las micelas, y que por lo tanto no se agruparon en el primer pico. Estas células migran en sentido opuesto al EOF, lo que puede explicar que la señal de las conidias que no se agruparon aparezca posteriormente a la señal de los agregados surfactante-conidias, y que estas señales no agrupen al total de las células en un solo pico.

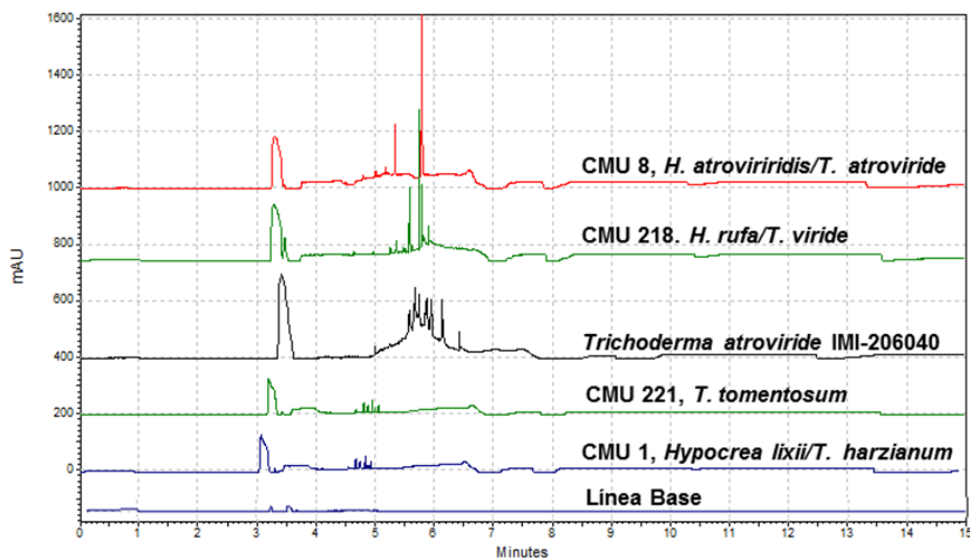


Figura 31. Señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de *Trichoderma spp.* HEPES pH7.0, CTAB 15mM en BGE y en muestra, y polaridad inversa.

En el caso del ensayo con la cepa de referencia, se puede observar el comportamiento descrito, con dos picos bien definidos en los que el primero podría pertenecer a las micelas y el segundo a la población de conidias que migró debido a su carga. De igual manera, un comportamiento similar se puede observar para la cepa 8 y la 218, con la diferencia de que las células no asociadas a micelas formó un pico principal y otro secundario. Finalmente en el caso de la cepa 1 y la 221,

las señales parecen mostrar que casi todas las conidias se agruparon en el primer pico (Figura 31).

En conclusión, probablemente esta condición produjo principalmente un pico formando los agregados de micela con conidias, y un segundo producto de las células individuales; el primero impulsado por el EOF y el segundo por la carga. Debido a que las cepas de las diferentes especies interactúan de manera similar con el CTAB es que los picos de los agregados pudiesen tener tiempos de migración prácticamente iguales en los que se agrupan el total de las células, lo que podría representar dificultades para poder realizar separaciones entre especies, pero ser de utilidad en estudios de presencia o ausencia de células fúngicas.

En la figura 32, se muestran los electroferogramas en los que se utilizó únicamente CTAB en la muestra y ningún tipo de recubrimiento del capilar. Las conidias de cada especie se agruparon en un solo pico estrecho y simétrico, en los que destaco por su forma el que corresponde a la cepa de referencia. Los tiempos de migración variaron entre 1 y 4.5 minutos. A pesar de que la señal de la cepa 8 agrupó a las células, el pico no fue del todo estrecho pero su tiempo de migración es parecido al de la cepa de referencia.

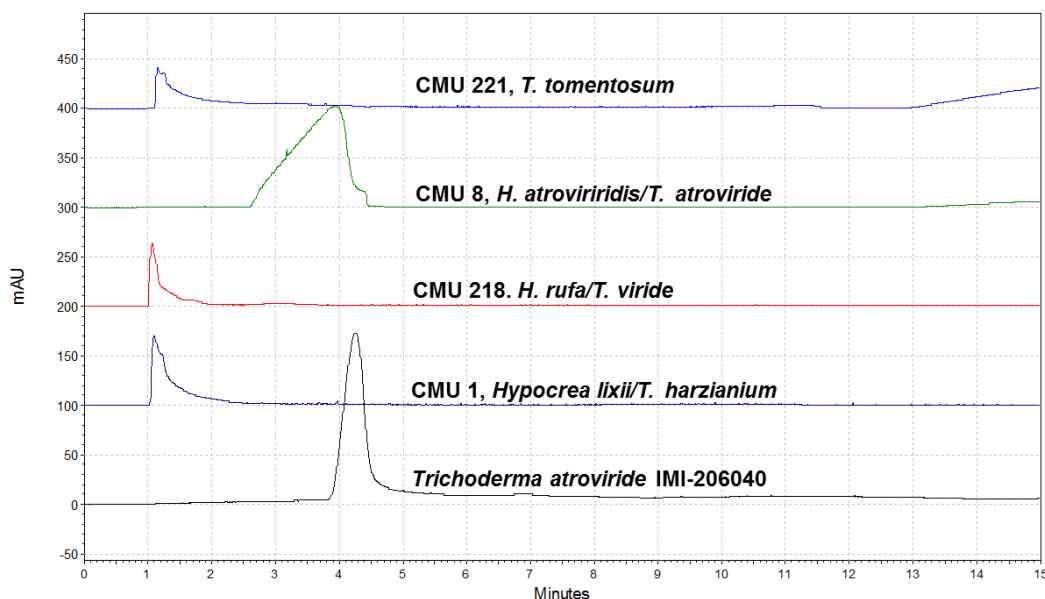


Figura 32. Señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de *Trichoderma spp*. Tricina pH 7.8, CTAB 15m M en muestra; polaridad inversa.

Finalmente, el recubrimiento del capilar y la adición de Tritón X-100 1% a la muestra también agrupó a las diferentes especies en un pico representativo de cada especie (figura 33), con tiempos de migración desde aproximadamente 2 a 4.2 minutos en los que el tamaño de la señal estuvo en función del grado de agrupamiento de las células, es decir que si el agrupamiento de las mismas fuese mayor, la migración de las conidias se llevaría a cabo en un lapso de tiempo menor, y por lo tanto, el pico se torna más estrecho. Por ejemplo, en el caso de la cepa 8 se puede observar una señal pequeña y amplia, como consecuencia de un agrupamiento deficiente y una migración en un lapso de tiempo mayor, a diferencia de la cepa 1, en la que se observa un pico estrecho, agrupado y en el que la totalidad de las conidias migraron en un lapso de tiempo corto.

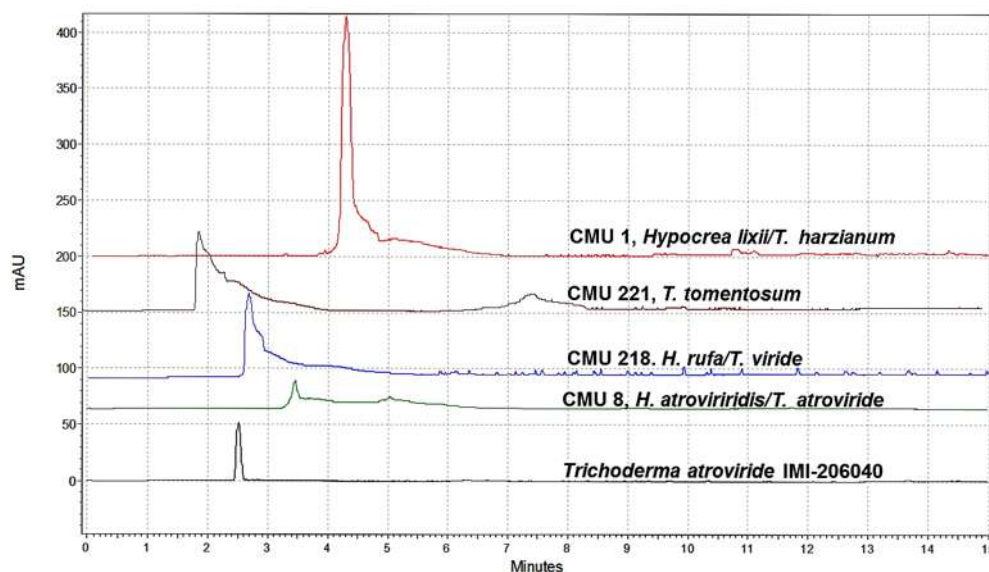


Figura 33. Señales electroforéticas de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y de cuatro cepas silvestres de *Trichoderma spp.* Tricina pH 7.8, CTAB 1% como recubrimiento, Tritón X-100 al 1% adicionado a la muestra; polaridad inversa.

8.2.5.- Ensayos con la cepa de referencia y las cepas silvestres en conjunto.

Una vez que se corroboró el agrupamiento de las diferentes especies con las condiciones propuestas, el siguiente paso consistió en realizar ensayos con una mezcla de las 5 cepas con la finalidad de evaluar la capacidad de separación de especies de un mismo género, en este caso *Trichoderma spp.*, con las 5 condiciones que habían presentado las mejores señales.

Utilizando HEPES 7.0 en polaridad normal (figura 34a), para una mezcla de conidias de las 5 cepas, se puede observar en primer instancia que los picos son de una altura menor debido a que la concentración de cada una de las cepas también lo es, ya que se utilizó una relación 1:5 de cada especie para realizar la mezcla y por lo tanto, la concentración neta al igual que los picos de las señal disminuyen en relación a los ensayos individuales (figura 34 b).

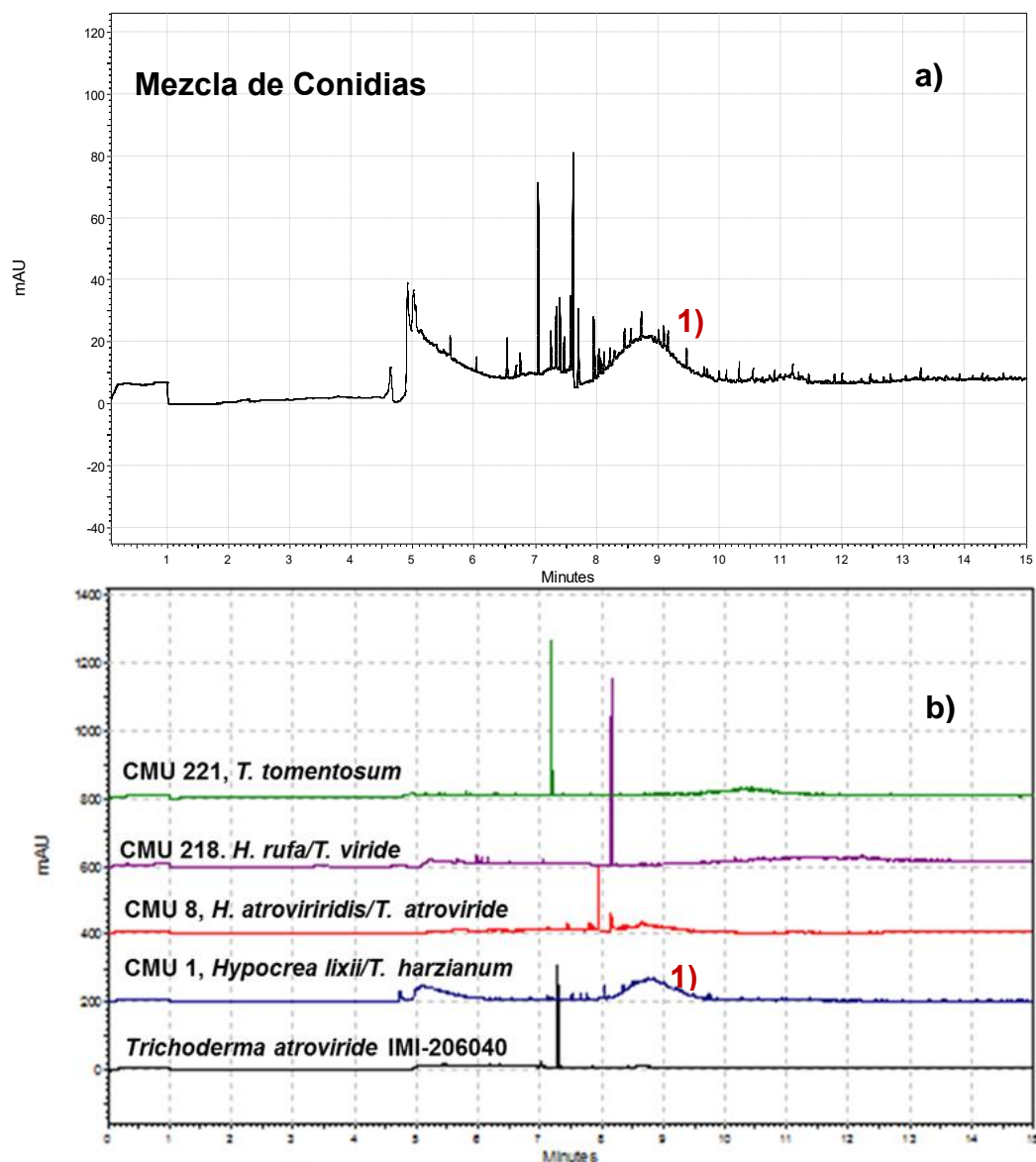


Figura 34. Comparación de la señal electroforética de 5 cepas de *Trichoderma* spp., en mezcla, y de las señales electroforéticas individuales de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y cuatro cepas silvestres. HEPES pH 7.0; polaridad normal.

Aunado a lo anterior, en la señal correspondiente a la mezcla aparece un pico con el mismo tiempo de migración y forma que el que se obtiene en el ensayo individual para la cepa CMU 1, correspondiente a *T. harzianum*, sugiriendo que

esta señal podría pertenecer mayoritariamente a dicha cepa. En la señal de la mezcla, y a pesar de que no se aprecian los picos correspondientes a las 5 especies de una manera resuelta y definida, se observan dos picos principales que agrupan dos poblaciones de células con una ionización uniforme en tiempos de migración aproximados de 7.05 y de 7.5 minutos, siendo estos valores cercanos a los tiempos de migración de los ensayos individuales, para la cepa de referencia y la CMU 221, y para la cepas identificadas como CMU 8 Y CMU 221, respectivamente.

Debido a que se observan una gran cantidad de picos secundarios, y solo existen dos picos principales en el electroferograma de la mezcla, además del que posiblemente corresponda a *T. harzianum*, es que se plantea que la agrupación de las cepas no se llevó a cabo en picos individuales para cada una de ellas, y por el contrario, y debido a la similitud de la pared celular entre especies, la ionización de las conidias y la migración de acuerdo a la carga no fue suficiente para separarlas únicamente utilizando el buffer. Lo anterior indica que posiblemente se agruparon conidias de diferentes especies en los dos picos ya mencionados, algunas otras migraron diferencialmente siendo detectadas en picos alternos y finalmente, la mayoría de *T. harzianum* se agrupó en el pico identificado como número 1 en la figura 34.

Los tiempos de migración cercanos de los ensayos individuales, producto de composiciones de la pared parecidas que produce ionizaciones similares, resultan en separaciones complicadas de realizar utilizando únicamente buffer de corrimiento y aprovechando el pH del mismo. Sin embargo, a partir de condiciones como la presentada en la que se modifica el buffer y se realiza un proceso de optimización mediante la utilización de ciertos aditivos, es que se ha llevado a cabo separaciones de diferentes especies de hongos filamentosos, aunque con tiempos de migración con un intervalo de 8 a 13 minutos, y no de 7 a 9 minutos

como en el caso del presente estudio. Ejemplo de esto, es el estudio de Horká et al, realizado en el 2009 en la que se separaron 5 cepas de hongos filamentosos (figura 35), en el que la separación fue llevada a cabo en un equipo construido por el grupo de trabajo y el tipo de detector fue de fluorescencia¹.

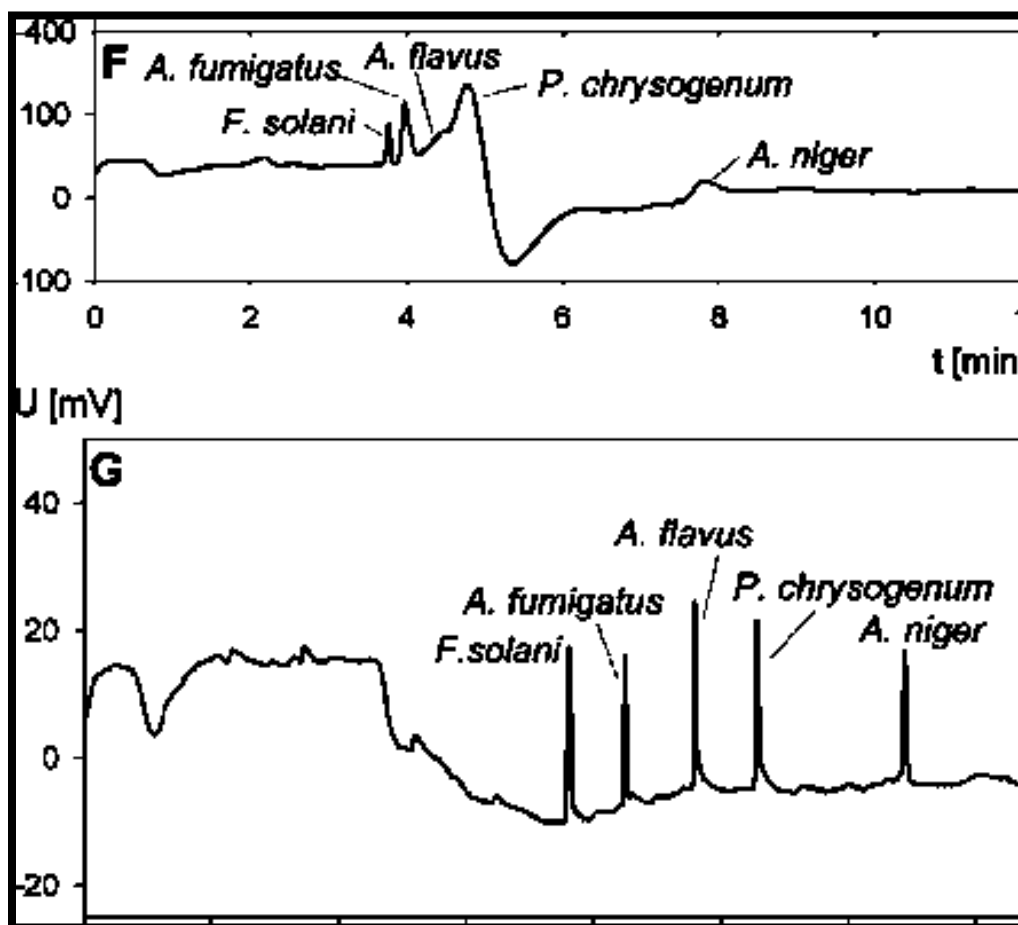


Figura 35. Proceso de optimización de CZE de conidias de 5 cepas de hongos filamentosos dinámicamente modificadas por PB-PEG. F) BGE: Tris-taurina 2 mM (pH=8.4), EtOH 3%, 0.07mM PB-PEG. Composición de la muestra: Suspensión de conidias en PB-PEG 0.5 mM, PSS 15mM, y EtOH 20%. G) Ver F) BGE: PEG 1000 0.3%. Composición de la muestra: Suspensión de conidias en PB-PEG 0.5 mM, PSS 15mM, y EtOH 20%. (Tomado de la referencia 1)

En el estudio individual de las 5 cepas de *Trichoderma spp*, los picos que se obtuvieron utilizando únicamente buffer permitieron agrupar las conidias en un pico representativo principal, generalmente estrecho. y simétrico. Sin embargo, al someter una mezcla de las cepas, no se obtuvo de manera independiente cada una de las señales pertenecientes a las mismas, lo que sugiere la posible optimización de la señal de la mezcla, mediante la utilización de diversos aditivos, con la finalidad de lograr la resolución de cada uno de los picos de acuerdo a su especie.

A).-Ensayos con recubrimiento dinámico del capilar y/o aditivo en muestra.

Con lo que respecta a los ensayos con recubrimiento y/o aditivo en la muestra, no fue posible la separación de las cepas en mezcla con ninguna de las condiciones seleccionadas, y aparentemente las señales obtenidas agruparon a todas las células en un solo pico con un comportamiento similar al que se obtuvo al realizar ensayos individuales (figura 36).

En el caso de la figura 36.b), se puede observar que el pico es diferente en comparación con los que se obtuvieron en los ensayos para cada cepa por separado. Los electroferogramas muestran una señal considerablemente amplia en las que las conidias pudiesen haber migrado en un intervalo de tiempo mayor al de las pruebas individuales, pero cuya señal no está exenta de un proceso de optimización.

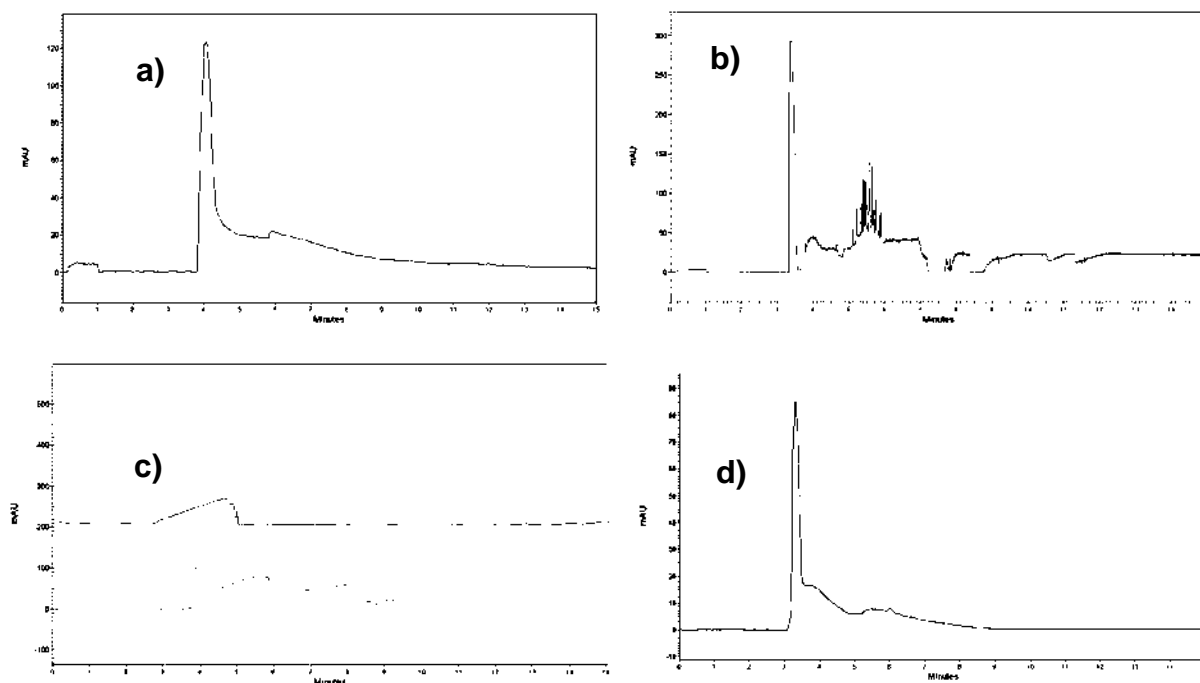


Figura 36. Señales electroforéticas de 5 cepas de *Trichoderma spp* mezcla. **a)** HEPES 7.0, PEO 0.125% como recubrimiento y polaridad inversa, **b)** HEPES 7.0, CTAB 15 mM en BGE y en muestra, y polaridad inversa, **c)** Tricina 7.8, CTAB en muestra y polaridad inversa, y **d)** Tricina 7.8, CTAB 1% como enjuague y Tritón X-100 en muestra, y polaridad inversa.

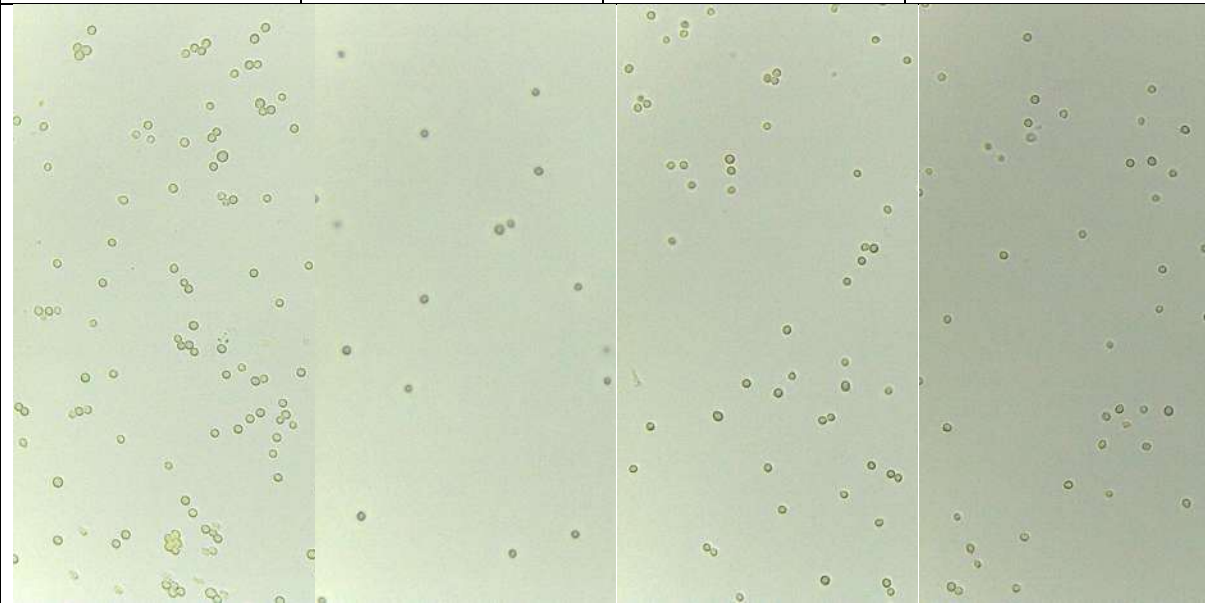
8.1.- Observación microscópica y sensibilidad del análisis.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante un conteo de las células contenidas en las diferentes muestras utilizadas. Esto se llevó a cabo tomando 100 μ L de la suspensión inicial de conidias (1:3), la cual es la que se inyecta en el equipo, y depositándolos en 900 μ L del BGE, para posteriormente tomar 100 μ L de la dilución 1:10 y colocarlos en 900 μ L del respectivo buffer, y así obtener la dilución que permitió realizar el conteo, siendo esta una dilución 1:100 (Tabla 18).

En dicha tabla se observa las distintas condiciones seleccionadas, la concentración de cada una de las muestras, misma que se obtuvo realizando el conteo de una dilución 1:100, el volumen teórico calculado y la cantidad total de células por inyección en cada ensayo.

Como se puede observar el volumen permanece constante para todas las condiciones probadas, debido a que se utilizó el valor de la viscosidad ya establecido para soluciones BGE acuosas a 25 °C y la viscosidad de la muestra es despreciable por ocupar una porción muy pequeña del total de la longitud del capilar.

Tabla 18. Muestras de conidias de *Trichoderma spp.*, diluidas 1:100 bajo diferentes condiciones y cantidad de células por inyección.

HEPES 7.0	HEPES 7.0 con CTAB	Tricina 7.8 con CTAB	Tricina 7.8 con Tritón X-100
			
Concentración de células en la muestra			
135.7x10 ³ cel/μL	135.0x10 ³ cel/μL	129.8x10 ³ cel/μL	126.2 x10 ³ cel/μL
Volumen de muestra teórico inyectado en cada corrimiento electroforético			
V=0.095μL			
Número de células teórico inyectadas en cada corrimiento			
12.89X10 ³ células	12.82X10 ³ células	12.33X10 ³ células	12.98X10 ³ células

El volumen de inyección con el que se trabajó en el presente estudio fue de 95 nL, inyectando en promedio 12.8X10³ conidias/ μL, mientras que Horká et al, utilizaron un volumen de 40 nL, con una inyección de 10⁵ conidias/ μL, de las cuales fueron detectadas aproximadamente 9000, cuando se utilizó detección por UV¹. Es decir,

que se trabajó con un volumen mayor pero con una concentración menor de células, y el porcentaje de conidias detectadas en relación a las inyectadas fue de un valor considerablemente mayor que en el trabajo de Horká et al, que fue de 9% en contraste con el valor mínimo de 35% en el presente estudio.

Sin embargo, mediante el empleo de la detección fluorométrica y la modificación dinámica de las conidias con un tensioactivo no-ionogénico, el grupo de Horká, detectó valores cercanos a las 10 células, al inyectar volúmenes entre 10 a 90 nL, con concentraciones de entre 10^4 y 10^5 conidias/mL de cada una de las especies en una mezcla.

El conteo de las células permitió determinar el número de células que fueron detectadas en cada corrimiento (tabla 19), y puesto que se encontraban en el vial de salida, comprobar que las señales obtenidas fueron consecuencia de la migración y detección de las mismas, así como de su interacción con el buffer y los aditivos utilizados.

En la tabla 19 se puede apreciar que dependiendo de la condición utilizada, las conidias detectadas estuvieron en un intervalo entre 9.52×10^3 y 4.55×10^3 , lo cual se explica por el hecho de que cada condición modifica el comportamiento que tendrán las células durante el análisis y existen factores como la adsorción al capilar que modificara el total de células recuperadas al final de los corrimientos. Es importante mencionar que en todas las condiciones seleccionadas existió la presencia de células en el vial de salida.

Tabla 19. Número de células post corrimiento para cada una de las condiciones seleccionadas				
HEPES 7.0	HEPES 7.0 con PEO como enjuague	HEPES 7.0 con CTAB en BGE y muestra	Tricina 7.8 con CTAB en muestra	Tricina 7.8 con CTAB como enjuague y Tritón X-100 en muestra
Concentración de células recuperadas en vial post corrimiento después de 5 ensayos				
136 cel/ μ L	66 cel/ μ L	82 cel/ μ L	122 cel/ μ L	65 cel/ μ L
Volumen de buffer conteniendo las células recuperadas post corrimiento				
V=350 μ L				
Número de células detectadas por corrimiento				
9.52X10 ³ células	4.62X10 ³ células	5.74X10 ³ células	8.54X10 ³ células	4.55X10 ³ células
Porcentaje de número de células detectadas en relación al número de células inyectadas				
75.8	35.8	44.8	69.3	35

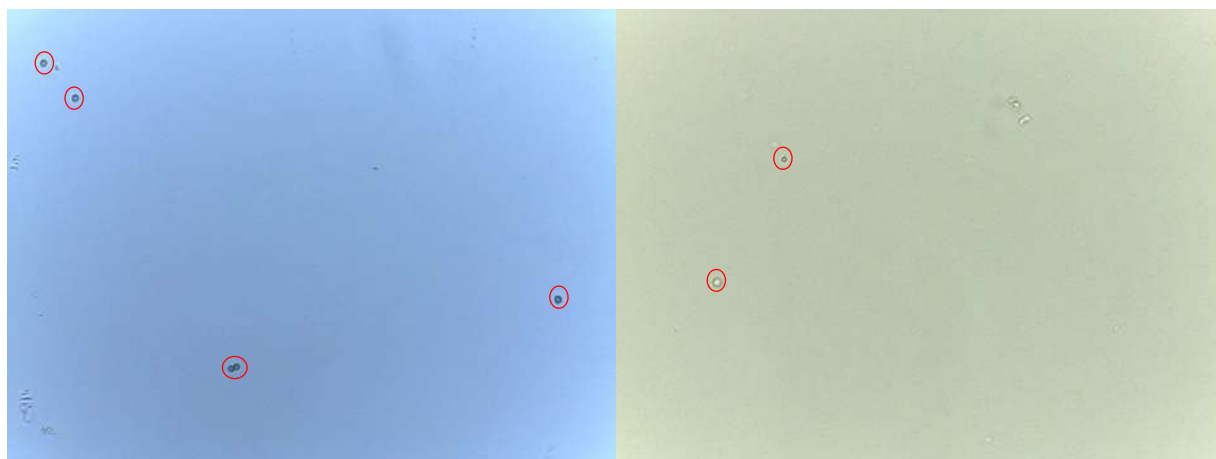


Figura 37. Conidias de *Trichoderma spp.*, recuperadas en el vial de salida post corrimiento. Las conidias fueron marcadas con círculos rojos para mejorar su visualización, **a)** *Trichoderma spp.*, HEPES 7.0, CTAB 15 Mm en BGE y muestra, y **b)** Mezcla de conidias, HEPES 7.0, PEO como enjuague.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- ❖ Los valores de pH que arrojaron las mejores señales para cada uno de los buffers correspondientes, muestran el agrupamiento de las células fúngicas en un pico electroforético estrecho, simétrico y definido; siendo estos: Tricina 7.8, MOPS 7.5 y HEPES 7.0.
- ❖ El diseño experimental permitió establecer los ensayos necesarios para determinar la influencia de distintos recubrimientos del capilar, aditivos en muestra y en BGE, así como su interacción, sobre el pico electroforético. Su implementación redujo los ensayos necesarios para obtener las mejores condiciones de 243 a 81.
- ❖ Las mejores condiciones fueron las siguientes:
 - HEPES 7.0, polaridad normal.
 - HEPES 7.0, PEO 0.125% como recubrimiento.
 - HEPES 7.0, CTAB 15mM en buffer y en muestra.
 - Tricina 7.8, CTAB 15 mM en muestra.
 - Tricina 7.8, CTAB 1% como recubrimiento y Tritón x-100 1% en muestra.
- ❖ El volumen de inyección fue de 95 nL, inyectando en promedio una concentración de 12.8×10^3 conidias/ μ L. Dependiendo de la condición utilizada, las conidias detectadas por corrimiento estuvieron en un intervalo entre 9.52×10^3 y 4.55×10^3 .

10. CONCLUSIONES

- ❖ El uso de buffers zwitteriónicos (fisiológicos) agrupó las conidias, y a determinado valor de pH (Tricina 7.8, MOPS 7.5 y HEPES 7.0) se obtuvieron señales estrechas, definidas y simétricas. Su utilización es una muy buena alternativa para realizar ensayos por EC de células fúngicas.
- ❖ Utilizando solo buffer, las cepas seleccionadas se agruparon en picos representativos en ensayos individuales, mientras que el electroferograma de la mezcla muestra la posibilidad de un proceso de optimización que resulte en la separación de las mismas.
- ❖ El diseño experimental permitió encontrar las mejores condiciones de recubrimiento del capilar y aditivos en muestra y BGE, con un mínimo de ensayos, mejorando las señales obtenidas únicamente con buffer.
- ❖ El recubrimiento del capilar tanto con PEO como con CTAB, produce señales más estrechas y definidas, agrupando las cepas en ensayos individuales, pero dificultando la separación de las cepas en mezcla.
- ❖ Los ensayos con CTAB y Tritón X-100 adicionados en la muestra, resultaron en señales estrechas y definidas con picos propios de cada especie en ensayos individuales, pero no favorecieron la separación de las cepas en mezcla.
- ❖ La cantidad de células inyectadas es congruente con lo reportado en la literatura y la sensibilidad del análisis muestra una vez más el potencial de la EC para el estudio de células fúngicas.

11. PERSPECTIVAS

- ❖ Pruebas con distintas concentraciones de los buffers fisiológicos seleccionados.
- ❖ Modificación de la concentración de PEO y surfactantes, tanto para el recubrimiento del capilar como para aquellos adicionados en la muestra.
- ❖ Determinar el efecto de iones divalentes en la movilidad electroforética de conidias con los buffers propuestos.
- ❖ Pruebas con un modificador dinámico de conidias, el surfactante no iónico PB-PEG.
- ❖ Pruebas con buffers complejos tales como TBE (Tris-ácido bórico –EDTA) en el análisis de células fúngicas.
- ❖ Ensayos de las mejores condiciones con distintos tipos de células fúngicas en mezcla.
- ❖ Optimización de las señales producidas por mezclas de especies de un mismo género a partir de únicamente el uso de buffer.
- ❖ Observación microscópica del comportamiento electroforético de las células fúngicas al utilizar diferentes tipos de aditivos, y en particular con las condiciones seleccionadas.

REFERENCIAS

1. Horká M, Růžička F, Kubesová A, Holá V, Štais K. Capillary Electrophoresis of Conidia from Cultivated Microscopic Filamentous Fungi. *Analytical Chemistry*. 2009; 81 (10) 3997-4004.
2. Kredics L, Hatvani L, Naeimi S, Körmöczi P, Manczinger L, Vágvölgyi C, Druzhinina I. Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. In: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Edited by: Gupta VK et al. Elsevier; 2014. p. 3-18.
3. Bao Y, Lantz AW, Crank JA, Huang J, Armstrong DW. The use of cationic surfactants and ionic liquids in the detection of microbial contamination by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2008; 29: 2587-2592.
4. Horká M, Kubesová A, Šalplachta J, Zapletová E, Horký J, and Šlais K. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS-Suitable tools for identification of filamentous fungi. *Analytica Chimica Acta*. 2012; 716:155-162.
5. Girod M, Armstrong DW. Monitoring the migration behavior of living microorganisms in capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection with a charged-coupled device imaging system. *Electrophoresis*. 2002; 23:2048-2056.
6. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012; 30(1):33-39.
7. Hernández F. Morfología general de los hongos. En: *Actualidades En Micología Médica*. Editado por: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. Editorial de la Facultad de Medicina, UNAM. Quinta edición. México D.F. 2010. p. 3-8.
8. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2008; 25:78-82.
9. Feofilova EP. The fungal cell wall: Modern concepts of its composition and biological function. *Microbiology*. 2010; 79 (6):723-733.

10. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 2006; 28:799-808.
11. Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*. 2010; 12(7): 863-873.
12. Mellado E, Cuenca-Estrella M. Importancia clínica de los mecanismos de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2002; 20(10):523-30.
13. Mata G. Campos de estudio de la micología: El cultivo de hongos comestibles, un ejemplo de micología aplicada. En: *Actualidades Micología Médica*. Editado por: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. Editorial de la Facultad de Medicina, UNAM. Quinta edición. México D.F. 2010. p. 39-45.
14. Castrillón-Rivera LE, Palma Ramos A. La respuesta inmune en las micosis. En: *Actualidades Micología Médica*. Editado por: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. Editorial de la Facultad de Medicina, UNAM. Quinta edición. México D.F. 2010. p. 71-82.
15. Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Ros L, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Alternaria spp*. Identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011; 66: 2585-2587
16. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010; 87:787-799.
17. Sharma P, Vignesh-Kumar P, Ramesh R, Saravanan K, Deep S, Sharma M, Mahes S, Dinesh SS. Biocontrol genes from *Trichoderma* species: A review. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10 (86):19898-19907.
18. Saloheimo M and Pakula TM. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology*. 2012; 158:46-57.
19. Samuels GJ. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology*; 96:195-206.
20. Carreras-Villaseñor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella AH. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*. 2012; 158: 3-16.

21. Osorio-Concepción M, Casas-Flores S, Cortés-Penagos Carlos. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a luz. *Revista Mexicana de Micología*. 2013; 37: 41-50.
22. Milán-Chiu BE. Reproducción asexual en hongos: Conidiogénesis y esporangiosporogénesis. En: *Actualidades Micología Médica*. Editado por: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. Editorial de la Facultad de Medicina, UNAM. Quinta edición. México D.F. 2010. p. 35-38.
23. Jaklitsch WM, Voglmayr H. New combinations in *Trichoderma* (Hypocreaceae, Hypocreales). *Mycotaxon*. 2013; 126: 143-156
24. Jung B, Kim S, Lee J. Mycrocicle Conidiation in Filamentous Fungi. *Mycobiology*. 2014; 42(1):1-5
25. Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukkerjee M, Schmoll M. *Trichoderma* in Agriculture, Industry and Medicine: An Overview. En: *Trichoderma, Biology and Applications*. Edited by: Prasun K et al. CABI. 2013. p. 1-9.
26. Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M. Special issue: *Trichoderma*- from Basic Biology to Biotechnology. *Microbiology*. 2012; 158: 1-2
27. Chouaki T, Lavarde V, Lachaud L, Raccurt CP, Hennequin C. Invasive Infections Due to *Trichoderma* Species: Report of 2 Cases, Findings of In Vitro Susceptibility Testing, And Review of the Literature. *Clinical Infections Diseases*. 2002; 35:1360-1367.
28. Seguin P, Degeilh B, Grulois I, Gacouin A, Maugendre S, Dufour T, Dupont B, and Camus C. Successful Treatment of a Brain Abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after Surgical Resection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1995; 14:445-448.
29. Ranque S, Garcia-Hermoso D, Michel-Nguyen A, Dumon H. Isolation of *Trichoderma atroviride* from a liver transplant. *Reporte de Caso. Journal de Mycologie Médicale*. 2008; 18, 234-236.
30. Castagnino JM. Electroforesis capilar. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 1999; 33(3):297-329
31. Chopin M. Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Tecnología en salud*. 2012; 1(2):86-89

32. Valverde I. Desarrollo de nuevas metodologías analíticas mediante electroforesis capilar. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 2002.
33. Sósol RE, Marín VM, Rosales E, Lapizco BH. 2012. Análisis de células en dispositivos microfluídicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2012; 2(2): 227-248
34. Magaña JJ, Arenas ML, Gómez R. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista Médica Chile*. 2009; 137: 946-956
35. Simonet BM, Ríos A, Valcárcel M. Capillary Electrophoresis Separation of Microorganisms. En: *Methods in Molecular Biology. Capillary Electrophoresis*. Editado por: P. Schmitt-Kopplin, Humana Press Inc. Totowa, NJ. 2008; 384: 569-590.
36. Oda RP and Landers JP. Introduction to capillary electrophoresis. *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Edited by Landers JP. Second Edition. New York, 1997.
37. Doroteo MC. Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigación en Discapacidad*. 2012; 1(2):86-89.
38. Lin Y, Trouillon R, Safina G, Ewing AG. Chemical analysis of single cells. *Analytical chemistry*. 2011; 83(12): 4369-4392.
39. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2001. Principios de análisis instrumental. 5ta ed. McGraw-Hill. Madrid España. 2001.
40. Cázares-García SV. Movilidad Electroforética de células fúngicas. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 2009.
41. Robinson-Fuentes VR. Introducción a la Electroforesis Capilar. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 2006.
42. Avila-Quintero JL. Análisis de Conidias de Diferentes Cepas de *Trichoderma spp* por Electroforesis Capilar. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 2013.
43. Harris DC. Métodos cromatográficos y Electroforesis Capilar. En: Análisis químico cuantitativo. 3ra edición correspondiente a la 6ta edición original. Editorial Reverté. Barcelona, España. 2007.

44. Desai MJ and Armstrong DW. Separation, Identification, and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. *Microbiology and Molecular Reviews*. 2002; 67(1):38-51.
45. Good, NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh-M RM. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*. 1966; 5(2), 467-477.
46. Hayes MA, Kheterpal I, Ewing AG. Effects of Buffer pH on Electroosmotic Flow Control by an Applied Radial Voltage for Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical chemistry*. 1993; 65, 27-31.
47. Petr J, Ryparová O, Ranc V, Hinnerová P, Znalezióna J, Maier V, Ševčík J. On-line combination of CE and microscopy: An insight into the migration of microorganisms. *Electrophoresis*. 2009; 30, 3863-3869.
48. Petr J Maier Vítězslav. Analysis of microorganisms by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2012; 31:9-22.
49. Ruiz-Marrondo S. Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar. Aplicación al análisis de herbicidas y de sus productos de degradación. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya. 2001.
50. Mazzeo JR. Micellar Electrokinetic Chromatography. En: *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Edited by Landers JP. Second Edition. New York. 1997. p. 49-73.
51. Reija-Otero B. Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 2007.
52. Kok W. Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation. *Chromatographia Supplement*. 2000; 51:(44-50)
53. Sørensen H, Sørensen S, Bjerregaard Ch, Søren M. *Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis*. Royal Society of Chemistry. Great Britain. 1999.
54. Armstrong DW, Schulte G, Schneiderheinze JM, Westenberg DJ. Separating Microbes in the Manner of Molecules. *Capillary Electrokinetic Approaches*. *Analytical Chemistry* 1999; 71:5465-5469.
55. Moon BG, Kim Y. Analysis of Health-related Microbes by Capillary Electrophoresis. *Buletin of the Korean Chemical Society*. 2003; 24(8):1203-1206.

56. Horká M, Růžicka F, Kubesová A, Němcová E and Šlais K. Separation of phenotypically indistinguishable *Candida species*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis*, by capillary electromigration techniques. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218: 3900-3907.
57. Salazar-Alcantar LY. Influencia de surfactantes en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 2015.
58. Gutiérrez H, De la Vara R. Análisis y diseño de experimentos. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 2008.
59. Montgomery DC. Diseño y Análisis de experimentos. Universidad Estatal de Arizona. Arizon. 2004. pp 457-461
60. Pérez-Hernández E. Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. Tesis de Maestría. 2012.
61. Moore D, Robson GD, Trinci APJ. 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press. New York, USA. 2011. p. 452-456
62. Whatley H. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. From: Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. Edited by: Petersen J and Mohammad A. Springer Science and business media .2001; Pag: 21-58.
63. Salis A and Monduzzi M. Not only pH. Specific buffer effects in biological systems. *Current opinion in colloid and interface science*. 2016.
64. Pedrós-Marí B. Clonación y caracterización de una hidrofobina de clase II (CaHPB) de *Candida albicans*. Universidad de Valencia. Tesis doctoral. Valencia 2003.