

Caracterización de extractos lipídicos asociados a la pared celular del hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* y su efecto sobre el modelo *Galleria mellonella*



Tesis Doctoral para Optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas

Pedronel Araque Marín

Director:

Carlos Alberto Peláez Jaramillo, MSc. PhD.

Co-directores:

María del Pilar Jiménez Álzate, MSc. Dra.

Cristiano Giordani, MSc, Ph.D.

Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares-GIEM

Grupo de Micología Médica

Posgrado en Ciencias Químicas

Instituto de Química

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Antioquia

Medellín

2020

CONTENIDO

1	RESUMEN.....	26
2	INTRODUCCIÓN	29
3	MARCO TEÓRICO.....	32
3.1	<i>Histoplasma capsulatum</i>	32
3.2	Anfotericina B com alternativa contra <i>Histoplasma capsulatum</i>	33
3.3	Lípidos constituyentes de los hongos patógenos	34
3.3.1	Extracción de lípidos tipo acilglicerol y fosfolípidos.....	40
3.3.2	Extracción de lípidos tipo glicosfingolípidos	41
3.4	<i>Galleria mellonella</i>	41
3.5	Modelo químico	42
3.5.1	Mecánica molecular	43
3.5.2	Métodos de estructura electrónica.....	43
3.6	Monocapas Langmuir-Blodgett.....	44
3.7	Calorimetría diferencial de barrido	45
4	HIPÓTESIS.....	46
5	OBJETIVOS	47
5.1	Objetivo General	47
5.2	Objetivos específicos.....	47
6	ASPECTOS METODOLÓGICOS	48
6.1	Cultivo de <i>Histoplasma capsulatum</i>	48
6.1.1	Fase micelio.....	48
6.1.2	Fase levadura.....	48
6.2	Extracción de lípidos	49
6.2.1	Inactivación de <i>H. capsulatum</i>	49
6.2.2	Extracción de lípidos asociados a la pared celular de la fase micelio	53
6.2.3	Extracción de lípidos asociados a la pared celular de la fase levadura	54
6.3	Caracterización microscópica.....	54
6.3.1	Microscopía óptica	54
6.3.2	Microscopía electrónica de Barrido	54
6.4	Caracterización por cromatografía en capa fina	55
6.5	Cuantificación lipídica por cromatografía gaseosa-GC y líquida de ultra alta eficiencia-UHPLC	56
6.5.1	Preparación de metilésteres de ácidos grasos (FAMES)	56

6.5.2	Condiciones cromatográficas de GC.....	56
6.5.3	Condiciones cromatográficas de UHPLC	58
6.6	Manejo y mantenimiento de la colonia del modelo <i>G. mellonella</i>	58
6.7	Evaluación de la actividad biológica de los extractos de <i>H. capsulatum</i> sobre el modelo <i>G. mellonella</i>	60
6.7.1	Protocolo de preparación de la suspensión de micelio de <i>H. capsulatum</i> :	60
6.7.2	Protocolo control positivo del crecimiento de <i>H. capsulatum</i>	61
6.7.3	Protocolo de evaluación sobre el modelo <i>G. mellonella</i>	61
6.7.4	Protocolo de recuperación de <i>H. capsulatum</i> a partir de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas.	62
6.8	Isotermas de compresión de monocapas lipídicas	63
6.8.1	Preparación de soluciones de propagación	63
6.9	Formulación de liposomas	64
6.9.1	Preparación de liposomas a partir de los extractos lipídicos de <i>H. capsulatum</i>	64
6.9.2	Preparación de liposomas de extractos y anfotericina B	65
6.9.3	Calorimetría de Barrido Diferencial.....	65
6.9.4	Determinación del tamaño de partícula y potencial Z.....	65
6.10	Cálculos teóricos	66
6.11	Modelo estadístico de análisis de datos	66
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
7.1	Inactivación de <i>H. capsulatum</i> en fase micelio	68
7.1.1	Inactivación en fase micelio	68
7.2	Inactivación de <i>H. capsulatum</i> en fase levadura.....	69
7.2.1	Inactivación en fase levadura	69
7.3	Extracción de lípidos asociados a la pared celular de <i>H. capsulatum</i>	72
7.4	Caracterización microscópica de micelio	73
7.5	Caracterización microscópica de levadura.....	75
7.6	Cromatografía de capa fina (CCF)	77
7.6.1	Extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico	77
7.6.2	Extractos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico	78
7.7	Análisis de los extractos provenientes de <i>H. capsulatum</i> por cromatografía gaseosa.....	79
7.7.1	Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	80

7.7.2	Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i>	84
7.7.3	Relación insaturados/saturados para los extractos de la pared celular de las fases micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i>	87
7.8	Cromatografía HPLC-MS.....	91
7.8.1	Composición lipídica de los extractos asociados a La pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico	92
7.8.2	Composición lipídica de los extractos asociados a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico	95
7.8.3	Propuesta de ruta biosintética de fosfolípidos en micelio de <i>H. capsulatum</i>	100
7.8.4	Propuesta de ruta biosintética de fosfolípidos en levadura de <i>H. capsulatum</i>	101
7.8.5	Esfingolípidos asociados a la pared celular de las fases micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico	107
7.9	Evaluación de conidias y formulados de extractos lipídicos asociados a la pared celular de <i>H. capsulatum</i> sobre el modelo <i>G. mellonella</i>	111
7.10	Isotermas de compresión de monocapas con anfotericina B	116
7.11	Isotermas de compresión de monocapas con extractos en cloroformo	120
7.11.1	Áreas moleculares en posición horizontal (A_h)	129
7.11.2	Áreas moleculares en posición vertical (A_v).....	131
7.12	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	135
7.13	Formulación y caracterización de liposomas	137
7.14	Evaluación de liposomas sobre <i>G. mellonella</i>	138
8	CONCLUSIONES	140
9	PERSPECTIVAS Y ESTUDIOS FUTUROS.....	142
10	REFERENCIAS	144
11	ANEXOS.....	157
11.1	Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por GC.....	157
11.2	Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por GC.....	160
11.3	Análisis fracción hexano de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	163
11.4	Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	172
11.5	Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	184

11.6	Análisis fracción metanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	189
11.7	Análisis fracción hexano de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	199
11.8	Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	213
11.9	Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	222
11.10	Análisis fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	237
11.11	Caracterización fisicoquímica de liposomas.....	245
11.12	Cromatografía de capa fina (CCF).....	247
11.12.1	Fracción hexano de micelio de <i>H. capsulatum</i>	247
11.12.2	Fracción cloroformo de micelio de <i>H. capsulatum</i>	248
11.12.3	Fracción isopropanol de micelio de <i>H. capsulatum</i>	249
11.12.4	Fracción metanol de micelio de <i>H. capsulatum</i>	250
11.12.5	Fracción de levadura de <i>H. capsulatum</i>	251
11.12.6	Fracción cloroformo de levadura de <i>H. capsulatum</i>	252
11.12.7	Fracción isopropanol de levadura <i>H. capsulatum</i>	253
11.12.8	Fracción metanol de levadura de <i>H. capsulatum</i>	254
11.13	Soporte Estadístico.....	255
11.13.1	ANOVA Simple – aislamiento clínico fase micelio.....	255
11.13.2	ANOVA Simple – aislamiento ambiental fase micelio.....	259
11.13.3	ANOVA Simple – Abundancia relativas fase micelio	263
11.13.4	ANOVA Simple – Relación insaturados/saturados para micelio	270
11.13.5	ANOVA Simple – Abundancia relativas fase levadura.....	275

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo para el microdominio de membrana fúngica (tomado de Guimarães *et al*, 2014). GlcCer: glucosilceramidas; GIPCs: glicosilinositolfosforilceramidas; Pma1p: membrana plasma ATPasa. 40
- Figura 2. Representación para la caracterización por cromatografía en capa fina: a) sistema inicial con la muestra (punto negro) y fase móvil en el origen de la placa; b) sistema final con las distancias recorridas por el componente (punto negro) y la fase móvil..... 55
- Figura 3. Representación estructural de ácidos grasos: a) ácido cáprico C10:0; b) ácido láurico C12:0; c) ácido mirístico C14:0; d) ácido palmítico C16:0; e) ácido esteárico C18:0; f) ácido oleico C18:1; g) ácido linoleico C18:2; h) ácido linolénico C18:3; i) ácido araquidónico C20:4..... 57
- Figura 4. Proceso de inyección sobre *G. mellonella*: a) proceso de selección del proleg; b) proceso de desinfección; c) proceso de inyección; d) proceso de verificación de retención del líquido inyectado. 62
- Figura 5. Aislamientos de *H. capsulatum* fase micelio en Agar Mycosel: a) aislamiento clínico a los 18 días; b) aislamiento clínico a los 27 días; c) aislamiento ambiental a los 18 días; d) aislamiento ambiental a los 27 días. 67
- Figura 6. Tercera generación de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* en fase micelio..... 68
- Figura 7. Aislamientos de *H. capsulatum* fase levadura: a) clínico; b) ambiental. 71
- Figura 8. Aislamientos de *H. capsulatum* fase levadura antes del proceso de extracción. 71
- Figura 9. Proceso de extracción de lípidos asociados a la pared celular de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*: a) fase micelio; b) fase levadura..... 72
- Figura 10. Caracterización microscópica de micelio de *H. capsulatum* a 10x: a) antes de la extracción; b) después de la extracción..... 74
- Figura 11. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para el micelio de *H. capsulatum* a 200x y 490x: a-b) después del proceso de extracción del aislamiento clínico; c-d) después del proceso de extracción del aislamiento ambiental. 74
- Figura 12. Caracterización por microscópica óptica de levaduras de *H. capsulatum* acopladas a la superficie de las esferas de Sephadex G-100 de los aislamientos ambiental y clínico: a) y b) aislamientos a 10x; c) y d) aislamientos a 40x..... 75
- Figura 13. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para el proceso de extracción de lípidos de la fase levadura del aislamiento ambiental a 600x y 100x: a-b) Sephadex G-100; c-d) Sephadex G-100 con levadura antes del proceso de extracción; e-f) Sephadex G-100 con levadura después del proceso de extracción. 76
- Figura 14. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para el proceso de extracción de la fase levadura del aislamiento clínico a 600x y 100x: a-b) Sephadex G-100; c-d) Sephadex G-100 con levadura antes del proceso de extracción; e-f) Sephadex G-100 con levadura después del proceso de extracción. 76
- Figura 15. Placas cromatografías de las fracciones hexano, cloroformo, isopropanol y metanol de los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga. 78

Figura 16. Placas cromatografías de las fracciones hexano, cloroformo, isopropanol y metanol de los extractos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga.	79
Figura 17. Composición relativa de ácidos grasos en los extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental.....	81
Figura 18. Perfil de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.....	81
Figura 19. Relación insaturados/saturados en los extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.	82
Figura 20. Relación insaturados/saturados en el contenido lipídicos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.....	83
Figura 21. Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental.....	85
Figura 22. Perfil de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.....	85
Figura 23. Relación insaturados/saturados en los extractos lipídicos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.....	86
Figura 24. Relación insaturados/saturados de los extractos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.	87
Figura 25. Relación insaturados/saturados en los extractos de la pared celular de las fases micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.	89
Figura 26. Relación insaturados/saturados de los extractos de la pared celular de micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.....	89
Figura 27. Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.	90
Figura 28. Transformación de ácidos grasos de micelio a levadura: A) biosíntesis de ácidos grasos para microorganismos (Malcicka <i>et al</i> , 2018); B) propuesta de transformación del aislamiento ambiental; C) propuesta de transformación del aislamiento clínico. $\Delta 9$, $\Delta 12$ y $\Delta 15$ hacen referencias a las enzimas acilo-lípido desaturasa.....	90
Figura 29. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase micelio de <i>H. capsulatum</i> basado en los resultados de los aislamientos ambiental y clínico: (1) PA sintasa; (2) Citidildifosfato (DDP)-Diacilglicerol (DAG) transferasa; (3) PS sintasa; (4) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (8) PI sintasa; (9) PG sintasa; (10) fosfolipasa B. La X (negra) representa las vías que no se presentan en el aislamiento ambiental y la X (blanca) representa las vías que no se presentan en el aislamiento clínico.....	102
Figura 30. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental: (1) PA sintasa; (2) DDP-DAG transferasa; (11) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (10) fosfolipasas B.....	103
Figura 31. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico: (1) PA sintasa; (2) DDP-DAG transferasa; (11) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (8) PI sintasa; (9) PG sintasa; (10) fosfolipasas B.	104

Figura 32. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de fase levadura de <i>H. capsulatum</i> basado en los resultados de los aislamientos ambiental y clínico: (1) PA sintasa; (2) DDP-DAG transferasa; (3) PS sintasa; (4) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (8) PI sintasa; (9) PG sintasa; (10) fosfolipasa B. La X (roja) representa las vías que no se presentan en el aislamiento ambiental y la X (amarilla) representa las vías que no se presentan en el aislamiento clínico.	105
Figura 33. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: (1) PA sintasa; (2) DDP-DAG transferasa; (11) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (10) fosfolipasas B.	106
Figura 34. Espectro MS/MS posible de dihexosilceramida (DHC) en extractos lipídicos asociados a la pared celular de las fases de micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico por ESI-MS/MS modo ion positivo.	108
Figura 35. Fragmentación de la dihexosilceramida (DHC) basado en la nomenclatura de Costello (Toledo <i>et al</i> , 2001).	108
Figura 36. Posible ruta biosintética de Dihexosilceramida de fases micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i> basado en los resultados de los aislamientos ambiental: (1) Hexosilceramida sintasa-Gcs1; (2) C9 metil transferasa-Smt1; (3) Hexosilceramida sintasa-Gcs1; (2) Hexosilceramida sintasa-Gcs2; (5) posible Acetil transferasa; (6) Ceramida kinasa.	110
Figura 37: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico sobre la mortalidad de <i>G. mellonella</i>	112
Figura 38: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico sobre la melanización de <i>G. mellonella</i>	112
Figura 39: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico sobre la movilidad de <i>G. mellonella</i>	113
Figura 40: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico sobre el estadio de pupa de <i>G. mellonella</i>	113
Figura 41. Evaluación de conidias y extractos lipídicos asociados a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico sobre el estadio de pupa de <i>G. mellonella</i> después de 24 horas de inyección: a) sin tratamiento; b) control; c) conidias <i>H. capsulatum</i> ; d) extracto clínico al 10^4 $\mu\text{g/mL}$; d) extracto ambiental al 10^4 $\mu\text{g/mL}$	114
Figura 42. Recuperación de aislamientos de <i>H. capsulatum</i> de larvas de <i>G. mellonella</i> en Agar Mycosel: a) macerado de larvas; b) corte de larvas; c) y d) caracterización microscópica de micelio de <i>H. capsulatum</i> a 10x.	115
Figura 43. Representación tridimensional de la molécula de anfotericina B: a) estructura en conectivas; b) estructura conectiva con optimización energética; c) estructura conectiva y esferas; d) estructura en conectivas y esferas tangentes.	117
Figura 44. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón para las monocapas de anfotericina B a volumen creciente.	117

Figura 45. Isoterma de presión superficial-área de anfotericina B extendida sobre buffer Tris 5mM, pH = 7,4. Los ajustes lineales a las porciones lineales de las isotermas de compresión extrapoladas a presión superficial cero apuntan a las áreas moleculares específicas en una posición horizontal (A_h) y en una posición vertical (A_v). El recuadro presenta un modelo de reorientación de las moléculas de Anfotericina B en la subfase a una temperatura de 37 °C.....	118
Figura 46. Modelo de reorientación de la molécula de anfotericina B: A) área molecular específicas en una posición horizontal (A_h); B) área molecular específicas en una posición vertical (A_v). Minimización energética para un valor de -3271,74 kJ/mol.	119
Figura 47. Modelo de reorientación de la molécula de anfotericina B: A) posición horizontal (A_h); B) posición vertical (A_v). Minimización energética para un valor de -3271,74 kJ/mol.....	120
Figura 48: Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental a volumen creciente.	121
Figura 49. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico a volumen creciente.	122
Figura 50. Efecto del volumen de extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico sobre el área del canal de teflón de la monocapa formada a 5 mN/m presión superficial.	122
Figura 51. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas de anfotericina B (50uL) a volumen creciente del extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental.....	123
Figura 52. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas de anfotericina B (50uL) a volumen creciente del extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico.	124
Figura 53. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental (5 μ L) a volumen creciente de anfotericina B.	125
Figura 54. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico (5 μ L) a volumen creciente de anfotericina B.	125
Figura 55. Efecto en el área del canal de teflón de las monocapas de anfotericina B y extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos clínico (5 μ L) y ambiental (5 μ L) a volumen creciente de anfotericina B.	126
Figura 56. Efecto en el área por molécula de las monocapas de anfotericina B y extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos clínico (5 μ L) y ambiental (5 μ L) a volumen creciente de anfotericina B.....	126
Figura 57. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas de anfotericina B (50	127
Figura 58. Isotermas de presión superficial-área por molécula de anfotericina B y mezcla anfotericina B con extractos lipídicos asociados a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> extendidas sobre buffer Tris 5mM, pH = 7,4. Los ajustes lineales a las porciones lineales de las isotermas de compresión extrapoladas a presión superficial cero apuntan a las áreas moleculares específicas en una posición horizontal (A_h) y en una posición vertical (A_v).	128

Figura 59. Modelo de orientación de la molécula de ácido fosfatídico en posición horizontal (A_h). Minimización energética para un valor de -2597,96 kJ/mol.	130
Figura 60. Modelo de empaquetamiento entre la anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: a) vista lateral derecha; b) vista lateral izquierda; c) vista inferior; d) vista superior. Minimización energética para un valor de -5876,54 kJ/mol.	131
Figura 61. Modelo de orientación de la molécula de anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental en posición vertical (A_v). Minimización energética para un valor de -5876,54 kJ/mol.	131
Figura 62. Modelo de empaquetamiento entre la anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental: a) vista lateral derecha; b) vista lateral izquierda; c) vista inferior; d) vista superior. Minimización energética para un valor de -5904,28 kJ/mol.	132
Figura 63. Modelo de orientación de la molécula de anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental en posición horizontal (A_h). Minimización energética para un valor de -5904,28 kJ/mol.	133
Figura 64. Modelo de empaquetamiento entre la anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico: a) vista lateral derecha; b) vista lateral izquierda; c) vista inferior; d) vista superior. Minimización energética para un valor de -8507,29 kJ/mol.	134
Figura 65. Modelo de orientación de la molécula de anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico en posición horizontal (A_h). Minimización energética para un valor de -8507,29 kJ/mol.	134
Figura 66: Calorimetría diferencial de barrido de extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental y mezcla de extracto lipídico con anfotericina B en relación 3:1.	136
Figura 67: Calorimetría diferencial de barrido de extracto de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico y la mezcla de extracto lipídico con anfotericina B en relación 2:1.	

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Modelos de función de anfotericina B en bicapas de fosfolípidos (tomado de Kaminski, 2014): a) modelo de canal iónico con anfotericina B; b) Modelo de adsorción de superficie en el que anfotericina B extrae ergosterol de la bicapa a la superficie; c) Modelo tipo esponja en el que grandes agregados de anfotericina B extraen ergosterol de la membrana de fosfolípidos.	34
Esquema 2. Metabolismo de los ácidos grasos fúngicos (tomado de Beccaccioli <i>et al</i> , 2019).....	35
Esquema 3. Representación de los cinco productos finales predominantes de la biosíntesis de esteroides reportados en 175 especies de hongos en todo el reino Hongos (tomado de Weete <i>et al</i> , 2010).....	36
Esquema 4. Síntesis de esfingolípidos fúngicos (tomado de Beccaccioli <i>et al</i> , 2019).....	37
Esquema 5. Modelo hipotético de la vía biosintética de esfingolípidos en <i>C. neoformans</i> (tomado de (Rhome <i>et al</i> , 2007). Las moléculas de esfingolípidos están en negrita y las enzimas están en cursiva. Los signos de interrogación indican enzimas o actividades que no han sido identificadas u observadas. Los grupos hidroxilo entre paréntesis indican que este grupo puede estar ausente, creando la forma no hidroxilada correspondiente. SPT, serina palmitoiltransferasa; SBK, base quinasa esfingoide; P, fosfato; SBPP, fosfato fosfatasa base esfingoide; SBPL, fosfato liasa base esfingoide; Cer, ceramida; Cdase, ceramidasa; des, desaturasa; Gcs1, glucosilceramida sintasa; GCdasa, glucosilceramidasa; MIPC, manosil-inositol fosforilceramida; M (IP) 2C, ceramida de manosil diinositol fosfato; M2IPC, dimannosil-inositol fosforilceramida.	38
Esquema 6. Ruta biosintética de Glucosilceramida (GluCer) en <i>C. neoformans</i> (tomado de Rhome <i>et al</i> , 2007).	39

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Primera propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	50
Diagrama 2. Segunda propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	50
Diagrama 3. Tercera propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	51
Diagrama 4. Cuarta propuesta de inactivación y extracción lipídica de asociada a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	51
Diagrama 5. Quinta propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	52
Diagrama 6. Sexta propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	52
Diagrama 6. Sexta propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i>	69
Diagrama 7. Propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i>	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Solventes con sus respectivos valores del momento dipolar a 20 °C y clasificación polar.	53
Tabla 2. Condiciones cromatográficas.	58
Tabla 3. Requerimientos nutricionales para la alimentación de <i>G. mellonella</i> .	59
Tabla 4. Promedio de masas de extractos obtenidos con cada solvente.	73
Tabla 5. Condiciones optimizadas para el método en desarrollo.	91
Tabla 6. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental (ND: No Detectado).	92
Tabla 7. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico (ND: No Detectado).	93
Tabla 8. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total de los extractos de la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico (ND: No Detectado).	94
Tabla 9. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento ambiental (ND: No Detectado).	95
Tabla 10. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> del aislamiento clínico (ND: No Detectado).	96
Tabla 11. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total de los extractos de la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico (ND: No Detectado).	98
Tabla 12. Composición de esfingolípidos mayoritarios tentativamente identificados por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total de los extractos de la pared celular de las fases micelio y levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico.	107
Tabla 13. Valores de áreas moleculares de anfotericina B en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) experimentales y comparadas con los valores obtenidos por optimización molecular a un nivel de teoría AM1 utilizando el software SPARTAN Pro.	120
Tabla 14. Valores de áreas moleculares de anfotericina B y mezcla anfotericina B con extracto en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) con sus respectivas presiones superficiales en posición horizontal (P_h) y vertical (P_v).	129
Tabla 15. Valores de áreas moleculares en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) experimentales de anfotericina B y anfotericina B-extracto comparadas con los valores obtenidos por optimización molecular a un nivel de teoría AM1 utilizando el software SPARTAN Pro.	135
Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de liposomas: Tamaño de Partícula (TP); Potencial Z (PZ); Índice de Polidispersidad (IP). (las distribuciones de TP se presentan en los anexos).	138

LISTA DE FIGURAS ANEXOS

Figura Anexo 1. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	157
Figura Anexo 2. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	157
Figura Anexo 3. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	157
Figura Anexo 4. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	158
Figura Anexo 5. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	158
Figura Anexo 6. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	158
Figura Anexo 7. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	159
Figura Anexo 8. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	159
Figura Anexo 9. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	160
Figura Anexo 10. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	160
Figura Anexo 11. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	160
Figura Anexo 12. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	161
Figura Anexo 13. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	161
Figura Anexo 14. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	161
Figura Anexo 15. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	162
Figura Anexo 16. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	162
Figura Anexo 17. Análisis fracción hexano de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.	163
Figura Anexo 18. Espectro MS/MS para un $R_t = 2,92$ fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	163
Figura Anexo 19. Espectro MS/MS para un $R_t = 2,96$ fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	164

Figura Anexo 20. Espectro MS/MS para un Rt = 3,30 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	164
Figura Anexo 21. Espectro MS/MS para un Rt = 4,41 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	165
Figura Anexo 22. Espectro MS/MS para un Rt = 5,84 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	165
Figura Anexo 23. Espectro MS/MS para un Rt = 7,40 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	166
Figura Anexo 24. Espectro MS/MS para un Rt = 8,01 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	166
Figura Anexo 25. Espectro MS/MS para un Rt = 10,20 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	167
Figura Anexo 26. Espectro MS/MS para un Rt = 2,06 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	167
Figura Anexo 27. Espectro MS/MS para un Rt = 2,92 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	168
Figura Anexo 28. Espectro MS/MS para un Rt = 3,06 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	168
Figura Anexo 29. Espectro MS/MS para un Rt = 5,85 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	169
Figura Anexo 30. Espectro MS/MS para un Rt = 7,02 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	169
Figura Anexo 31. Espectro MS/MS para un Rt = 7,42 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	170
Figura Anexo 32. Espectro MS/MS para un Rt = 7,67 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	170
Figura Anexo 33. Espectro MS/MS para un Rt = 7,98 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	171
Figura Anexo 34. Espectro MS/MS para un Rt = 9,95 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	171
Figura Anexo 35. Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	172
Figura Anexo 36. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	172
Figura Anexo 37. Espectro MS/MS para un Rt = 2,27 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	173
Figura Anexo 38. Espectro MS/MS para un Rt = 2,81 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	173
Figura Anexo 39. Espectro MS/MS para un Rt = 2,90 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	174

Figura Anexo 40. Espectro MS/MS para un Rt = 3,29 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	174
Figura Anexo 41. Espectro MS/MS para un Rt = 3,43 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	175
Figura Anexo 42. Espectro MS/MS para un Rt = 4,23 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	175
Figura Anexo 43. Espectro MS/MS para un Rt = 4,85 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	176
Figura Anexo 44. Espectro MS/MS para un Rt = 6,83 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	176
Figura Anexo 45. Espectro MS/MS para un Rt = 8,15 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	177
Figura Anexo 46. Espectro MS/MS para un Rt = 0,62 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	177
Figura Anexo 47. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	178
Figura Anexo 48. Espectro MS/MS para un Rt = 1,11 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	178
Figura Anexo 49. Espectro MS/MS para un Rt = 1,19 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	179
Figura Anexo 50. Espectro MS/MS para un Rt = 2,27 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	179
Figura Anexo 51. Espectro MS/MS para un Rt = 2,81 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	180
Figura Anexo 52. Espectro MS/MS para un Rt = 2,89 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	180
Figura Anexo 53. Espectro MS/MS para un Rt = 3,17 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	181
Figura Anexo 54. Espectro MS/MS para un Rt = 3,18 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	181
Figura Anexo 55. Espectro MS/MS para un Rt = 3,35 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	182
Figura Anexo 56. Espectro MS/MS para un Rt = 5,92 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	182
Figura Anexo 57. Espectro MS/MS para un Rt = 6,03 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	183
Figura Anexo 58. Espectro MS/MS para un Rt = 7,93 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	183
Figura Anexo 59. Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	184

Figura Anexo 60. Espectro MS/MS para un Rt = 0,59 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	184
Figura Anexo 61. Espectro MS/MS para un Rt = 0,98 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	185
Figura Anexo 62. Espectro MS/MS para un Rt = 3,03 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	185
Figura Anexo 63. Espectro MS/MS para un Rt = 7,32 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	186
Figura Anexo 64. Espectro MS/MS para un Rt = 0,59 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	186
Figura Anexo 65. Espectro MS/MS para un Rt = 0,98 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	187
Figura Anexo 66. Espectro MS/MS para un Rt = 1,25 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	187
Figura Anexo 67. Espectro MS/MS para un Rt = 4,46 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	188
Figura Anexo 68. Espectro MS/MS para un Rt = 7,32 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	188
Figura Anexo 69. Análisis fracción metanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	189
Figura Anexo 70. Espectro MS/MS para un Rt = 0,42 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	189
Figura Anexo 71. Espectro MS/MS para un Rt = 2,81 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	190
Figura Anexo 72. Espectro MS/MS para un Rt = 3,14 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	190
Figura Anexo 73. Espectro MS/MS para un Rt = 5,80 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	191
Figura Anexo 74. Espectro MS/MS para un Rt = 7,43 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	191
Figura Anexo 75. Espectro MS/MS para un Rt = 0,42 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	192
Figura Anexo 76. Espectro MS/MS para un Rt = 0,65 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	192
Figura Anexo 77. Espectro MS/MS para un Rt = 1,51 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	193
Figura Anexo 78. Espectro MS/MS para un Rt = 3,16 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	193
Figura Anexo 79. Espectro MS/MS para un Rt = 3,36 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	194

Figura Anexo 80. Espectro MS/MS para un Rt = 3,39 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	194
Figura Anexo 81. Espectro MS/MS para un Rt = 4,28 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	195
Figura Anexo 82. Espectro MS/MS para un Rt = 4,42 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	195
Figura Anexo 83. Espectro MS/MS para un Rt = 4,58 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	196
Figura Anexo 84. Espectro MS/MS para un Rt = 4,95 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	196
Figura Anexo 85. Espectro MS/MS para un Rt = 5,03 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	197
Figura Anexo 86. Espectro MS/MS para un Rt = 5,17 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	197
Figura Anexo 87. Espectro MS/MS para un Rt = 5,37 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	198
Figura Anexo 88. Espectro MS/MS para un Rt = 5,74 = 5,80 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	198
Figura Anexo 89. Análisis fracción hexano de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.	199
Figura Anexo 90. Espectro MS/MS para un Rt = 0,48 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	199
Figura Anexo 91. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	200
Figura Anexo 92. Espectro MS/MS para un Rt = 0,80 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	200
Figura Anexo 93. Espectro MS/MS para un Rt = 1,11 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	201
Figura Anexo 94. Espectro MS/MS para un Rt = 2,36 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	201
Figura Anexo 95. Espectro MS/MS para un Rt = 3,17 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	202
Figura Anexo 96. Espectro MS/MS para un Rt = 3,76 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	202
Figura Anexo 97. Espectro MS/MS para un Rt = 3,85 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	203
Figura Anexo 98. Espectro MS/MS para un Rt = 3,93 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	203
Figura Anexo 99. Espectro MS/MS para un Rt = 5,05 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	204

Figura Anexo 100. Espectro MS/MS para un Rt = 6,35 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	204
Figura Anexo 101. Espectro MS/MS para un Rt = 6,54 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	205
Figura Anexo 102. Espectro MS/MS para un Rt = 0,48 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	205
Figura Anexo 103. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	206
Figura Anexo 104. Espectro MS/MS para un Rt = 0,80 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	206
Figura Anexo 105. Espectro MS/MS para un Rt = 2,25 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	207
Figura Anexo 106. Espectro MS/MS para un Rt = 2,40 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	207
Figura Anexo 107. Espectro MS/MS para un Rt = 3,17 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	208
Figura Anexo 108. Espectro MS/MS para un Rt = 3,31 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	208
Figura Anexo 109. Espectro MS/MS para un Rt = 3,47 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	209
Figura Anexo 110. Espectro MS/MS para un Rt = 3,76 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	209
Figura Anexo 111. Espectro MS/MS para un Rt = 3,86 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	210
Figura Anexo 112. Espectro MS/MS para un Rt = 3,96 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	210
Figura Anexo 113. Espectro MS/MS para un Rt = 5,05 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	211
Figura Anexo 114. Espectro MS/MS para un Rt = 6,35 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	211
Figura Anexo 115. Espectro MS/MS para un Rt = 6,54 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	212
Figura Anexo 116. Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	213
Figura Anexo 117. Espectro MS/MS para un Rt = 0,48 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	213
Figura Anexo 118. Espectro MS/MS para un Rt = 0,86 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	214
Figura Anexo 119. Espectro MS/MS para un Rt = 1,17 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	214

Figura Anexo 120. Espectro MS/MS para un Rt = 1,26 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	215
Figura Anexo 121. Espectro MS/MS para un Rt = 2,02 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	215
Figura Anexo 122. Espectro MS/MS para un Rt = 2,25 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	216
Figura Anexo 123. Espectro MS/MS para un Rt = 2,34 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	216
Figura Anexo 124. Espectro MS/MS para un Rt = 2,47 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	217
Figura Anexo 125. Espectro MS/MS para un Rt = 2,85 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	217
Figura Anexo 126. Espectro MS/MS para un Rt = 3,18 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	218
Figura Anexo 127. Espectro MS/MS para un Rt = 3,31 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	218
Figura Anexo 128. Espectro MS/MS para un Rt = 3,49 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	219
Figura Anexo 129. Espectro MS/MS para un Rt = 3,77 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	219
Figura Anexo 130. Espectro MS/MS para un Rt = 4,06 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	220
Figura Anexo 131. Espectro MS/MS para un Rt = 4,85 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	220
Figura Anexo 132. Espectro MS/MS para un Rt = 6,43 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamiento ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	221
Figura Anexo 133. Espectro MS/MS para un Rt = 6,50 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	221
Figura Anexo 134. Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.	222
Figura Anexo 135. Espectro MS/MS para un Rt = 0,59 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	222
Figura Anexo 136. Espectro MS/MS para un Rt = 0,75 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	223
Figura Anexo 137. Espectro MS/MS para un Rt = 2,34 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	223
Figura Anexo 138. Espectro MS/MS para un Rt = 2,67 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	224
Figura Anexo 139. Espectro MS/MS para un Rt = 2,74 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	224

Figura Anexo 140. Espectro MS/MS para un $R_t = 2,86$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	225
Figura Anexo 141. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,20$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	225
Figura Anexo 142. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,33$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	226
Figura Anexo 143. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,50$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	226
Figura Anexo 144. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,66$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	227
Figura Anexo 145. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,92$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	227
Figura Anexo 146. Espectro MS/MS para un $R_t = 4,10$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	228
Figura Anexo 147. Espectro MS/MS para un $R_t = 4,24$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	228
Figura Anexo 148. Espectro MS/MS para un $R_t = 4,81$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	229
Figura Anexo 149. Espectro MS/MS para un $R_t = 5,22$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	229
Figura Anexo 150. Espectro MS/MS para un $R_t = 6,59$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	230
Figura Anexo 151. Espectro MS/MS para un $R_t = 7,25$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	230
Figura Anexo 152. Espectro MS/MS para un $R_t = 7,57$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	231
Figura Anexo 153. Espectro MS/MS para un $R_t = 2,72$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	231
Figura Anexo 154. Espectro MS/MS para un $R_t = 2,86$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	232
Figura Anexo 155. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,03$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	232
Figura Anexo 156. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,04$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	233
Figura Anexo 157. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,33$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	233
Figura Anexo 158. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,40$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	234
Figura Anexo 159. Espectro MS/MS para un $R_t = 3,48$ fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	234

Figura Anexo 160. Espectro MS/MS para un Rt = 3,66 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	235
Figura Anexo 161. Espectro MS/MS para un Rt = 3,92 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	235
Figura Anexo 162. Espectro MS/MS para un Rt = 4,10 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	236
Figura Anexo 163. Análisis fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i> por ESI-MS/MS modo ion positivo.....	237
Figura Anexo 164. Espectro MS/MS para un Rt = 1,50 fracción metanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	237
Figura Anexo 165. Espectro MS/MS para un Rt = 2,34 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	238
Figura Anexo 166. Espectro MS/MS para un Rt = 2,67 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	238
Figura Anexo 167. Espectro MS/MS para un Rt = 2,86 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	239
Figura Anexo 168. Espectro MS/MS para un Rt = 3,04 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	239
Figura Anexo 169. Espectro MS/MS para un Rt = 3,20 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	240
Figura Anexo 170. Espectro MS/MS para un Rt = 3,33 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamiento ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	240
Figura Anexo 171. Espectro MS/MS para un Rt = 3,50 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	241
Figura Anexo 172. Espectro MS/MS para un Rt = 3,66 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	241
Figura Anexo 173. Espectro MS/MS para un Rt = 3,92 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	242
Figura Anexo 174. Espectro MS/MS para un Rt = 4,10 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	242
Figura Anexo 175. Espectro MS/MS para un Rt = 4,18 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	243
Figura Anexo 176. Espectro MS/MS para un Rt = 4,81 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	243
Figura Anexo 177. Espectro MS/MS para un Rt = 5,22 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	244
Figura Anexo 178. Espectro MS/MS para un Rt = 6,01 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de <i>H. capsulatum</i>	244
Figura Anexo 179. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i>	245

Figura Anexo 180. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de <i>H. capsulatum</i> con anfotericina B.	245
Figura Anexo 181. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i>	246
Figura Anexo 182. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de <i>H. capsulatum</i> con anfotericina B.	246
Figura Anexo 182. Placas cromatografías de la fracción hexano del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.....	247
Figura Anexo 183. Placas cromatografías de la fracción cloroformo del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.....	248
Figura Anexo 184. Placas cromatografías de la fracción isopropanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.....	249
Figura Anexo 185. Placas cromatografías de la fracción metanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.....	250
Figura Anexo 186. Placas cromatografías de la fracción hexano del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga. 251	251
Figura Anexo 187. Placas cromatografías de la fracción cloroformo del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga.....	252
Figura Anexo 188. Placas cromatografías de la fracción isopropanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga.....	253
Figura Anexo 189. Placas cromatografías de la fracción metanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de <i>H. capsulatum</i> de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga. 254	254

ABREVIATURAS

Ácido fosfatídico (PA)

Austin Model 1 (AM1)

BHI suplementado: BHI suplementado con glucosa al 1 % L- cisteína al 0,01 %, solución de antibióticos gentamicina y penicilina al 0,1 % y sangre de carnero al 5 %.

Brain Hearth Infusion (BHI)

Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

Cromatografía en capa fina (CCF)

Cromatografía gaseosa (GC)

Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC)

Diacilglicerol (DG)

Fosfatidilglicerol (PG)

Fosfatidilinositol (PI)

Fosfatidilcolina (PC)

Fosfatidiletanolamina (PE)

Fosfatidilserina (PS)

Galleria mellonella (*G. mellonella*)

Glicosilinositolfosforilceramides (GIPCs)

Glucosilceramidas (GlcCer)

Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM)

Histoplasma capsulatum (*H. Capsulatum*)

Inositol fosforil ceramida (IPC)

Langmuir-Blodgett (L-B)

Liso-Fosfatidiletanolamina (LPE)

Liso-Fosfatidilcolina (LPC)

Liso-ácido fosfatídico (LPA)

Liso-Fosfatidilinositol (LPI)

Liquid Chromatography (LC)

Liquid Chromatography Mass/Mass (LC MS/MS)

Metilésteres de ácidos grasos (FAMES)

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Monoacilglicerol (MG)

Mycosel (MyC)

Papa-Dextrosa-Agar (PDA)

Plasma membrane ATPase (Pma1p)

Retention Factor (Rf)

Teoría del funcional de la densidad (DFT).

Thin Layer chromatography (TLC)

Timerosal: Sal sódica de mercurio ((*o*-carboxifenil)tio) etilo

Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

1 RESUMEN

Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico térmico y nutricional. En el ambiente, hasta una temperatura aproximada de 28 °C crece como un moho (micelio) compuesto por hifas septadas hialinas, macroconidias tuberculadas de 7 a 15 µm y microconidias de pared delgada de 2 a 6 µm. Estas últimas en conjunto con los fragmentos de hifas, constituyen las partículas infectantes que en el hospedero o en cultivos a 37 °C, se transforman en blastoconidias, que constituyen la forma parasitaria (levadura). La infección con *H. capsulatum* es considerada un evento accidental dado que las partículas infectantes del micelio al ser inhaladas, llegan al alvéolo donde se convierten en levadura. Sin embargo, entre las alternativas para el entendimiento de la virulencia de *H. capsulatum*, se han realizado estudios sobre el contenido de lípidos de las fases de micelio y levadura de aislamientos clínicos para establecer su relación con la patogenicidad, sin tener estudios comparativos sobre aislamientos ambientales. Para el estudio de la interacción de *H. capsulatum*-hospedero se han utilizado líneas celulares (células obtenidas de pacientes con las micosis) y ratones, lo que ha permitido dilucidar mecanismos de infección de esta interacción; con las desventajas del costo en su mantenimiento, el personal entrenado para su manipulación y tiene consideraciones éticas y legales.

El presente trabajo pretende caracterizar químicamente la composición lipídica asociada a la pared celular del hongo *H. capsulatum* y evaluar su efecto biológico sobre un modelo invertebrado alternativo al ratón, la *Galleria mellonella*, que entre las ventajas vale la pena destacar que las larvas son de fácil manejo, pueden ser incubadas a temperaturas entre 20 °C y 37 °C, su mantenimiento es poco costoso, tiene respuesta inmune tanto humoral como celular y no tiene consideraciones éticas asociadas.

El aislamiento clínico se obtuvo mediante una biopsia de un paciente por el Grupo de Micología Médica y el aislamiento ambiental se obtuvo de muestras de enmiendas orgánicas proporcionadas por el Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares-GIEM de la Universidad de Antioquia. Las fases micelio y levadura de ambos tipos de aislamientos de *H. capsulatum* se inactivaron en hexano a 23 °C.

El crecimiento de *H. capsulatum* se controló mensualmente para verificar la viabilidad del hongo y posteriormente el hongo inactivo se sometió a extracción Soxhlet, utilizando hexano como disolvente primario, seguido de cloroformo, isopropanol y finalmente con metanol. La caracterización de los extractos se realizó por cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de ultra alto rendimiento. Los extractos lipídicos y liposomas formulados a partir de los extractos, fueron evaluados sobre el modelo biológico *G. mellonella*. El periodo de permanencia del hongo en su fase micelio en solvente hexano fue de cinco meses para garantizar su inactividad. En la caracterización química de los extractos se presentaron diferencias entre los aislamientos ambiental y clínico de la fase micelio, pero no de la fase levadura. Los extractos lipídicos y los liposomas formulados a partir de los extractos de micelio y levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* no presentaron efectos apreciables sobre el modelo *G. mellonella*, dado que no se observó mortalidad, melanización, alteración de la movilidad de larvas y efecto para llegar al estadio de pupa, durante el tiempo de exposición de 48 horas.

El estudio comparativo del análisis lipídico de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum* entre aislamientos ambiental y clínico abre el camino para el entendimiento del rol de los lípidos asociados a la pared celular en la biología del hongo, además las isotermas de presión superficial-área de monocapas de los extractos lipídicos y la molécula anfotericina B, no solo

nos posibilita comprender la relación de interacción entre la anfotericina B y las fracciones lipídicas de *H. capsulatum*, sino que también nos permite a proponer formulaciones tipo liposomas con índice de selectividad mayor.

Palabras Clave: *Histoplasma capsulatum*, extractos lipídicos, liposomas, *Galleria mellonella*, anfotericina B, HUPLC-MS-S, Fosfolípidos, Monohexiceramida

2 INTRODUCCIÓN

La histoplasmosis es una micosis sistémica endémica de compromiso pulmonar primario, los síntomas incluyen malestar, fiebre, dolor de pecho y tos seca, sin embargo, suele diseminarse a otros órganos, como los del sistema retículo endotelial, entre otros (Jiménez *et al*, 2002). La enfermedad se adquiere por inhalación de propagulos infectantes del hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, cuyo hábitat natural son los suelos, especialmente aquellos con presencia de excrementos de aves y murciélagos (Emmons, 1950; Jiménez *et al*, 2002). A temperatura ambiente, el hongo crece como micelio compuesto por hifas septadas hialinas, el cual se reproduce asexualmente y produce macroconidias tuberculadas y microconidias. Los fragmentos del micelio y microconidias, constituyen las partículas infectantes del hongo (Kauffman, 2007; Abidon, 2009).

La histoplasmosis es endémica en casi todo el mundo, sin embargo, es en el continente americano donde se presenta la mayor incidencia, especialmente en agricultores, granjeros, constructores, exploradores y espeleólogos, en quienes las posibilidades de contacto con el patógeno son mayores (Jiménez *et al*, 2002). Anteriormente la micosis fue considerada rural, pero actualmente se reportan brotes en zonas urbanas, debido a las nuevas construcciones en áreas arborizadas, tala de árboles, demoliciones y uso de suelos con fertilizantes orgánicos como la gallinaza (Ordóñez *et al*, 1997; Jiménez *et al*, 2002; Gómez *et al*, 2017; Gómez *et al*, 2019).

La infección con *H. capsulatum* es considerada un evento accidental que se presenta cuando se perturba una fuente contaminada y se aerolizan las partículas infectantes que, al ser

inhaladas, llegan al alvéolo donde se convierten en la forma parasitaria (Porta *et al*, 2010; Kauffman, 2007). El desarrollo de la histoplasmosis, depende de condiciones tanto del hospedero como del hongo. Así, en el caso del hospedero, dependerá del estado de su sistema inmune y los defectos estructurales del pulmón, y en el caso del hongo, dependerá de la cantidad de hongo inhalado y su virulencia (Kauffman, 2007; Garfoot & Rappleye, 2015).

Entre las alternativas para el entendimiento de la virulencia de *H. capsulatum*, se han realizado estudios sobre el contenido de lípidos del hongo (Nielsen, 1966), los cuales han planteado la posible correlación entre el contenido lipídico y la virulencia del hongo. Hasta la fecha, se han sugerido alternativas de identificación, aislamiento y caracterización de la composición lipídica de las fases de micelio y levadura (Zarnowski, et al. 2008) y vesículas (Albuquerque, et al. 2008) para establecer su relación con la patogenicidad (Alvarez *et al*, 2007; Weete *et al*, 2010; Barreto-Bergter *et al*, 2011; Guimarães *et al*, 2014).

Se han utilizado diferentes modelos para estudiar el papel de los lípidos en la virulencia de hongos patógenos al hombre entre ellos: líneas celulares, células obtenidas de pacientes con las micosis correspondientes, ratones e insectos. En el caso del modelo con el invertebrado *Galleria mellonella* se ha utilizado para estudiar la patogenicidad de hongos como: *Aspergillus fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* (Reeves *et al*, 2004, Scorzoni *et al*, 2015, Mylonakis *et al*, 2005, Mesa-Arango *et al*, 2013, Li *et al*, 2013). Los resultados de estos trabajos han permitido dilucidar que los lípidos contribuyen a la patogénesis de las enfermedades fúngicas infecciosas. Por lo anterior en el presente trabajo se caracterizó y comparó químicamente la

composición lipídica asociada a la pared celular de las fases micelio y de levadura de *H. capsulatum* de un aislamiento ambiental y uno clínico. Se evaluó el efecto de los extractos lipídicos sobre el modelo biológico *G. mellonella* y caracterizó biofísicamente la variación de la energía libre de Gibbs, entalpía de interacción y temperatura entre los extractos lipídicos asociados a la pared celular de la fase micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico con el fármaco anfotericina B utilizado en el tratamiento clínico de la histoplasmosis en las formas severas de la enfermedad.

La realización de estos trabajos permitirá comprender mejor el metabolismo de los lípidos en los hongos patógenos y su importancia en la virulencia y ayudar a identificar y desarrollar estrategias terapéuticas antifúngicas nuevas y más eficientes.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 *Histoplasma capsulatum*

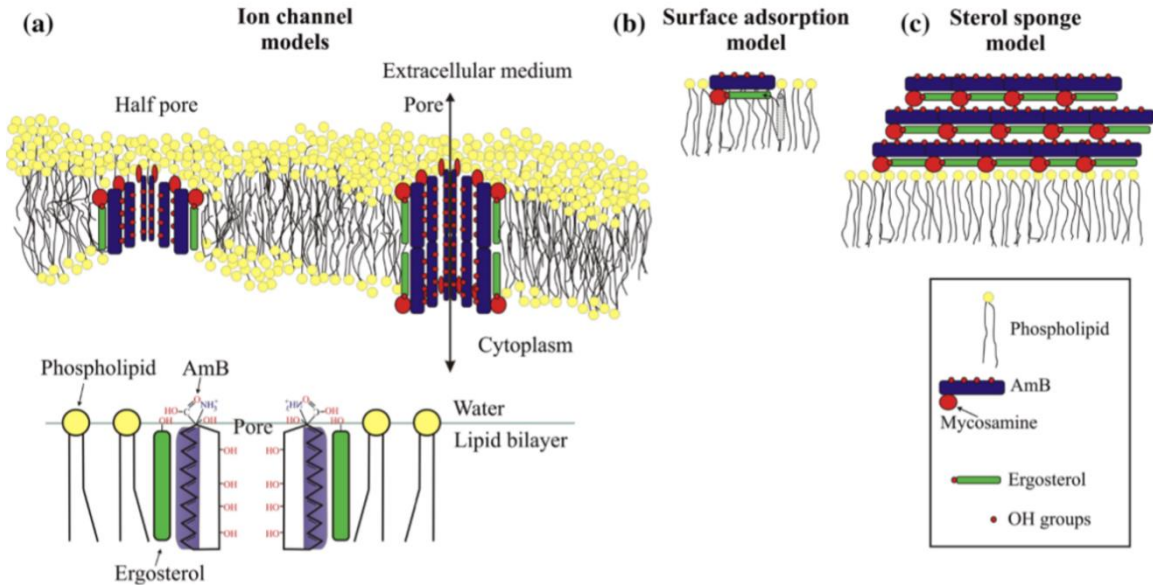
Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico térmico. En el ambiente, hasta una temperatura aproximada de 28 °C crece como un moho compuesto por hifas septadas hialinas, macroconidias tuberculadas de 7 a 15 µm y microconidias de pared delgada de 2 a 6 µm. Estas últimas en conjunto con los fragmentos de hifas, constituyen las partículas infectantes; por otra parte, en el hospedero o en cultivos a 37 °C, se transforman en levaduras, que constituye la forma parasitaria, compuesta por blastoconidias intracelulares que miden de 2 a 4 µm (Kauffman, 2007; Abidon, 2009).

La infección con *H. capsulatum* es un evento accidental que se presenta cuando se perturba una fuente contaminada y se aerolizan las partículas infectantes que, al ser inhaladas, llegan al alvéolo donde se convierten en la forma parasitaria (Porta *et al*, 2010; Kauffman, 2007). El desarrollo de la histoplasmosis, depende de condiciones tanto del hospedero como del hongo. Así, en el caso del hospedero, dependerá del estado de su sistema inmune y los defectos estructurales del pulmón, y en el caso del hongo, dependerá de la cantidad de hongo inhalado y su virulencia (Kauffman, 2007; Garfoot & Rapple, 2015). Como resultado, las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden ir desde una infección asintomática, hasta una forma diseminada progresiva y letal (Knox & Hage, 2010; Kauffman, 2007; Abidon, 2009). Además, en el hospedero, queda un foco latente que puede reactivarse ante la aparición de factores de riesgo que disminuyen la respuesta inmune como: trasplantes, malignidades hematológicas, tratamiento con corticosteroides o estados avanzados de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana VIH-SIDA (Kauffman, 2007; Gómez, 2011; Nieto-Ríos *et al*, 2014).

3.2 Anfotericina B com alternativa contra *Histoplasma capsulatum*

Como alternativa al tratamiento de la histoplasmosis se encuentra la anfotericina B, la cual como antibiótico y antimicótico (Carrillo-Munoz *et al.* 2006; Cereghetti & Carreira 2006), ha demostrado la efectividad para el control de la infección generada por *H. capsulatum* (Fernández *et al.*, 2003). El mecanismo de acción de la anfotericina B (Esquema 1), se basa en la unión del fármaco al ergosterol de la membrana celular del hongo, generando la formación de canales que facilitan la salida del contenido citoplásmico y la consecuente muerte celular (Finkelstein & Holz, 1973; (Kaminski, 2014). Sin embargo, sus efectos adversos y toxicidad requieren en ocasiones la interrupción del tratamiento a pesar de la presencia de una infección micótica grave. Su principal toxicidad crónica se manifiesta a nivel renal, el cual se manifiesta como insuficiencia renal, hipocalcemia, hipomagnesemia, acidosis metabólica y poliuria secundaria a diabetes insípida (Laniado & Cabrales, 2009).

En la última década, se han realizado progresos sustanciales en la comprensión de la organización y la actividad biológica de la anfotericina B en presencia de esteroides en entornos lipídicos, centrados en las interacciones de anfotericina B con lípidos y esteroides, formación de canales de anfotericina B en membranas, agregación de moléculas de anfotericina B (Kaminski, 2014). La mayoría de los estudios para mejorar el perfil de toxicidad de la anfotericina B se han enfocado en la preparación de formulaciones liposomales para el tratamiento de la histoplasmosis (Hamill, 2013; Stone *et al.*, 2016). En el estudio de liposomas de anfotericina B, se hace referencia al estudio de monocapas en la interfaz agua-gas, monocapas depositadas en un sustrato sólido mediante el uso de la técnica de Langmuir-Blodgett, micelas, vesículas y multicapas (Kaminski, 2014).

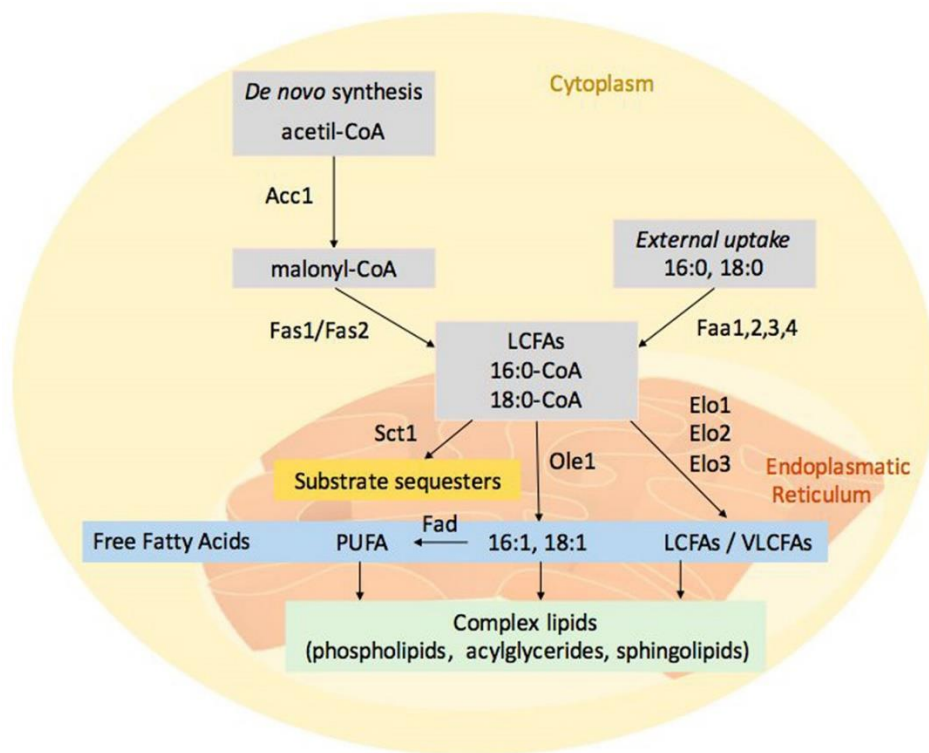


Esquema 1. Modelos de función de anfotericina B en bicapas de fosfolípidos (tomado de Kaminski, 2014): **a)** modelo de canal iónico con anfotericina B; **b)** Modelo de adsorción de superficie en el que anfotericina B extrae ergosterol de la bicapa a la superficie; **c)** Modelo tipo esponja en el que grandes agregados de anfotericina B extraen ergosterol de la membrana de fosfolípidos.

3.3 Lípidos constituyentes de los hongos patógenos

Estudios sobre el contenido lipídico de *Blastomyces dermatitides* (Disalvo & Denton, 1963; Cox & Best, 1972), *Candida albicans* (Peck & Hauser, 1947); *H. capsulatum* (Nielsen, 1966), *Coccidioides immitis* (Anderes *et al*, 1973) y *Paracoccidioides brasiliensis* (Manocha, 1979) dieron inicio al entendimiento de la existencia de una posible correlación entre el contenido lipídico con la virulencia de estos hongos. Actualmente se ha prestado atención a los lípidos constituyentes de los hongos patógenos primarios y oportunistas (Esquema 2), principalmente aquellos que componen su membrana plasmática ya que pueden ser importantes en el proceso infeccioso (Beccaccioli *et al*, 2019). Los ácidos grasos se derivan tanto de la síntesis de novo como de la absorción externa. La acetil-CoA carboxilasa (**Acc1**) cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA y el complejo de ácido graso sintasa citosólico multi-enzima (**Fas1/Fas2**) genera el acil-CoA con una longitud de cadena de acilo

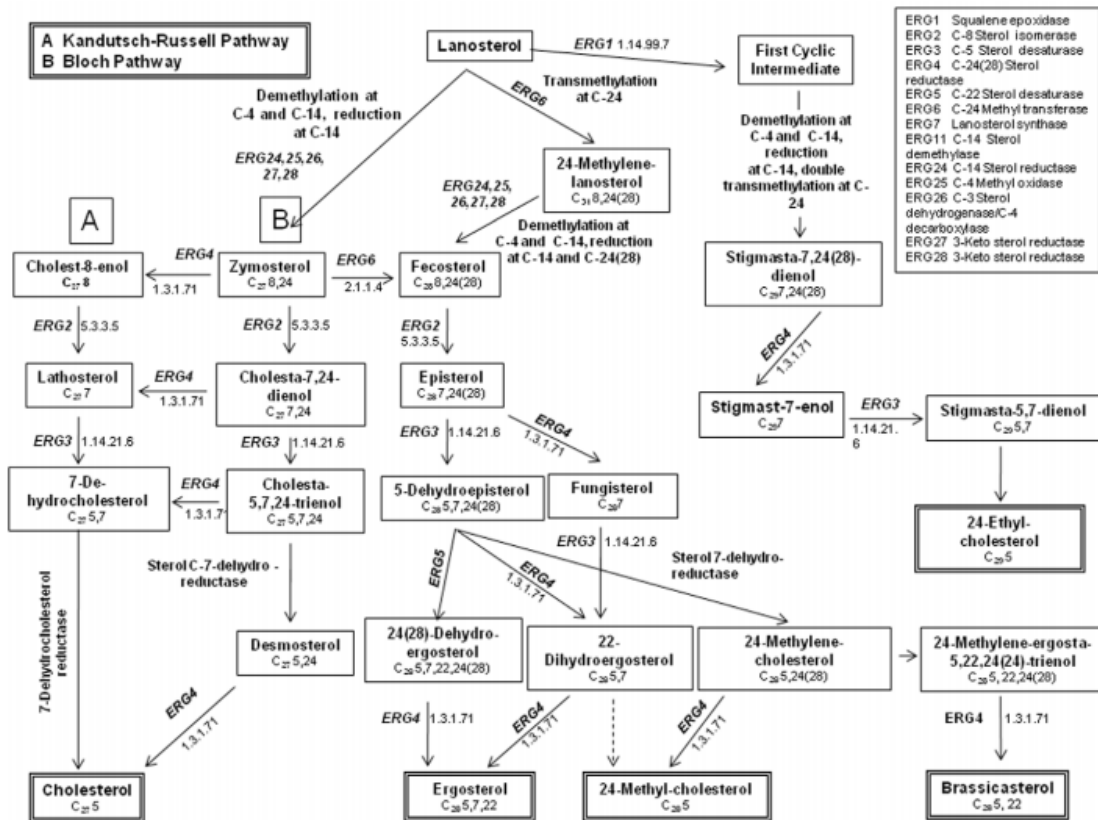
de 16 o 18 átomos de carbono. Los ácidos grasos de cadena larga (**LCFAs**) y de cadena muy larga (**VLCFAs**) se localizan en el retículo endoplasmático. La maquinaria de alargamiento presenta diferentes enzimas de alargamiento de ácidos grasos **Elo1**, **Elo2** y **Elo3**. **Elo1** tiene especificidad para el alargamiento de ácidos grasos C12-16 a C16-18, mientras que **Elo2** alarga C16-18 hasta C22 y **Elo3** alarga C18 hasta C26. **Ole1** y otras desaturasas (**Fad**) respectivamente pueden convertir los ácidos grasos fundamentales, 16:0-CoA y 18:0-CoA, en ácidos grasos mono y poliinsaturados (**PUFA**). FFA se puede incorporar en lípidos de membrana complejos (fosfolípidos, acilglicéridos y esfingolípidos). La enzima **Sct1** es un competidor **Ole1**; Su acción reduce la formación de **PUFA** (Beccaccioli *et al*, 2019).



Esquema 2. Metabolismo de los ácidos grasos fúngicos (tomado de Beccaccioli *et al*, 2019).

En la membrana celular de los hongos, existen microdominios de esteroides (Esquema 3), como el colesterol, ergosterol (el esteroide primario en muchos grupos de hongos), 24-metil

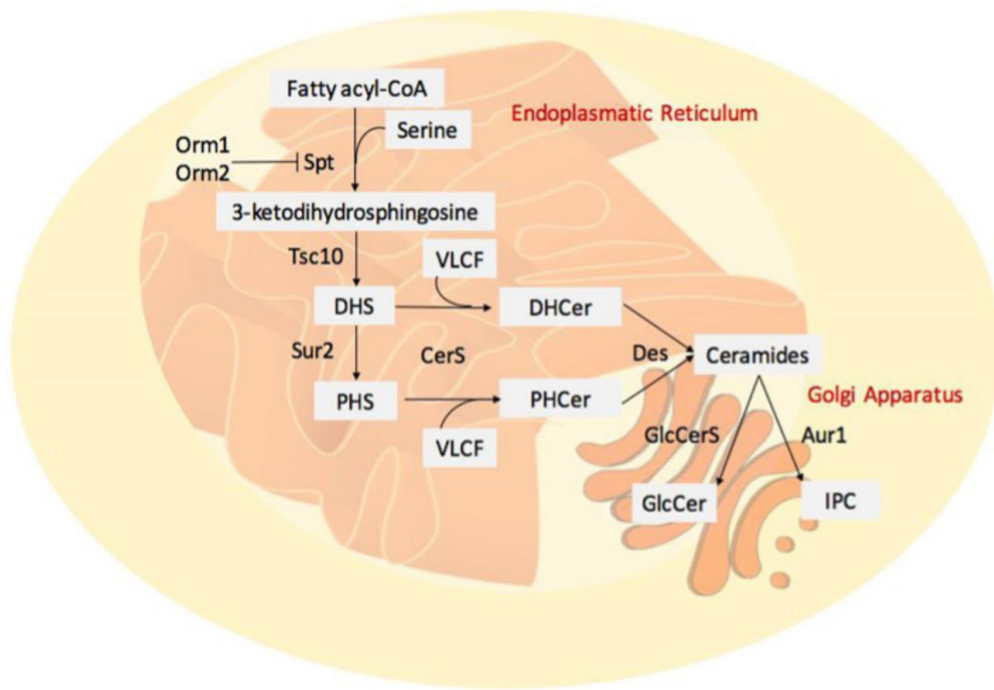
colesterol, 24-etil colesterol y brasicasterol e intermedios en la formación de 24-etil colesterol (Weete *et al*, 2010). Estos microdominios pueden formarse por el agrupamiento de balsas lipídicas que pueden actuar como centros organizadores de la membrana ya que se asocian con proteínas específicas (Czub & Baginski, 2006; Guimarães *et al*, 2014).



Esquema 3. Representación de los cinco productos finales predominantes de la biosíntesis de esteroides reportados en 175 especies de hongos en todo el reino Hongos (tomado de Weete *et al*, 2010).

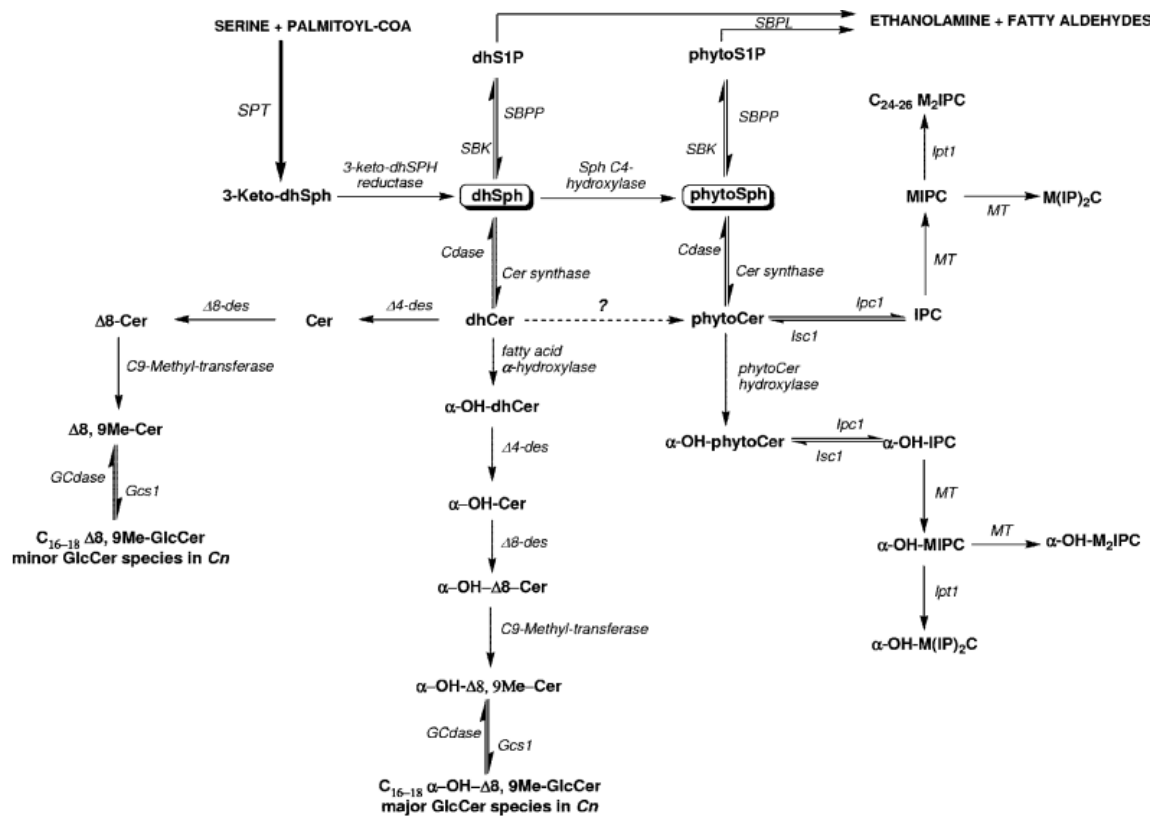
Los esfingolípidos más abundantes en los hongos son las glucosilceramidas, que están ubicadas preferencialmente en la monocapa externa de la membrana citoplasmática y son estructuralmente diferentes de las glucosilceramidas humanas (Rodrigues *et al*, 2007). La síntesis de novo (Esquema 4) comienza con la condensación de una serina con acil-CoA graso, es catalizada por el complejo serina palmitoil-transferasa (**spt**). **Orm1** y **Orm2** pueden

unirse al complejo **spt** e inhibir su actividad. Se forma 3-cetodihidrosfingosina y la reductasa **Tsc10** cataliza la formación de dihidrosfingosina (**DHS**), puede ser hidroxilada por una esfingolípida C4-hidroxilasa (**Sur2**) para generar la fitosfingosina (**PHS**). La asociación entre las bases de cadena larga (**DHS** o **PHS**) y **VLCFA** es catalizada por el complejo de ceramida sintasa (**CerS**) que conduce a dihidroceramida (**DHCer**) y fitoceramida (**PHCer**). Las desaturasas (**Des**) forman las ceramidas. Las ceramidas complejas pueden presentar varios grupos principales, las glucosilceramidas (**GlcCer**) y las fosfoinositol ceramidas (**IPC**) son un ejemplo (Beccaccioli *et al*, 2019). Además, en la vía de síntesis de esfingolípidos, hay un paso enzimático catalizado por la Inositol fosforil ceramida (IPC) sintasa la cual es un enzima fundamental para la síntesis de inositolfosforilceramidas. Ya que este paso de síntesis que no es compartido con los mamíferos, ha sido de especial interés para el desarrollo de antifúngicos específicos con menores efectos secundarios y que prevengan la toxicidad en el hospedero (Zhong *et al*, 2000; Sugimoto *et al*, 2004).

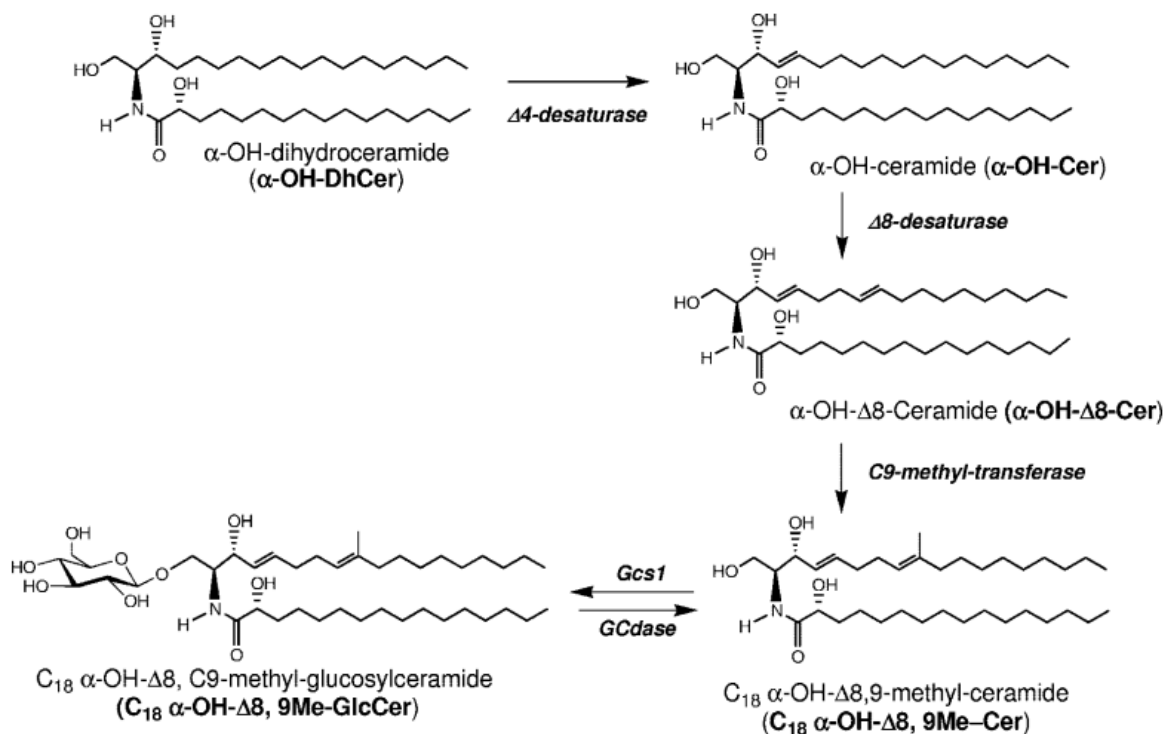


Esquema 4. Síntesis de esfingolípidos fúngicos (tomado de Beccaccioli *et al*, 2019).

Múltiples trabajos de investigación confirman el papel en la patogénesis fúngica de las glucosilceramidas (GlcCer) y su influencia en las interacciones hospedero-patógeno. Aislamientos mutados de *Cryptococcus neoformans* que carecen de GlcCer son incapaces de crecer *in vitro* a pH neutro o alcalino y en presencia de 5 % de CO₂, condiciones que imitan el ambiente extracelular tal como el espacio alveolar o el torrente sanguíneo (Rittershaue *et al*, 2006). Igualmente, en otros estudios realizados con inmunización pasiva con un anticuerpo monoclonal dirigido a las moléculas de GlcCer, se reportó elevada supervivencia de ratones infectados con *C. neoformans* (Rodríguez *et al*, 2007).



Esquema 5. Modelo hipotético de la vía biosintética de esfingolípidos en *C. neoformans* (tomado de (Rhome *et al*, 2007). Las moléculas de esfingolípidos están en negrita y las enzimas están en cursiva. Los signos de interrogación indican enzimas o actividades que no han sido identificadas u observadas. Los grupos hidroxilo entre paréntesis indican que este grupo puede estar ausente, creando la forma no hidroxilada correspondiente. SPT, serina palmitoiltransferasa; SBK, base quinasa esfingolípida; P, fosfato; SBPP, fosfato fosfatasa base esfingolípida; SBPL, fosfato liasa base esfingolípida; Cer, ceramida; Cdase, ceramidasa; des, desaturasa; Gcs1, glucosilceramida sintasa; GCdase, glucosilceramidasa; MIPC, manosil-inositol fosforilceramida; M (IP)₂C, ceramida de manosil diinositol fosfato; M₂IPC, dimanosil-inositol fosforilceramida.



Esquema 6. Ruta biosintética de Glucosilceramida (GluCer) en *C. neoformans* (tomado de Rhome *et al.*, 2007).

Otro estudio demostró la importancia de estas moléculas en la virulencia de *C. neoformans* (Esquema 5 y 6), ya que la mutación del gen metil transferasa C9 esfingolípido (STM1) responsable de la metilación del carbono 9 (C9) de esfingosina de la GlcCer resulta en una pérdida de más del 80 % de su virulencia, cuando se comparó con los aislamientos sin la mutación (wild type) y los reconstituidos (Singh *et al.*, 2012; Rhome *et al.*, 2007).

Así mismo, se ha observado que los glicosilinositol-fosforilceramidas inducen una respuesta inmune con producción de anticuerpos específicos en pacientes con paracoccidioidomicosis (Guimarães *et al.*, 2014). Lo anterior ha llevado a proponer un modelo para el microdominio de membrana fúngica como se observa en la Figura 1.

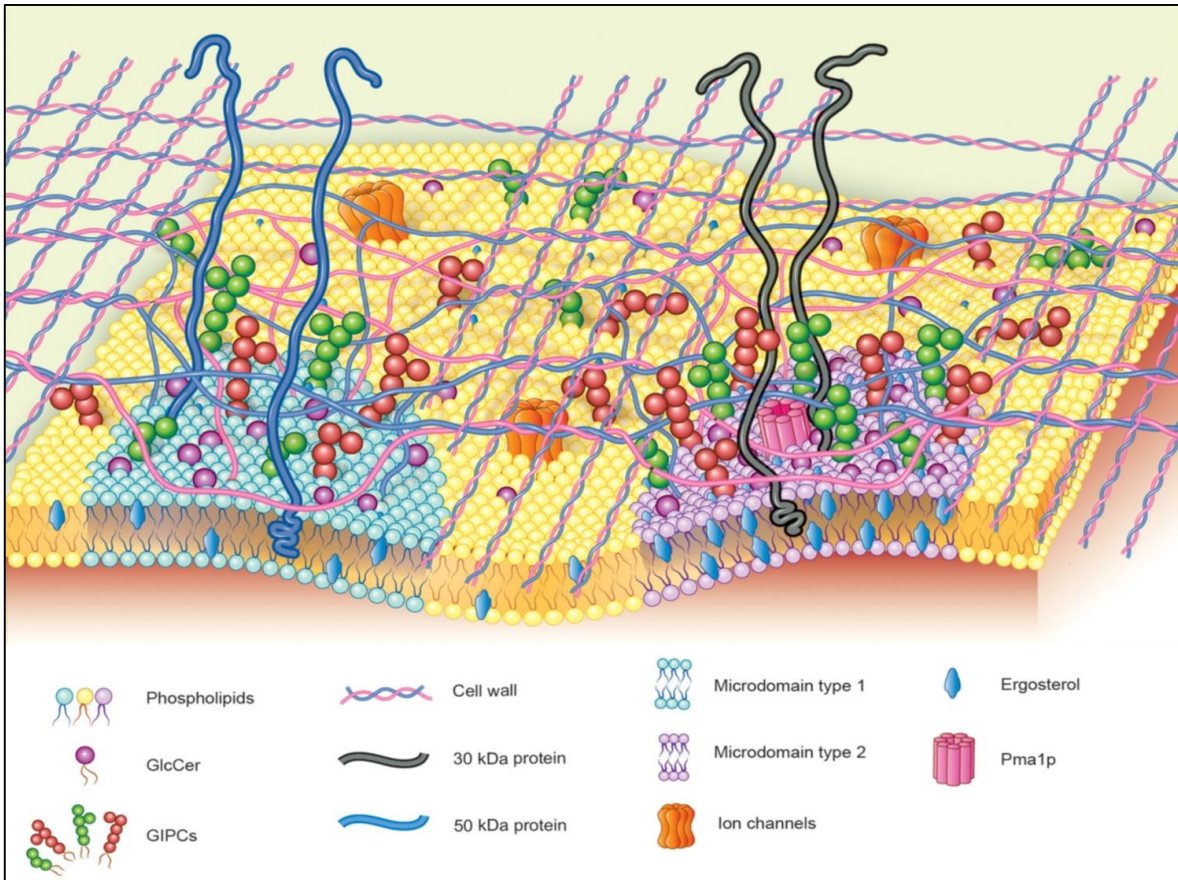


Figura 1. Modelo para el microdominio de membrana fúngica (tomado de Guimarães *et al.*, 2014). GlcCer: glucosilceramidas; GIPCs: glicosilinositolfosforilceramidas; Pma1p: membrana plasma ATPasa.

3.3.1 Extracción de lípidos tipo acilglicerol y fosfolípidos

Entre las alternativas propuestas para la obtención de fosfolípidos de *H. capsulatum* se ha propuesto la inactivación de *H. capsulatum* en fase levadura, utilizando una mezcla formaldehído/agua destilada (5:95, v/v) y para la extracción de lípidos, seguido de hidrólisis ácida con HCl 1N y Alcohol etílico 96% (Nielsen, 1966). También se han utilizado metodologías de inactivación térmica (65 °C por 3 horas), utilizando para la extracción mezcla CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) por metodología Soxhlet por 72 horas a 65 °C (Al-Doory, 1960), e inactivación mecánica (Mini-Beadbeater-8), para la extracción de lípidos se coincide con la mezcla CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) (Zarnowski, *et al.* 2007; Zarnowski, *et al.* 2008). Las

propuestas de inactivación de *H. capsulatum* en fase levadura son propuestas de inactivación destructiva del hongo, generando lisis de la pared celular y de la membrana celular, además muy poco se conoce sobre estudios sobre la inactivación micelio no destructiva, ya que los estudios sobre la composición lipídica de *H. capsulatum* se orienta a aislamientos clínicos y a estas condiciones predomina la fase levadura.

3.3.2 Extracción de lípidos tipo glicoesfingolípidos

Entre las alternativas propuestas para la obtención de glicoesfingolípidos de *H. capsulatum* se ha propuesto la inactivación simultánea de un aislamiento clínico de *H. capsulatum* tanto de la fase micelio como de la fase levadura, la adición de Timerosal al 0,1 % por un periodo de 48 horas y como sistemas de extracción las mezclas: isopropanol/hexano/agua (55:20:25, v/v/v) y cloroformo/metanol (2:1, v/v) (Toledo *et al*, 2001; Barreto-Bergter *et al*, 2011).

3.4 *Galleria mellonella*

Para el estudio de la interacción hongo patógeno-hospedero se han utilizado diferentes modelos, entre los cuales en mamíferos se encuentra el ratón (Nielsen, 1965; Manocha *et al*, 1979; Taylor *et al*, 2005; Almeida *et al*, 2015), lo que ha permitido dilucidar mecanismos de infección de esta interacción; entre las desventajas de utilizar éste modelo se presenta el costo de su mantenimiento, además se requiere personal entrenado para su manipulación y tiene consideraciones éticas y legales importantes. Como alternativa al modelo ratón se han utilizado modelos invertebrados como la *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) el cual tiene ventajas y desventajas como animal de experimentación, sin embargo entre las ventajas se encuentra que las larvas son de fácil manejo, pueden ser incubadas a temperaturas entre 20 °C y 37 °C, tienen un sistema inmune innato que incluye respuestas humorales mediadas por péptidos antimicrobianos y respuestas celulares mediadas por cuatro tipos principales de

hemocitos (plasmatocitos, granulocitos, esferulocitos y oenocitoides), y procesos como fagocitosis, nodulación y encapsulación; además de que su mantenimiento es poco costoso y no tiene consideraciones éticas asociadas (Wu *et al*, 2016).

Sobre *G. mellonella* como modelo se han realizado diversas investigaciones estudiando una veintena de hongos patógenos humanos (Champion *et al*, 2016) como: *Aspergillus fumigatus*, *P. brasiliensis*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *Candida tropicalis* (Reeves *et al*, 2004, Scorzoni *et al*, 2015, Mylonakis *et al*, 2005, Mesa-Arango *et al*, 2013, Li *et al*, 2013). También se le ha usado para el estudio de macromoléculas de hongos como componentes de la pared celular de *Entomophaga aulicae* (β 1-3 glucano y quitina), enzimas hidrolíticas de *Beauveria bassiana*, glicoproteínas tóxicas de *Beauveria sulfurescens* y metabolitos peptídicos de diferentes hongos entomopatógenos (Beauvais *et al*, 1989, Samšišáková *et al*, 1971, Mollier *et al*, 1994, Vilcinskas *et al*, 1999). En el modelo de infección de *G. mellonella* con conidias de *Fusarium oxysporum* se ha evaluado la eficacia de antifúngicos en la supervivencia de las larvas (Coleman *et al*, 2011; Navarro-Velasco *et al*, 2011) y el efecto en la respuesta innata empleando técnicas proteómicas en donde se encontraron involucrados potentes péptidos antimicrobianos, proteínas y genes de defensa que se caracterizaron en el insecto (Muñoz-Gómez *et al*, 2015).

3.5 Modelo químico

El modelo químico se describe como imparcial, únicamente definido, y modelo teórico uniformemente aplicable para predecir propiedades químicas de un sistema. Un modelo químico consiste generalmente en la combinación de un método teórico y un sistema base. Cada par único de un método con un sistema base representan una aproximación diferente a

la ecuación de Schrödinger (Foresman & Frisch, 1996). Existen dos áreas dentro de la química computacional dedicada a la estructura de las moléculas y su reactividad: la mecánica molecular y la teoría de estructura electrónica.

3.5.1 Mecánica molecular

La mecánica molecular utiliza las leyes de la física clásica para predecir las estructuras y propiedades de las moléculas. Los cálculos de la mecánica cuántica no tratan explícitamente los electrones en un sistema molecular. En su lugar se realiza computación basado en las interacciones entre núcleos. Los efectos electrónicos son incluidos implícitamente en campos de fuerza a través de parametrización (Foresman & Frisch, 1996).

3.5.2 Métodos de estructura electrónica

El modelo de estructura electrónica utiliza las leyes de la mecánica cuántica, y las leyes físicas como base para su computación. Los estados energéticos y otras propiedades de la molécula son obtenidos por la solución de la ecuación de Schrödinger:

$$H\psi = E\psi$$

Los métodos de estructura electrónica son caracterizados por varias aproximaciones matemáticas para su solución. Entre ellos se encuentran:

- Métodos semi-empíricos.
- Métodos de correlación electrónica
- Métodos de teoría del funcional de la densidad (DFT).
- Cálculos de estados excitados.

3.5.2.1 Métodos Semi-empíricos

Los métodos semi-empíricos son caracterizados por sus parámetros que se derivan de datos experimentales para simplificar la aproximación a la ecuación de Schrödinger. Como tal, consumen poco tiempo computacional y pueden ser aplicados con buena eficiencia a moléculas grandes. Hay variedad de métodos semi-empíricos, entre los más conocidos están AM1, PM3 y MNDO, los cuales están incluidos en software comerciales como AMPAC, MOPAC, HyperChem y Spartan. (Foresman & Frisch, 1996).

En el desarrollo de este trabajo se empleó el método semiempírico AM1 (Austin Model 1) que debido a su menor nivel de teoría, tiene un menor tiempo computacional para calcular sistemas moleculares de más de 40 núcleos. Sin embargo se obtiene una alta aproximación a métodos de mayor nivel de teoría.

3.6 Monocapas Langmuir-Blodgett

Las monocapas de fosfolípidos, preparadas por la técnica de Langmuir-Blodgett (L-B), es el más conocido entre los modelos simplificados de las membranas biológicas (Roberts, 1990). La técnica de Langmuir permite la preparación de una monocapa de fosfolípidos seleccionados o mezclados en la interfase agua-aire. La investigación sobre el comportamiento de fase y la organización molecular de las monocapas de lípidos se ha catalogado como una exitosa herramienta para el estudio de las propiedades interfaciales de una amplia familia de fármaco membrana-lítico (Maget, 1999). La agregación de un fármaco antifúngico en monocapas ofrece una oportunidad para la caracterización termodinámica de esta interacción por posible variación de la energía libre de Gibbs debido a la modificación de la monocapa por parte del fármaco y la variación estructural desde la estabilidad de la

monocapa del sistema fármaco-lípido a través del análisis de las isothermas de compresión (Diociaiuti *et al*, 2002; Mohwald, 1990; McConnell, 1991; Knobler & Desai, 1992; Sorrenti *et al*, 2009; Maget-Dana, 1999). La termodinámica de la interacción es por lo general investigada depositando en la interfase de la subfase aire, premezclas del fármaco con los modelos de membrana, en relaciones molares crecientes (Pérez-López *et al*, 2009; Caseli *et al*, 2005; Kamel *et al*, 2012). Las isothermas de compresión en la superficie proporcionan informaciones útiles sobre la naturaleza de las interacciones de corto y largo alcance entre las moléculas, especialmente entre los lípidos y el fármaco (Thakur *et al*, 2009).

3.7 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica para explorar las transiciones de fase termodinámicas que se puede aplicar a un lípido o mezcla de lípidos en una muestra. Esto proporciona un gráfico de entalpía frente a la temperatura, la grabación de manera efectiva de la capacidad calorífica isobárica de la muestra: los cambios agudos de la trama indican una transición de fase de algún tipo. En el caso de los lípidos y los cristales líquidos, en general, esto podría ser indicativo de un cambio en el polimorfismo lípido o un proceso de fusión de cadena. De esta manera, los límites de fase precisa para un sistema de lípidos dado se puedan identificar, de forma reversible y no destructiva (Gill *et al*, 2010; Kodre *et al*, 2014). La DSC puede dar información sobre la interacción del fármaco con la región no polar (hidrofóbica) o con la región polar (hidrofílica) de los lípidos

4 HIPÓTESIS

- Existen diferencias entre la composición lipídica asociadas a la pared celular de los aislamientos ambiental y clínico de *Histoplasma capsulatum* tanto de la fase micelio como de la levadura.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Caracterizar químicamente la composición lipídica asociada a la pared celular del hongo dimórfico *H. capsulatum* y evaluar su efecto sobre el modelo experimental *G. mellonella*.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar químicamente la composición lipídica asociada a la pared celular de aislamientos clínico y ambiental de *H. capsulatum* tanto de la fase micelio como de la levadura.
- Evaluar el efecto de los extractos lipídicos de *H. capsulatum* sobre el modelo biológico *G. mellonella*.
- Estudiar la interacción entre las monocapas formadas entre los extractos lipídicos de *H. capsulatum* y anfotericina B para la formulación de liposomas.

6 ASPECTOS METODOLÓGICOS

6.1 Cultivo de *Histoplasma capsulatum*

6.1.1 Fase micelio

Se utilizó el aislamiento clínico codificado como: **17183** de *H. capsulatum*, proveniente de una biopsia de un paciente la cual fue aislado, analizado e identificado por el Grupo de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. El aislamiento ambiental codificado como: **316-1** de *H. capsulatum* fue recuperado e identificado por el Grupo de Micología Médica, de una muestra de enmienda de suelo colectada por el Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares-GIEM del Instituto de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia. Los aislamientos, se mantuvieron en su fase micelio con repiques mensuales en el medio Mycosel-MyC (Mycosel Agar, BBLTM; ref. 211462. Franklin Lakes, NJ, USA) e incubados a 23 °C.

6.1.2 Fase levadura

La fase de levadura se obtuvo luego de repicar los aislamientos de *H. capsulatum* ambiental y clínico mencionados anteriormente en el medio agar BHI suplementado (Brain Heart Infusion, BBLTM; ref. 211065. Franklin Lakes, NJ, USA), preparado siguiendo las indicaciones de la casa comercial y suplementado con glucosa al 1 % (Sigma, Ref. G5400-250G. St. Louis, MO, USA), L- cisteína al 0,01 % (Sigma, ref. C-7755. St. Louis, MO, USA), solución de antibióticos gentamicina y penicilina al 0,1 % y sangre de carnero al 5 %. La

incubación se realizó en ambiente de CO_{2(g)} al 5 % y a 37 °C, hasta observar el crecimiento abundante de la levadura.

6.2 Extracción de lípidos

Dado que la infección con *H. capsulatum* se puede presentar por las partículas infectantes que, al ser inhaladas, llegan al alvéolo donde se convierten en la forma parasitaria (Porta *et al*, 2010; Kauffman, 2007), es importante inactivar el hongo antes de ser manipulado en el proceso de extracción.

6.2.1 Inactivación de *H. capsulatum*

Con el propósito de tener un proceso de inactivación de los aislamientos clínico y ambiental de *H. capsulatum* tanto para la fase micelio como de la fase levadura y que este proceso de inactivación se encuentre conectado con el proceso de extracción de lípidos asociados a la pared celular de *H. capsulatum*, se utilizará el solvente hexano como inactivador no destructivo, el cual ya ha sido utilizado en la inactivación del hongo dimórfico patógeno Coccidioides (Jiménez-Alzate, *et al*, 2015). A continuación, se detallan esquemáticamente los procesos utilizados en el proceso de inactivación.

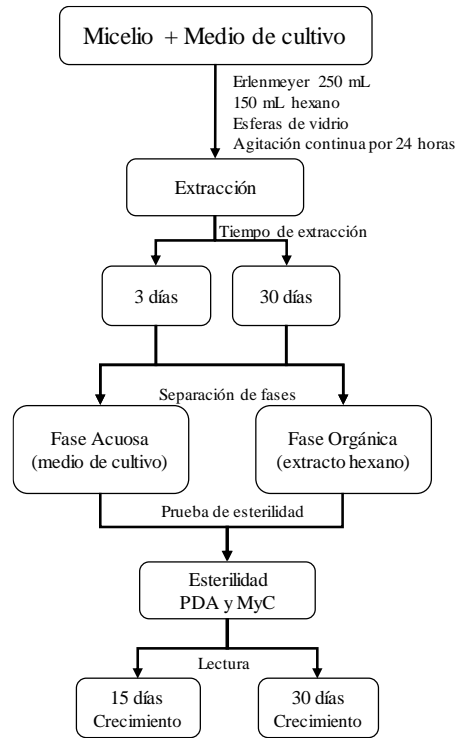


Diagrama 1. Primera propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de *H. capsulatum*.

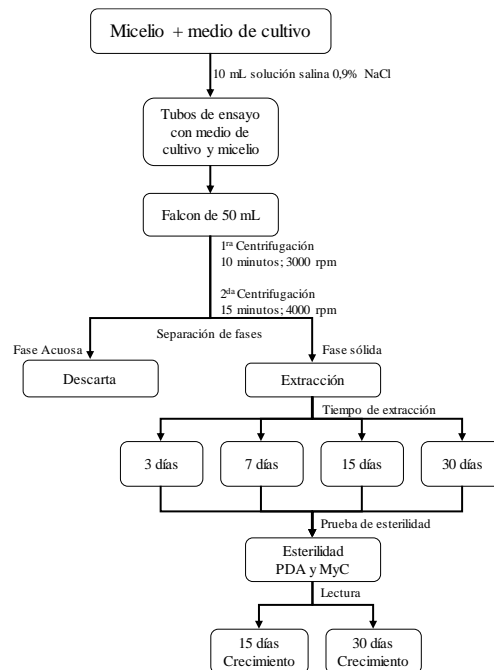


Diagrama 2. Segunda propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de *H. capsulatum*.

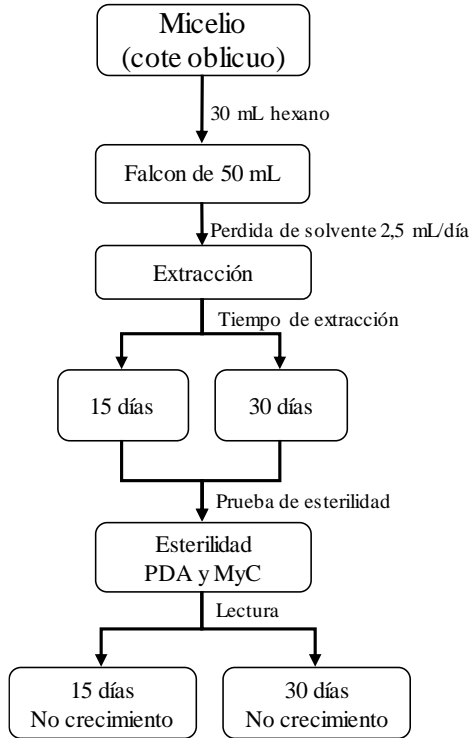


Diagrama 3. Tercera propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de *H. capsulatum*.

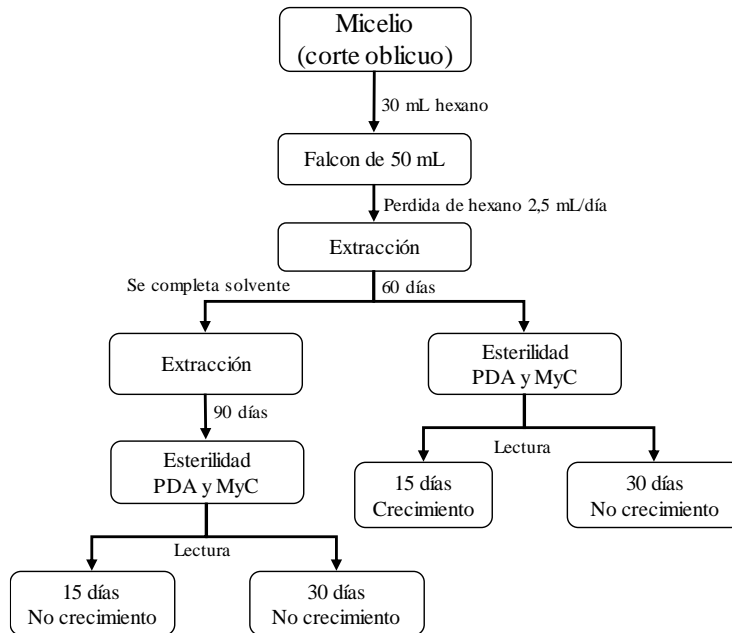


Diagrama 4. Cuarta propuesta de inactivación y extracción lipídica de asociada a la pared celular de micelio de *H. capsulatum*.

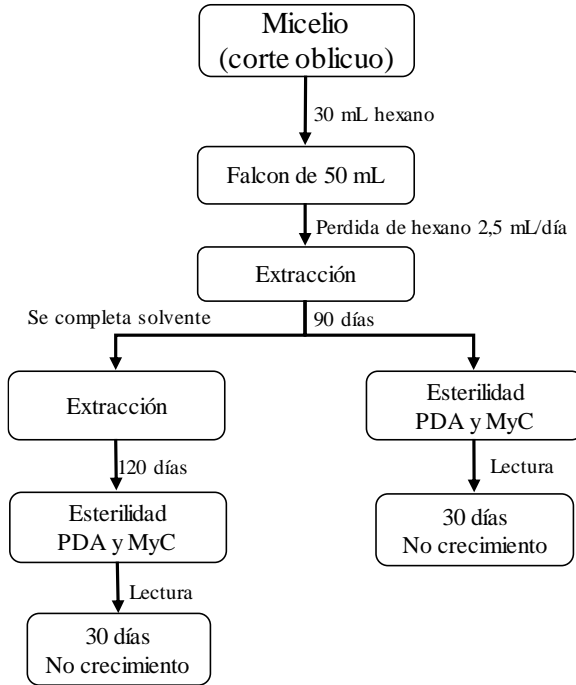


Diagrama 5. Quinta propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de *H. capsulatum*.

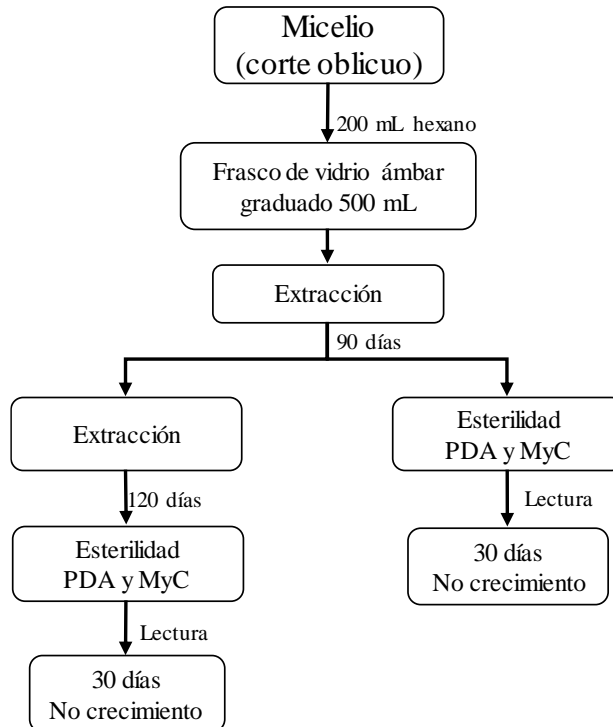


Diagrama 6. Sexta propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de *H. capsulatum*.

En la Tabla 1 se muestra un conjunto de solventes y su respectiva polaridad, de los cuales fueron utilizados para la extracción de lípidos asociados a la pared celular de *H. capsulatum* los solventes: hexano, cloroformo, isopropanol y metanol (Haynes *et al*, 2016). Los extractos de lípidos se prepararon por duplicado.

Tabla 1. Solventes con sus respectivos valores del momento dipolar a 20 °C y clasificación polar.

Solvente	Momento Dipolar (Debye)	Polaridad
Hexano	0,08	No polar
Cloroformo	1,15	No polar
Diclorometano	1,14	No polar
Etanol	1,78	Polar prótico
Isopropanol	1,66	Polar prótico
Acetato de etilo	1,88	Polar aprótico
Agua	1,87	Polar prótico
Acetona	2,69	Polar aprótico
Metanol	1,69	Polar prótico
Dimetilsulfóxido	3,96	Polar aprótico

6.2.2 Extracción de lípidos asociados a la pared celular de la fase micelio

Los lípidos se extrajeron de la fase micelio de ambos aislamientos de *H. capsulatum*. Los fragmentos de micelio se mezclaron con solvente hexano a 23 °C. El crecimiento de *H. capsulatum* se controló mensualmente en medio cultivo para verificar la viabilidad del hongo, posteriormente los fragmentos de micelio inactivos se sometieron a extracción Soxhlet, utilizando hexano como solvente primario. Se realizó una segunda extracción con cloroformo, seguida de una tercera extracción con isopropanol y finalmente con metanol. El tiempo de reflujo fue de 2 horas, luego se llevó a sequedad por rotaevaporación y finalmente, a los extractos se les removió el exceso de solvente con nitrógeno gaseoso y se almacenaron a -20 °C (Florsch *et al*, 1957; Manocha *et al*, 1980; Somashekar *et al*, 2001).

6.2.3 Extracción de lípidos asociados a la pared celular de la fase levadura

Los lípidos se extrajeron de la pared celular de la levadura de ambos aislamientos de *H. capsulatum*. La levadura fue colectada de la caja de Petri y se mezcló con solvente hexano a 23 °C; después de 15 días de las levaduras estar en contacto con el solvente, se sembraron en nuevo medio de cultivo para observar si había crecimiento y se siguió controlando cada 15 días para verificar la viabilidad del hongo. La levadura inactiva se sometió a extracción Soxhlet reproduciendo el proceso de extracción implementado para la fase micelio (6.2.1).

6.3 Caracterización microscópica

6.3.1 Microscopía óptica

Se realizó seguimiento para los aislamientos por medio de microscopia óptica, utilizando Microscopio óptico Olympus CX21, Ocular 10x/18. Tubo binocular inclinado 30°. Rango de ajuste de distancia interpupilar de 48–75 mm. Porta objetivos cuádruple giratorio. Objetivos 4x, 10x, 40x 100x. Un foco halógeno de 6 V/20 W. Platina fija mecánica con movimiento de cable: 120 x 132 mm. Rango de desplazamiento: 76 mm(X) x 30 mm(Y). Límite de resolución de 200 nm.

6.3.2 Microscopía electrónica de Barrido

Los extractos sólidos fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido utilizando Microscopio Electrónico Phenom SEM. Ampliación óptica: 20x–135x. Ampliación SEM 80x–130000x. Tamaño de muestra hasta 32 mm. Voltaje de aceleración 5 kV y 10 kV. Límite de resolución de 2 nm.

6.4 Caracterización por cromatografía en capa fina

La caracterización cualitativa de los extractos lipídicos de aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* se realizó mediante cromatografía de capa fina (CCF) mono dimensional en sílica gel 60 F254 (Merck®, USA). El revelado de las placas se realizó con yodo molecular y luz ultravioleta-UV (a longitud de onda larga y onda corta) para la conservación de las placas. Las posiciones de los componentes revelados en las placas se expresaron como un factor de retención (Retention Factor-Rf), por medio del cual se indicó la posición del componente como una fracción (relación) decimal medida entre el punto de retención del componente y la distancia recorrida por la fase móvil (eluyente) como se indica a en la Figura 2:

$$R_f = \frac{x}{y} = \frac{\text{distancia recorrida por el componente desde el origen}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil desde el origen}}$$

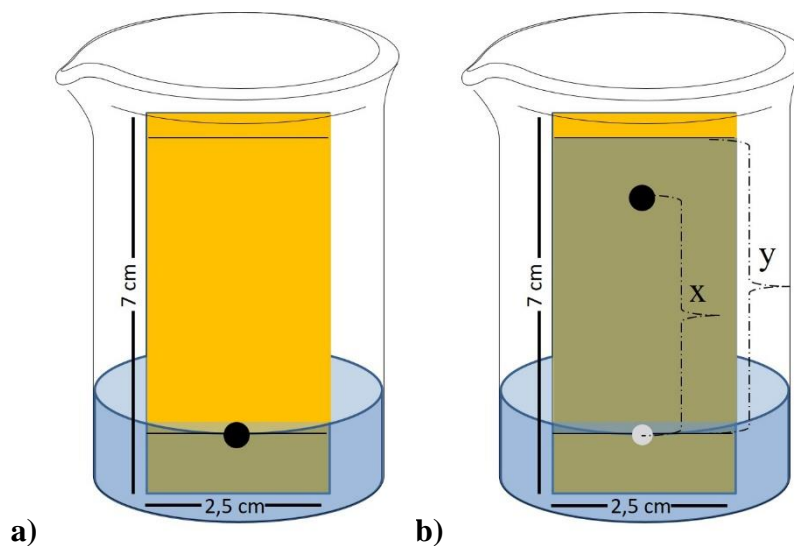


Figura 2. Representación para la caracterización por cromatografía en capa fina: **a)** sistema inicial con la muestra (punto negro) y fase móvil en el origen de la placa; **b)** sistema final con las distancias recorridas por el componente (punto negro) y la fase móvil

6.5 Cuantificación lipídica por cromatografía gaseosa-GC y líquida de ultra alta eficiencia-UHPLC

6.5.1 Preparación de metilésteres de ácidos grasos (FAMES)

Las diferentes fracciones obtenidas se trataron con 4 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M en metanol y se colocaron en un baño de agua a 90 °C bajo un sistema de reflujo durante 7 min. Posteriormente, se agregaron 5 mL de trifluoruro de boro (BF₃) al 20 % (v/v) en metanol y se mantuvieron bajo un sistema de reflujo durante 2 minutos. Luego, las muestras se mezclaron con 4 mL de n-heptano y se dejaron a reflujo durante un minuto adicional. Las muestras se retiraron del baño de agua y se dejaron reposar durante 5 min. Finalmente se adicionaron 100 mL de una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) para mejorar la separación de la fase orgánica. Las fases orgánicas se recogieron luego en tubos Eppendorf con sulfato de sodio anhidro para remover trazas de agua en las muestras. Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 13000 rpm durante 7 minutos, y se colectaron 200 µL de la muestra del sobrenadante en viales de tapa de rizo de vidrio de muestreador automático (Agilent, Santa Clara, CA, USA.) para someterse a cromatografía de gases. (Protocolo Interno Grupo GIEM) (Sepulveda *et al*, 2020).

6.5.2 Condiciones cromatográficas de GC

La mezcla de estándares internos de metil ésteres de ácidos grasos de en n-heptano (caprato, laureato, miristato, palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato y araquidonato) (Figura 3) fue corrida antes de cada ensayo para estimar los tiempos de retención, seguido de los diferentes extractos que se ejecutaron de forma independiente, empleando un cromatógrafo

de gases Agilent 6890N con detector de ionización de llama (FID, Santa Clara, CA, EE. UU.). Sistema de Inyección Split/Splitless y autoinyector Agilent 7683. Columna capilar DB23 de 50m, diámetro interno 0,25mm y espesor de película 1,4 μm . El corrido cromatográfico se realizó sobre una columna FAME (modelo FAME JIWDB23, Agilent) con gas hidrógeno. El método utilizado fue CG-AOAC Official methods 996.06 y los datos se analizaron con el software Agilent ChemStation utilizando las áreas bajo la curva de cada analito.

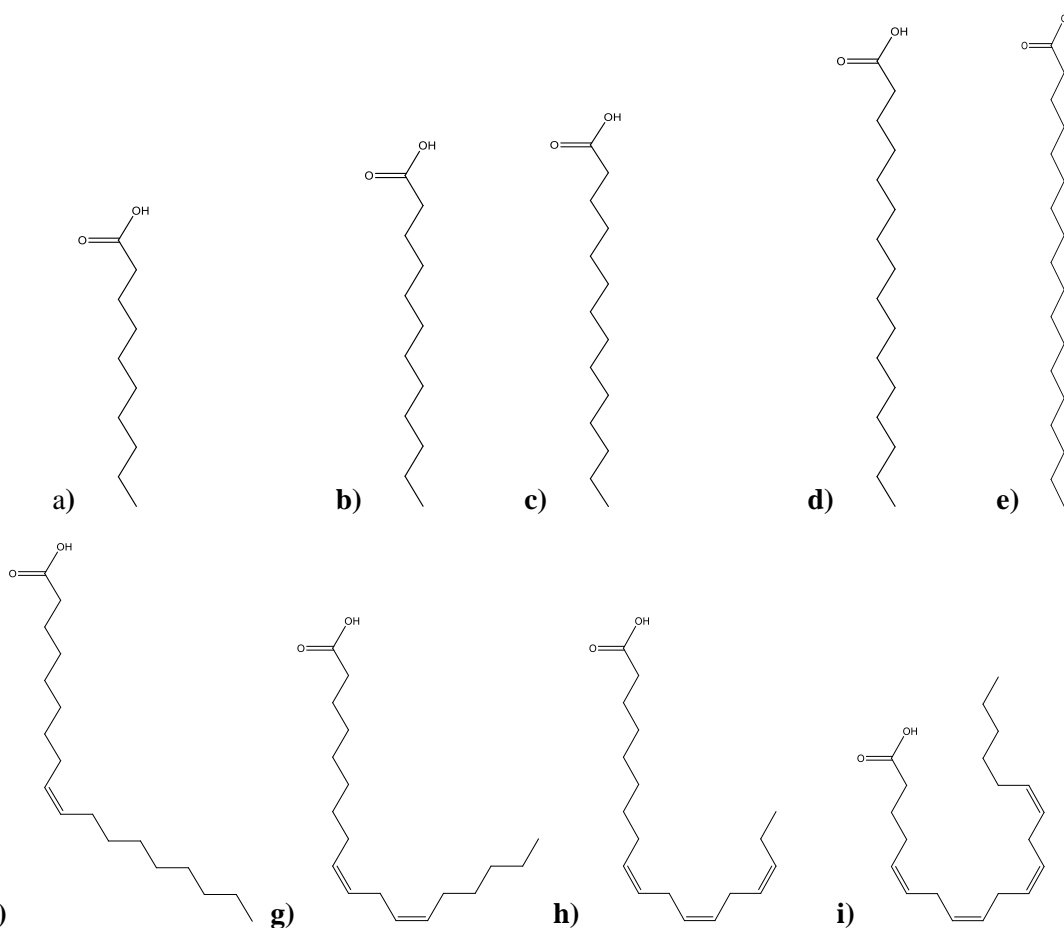


Figura 3. Representación estructural de ácidos grasos: **a)** ácido cáprico C10:0; **b)** ácido láurico C12:0; **c)** ácido mirístico C14:0; **d)** ácido palmítico C16:0; **e)** ácido esteárico C18:0; **f)** ácido oleico C18:1; **g)** ácido linoleico C18:2; **h)** ácido linolénico C18:3; **i)** ácido araquidónico C20:4.

6.5.2.1 Relación insaturados/saturados

La relación insaturados/saturados (Nelson *et al*, 2005) se terminó por medio de la relación entre la sumatoria de los ácidos grasos insaturados y la sumatoria de ácidos grasos saturados de cada aislamiento.

$$\text{Relación} \frac{\textit{insaturado}}{\textit{saturado}} = \frac{\sum \textit{Ácido graso insaturado}}{\sum \textit{Ácido graso saturado}}$$

6.5.3 Condiciones cromatográficas de UHPLC

Las fracciones lipídicas se caracterizarán por fase inversa LC-MS/MS y las condiciones cromatográficas se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas.

Parámetros	UHPLC-MS/MS
Columna analítica	ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm)
Fase móvil	Solución de ácido fórmico y acetonitrilo
Flujo	0,300 mL/min
Volumen de inyección	5 μL
Fuente de ionización	ESI +/-
Detector	Espectrómetro de masas, operando en el modo MS/MS

Los espectros fueron colectados en un rango de 100 a 1500 *m/z* y fueron analizados manualmente para la identificación de las especies lipídicas.

6.6 Manejo y mantenimiento de la colonia del modelo *G. mellonella*

Para el manejo y mantenimiento de la colonia de *G. mellonella*, se implementó el siguiente protocolo desarrollado y estandarizado por el Grupo Interdisciplinario de Estudios moleculares-GIEM: en un recipiente plástico se mezclaron salvado de trigo, levadura de cerveza, germen de trigo, harina de maíz y leche en polvo con agitación continua. Una vez

se han incorporado los ingredientes (Tabla 3), se agregó poco a poco miel de abejas, glicerina y formaldehído, mezclando continuamente. La cera se fundió y se adicionó al final. El alimento se almacenó a 4 °C en un recipiente hermético y de allí se tomaron las porciones requeridas.

Tabla 3. Requerimientos nutricionales para la alimentación de *G. mellonella*.

Nutriente	Cantidad
Salvado de trigo	400 g
Cera de abejas	70 g
Levadura de cerveza	100 g
Miel de abejas	225 mL
Glicerina	325 mL
Formaldehído	5,5 mL
Germen de trigo	100 g
Harina de maíz	200 g
Leche en polvo	200 g

Para iniciar la colonia, se dispusieron tiras de papel encerado con huevos de *G. mellonella* en una caja de acrílico pequeña y se recubrieron con alimento. A las dos o tres semanas cuando se formó el material que recubre los huevos (cocoón), se pasó toda la mezcla a una bandeja de acrílico de mayor tamaño (20 cm x 30 cm) y se agregó más alimento.

Las bandejas se dejaron en un lugar oscuro hasta que aparecieron las pupas y se les adicionó alimento una o dos veces por semana. Posteriormente, las pupas se transfirieron a frascos de vidrio de 4 litros con malla metálica en la tapa. Cuando se dio la emergencia de los adultos, se suministró como alimento: solución de miel de abejas impregnando algodones, que se ubicaron en la tapa del frasco. Para las posturas, se adicionaron tiras de papel encerado enrollado en forma de acordeón. Los adultos se descartaron cada 3-5 días, pero si se requerían muchos huevos, se dejaban hasta 15 días cambiando la tira de papel para las posturas cada 3-4 días. Las tiras de papel se pasaron a nuevas cajas de acrílico para iniciar nuevamente el

ciclo de vida. La duración de cada estadio de desarrollo de *G. mellonella* se monitoreó durante cinco ciclos de vida, en un rango de humedad relativa de 40–50 % y temperatura de 22–28°C.

6.7 Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *H. capsulatum* sobre el modelo *G. mellonella*

Para la evaluación de los extractos sobre el modelo *G. mellonella*, se implementaron los siguientes protocolos desarrollados y estandarizados por el Grupo de Micología Médica y el Grupo Interdisciplinario de Estudios moleculares-GIEM.

6.7.1 Protocolo de preparación de la suspensión de micelio de *H. capsulatum*:

Se adicionaron 5 mL de solución salina estéril al 0,01% de Tween 40 y al 1% de penicilina–gentamicina a cada tubo con crecimiento en fase micelio del hongo. Luego con asa micológica se desprende suavemente el micelio aéreo de la colonia evitando remover medio de cultivo. Se agitó durante 10 segundos, luego la suspensión de fragmentos de micelio se depositó en un Erlenmeyer estéril de 250 mL y se adicionaron perlas de vidrio estériles. Se repitió el procedimiento anterior con cada tubo hasta obtener 15 mL. Posteriormente el Erlenmeyer se agitó por 30 segundos y este procedimiento se realizó 5 veces y finalmente, la suspensión se centrifugó a 4 °C y 3000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se reconstituyó adicionando 1 mL de solución salina estéril al 0,01% de Tween 40® y 1% de penicilina–gentamicina.

6.7.2 Protocolo control positivo del crecimiento de *H. capsulatum*

Se sembraron 10µL de la suspensión del inóculo del micelio de *H. capsulatum* por triplicado en cajas con agar Mycosel y agar Sabouraud. Se incubaron a temperatura ambiente (20 °C) y se realizaron lecturas periódicas para verificar el crecimiento de *H. capsulatum*.

También se sembraron 10 µL de la suspensión del inóculo de micelio en cajas con agar BHI suplementado. Se incubaron a 37 °C y se realizaron lecturas periódicas para verificar el crecimiento de *H. capsulatum*. Una vez se observó crecimiento del hongo, se realizaron placas con azul de lactofenol de cada uno de los cultivos y se verificó que correspondían a *H. capsulatum*.

6.7.3 Protocolo de evaluación sobre el modelo *G. mellonella*.

Se seleccionaron larvas de *G. mellonella* en el último estadio de su desarrollo con una masa promedio por larva entre 200 mg y 300 mg. Se formaron grupos de 10 larvas cada uno. Los tratamientos fueron los siguientes: el primero recibió la suspensión con el inóculo de *H. capsulatum*, el segundo recibió la solución salina estéril al 0,01 % de Tween 40® y 1% de penicilina–gentamicina y un tercer grupo no recibió tratamiento (grupo control). Cada tratamiento se suministró a 3 grupos de larvas, es decir a 30 larvas por tratamiento.

Para inyectar las larvas con los diferentes tratamientos, estos se agitaron por 10 segundos y a cada larva se le inyectó 2µL de cada tratamiento en el último proleg y se verificó dicha suspensión permaneciera en la larva (Figura 4). Los siguientes parámetros se evaluaron cada 12 horas: **melanización de la cutícula de las larvas, falta de reacción de las larvas ante estímulo y tiempo para la formación de pupas.**

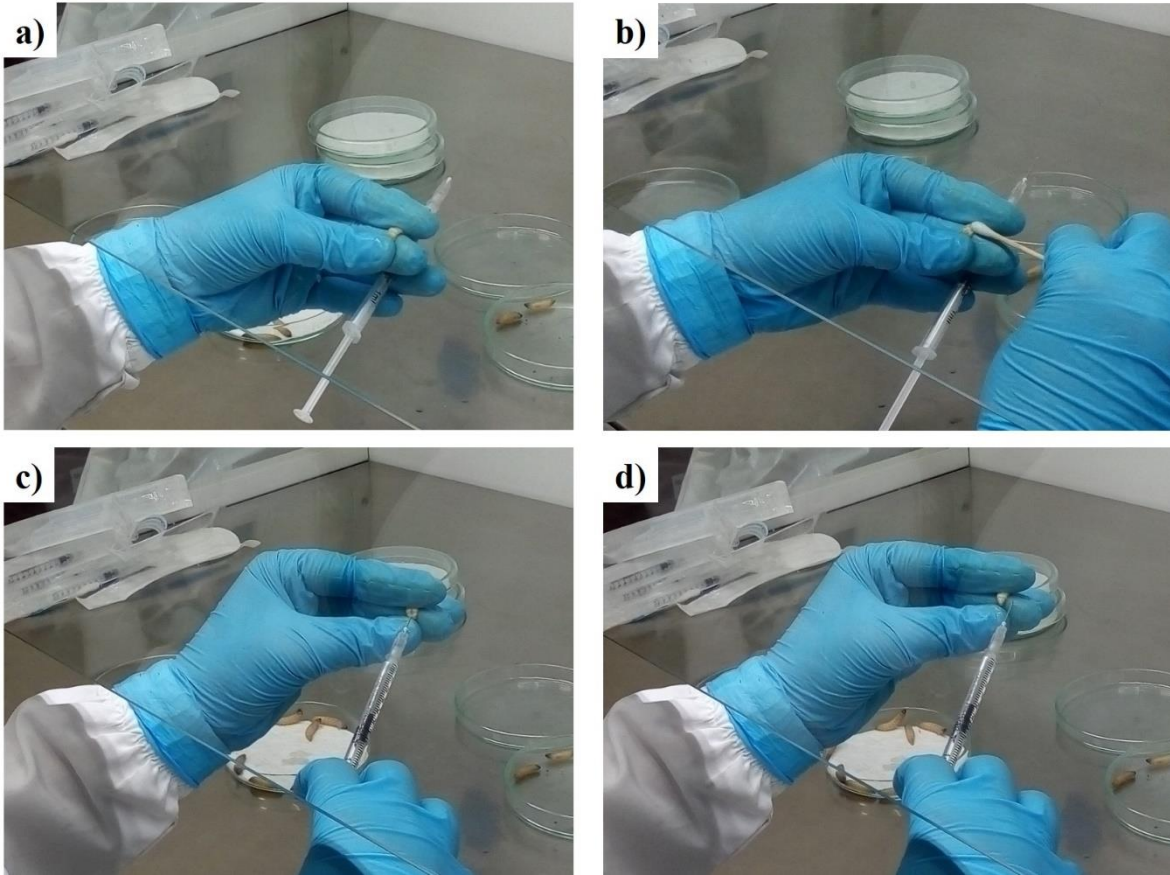


Figura 4. Proceso de inyección sobre *G. mellonella*: **a)** proceso de selección del proleg; **b)** proceso de desinfección; **c)** proceso de inyección; **d)** proceso de verificación de retención del líquido inyectado.

6.7.4 Protocolo de recuperación de *H. capsulatum* a partir de larvas de *G. mellonella* infectadas.

Las larvas muertas de cada tratamiento se seleccionaron y se sumergieron en alcohol etílico por 5 segundos. Para procesarlas se dividieron en dos grupos: un grupo se maceró y al otro grupo se le realizó cortes transversales con bisturí. Posteriormente del material obtenido en cada grupo se sembró en Agar Mycosel y agar Sabouraud y se incubó a temperatura de 23 °C y también en Agar BHI suplementado y en estos casos se incubó a 37°C con 5% CO₂.

Los cultivos se monitorearon periódicamente para verificar si había crecimiento de *H. capsulatum*. En los cultivos que se observó crecimiento se hicieron preparaciones del hongo

en azul de lactofenol y se observaron al microscopio óptico, para confirmar que correspondiera a *H. capsulatum*.

6.8 Isotermas de compresión de monocapas lipídicas

Las isotermas se registraron con un canal de Teflón de Langmuir Nima (U.K.) de 595 cm² de superficie y un volumen de 297,5 cm³. Las monocapas se formaron aplicando pequeñas gotas de las soluciones de propagación con una microjeringa (Hamilton Co., Reno, NV, EE. UU.) sobre una solución buffer (TRIS 5 mM, pH = 7,4) preparada con agua ultrapura con una resistividad de 18,2 MΩ cm, obtenida a través de un sistema Simplicity 185 Millipore. Después de 10 min, las monocapas de la composición deseada se comprimieron continuamente con una tasa de reducción de área de 10 cm² min⁻¹. Las películas fueron comprimidas a su presión de colapso. Cada ejecución se repitió tres veces y la reproducibilidad fue de $\pm 1 \text{ \AA}^2 \text{ molécula}^{-1}$.

6.8.1 Preparación de soluciones de propagación

Para formar las monocapas de los componentes individuales, se prepararon soluciones de anfotericina B (0,447 mg/mL) en cloroformo/metanol 1:1 (en volumen). Los extractos lipídicos de *H. capsulatum* fase micelio de aislamientos ambiental y clínico fueron preparados en cloroformo a las concentraciones 13,737 mg/mL y 9,277 mg/mL respectivamente.

A continuación, se propone la ecuación para el cálculo de área por molécula de la anfotericina B sobre el canal de teflón de Langmuir:

$$\frac{\text{Å}^2}{\text{molécula}} = \frac{\text{Area del canal de teflón (Å}^2)}{Fc \times N_A} \times \frac{MM}{C \times V}$$

$$\frac{\text{Å}^2}{\text{molécula}} = \left(\frac{\text{Area del canal de teflón (Å}^2)}{1 \times 10^{-6} \frac{\text{mL} \cdot \text{g}}{\text{uL} \cdot \text{mg}} \times 6,022 \times 10^{23} \frac{\text{moléculas}}{\text{mol}}} \right) \times \frac{924,08 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{0,447 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 50 \text{uL}}$$

$$\frac{\text{Å}^2}{\text{molécula}} = \text{Area del canal de teflón (Å}^2) \times 6,866 \times 10^{-17}$$

6.9 Formulación de liposomas

6.9.1 Preparación de liposomas a partir de los extractos lipídicos de *H. capsulatum*

A cada extracto se adicionaron 2 mL de cloroformo/metanol (2:1) y se llevaron a 40 °C por un minuto, posteriormente se filtraron con acrodisco de 13 mm de diámetro GHP y 0,2 μm de tamaño de poro. La solución de extracto obtenida se vertió en un tubo vidrio, el cual se secó con nitrógeno gaseoso en calentamiento a un rango de temperatura de 40 °C – 50 °C, con rotación continua con el propósito de crear una película de lípido alrededor del tubo, luego se llevó a proceso de liofilización a 0,351 Torr y -83 °C por 3 horas y finalmente se determinó el contenido de extracto en cada tubo. A cada tubo se adicionaron 150 uL de solución buffer (TRIS 5 mM, pH = 7,4), cada uno se agitó con vórtex por un minuto y se calentó a 40 °C por un minuto, se realizó cuatro veces intercalando el vórtex y el calentamiento. Finalizado este procedimiento se dejó en calentamiento a 40°C por una hora. Se utilizaron 120 uL del formulado del liposoma para calorimetría de barrido diferencial y 30uL se resuspendieron en 1 mL de solución buffer (TRIS 5 mM, pH = 7,4) para caracterizar los liposomas por medio de tamaño de partícula y potencial Z.

6.9.2 Preparación de liposomas de extractos y anfotericina B

La mezcla extracto-anfotericina B se solubilizó en 2 mL de cloroformo/metanol (2:1) y se hizo el mismo procedimiento planteado para la formulación y caracterización de liposomas planteado en el ítem 6.9.1.

6.9.3 Calorimetría de Barrido Diferencial

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) fue realizada utilizando el equipo Mettler TA Stare, equipado con una celda calorimétrica DSC1 y software Mettler STAR[®] V 11.0. 120 µL de suspensión de liposomas se adicionaron en crisoles de aluminio de 160µL (ME-278II TALL ALU CRICIBLES). Las muestras se calentaron de 5 °C a 80 °C (2 °C/min) y se enfriaron de 80 °C to 5 °C (4 °C/min) por triplicado.

6.9.4 Determinación del tamaño de partícula y potencial Z

Para la medición de tamaño de partícula y potencial Z, se tomó 1 mL de la suspensión de liposoma resuspendida y se llevó al Zetasizer Nano ZS90, con un rango de medición de 0,3 nm-10 µm utilizando el principio de la medición por dispersión de luz dinámica para la medición de tamaño de partícula (sensibilidad de 0,1 mg/mL) y dispersión de luz electroforética para la medición de potencial Z.

6.10 Cálculos teóricos

Las moléculas de los lípidos y anfotericina B fueron optimizadas a un nivel de teoría AM1 utilizando el software SPARTAN Pro para Windows, versión 1,0,5 (Wavefunction, Inc.).

6.11 Modelo estadístico de análisis de datos

Para los resultados se realizó un análisis ANOVA utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI, versión 16.1.02.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestra el crecimiento de los aislamientos de *H. capsulatum* en fase micelio en agar Mycosel. En la Figura 5a y 5b se presenta el aislamiento clínico con una razón de crecimiento de 0,25 cm/día a los 18 y 27 días, respectivamente. En la Figura 5c y 5d presenta el aislamiento ambiental con una razón de crecimiento de 0,23 cm/día a los 18 y 27 días, respectivamente. La tercera generación de los cultivos (la que se obtiene después de la tercera siembra de cada aislamiento) fue la que se utilizó para obtener el micelio del cual se hizo la extracción de lípidos asociados a la pared celular de *H. capsulatum* (Figura 6).

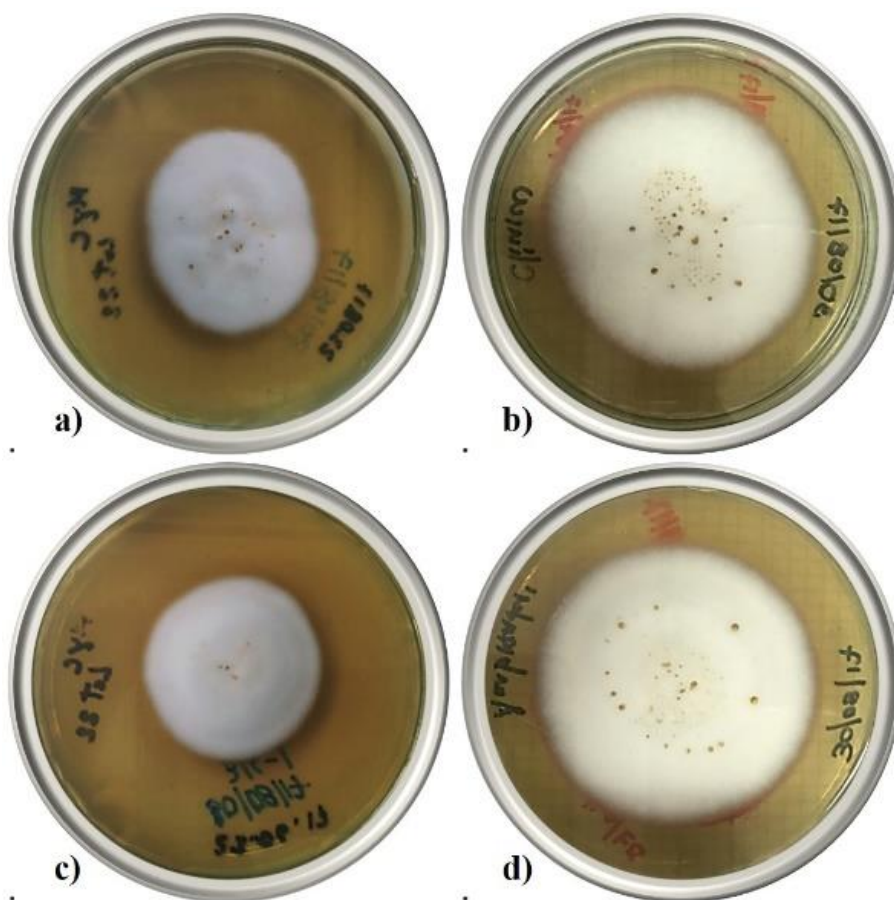


Figura 5. Aislamientos de *H. capsulatum* fase micelio en Agar Mycosel: **a)** aislamiento clínico a los 18 días; **b)** aislamiento clínico a los 27 días; **c)** aislamiento ambiental a los 18 días; **d)** aislamiento ambiental a los 27 días.



Figura 6. Tercera generación de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* en fase micelio.

7.1 Inactivación de *H. capsulatum* en fase micelio

7.1.1 Inactivación en fase micelio

La sexta propuesta garantizó la inactividad completa del hongo (Diagrama 6) donde el periodo de permanencia del hongo en solvente hexano fue de cinco meses, por lo que fue necesario realizar pruebas de esterilidad a los 90 y 120 días de permanencia en el frasco de vidrio ámbar graduado de 500 mL y no se presentó crecimiento de *H. capsulatum* a los 30 días después de la siembra de micelio

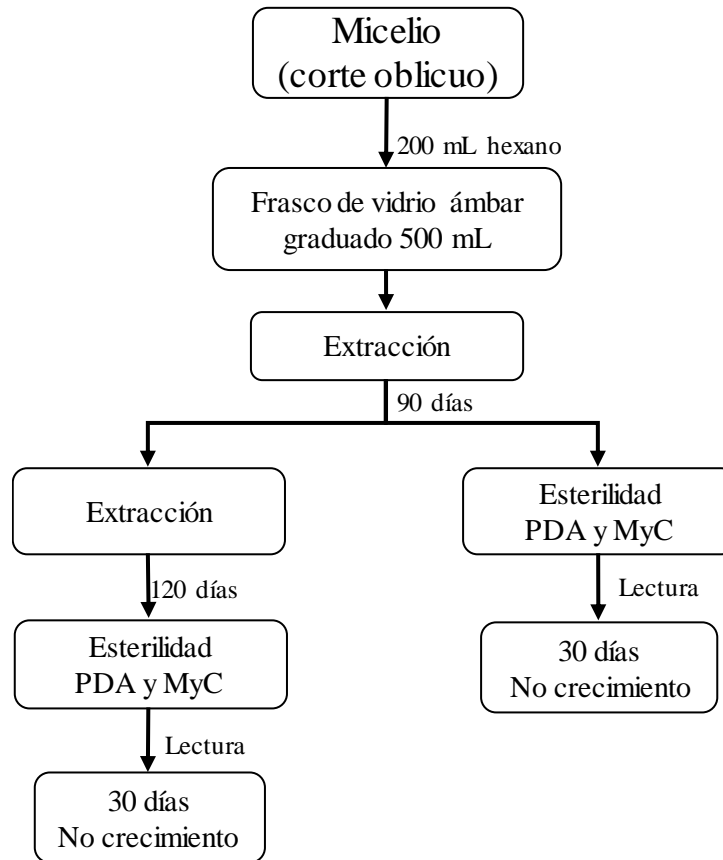


Diagrama 6. Sexta propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de micelio de *H. capsulatum*.

Con el propósito de unificar la inactivación con el proceso de extracción Soxhlet, el solvente hexano resultante del proceso de inactivación será utilizado como el primer solvente para extraer los lípidos asociados a la pared celular del micelio como se describirá en el apartado 7.3.

7.2 Inactivación de *H. capsulatum* en fase levadura

7.2.1 Inactivación en fase levadura

Para realizar la extracción lipídica de la pared celular de levadura de *H. capsulatum*, las colonias de levadura de la caja de Petri se depositaron en un frasco de vidrio ámbar graduado de 500 mL, al cual se adicionó 200 mL de solvente hexano. Se procedió a realizar pruebas

de esterilidad a los 30 días de permanencia en el frasco de vidrio (la prueba de esterilidad se realizó en agar PDA y agar Mycosel, tanto a la fase orgánica como a la levadura) y no se presentó crecimiento de *H. capsulatum* a los 15 días después de la siembra. Debido a la consistencia de la levadura y su afinidad con el vidrio del recipiente, fue necesario adicionar Sephadex G-100 en una relación levadura/Sephadex de 7:1 para obtener una consistencia sólida y de esta forma posibilitar la separación de la levadura del recipiente. En el Diagrama 7 se detalla el procedimiento efectuado para la inactivación de la levadura.

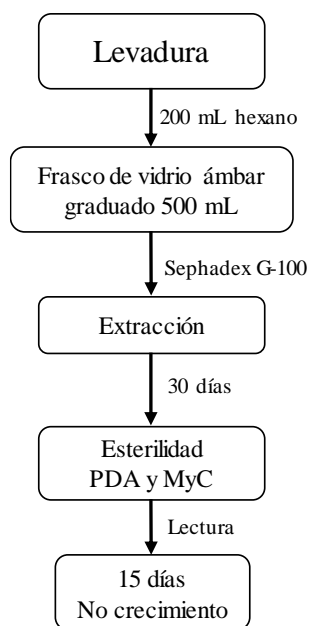


Diagrama 7. Propuesta de inactivación y extracción lipídica asociada a la pared celular de levadura de *H. capsulatum*.

En la Figura 7 se presentan los cultivos en fase levadura a los 15 días de los aislamientos ambiental y clínico y en la Figura 8 antes del proceso de extracción.

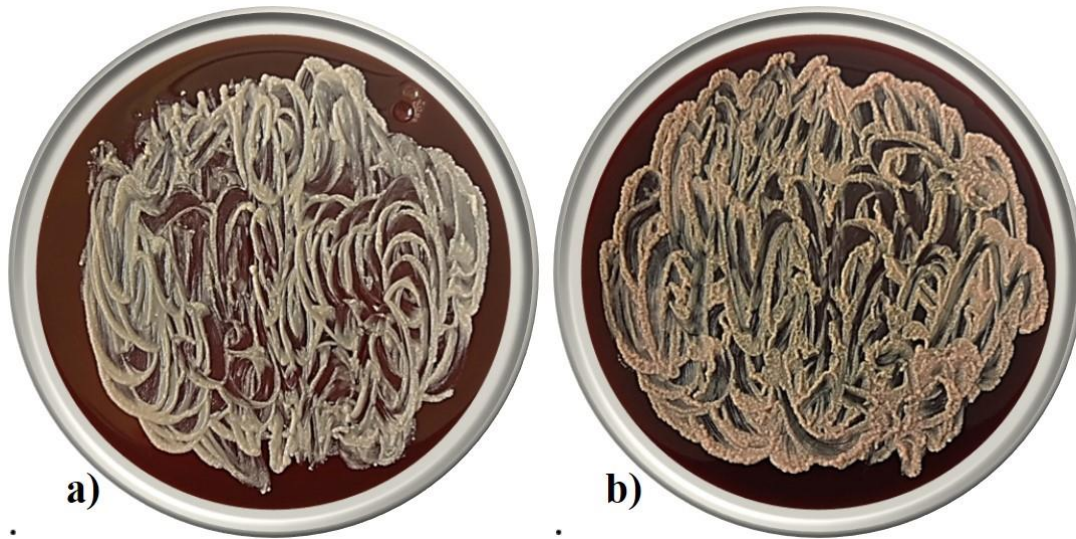


Figura 7. Aislamientos de *H. capsulatum* fase levadura: **a)** clínico; **b)** ambiental.

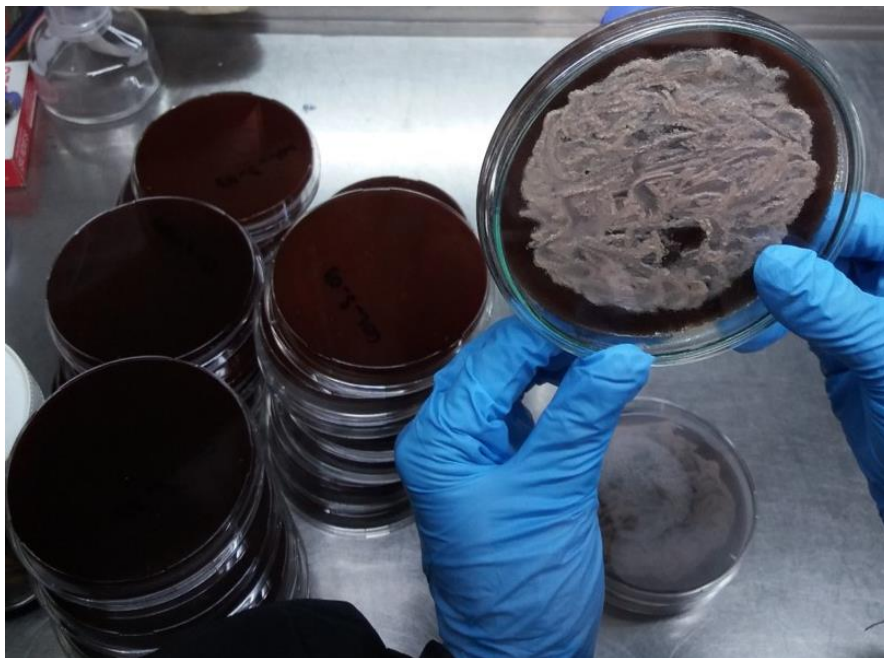


Figura 8. Aislamientos de *H. capsulatum* fase levadura antes del proceso de extracción.

Luego, la extracción de lípidos asociados a la pared celular de la levadura inactiva se realizó como se describirá en el apartado 7.3.

7.3 Extracción de lípidos asociados a la pared celular de *H. capsulatum*

En la Figura 9 se presenta el proceso de extracción de lípidos asociados a la pared celular de los aislamientos ambiental y clínico de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum*.

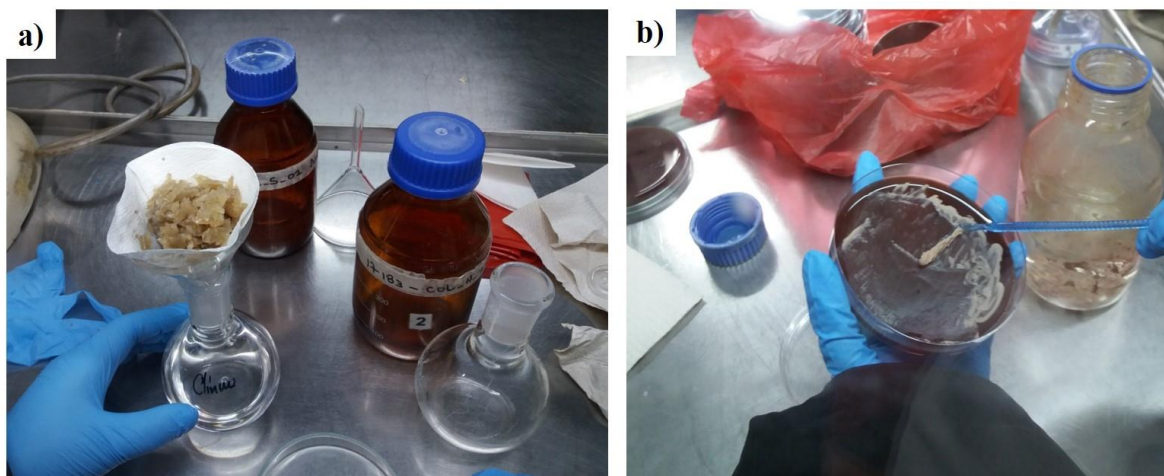


Figura 9. Proceso de extracción de lípidos asociados a la pared celular de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*: **a)** fase micelio; **b)** fase levadura.

Los aislamientos ambiental y clínico de las fases micelio y levadura inactivos se sometieron a extracción Soxhlet, la primera extracción fue con hexano como disolvente primario y siendo este el utilizado en el proceso de inactivación; una segunda extracción con cloroformo, seguida de una tercera extracción con isopropanol y finalmente con metanol. El tiempo de reflujo fue de 2 horas y los extractos se sometieron a secado bajo una corriente de nitrógeno gaseoso. En la Tabla 4 se presenta la cantidad promedio con su respectiva desviación estándar de los extractos obtenidos en cada solvente (Extracción realizada por triplicado), presentando mayor contenido en los solventes polares isopropanol y metanol. Esta masa superior se debe a que *H. capsulatum* contiene mayoritariamente compuestos polares que logran ser separados con los solventes de mayor polaridad.

Tabla 4. Promedio de masas de extractos obtenidos con cada solvente.

Aislamiento	Solvente	Micelio (g) (X ± DS)	Levadura (g) (X ± DS)
Clínico	Hexano	0,029 ± 0,014	0,05 ± 0,01
	Cloroformo	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	Isopropanol	0,3 ± 0,1	0,153 ± 0,009
	Metanol	0,2 ± 0,2	0,65 ± 0,02
Ambiental	Hexano	0,03 ± 0,02	0,082 ± 0,007
	Cloroformo	0,04 ± 0,02	0,15 ± 0,01
	Isopropanol	0,3 ± 0,1	0,21 ± 0,01
	Metanol	0,103 ± 0,007	0,538 ± 0,005

7.4 Caracterización microscópica de micelio

En las Figuras 10 y 11 se muestra por microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM), respectivamente, la estructura del micelio antes y después de la extracción lipídica. En la microscopía óptica se observan múltiples agregados de micelio después de la extracción, posiblemente por pérdida de estructura superficial de las células mas no por lisis celular, indicando que durante el proceso de extracción no hubo rompimiento celular y nos garantiza que los extractos obtenidos corresponden a los lípidos asociados a la parte externa del hongo. La microscopía electrónica de barrido no se observan diferencias en las películas formadas por agregados de micelio después del proceso de extracción de los lipídicos de la fase micelio de los aislamientos ambiental y clínico, este efecto está asociado al grado de deshidratación de las muestras analizadas.

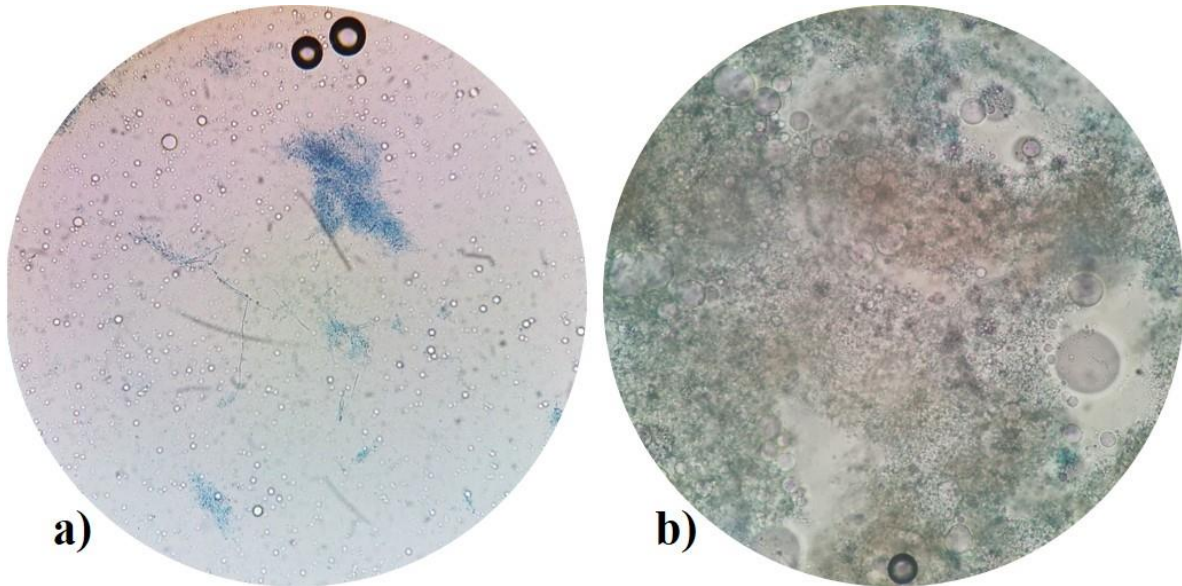


Figura 10. Caracterización microscópica de micelio de *H. capsulatum* a 10x: **a)** antes de la extracción; **b)** después de la extracción.

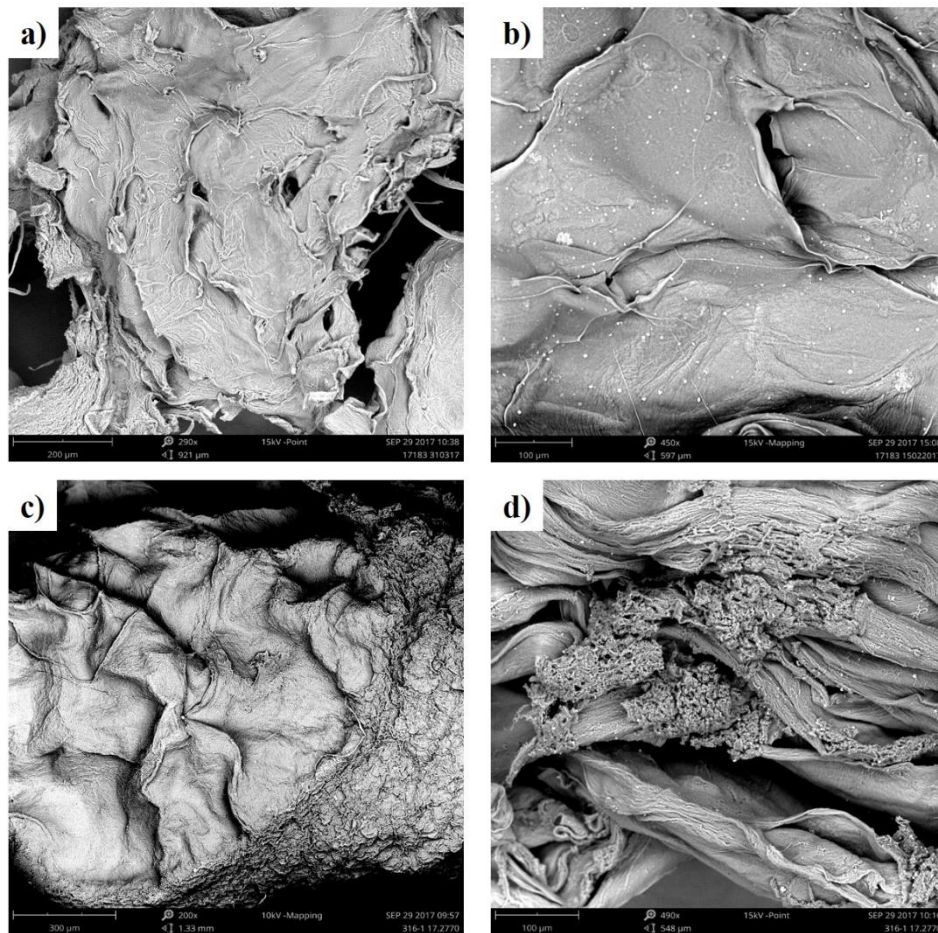


Figura 11. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para el micelio de *H. capsulatum* a 200x y 490x: **a-b)** después del proceso de extracción del aislamiento clínico; **c-d)** después del proceso de extracción del aislamiento ambiental.

7.5 Caracterización microscópica de levadura

En las Figuras 12, 13 y 14 se observa por microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM), respectivamente, las estructuras esféricas de Sephadex G-100 y el proceso de acoplamiento de la levadura de *H. capsulatum* en la superficie de las esferas de Sephadex G-100 antes y después del proceso de extracción lipídica.

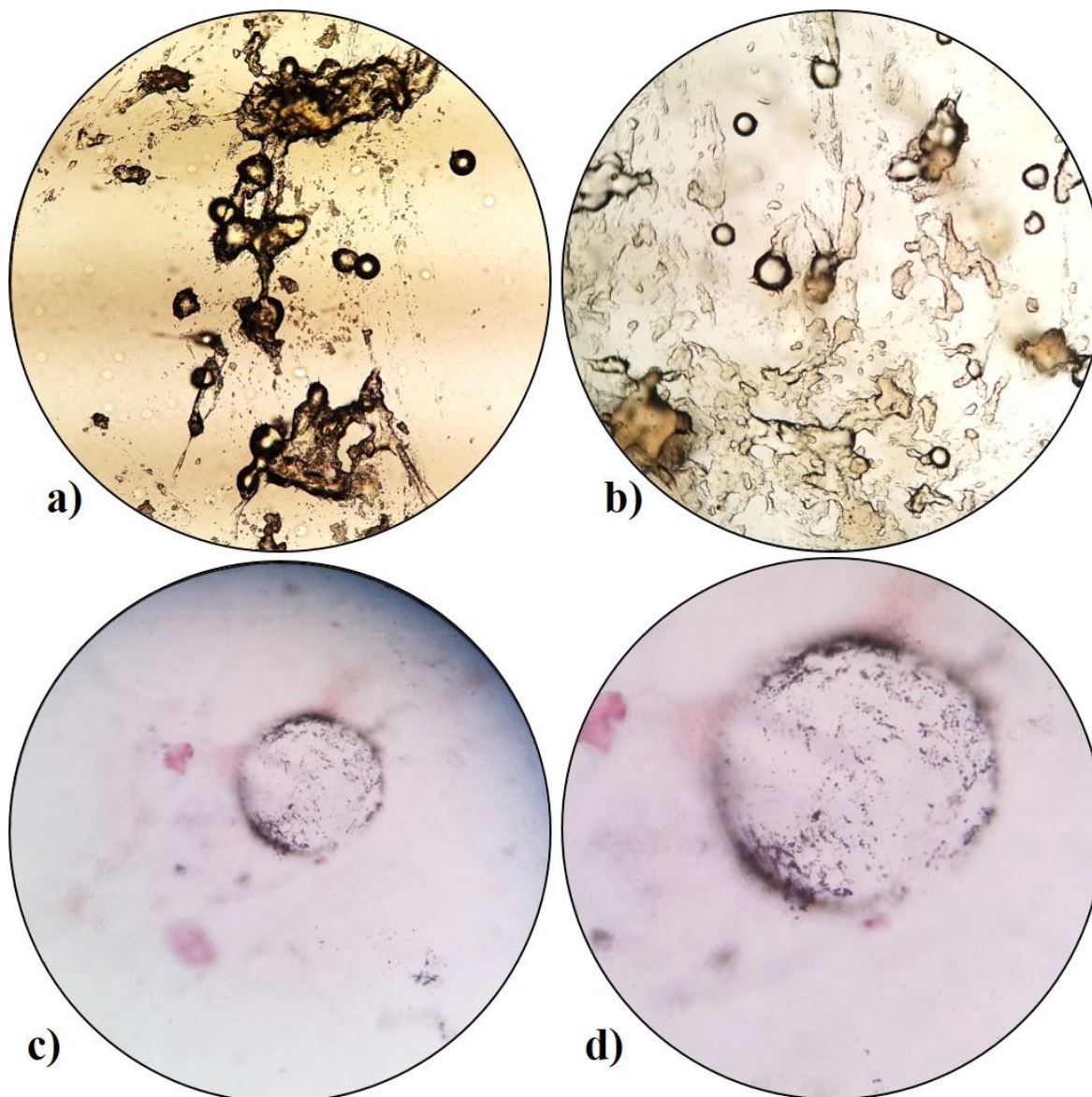


Figura 12. Caracterización por microscopía óptica de levaduras de *H. capsulatum* acopladas a la superficie de las esferas de Sephadex G-100 de los aislamientos ambiental y clínico: **a)** y **b)** aislamientos a 10x; **c)** y **d)** aislamientos a 40x.

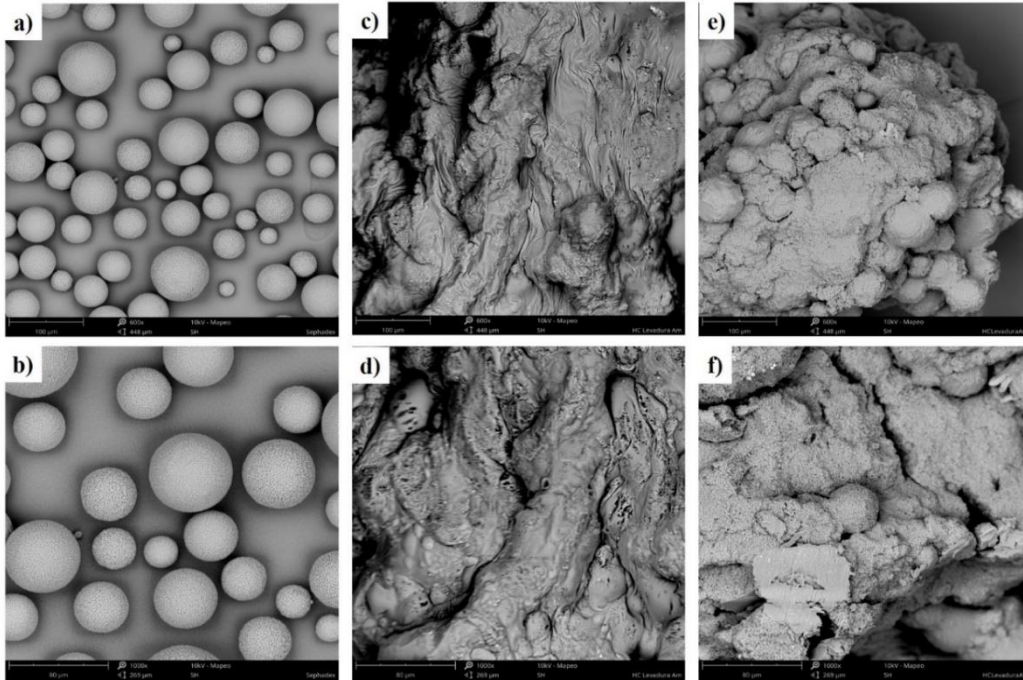


Figura 13. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para el proceso de extracción de lípidos de la fase levadura del aislamiento ambiental a 600x y 100x: **a-b)** Sephadex G-100; **c-d)** Sephadex G-100 con levadura antes del proceso de extracción; **e-f)** Sephadex G-100 con levadura después del proceso de extracción.

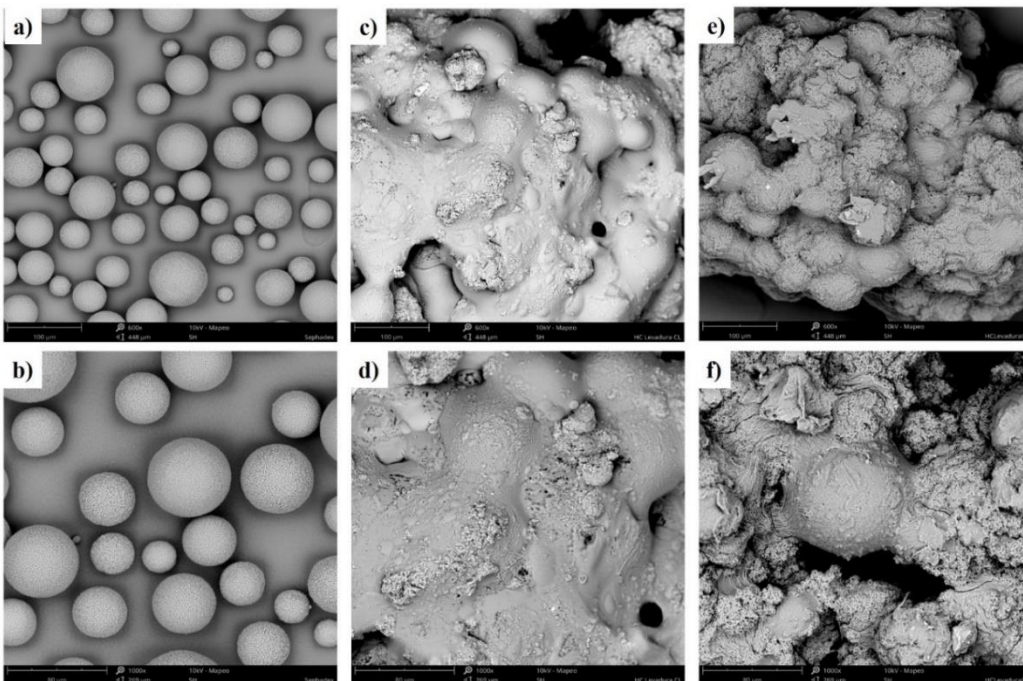


Figura 14. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para el proceso de extracción de la fase levadura del aislamiento clínico a 600x y 100x: **a-b)** Sephadex G-100; **c-d)** Sephadex G-100 con levadura antes del proceso de extracción; **e-f)** Sephadex G-100 con levadura después del proceso de extracción.

Por medio de microscopia electrónica de barrido en las Figuras 13 y 14 se observa un cambio en el aglomerado de levadura y Sephadex G-100 antes y después de la extracción, posiblemente debido al contenido de lípidos separados de la pared celular mediante la extracción realizada de estos compuestos por los solventes.

7.6 Cromatografía de capa fina (CCF)

Con el propósito de realizar una caracterización cualitativa de los extractos para establecer un sistema eluyente a emplear en la separación de los componentes, se procedió a realizar cromatografía en capa fina de las diferentes fracciones de los aislamientos ambiental y clínico de la fase de micelio y levadura. Para la elección del mejor eluyente (solvente o mezcla de solventes que logren mayor separación de los componentes), se utilizaron cinco sistemas de solvente: **1.** 100% cloroformo; **2.** 95:5 cloroformo/metanol; **3.** 90:10 cloroformo/metanol y **4.** 70:30 cloroformo/metanol.

7.6.1 Extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico

A partir de los resultados de cromatografía en capa fina para los extractos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico (ver anexos), el mayor número de componentes se observó para el sistema eluyente; 95:4:1 cloroformo/metanol/ácido acético en las fracciones hexano, isopropanol y metanol, mientras que para la fracción cloroformo fue el sistema eluyente: 95:4:1 cloroformo/metanol/hidróxido de amonio. Se pueden apreciar diferencias cualitativas entre

los aislamientos ambiental y clínico en las fracciones de hexano (Figura 15A-a) y cloroformo (Figura 15A-b), correspondientes a los metabolitos de menor polaridad. Para las fracciones de isopropanol y metanol no se observan diferencias en la composición de los aislamientos.

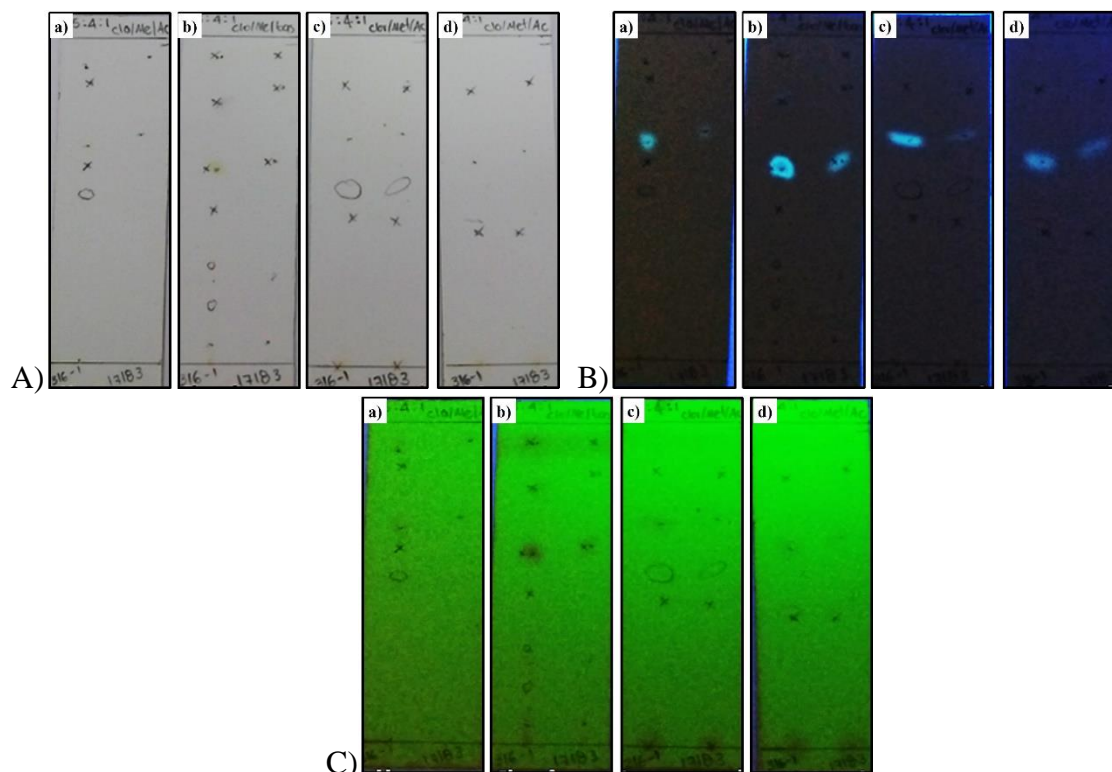


Figura 15. Placas cromatografías de las fracciones hexano, cloroformo, isopropanol y metanol de los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: **A)** revelado con yodo; **B)** revelado con luz ultravioleta de onda corta; **C)** revelado con luz ultravioleta de onda larga.

7.6.2 Extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico

A partir de los resultados de CCF para el extracto de levadura de los aislamiento ambiental y clínico de *H. capsulatum* (ver anexos), la mejor separación entre los componentes se logró para el sistema eluyente; 95:4:1 cloroformo/metanol/ácido acético. Sin embargo, no se presentaron diferencias entre los aislamientos ambiental y clínico (Figura 16).

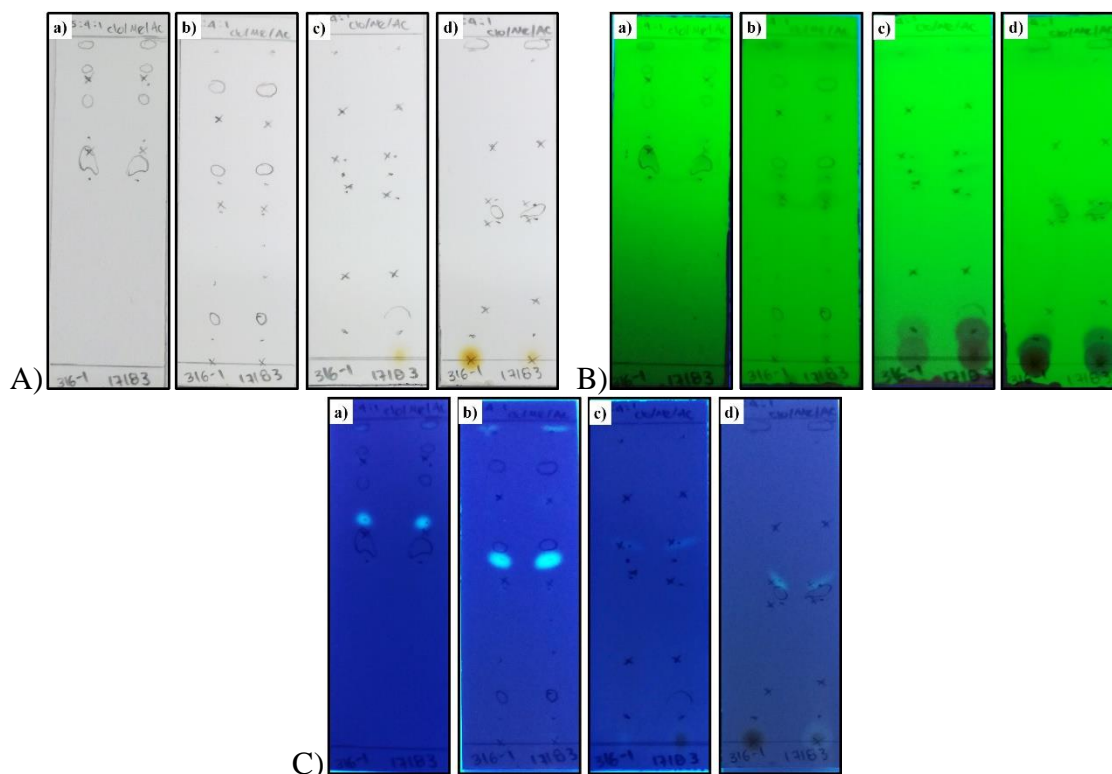


Figura 16. Placas cromatografías de las fracciones hexano, cloroformo, isopropanol y metanol de los extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: **A)** revelado con yodo; **B)** revelado con luz ultravioleta de onda corta; **C)** revelado con luz ultravioleta de onda larga.

7.7 Análisis de los extractos provenientes de *H. capsulatum* por cromatografía gaseosa

La cromatografía en capa fina nos brindó una información cualitativa para establecer en primera instancia si existe diferencia entre los extractos lipídicos obtenidos de los aislamientos ambiental y clínico de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum*. Aunque para la fase micelio, los resultados indican diferencias entre los aislamientos ambiental y clínico, los resultados no son concluyentes sobre la composición y naturaleza química de los extractos. Esto nos llevó a realizar una caracterización del contenido lipídico tipo ácido graso por medio de cromatografía gaseosa (los cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para las fracciones lipídicas se presentan en los anexos).

7.7.1 Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum*

En los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico se encontraron los siguientes ácidos grasos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) (Figuras 17). En la Figura 18 se presenta el contenido de ácidos grasos total (tomado como el producto entre la abundancia relativa y el contenido en masa del extracto), reportando que el contenido promedio relativo para el aislamiento ambiental es: mirístico (5 %), palmítico (25 %), esteárico (13 %), oleico (29 %), linoleico (27 %) y linolénico (0,03 %); mientras que para el aislamiento clínico: mirístico (5 %), palmítico (25 %), esteárico (8 %), oleico (27 %), linoleico (34 %) y linolénico (0,02 %). Los extractos fueron obtenidos por triplicado y cada uno caracterizado por cromatografía gaseosa.

En la Figura 19 se muestra el aporte de cada fracción no solo en la composición lipídica sino en la relación insaturados/saturados de los extractos, el cual fue determinado como la relación entre la sumatoria de ácidos grasos insaturados y la sumatoria de ácidos grasos saturados en cada extracto.

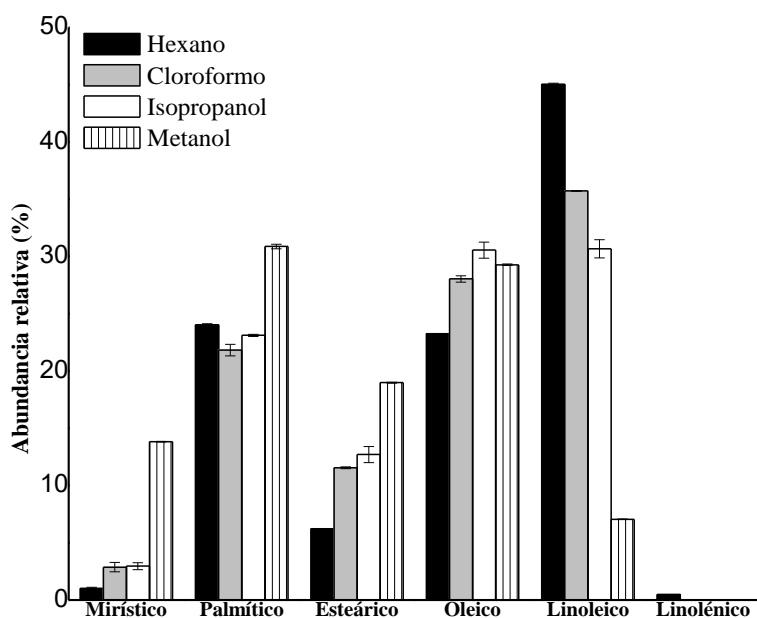


Figura 17. Composición relativa de ácidos grasos en los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental.

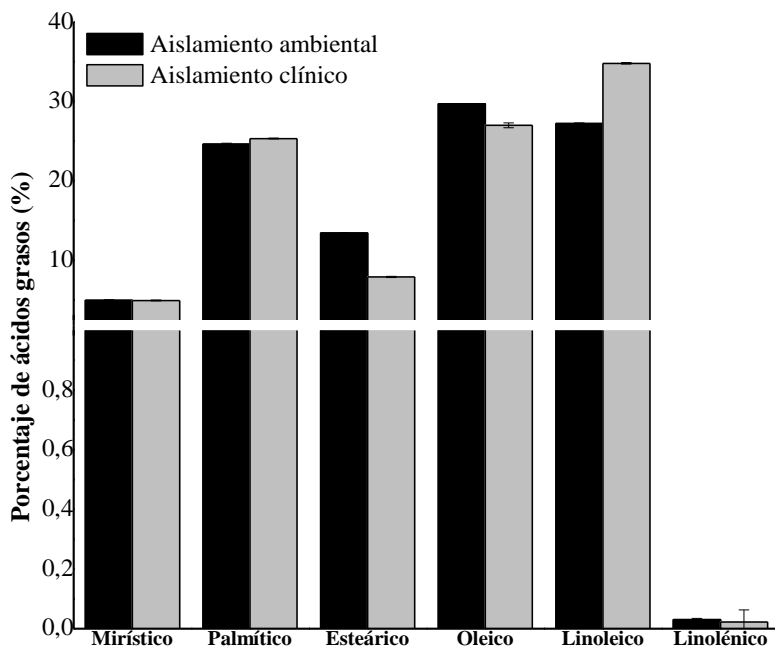


Figura 18. Perfil de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

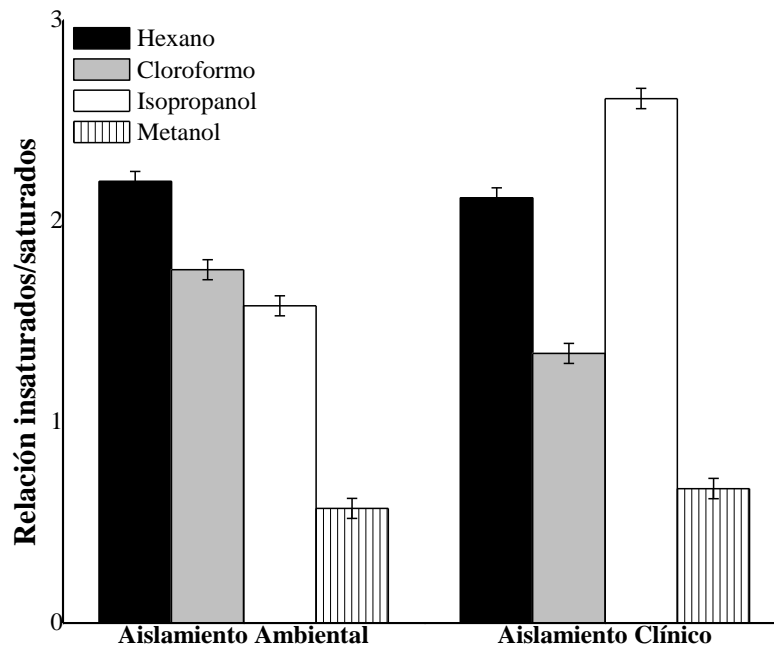


Figura 19. Relación insaturados/saturados en los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Aunque se presenta una similitud en la tendencia del contenido de ácidos grasos total en los aislamientos ambiental y clínico (Figura 18), existe diferencia estadísticamente significativa (ver anexos) entre los aislamientos (P -valor $< 0,05$), especialmente entre los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico. Sobre la contribución de cada fracción de solvente (Figura 19), las fracciones como hexano y metanol no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre los aislamientos cuando se compara la relación insaturados/saturados (P -valor $< 0,05$), mientras que la fracción isopropanol del aislamiento clínico fue el que más aportó en la relación insaturados/saturados. La relación insaturados/saturados del aislamiento clínico es 1,2 veces mayor que el aislamiento ambiental (Figura 20). Una hipótesis que permite explicar la diferencia, establece que el aislamiento clínico de *H. capsulatum*, proveniente de una biopsia de un paciente el cual inicialmente se encuentra una temperatura

corporal aproximadamente a 37 °C, el contacto de *H. capsulatum* con el huésped, produce una alteración de la composición de los ácidos grasos de ambos organismos. Esta alteración puede ser causada en primer lugar, modulando de nuevo la absorción de ácidos grasos; en segundo lugar, controlando la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos (van der Meer-Janssen *et al*, 2010). El acondicionamiento fisiológico y nutricional en la fase micelio requiere una regulación continua de los lípidos de membrana para conseguir una fluidez constante en diversas condiciones de crecimiento (Nelson *et al*, 2005) , debido al cambio de temperatura (20 °C- 25 °C) y modificación del medio de cultivo para el desarrollo del micelio (Beccaccioli *et al*, 2019), a esta nueva condición de temperatura y nutrientes la biosíntesis de ácidos grasos se direcciona para producir ácidos grasos insaturados lo que permite mayor permeabilidad y disminución de la rigidez de su membrana lipídica (Zarnowski *et al*, 2008) y de esta forma conservar aproximadamente el mismo grado de fluidez.

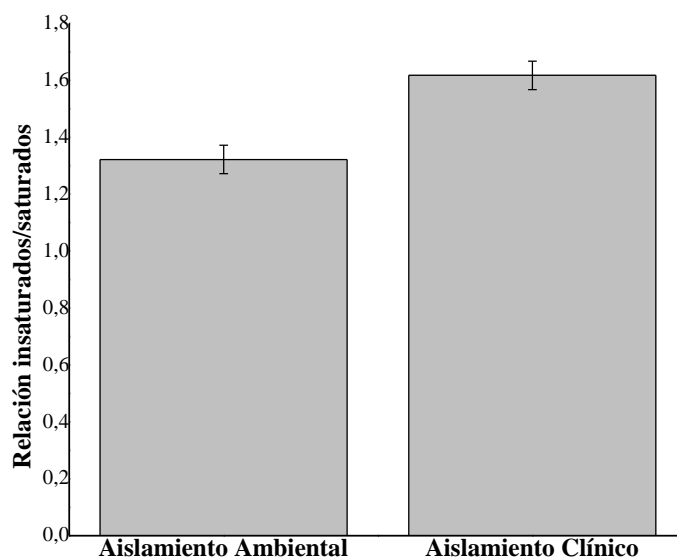


Figura 20. Relación insaturados/saturados en el contenido lipídicos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

7.7.2 Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum*

En los extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico, se encontraron los ácidos grasos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) (Figura 21). En la Figura 22 se presenta la composición relativa de ácidos grasos total, reportando que el contenido promedio de ácidos grasos para el aislamiento ambiental es: mirístico (0,5 %), palmítico (41 %), esteárico (22 %), oleico (24 %) y linoleico (12 %); mientras que para el aislamiento clínico: mirístico (1 %), palmítico (44 %), esteárico (29 %), oleico (18 %) y linoleico (7 %) y linolénico (0,1 %). Los ácidos palmítico, esteárico y oleico presentaron la mayor abundancia, la variación en la composición lipídica (especialmente de los ácidos grasos) en aislamientos de *H. capsulatum*, se relaciona no solo con el tipo de medio de cultivo, sino con la fase de crecimiento del hongo (Zarnoswski, *et al* 2008). Existe una leve diferencia en la composición lipídica de los aislamientos ambiental y clínico; es importante resaltar que los ácidos insaturados, como linoleico y linolénico en levaduras de *H. capsulatum* han sido referidos como sustancias protectoras de la degradación por la adición de pequeñas cantidades de agentes antioxidantes (Zarnoswski, *et al* 2007). Para el aislamiento ambiental, se tendría una mayor protección a la degradación química dado que también se encontró ácido linolénico. En la Figura 33 se muestra el aporte de cada fracción no solo en la composición lipídica si no en la relación insaturados/saturados de los extractos.

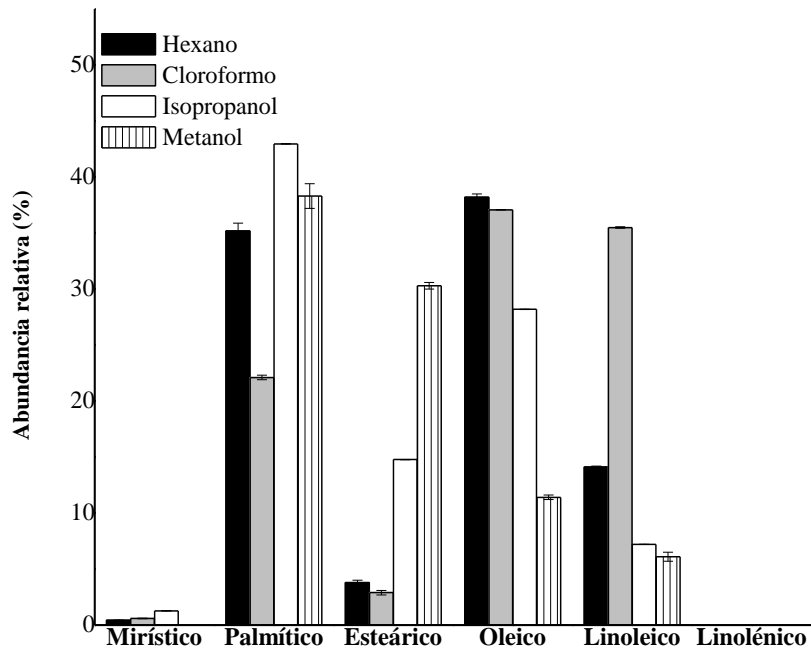


Figura 21. Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental.

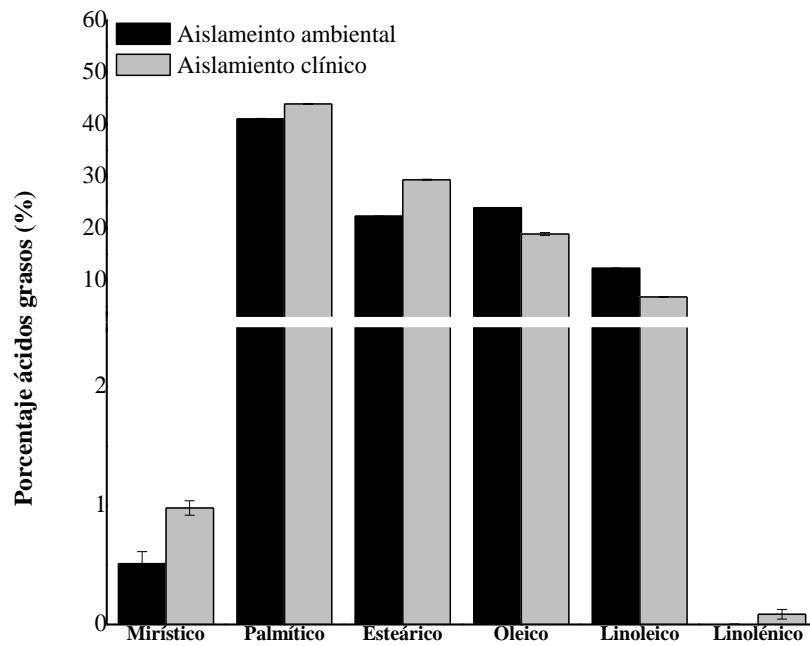


Figura 22. Perfil de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Aunque se observe una similitud en la tendencia del contenido de ácidos grasos en los aislamientos ambiental y clínico (Figura 22), existe diferencia estadísticamente significativa (ver anexos) entre los aislamientos (valor-P < 0,05). Sobre la contribución de cada fracción de solvente (Figura 23), la fracción cloroformo no presentó diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, las fracciones hexano y cloroformo de los aislamientos ambiental y clínico fueron las que más aportaron a la relación insaturados/saturados, generando para aislamiento ambiental una presencia 1,6 veces más insaturado que el encontrado en aislamiento clínico (Figura 24). Esta relación es inversa a la encontrada entre los aislamientos ambiental y clínico de la fase micelio (Figura 20).

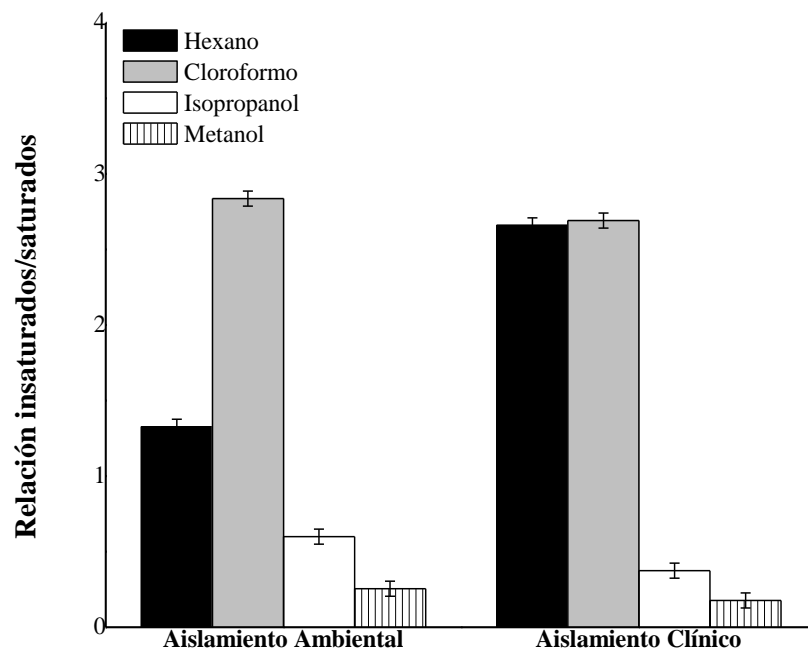


Figura 23. Relación insaturados/saturados en los extractos lipídicos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

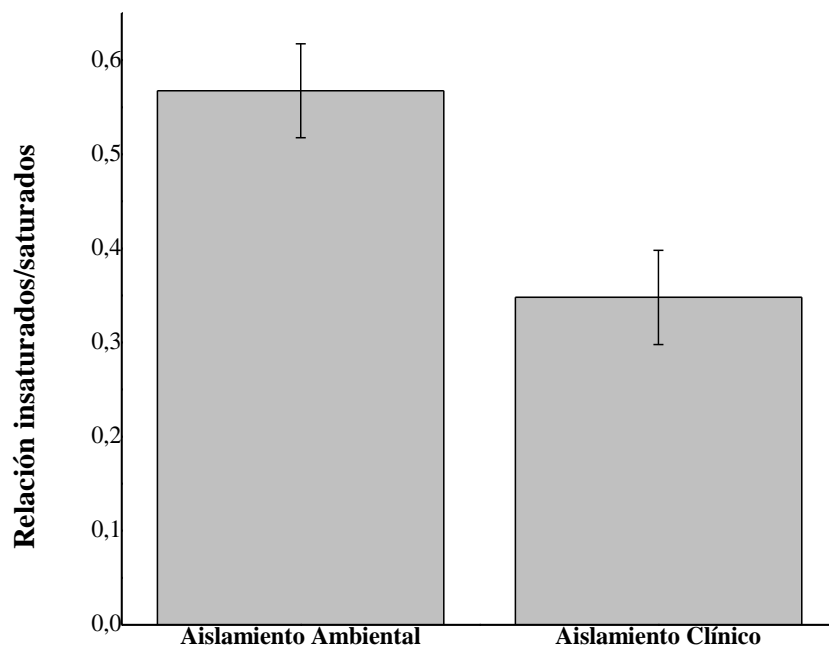


Figura 24. Relación insaturados/saturados de los extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

7.7.3 Relación insaturados/saturados para los extractos de la pared celular de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum*

En la Figura 25 se resume la contribución de las fracciones lipídicas a la relación insaturados/saturados de las fases micelio y levaduras de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico, en la Figura 26 se observa que la relación insaturados/saturados disminuye en el paso de micelio a levadura, indicando que *H. capsulatum* regula su composición lipídica de forma que consigue una fluidez constante en diversas condiciones de crecimiento.

En la Figura 27 se detalla la abundancia relativa de los ácidos grasos en el proceso de transición de micelio a levadura. Para los aislamientos ambiental y clínico, se observa una disminución en la abundancia del ácido mirístico, el un aumento de los ácidos palmítico y esteárico en la conversión de la fase micelio a levadura; esto nos indica una posible secuencia de transformación del precursor C14 (mirístico) en C16 (palmítico) y de precursor C16 (palmítico) en C18 (esteárico). La disminución de los ácidos oleico, linoleico y linolénico en el paso de la fase micelio hacia levadura, supone que el precursor C16 no solo se direcciona hacia la formación de precursores insaturados C18:1 (oleico), C18:2 (linoleico) y C18:3 (linolénico), si no a la formación ácido esteárico, disminuyendo de esta forma la relación insaturados/saturados(Figura 28B), complementando la propuestas para la síntesis de ácidos poliinsaturados en microorganismos (Murata & Wada, 1995; Malcicka *et al*, 2018) (Figura 28A). Para el aislamiento clínico, la disminución de los ácidos oleico, linoleico y el aumento del ácido linolénico nos lleva a proponer que el precursor C18 no solo se direcciona hacia la formación de precursores insaturados C18:2 (linoleico) y C18:3 (linolénico), si no a la formación y concentración de ácido oleico, aumentando de esta forma la relación insaturados/saturados (Figura 28C).

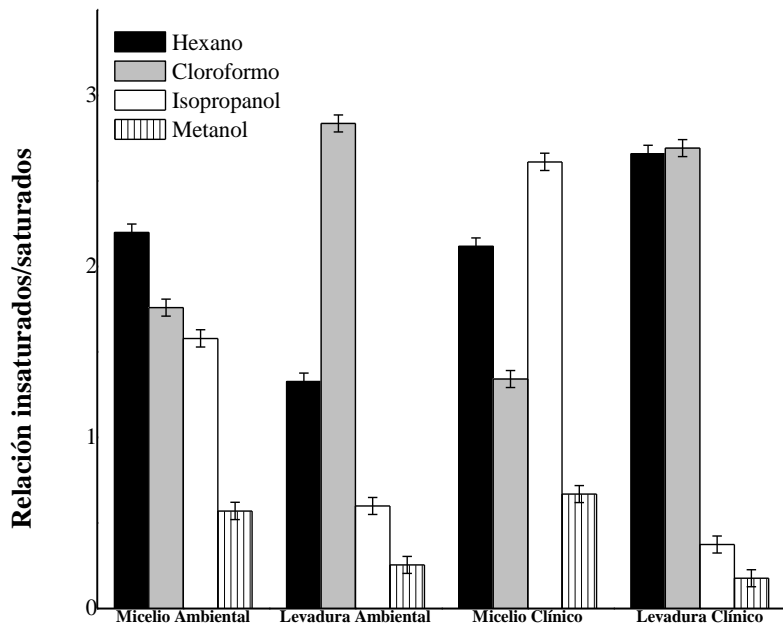


Figura 25. Relación insaturados/saturados en los extractos de la pared celular de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

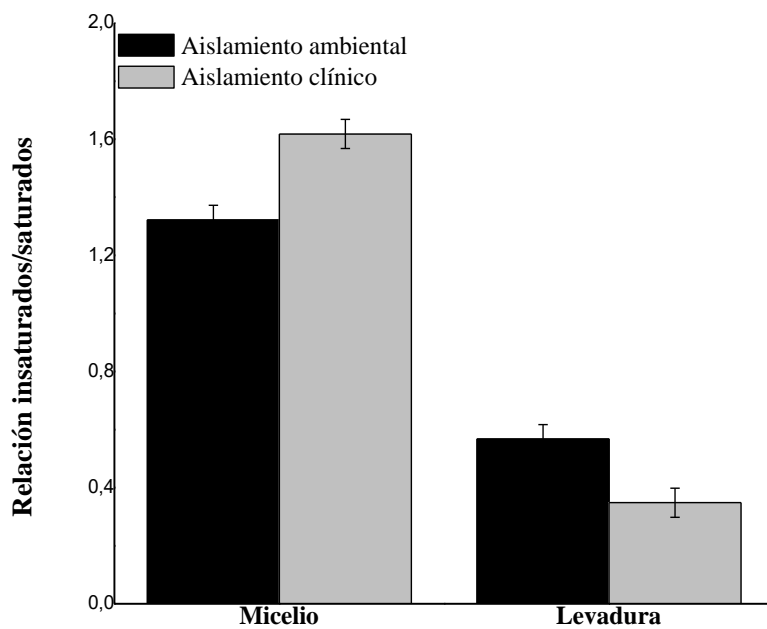


Figura 26. Relación insaturados/saturados de los extractos de la pared celular de micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

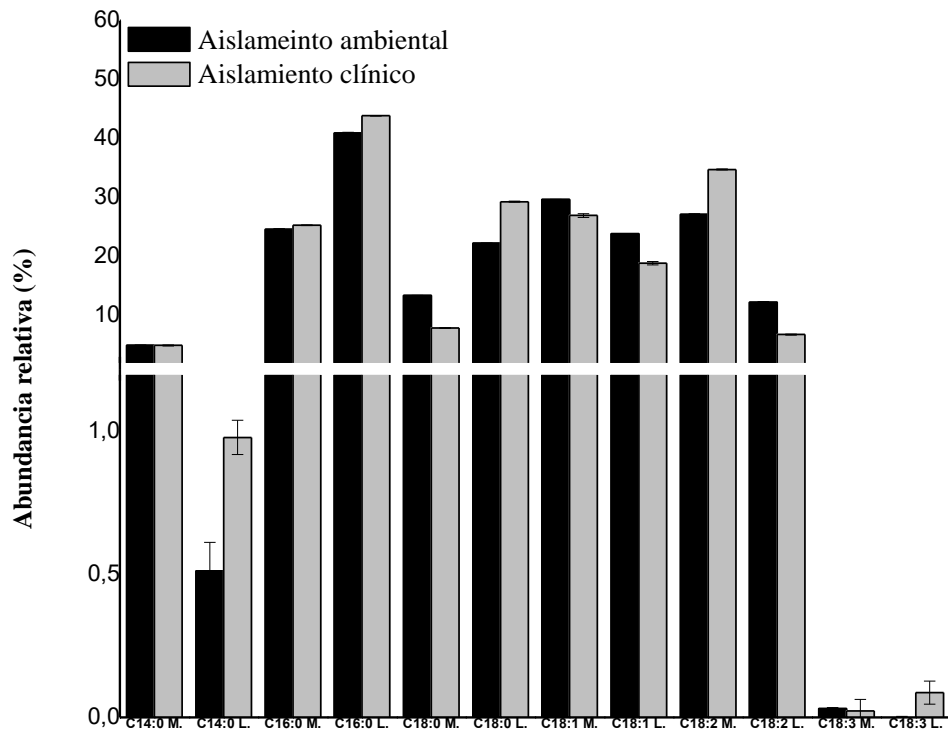


Figura 27. Composición relativa de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

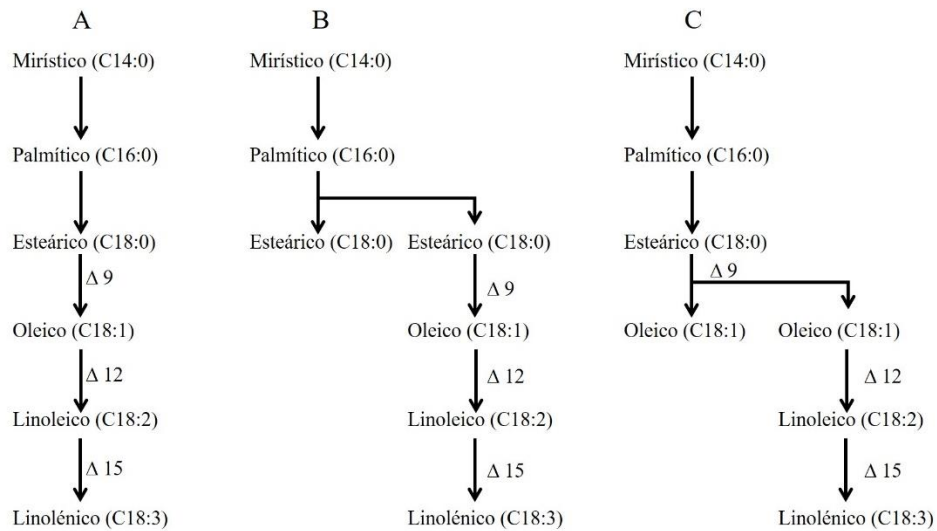


Figura 28. Transformación de ácidos grasos de micelio a levadura: **A)** biosíntesis de ácidos grasos para microorganismos (Malcicka *et al*, 2018); **B)** propuesta de transformación del aislamiento ambiental; **C)** propuesta de transformación del aislamiento clínico. Δ9, Δ12 y Δ15 hacen referencias a las enzimas acilo-lípido desaturasa.

Los ácidos grasos encontrados por cromatografía gaseosa nos dan un indicio del tipo de ácido graso que puede estar asociado a un lípido compuesto fosfolípidos o glicolípido, por lo que se caracterizaron los extractos por cromatografía líquida acoplada a masas.

7.8 Cromatografía HPLC-MS

A partir de los resultados del mejor sistema de solventes utilizado como fase móvil para cromatografía en capa fina (95:4:1 cloroformo/metanol/ácido acético) se procedió a optimizar las condiciones para la caracterización por UHPLC. A continuación, se presentan las condiciones optimizadas (Tabla 5) para la caracterización de los extractos lípidos por UHPLC-MS/MS modo ion positivo.

Tabla 5. Condiciones optimizadas para el método en desarrollo.

Parámetros	UHPLC-MS/MS
Columna analítica	ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm)
Fase móvil	Agua acidificada con 0,1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B)
Gradiente	Iniciando con 100% (A), El 85% (A) y el 15% (B) de 0 a 0,25 min, hasta alcanzar el 100% (B) en 7,75 min (permaneciendo hasta 8,50 min); alternando hasta el 85% (A) y el 15% (B) en 8,51 min (permaneciendo hasta 16 min)
Flujo	0,300 mL/min
Volumen de inyección	5 µL
Fuente de ionización	ESI +/-
Detector	Espectrómetro de masas, operando en el modo MS/MS

7.8.1 Composición lipídica de los extractos asociados a La pared celular de micelio de

H. capsulatum de los aislamientos ambiental y clínico

En la Tabla 6 y 7 se resumen los lípidos encontrados en fase micelio de los aislamientos ambiental y clínico (los espectros MS/MS de cada lípido se presentan en los anexos).

Tabla 6. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental (ND: No Detectado).

Fracción Hexano		Fracción Cloroformo		Fracción Isopropanol		Fracción Metanol		Composición propuesta	Predicción masa (Da)
Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z		
Fosfatidiletanolamina (PE)									
[M+H] ⁺	663,455	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C14:0/C16:0	663,918
ND	ND	[M+H] ⁺	481,201	ND	ND	[M+H] ⁺	486,371	C18:0	481,611
ND	ND	[M+Na] ⁺	483,538	ND	ND	[M+H] ⁺	474,314	C18:2	476,571
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	453,320	C16:0	453,557
Fosfatidilcolina (PC)									
[M+H] ⁺	736,571	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:3/C18:1	740,010
[M+H] ⁺	708,511	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C14:0/C16:0	705,999
[M+Na] ⁺	556,443	[M+Na] ⁺	556,443	[M+H] ⁺	560,301	ND	ND	C18:1-OH	560,666
[M+H] ⁺	530,245	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:0	523,692
ND	ND	[M+H] ⁺	530,349	ND	ND	ND	ND	C18:2	520,669
ND	ND	[M+H] ⁺	468,195	ND	ND	ND	ND	C14:0	467,584
Ácido fosfatídico (PA)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	733,284	C18:1/C18:1	721,953
[M+H] ⁺	684,203	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:2/C18:2	695,939
ND	ND	[M+Na] ⁺	663,455	ND	ND	ND	ND	C14:0/C18:2	663,853
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	641,199	ND	ND	C14:0/C16:0	642,208
[M+Na] ⁺	608,875	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C10:0/C18:2	610,745
ND	ND	[M+H] ⁺	400,380	ND	ND	ND	ND	C16:0	408,472
Fosfatidilserina (PS)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilglicerol (PG)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilinositol (PI)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diacilglicerol (DG)									
ND	ND	[M+H] ⁺	639,233	M	618,253	ND	ND	C18:3/C18:1	621,000
ND	ND	ND	ND	ND	ND	M	536,534	C12:0/C18:0	540,877
Monoacilglicerol (MG)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	M	348,318	C18:2	354,531
Esfingolípidos									
ND	ND	[M+Na] ⁺	939,233	[M+Na] ⁺	939,233	ND	ND	C18:0 Monohexosilcer amida	957,7587

Tabla 7. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico (ND: No Detectado).

Fracción Hexano		Fracción Cloroformo		Fracción Isopropanol		Fracción Metanol		Composición propuesta	Predicción masa (Da)
Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z		
Fosfatidiletanolamina (PE)									
[M+Na] ⁺	761,585	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:3/C18:1	763,016
[M+H] ⁺	663,455	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	667,372	C14:0/C16:0	663,918
ND	ND	[M+H] ⁺	477,570	ND	ND	ND	ND	C18:2	477,579
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	453,320	C16:0	453,557
Fosfatidilcolina (PC)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	792,383	C16:0/C18:0	785,097
[M+H] ⁺	737,546	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C14:0/C18:0	734,057
[M+H] ⁺	708,511	[M+H] ⁺	703,510	ND	ND	ND	ND	C14:0/C16:0	705,999
ND	ND	[M+H] ⁺	701,493	ND	ND	M	701,493	C12:0/C18:2	701,967
ND	ND	[M+H] ⁺	684,204	ND	ND	ND	ND	C10:0/C18:2	673,913
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	540,448	C18:2	542,650
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	491,288	ND	ND	C16:0	495,638
ND	ND	[M+H] ⁺	468,195	ND	ND	ND	ND	C14:0	467,584
ND	ND	[M+Na] ⁺	439,332	ND	ND	ND	ND	C10:0	434,466
Ácido fosfatídico (PA)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	733,284	C18:1/C18:1	721,953
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	703,413	C18:0/C18:0	704,003
[M+H] ⁺	684,203	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:2/C18:2	695,939
ND	ND	[M+Na] ⁺	663,455	ND	ND	ND	ND	C14:0/C18:2	663,853
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	641,199	ND	ND	C14:0/C16:0	642,208
[M+Na] ⁺	608,875	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C10:0/C18:2	610,745
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	460,319	C18:0	460,524
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	450,384	ND	ND	C18:2	456,491
ND	ND	[M+H] ⁺	400,380	ND	ND	ND	ND	C16:0	408,472
ND	ND	[M+H] ⁺	352,153	ND	ND	ND	ND	C12:0	352,362
Fosfatidilserina (PS)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilglicerol (PG)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	579,427	C18:0	576,640
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	473,124	C14:0	478,495
Fosfatidilinositol (PI)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	6,15,497	C18:2	618,633
Diacylglicerol (DG)									
ND	ND	[M+H] ⁺	639,233	[M+H] ⁺	640,236	ND	ND	C18:1/C18:1	643,990
[M+H] ⁺	533,148	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C12:0/C18:2	536,838
Monoacylglicerol (MG)									
[M+H] ⁺	348,318	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	348,318	C18:2	354,531
ND	ND	[M+H] ⁺	334,296	ND	ND	ND	ND	C16:0	330,509
Esfingolípidos									
[M+Na] ⁺	1025,324	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:0 Monohexosil ceramida acetilada	1024,5706
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	939,233	ND	ND	C18:0 Monohexosilceramida	957,7587
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	680,962	C18:0 Fosfatidil - ceramida	982,1209

En la Tabla 8 se hace la comparación entre los lípidos compuestos tipo mono y diacil glicerol, fosfolípidos y glicolípidos encontrados en los aislamientos ambiental y clínico, presentando diferencias entre los aislamientos.

Tabla 8. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total de los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico (ND: No Detectado).

Aislamiento Ambiental		Aislamiento Clínico		Composición propuesta	Predicción masa (Da)
Especie	m/z	Especie	m/z		
Fosfatidiletanolamina (PE)					
ND	ND	[M+Na] ⁺	761,585	C18:3/C18:1	763,016
[M+H] ⁺	663,455	[M+H] ⁺	663,455	C14:0/C16:0	663,918
Liso-Fosfatidiletanolamina (LPE)					
[M+H] ⁺	481,201	ND	ND	C18:0	481,611
[M+Na] ⁺	483,538	[M+H] ⁺	477,570	C18:2	477,579
[M+H] ⁺	453,320	[M+H] ⁺	453,320	C16:0	453,557
Fosfatidilcolina (PC)					
[M+Na] ⁺	792,383	ND	ND	C16:0/C18:0	785,097
[M+H] ⁺	737,546	ND	ND	C14:0/C18:0	734,057
[M+H] ⁺	736,571	ND	ND	C18:3/C18:1	740,010
[M+H] ⁺	708,511	[M+H] ⁺	708,511	C14:0/C16:0	705,999
ND	ND	[M+H] ⁺	701,493	C12:0/C18:2	701,967
ND	ND	[M+H] ⁺	684,204	C10:0/C18:2	673,913
Liso-Fosfatidilcolina (LPC)					
[M+Na] ⁺	556,443	ND	ND	C18:1-OH	560,666
[M+H] ⁺	530,245	ND	ND	C18:0	523,692
[M+H] ⁺	530,349	[M+H] ⁺	517,458	C18:2	520,669
[M+H] ⁺	491,288	ND	ND	C16:0	495,638
[M+H] ⁺	468,195	[M+H] ⁺	468,195	C14:0	467,584
ND	ND	[M+Na] ⁺	439,332	C10:0	434,466
Ácido fosfatídico (PA)					
[M+Na] ⁺	733,284	[M+Na] ⁺	733,284	C18:1/C18:1	721,953
ND	ND	[M+Na] ⁺	703,413	C18:0/C18:0	704,003
[M+H] ⁺	684,203	[M+H] ⁺	684,203	C18:2/C18:2	695,939
[M+Na] ⁺	663,455	[M+Na] ⁺	663,455	C14:0/C18:2	663,853
[M+Na] ⁺	641,199	[M+Na] ⁺	641,199	C14:0/C16:0	642,208
[M+Na] ⁺	608,875	[M+Na] ⁺	608,875	C10:0/C18:2	610,745
Liso-ácido fosfatídico (LPA)					
ND	ND	[M+Na] ⁺	460,319	C18:0	460,524
ND	ND	[M+Na] ⁺	450,384	C18:2	456,491
[M+H] ⁺	400,380	[M+H] ⁺	400,380	C16:0	408,472
ND	ND	[M+H] ⁺	352,153	C12:0	352,362
Fosfatidilserina (PS)					
ND	ND	ND	ND	ND	ND
Liso-Fosfatidilglicerol (LPG)					
ND	ND	[M+Na] ⁺	579,427	C18:0	576,640
ND	ND	[M+Na] ⁺	473,124	C14:0	478,495
Liso-Fosfatidilinositol (LPI)					

ND	ND	[M+Na] ⁺	6,15,497	C18:2	618,633
Diacilglicerol (DG)					
ND	ND	[M+H] ⁺	640,236	C18:1/C18:1	643,990
[M+H] ⁺	618,253	ND	ND	C18:3/C18:1	621,000
[M+H] ⁺	536,534	ND	ND	C12:0/C18:0	540,877
ND	ND	[M+H] ⁺	533,148	C12:0/C18:2	536,838
Monoacilglicerol (MG)					
[M+H] ⁺	348,318	[M+H] ⁺	348,318	C18:2	354,531
ND	ND	[M+H] ⁺	334,296	C16:0	330,509
Esfingolípidos					
[M+H] ⁺	916,243	[M+H] ⁺	916,243	C18:0 Monohexosilceramida	916,243
ND	ND	[M+Na] ⁺	1025,324	C18:0 Monohexosilceramida acetilada	1024,571
ND	ND	[M+H] ⁺	680,962	C18:0 Fosfatidil - ceramida	982,1209

7.8.2 Composición lipídica de los extractos asociados a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico

En la Tabla 9 y 10 se resumen los lípidos encontrados en fase levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico (los espectros MS/MS de cada lípido se presentan en los anexos).

Tabla 9. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental (ND: No Detectado).

Fracción Hexano		Fracción Cloroformo		Fracción Isopropanol		Fracción Metanol		Composición propuesta	Predicción masa (Da)
Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z		
Fosfatidiletanolamina (PE)									
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	661,902	ND	ND	C12:0/C18:1	663,530
[M+H] ⁺	481,611	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:0	487,179
ND	ND	[M+H] ⁺	480,603	ND	ND	ND	ND	C18:1	481,611
ND	ND	[M+H] ⁺	477,570	ND	ND	ND	ND	C18:2	467,313
[M+H] ⁺	453,320	[M+H] ⁺	453,320	ND	ND	ND	ND	C16:0	453,557
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	298,457	[M+H] ⁺	298,457	C12:0	402,391
ND	ND	[M+H] ⁺	369,395	ND	ND	ND	ND	C10:0	376,315
Fosfatidilcolina (PC)									
ND	ND	[M+Na] ⁺	811,137	ND	ND	ND	ND	C18:0/C18:1	814,678
[M+Na] ⁺	805,087	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:2/C18:2	803,532
ND	ND	[M+H] ⁺	758,075	ND	ND	ND	ND	C18:2/C16:0	736,614
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	705,999	ND	ND	C12:0/C18:2	701,528
ND	ND	[M+H] ⁺	700,935	ND	ND	[M+H] ⁺	700,935	C14:0/C14:0	701,430
[M+H] ⁺	705,999	[M+H] ⁺	705,999	ND	ND	ND	ND	C14:0/C16:0	699,450

[M+H] ⁺	519,660	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:2	526,522
[M+H] ⁺	495,638	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C16:0	485,215
ND	ND	[M+H] ⁺	468,596	[M+H] ⁺	468,592	[M+H] ⁺	468,592	C14:0	456,349
Ácido fosfatídico (PA)									
[M+Na] ⁺	456,492	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:2	453,001
[M+H] ⁺	438,442	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:0	447,319
[M+H] ⁺	436,526	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:1	433,309
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	432,470	[M+H] ⁺	432,470	C16:0	424,322
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	381,426	ND	ND	C14:0	364,419
ND	ND	[M+H] ⁺	325,318	ND	ND	ND	ND	C12:0	330,415
Fosfatidilserina (PS)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilglicerol (PG)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilinositol (PI)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diacilglicerol (DG)									
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	566,908	[M+H] ⁺	566,908	C14:0/C18:1	563,552
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	568,892	[M+H] ⁺	568,892	C14:0/C18:2	563,355
Monoacilglicerol (MG)									
ND	ND	[M+H] ⁺	354,531	ND	ND	ND	ND	C18:2	338,345
ND	ND	[M+H] ⁺	330,509	ND	ND	ND	ND	C16:0	329,092
ND	ND	[M+H] ⁺	302,455	ND	ND	ND	ND	C14:0	302,312
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	274,401	C12:0	280,315
ND	ND	[M+H] ⁺	246,347	ND	ND	ND	ND	C10:0	246,248
Ácido Graso (FA)									
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	303,444	[M+Na] ⁺	303,444	C18:2	303,250
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	284,484	[M+H] ⁺	284,484	C18:0	284,294
[M+H] ⁺	282,470	ND	ND	[M+H] ⁺	282,470	[M+H] ⁺	282,470	C18:1	282,276
[M+H] ⁺	256,430	[M+H] ⁺	256,430	[M+H] ⁺	256,430	[M+H] ⁺	256,430	C16:0	256,262
[M+H] ⁺	228,370	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C14:0	228,232
Esfingolípidos									
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	916,243	ND	ND	C18:0 Monohexosilcer amida	921,083
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	615,960	ND	ND	C18:0 Ceramide	615,466
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	671,941	C18:0 Fosfatil- Ceramide	654,124

Tabla 10. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* del aislamiento clínico (ND: No Detectado).

Fracción Hexano		Fracción Cloroformo		Fracción Isopropanol		Fracción Metanol		Composición propuesta	Predicción masa (Da)
Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z		
Fosfatidiletanolamina (PE)									
[M+H] ⁺	481,611	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:0	487,179
ND	ND	[M+H] ⁺	480,603	ND	ND	ND	ND	C18:1	481,611
ND	ND	[M+H] ⁺	477,570	ND	ND	ND	ND	C18:2	467,313
[M+H] ⁺	453,320	[M+H] ⁺	453,320	ND	ND	ND	ND	C16:0	453,557

ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	298,457	[M+H] ⁺	298,457	C12:0	402,391
ND	ND	[M+H] ⁺	369,395	ND	ND	ND	ND	C10:0	376,315
Fosfatidilcolina (PC)									
ND	ND	[M+Na] ⁺	811,137	ND	ND	ND	ND	C18:0/C18:1	814,678
[M+Na] ⁺	805,087	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:2/C18:2	803,532
ND	ND	[M+H] ⁺	758,075	ND	ND	ND	ND	C18:2/C16:0	736,614
ND	ND	[M+H] ⁺	700,935	ND	ND	M	700,935	C14:0/C14:0	701,430
ND	ND	[M+H] ⁺	705,999	ND	ND	ND	ND	C14:0/C16:0	699,450
[M+H] ⁺	519,660	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:2	526,522
ND	ND	[M+H] ⁺	468,596	[M+H] ⁺	468,592	[M+H] ⁺	468,592	C14:0	456,349
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	439,530	ND	ND	C12:0	447,212
Ácido fosfatídico (PA)									
ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	516,848	ND	ND	C12:0/C18:0	522,362
[M+Na] ⁺	456,492	ND	ND	[M+Na] ⁺	456,492	ND	ND	C18:2	453,001
[M+H] ⁺	438,442	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:0	447,319
[M+H] ⁺	436,526	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C18:1	433,309
[M+H] ⁺	432,470	ND	ND	[M+H] ⁺	432,470	[M+H] ⁺	432,470	C16:0	424,322
ND	ND	[M+H] ⁺	325,318	[M+H] ⁺	325,318	ND	ND	C12:0	330,415
Fosfatidilserina (PS)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilglicerol (PG)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilinositol (PI)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diacylglicerol (DG)									
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	591,914	ND	ND	C14:0/C18:0	588,397
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	566,908	C14:0/C18:1	563,552
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	568,892	C14:0/C18:2	563,355
[M+H] ⁺	542,886	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C14:0/C16:0	546,121
Monoacylglicerol (MG)									
ND	ND	[M+H] ⁺	354,531	ND	ND	ND	ND	C18:2	338,345
ND	ND	[M+H] ⁺	330,509	[M+H] ⁺	334,541	ND	ND	C16:0	329,092
ND	ND	[M+H] ⁺	302,455	ND	ND	ND	ND	C14:0	302,312
ND	ND	[M+H] ⁺	246,347	ND	ND	ND	ND	C10:0	246,248
Ácido Graso (FA)									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	303,444	C18:2	303,250
ND	ND	ND	ND	ND	ND	[M+H] ⁺	284,484	C18:0	284,294
[M+H] ⁺	282,470	ND	ND	[M+H] ⁺	282,470	[M+H] ⁺	282,470	C18:1	282,276
[M+H] ⁺	256,430	[M+H] ⁺	256,430	[M+H] ⁺	256,430	[M+H] ⁺	256,430	C16:0	256,262
[M+H] ⁺	228,370	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C14:0	228,232

En la Tabla 11 se hace la comparación entre los lípidos compuestos tipo mono y diacylglicerol, fosfolípidos y glicolípidos encontrados en los aislamientos ambiental y clínico de la fase levadura.

Tabla 11. Lípidos mayoritarios identificados tentativamente por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total de los extractos de la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico (ND: No Detectado).

Aislamiento Ambiental		Aislamiento Clínico		Composición propuesta	Predicción masa (Da)
Especie	m/z	Especie	m/z		
Fosfatidiletanolamina (PE)					
[M+H] ⁺	661,902	ND	ND	C12:0/C18:1	663,530
Liso-fosfatidiletanolamina (LPE)					
[M+H] ⁺	481,611	[M+H] ⁺	481,611	C18:0	487,179
[M+H] ⁺	480,603	[M+H] ⁺	480,603	C18:1	481,611
[M+H] ⁺	477,570	[M+H] ⁺	477,570	C18:2	467,313
[M+H] ⁺	453,320	[M+H] ⁺	453,320	C16:0	453,557
[M+H] ⁺	298,457	[M+H] ⁺	298,457	C12:0	402,391
[M+H] ⁺	369,395	[M+H] ⁺	369,395	C10:0	376,315
Fosfatidilcolina (PC)					
[M+Na] ⁺	811,137	[M+Na] ⁺	811,137	C18:0/C18:1	814,678
[M+Na] ⁺	805,087	[M+Na] ⁺	805,087	C18:2/C18:2	803,532
[M+H] ⁺	758,075	[M+H] ⁺	758,075	C18:2/C16:0	736,614
[M+H] ⁺	705,999	ND	ND	C12:0/C18:2	701,528
[M+H] ⁺	700,935	[M+H] ⁺	700,935	C14:0/C14:0	701,430
[M+H] ⁺	705,999	[M+H] ⁺	705,999	C14:0/C16:0	699,450
Liso-fosfatidilcolina (LPC)					
[M+H] ⁺	519,660	[M+H] ⁺	519,660	C18:2	526,522
[M+H] ⁺	495,638	ND	ND	C16:0	485,215
[M+H] ⁺	468,596	[M+H] ⁺	468,596	C14:0	456,349
ND	ND	[M+H] ⁺	439,530	C12:0	447,212
Liso-ácido fosfatídico (LPA)					
[M+Na] ⁺	456,492	[M+Na] ⁺	456,492	C18:2	453,001
[M+H] ⁺	438,442	[M+H] ⁺	438,442	C18:0	447,319
[M+H] ⁺	436,526	[M+H] ⁺	436,526	C18:1	433,309
[M+H] ⁺	432,470	[M+H] ⁺	432,470	C16:0	424,322
[M+H] ⁺	381,426	ND	ND	C14:0	364,419
[M+H] ⁺	325,318	[M+H] ⁺	325,318	C12:0	330,415
Fosfatidilserina (PS)					
ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilglicerol (PG)					
ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosfatidilinositol (PI)					
ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diacilglicerol (DG)					
ND	ND	[M+Na] ⁺	591,914	C14:0/C18:0	588,397
[M+H] ⁺	566,908	[M+H] ⁺	566,908	C14:0/C18:1	563,552
[M+H] ⁺	568,892	[M+H] ⁺	568,892	C14:0/C18:2	563,355
ND	ND	[M+H] ⁺	542,886	C14:0/C16:0	546,121
Monoacilglicerol (MG)					
[M+H] ⁺	354,531	[M+H] ⁺	354,531	C18:2	338,345
[M+H] ⁺	330,509	[M+H] ⁺	330,509	C16:0	329,092
[M+H] ⁺	302,455	[M+H] ⁺	302,455	C14:0	302,312
[M+H] ⁺	274,401	ND	ND	C12:0	280,315
ND	ND	[M+H] ⁺	246,347	C10:0	246,248
Ácido Graso (FA)					

[M+Na] ⁺	303,444	[M+Na] ⁺	303,444	C18:2	303,250
[M+H] ⁺	284,484	[M+H] ⁺	284,484	C18:0	284,294
[M+H] ⁺	282,470	[M+H] ⁺	282,470	C18:1	282,276
[M+H] ⁺	256,430	[M+H] ⁺	256,430	C16:0	256,262
[M+H] ⁺	228,370	[M+H] ⁺	228,370	C14:0	228,232
Esfingolípidos					
[M+H] ⁺	916,243	[M+H] ⁺	916,243	C18:0 Monohexosilceramida	921,083
[M+Na] ⁺	615,960	[M+Na] ⁺	615,960	C18:0 Ceramide	615,466
[M+H] ⁺	671,941	[M+H] ⁺	671,941	C18:0 Fosfatil-Ceramide	654,124

A partir de los fosfolípidos encontrados, se tiene que en micelio aislamiento ambiental las especies mayoritarias fueron PE, PC y PA, mientras para micelio aislamiento clínico fueron PE, PC, PA, PG y PI. Aunque los lípidos encontrados están asociados a la construcción de membranas celulares (bicapas lipídicas), estos lípidos también realizan un número diverso de funciones, desde la compartimentación del citoplasma hasta el alojamiento de proteínas involucradas en la señalización celular, la adhesión intercelular y el soporte del citoesqueleto (Albuquerque *et al.*, 2008), los estudios sobre la presencia de fosfolípidos en *H. capsulatum* están más orientados a forma infectante (fase levadura) (Al-Doory, 1960; Nielsen, 1966; Zarnowski, *et al.* 2007; Zarnowski, *et al.* 2008; Toledo *et al.*, 2001; Barreto-Bergter *et al.*, 2011), que a la forma parasitaria (fase micelio).

Para la fase levadura de *H. capsulatum*, se tiene que para los aislamientos ambiental y clínico no presentaron diferencias y que las especies mayoritarias fueron PE, PC y PA. Para los resultados en levadura se han propuesto que el contenido de PC es determinante en la virulencia de aislamientos clínicos de *H. capsulatum* sobre ratones, donde la ausencia de PC disminuye la virulencia en 50% (Nielsen, 1966), además, PC y PE están relacionados en el mecanismo de transferencias trans-pared celular por medio de vesículas en *H. capsulatum* (Albuquerque *et al.*, 2008). En los extractos lipídicos asociados a la pared celular de levadura

de *H. capsulatum* se observa mayor contenido de ácidos grasos, acilgliceroles y fosfolípidos, comparado con los extractos lipídicos asociados a la pared celular de micelio (Al-Doory, 1960).

7.8.3 Propuesta de ruta biosintética de fosfolípidos en micelio de *H. capsulatum*

Los pasos involucrados en la ruta biosintética de fosfoglicéridos se conservan en gran medida en hongos y comparten muchos puntos en común con los mamíferos (Singh *et al*, 2017). A partir de los resultados la biosíntesis de fosfoglicéridos en *H. capsulatum*, es bastante similar a la reportada para *C. neoformans* (Singh *et al*, 2017), *Saccharomyces cerevisiae* (Carman and Han, 2011) y *C. albicans* (Chen *et al*, 2010).

Se propone que la biosíntesis de fosfolípidos de la fase micelio de *H. capsulatum* (Figura 29), inicia con la formación de diacil glicerol-DG a partir de monoacil glicerol-MG y continua con la formación de ácido fosfatídico-PA. A partir del PA, posteriormente se forma Citidildifosfato (DDP)-Diacilglicerol (DAG) el cual es un precursor de la mayor parte de fosfoglicéridos como, fosfatidilserina-PS, fosfatidilinositol-PI y fosfatidiletanolamina-PE (Singh *et al*, 2017). A partir de fosfatidiletanolamina-PE se obtienen fosfatidil-N-monetiletanolamina-PME, fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina-PDE y finalmente fosfatidilcolina-PC. La presencia de liso-ácidofosfatídico-LPA, liso-fosfatidilcolina-LPC, liso-fosfatidilglicerol-LPG; liso-fosfatidiletanolamina-LPE; lisofosfatidilserina-LP y liso-fosfatidilinositol-LPI nos indica que pueden ser precursores de los fosfolípidos encontrados.

En las Figuras 30 y 31, se detallan las posibles rutas biosintéticas de fosfolípidos de la fase micelio de *H. capsulatum* basado en los resultados de los aislamientos ambiental y clínico.

7.8.4 Propuesta de ruta biosintética de fosfolípidos en levadura de *H. capsulatum*

A partir de los fosfolípidos encontrados para la fase levadura de *H. capsulatum*, se tiene que para los aislamientos ambiental y clínico no presentaron diferencias y que las especies mayoritarias fueron PE, PC y PA. Para los resultados en levadura se propone una ruta biosintética como la propuesta para micelio de *H. capsulatum* como se ilustra en la Figura 32 y 33.

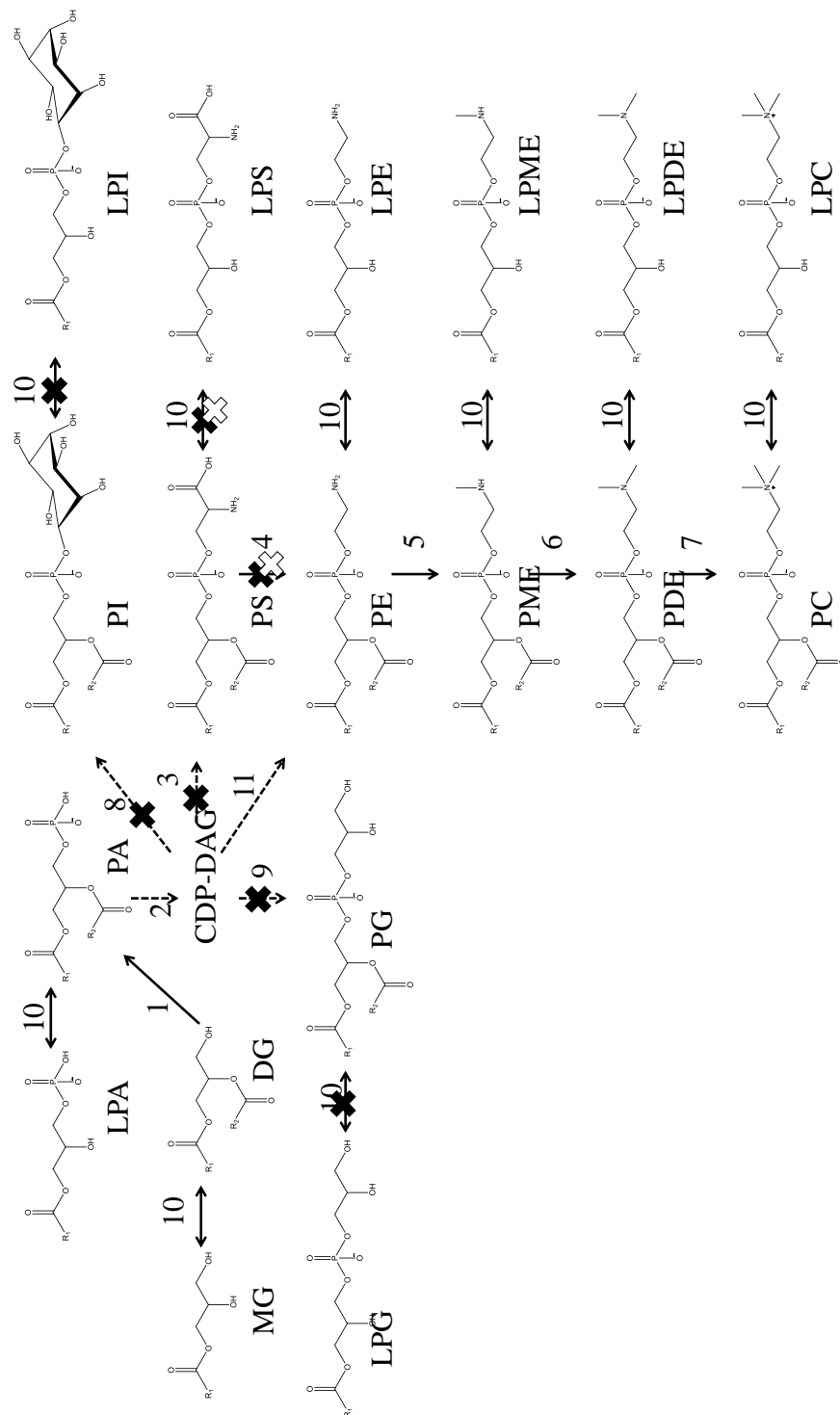


Figura 29. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase micelio de *H. capsulatum* basado en los resultados de los aislamientos ambiental y clínico: (1) PA sintasa; (2) Citidildifosfato (DDP)-Diacilglicerol (DAG) transferasa; (3) PS sintasa; (4) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (8) PI sintasa; (9) PG sintasa; (10) fosfolipasa B. La X (negra) representa las vías que no se presentan en el aislamiento ambiental y la X (blanca) representa las vías que no se presentan en el aislamiento clínico.

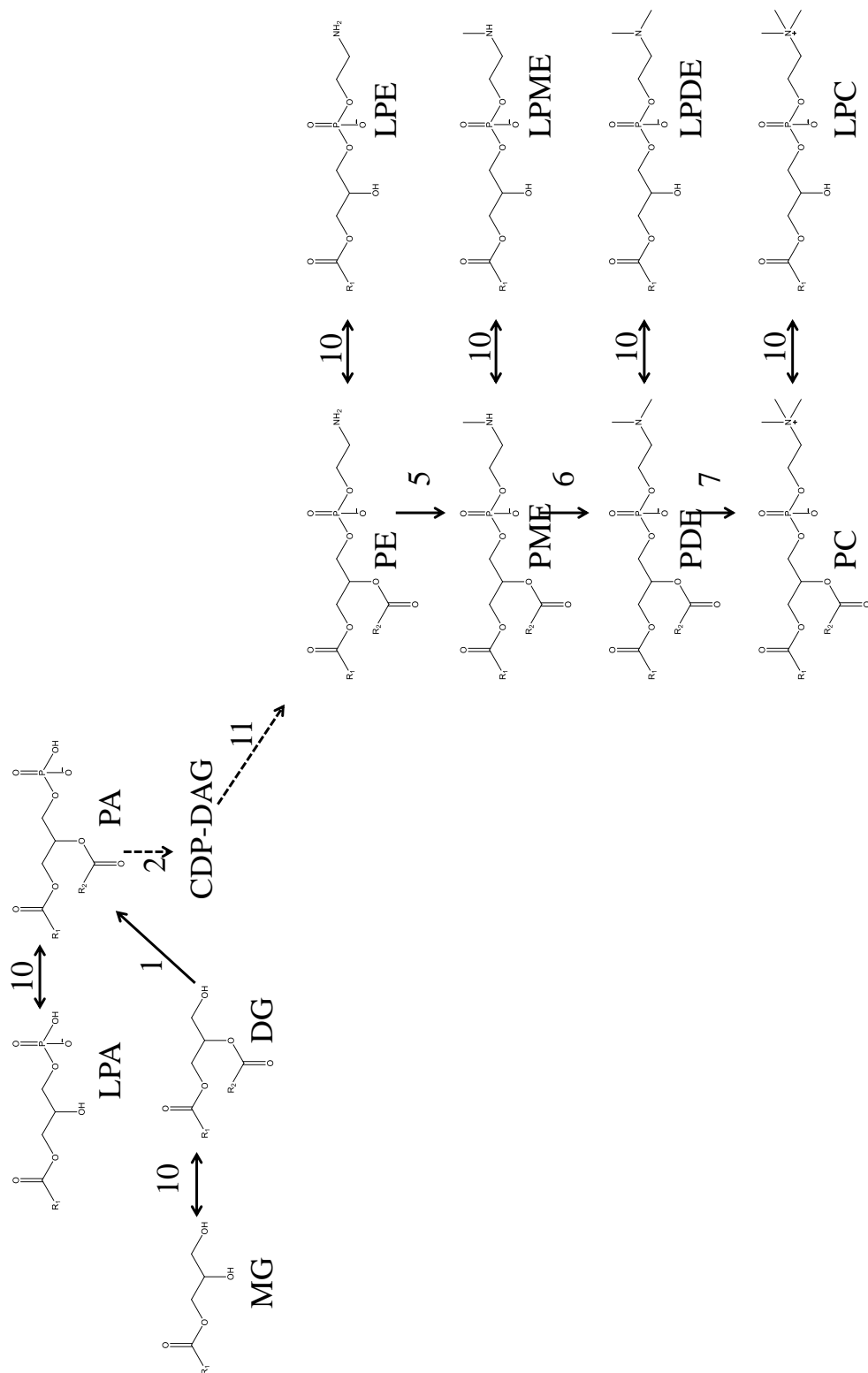


Figura 30. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental: (1) PA sintasa; (2) DDP-DAG transferasa; (11) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (10) fosfolipasas B.

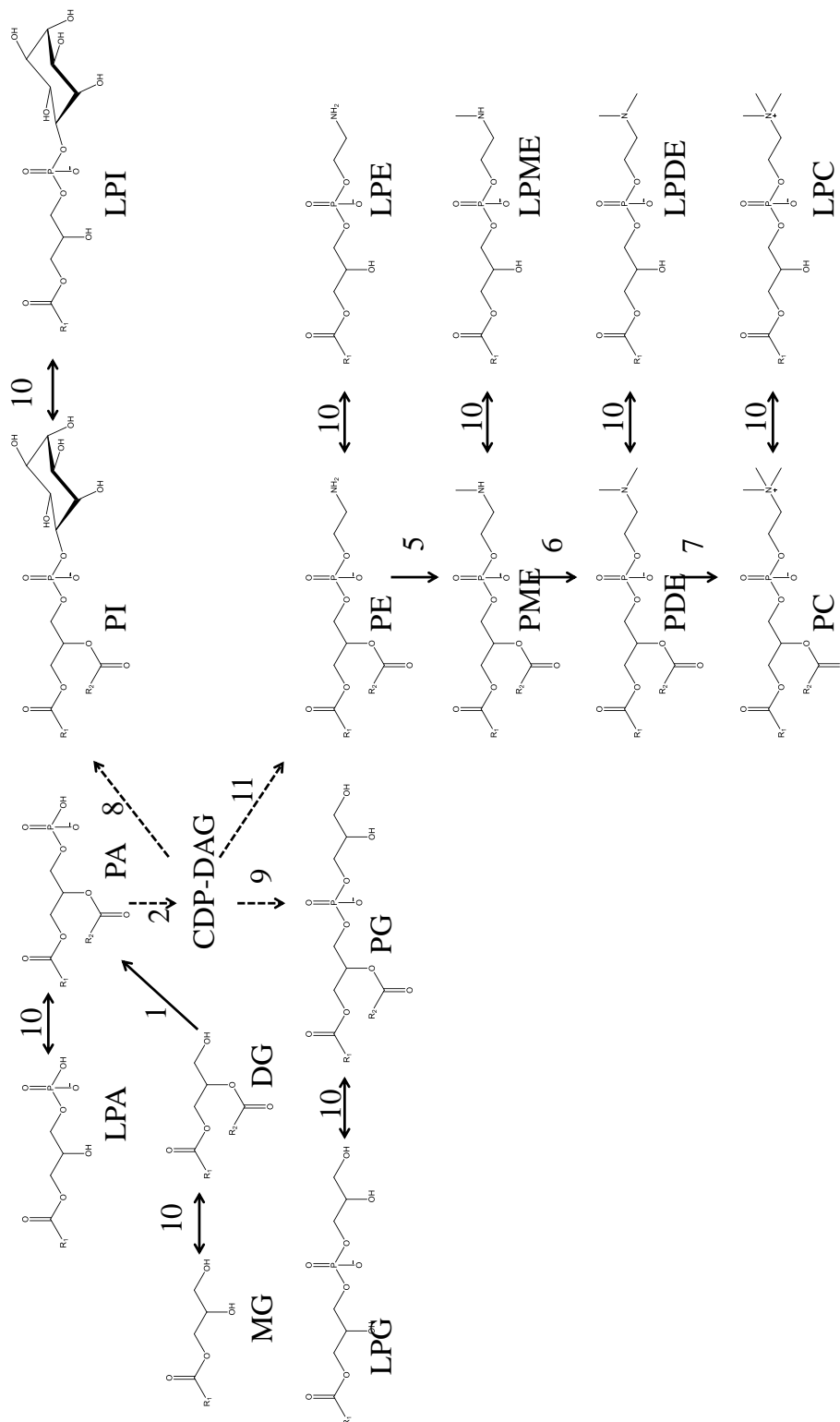


Figura 31. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico: (1) PA sintasa; (2) DDP-DAG transferasa; (11) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (8) PI sintasa; (9) PG sintasa; (10) fosfolipasas B.

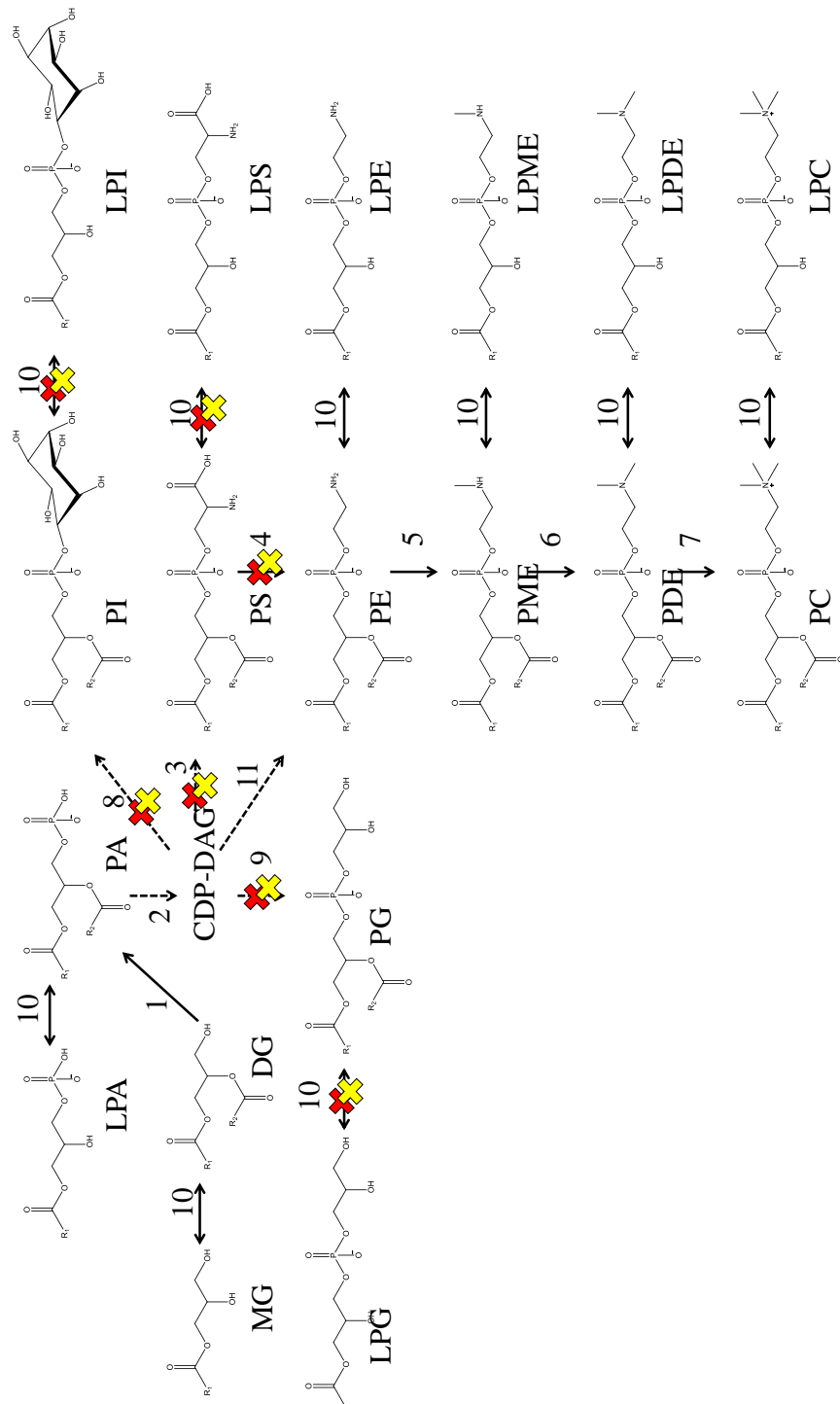


Figura 32. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de fase levadura de *H. capsulatum* basado en los resultados de los aislamientos ambiental y clínico: (1) PA sintasa; (2) DDP-DAG transferasa; (3) PS sintasa; (4) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (8) PI sintasa; (9) PG sintasa; (10) fosfolipasa B. La X (roja) representa las vías que no se presentan en el aislamiento ambiental y la X (amarilla) representa las vías que no se presentan en el aislamiento clínico.

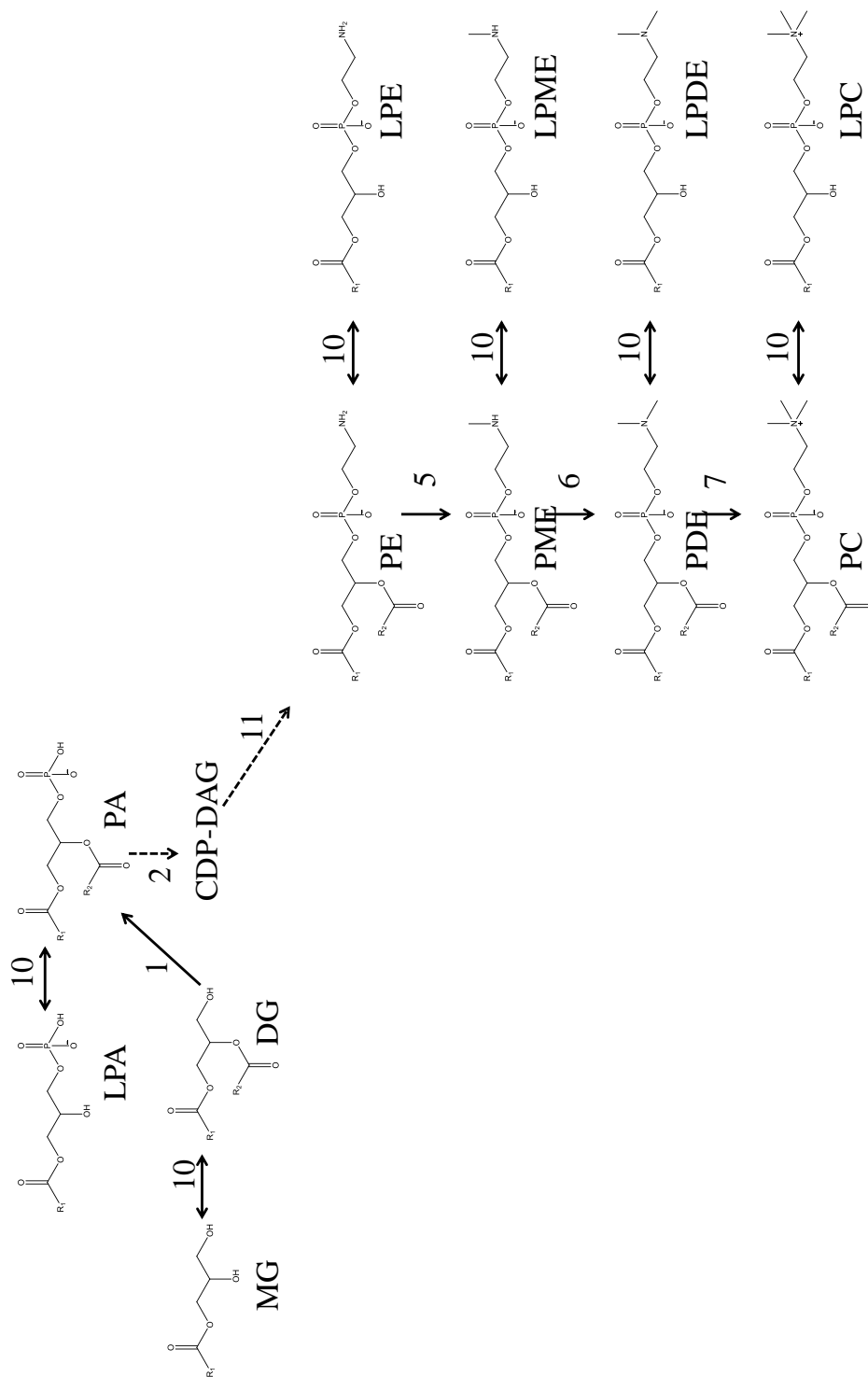


Figura 33. Posible ruta biosintética de fosfolípidos de la fase levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: (1) PA sintasa; (2) DDP)-DAG transferasa; (11) PE sintasa; (5) PE metiltransferasa; (6) PME metiltransferasa; (7) PDE metiltransferasa; (10) fosfolipasas B.

7.8.5 Esfingolípidos asociados a la pared celular de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico

En la Tabla 12 se resumen los esfingolípidos encontrados en micelio y levadura de *H. capsulatum* aislamientos ambiental y clínico (los espectros MS/MS de cada lípido se presentan en los anexos). En la Figura 34 se presenta el espectro MS/MS de la posible dihexosilceramida (DHC), correlacionada con la estructura de GluCer encontrada en el proceso de transición de micelio a levadura de *H. capsulatum*, por Toledo *et al.*, (2001). la cual presenta el grupo 9-metil y (*E, E*)- $\Delta^{4,8}$ insaturaciones. En la Figura 35 se presenta la fragmentación de la dihexosilceramida basado en la nomenclatura propuesta por Costello (Toledo *et al.*, 2001).

Tabla 12. Composición de esfingolípidos mayoritarios tentativamente identificados por ESI (modo ion positivo)-MS ion-total de los extractos de la pared celular de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Micelio				Levadura				Composición propuesta	Predicción masa (Da)
Aislamiento Ambiental		Aislamiento Clínico		Aislamiento Ambiental		Aislamiento Clínico			
Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z	Especie	m/z		
Esfingolípidos									
M	916,243	M	916,243	M	916,243	M	916,243	C18:0 Monohexosilceramida	921,083
ND	ND	[M+Na] ⁺	1025,324	ND	ND	ND	ND	C18:0 Monohexosilceramida acetilada	1024,571
ND	ND	M	680,962	M	671,941	M	671,941	C18:0 Fosfatil-Ceramida	654,124
ND	ND	ND	ND	[M+Na] ⁺	615,960	[M+Na] ⁺	615,960	C18:0 Ceramida	615,466

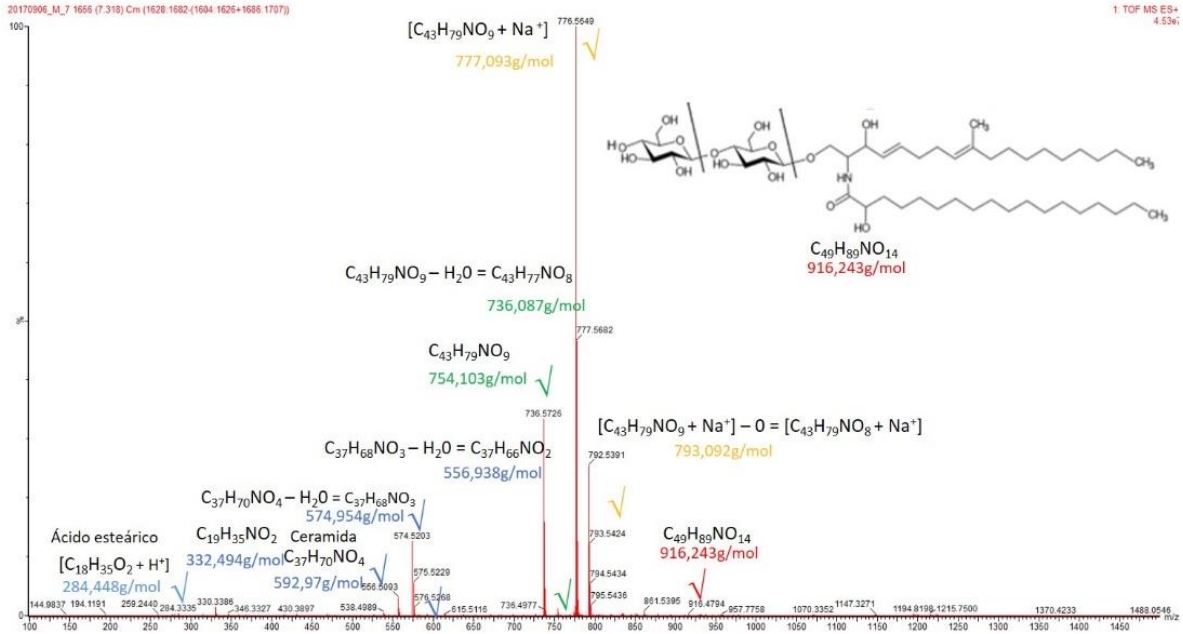


Figura 34. Espectro MS/MS posible de dihexosilceramida (DHC) en extractos lipídicos asociados a la pared celular de las fases de micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico por ESI-MS/MS modo ion positivo.

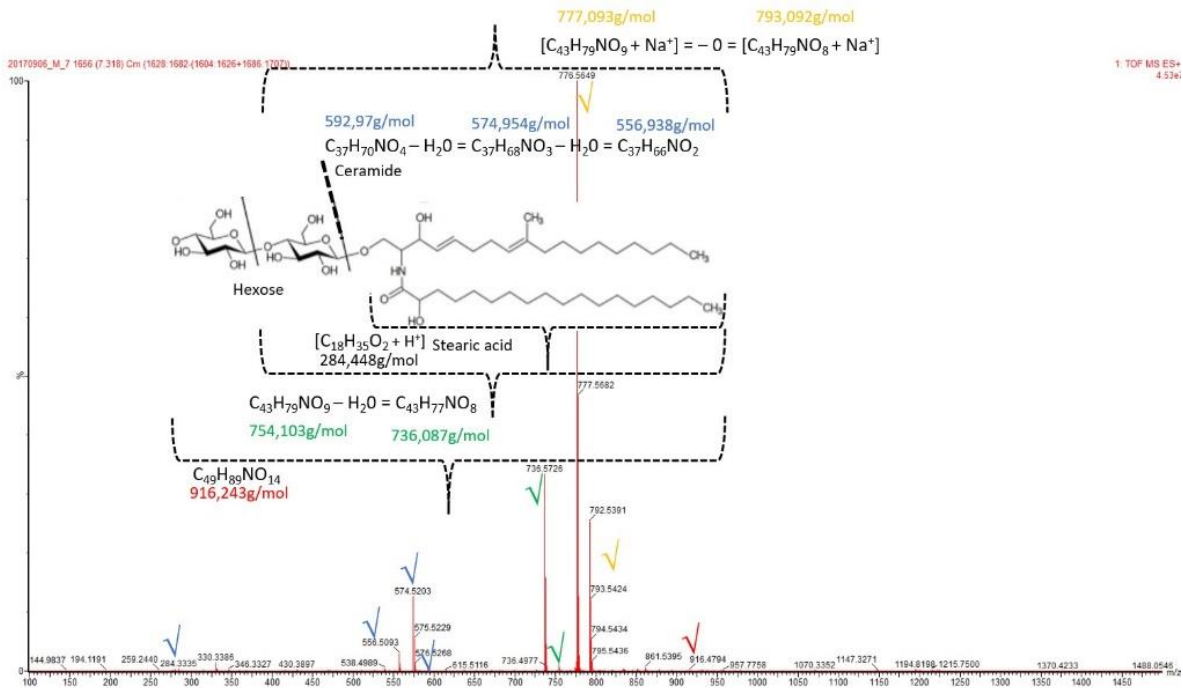


Figura 35. Fragmentación de la dihexosilceramida (DHC) basado en la nomenclatura de Costello (Toledo *et al*, 2001).

Los pasos involucrados en la ruta biosintética de dihexosilceramida se conservan en gran medida en hongos, plantas y comparten muchos puntos en común con los mamíferos (Heung *et al*, 2006). A partir de los resultados se sugiere que la biosíntesis de dihexosilceramida en *H. capsulatum* para los aislamientos ambiental y clínico es similar a la reportada para *C. neoformans* (Figura 36) (Rhome *et al*, 2007; Singh *et al*, 2012).

Caracterizados los extractos lipídicos asociados a la pared celular de las fases de micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico, se procedió a evaluar no solo los extractos lipídicos sobre el modelo biológico *G. mellonella*, si no también el micelio (como las conidias) de *H. capsulatum*.

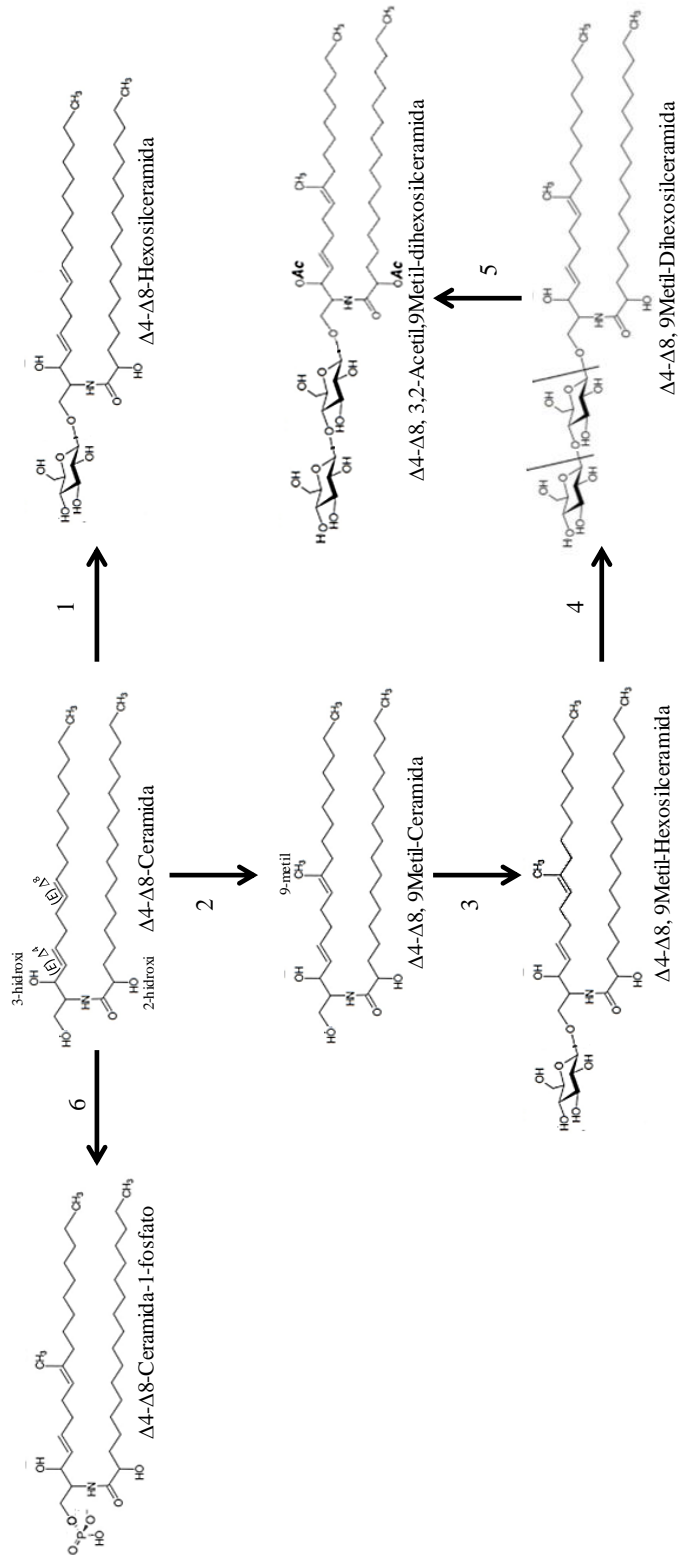


Figura 36. Posible ruta biosintética de Dihexosilceramida de fases micelio y levadura de *H. capsulatum* basado en los resultados de los aislamientos ambiental: (1) Hexosilceramida sintasa-Gcs1; (2) C9 metil transferasa-Smt1; (3) Hexosilceramida sintasa-Gcs1; (2) Hexosilceramida sintasa-Gcs2; (5) posible Acetil transferasa; (6) Ceramida kinasa.

7.9 Evaluación de conidias y formulados de extractos lipídicos asociados a la pared celular de *H. capsulatum* sobre el modelo *G. mellonella*

Las conidias y los extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) del micelio aislamiento ambiental y clínico de *H. capsulatum* fueron suspendidos en solución salina estéril al 0,01% en Tween 40® y al 1% de penicilina–gentamicina, fueron inyectados en larvas de *G. mellonella*, al igual que los controles. Los extractos fueron evaluados a las concentraciones 10^2 , 10^3 y 10^4 $\mu\text{g/mL}$. Durante las 144 horas de observación solo se presentó mortalidad no para el tratamiento con conidias (co-estímulo) con un 100% de mortalidad después de las 24 horas de exposición (Figura 37). Para el tratamiento con conidias (co-estímulo) como respuesta se presentó el 100% de melanización a las 24 horas de la inyección (Figura 38) y pérdida de movilidad después de las 24 horas de exposición (Figura 39), lo cual está relacionado al mecanismo de defensa de las larvas a la patogenicidad de la conidias. A las 12 horas de exposición, tanto para los controles como para los extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) *G. mellonella* se encontraba en un 100% en estadio de pupa (Figura 40). El efecto de las conidias de *H. capsulatum* sobre *G. mellonella* concuerda con las variaciones en la susceptibilidad de las larvas a la infección por hongos como *A. fumigatus* (Renwick *et al* 2006), *C. neoformans* (Mylonakis *et al*, 2005) y *F. oxysporum* (Coleman *et al*, 2011; Muñoz-Gómez *et al*, 2014), además, otros trabajos de investigación confirman el papel en la patogénesis fúngica de *H. capsulatum* (Toledo *et al*, 2001; Barreto-Bergter *et al*, 2011).

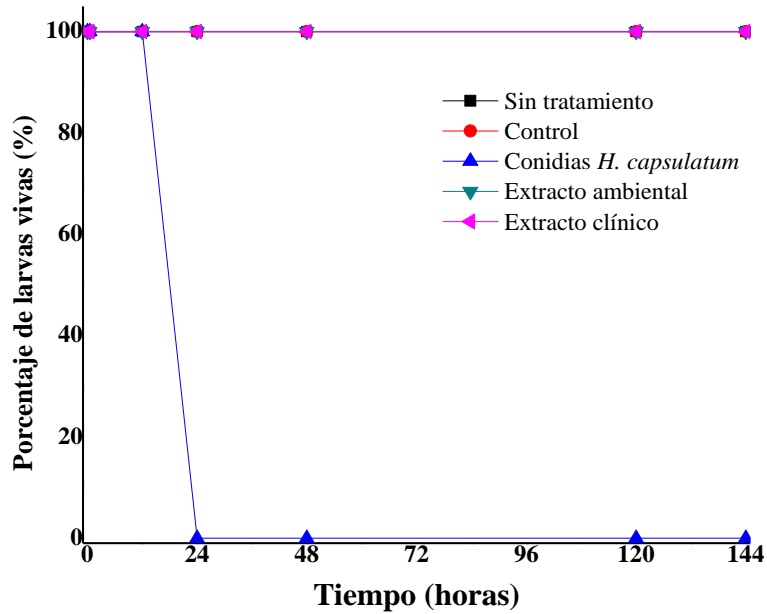


Figura 37: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico sobre la mortalidad de *G. mellonella*.

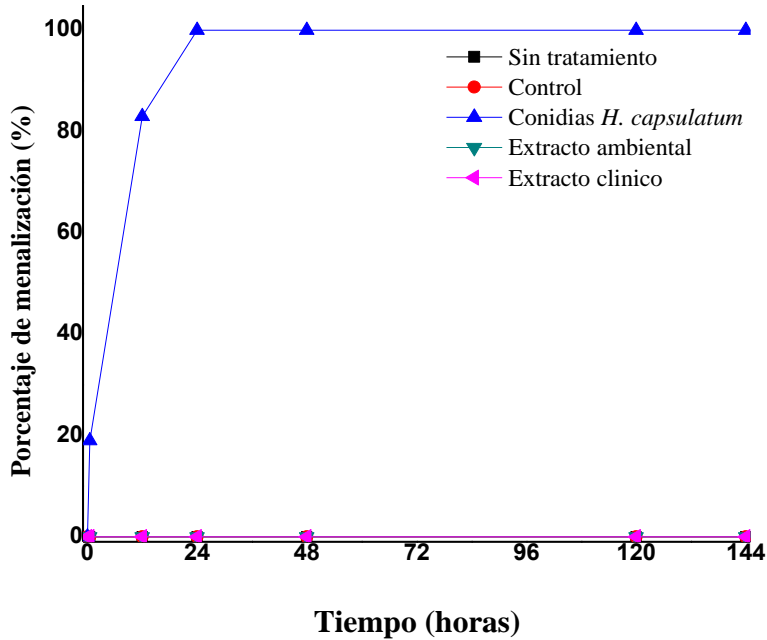


Figura 38: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico sobre la melanización de *G. mellonella*.

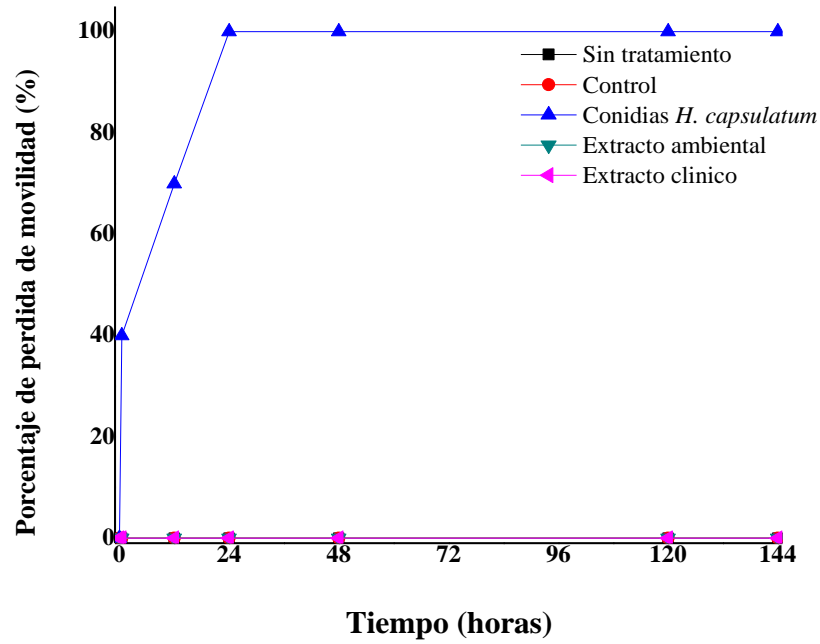


Figura 39: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico sobre la movilidad de *G. mellonella*.

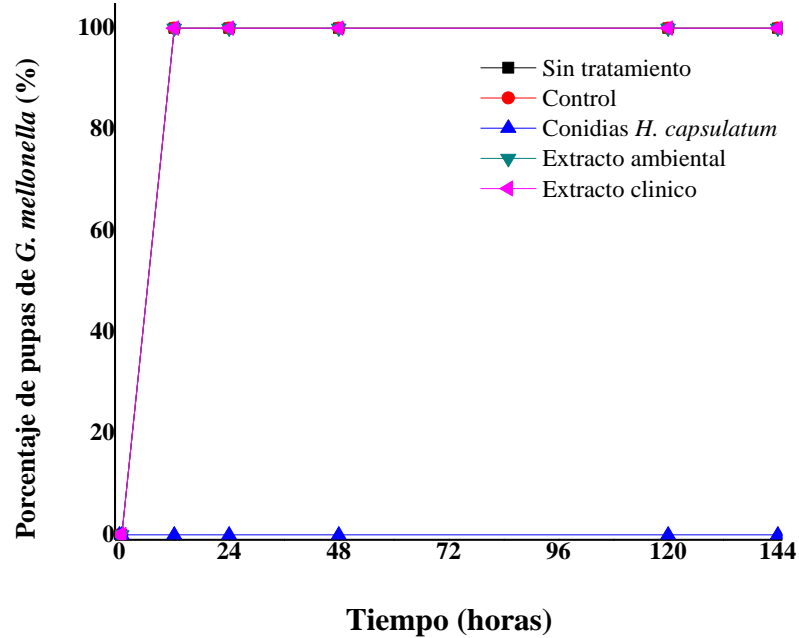


Figura 40: Evaluación de conidias y extractos (hexano, cloroformo, isopropanol y metanol) lipídicos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico sobre el estadio de pupa de *G. mellonella*.

No se presentó diferencia estadísticamente significativa (Valor $p > 0,05$) entre las concentraciones evaluadas (10^2 , 10^3 y 10^4 $\mu\text{g/mL}$) del extracto de los aislamientos ambiental y clínico, el control de Tween y las larvas sin tratamiento. En la Figura 41 se muestran las larvas de *G. mellonella* después de 24 horas de inyección de los tratamientos.

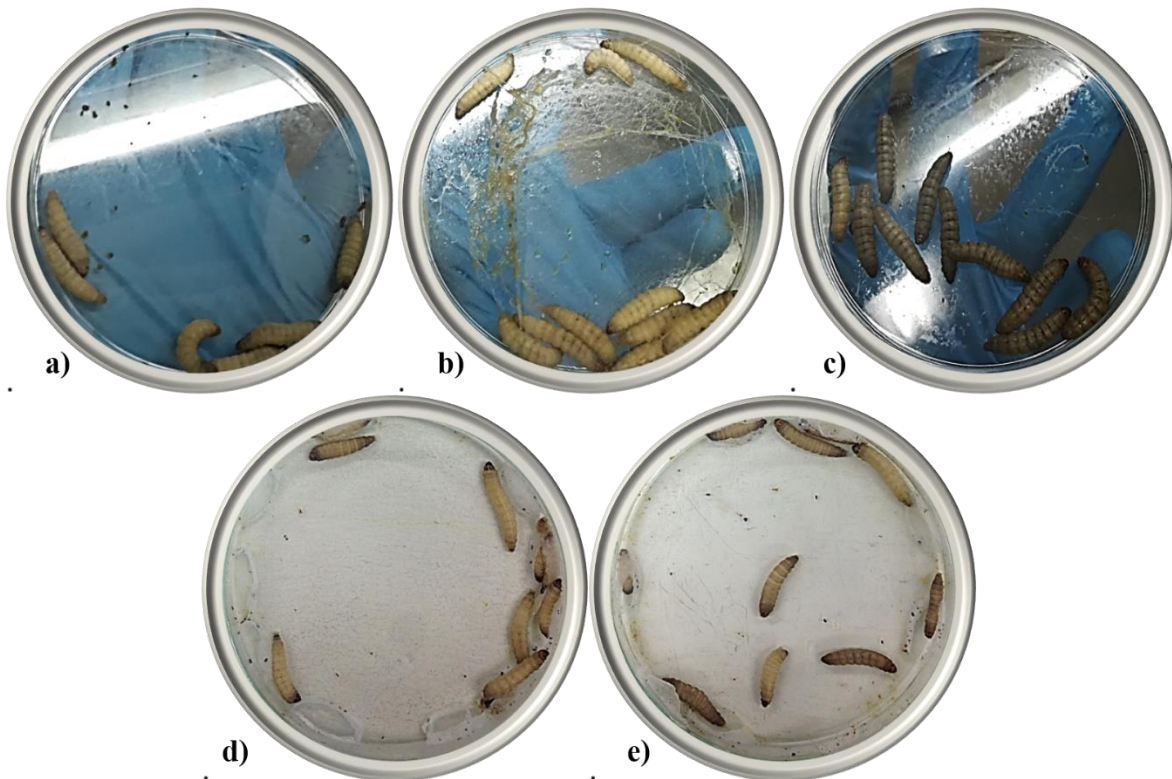


Figura 41. Evaluación de conidias y extractos lipídicos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico sobre el estadio de pupa de *G. mellonella* después de 24 horas de inyección: **a)** sin tratamiento; **b)** control; **c)** conidias *H. capsulatum*; **d)** extracto clínico al 10^4 $\mu\text{g/mL}$; **e)** extracto ambiental al 10^4 $\mu\text{g/mL}$.

Las larvas muertas con el tratamiento de conidias de *H. capsulatum* (Figura 41c) se sumergieron en alcohol etílico por 5 segundos, para ser procesarlas se dividieron en dos grupos: un grupo fue maceraron y al otro grupo se le realizó corte con bisturí. Posteriormente del material obtenido en cada grupo se sembró en Agar Mycosel y se incubó a una temperatura 23 °C. en la Figura 42, se observa el crecimiento de *H. capsulatum* después de

los cultivos después de 27 días y la verificación del hongo preparado en azul de lactofenol y observado por microscopio óptica.

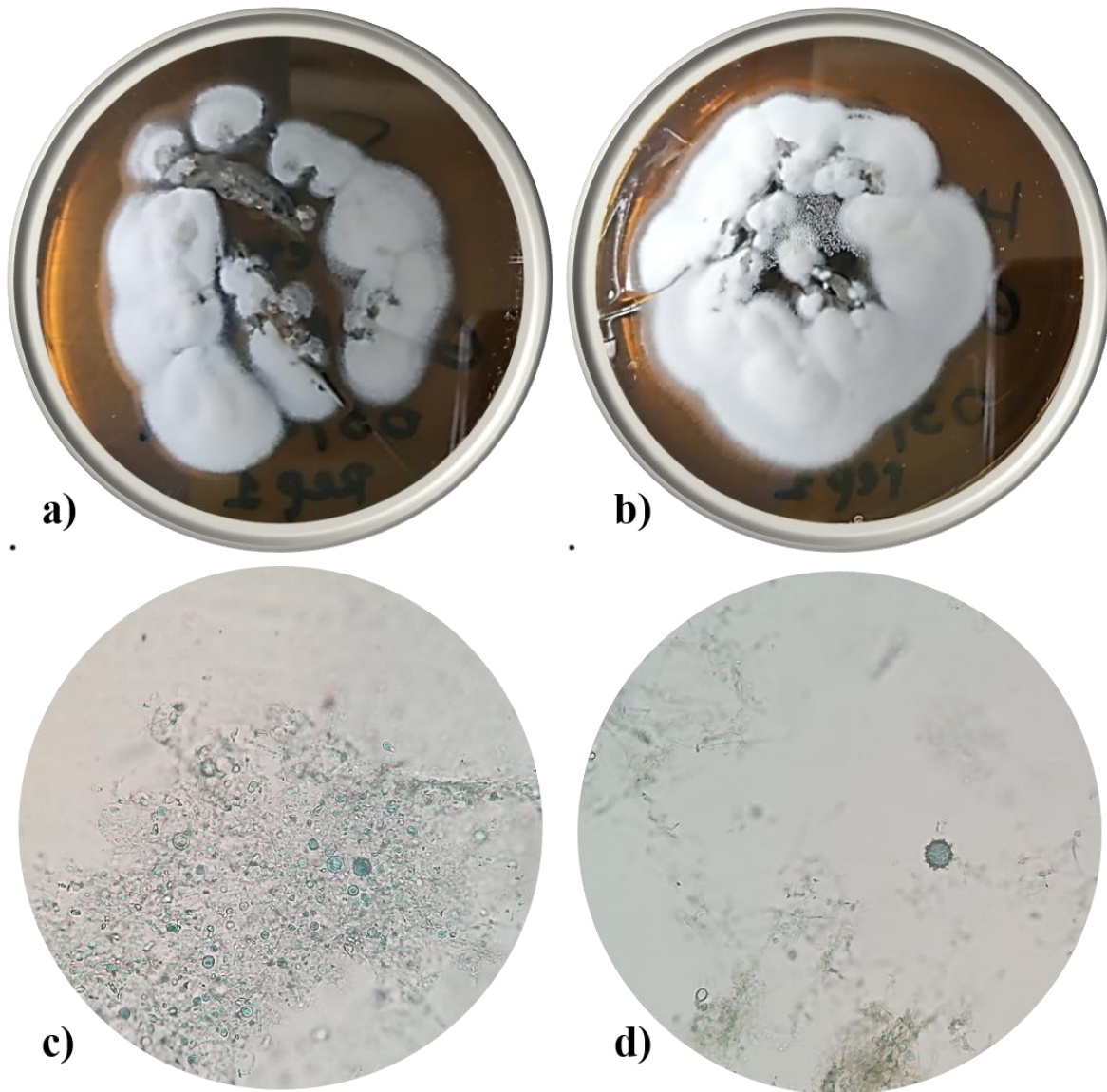


Figura 42. Recuperación de aislamientos de *H. capsulatum* de larvas de *G. mellonella* en Agar Mycosel: **a)** macerado de larvas; **b)** corte de larvas; **c)** y **d)** caracterización microscópica de micelio de *H. capsulatum* a 10x.

Los extractos lipídicos asociados a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico no presentaron ningún efecto sobre *G. mellonella*. Aunque las caracterizaciones de los extractos lipídicos sobre *H. capsulatum* confirman el papel en la patogénesis fúngica (Nielsen, 1966; Toledo *et al*, 2001; Barreto-Bergter *et al*, 2011).

7.10 Isotermas de compresión de monocapas con anfotericina B

De los extractos de la pared celular de micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico sobre *G. mellonella*, se seleccionaron los extractos de micelio para estudiar sus propiedades fisicoquímicas en la formación de monocapas y vesículas (i.e. liposomas) multilamelares (MLV) y de esta forma disponer de información sobre los mecanismos implicados en la interacción de fármacos antifúngicos como la anfotericina B (Figura 43) con las membranas biológicas. Para tal fin, se usaron liposomas como vehículo (Sarpietro *et al*, 2009; Sarpietro *et al*, 2011).

Para formar las monocapas de anfotericina B en el canal de teflón de Langmuir, se prepararon soluciones de anfotericina B (0,447 mg/mL) en cloroformo/metanol 1:1 (en volumen) y se procedió a realizar las isotermas de anfotericina B en volúmenes crecientes de 10 μ L a 80 μ L como se observa en la Figura 44.

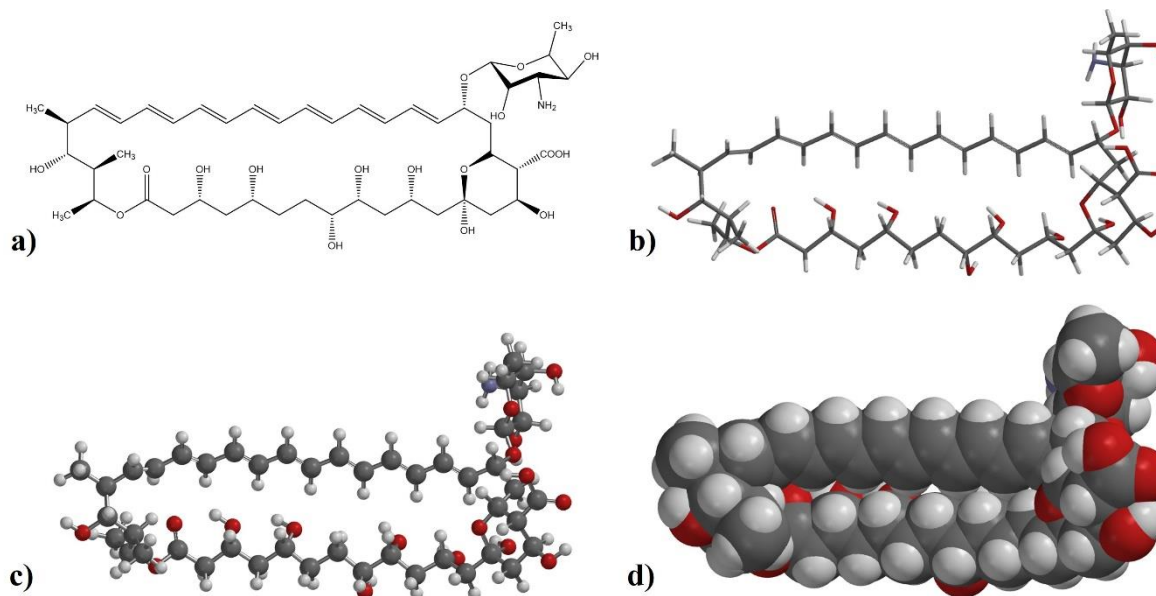


Figura 43. Representación tridimensional de la molécula de anfotericina B: **a)** estructura en conectivas; **b)** estructura conectiva con optimización energética; **c)** estructura conectiva y esferas; **d)** estructura en conectivas y esferas tangentes.

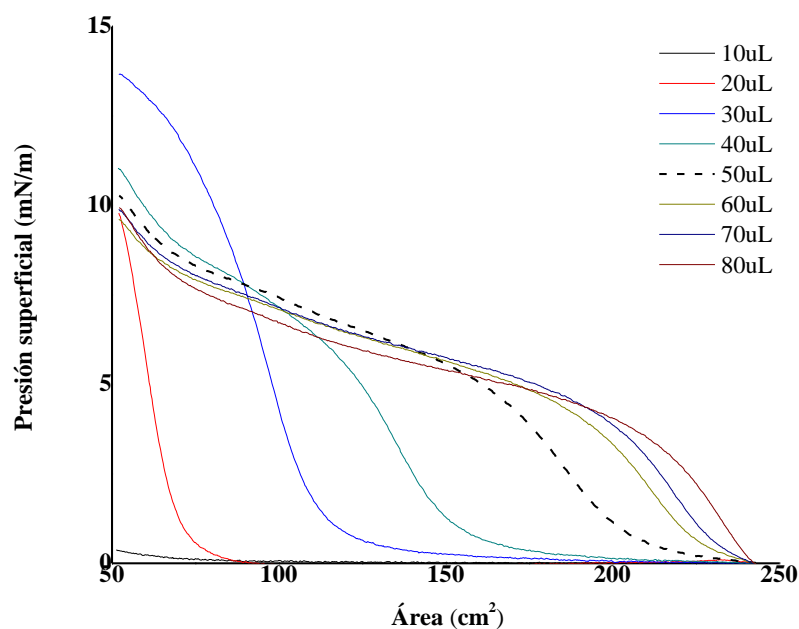


Figura 44. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón para las monocapas de anfotericina B a volumen creciente.

Para el rango de área del canal de teflón (50-250 cm²), es importante establecer la relación de las isotermas de presión en función del área por molécula de anfotericina B, para esto se

toma el rango de área del canal de teflón en \AA^2 ($5,0 \times 10^{17} \text{\AA}^2$ - $2,50 \times 10^{18} \text{\AA}^2$), el número de Avogadro ($N_A = 6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol), la masa molar de la molécula de anfotericina B ($MM = 924,08 \text{ g/mol}$), la concentración (C) de la solución de anfotericina B medido en mg/mL, el volumen (V) de la solución de anfotericina B medido en μL y un factor de corrección de unidades ($Fc = 1 \times 10^{-6} \text{ mL.g/uL.mg}$)

La isoterma a $50 \mu\text{L}$ y $0,447 \text{ mg/mL}$ (líneapunteada de la Figura 44) representa el sistema ideal para la formación de monocapas de anfotericina B en un rango entre 30\AA^2 y 172\AA^2 , ya que los ajustes lineales a las porciones de las isotermas de compresión extrapoladas a presión superficial (tensión superficial) cero apuntan a las áreas moleculares específicas en una posición horizontal (A_h) y en una posición vertical (A_v) (Figura 45) (Wójtowicz *et al*, 1998; Sykora *et al*, 2004; Arczwska & Gagoś, 2011).

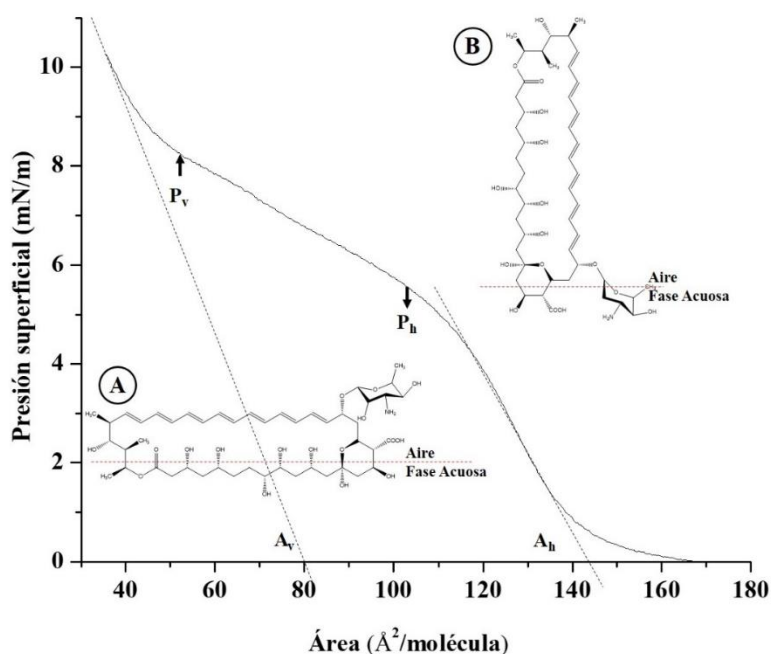


Figura 45. Isoterma de presión superficial-área de anfotericina B extendida sobre buffer Tris 5mM, pH = 7,4. Los ajustes lineales a las porciones lineales de las isotermas de compresión extrapoladas a presión superficial cero apuntan a las áreas moleculares específicas en una posición horizontal (A_h) y en una posición vertical (A_v). El recuadro presenta un modelo de reorientación de las moléculas de Anfotericina B en la subfase a una temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las áreas moleculares específicas en una posición horizontal (A_h) y en una posición vertical (A_v) no solo dependen del modelo de reorientación de las moléculas de anfotericina B en la subfase. Para la molécula de anfotericina B se ha propuesto un modelo tipo caja rectangular (Wójtowicz *et al*, 1998; Kaminski, 2014), como se observa en las Figuras 46 y 47. En la Tabla 13, se presentan los valores experimentales de las áreas moleculares específicas de anfotericina B en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) comparadas con los valores obtenidos por optimización molecular a un nivel de teoría AM1.

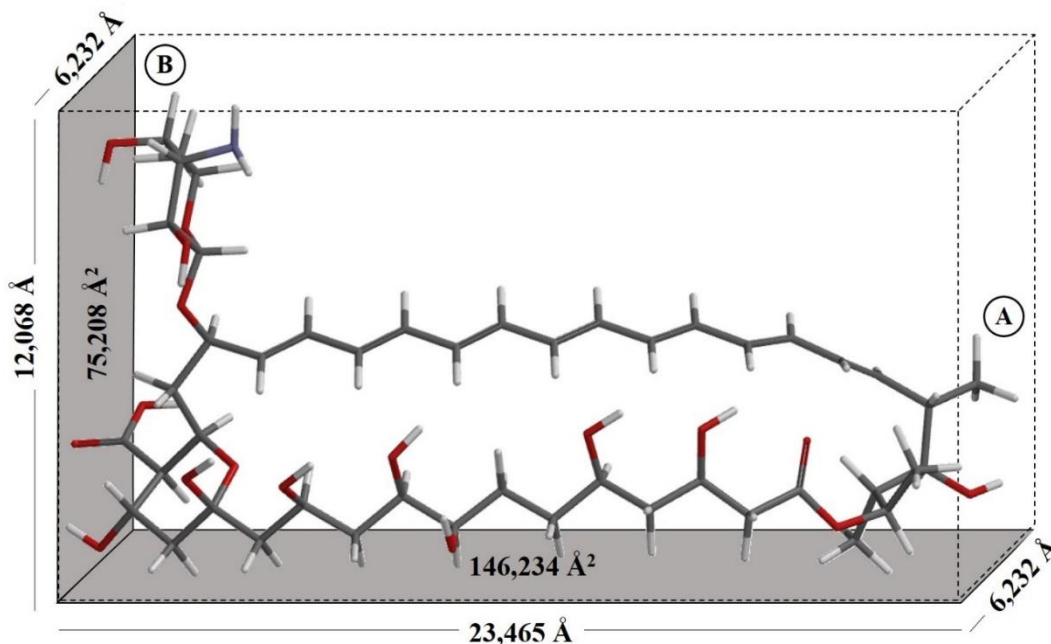


Figura 46. Modelo de reorientación de la molécula de anfotericina B: **A)** área molecular específicas en una posición horizontal (A_h); **B)** área molecular específicas en una posición vertical (A_v). Minimización energética para un valor de -3271,74 kJ/mol.

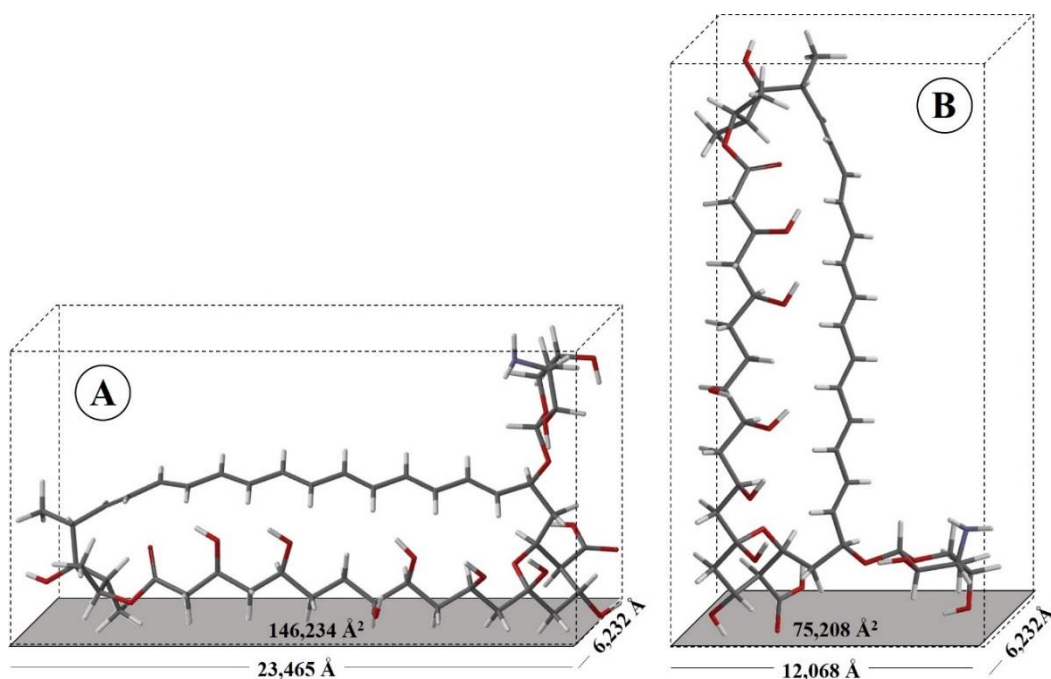


Figura 47. Modelo de reorientación de la molécula de anfotericina B: **A)** posición horizontal (A_h); **B)** posición vertical (A_v). Minimización energética para un valor de $-3271,74$ kJ/mol.

Tabla 13. Valores de áreas moleculares de anfotericina B en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) experimentales y comparadas con los valores obtenidos por optimización molecular a un nivel de teoría AM1 utilizando el software SPARTAN Pro.

Anfotericina B	A_v ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	A_h ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)
Valores Experimentales	80	144
Valores Calculados por AM1	75,208	146,234

7.11 Isotermas de compresión de monocapas con extractos en cloroformo

Los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico fueron preparados en cloroformo a las concentraciones de $13,737$ mg/mL y $9,277$ mg/mL respectivamente. Se procedió a realizar las isotermas de los extractos, en volúmenes crecientes de $3 \mu\text{L}$ a $50 \mu\text{L}$ como se observa en las Figuras 48 y 49. Dado el desconocimiento de la isoterma ideal que represente la formación de monocapas de los extractos, se toma como

constante la presión superficial de 5 mN/m y de esta forma trazando una línea base a 5 mN/m podemos evaluar el efecto del volumen de extracto en el área de formación de la monocapa. En la Figura 50, se observa que para los extractos a volúmenes de 5 uL y 20 µL se alcanza la máxima área de monocapa formada entre 190 cm² y 210 cm².

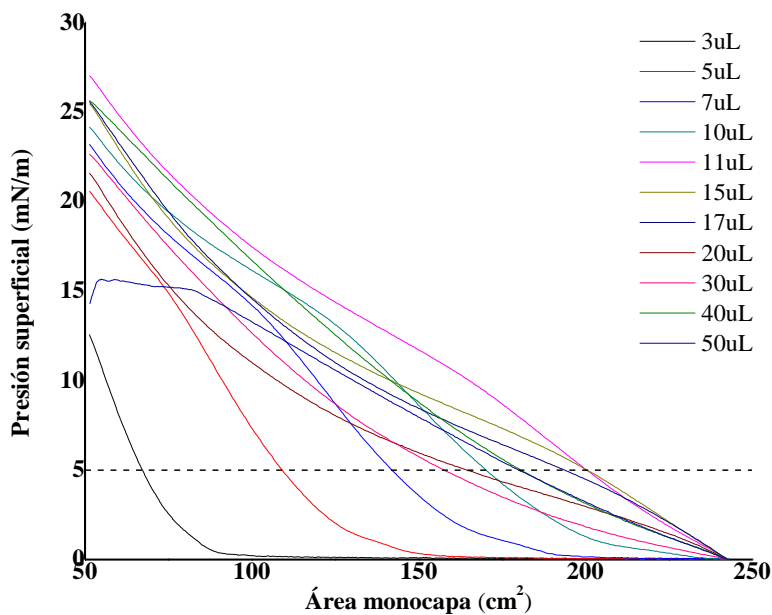


Figura 48: Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental a volumen creciente.

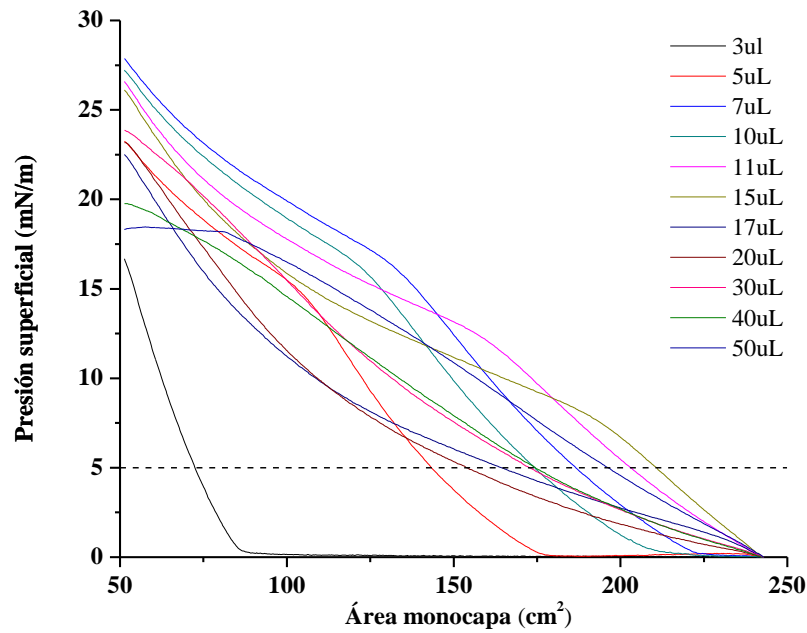


Figura 49. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico a volumen creciente.

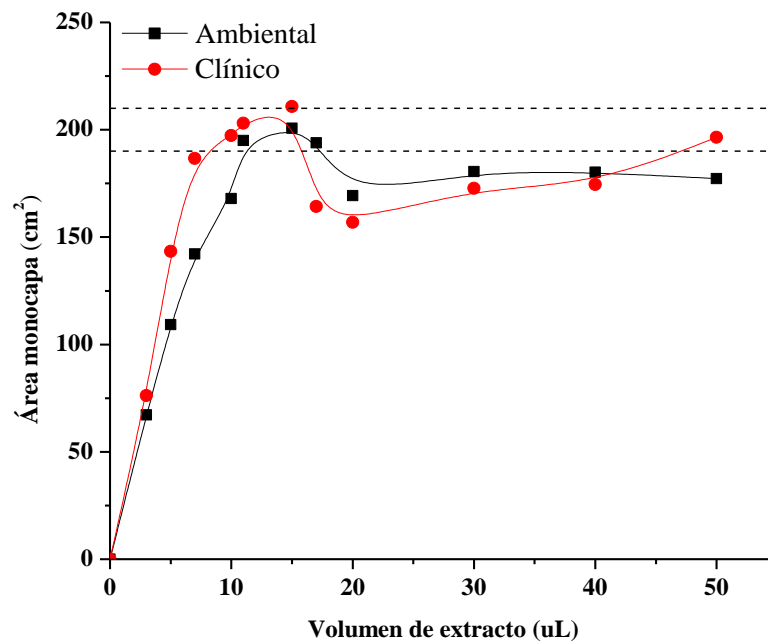


Figura 50. Efecto del volumen de extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico sobre el área del canal de teflón de la monocapa formada a 5 mN/m presión superficial.

A partir de la isoterma ideal para la formación de monocapas de anfotericina B (la cual se dio un volumen de 50 μL), se procedió a evaluar el efecto de volumen del extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico. Se encontró que la isoterma de 50 μL anfotericina B + 0 μL de extracto ambiental tiene una tendencia similar (paralela) a la isoterma de 50 μL anfotericina B con 5 μL de extracto ambiental (Figura 51). De igual forma, la isoterma de 50 μL anfotericina B con 0 μL de extracto clínico tiene una tendencia similar a la isoterma 50 μL anfotericina B con 5 μL de extracto clínico (Figura 52). Los cambios de presión superficial y área de monocapas nos indican que hay una reorganización molecular en la subfase.

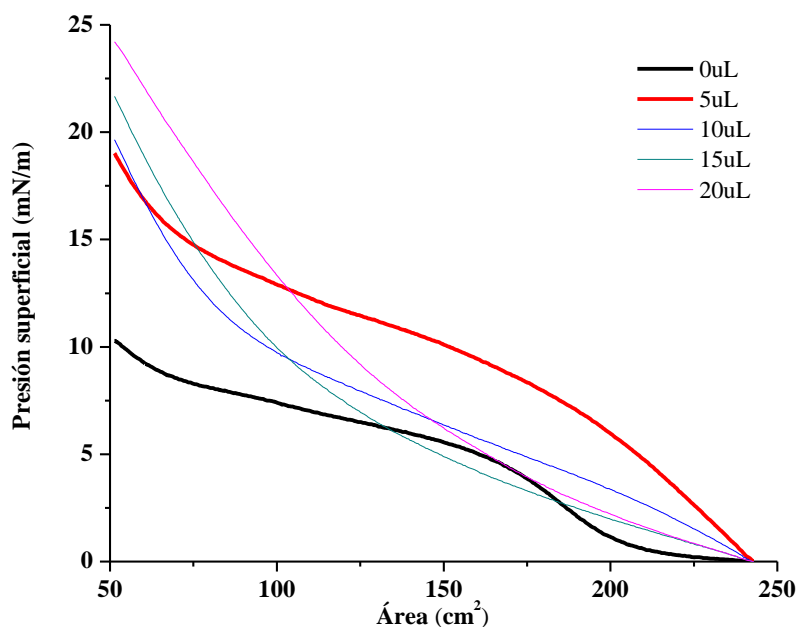


Figura 51. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas de anfotericina B (50 μL) a volumen creciente del extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental.

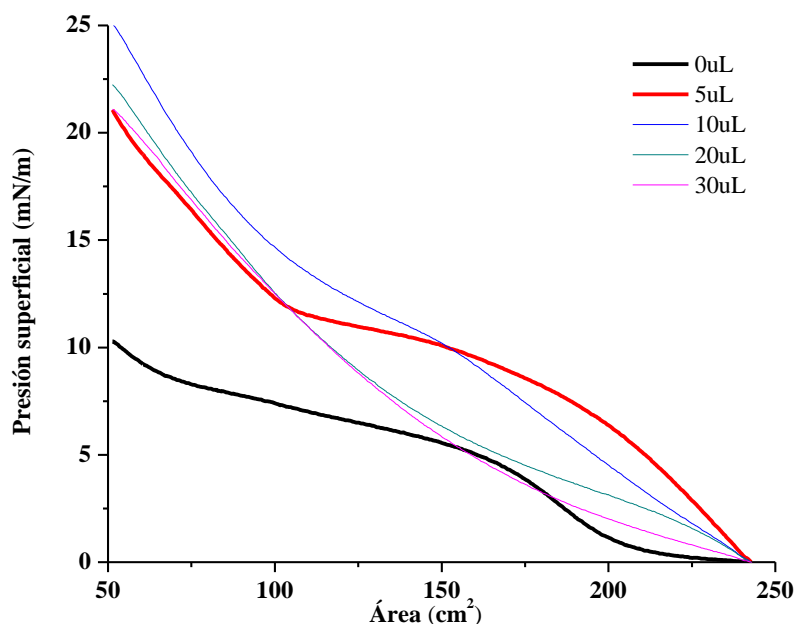


Figura 52. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas de anfotericina B (50uL) a volumen creciente del extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico.

Posteriormente, se procedió a evaluar el efecto en las isotermas de diferentes volúmenes de anfotericina B (20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μL) a volumen constante de los extractos (Figuras 53 y 54). Se toma como constante la presión superficial de 5 mN/m y de esta forma trazando una línea base a 5 mN/m podemos evaluar el efecto del volumen de anfotericina B en el área de formación de la monocapa a volumen constante de los extractos. En la Figura 55, se presenta que para la anfotericina B el volumen de 50 μL es el que presenta la máxima área de monocapa formada (210cm²). Cuando se analiza el efecto del volumen de anfotericina B a volumen constante de extracto sobre el área por molécula de la anfotericina B, se observa que a valores superiores a 50 μL la anfotericina desplaza completamente las moléculas del extracto de la interfaz dado que presenta valores similares a los de la anfotericina en ausencia de extractos (Figura 56).

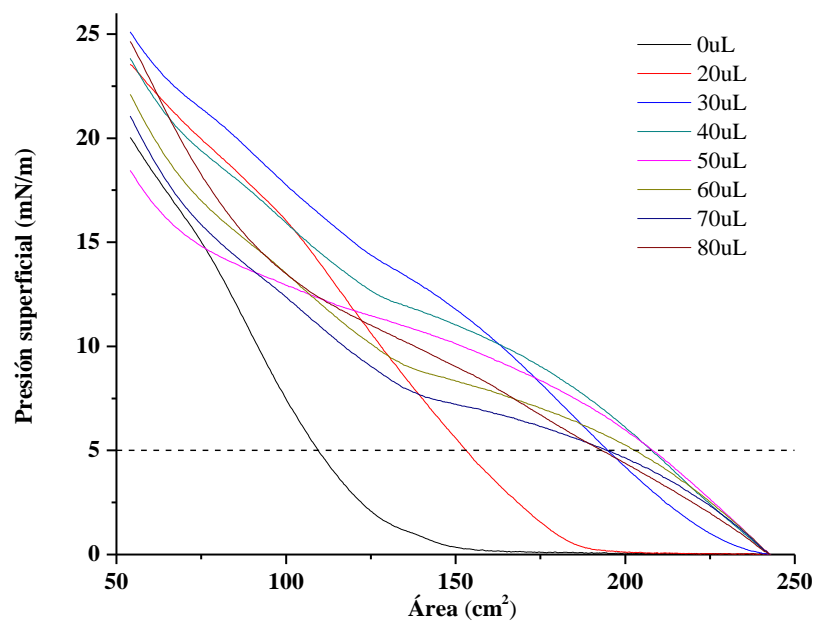


Figura 53. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental ($5\mu\text{L}$) a volumen creciente de anfotericina B.

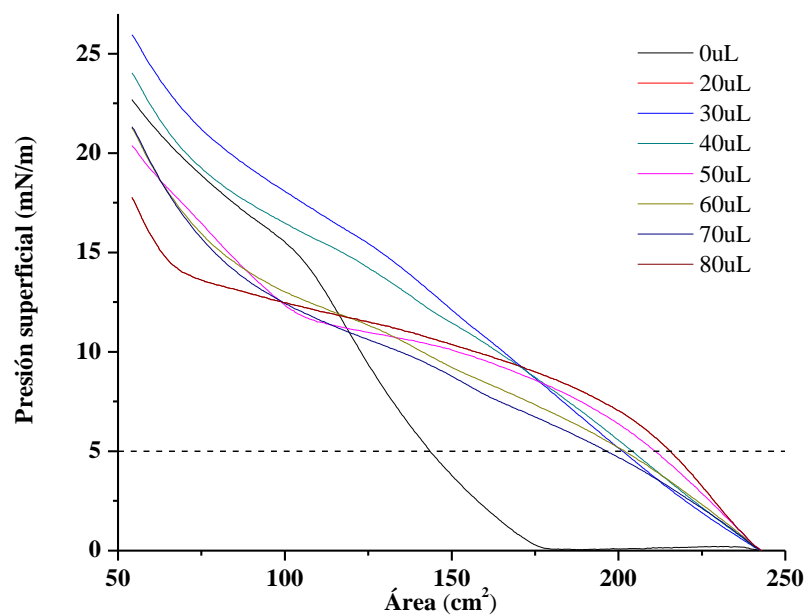


Figura 54. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas del extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico ($5\mu\text{L}$) a volumen creciente de anfotericina B.

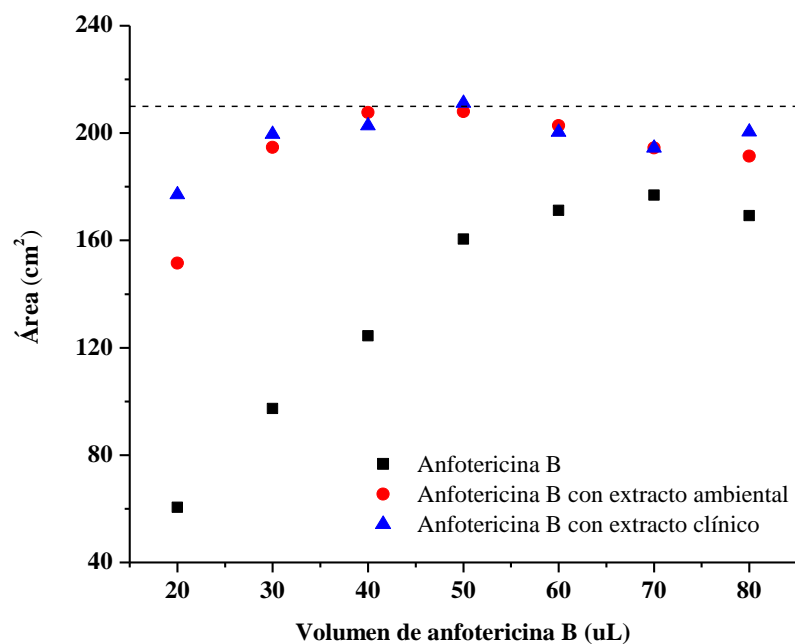


Figura 55. Efecto en el área del canal de teflón de las monocapas de anfotericina B y extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos clínico (5 μ L) y ambiental (5 μ L) a volumen creciente de anfotericina B.

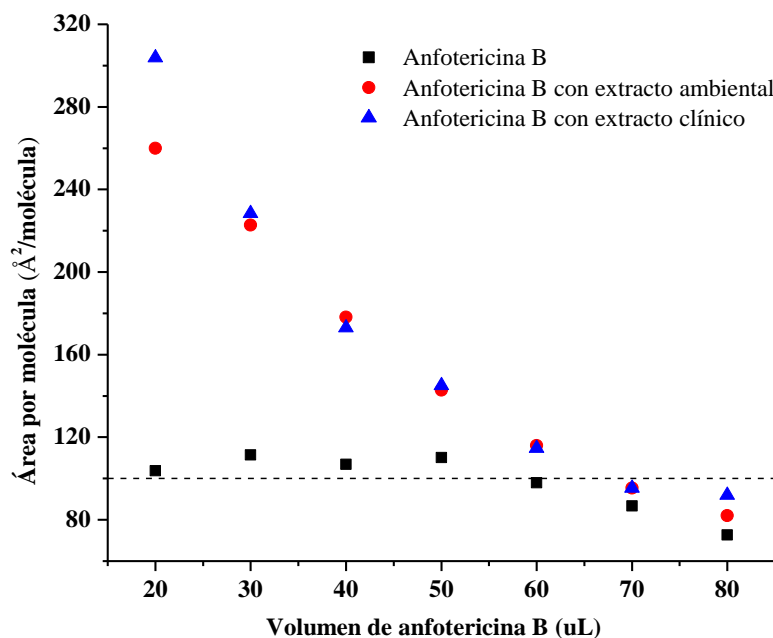


Figura 56. Efecto en el área por molécula de las monocapas de anfotericina B y extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos clínico (5 μ L) y ambiental (5 μ L) a volumen creciente de anfotericina B

En la Figura 57 se presentan las isotermas de presión superficial-área de monocapas para anfotericina B, los extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los dos aislamientos y la mezcla de anfotericina B con extracto. Para la mezcla de 50 μL de anfotericina B de concentración 0,447 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con 5 μL de extracto ambiental de concentración 13,737 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tenemos un volumen total de la mezcla de 55 μL con las nuevas concentraciones para anfotericina B de 0,406 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y para el extracto ambiental de 1,249 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, indicando una relación en masa de anfotericina B/extracto ambiental de 1:3. Para la mezcla de 50 μL de anfotericina B de concentración 0,447 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con 5 μL de extracto clínico de concentración 9,277 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tenemos un volumen total de la mezcla de 55 μL con las nuevas concentraciones para anfotericina B de 0,406 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y para el extracto clínico de 0,843 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, indicando una relación en masa de anfotericina B/extracto ambiental de 1:2.

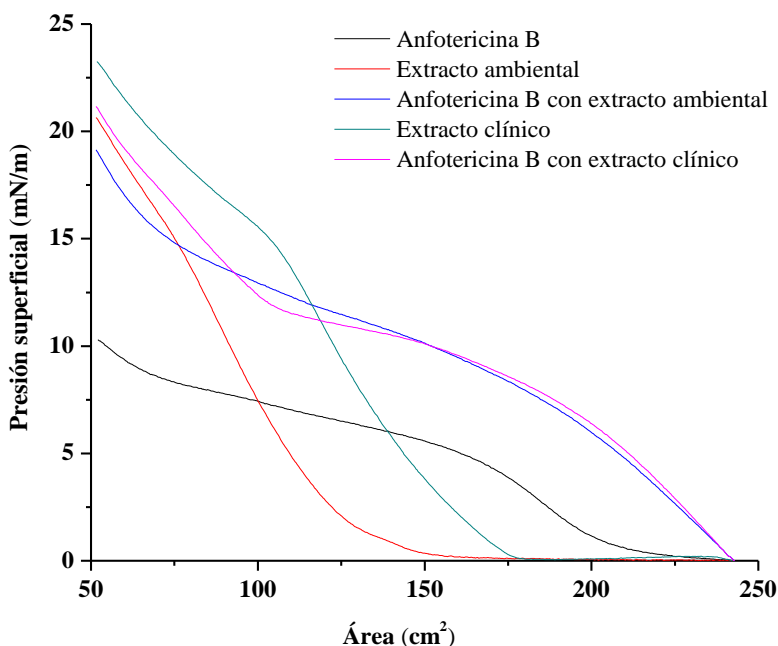


Figura 57. Isotermas de presión superficial-área del canal de teflón de monocapas de anfotericina B (50 μL); extractos de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental (5 μL) y clínico (5 μL); mezcla anfotericina B (50 μL) con extracto lipídico (5 μL).

La isoterma de anfotericina B y anfotericina B con extracto se representan en la Figura 58. Los ajustes lineales a las porciones lineales de las isoterma de compresión extrapoladas a presión superficial cero apuntan a que las áreas moleculares específicas en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) no solo dependen del modelo de reorientación de las moléculas de anfotericina B en la subfase, si no del empaquetamiento entre la molécula de anfotericina B y las moléculas de los lípidos que se encuentran en cada extracto. En la Tabla 14, se presentan los valores de las áreas moleculares en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v), con sus respectivas presiones superficiales en posición horizontal (P_h) y vertical (P_v).

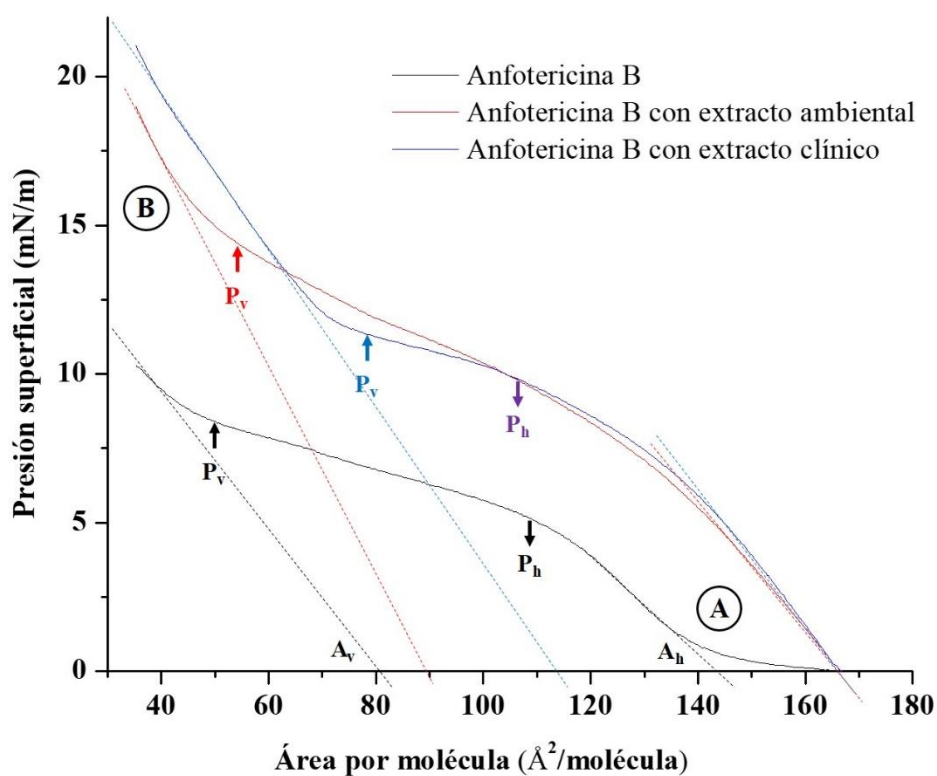


Figura 58. Isotermas de presión superficial-área por molécula de anfotericina B y mezcla anfotericina B con extractos lipídicos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* extendidas sobre buffer Tris 5mM, pH = 7,4. Los ajustes lineales a las porciones lineales de las isoterma de compresión extrapoladas a presión superficial cero apuntan a las áreas moleculares específicas en una posición horizontal (A_h) y en una posición vertical (A_v).

Tabla 14. Valores de áreas moleculares de anfotericina B y mezcla anfotericina B con extracto en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) con sus respectivas presiones superficiales en posición horizontal (P_h) y vertical (P_v).

	A_v ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	P_v (mN/m)	A_h ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	P_h (mN/m)
Anfotericina B	80	8,4	144	5,0
Anf B + ambiental	90	14,2	166	9,8
Anf B + clínico	114	11,4	166	9,8

7.11.1 Áreas moleculares en posición horizontal (A_h)

La comparación de las áreas moleculares y las presiones superficiales en posición horizontal (A_h y P_h) de la molécula de anfotericina B y anfotericina B con extracto, no reveló diferencia entre los aislamientos. Sin embargo, las diferencias de las áreas moleculares entre los extractos y la anfotericina B fue de $22 \text{\AA}^2/\text{molécula}$. Tomando como modelo el ácido fosfatídico (PA), el cual es el precursor de los demás fosfolípidos encontrados en los extractos de *H. capsulatum* y basados en el modelo tipo caja rectangular propuesto para la anfotericina B (Wójtowicz *et al.*, 1998; Kaminski, 2014), se procedió a calcular el área en posición horizontal (A_h) de la molécula de ácido fosfatídico, encontrando un valor de $20,382 \text{\AA}^2/\text{molécula}$ (Figura 59).

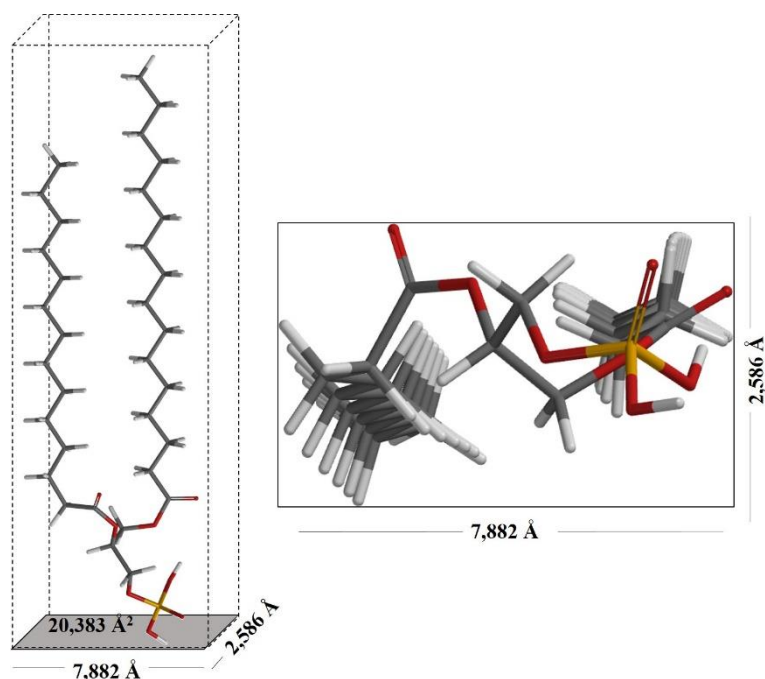


Figura 59. Modelo de orientación de la molécula de ácido fosfatídico en posición horizontal (A_h). Minimización energética para un valor de $-2597,96$ kJ/mol.

En la Figura 60 se propone el modelo de empaquetamiento molecular entre anfotericina B y el ácido fosfatídico presente en los extractos de micelio. En la Figura 61 se presenta emodelo de orientación en posición horizontal (A_h) de las moléculas de anfotericina B y ácido fosfatídico. Se encontró un valor de área molecular para la pareja de moléculas de $168,155$ Å²/molécula comparado con el valor experimental de 166 Å²/molécula, lo que indica la anfotericina B en presencia de los lípidos de los extractos pierde su posición horizontal.

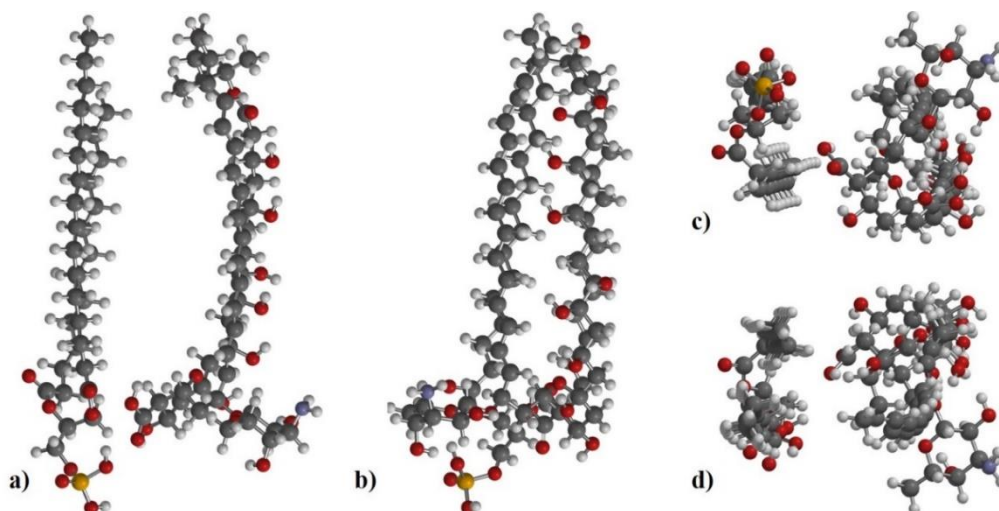


Figura 60. Modelo de empaquetamiento entre la anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: **a)** vista lateral derecha; **b)** vista lateral izquierda; **c)** vista inferior; **d)** vista superior. Minimización energética para un valor de -5876,54 kJ/mol.

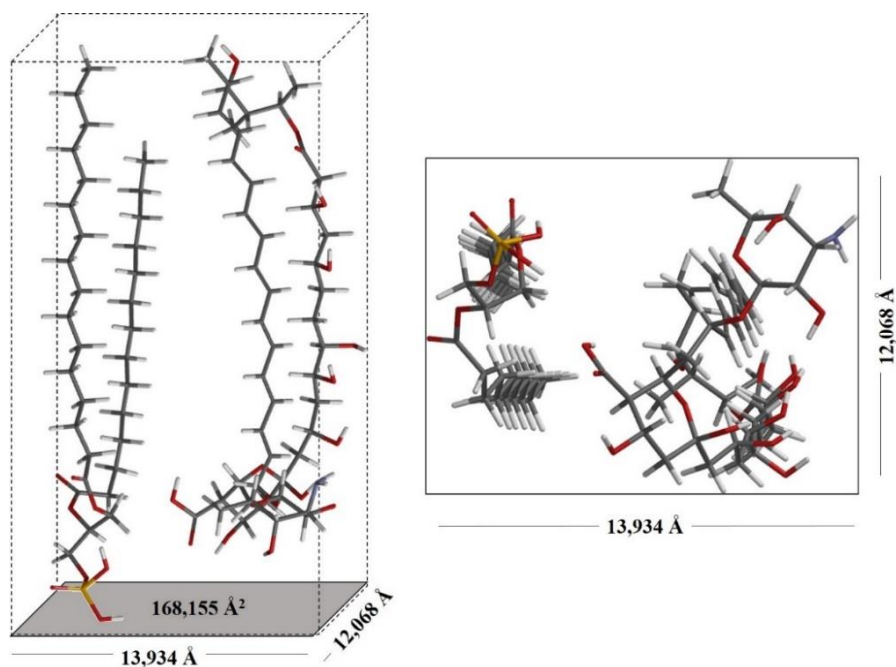


Figura 61. Modelo de orientación de la molécula de anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental en posición vertical (A_v). Minimización energética para un valor de -5876,54 kJ/mol.

7.11.2 Áreas moleculares en posición vertical (A_v)

Comparando las áreas moleculares y las presiones superficiales en posición vertical (A_v y P_v) de la molécula de anfotericina B y anfotericina B con extracto lipídico, se observa diferencias significativas tanto en las áreas como en las presiones. La diferencia entre las áreas

moleculares de los extractos de los aislamientos ambiental y clínico comparados con la anfotericina B nos dan valores de $10 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ y $24 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ respectivamente. En la Figura 62 se propone el modelo de empaquetamiento molecular entre anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio aislamiento ambiental. En la Figura 63 se presenta el modelo de orientación en posición vertical (A_v) de la molécula de anfotericina B y ácido fosfatídico, encontrando un valor de $96,556 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, cercano al valor experimental de $90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

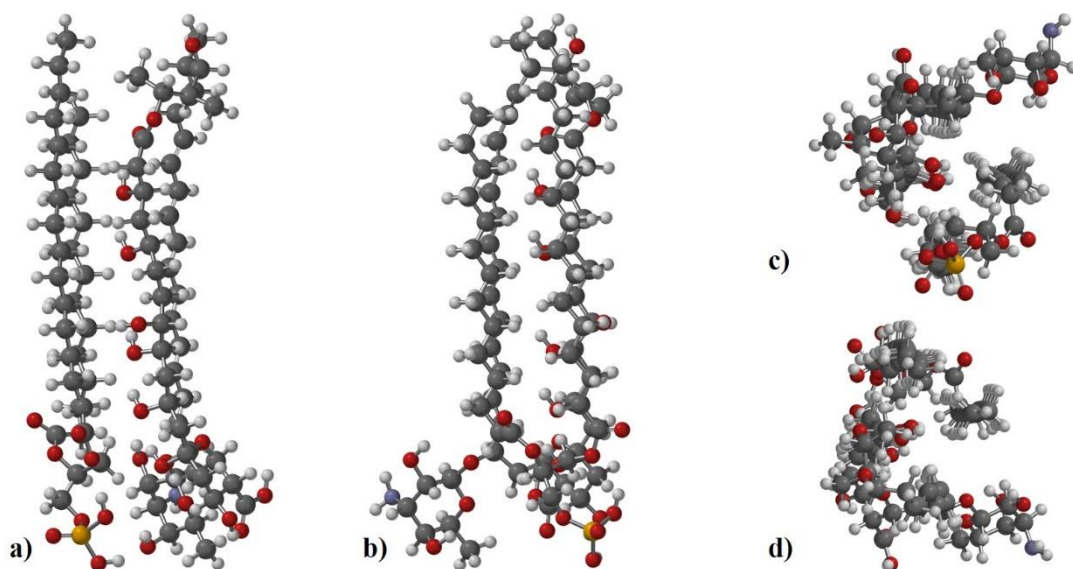


Figura 62. Modelo de empaquetamiento entre la anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental: **a)** vista lateral derecha; **b)** vista lateral izquierda; **c)** vista inferior; **d)** vista superior. Minimización energética para un valor de $-5904,28 \text{ kJ/mol}$.

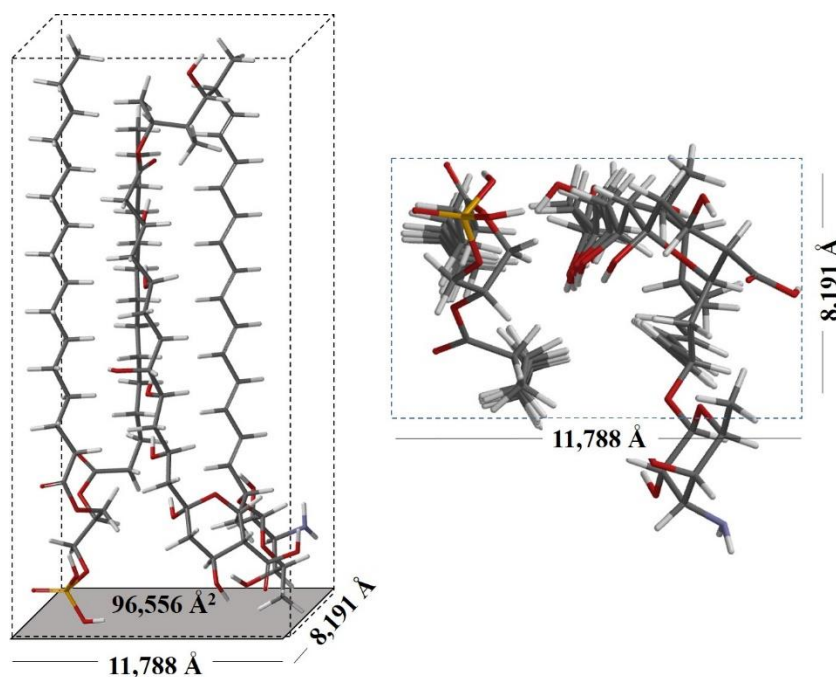


Figura 63. Modelo de orientación de la molécula de anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental en posición horizontal (A_h). Minimización energética para un valor de $-5904,28$ kJ/mol.

La mezcla anfotericina B con extracto clínico presentó una presión superficial de $11,4$ mN/m, es decir $2,8$ mN/m menor que la generada por el extracto ambiental ($14,2$ mN/m), lo que indicaría menor grado de empaquetamiento. En la Figura 64 se propone el modelo de empaquetamiento molecular entre anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio aislamiento clínico y en la Figura 65 se presenta el modelo de orientación en posición vertical (A_v) de las moléculas de anfotericina B y ácido fosfatídico, encontrando un valor de $115,153$ Å²/molécula, cecano al valor experimental de 114 Å²/molécula.

En la Tabla 15 se resumen los valores experimentales de las áreas moleculares específicas de anfotericina B y anfotericina B-extracto y los valores obtenidos por optimización molecular a un nivel de teoría AM1 con su respectivo valor de minimización energética.

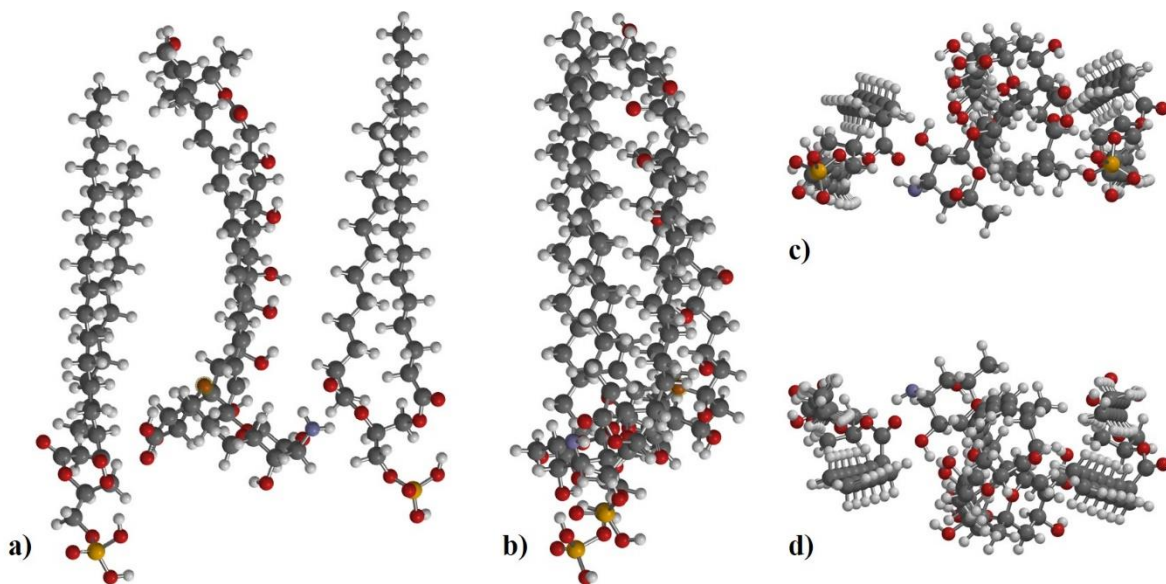


Figura 64. Modelo de empaquetamiento entre la anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico: **a)** vista lateral derecha; **b)** vista lateral izquierda; **c)** vista inferior; **d)** vista superior. Minimización energética para un valor de $-8507,29$ kJ/mol.

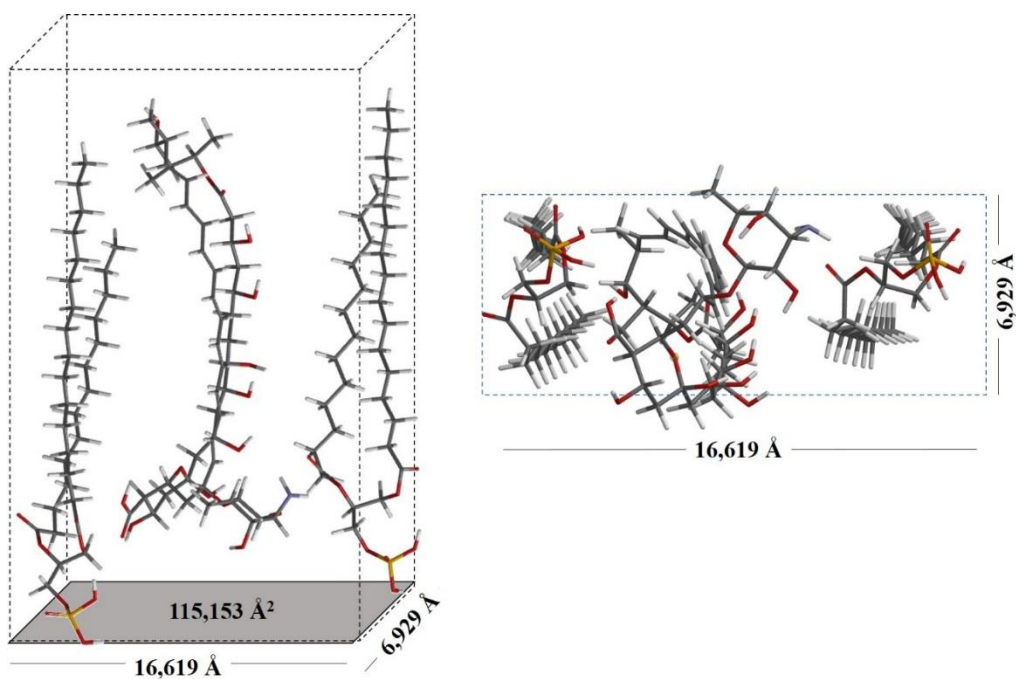


Figura 65. Modelo de orientación de la molécula de anfotericina B y el ácido fosfatídico de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico en posición horizontal (Ah). Minimización energética para un valor de $-8507,29$ kJ/mol.

Tabla 15. Valores de áreas moleculares en posición horizontal (A_h) y vertical (A_v) experimentales de anfotericina B y anfotericina B-extracto comparadas con los valores obtenidos por optimización molecular a un nivel de teoría AM1 utilizando el software SPARTAN Pro.

Sistema	A_v ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	Energética (kJ/mol)	A_h ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	Energética (kJ/mol)
Anfotericina B (Experimental)	80	---	144	---
Anfotericina B (Calculado)	75,208	-3271,74	146,234	-3271,74
Sistema	A_v ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	Energética (kJ/mol)	A_v ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	Energética (kJ/mol)
Anfotericina B-extracto ambiental (Experimental)	90	---	166	---
Anfotericina B-extracto ambiental (Calculado)	96,556	-5904,28	168,155	-5876,54
Anfotericina B-extracto clínico (Experimental)	114	---	166	---
Anfotericina B -extracto clínico (Calculado)	115,153	-8507,29	168,155	-5876,54

7.12 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los extractos lipídicos asociados a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico, la mezcla de extracto lipídico ambiental/anfotericina B (3:1) y extracto lipídico clínico/anfotericina B (2:1) fueron evaluados por calorimetría diferencial de barrido con el fin de sondear las transiciones de fase termodinámicas (Gill *et al.*, 2010; Kodre *et al.*, 2014). En las Figuras 66 y 67 en la cual se relaciona la entalpía con la temperatura, no se observa efecto significativo de la adición de anfotericina B en la capacidad calorífica isobárica del extracto. El hecho de que las tramas no presenten cambios agudos nos puede indicar que no hay una transición de fase o que no se generó ningún cambio en el polimorfismo del extracto o en el proceso de fusión, tanto en los extractos como en la mezcla extracto-anfotericina B. Sobre el proceso de fusión de cadena es importante resaltar que, aunque la molécula de anfotericina B presenta una temperatura de fusión mayor a 170 °C (con descomposición) ha sido utilizada en barridos hasta 80 °C para la formación de

liposomas con dipalmitoilfosfatidilcolina (Wójtowicz *et al*, 1998; Kaminski, 2014). Para este estudio no se observó efecto de la anfotericina dado que el extracto no presentó cambio de entalpía a las temperaturas evaluadas (5 °C hasta 80 °C), sin embargo, es importante considerar evaluar nuevamente la metodología con mayor cantidad de muestra debido a que los resultados no son concluyentes para la cantidad de extracto evaluado.

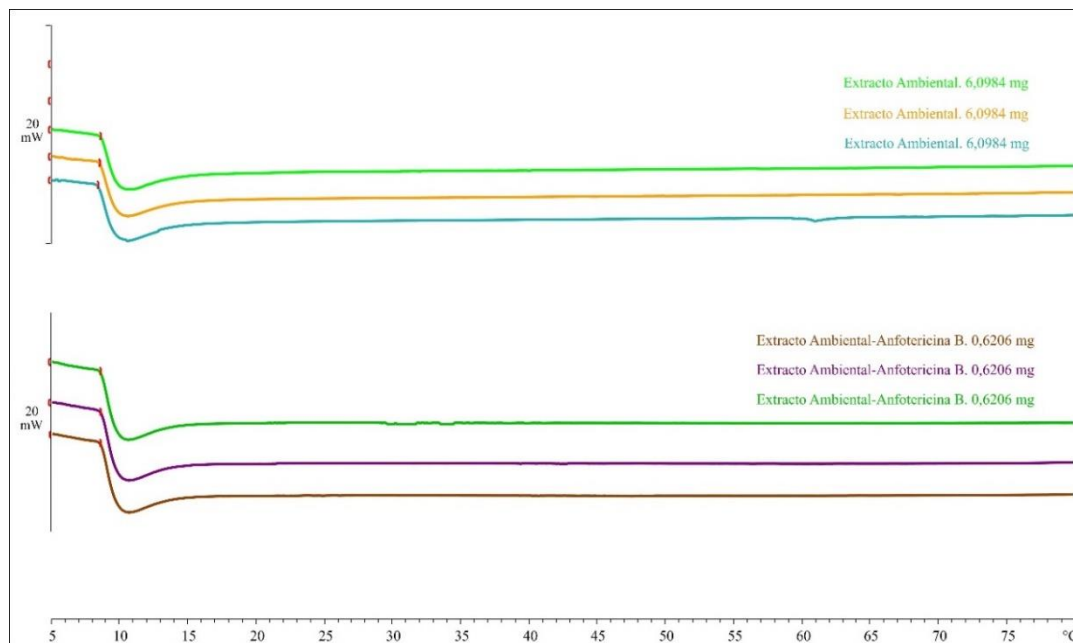


Figura 66: Calorimetría diferencial de barrido de extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento ambiental y mezcla de extracto lipídico con anfotericina B en relación 3:1.

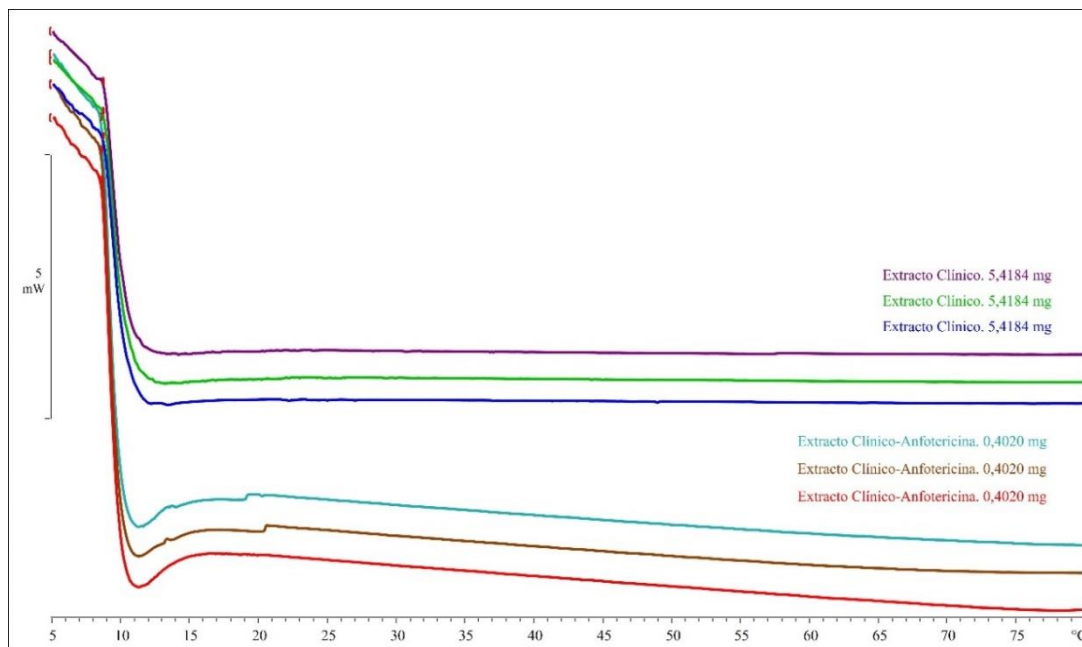


Figura 67: Calorimetría diferencial de barrido de extracto de la pared celular de micelio de *H. capsulatum* del aislamiento clínico y la mezcla de extracto lipídico con anfotericina B en relación 2:1.

7.13 Formulación y caracterización de liposomas

Se procedió a la formulación de liposomas y caracterización de liposomas como se resume en la Tabla 16. Los liposomas formulados se pueden considerar como liposomas grandes (LUV) dado que el tamaño promedio de partícula es mayor a 100 nm (Brand, 2001; Akbarzadeh *et al*, 2013).

Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de liposomas: Tamaño de Partícula (TP); Potencial Z (PZ); Índice de Polidispersidad (IP). (las distribuciones de TP se presentan en los anexos).

Liposoma	TP (nm)	Picos Media/Area	PZ (mV)	IP
Extracto ambiental	482,4	705,5 nm / 100 %	-86,2	0,375
Extracto ambiental + anfotericina B	216,6	226,9 nm / 90,2 %	-57,8	0,481
		52558 nm / 5,0%		
		43,49 nm / 4,8 %		
Extracto clínico	404,1	579,8 nm / 92,9 %	-89,3	0,325
		58,51 nm / 7,1 %		
Extracto clínico + anfotericina B	124,7	232,3 nm / 59,4 %	-47,3	0,350
		71,83 nm / 36,9 %		
		4685 nm / 3,6 %		

Dado que la anfotericina B disminuye significativamente el tamaño de partícula y la carga superficial en las combinaciones, se confirma que este antimicrobiano no solo se empaqueta con los lípidos de los extractos de micelio en el proceso de formación de monocapas, si no que conserva su estructura en la formación de liposomas.

7.14 Evaluación de liposomas sobre *G. mellonella*

Los liposomas de los extractos del micelio y levaduras, aislamiento ambiental y clínico, de *H. capsulatum* fueron formulados y evaluados a $7,35 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$ (micelio) y $1,25 \times 10^4$ $\mu\text{g/mL}$ (levadura) en solución buffer (TRIS 5 mM, pH = 7,4). Luego de la inyección de los liposomas sobre *G. mellonella*, no se observó mortalidad, melanización, ni efecto sobre movilidad de larvas y el estadio de pupa, durante el tiempo de exposición de 48 horas.

A partir de los resultados es importante considerar una metodología no destructiva que permita disminuir los tiempos de inactivación del hongo y de esta forma obtener mayor cantidad de extractos lipídicos para evaluar concentraciones superiores a las realizadas

durante este trabajo y concluir si el efecto está dado por la naturaleza de los extractos o por la cantidad de los mismos.

8 CONCLUSIONES

Se evidenciaron diferencias en la composición lipídica en la fase micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico. En contraste, no se observaron diferencias en las composiciones lipídicas de la fase levadura. Lo anterior permite profundizar en la bioquímica del proceso de transición de micelio a levadura, debido a que la fase de micelio es la forma infectante y la fase levadura, la forma parasitaria.

La metodología propuesta para la inactivación de *H. capsulatum* tanto en fase micelio como levadura fue exitosa. Sin embargo, se propone a futuro trabajar en la disminución de tiempos de inactivación, ya sea con alternativas tecnológicas o sistemas de solventes diferentes a los utilizados en esta tesis, sin que haya interferencias de componentes de la membrana celular o intracelular.

Se encontró que la relación insaturados/saturados en la fase micelio del aislamiento clínico es 1,2 veces mayor que el aislamiento ambiental, mientras que en la fase levadura, el aislamiento ambiental fue 1,6 veces menor. La diferencia en las relaciones insaturados/saturados nos lleva a proponer que durante el proceso de transición de micelio a levadura para el aislamiento ambiental, el precursor C18 no solo se direcciona hacia la formación de precursores insaturados C18:1 (oleico), C18:2 (linoleico) y C18:3 (linolénico), sino a la formación y concentración de ácido esteárico, mientras en el aislamiento clínico el precursor C18:1 no solo se direcciona hacia la formación de precursores insaturados C18:2 (linoleico) y C18:3 (linolénico), si no a la formación y concentración de ácido oleico.

En los extractos de ambos aislamientos ambiental y clínico y de ambas formas del hongo, micelio y levadura, se detectaron lípidos tipo ceramidas, como se ha reportado para otros hongos patógenos en humanos.

A partir de las isotermas de presión superficial-área de monocapas de los extractos lipídicos y la molécula anfotericina B, se logró establecer que la relación de acoplamiento superficial de anfotericina B y el extracto de la pared celular de micelio aislamiento ambiental fue de 1:3, mientras que la relación anfotericina B y el extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio del aislamiento clínico 1:2, estos resultados podrían ayudar parcialmente a comprender la posible relación de interacción entre moléculas anti-fúngicas como la anfotericina B y la pared celular no solo de *H. capsulatum*, sino de otros hongos patógenos.

Los liposomas formulados a partir de los extractos lipídicos de micelio y levadura en aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*, no presentaron efecto sobre el modelo *G. mellonella*.

9 PERSPECTIVAS Y ESTUDIOS FUTUROS

Integrar otras técnicas de cuantificación y caracterización de los lípidos encontrados, entre ellos las ceramidas, las cuales se han correlacionado con la patogenicidad en hongos.

El efecto biológico de los extractos de la pared celular de micelio y levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*, propone en investigaciones futuras establecer protocolos de cuantificación no solo de fosfolípidos, si no de moléculas como esfingolípidos y de esta forma determinar si la respuesta sobre el modelo biológico *G. mellonella* es más por la naturaleza del extracto, por la concentración de las moléculas asociadas a la patogenicidad o porque las moléculas aisladas no presentan patogenicidad.

Dado que no se observó mortalidad, melanización, efecto sobre movilidad de larvas y efecto del estadio pupa, durante el tiempo de exposición de 48 horas, sin embargo, consideramos realizar ensayos con las fracciones lipídicas y aumentar la concentración de los extractos para las evaluaciones futuras.

Hacer estudios de formación de monocapas con anfotericina B y los extractos lipídicos asociados a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico, ya que esta es la forma parasitaria del hongo.

Complementar la evaluación del efecto biológico de los extractos lipídicos en el modelo *G. mellonella*, utilizando las diferentes fracciones lipídicas de los aislamientos ambiental y clínico de las fases micelio y levadura de *H. capsulatum*.

Realizar modificaciones genéticas en las vías de síntesis de los lípidos constituyentes de la pared celular de *H. capsulatum*, identificados con este estudio para determinar su papel/función en la patogenicidad (o virulencia del hongo) y de esta forma encontrar otros blancos terapéuticos.

10 REFERENCIAS

Abidon, A. M. 2009. Continuing Education Course - Mycoses. Chapter4 - Histoplasmosis. *Journal Brasileira of Pneumology*, 35(11): 1145–1151.

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 8(1): 102.

Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S. Casadevall, A., Zancopé-Oliveira, R. M., Almeida, I. C., Nosanchuk, D. 2008. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol*. 10(8): 1695–1710.

Almeida-Paes, R., Oliveira, L. C., Evangelista, O.M., Gutierrez, M. M. C., Nosanchuk, J. D., Zancopé, R, M. 2015. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from *Sporothrix* complex. *BioMED Research International*. ID212308: 1–10.

Alvarez, F. J., Douglas, L. M., Konopka, J. B. 2007. Sterol-Rich Plasma Membrane Domains in Fungi. *Eukaryotic Cell*. 6(5): 755–763.

Anderes, E. A., Finley, A. A., Walch, H. A. The lipids of an auxotrophic avirulent mutant of *Coccidioides immitis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 11: Issue 2.

Arczewska, M., Gagoś, M. 2011. Molecular organization of antibiotic amphotericin B in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayer induced by K⁺ and Na⁺ ions: The Langmuir technique study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 2706–2713.

Barreto-Bergter, E., Sasaki, G. L., Souza, L. M. 2011. Structural analysis of fungal cerebrosides. *Frontier in Microbiology*. 2(Art 239): 1–11.

Batista, V. G., Toledo, M. S., Straus, A. H., Mendes-Giannini, M. J., Duate, A. J., Takahashi, H.K., Benard, G. 2014. Glycolipid sensing and innate immunity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 178(3-4):153–162.

Beauvais, A., Latgé, J. P., Vey, A., Prevost, M. C. 1989. The role of surface components of the entomopathogenic fungus *Entomophaga aulicae* in the cellular immune response of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Microbiology*. 135(3): 489–498.

Beccaccioli, M., Reverberi, M., Scala, V. 2019. Fungal lipids: biosynthesis and signalling during plant-pathogen interaction. *Frontiers in Bioscience, Landmark*. 42: 172–185.

Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnol Annu Rev*. 7: 59–85.

Carman, G. M., and G. S. Han. 2011. Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 80: 859–883.

Carrillo-Munoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., Quindos, G. 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Revista espanola de quimioterapia*. 19: 130–139.

Caseli, L., Oliveira, R. G., Masui, D. C., Furriel, R. P., Leone, F. A., Maggio, B., Zaniquelli, M. E. 2005. Effect of molecular surface packing on the enzymatic activity modulation of an anchored protein on phospholipid Langmuir monolayers. *Langmuir*. 21(9): 4090–4095.

Champion, O. L., Wagley, S., & Titball, R. W. (2016). *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence*. 7(7): 840–845.

Cereghetti, D. M., Carreira, E. M. 2006. Amphotericin B: 50 years of chemistry and biochemistry. *Synthesis-Stuttgart*. 6: 914–942.

Chen, Y. L., A. E. Montedonico, S. Kauffman, J. R. Dunlap, F. M. Menn, and T. B. Reynolds. 2010. Phosphatidylserine synthase and phosphatidylserine decarboxylase are essential for cell wall integrity and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 75: 1112–1132.

Coleman, J. J., Muhammed. M., Kasperkovitz, P. V., Vyas, J. V., Mylonakis, E. 2011. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol.* 115(12): 1279–1289.

Cox, R. A., Best, G. K. 1972. Cell wall composition of two strains of *Blastomyces dermatitidis* exhibiting differences in virulence for mice. *Infect Immun.* 5(4): 449–53.

Czub, J., Baginski, M. 2006. Comparative Molecular Dynamics Study of Lipid Membranes Containing Cholesterol and Ergosterol. *Biophysical Journal.* 90: 2368–2382.

Diociaiuti, M. F., Bordi, A. Motta, A. Carosi, A. Molinari, G. Arancia, and C. Coluzza. 2002. Aggregation of gramicidin A in phospholipid Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophys. J.* 82: 3198–3206.

Disalvo A. F., Denton, J, F. 1963. Lipid content of four strains of *Blastomyces dermatitidis* of different mouse virulence. *J Bacteriol.* 85: 927–31.

Emmons, C. W. 1950. Histoplasmosis: Animal Reservoirs and Other Sources in Nature of the Pathogenic Fungus, *Histoplasma*. *American Journal of Public Health.* 40: 436–440.

Fernández, C. M., Martínez, L. A., Echemendía, M. Y., Martínez, M. G., Perurena M. R., Illnait, M. T., 2003. Sensibilidad in vitro de *Histoplasma capsulatum* var: *capsulatum* frente a anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. *Rev Cubana Med Trop.* 55(2): 76–82.

Finkelstein, A. Holz, R. 1973. Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *Membranes 2*: 377–408.

Folsch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.

Foresman, E., Frisch A. 1996. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, ed Gaussian.In.

Garfoot, A. L. & Rappleye, C. A. 2015. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. *FEBS Journal*. 283(4): 619–33.

Gómez, B. L. 2011. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*. 5(4): 199–205.

Gómez, L. F. Torres I.P., Jiménez-A M. D P., McEwen, J.G., de Bedout, C., Peláez, C. A., Acevedo, J. M., Taylor M. L., Arango, M. 2017. Detection of *Histoplasma capsulatum* in organic fertilizers by Hc100 nested PCR and its correlation with the physicochemical and microbiological characteristics of the samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 98(5):1303–1312.

Gómez, L. F., Arango, M., McEwen, J.G., Gómez, O. M., Rodríguez, A., C., Peláez, C. A., Acevedo, J. M., Taylor M. L., Jiménez-A M. 2019. Molecular epidemiology of Colombian *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from human and chicken manure samples. *Heliyon*. 5: e02084: 1–8.

Gill, P., Moghadam T. T., Ranjbar B. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*. 21:167–193.

Guimarães, L. L., Toledo, M. S., Ferreira, F. A., Straus, A. H., Takahashi, H. K. 2014. Structural diversity and biological significance of glycosphingolipids in pathogenic and opportunistic fungi. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*. 4(Art 138): 1–8.

Haynes, W. M., Lide, D. R., & Bruno, T. J. (2016). *CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data*. 2016-2017, 97th Edition / Boca Raton, Florida: CRC Press.

Hamill, R. J. 2013. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 73: 919–934.

Heung, L. J., Luberto, C., Poeta M. 2006. Role of sphingolipids in microbial pathogenesis. *Infection and Immunity*. 74(1): 28–39.

Jiménez-Alzate MD, Peláez-Jaramillo CA, Hung C, Castro-López N and Cole G. 2015. Lipid components of Coccidioides parasitic cells suppress host immune response to lung infection. *Front. Immunol. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015 - 11th Congress of the Latin American Association of Immunology - 10º. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología*.

Jiménez. R., Tobón. A., Arango. M., Espinal. D., Restrepo. A. 2002. Histoplasmosis: utilidad de las pruebas serológicas en el diagnóstico diferencial. *Acta Médica Colombiana*. 27(3): 181–185.

Kamel, G., Bordi, F., Chronopoulou, L., Lupi, S., Palocci, C., Sennato, S., Verdes, and P. V. 2012. Adsorption of *Candida rugosa* lipase at water-polymer interface: The case of poly(dl)lactide. *Surf. Sci*. 605: 2017–2024.

Kaminskii, D. M. 2014. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *Eur Biophys J*. 43: 453–467.

- Kauffman, C. 2007. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1): 115–132.
- Knobler, C. M., Desai, R. C. 1992. Phase transitions in monolayers. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43: 207–236.
- Knox, K. S., Hage, C. A. 2010. Histoplasmosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(3): 169–72.
- Kodre, K. V., Attarde, S. R., Yendhe, P. R., Patil, R. Y., Barge, V. U. 2014. Differential Scanning Calorimetry: A Review. Research and Reviews: *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 3: 11–22.
- Laniado-Laborín, R., Cabrales-Vargas, M. N. 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26(4): 223–227.
- Leverly, S. B., Toledo, M. S., Straus, A. H., Takahashi, H. K. 1998. Structure Elucidation of sphingolipids from the Mycopayhogen *Paracoccidioides brasiliensis*: An Immunodominant β -Galactofuranosa residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. *Biochemistry*. 37: 8764–8775.
- Li, D. D., Deng, L., Hu, G. H., Zhao, L. X., Hu, D. D., Jiang, Y. Y., Wang, Y. 2013. Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 36(9): 1482–1487.
- Longo, L. V., Nakayasu, E. S., Gazos-Lopes, F., Vallejo, M. C., Matsuo, A. L., Almeida, I. C., Puccia, R. 2013. Characterization of cell wall lipids from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* cultivated in the presence or absence of human plasma. *Plos One*. 8(5) e63372:1–12.

Loureiro y Penha, C. V., Todeschini, A. R., Lopes-Bezerra, L. M., Wait, R., Jones, C., Mattos, K. A., Heise, N., Mendonça-Prieto, L., Previato, J. O. 2001. Characterization of novel structures of mannosyllinositolphosphorylceramides from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. *Eur. J. Biochem* 268: 4243–4250.

Maget-Dana, R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462: 109 –140.

Malcicka, M., Visser, B., Ellers, J. 2018. An Evolutionary Perspective on Linoleic Acid Synthesis in Animals. *Evol Biol.* 45:15–26.

Manocha, M. S., San-Blas, G., Centeno, S. 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *Journal of General Microbiology.* 117: 147–154.

Mesa-Arango, A. C., Forastiero, A., Bernal-Martínez, L., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., Zaragoza, O. 2013. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Medical mycology.* 51(5): 461–472.

McConnell, H. M. 1991. Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 42:171–195.

Mohwald, H. 1990. Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41: 441–476.

Mollier, P., Lagnel, J., Fournet, B., Aioun, A., Riba, G. 1994. A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 64(3): 200–207.

Muñoz-Gómez, A., Corredor, M., Benítez-Páez, A., Peláez, C. 2014. Development of Quantitative Proteomics Using iTRAQ Based on the Immunological Response of *Galleria mellonella* Larvae Challenged with *Fusarium oxysporum* Microconidia. *PLoS One*. 9(11): e112179.

Murata, N., Wada, H. 1995. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308: 1–8.

Mylonakis, E., Moreno, R., Khoury, J. B. Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood. S. B., Ausubel, F. M., Andrew. D. 2005. *Galleria mellonella* as a Model System to Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 73(7): 3842–3850.

Navarro-Velasco, G. Y., Prados-Rosales, R. C., Ortíz-Urquiza, A., Quesada- Moraga, E., Di Pietro, A. 2011. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*. 48 (12): 1124–1129.

Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega.

Nielsen Jr, H. S. 1966. Variation in Lipid Content of Strains of *Histoplasma capsulatum* Exhibiting Different Virulence Properties for Mice. *J Bacteriol.* 91(1): 273–277.

Nieto-Ríos, J. F., Serna-Higueta, L. M., Guzman-Luna, C. E., Ocampo-Kohn, C., Aristizabal-Alzate, A., Ramírez, I., Velez-Echeverri, C., Vanegas-Ruiz, J. J., Zuleta J, J., Zuluaga-Valencia, G. A. 2014. Histoplasmosis in Renal Transplant Patients in an Endemic Area at a Reference Hospital in Medellin, Colombia. *Transplantation Proceedings*. 46(9): 3004–3009.

Ordóñez, N., Tobón, A., Arango, M., Tabares, A., de Bedout, C., Gómez B., Castañeda, E., Restrepo A. 1997. Brotes de histoplasmosis registrados en el área andina colombiana. *Biomédica* 1997. 17: 105–111.

Porta, A., Eletto, A., Török, Z., Franceschelli, S., Glatz, A., Vígh, L., Maresca, B. 2010. Changes in membrane fluid state and heat shock response cause attenuation of virulence. *Journal of bacteriology*. 192(7): 1999–2005.

Peck, R. L., Hauser, C. R. 1938. Chemical studies of certain pathogenic fungi. I. The lipids of *Blastomyces dermatitidis*. *J. Am. Chem. Soc.* 60: 2599–2603.

Pérez-López, S., M. Nieto-Suárez, C. Mestres, M. A. Alsina, I. Haro, and N. Vila-Romeu. 2009. Behaviour of a peptide sequence from the GB virus C/hepatitis G virus E2 protein in Langmuir monolayers: its interaction with phospholipid membrane models. *Biophys. Chem.* 141(2-3): 153–161.

Renwick, J., Daly, P., Reeves, E. P., Kavanagh, K. 2006. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. *Mycopathologia* .161: 377–384.

Reeves, E. P., Messina, C. G. M., Doyle, S., Kavanagh, K. 2004. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*. 158(1): 73–79.

Rittershaus, P. C., Kechichian, T. B., Allegood, J. C., Merrill Jr, A. H., Henning, M., Luberto, C., Poeta, M. 2006. Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(6): 1651–1659.

Rhome, R., McQuiston, T., Kechichian, T., Bielawska, A., Henning, M., Drago, M., Morace, G., M., Luberto, C., Poeta, M. 2007. Biosynthesis and immunogenicity of glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* and other human pathogens. *Eucaryotic Cell*. 6(10):1715–1726.

Roberts, G. 1990. Langmuir–Blodgett films. Plenum Press, New York.

Rodríguez, M. L., Travassos, L. R., Miranda, K. R., Franzen, A. J., Rozental, S., Souza, W., Alviano, C. S., Bergter, E. B. 2000. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infection and Immunity*. 68: 7049–7060.

Rodríguez, M. L., Shi, L., Barreto-Bergter, E., Nimrichter, L., Farias, S. E., Rodríguez, E. G. 2007. Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide Protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans*. *infection. Clin. Vaccine Immunol*. 14: 1372–1376.

Ruiz-Baca, E. R., Villagómez-Castro, J. C., Leal-Morales, C. A., Sabanero-López, M., Flores-Carreón, A., López-Romero, E. 2005. Biosynthesis of glycoproteins in the human pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* synthesis of dolichol phosphate mannose and mannoproteins by membrane-bound and solubilized mannosyl transferases. *Antonie van Leeuwenhoek*. 88: 221–230.

Samšňáková, A., Mišíková, S., Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 18(3): 322–330.

Scorzoni, L., de Paula e Silva, A. C. A., Singulani, J. D. L., Leite, F. S., de Oliveira, H. C., Moraes da Silva, R. A., Mendes-Giannini, M. J. S. (2015). Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. *Virulence*. 6(8): 766–776.

Sarpietro, M. G., Micieli, D., Rocco, F., Ceruti, M., Castelli, F. 2009. Conjugation of squalene to acyclovir improves the affinity for biomembrane models. *Int. J. Pharm.* 382: 73–79.

Sarpietro, M. G., Ottimo, S., Giuffrida, M. C., Rocco, F., Ceruti, M., Castelli, F. 2011. Synthesis of n-squalenoyl cytarabine and evaluation of its affinity with phospholipid bilayers and monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*. 406: 69–77.

Sepulveda, J. R., Jimenez. M. P., Peláez, C., Araque, P. 2020. Biological Activity of Lipids Extracted from Two Isolates of *Fusarium oxysporum* (Environmental and Clinical) in *Galleria mellonella*. *American Journal of Chemistry and Application*. 7(1): 1-7.

Singh, A., Wang, H., Silva, L. C., Na, C., Prieto, M., Futerman, A. H., Luberto, C., Poeta M. 2012. Methylation of glycosylated sphingolipid modulates membrane lipid topography and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Cellular Microbiology*. 14(4): 500–516.

Singh, A., MacKenzie, A., Girnun G., Poeta M. 2017. Analysis of sphingolipids, sterols, and phospholipids in human pathogenic *Cryptococcus* strains. *Journal of Lipid Research*. 58: 2017–2016.

Somasshekar, D., Venkateshwaran, G., Srividya, C., Krishnanand, S., Lokesh, B. R. 2001. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 17: 317–320.

Sorrenti, A., Diociaiuti, M., Corvaglia, V., Chistolini, P., Mancini. G. 2009. Chiral recognition of dipeptides in Langmuir monolayers. *Tetrahedron: Asymmetry*. 20(23): 2737–2741.

Stone, R. H., Bicanic, T., Salim, R., Hope, W. 2016. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs*. 76(4): 485–500.

Sugimoto, Y., Sakoh, H., & Yamada, K. (2004). IPC synthase as a useful target for antifungal drugs. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 4(4): 311–322.

Sykora, J. C., Neely, W. C., Vdyanoy, V. 2004. Solvent effects on amphotericin B monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 269: 499–502.

Taylor, M. L., Ruíz, G. M., Reyes, M. R., Rodríguez, G., Carreto, L. E., Duarte, E., Hernández, A., Perez, A., Suárez, R. O., Roldán, Y. A., Romero, R., Sahaza, J. H., Sifuentes, J., Soto, L. E., Peña, G. R. 2005. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 45: 435–441.

Thakur, G., Micic, M., Leblanc, R. M. 2009. Surface chemistry of Alzheimer's disease: a Langmuir monolayer approach. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 74(2): 436–456.

Toledo, M. S., Suzuki, E., Straus, A. H., Takahashi, H. K. 1995. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 33: 247–251.

Toledo, M. S., Levery, S. B., Suzuki, E., Straus, A. H., Takahashi, H. K. 2001. Characterization of cerebrosides from the thermally dimorphic mycopathogen *Histoplasma capsulatum*: expression of 2-hydroxy fatty N-acyl (*E*)- Δ^3 -unsaturation correlates with the yeast-mycelium phase transition. *Glycobiology*. 11(2): 113–124.

Vallejo, M. C., Nakayasu, E. S., Longo, L. V., Ganiko, L., Gazos-Lopes, F., Matsuo, A. L., Almeida, I. C., Puccia, R. 2013. Lipidomic Analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Plos One*. 7(6) e39463: 1–12.

van der Meer-Janssen, Y. P. M., van Galen, J., Batenburg, J. J., Helms, J.B. 2010. Lipids in host-pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Progress in Lipid Research*. 49: 1–26.

Vilcinskis, A., Jegorov, A., Landa, Z., Götz, P., Matha, V. 1999. Effects of beauverolide L and cyclosporin A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 122(1): 83–92.

Weete, J. D., Abril, M., Blackwell, M. 2010. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. *PLoS ONE* 5(5): e10899: 1–6.

Wójtowicz, K., Gruszecki, W. I., Walicka, M., Barwicz, J. 1998. Effect of amphotericin B on dipalmitoylphosphatidylcholine membranes: calorimetry, ultrasound absorption and monolayer technique studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1373: 220–226.

Wu, G., Liu, Y., Ding, Y., & Yi, Y. (2016). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell*. 48(4): 297–304.

Zarnowski, R., Miyazaki, M., A., Dobrzyn, A., Ntambi, J. M., Woods, J. P. 2007. Typing of *Histoplasma capsulatum* strains by fatty acid profile analysis. *Journal of Medical Mycology*. 56: 788–797.

Zarnowski, R., Dobrzyn, A., Ntambi, J. M., Woods, J. P. 2008. Neutral Storage Lipids of *Histoplasma capsulatum*: Effect of Culture Age. *Curr Microbiol*. 56(2): 110–114.

Zhong, W., Jeffries, M. W., & Georgopapadakou, N. H. 2000. Inhibition of Inositol Phosphorylceramide Synthase by Aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* Species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(3): 651–653.

Al-Doory Yousef. 1960. Free Lipids and Phospholipid Phosphorus of *Histoplasma capsulatum* and other Pathogenic Fungi. *Journal of Bacteriology*. 80(4): 565–566.

11 ANEXOS

11.1 Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por GC.

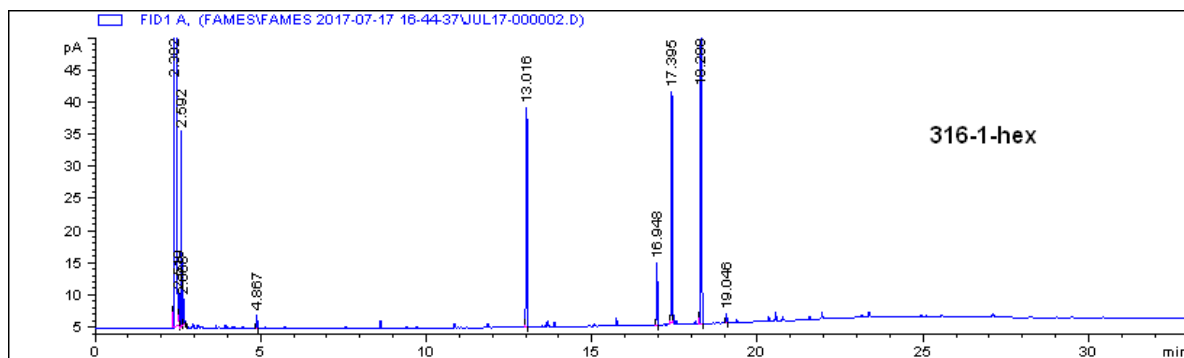


Figura Anexo 1. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

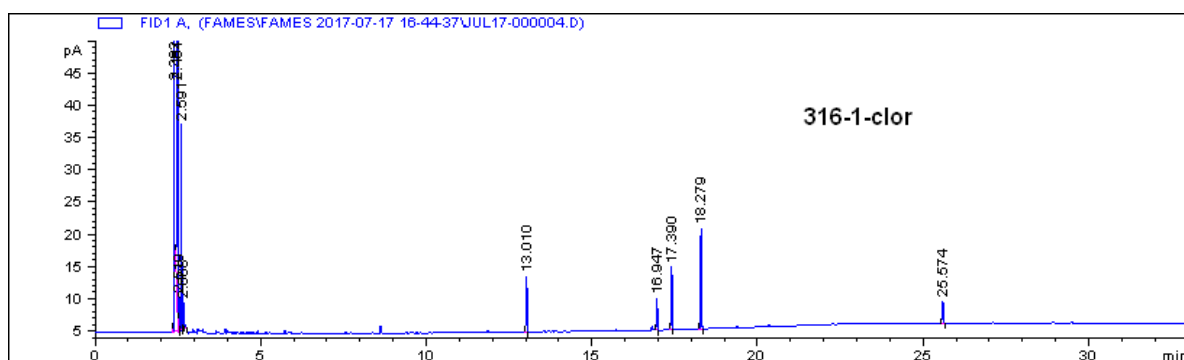


Figura Anexo 2. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

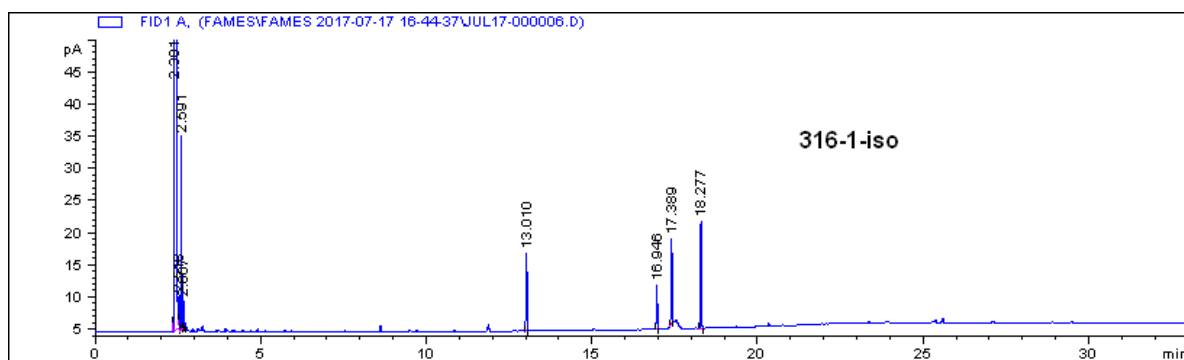


Figura Anexo 3. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

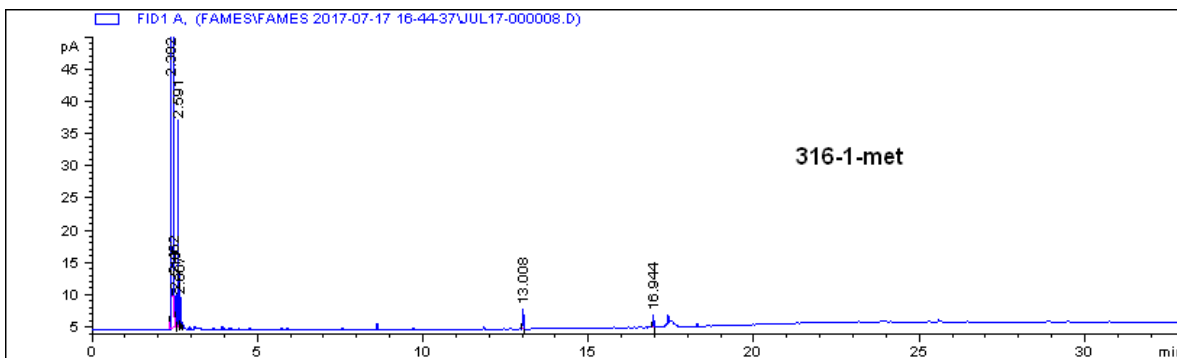


Figura Anexo 4. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

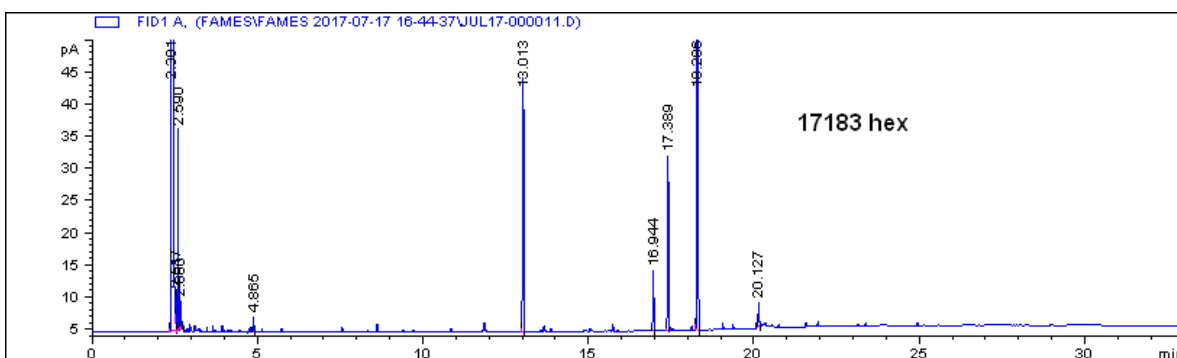


Figura Anexo 5. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

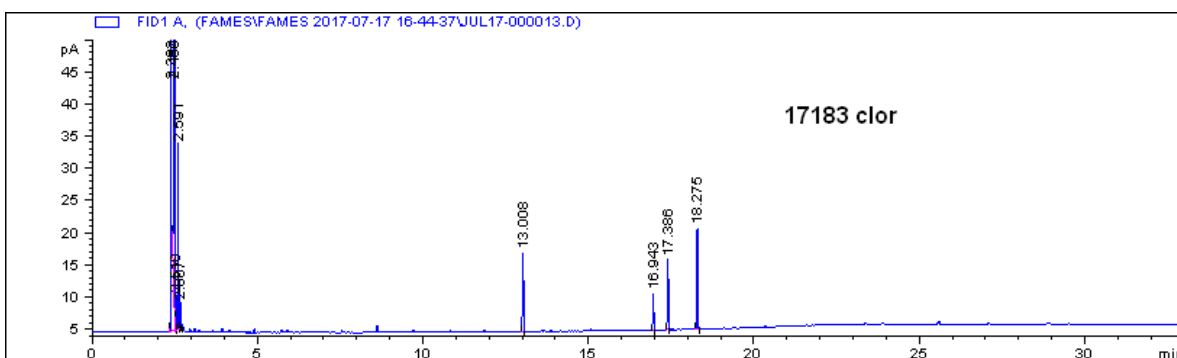


Figura Anexo 6. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

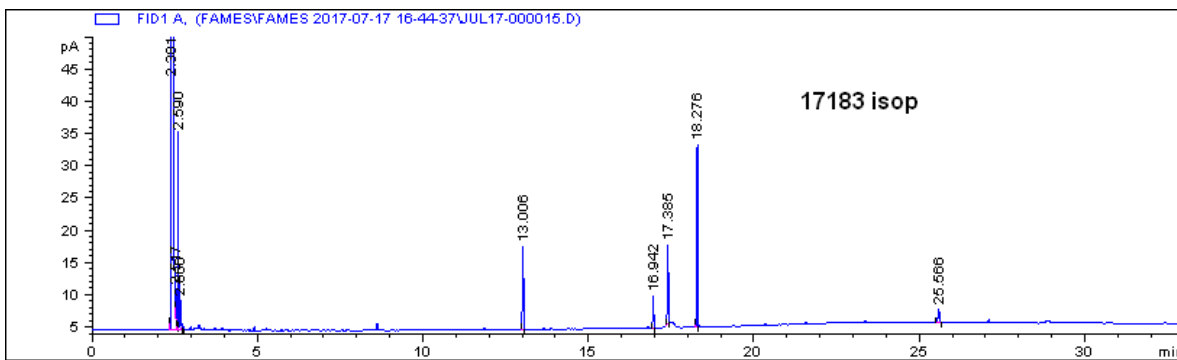


Figura Anexo 7. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

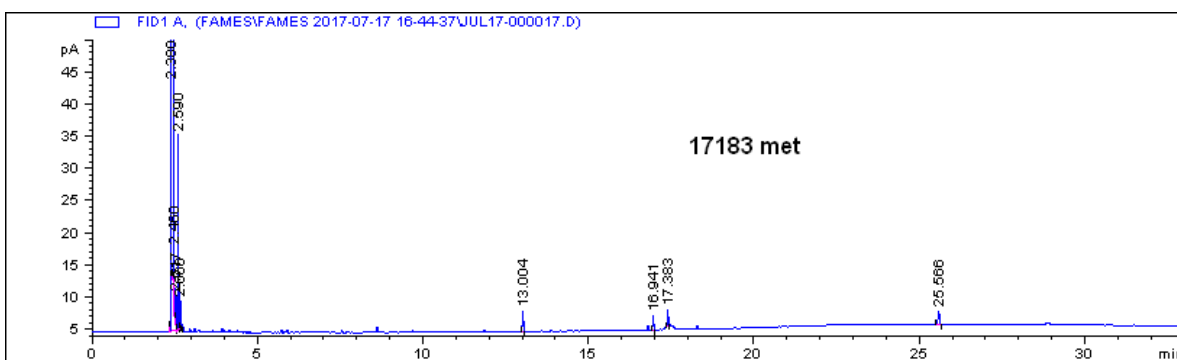


Figura Anexo 8. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.2 Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por GC.

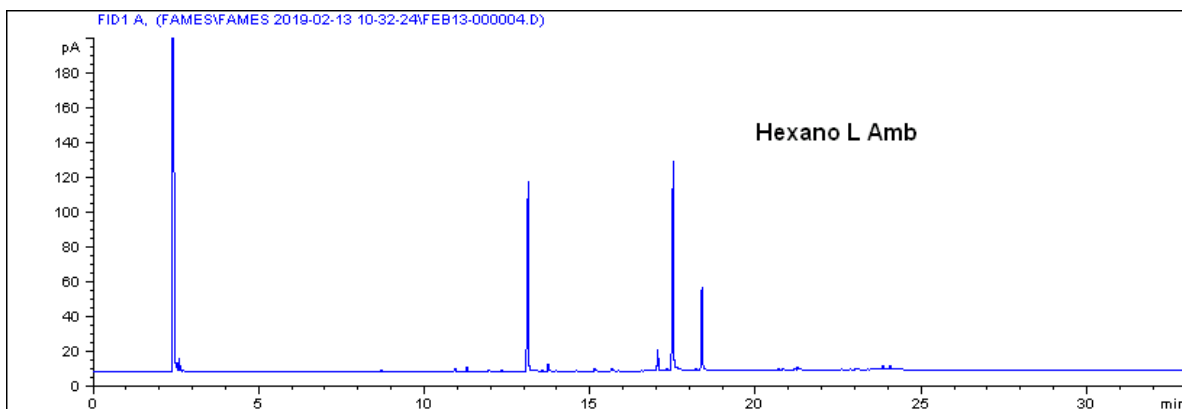


Figura Anexo 9. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

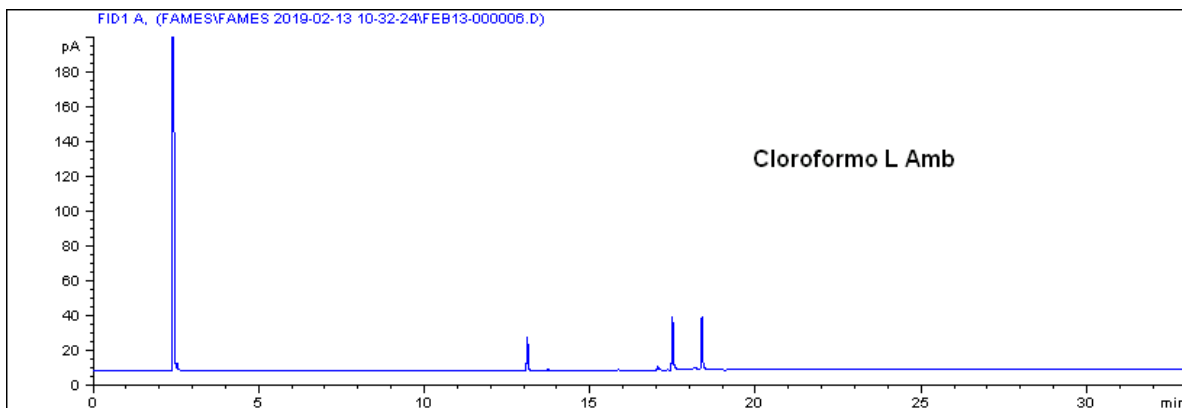


Figura Anexo 10. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

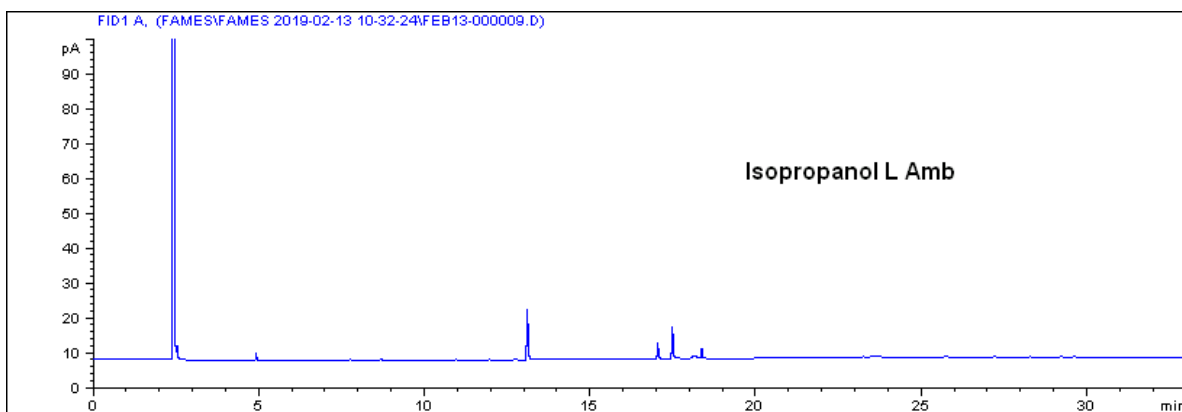


Figura Anexo 11. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

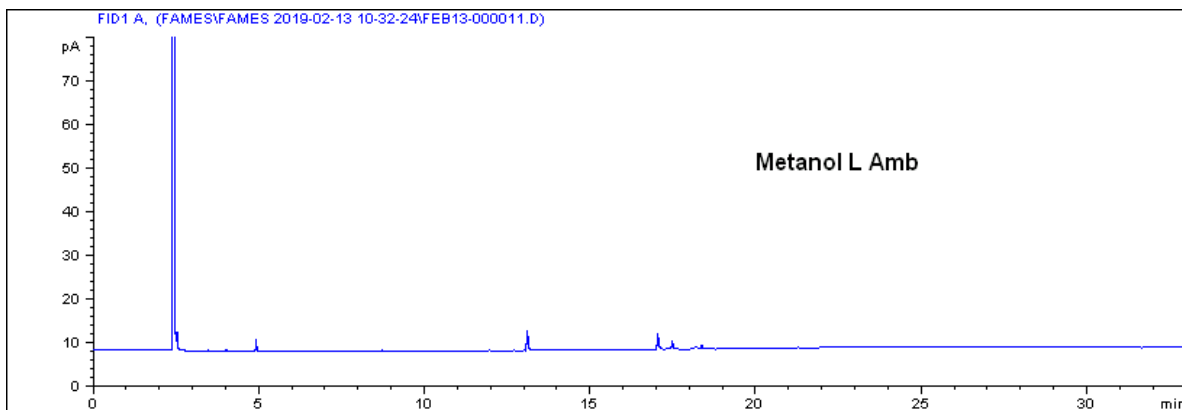


Figura Anexo 12. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

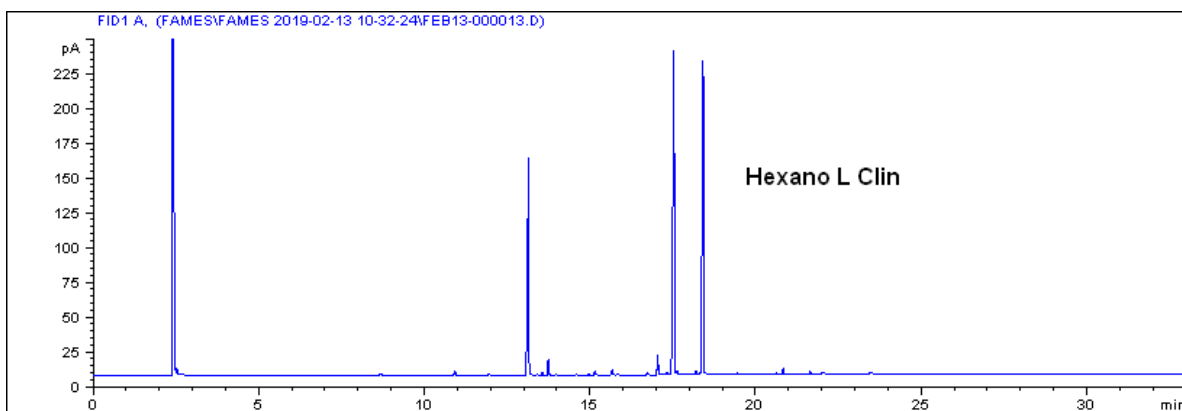


Figura Anexo 13. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

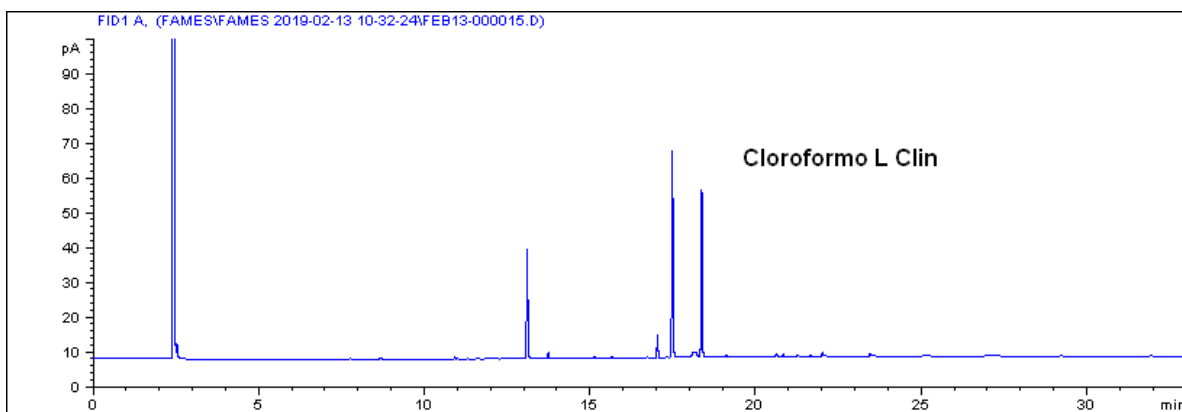


Figura Anexo 14. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

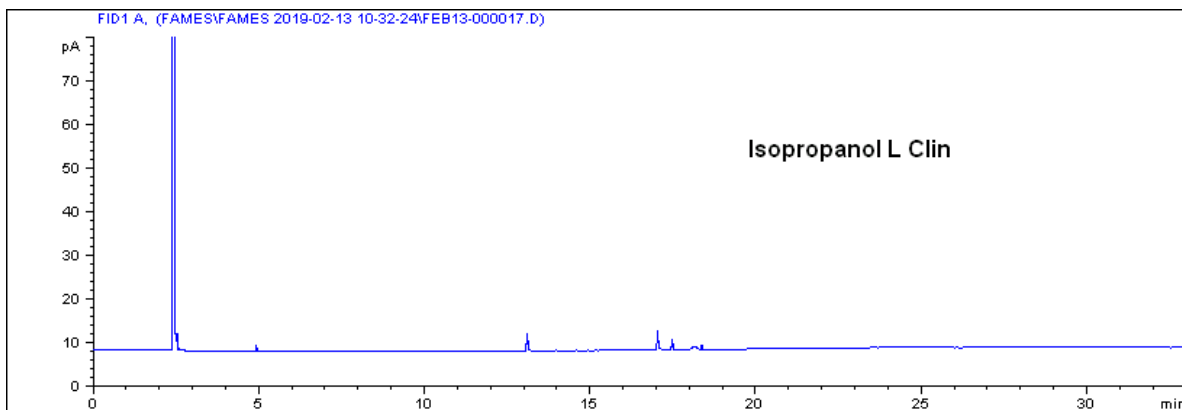


Figura Anexo 15. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

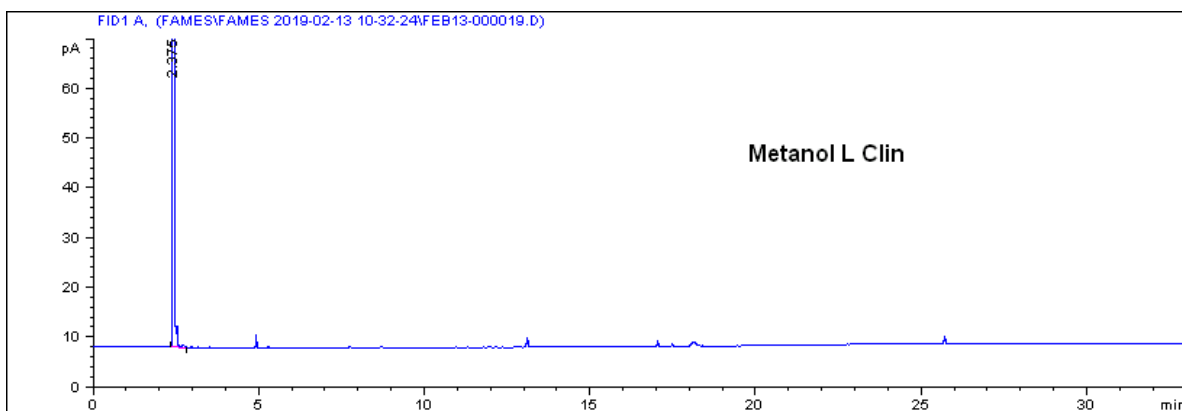


Figura Anexo 16. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para la fracción metanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.3 Análisis fracción hexano de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

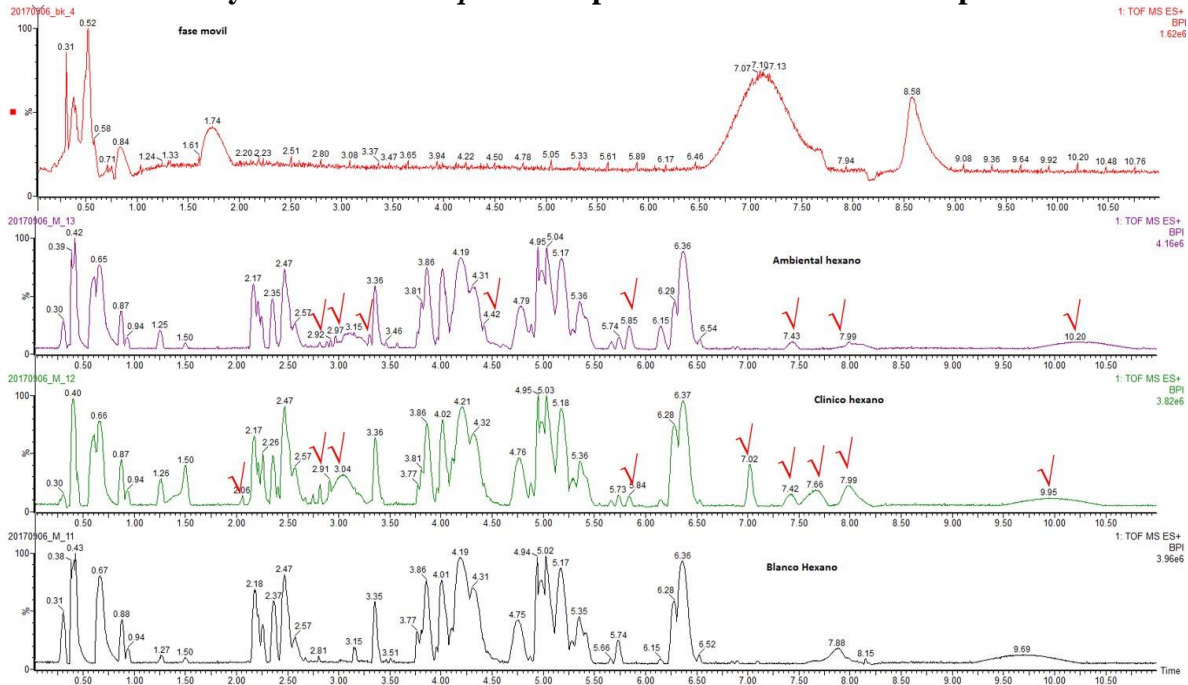


Figura Anexo 17. Análisis fracción hexano de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

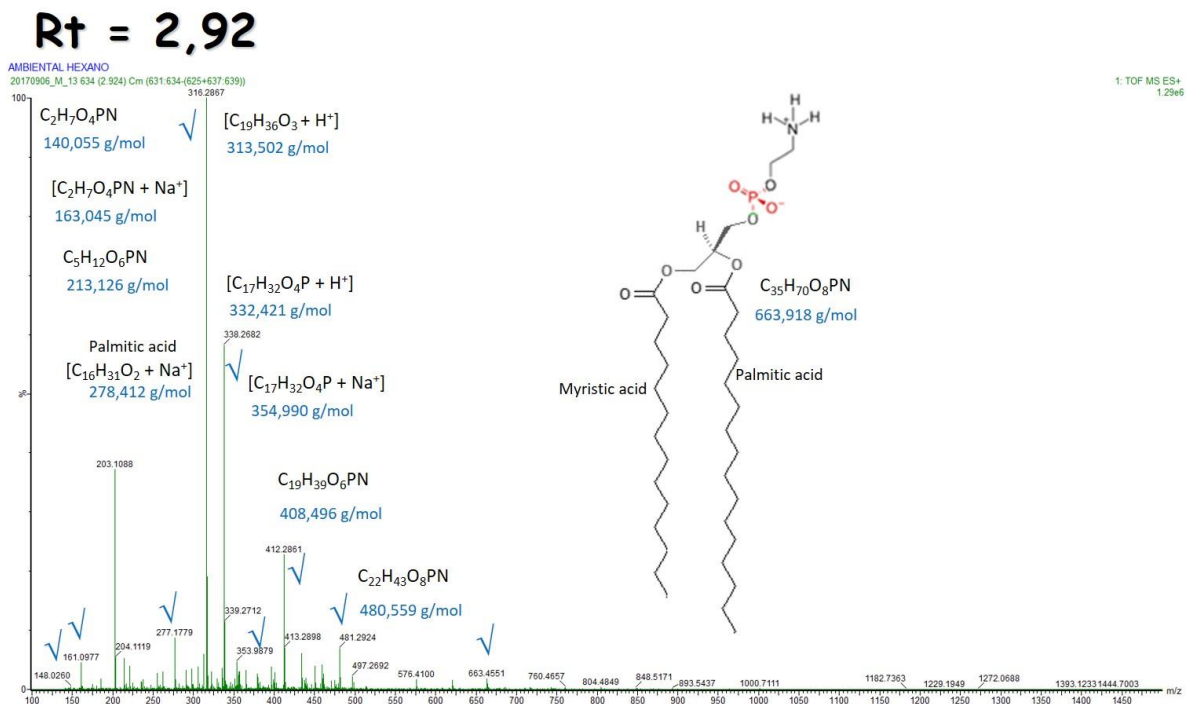


Figura Anexo 18. Espectro MS/MS para un Rt = 2,92 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 2,96

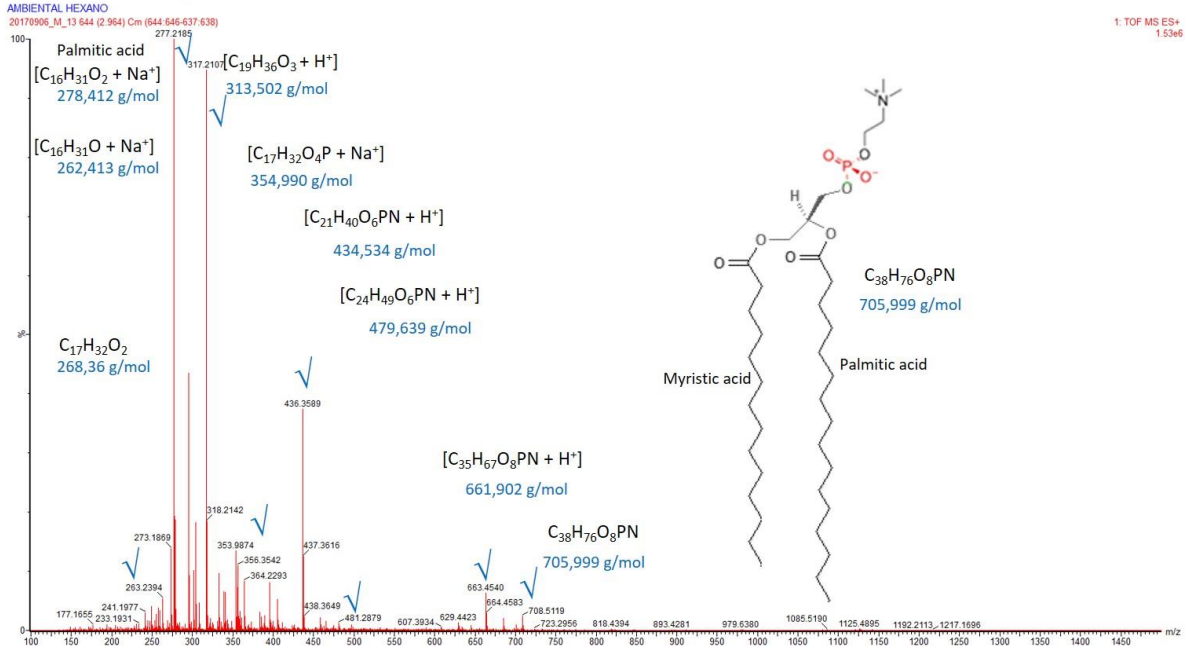


Figura Anexo 19. Espectro MS/MS para un Rt = 2,96 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 3,30

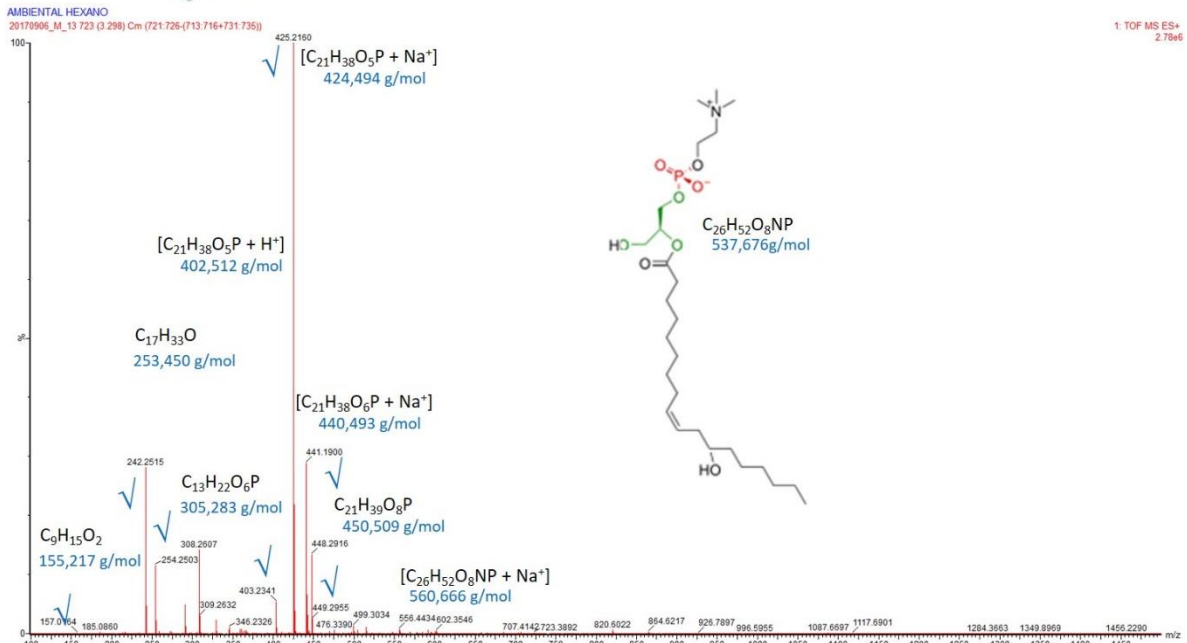


Figura Anexo 20. Espectro MS/MS para un Rt = 3,30 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 4,41

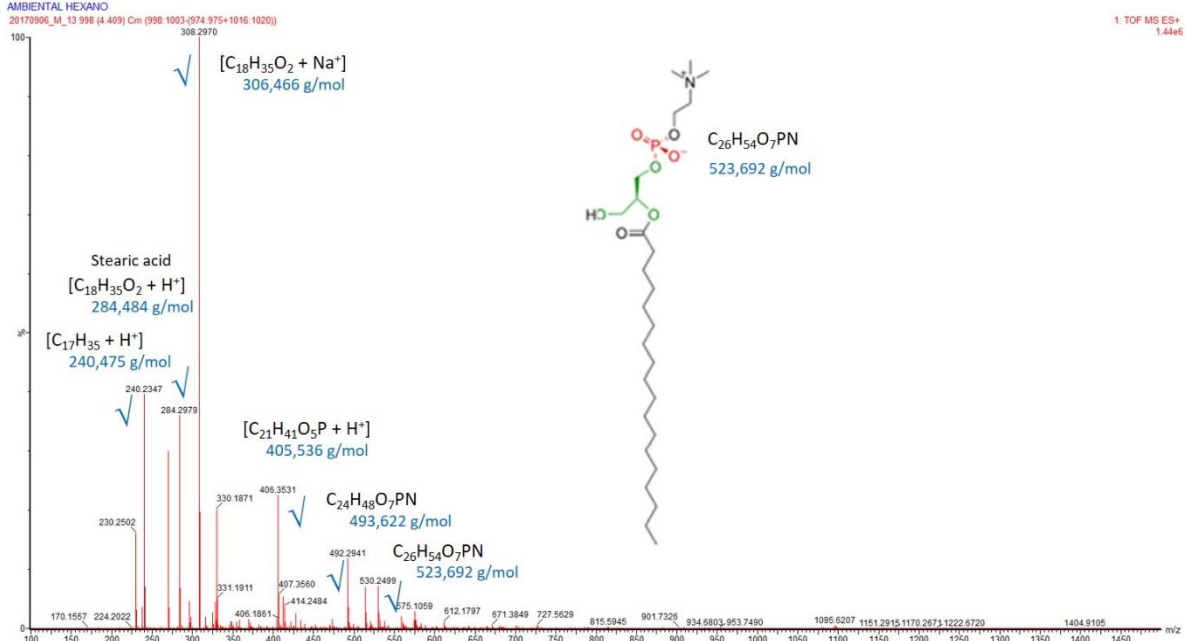


Figura Anexo 21. Espectro MS/MS para un Rt = 4,41 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 5,84

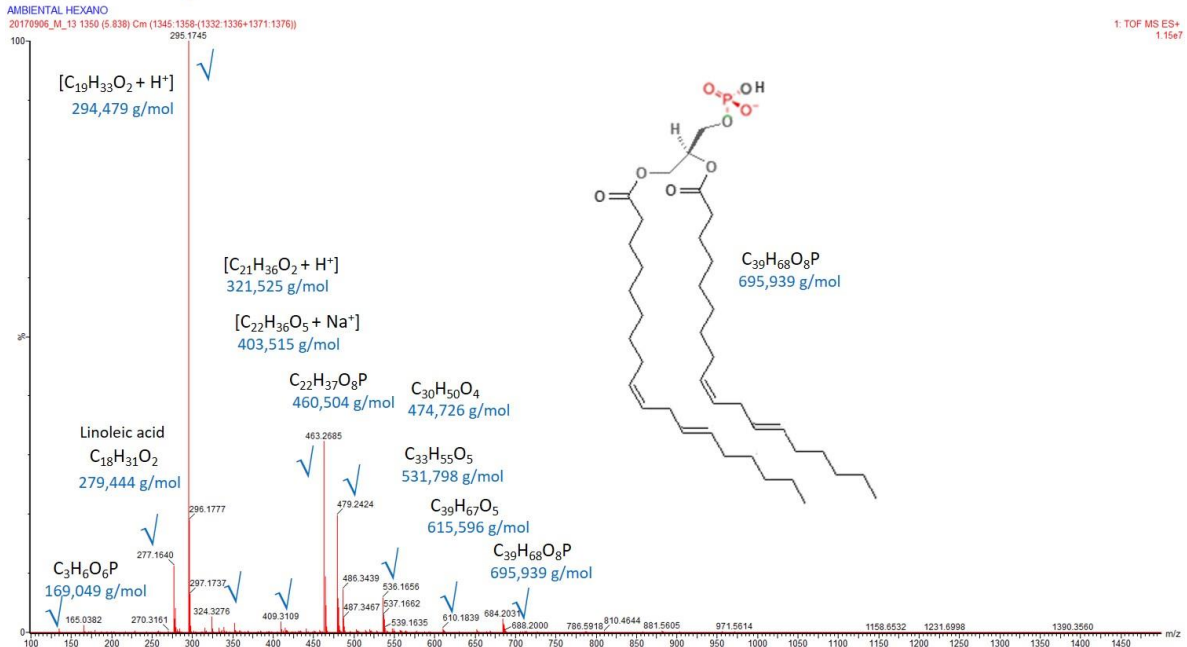


Figura Anexo 22. Espectro MS/MS para un Rt = 5,84 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 7,40

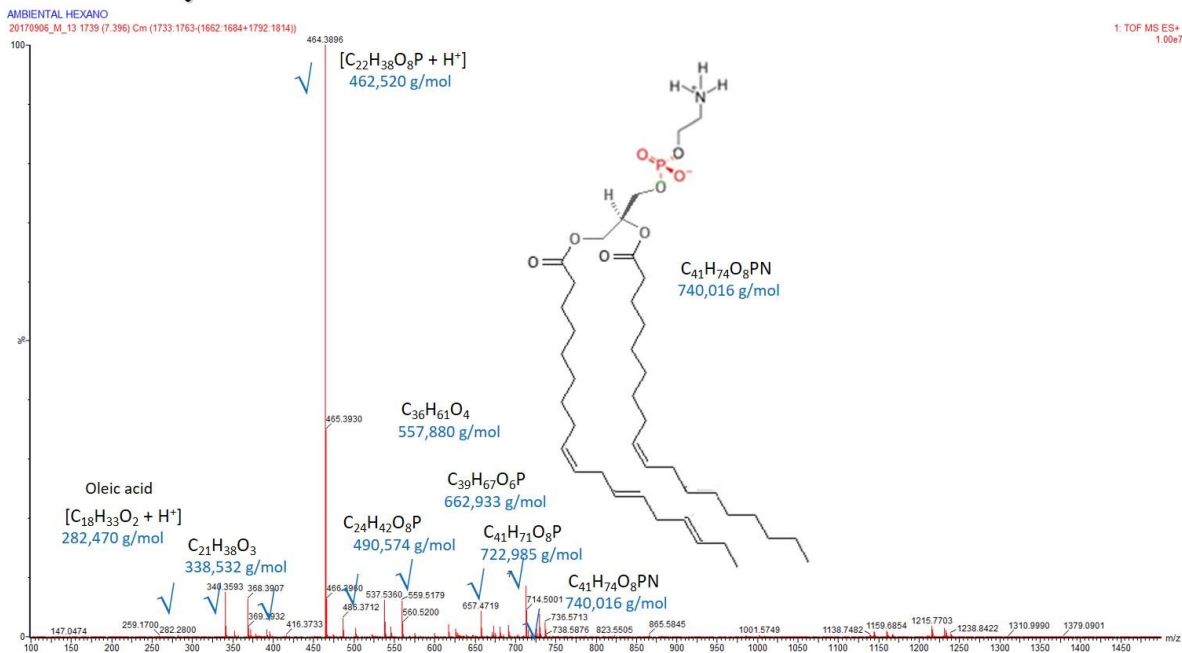


Figura Anexo 23. Espectro MS/MS para un Rt = 7,40 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 8,01

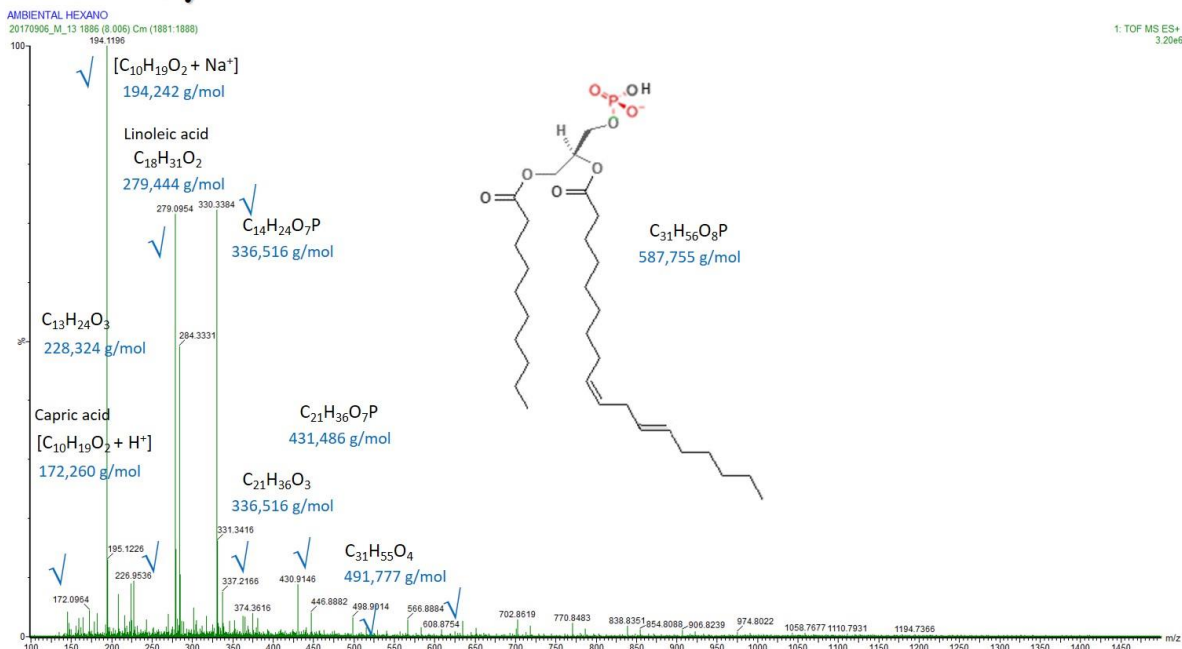


Figura Anexo 24. Espectro MS/MS para un Rt = 8,01 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 10,20

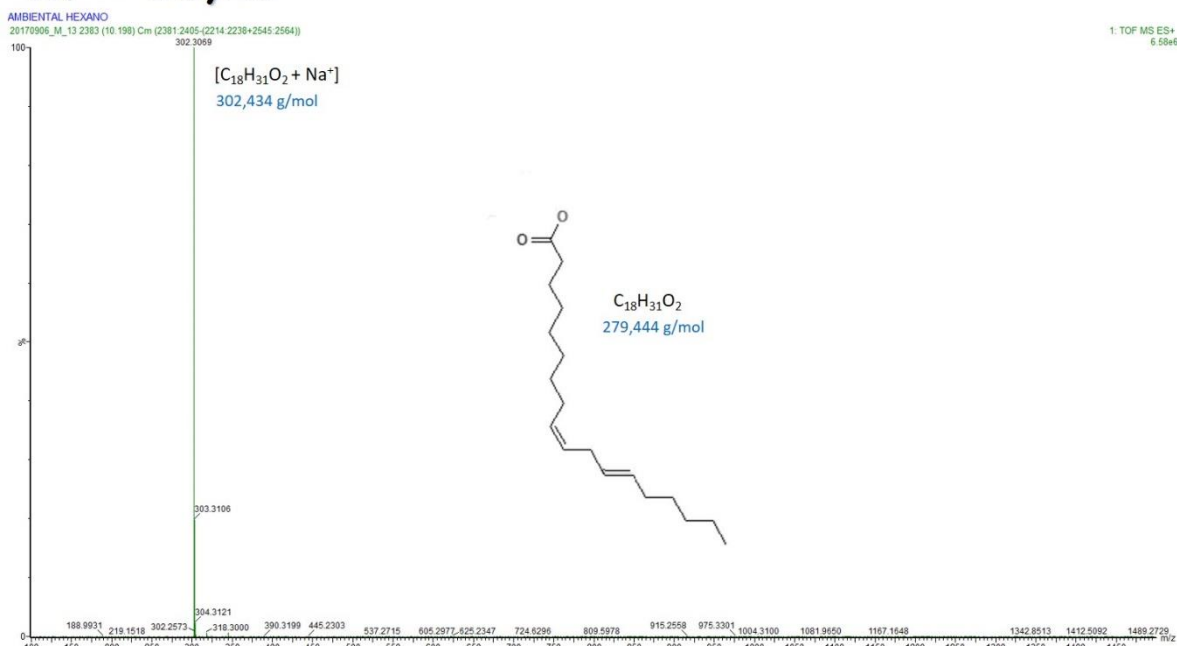


Figura Anexo 25. Espectro MS/MS para un Rt = 10,20 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 2,06

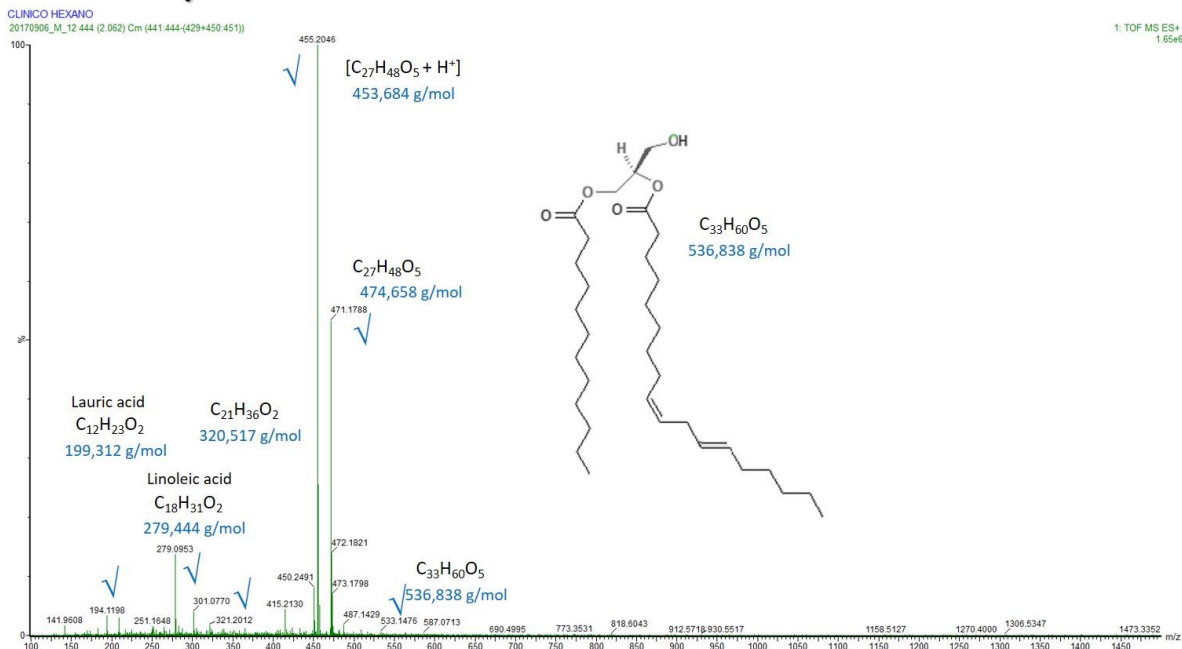


Figura Anexo 26. Espectro MS/MS para un Rt = 2,06 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 2,92

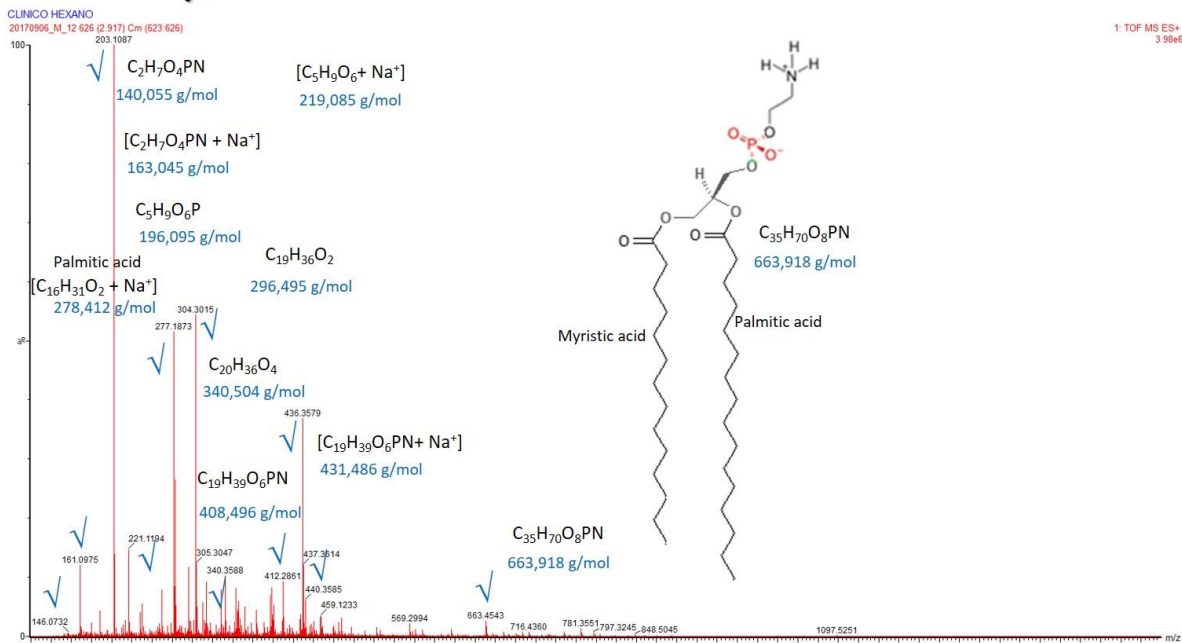


Figura Anexo 27. Espectro MS/MS para un Rt = 2,92 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 3,06

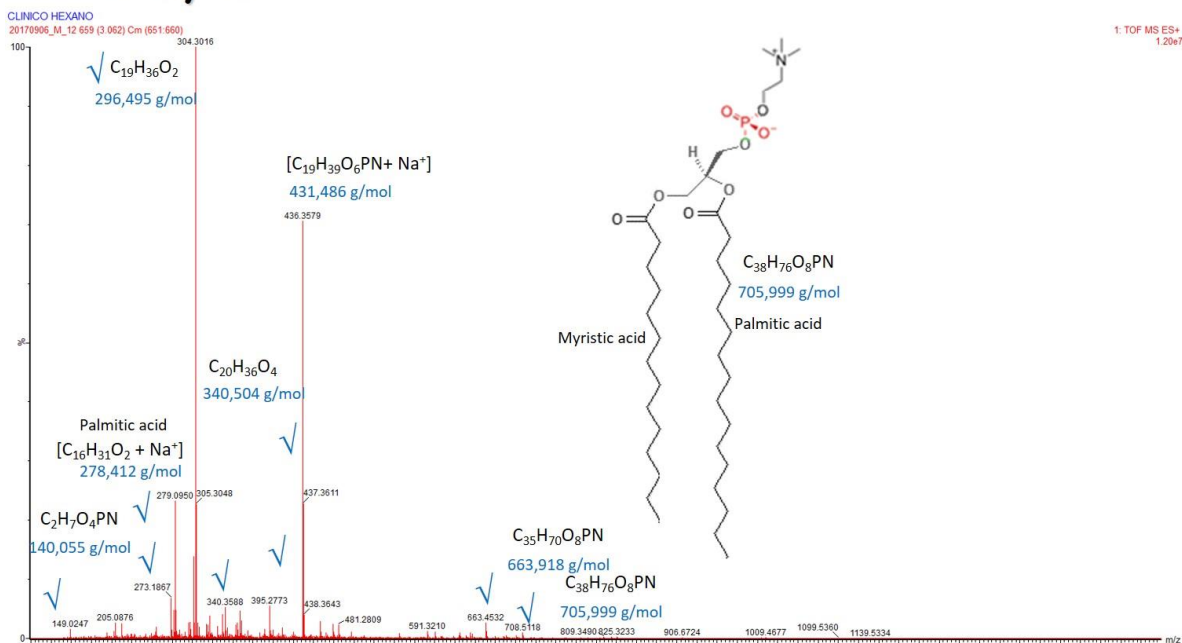


Figura Anexo 28. Espectro MS/MS para un Rt = 3,06 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 5,85

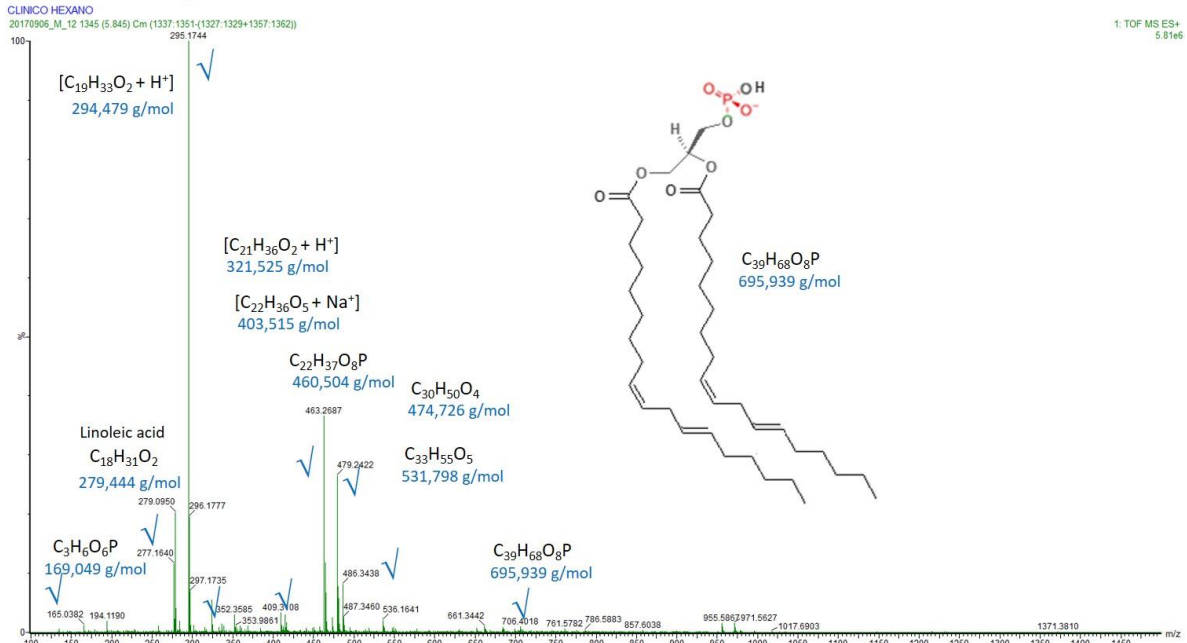


Figura Anexo 29. Espectro MS/MS para un Rt = 5,85 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 7,02

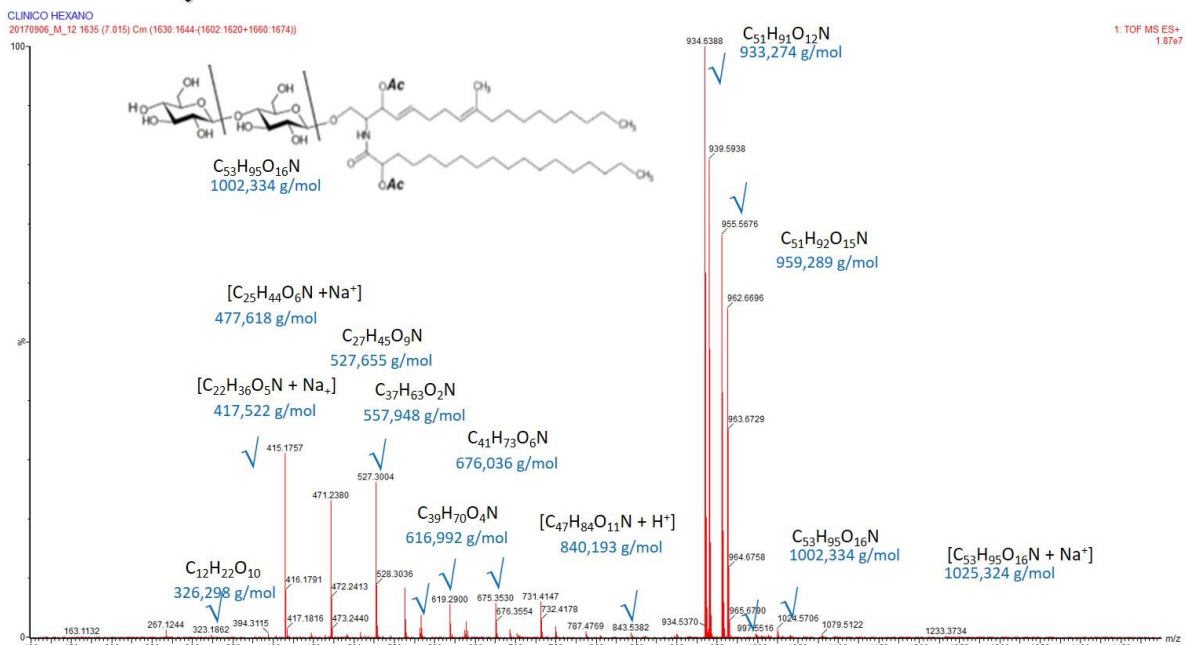


Figura Anexo 30. Espectro MS/MS para un Rt = 7,02 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 7,42

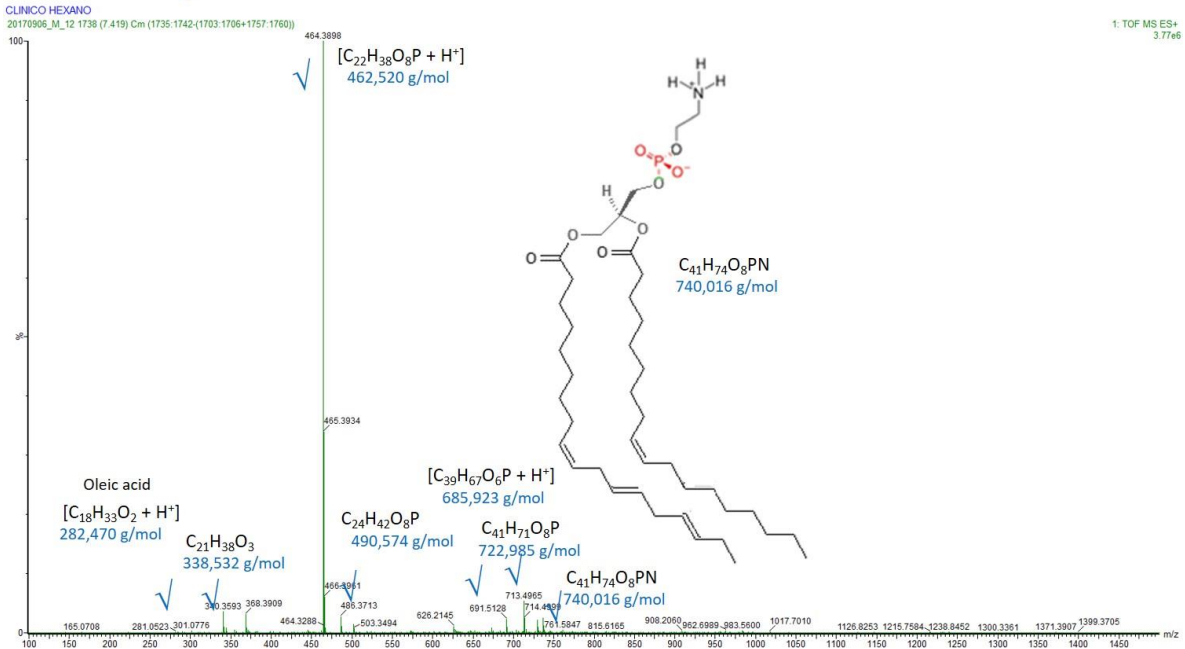


Figura Anexo 31. Espectro MS/MS para un Rt = 7,42 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 7,67

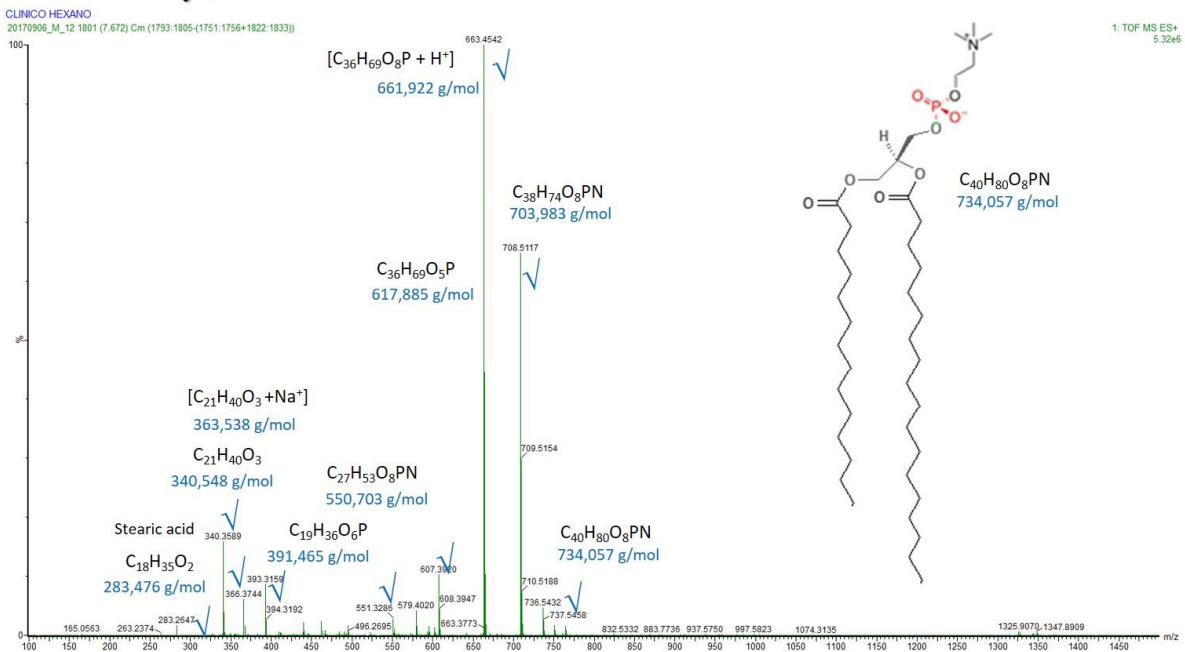


Figura Anexo 32. Espectro MS/MS para un Rt = 7,67 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 7,98

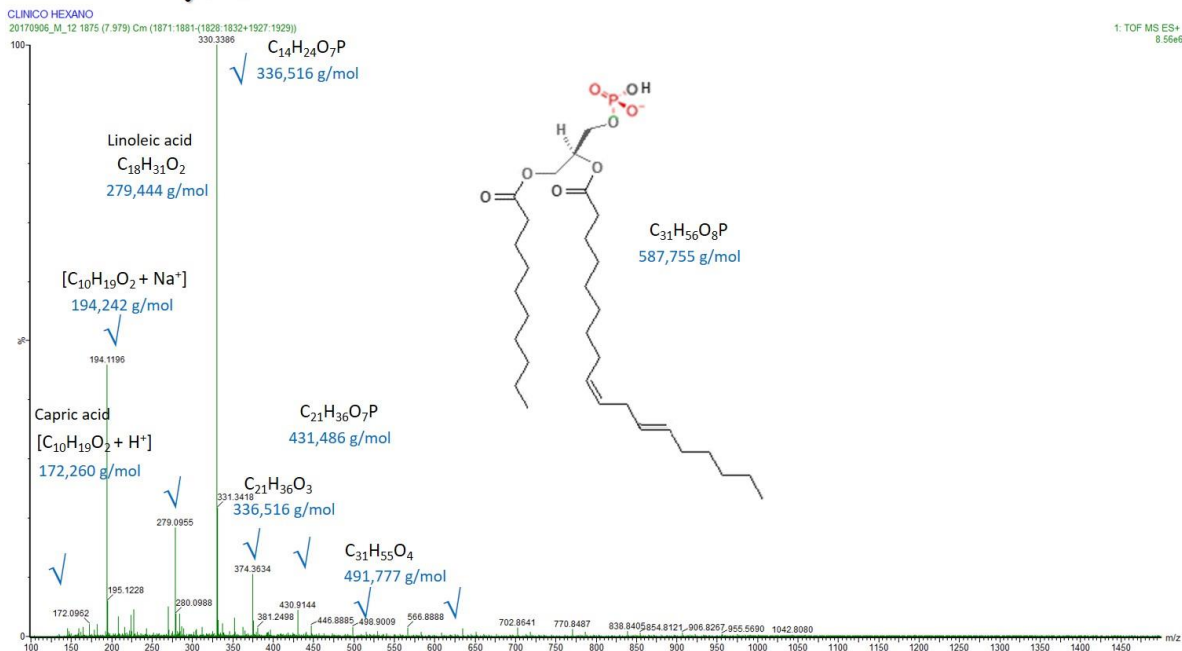


Figura Anexo 33. Espectro MS/MS para un Rt = 7,98 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 9,95

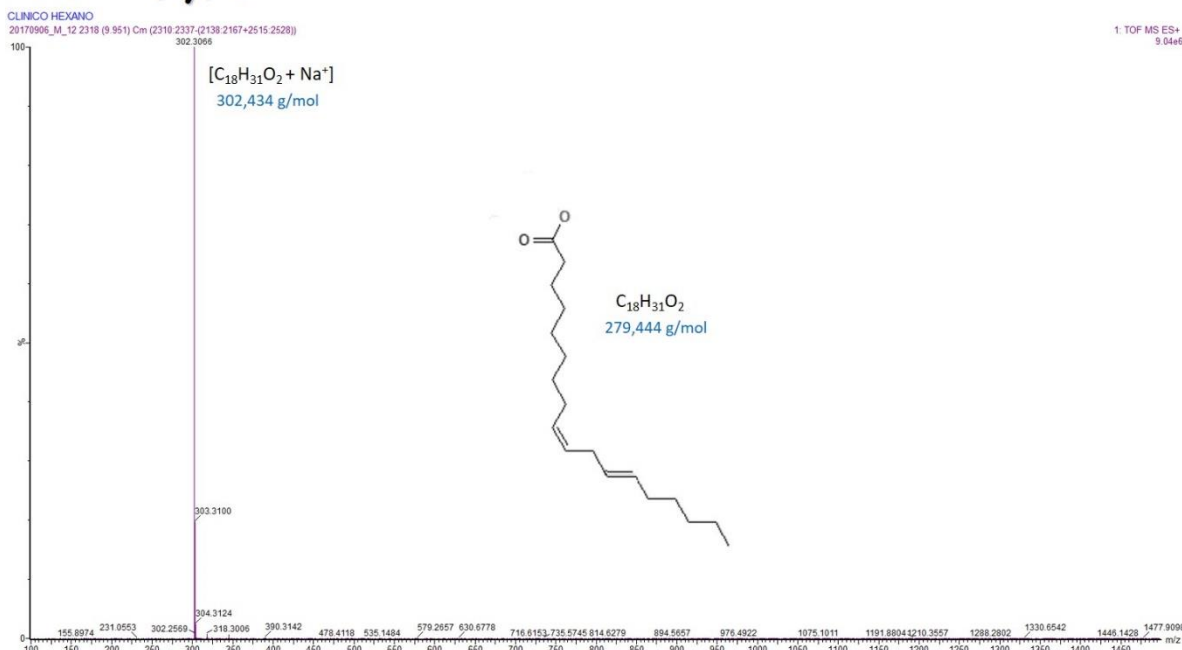


Figura Anexo 34. Espectro MS/MS para un Rt = 9,95 fracción hexano de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.4 Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

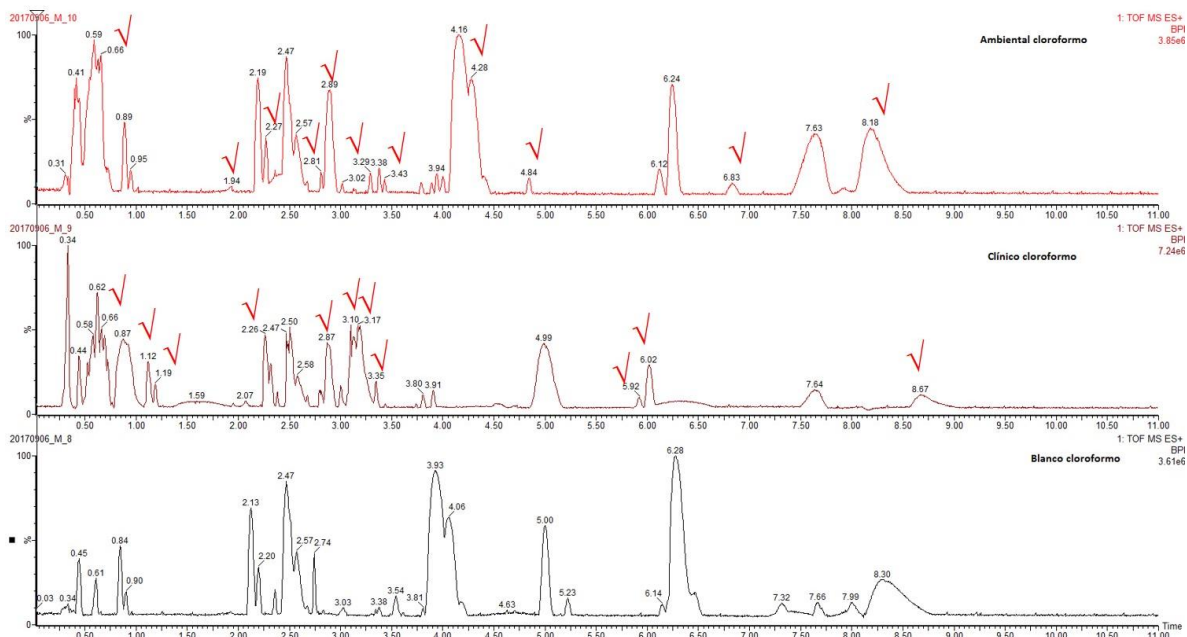


Figura Anexo 35. Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

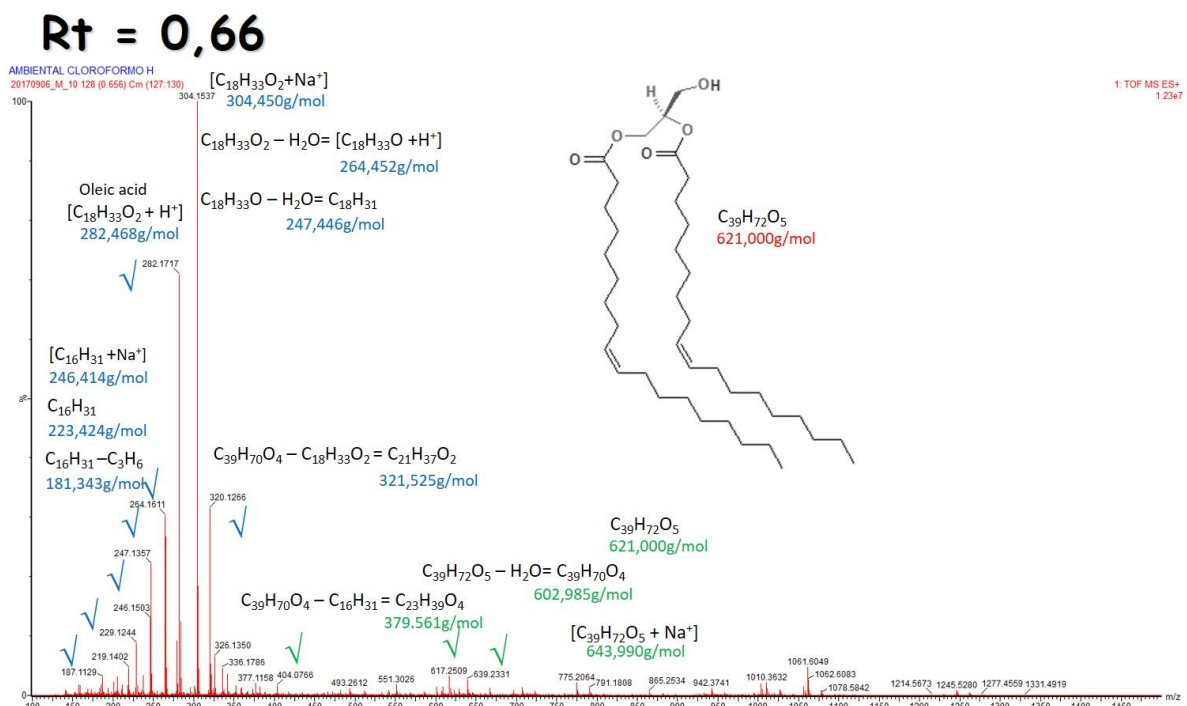


Figura Anexo 36. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 2,27

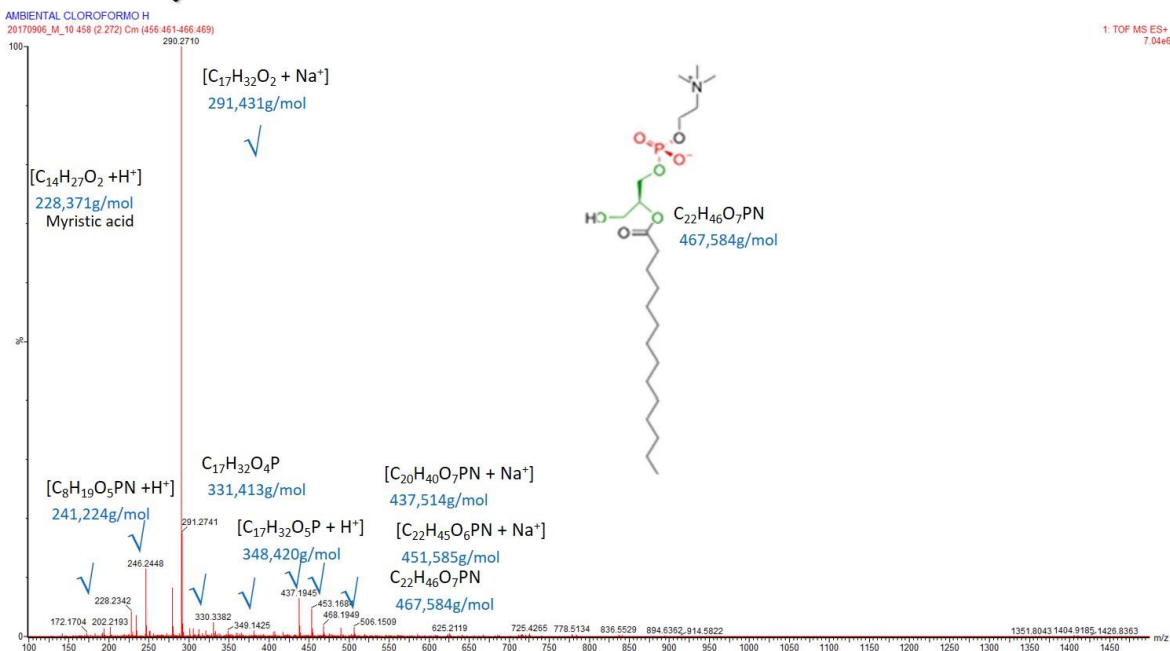


Figura Anexo 37. Espectro MS/MS para un Rt = 2,27 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 2,81

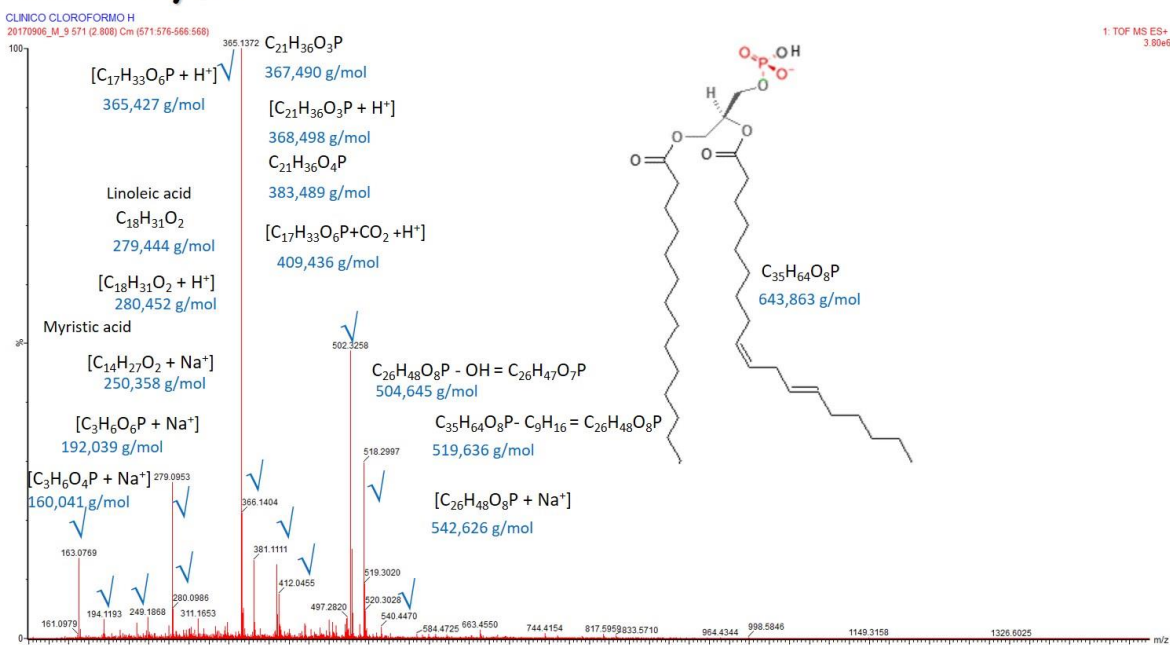


Figura Anexo 38. Espectro MS/MS para un Rt = 2,81 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 2,90

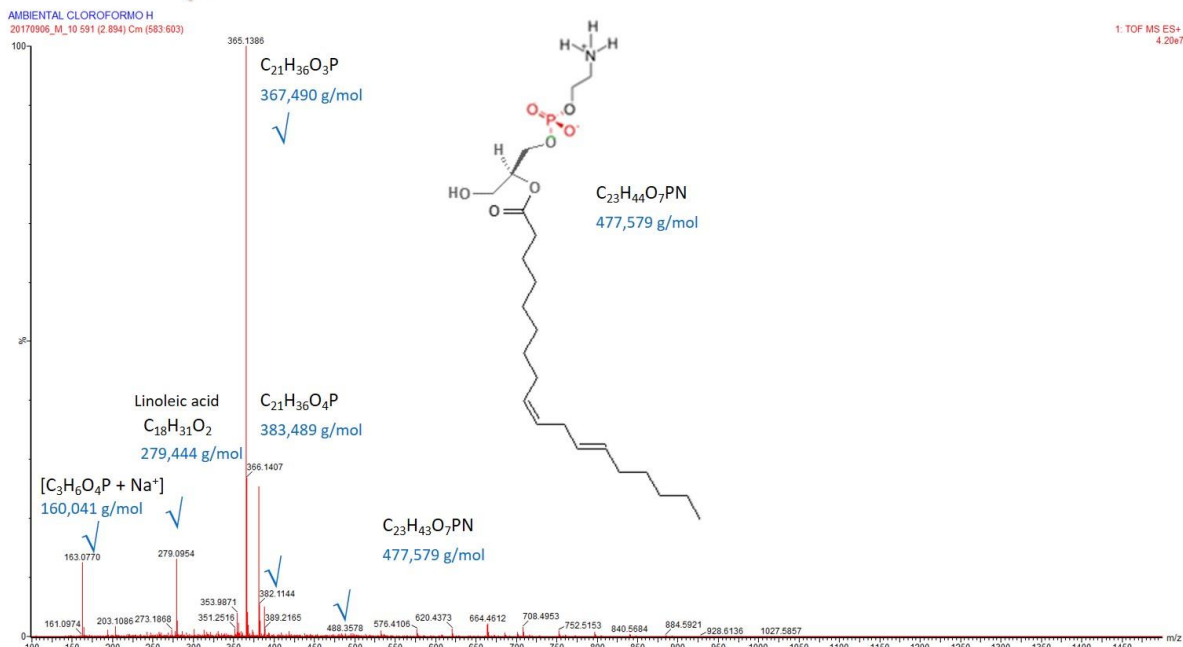


Figura Anexo 39. Espectro MS/MS para un Rt = 2,90 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 3,29

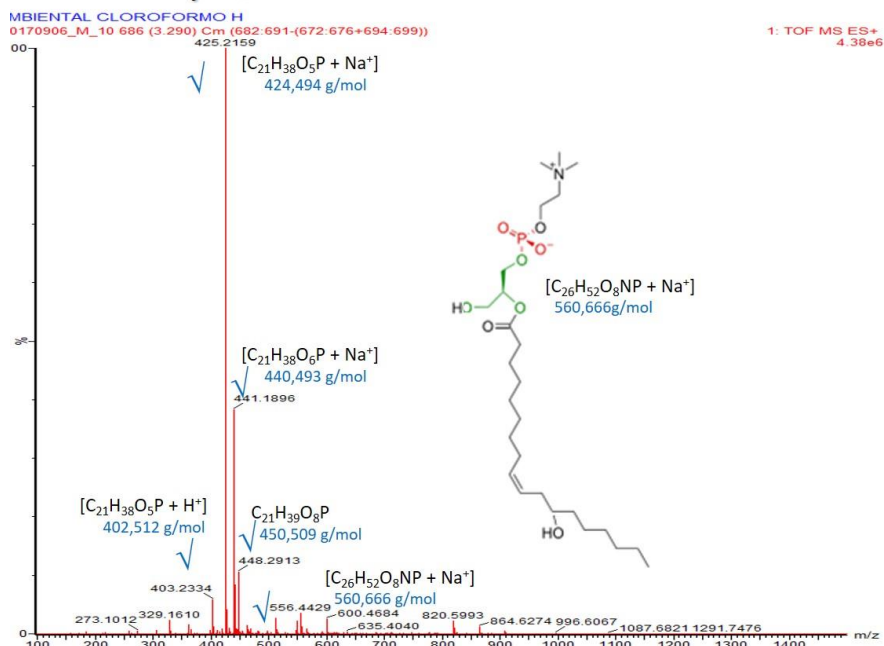


Figura Anexo 40. Espectro MS/MS para un Rt = 3,29 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 3,43

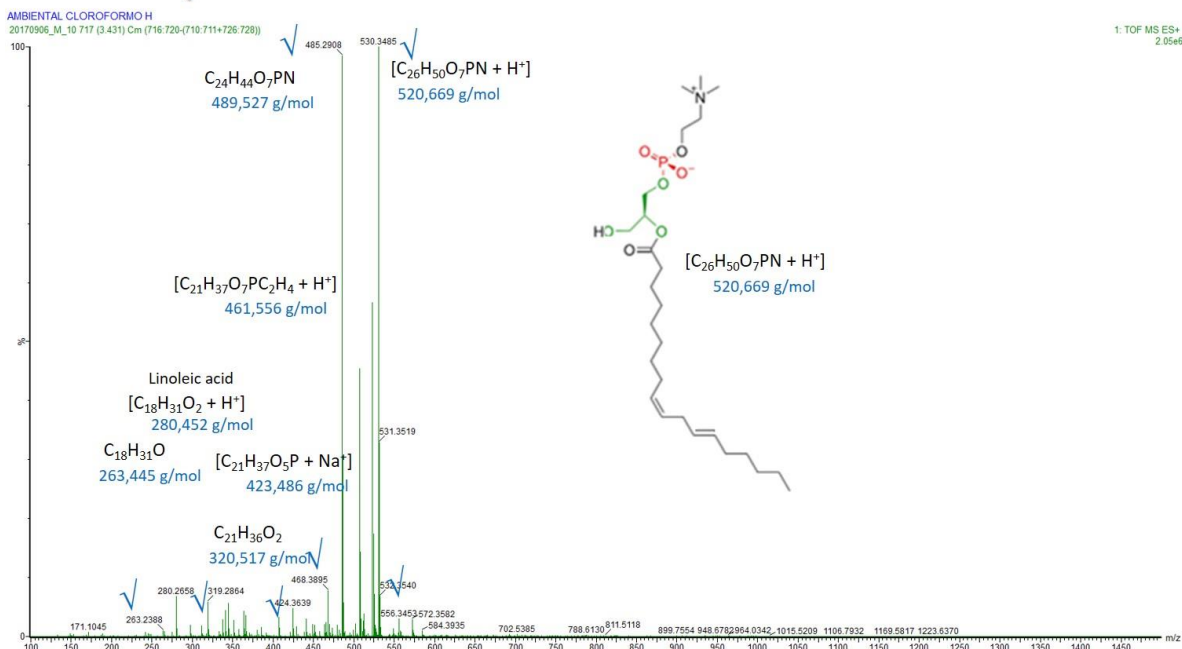


Figura Anexo 41. Espectro MS/MS para un Rt = 3,43 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 4,23

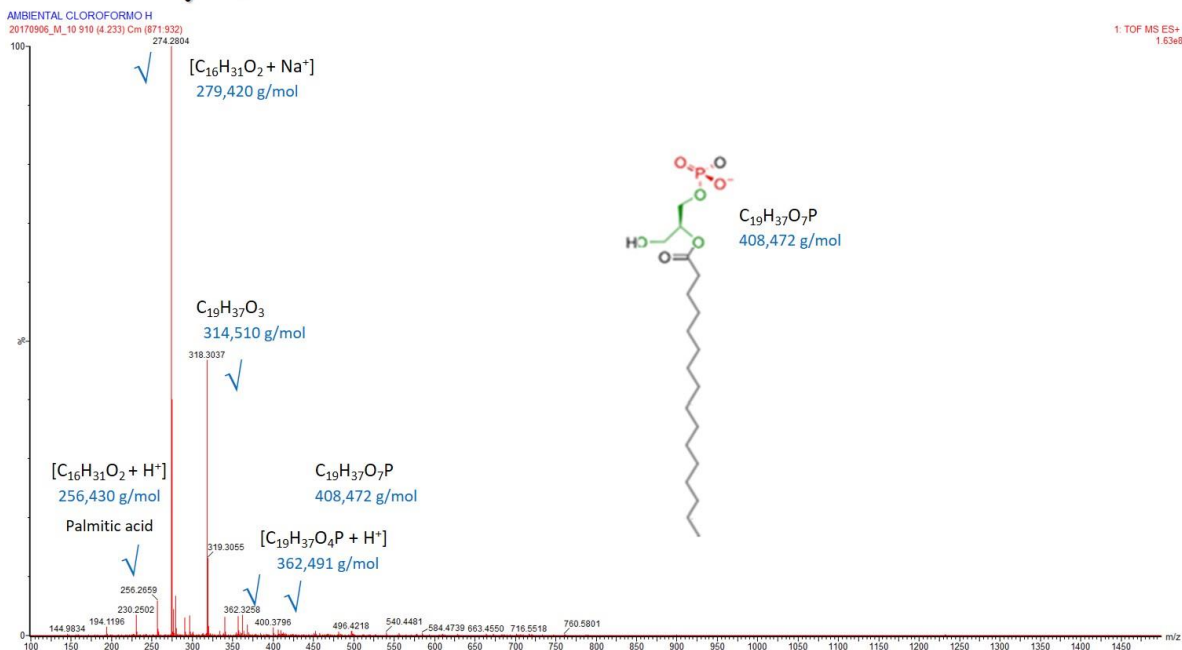


Figura Anexo 42. Espectro MS/MS para un Rt = 4,23 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 4,85

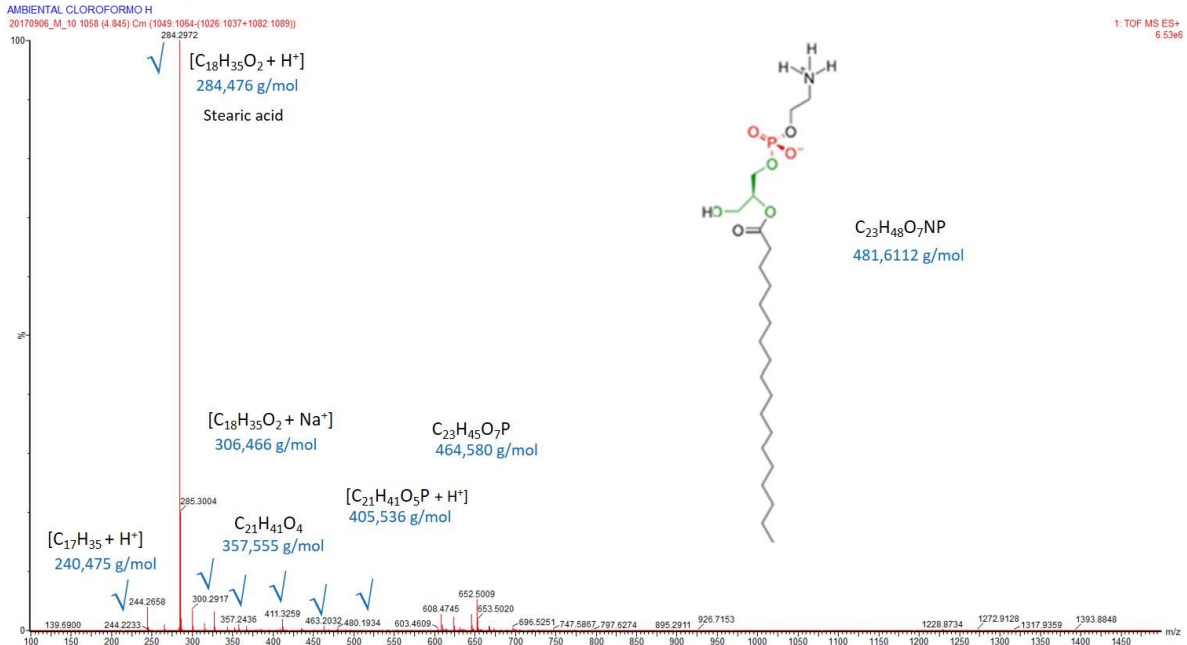


Figura Anexo 43. Espectro MS/MS para un Rt = 4,85 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 6,83

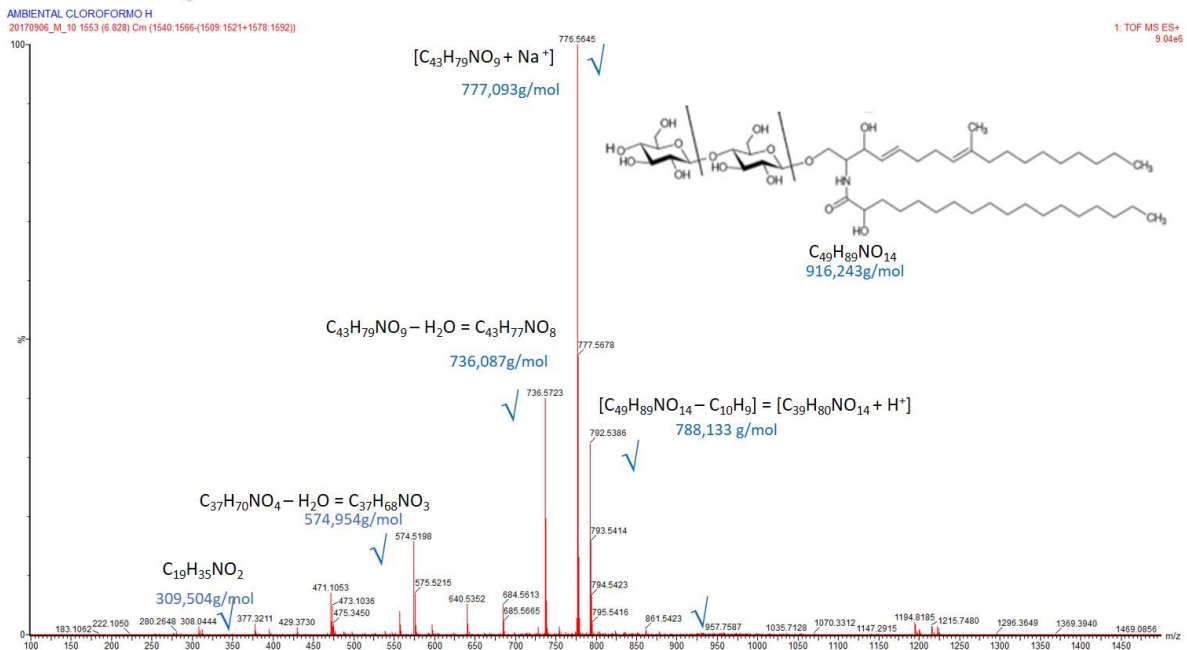


Figura Anexo 44. Espectro MS/MS para un Rt = 6,83 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 8,15

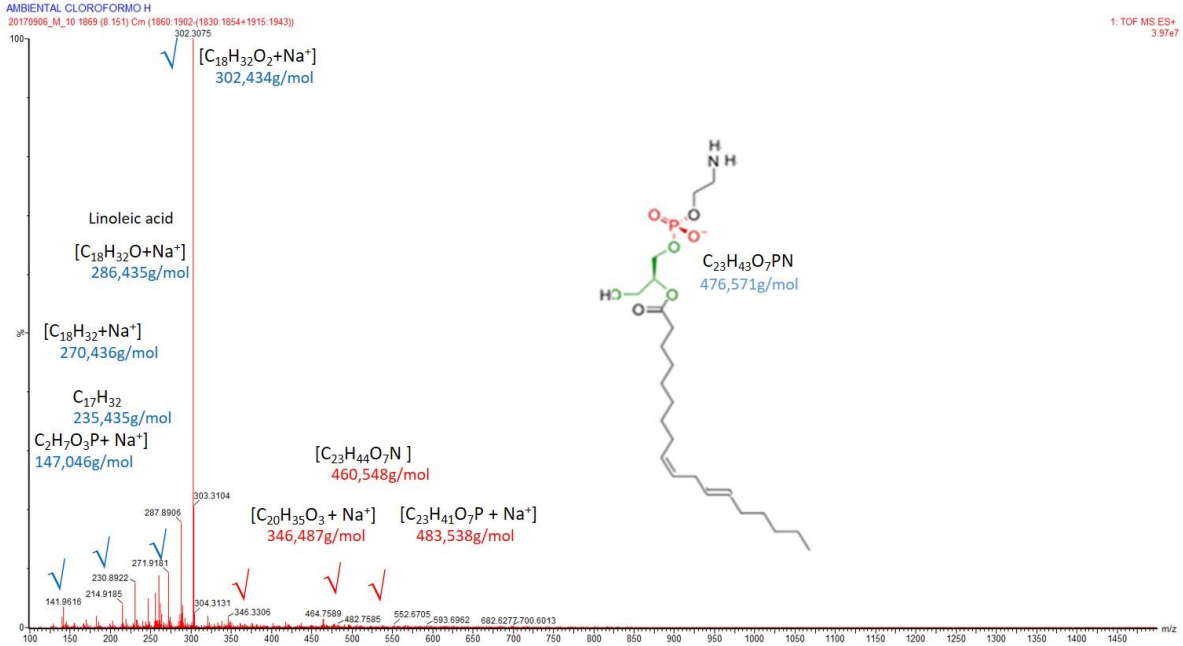


Figura Anexo 45. Espectro MS/MS para un Rt = 8,15 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 0,62

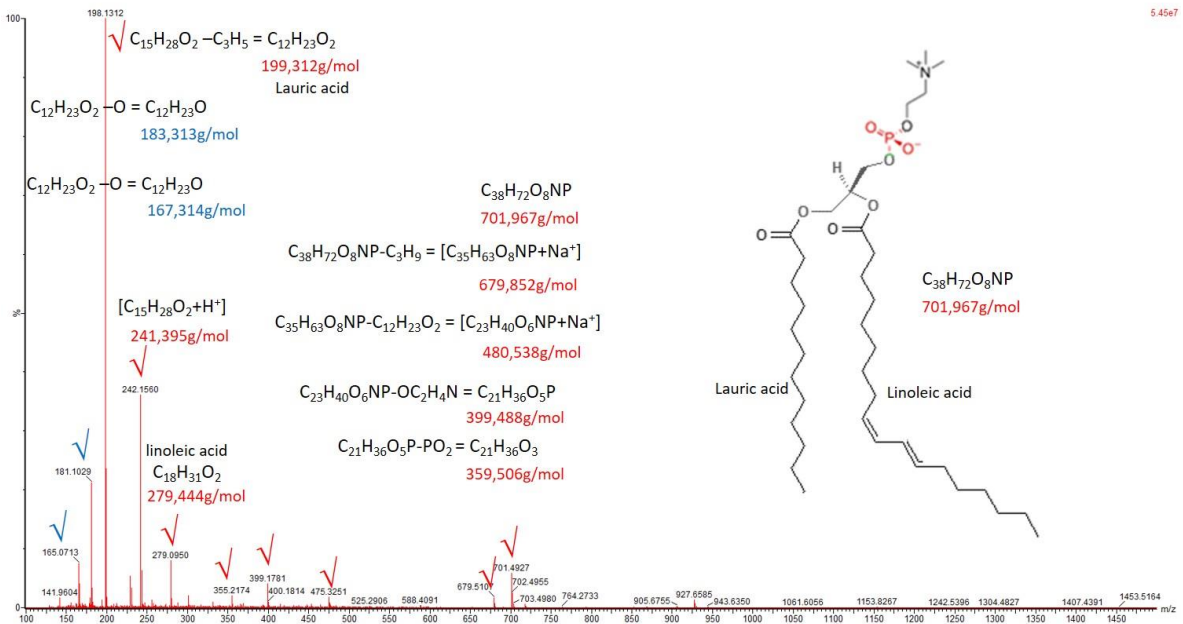


Figura Anexo 46. Espectro MS/MS para un Rt = 0,62 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 0,66

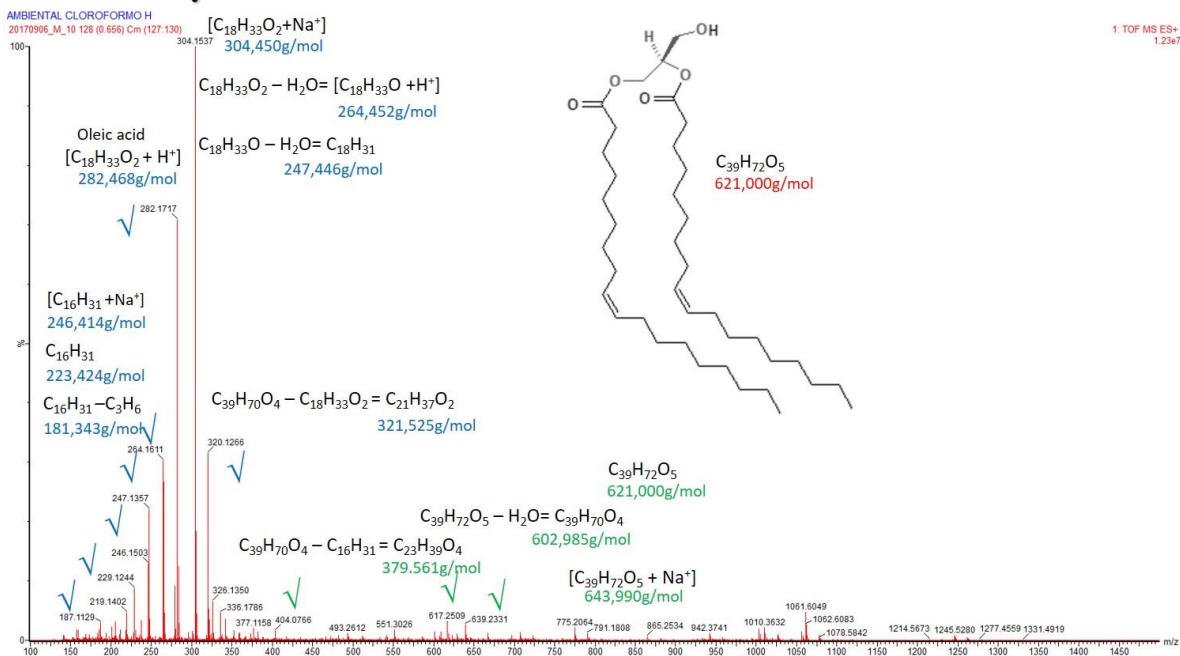


Figura Anexo 47. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 1,11

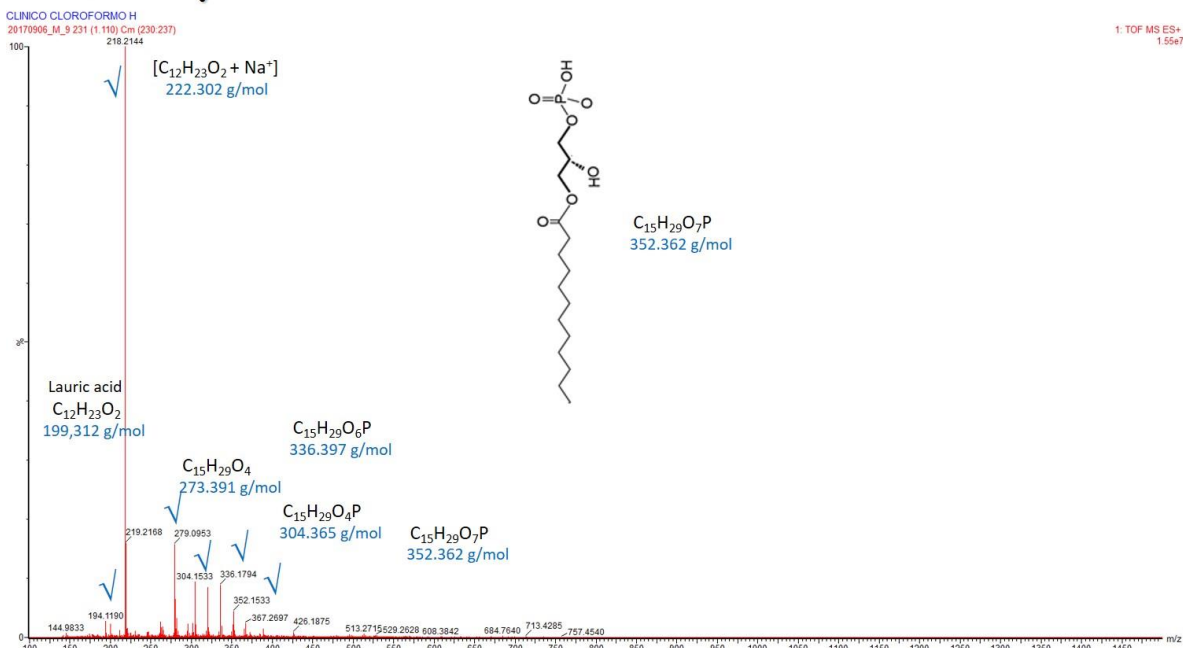


Figura Anexo 48. Espectro MS/MS para un Rt = 1,11 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

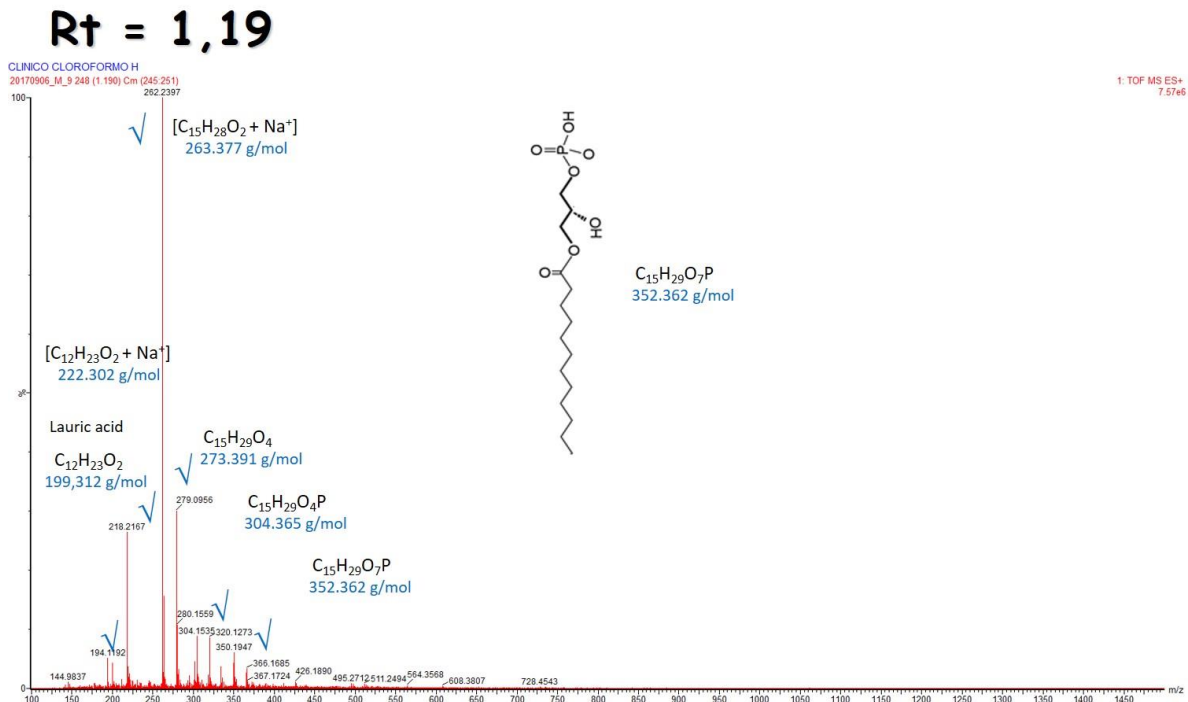


Figura Anexo 49. Espectro MS/MS para un Rt = 1,19 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

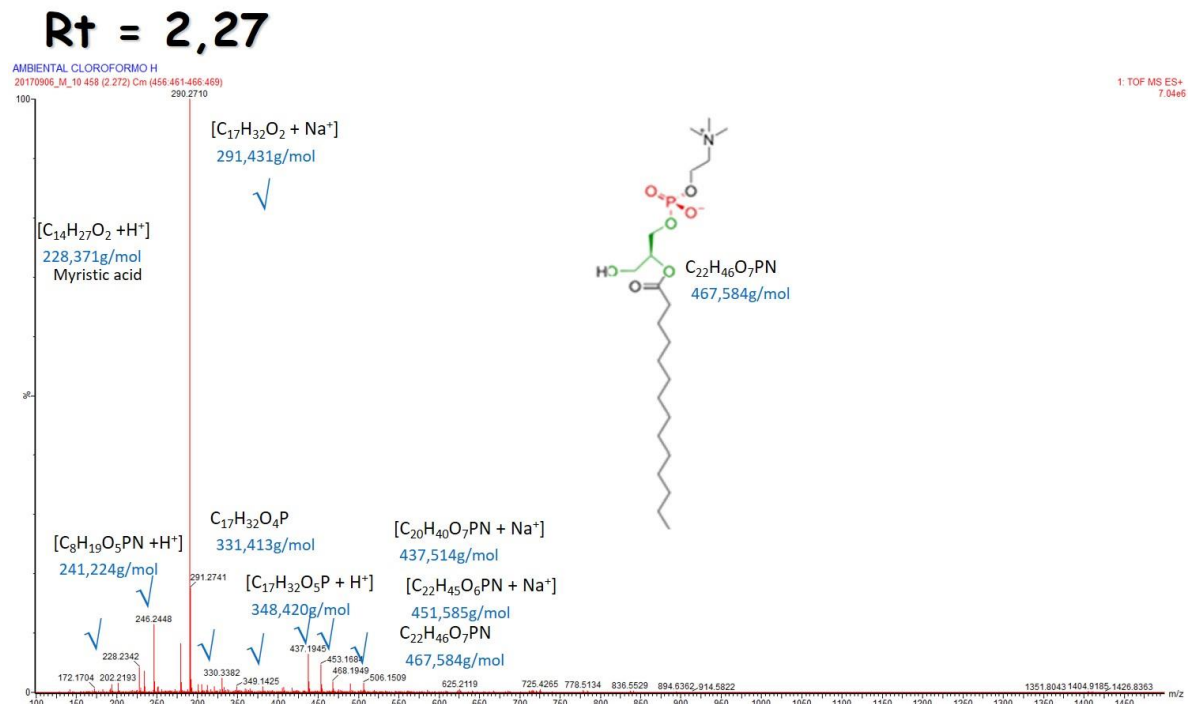


Figura Anexo 50. Espectro MS/MS para un Rt = 2,27 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 2,81

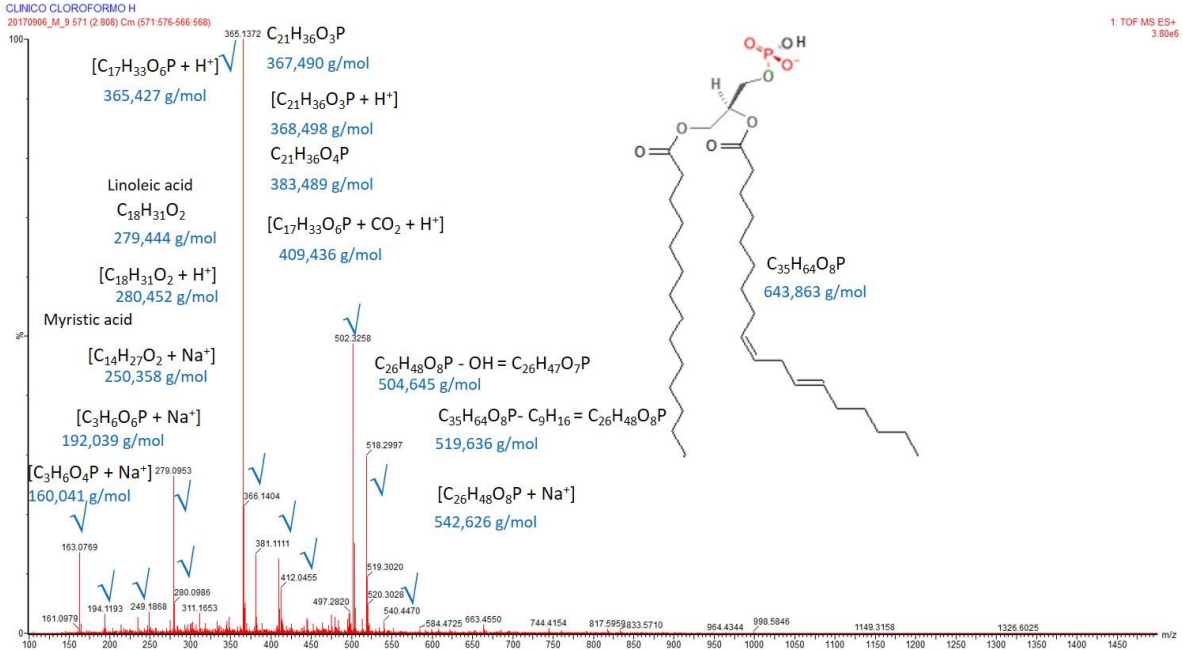


Figura Anexo 51. Espectro MS/MS para un Rt = 2,81 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 2,89

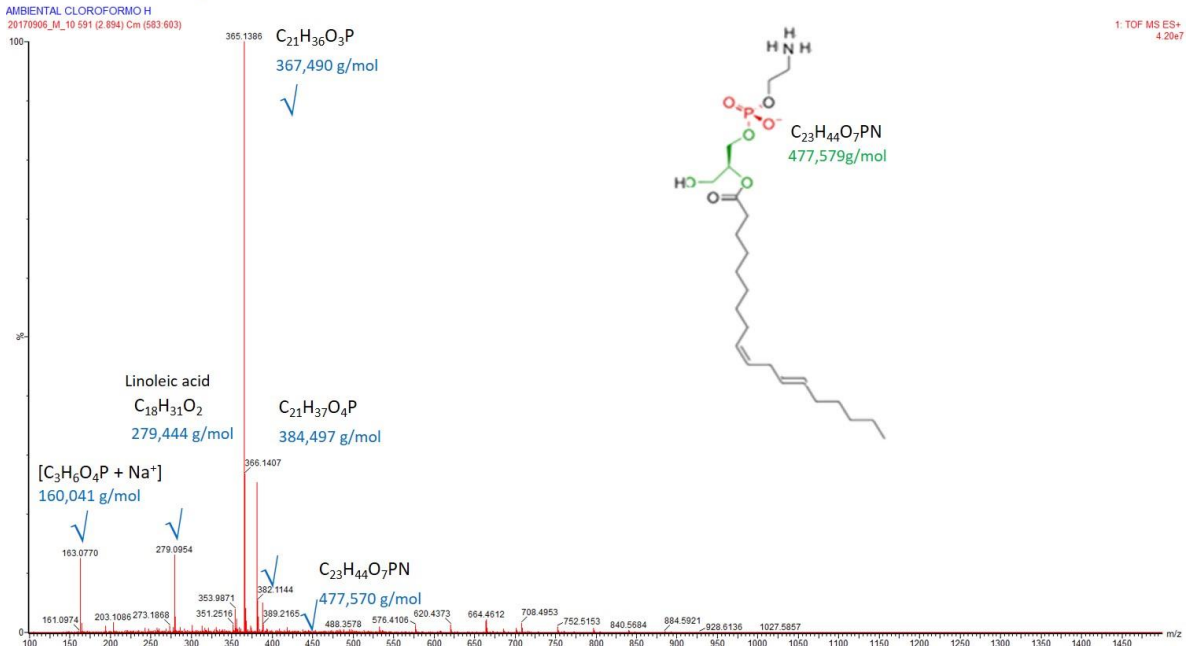


Figura Anexo 52. Espectro MS/MS para un Rt = 2,89 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 3,17

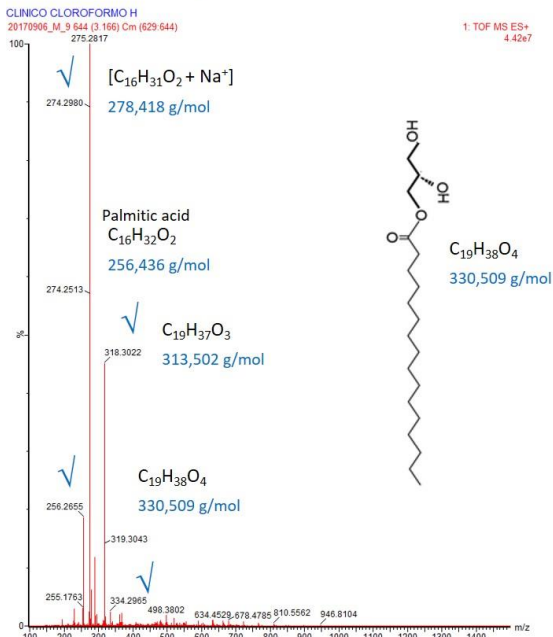


Figura Anexo 53. Espectro MS/MS para un Rt = 3,17 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 3,18

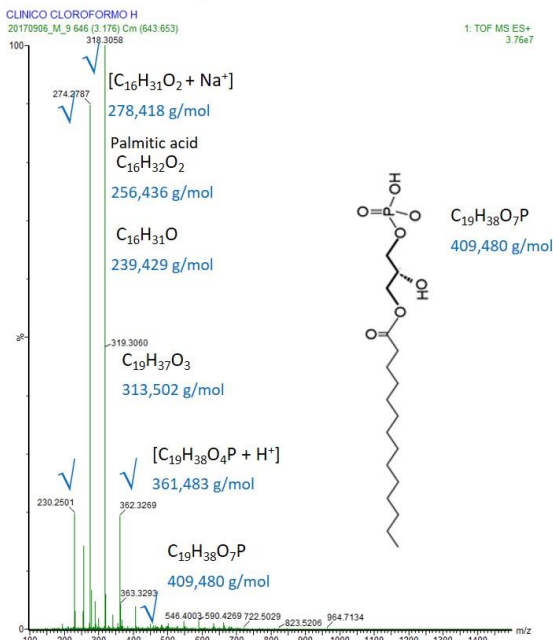


Figura Anexo 54. Espectro MS/MS para un Rt = 3,18 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

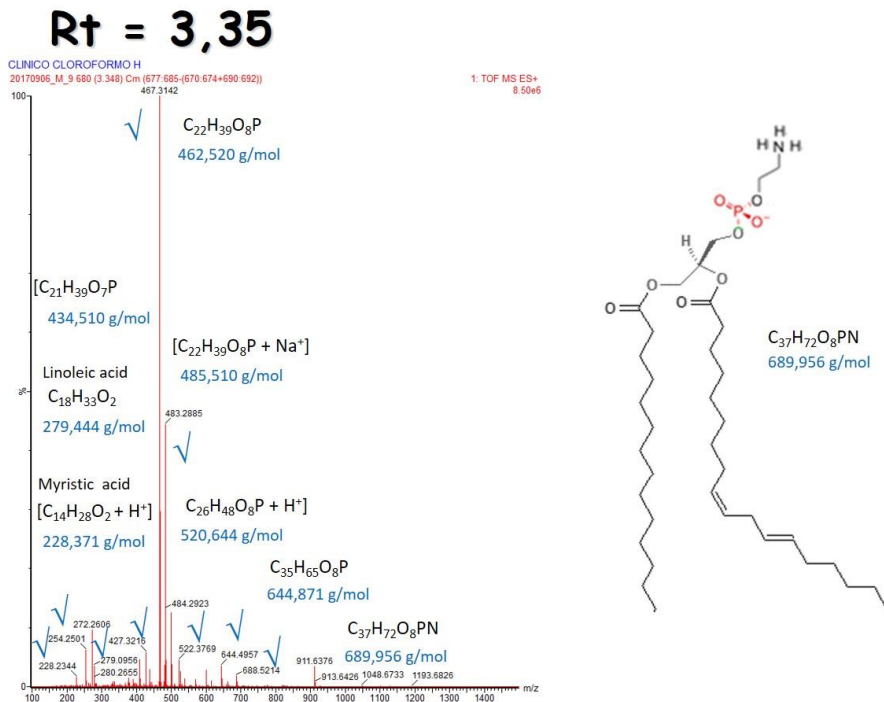


Figura Anexo 55. Espectro MS/MS para un Rt = 3,35 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

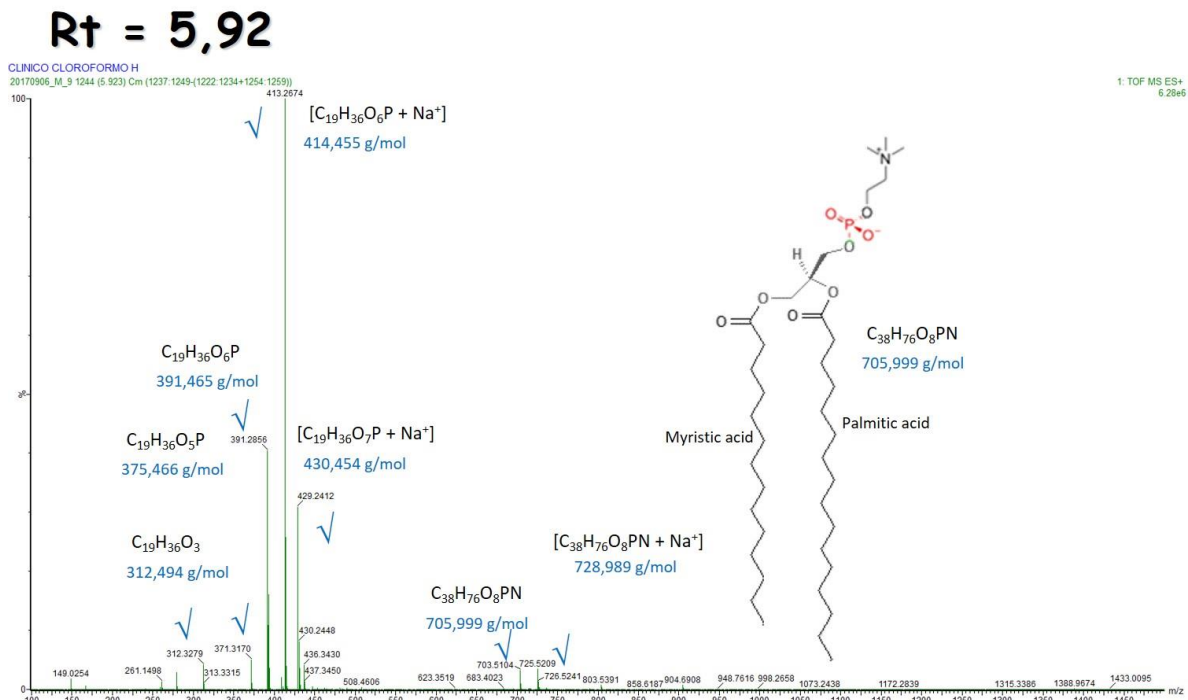


Figura Anexo 56. Espectro MS/MS para un Rt = 5,92 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

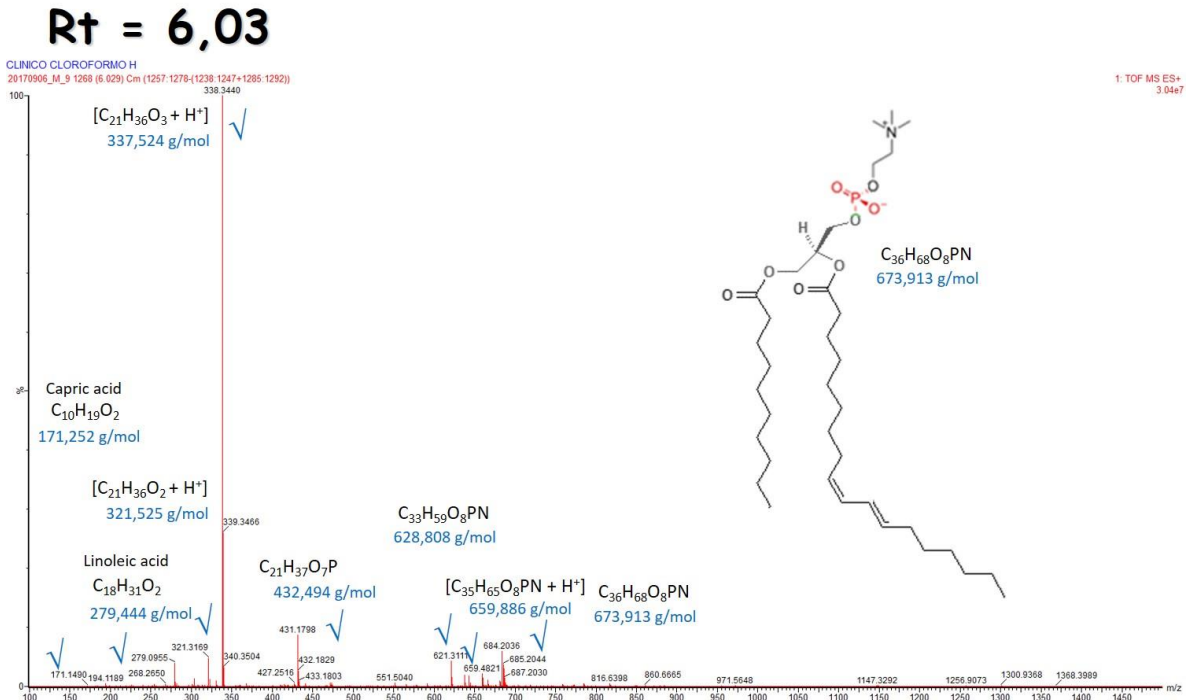


Figura Anexo 57. Espectro MS/MS para un Rt = 6,03 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

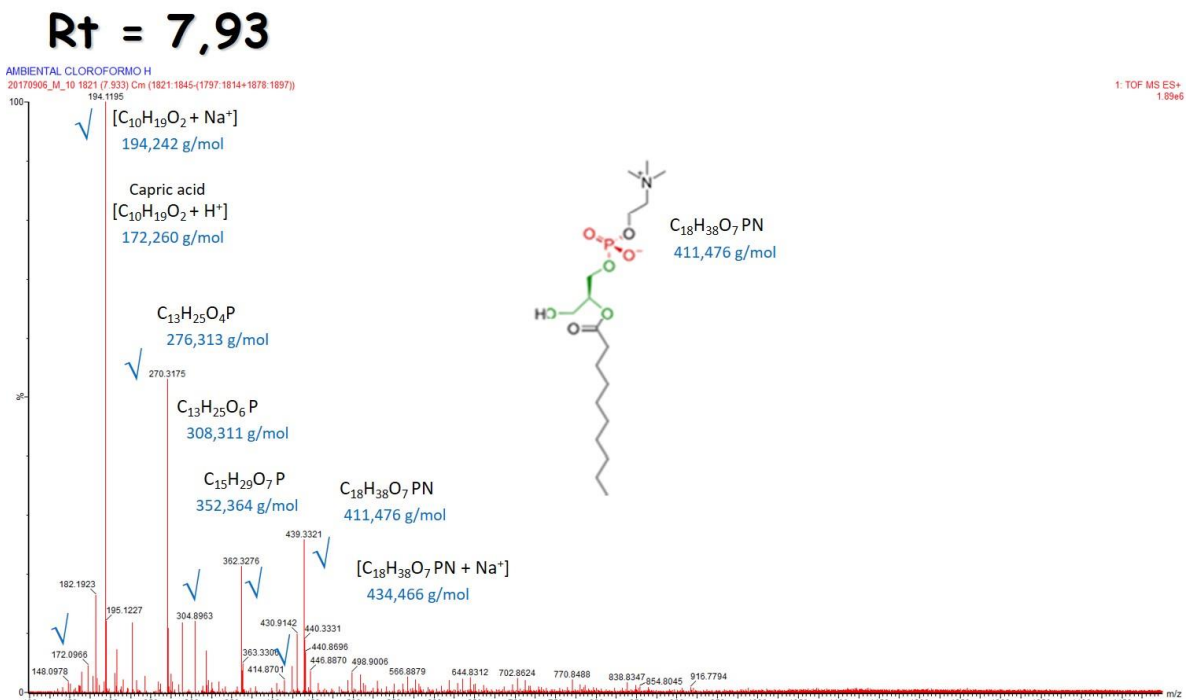


Figura Anexo 58. Espectro MS/MS para un Rt = 7,93 fracción cloroformo de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.5 Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

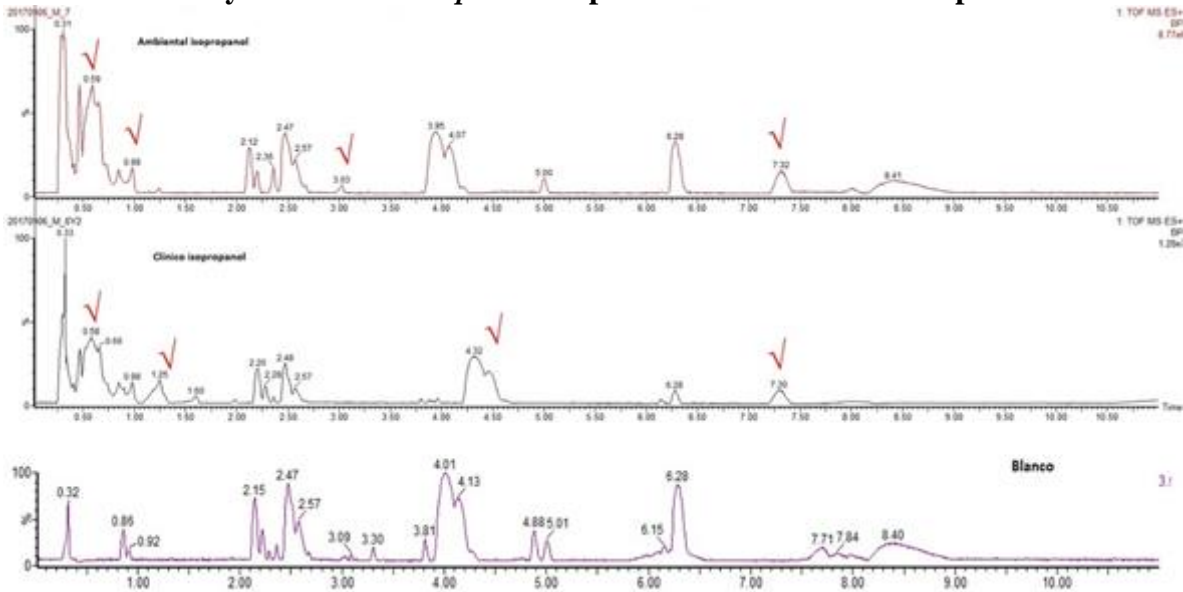


Figura Anexo 59. Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

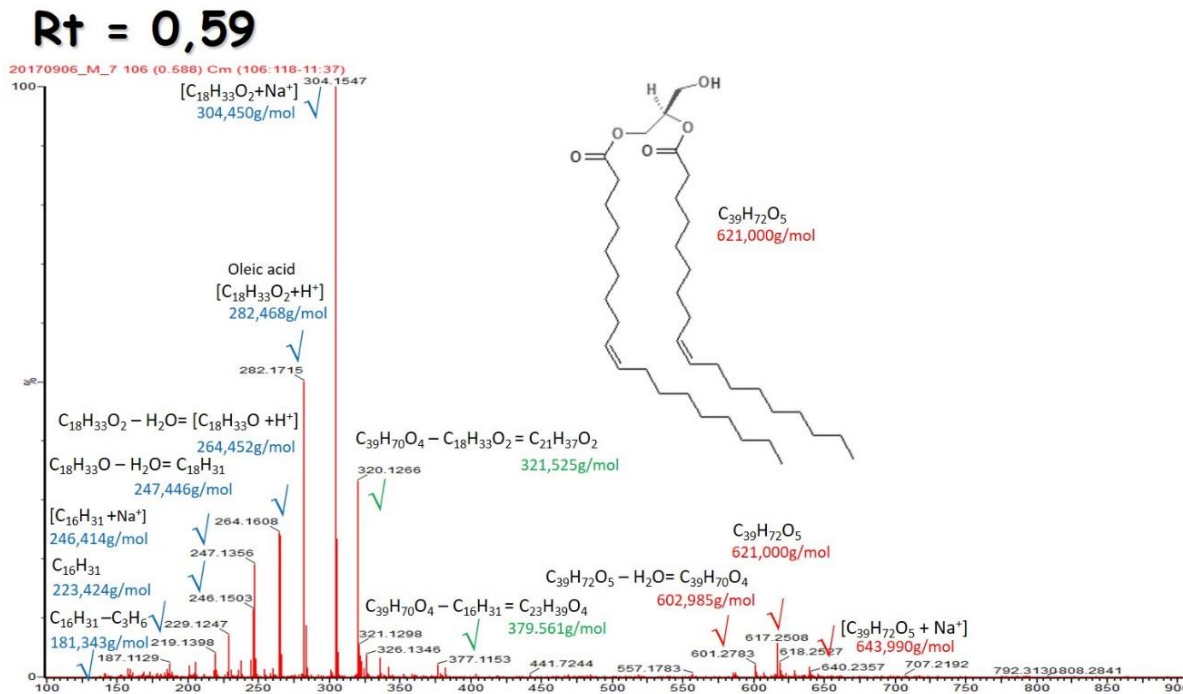


Figura Anexo 60. Espectro MS/MS para un Rt = 0,59 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 0,98

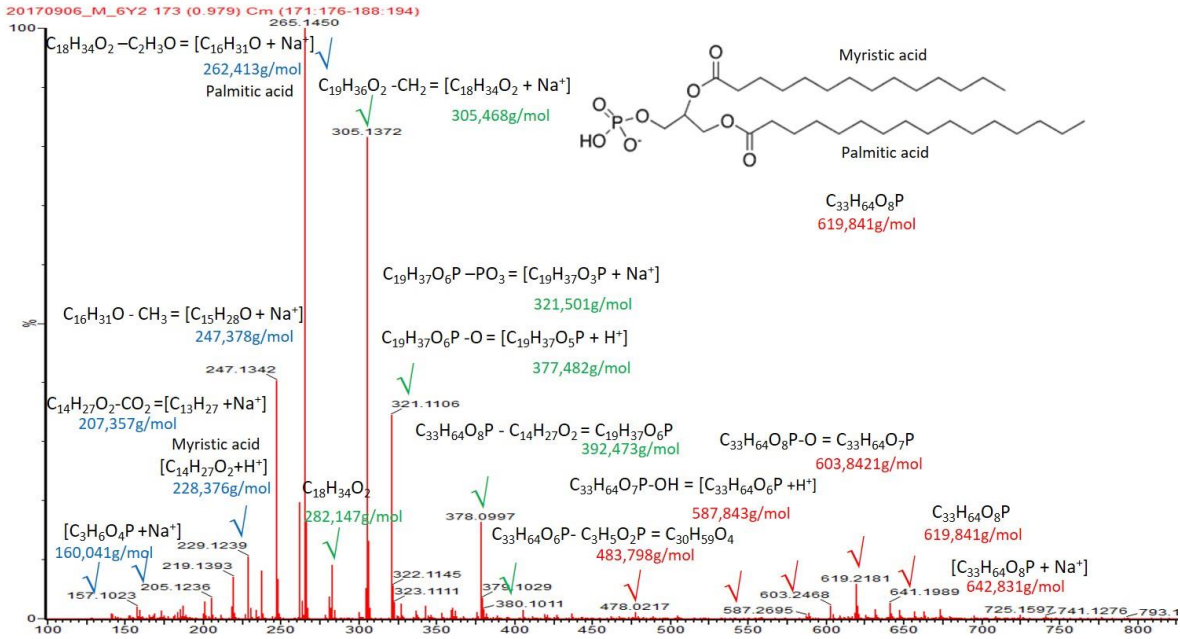


Figura Anexo 61. Espectro MS/MS para un Rt = 0,98 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 3,03

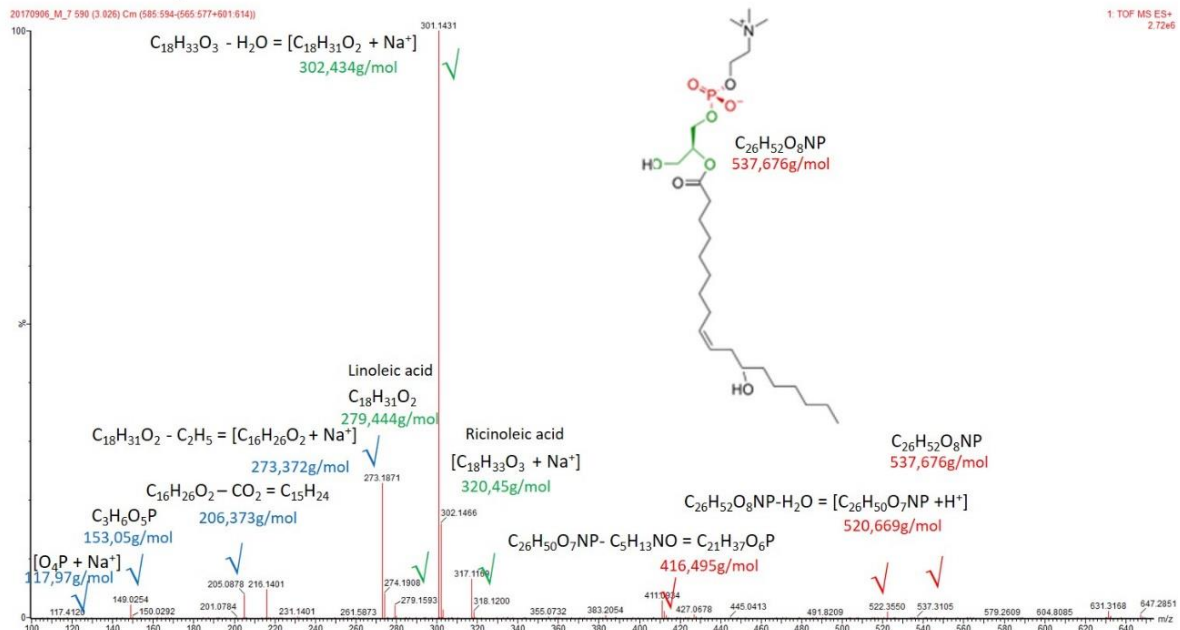


Figura Anexo 62. Espectro MS/MS para un Rt = 3,03 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

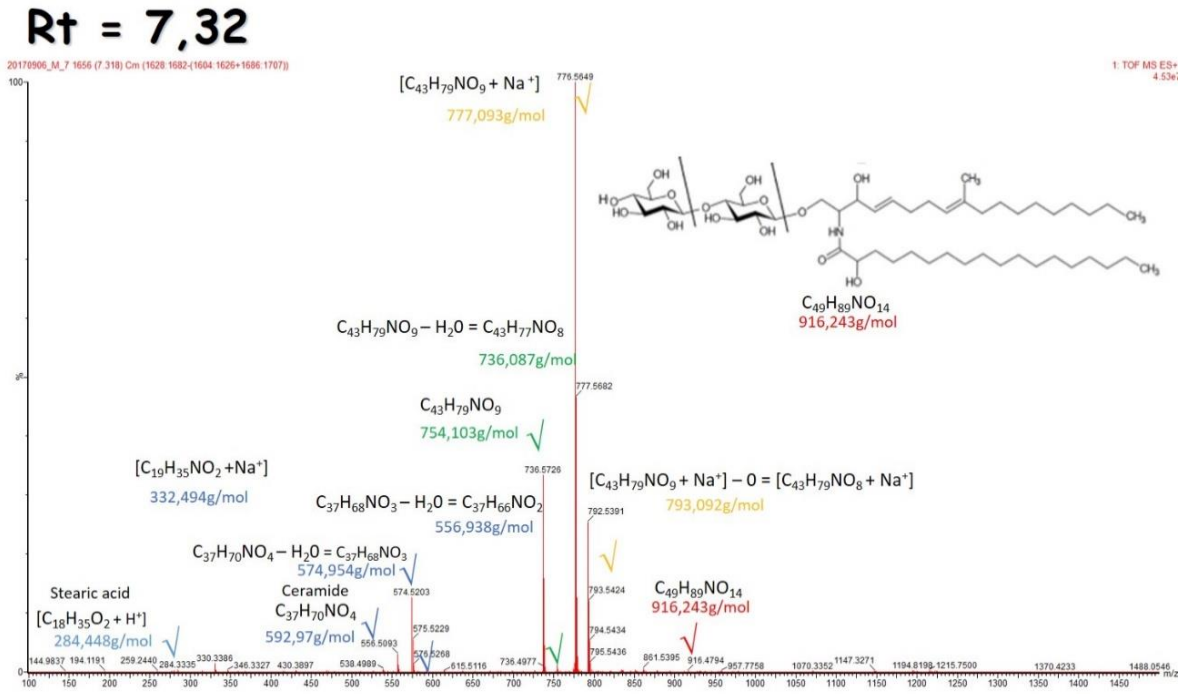


Figura Anexo 63. Espectro MS/MS para un Rt = 7,32 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

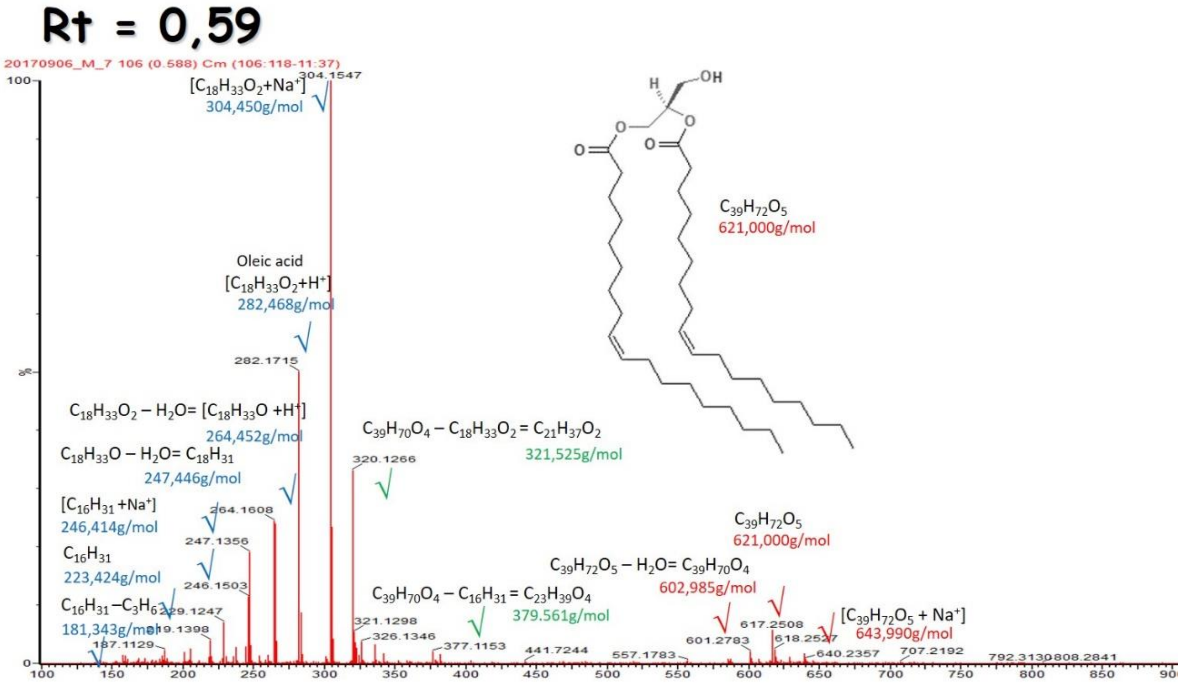


Figura Anexo 64. Espectro MS/MS para un Rt = 0,59 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

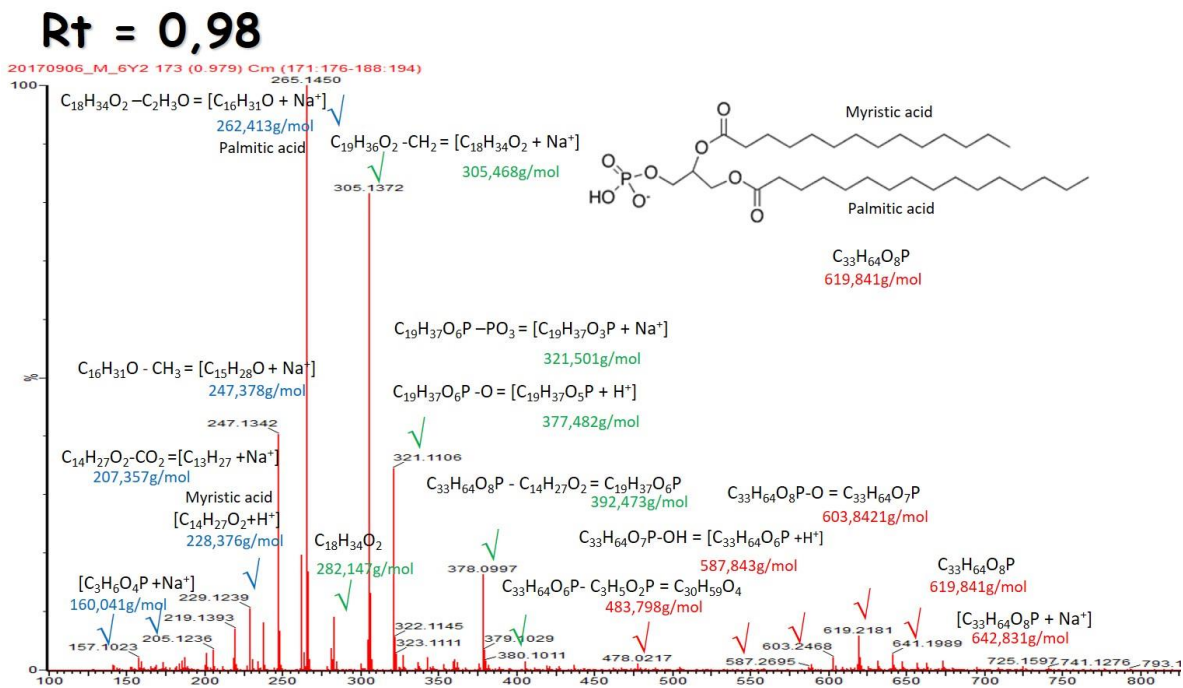


Figura Anexo 65. Espectro MS/MS para un Rt = 0,98 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

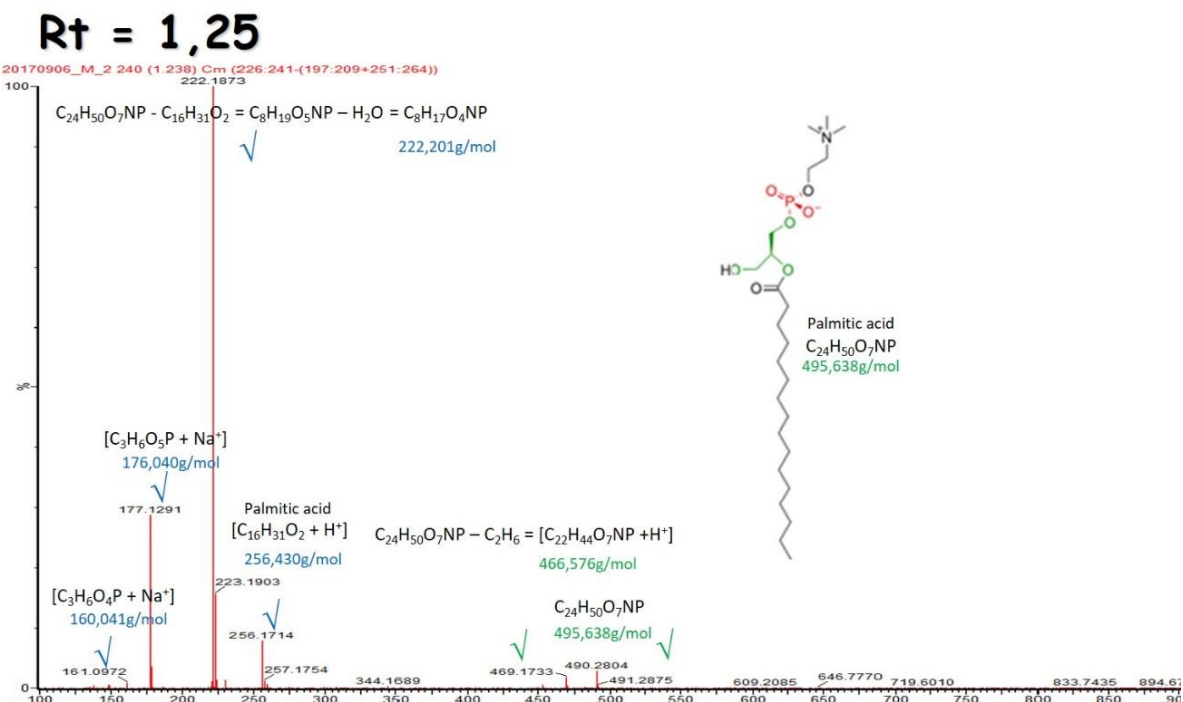


Figura Anexo 66. Espectro MS/MS para un Rt = 1,25 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 4,46

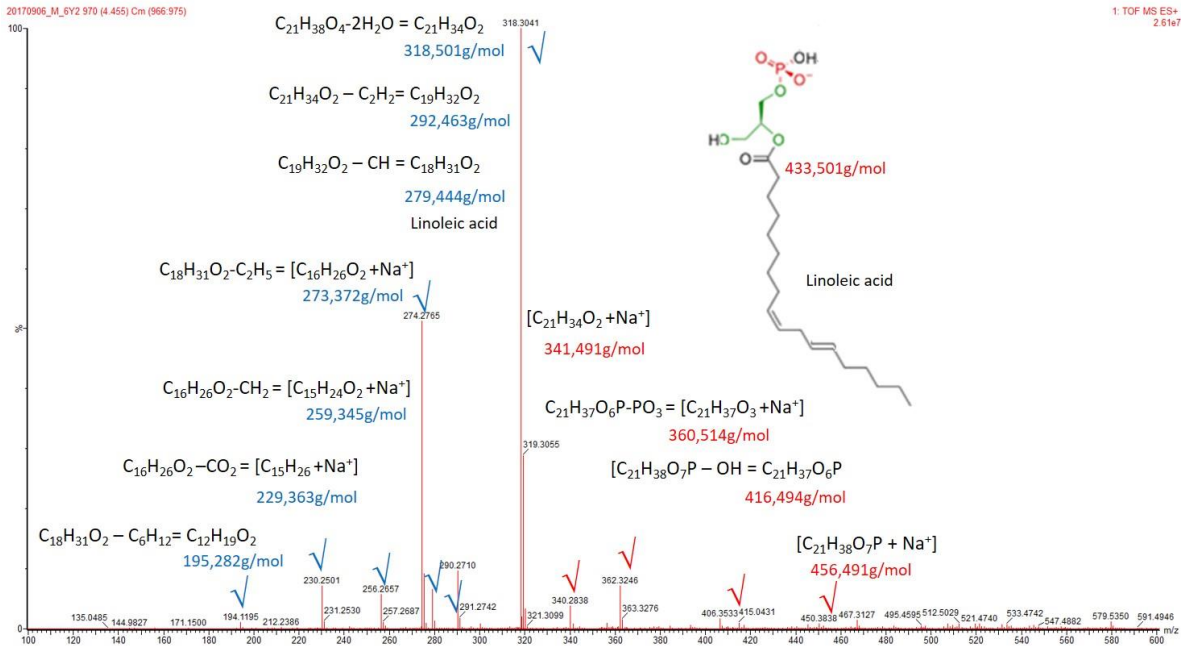


Figura Anexo 67. Espectro MS/MS para un Rt = 4,46 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 7,32

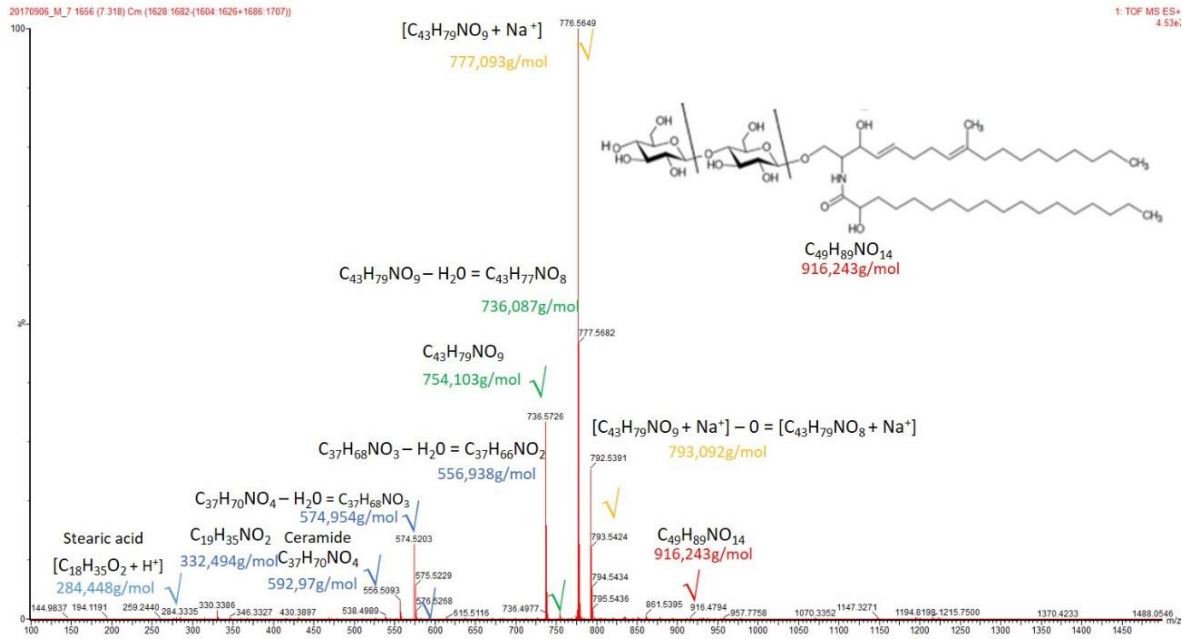


Figura Anexo 68. Espectro MS/MS para un Rt = 7,32 fracción isopropanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.6 Análisis fracción metanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

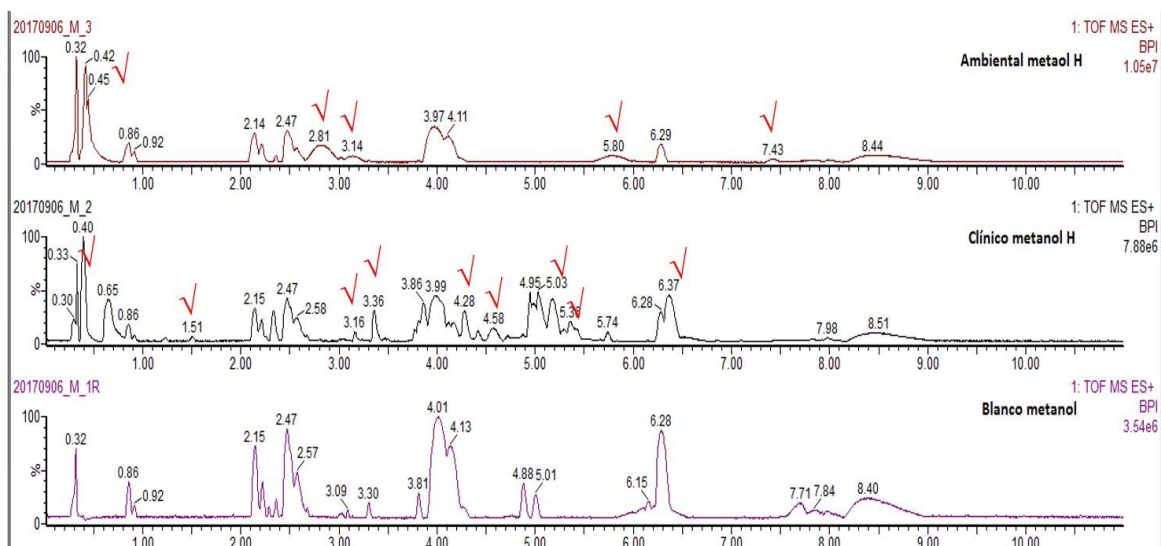


Figura Anexo 69. Análisis fracción metanol de extracto lipídico de micelio de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

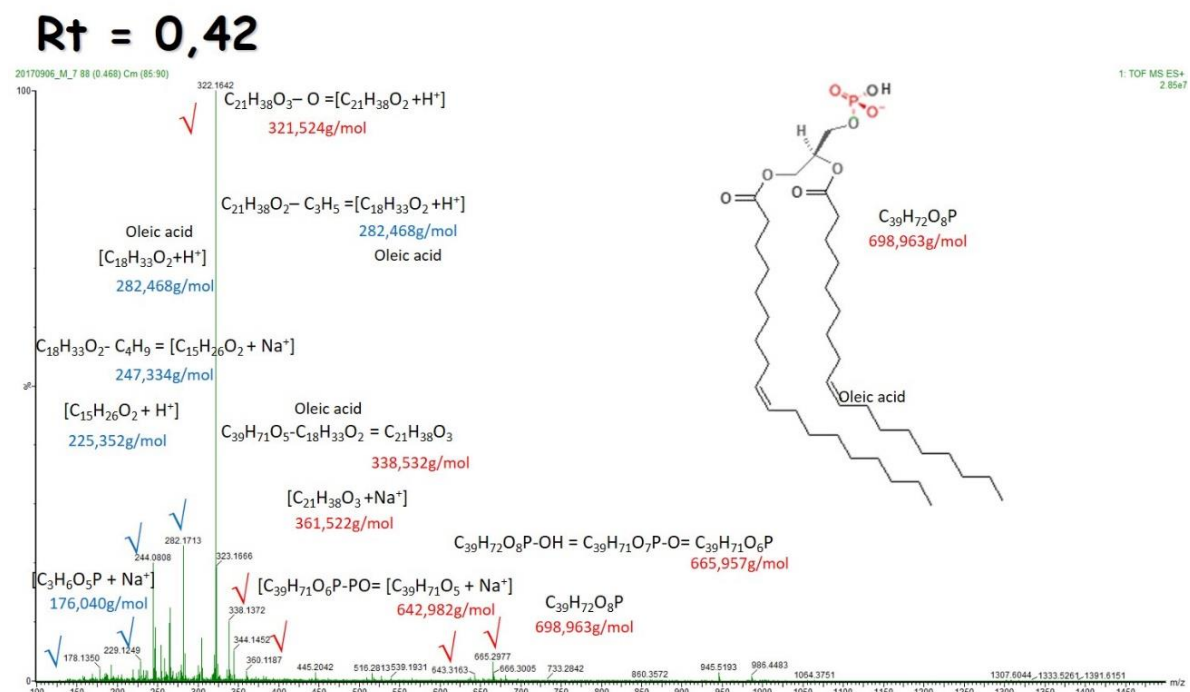


Figura Anexo 70. Espectro MS/MS para un Rt = 0,42 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 2,81

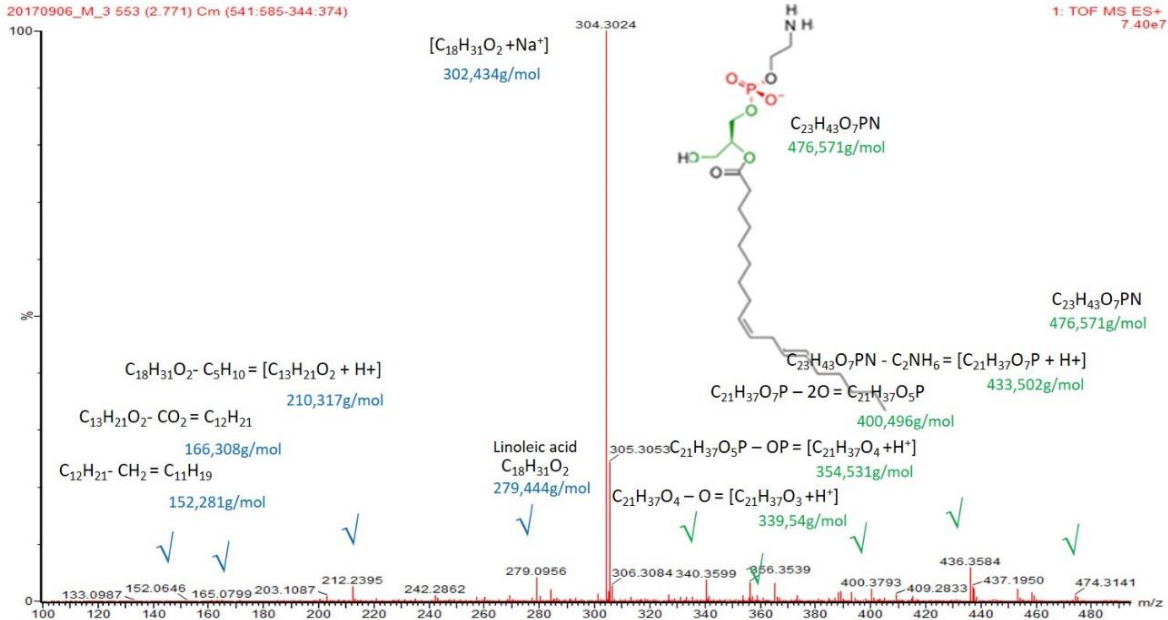


Figura Anexo 71. Espectro MS/MS para un Rt = 2,81 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 3,14

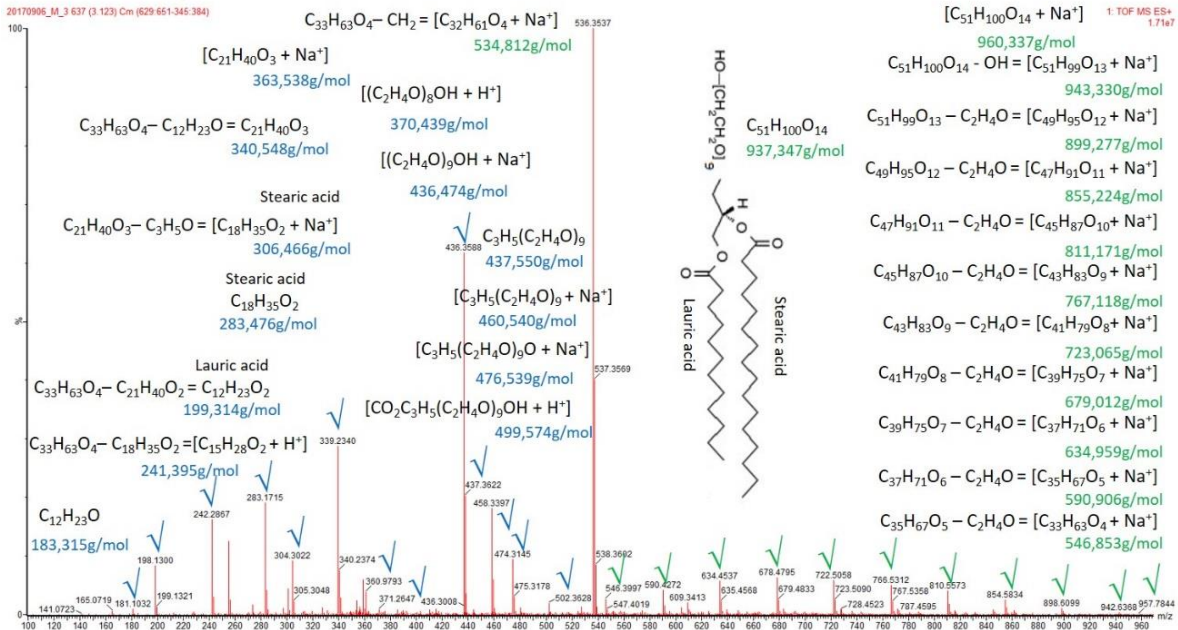


Figura Anexo 72. Espectro MS/MS para un Rt = 3,14 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 5,80

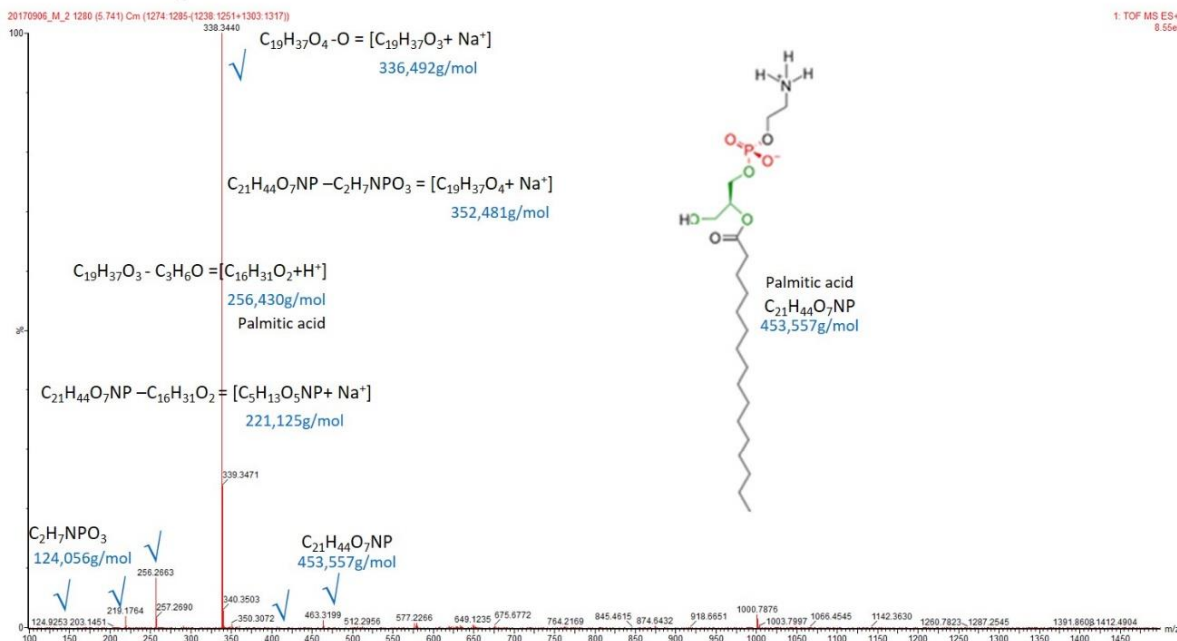


Figura Anexo 73. Espectro MS/MS para un Rt = 5,80 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 7,43

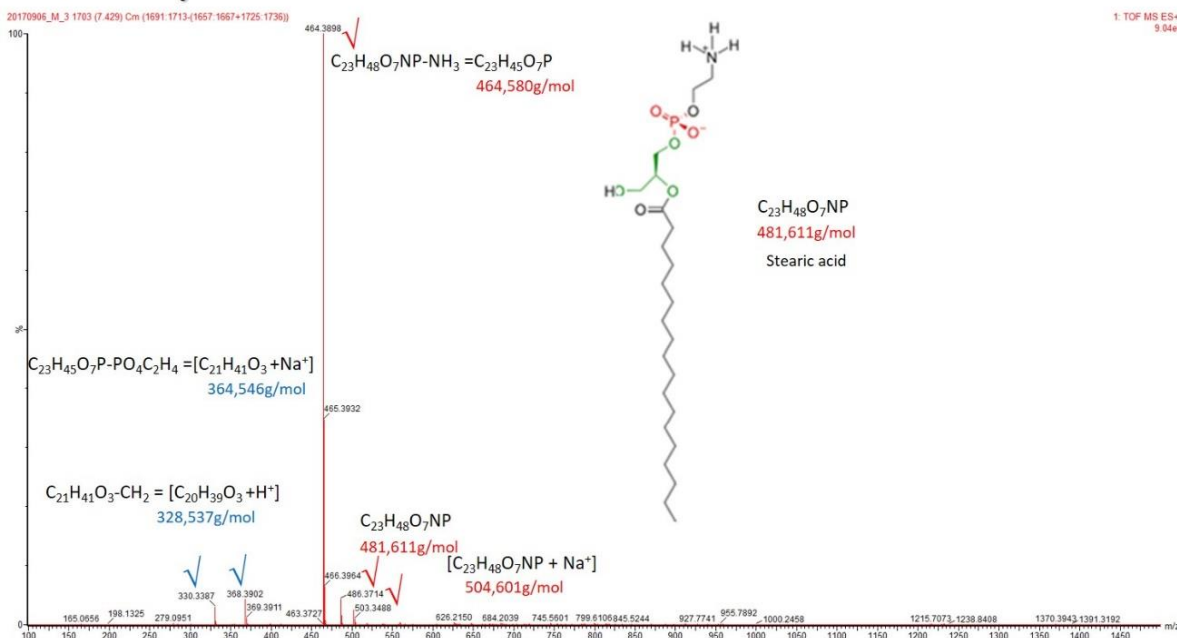


Figura Anexo 74. Espectro MS/MS para un Rt = 7,43 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

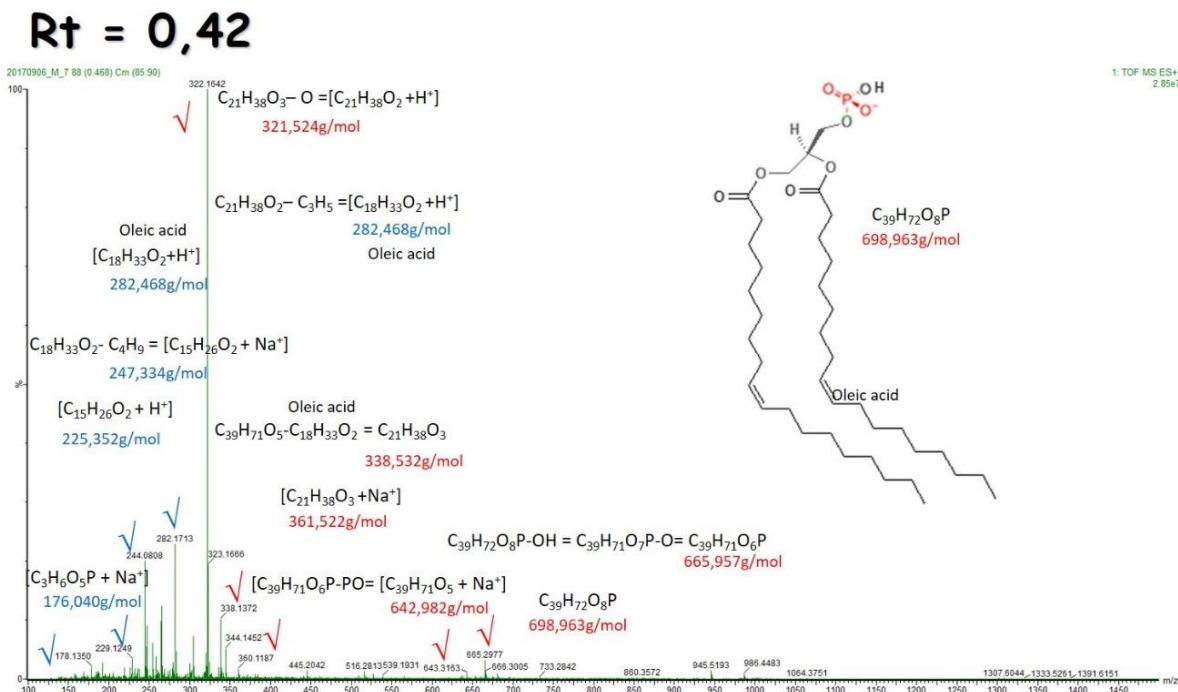


Figura Anexo 75. Espectro MS/MS para un Rt = 0,42 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

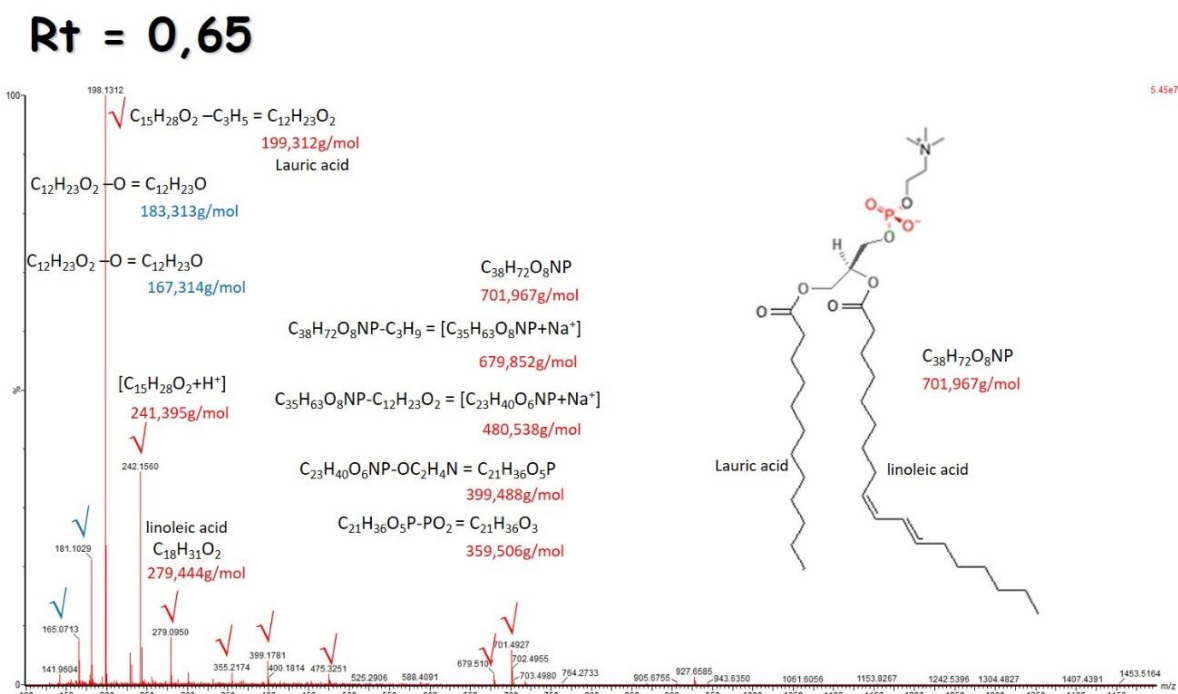


Figura Anexo 76. Espectro MS/MS para un Rt = 0,65 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 1,51

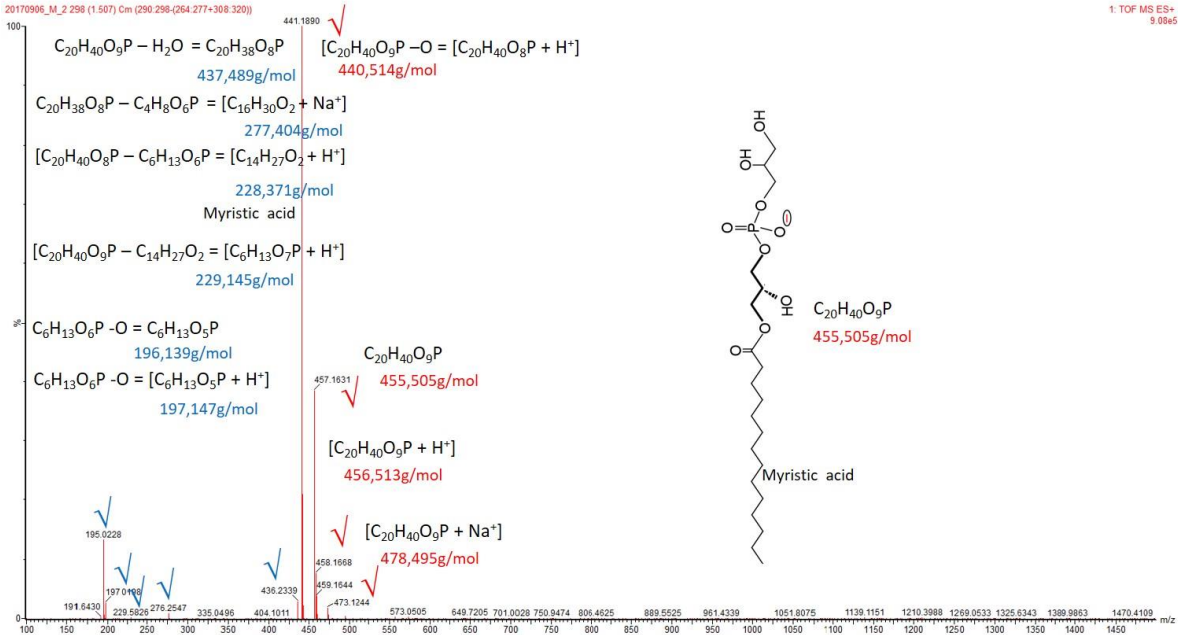


Figura Anexo 77. Espectro MS/MS para un Rt = 1,51 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 3,16

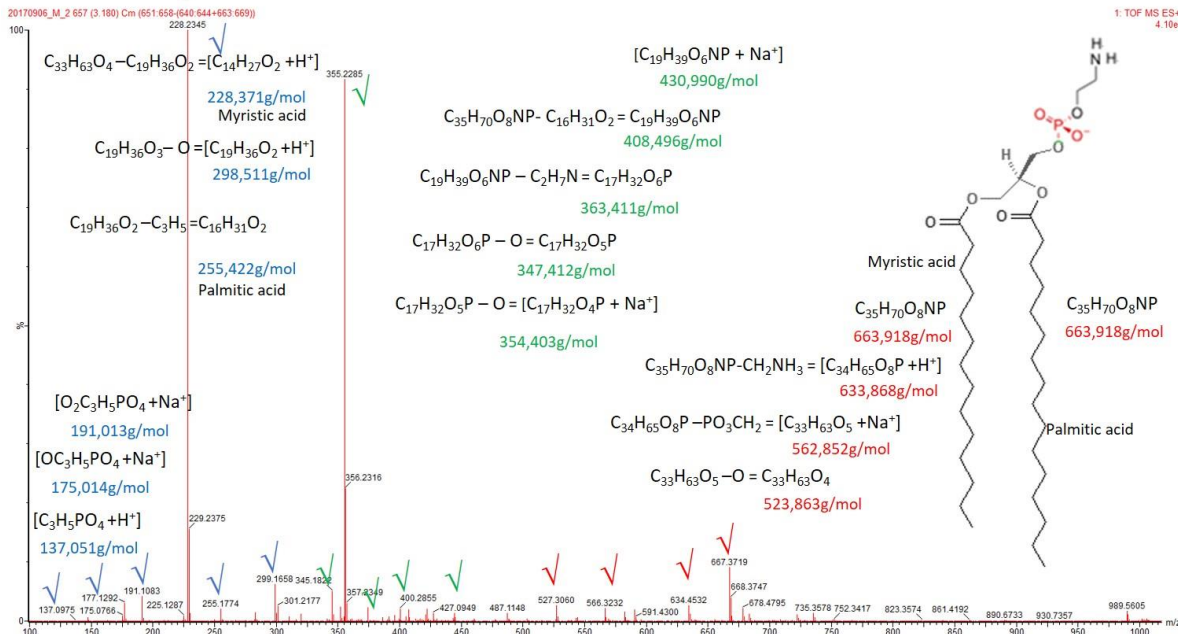


Figura Anexo 78. Espectro MS/MS para un Rt = 3,16 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

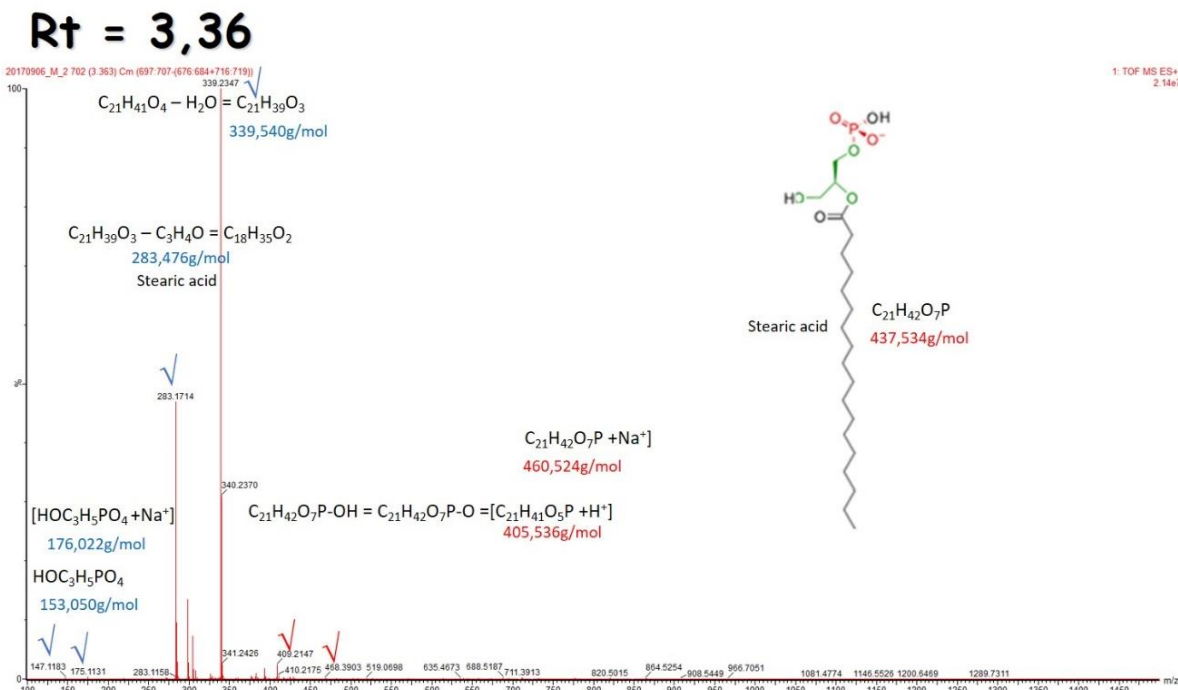


Figura Anexo 79. Espectro MS/MS para un Rt = 3,36 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

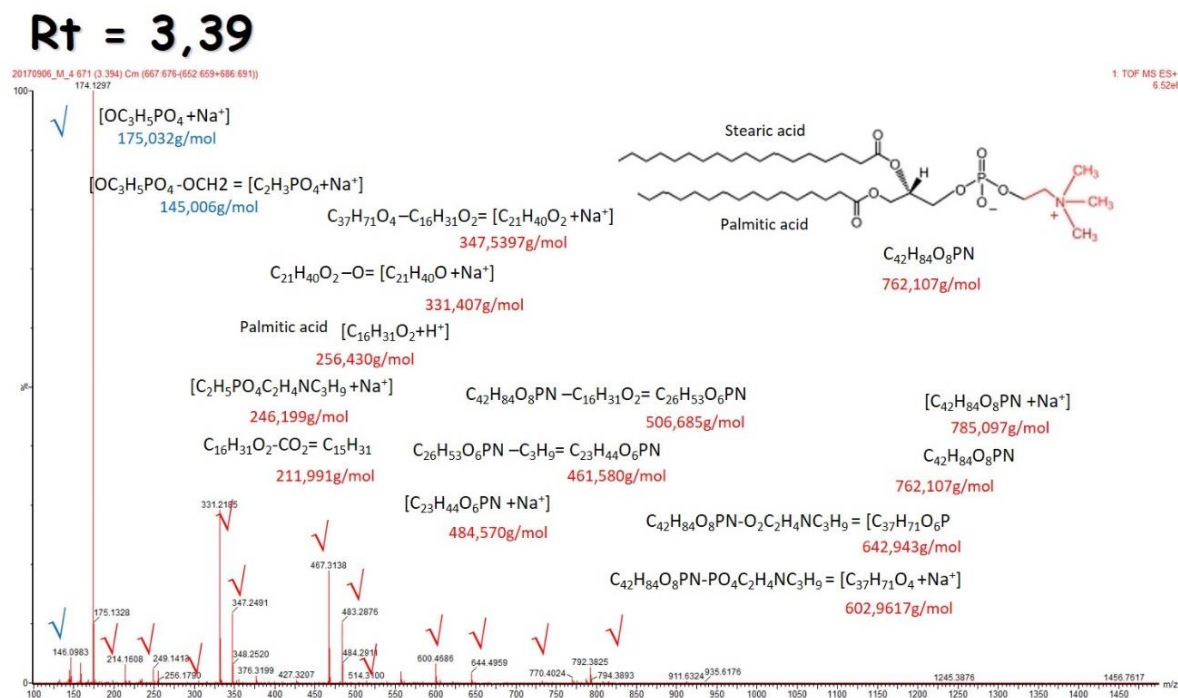


Figura Anexo 80. Espectro MS/MS para un Rt = 3,39 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 4,28

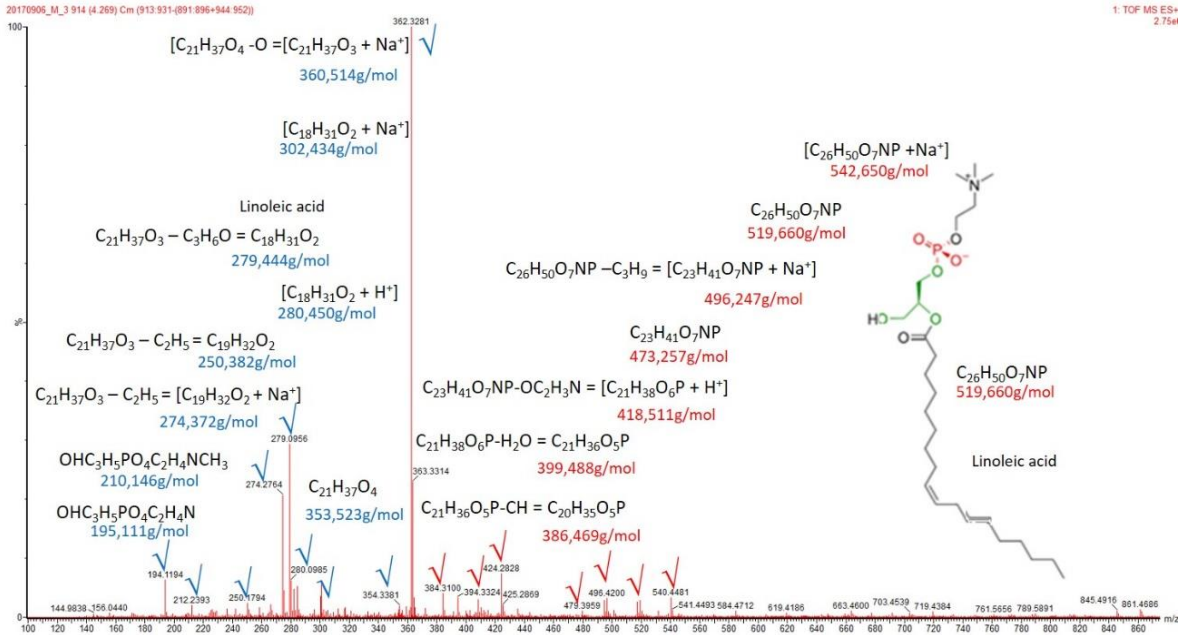


Figura Anexo 81. Espectro MS/MS para un Rt = 4,28 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 4,42

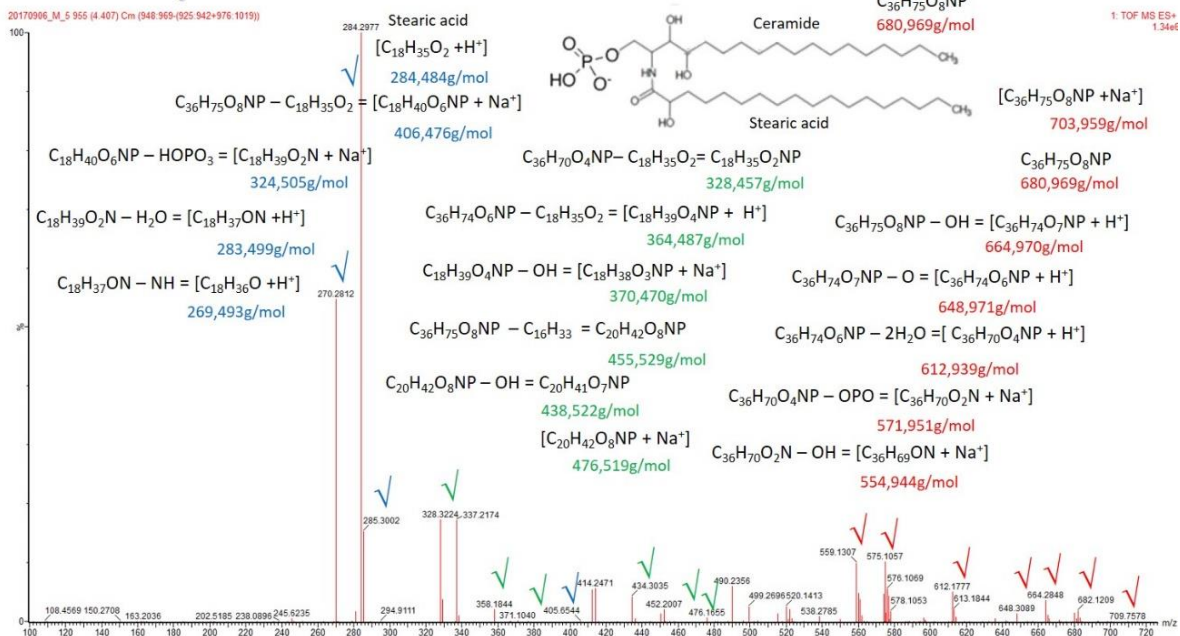


Figura Anexo 82. Espectro MS/MS para un Rt = 4,42 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

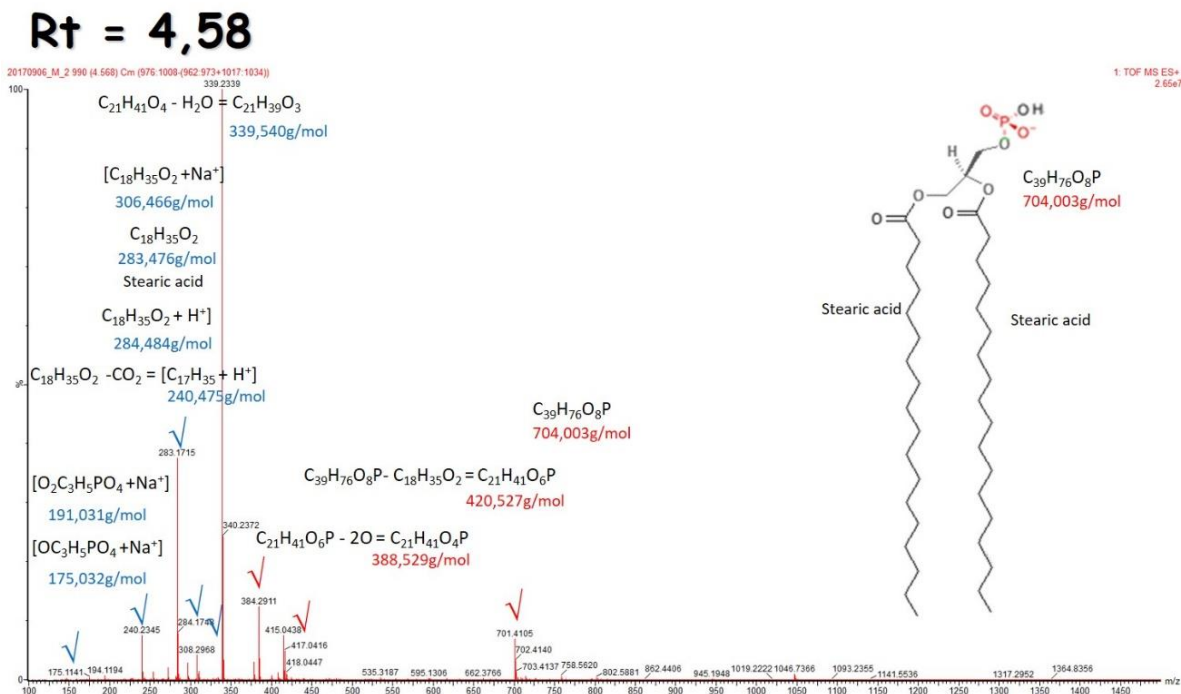


Figura Anexo 83. Espectro MS/MS para un Rt = 4,58 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

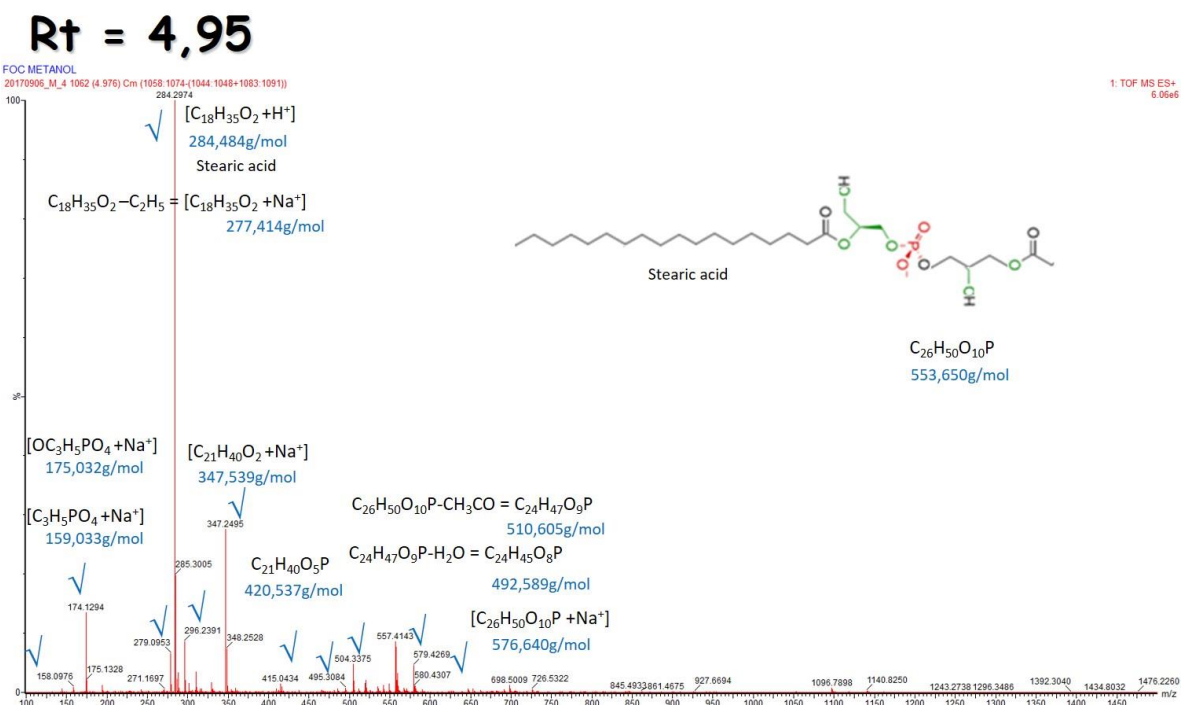


Figura Anexo 84. Espectro MS/MS para un Rt = 4,95 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 5,03

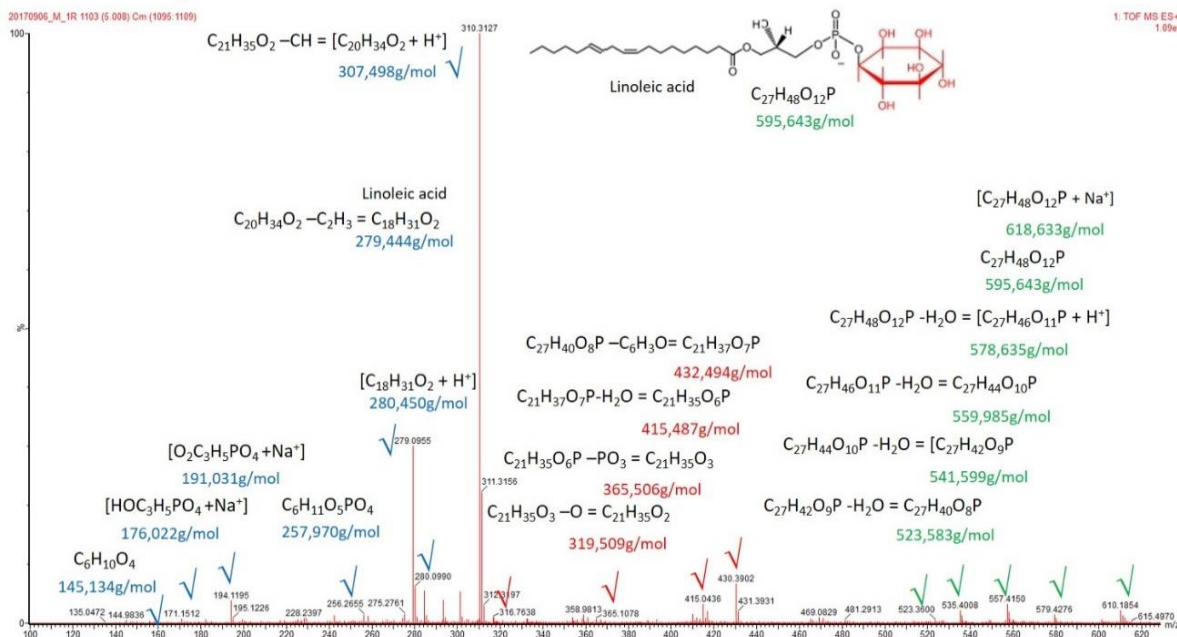


Figura Anexo 85. Espectro MS/MS para un Rt = 5,03 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 5,17

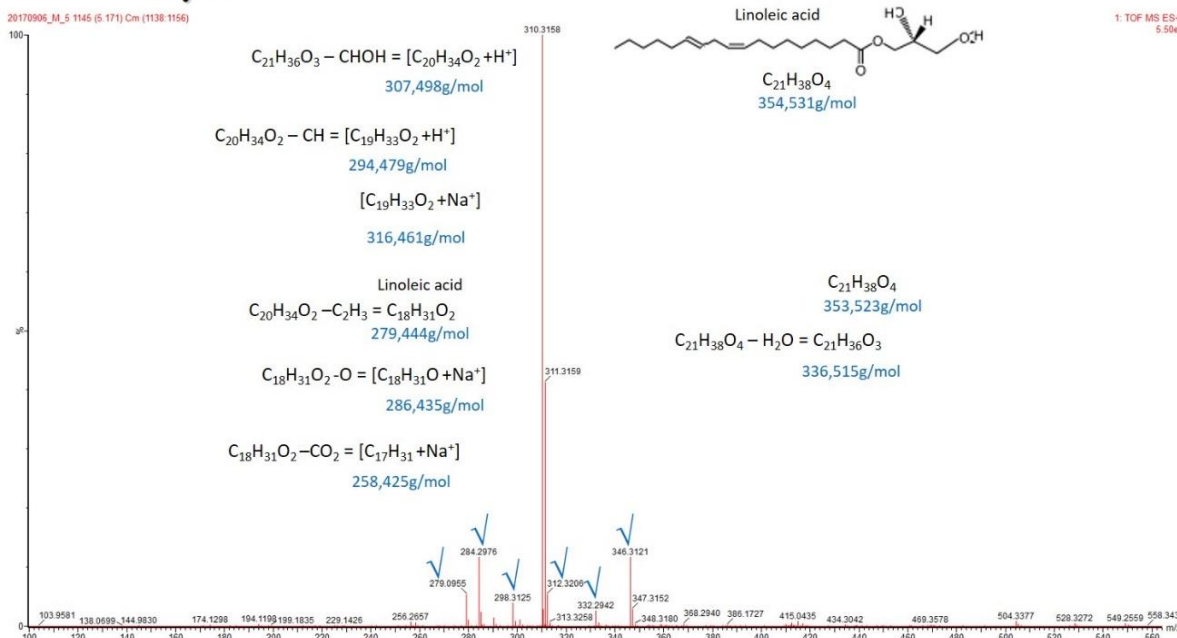


Figura Anexo 86. Espectro MS/MS para un Rt = 5,17 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 5,37

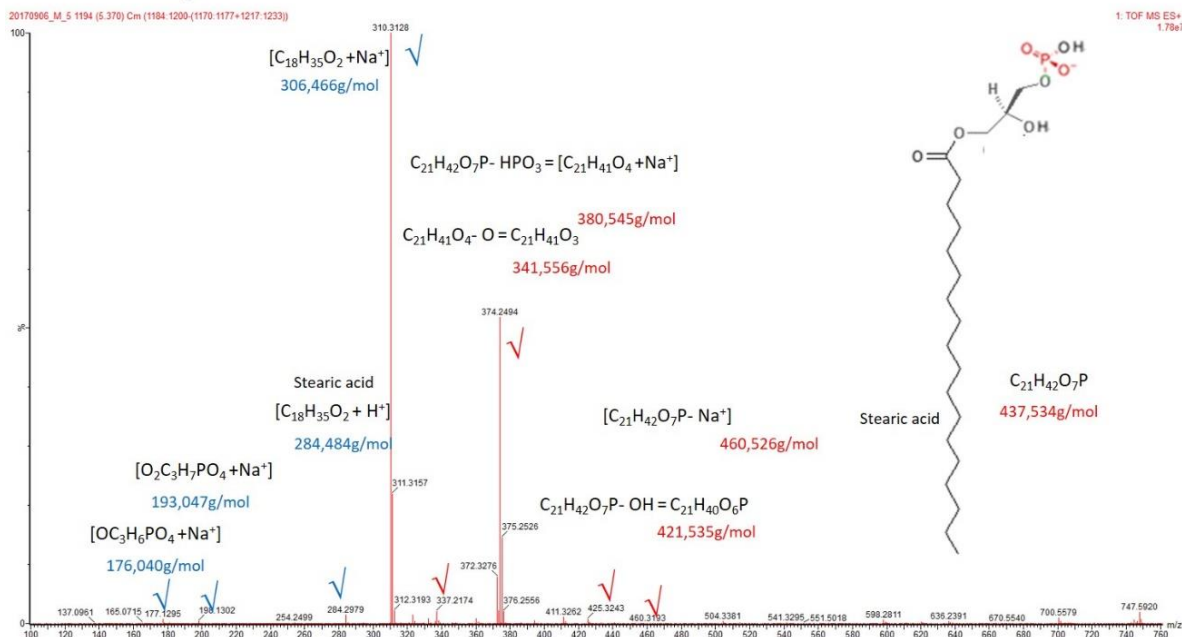


Figura Anexo 87. Espectro MS/MS para un Rt = 5,37 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 5,74 = 5,80

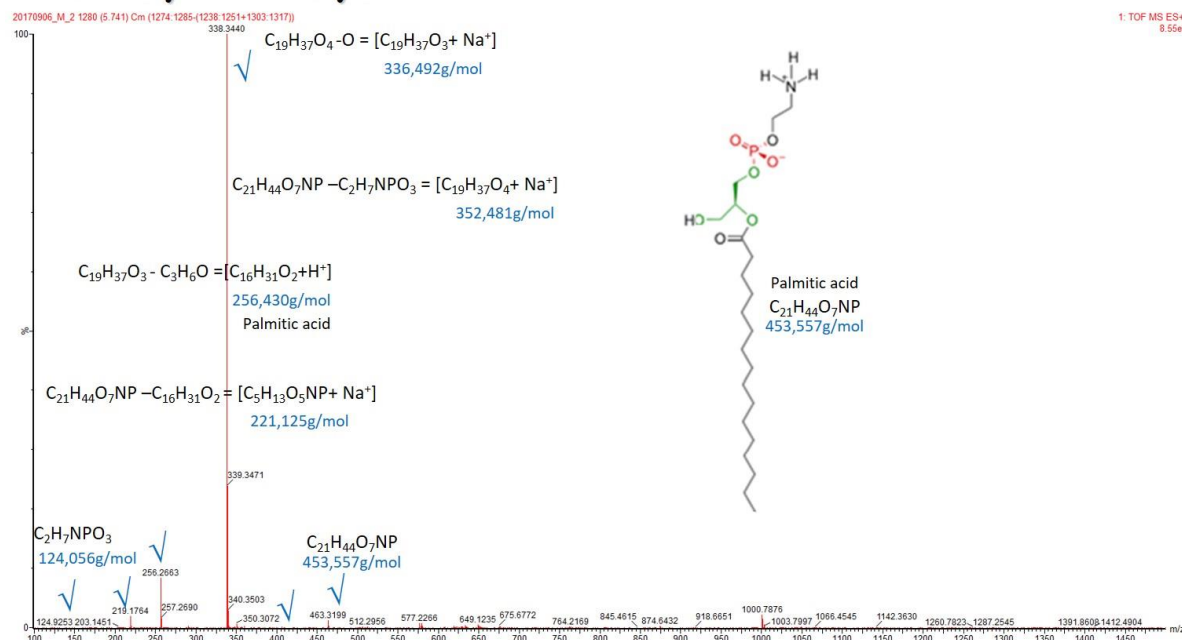


Figura Anexo 88. Espectro MS/MS para un Rt = 5,74 = 5,80 fracción metanol de extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.7 Análisis fracción hexano de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

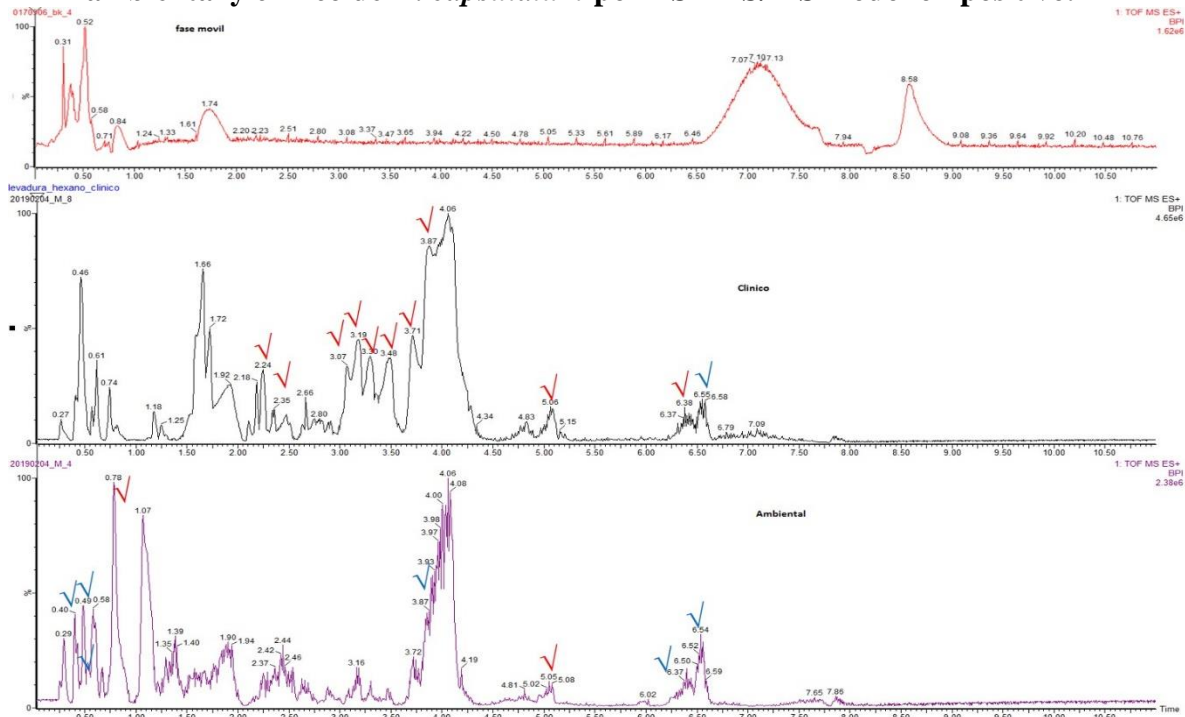


Figura Anexo 89. Análisis fracción hexano de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

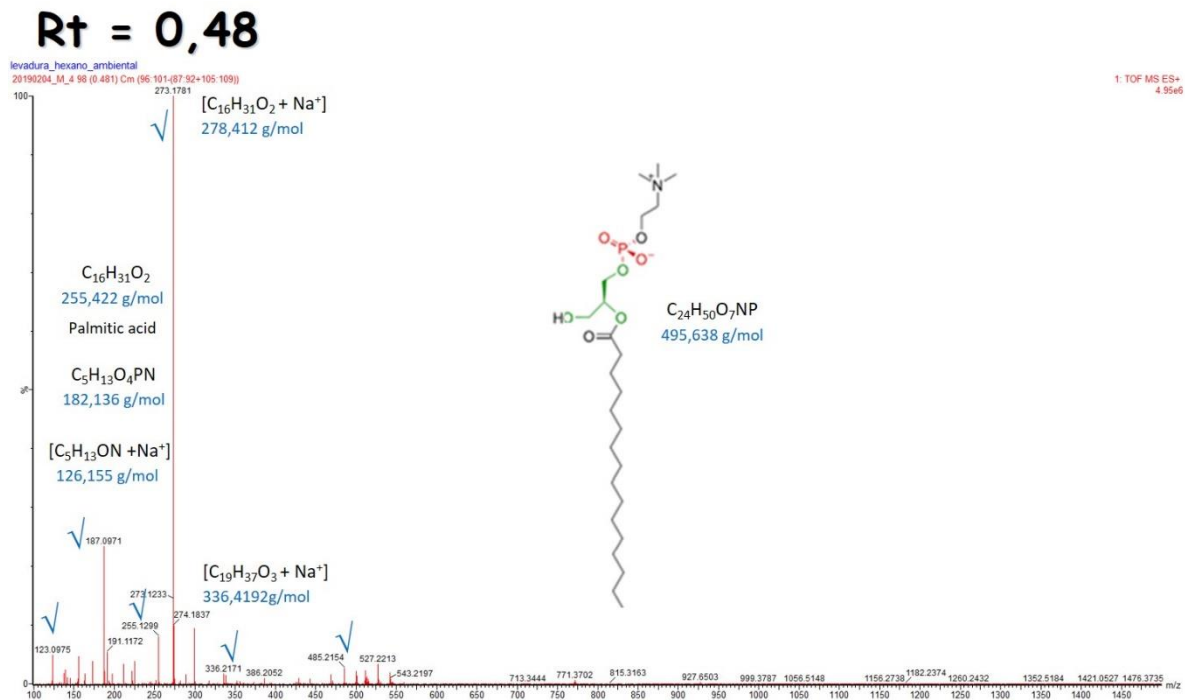


Figura Anexo 90. Espectro MS/MS para un Rt = 0,48 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 0,66

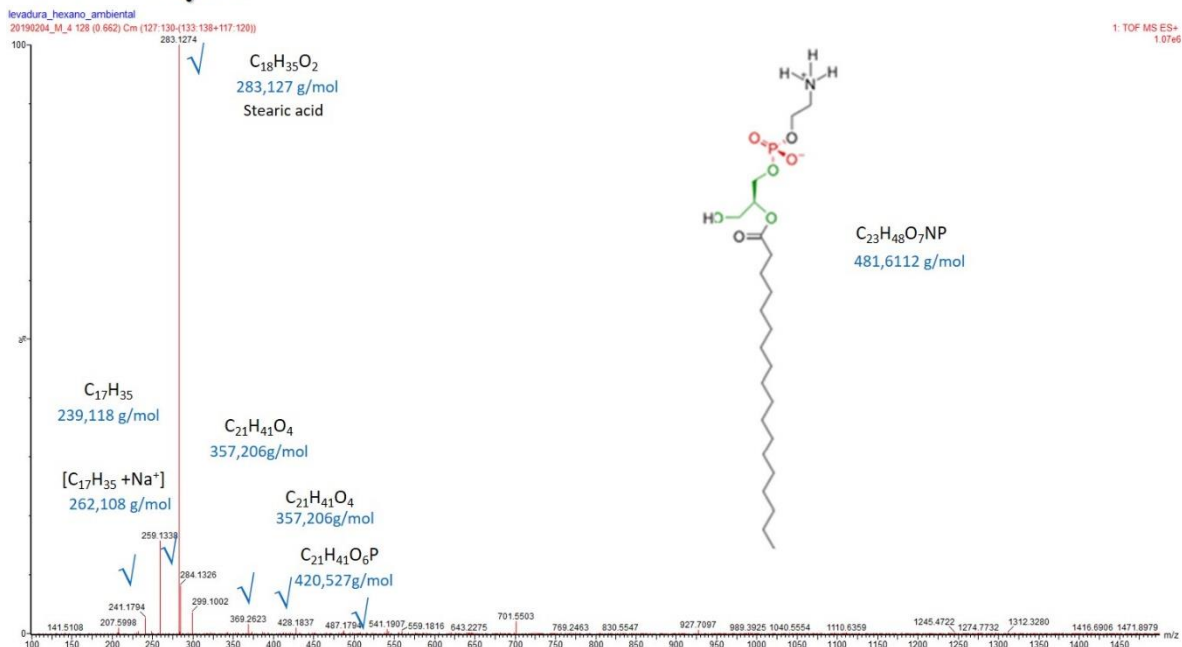


Figura Anexo 91. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 0,80

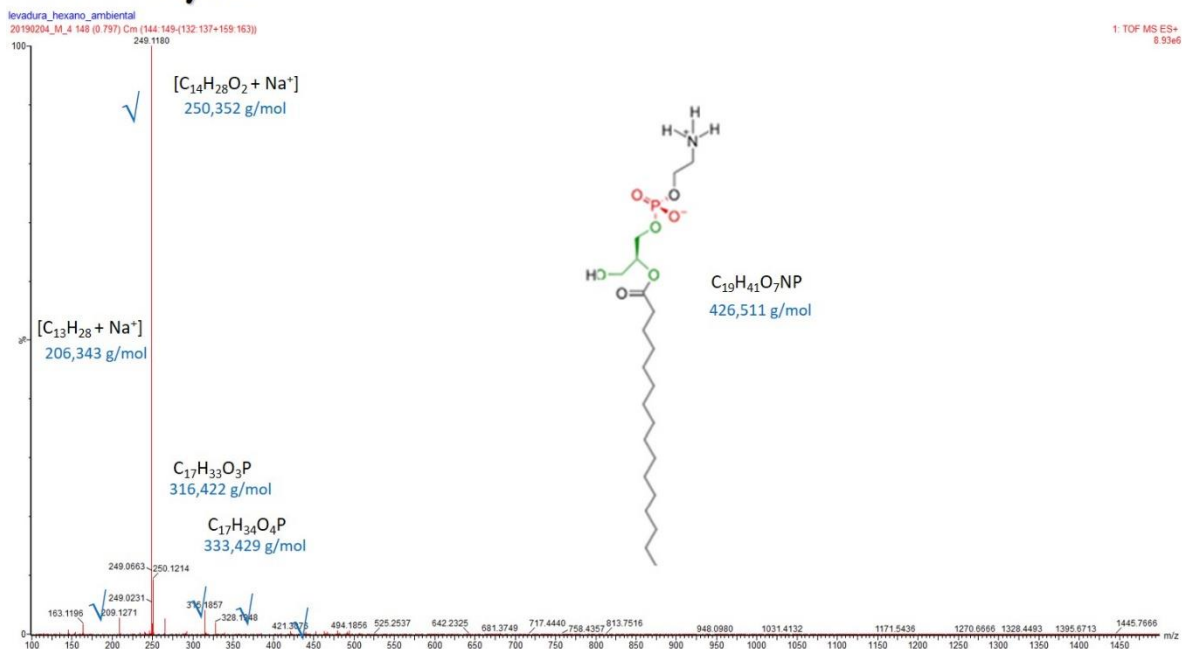


Figura Anexo 92. Espectro MS/MS para un Rt = 0,80 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

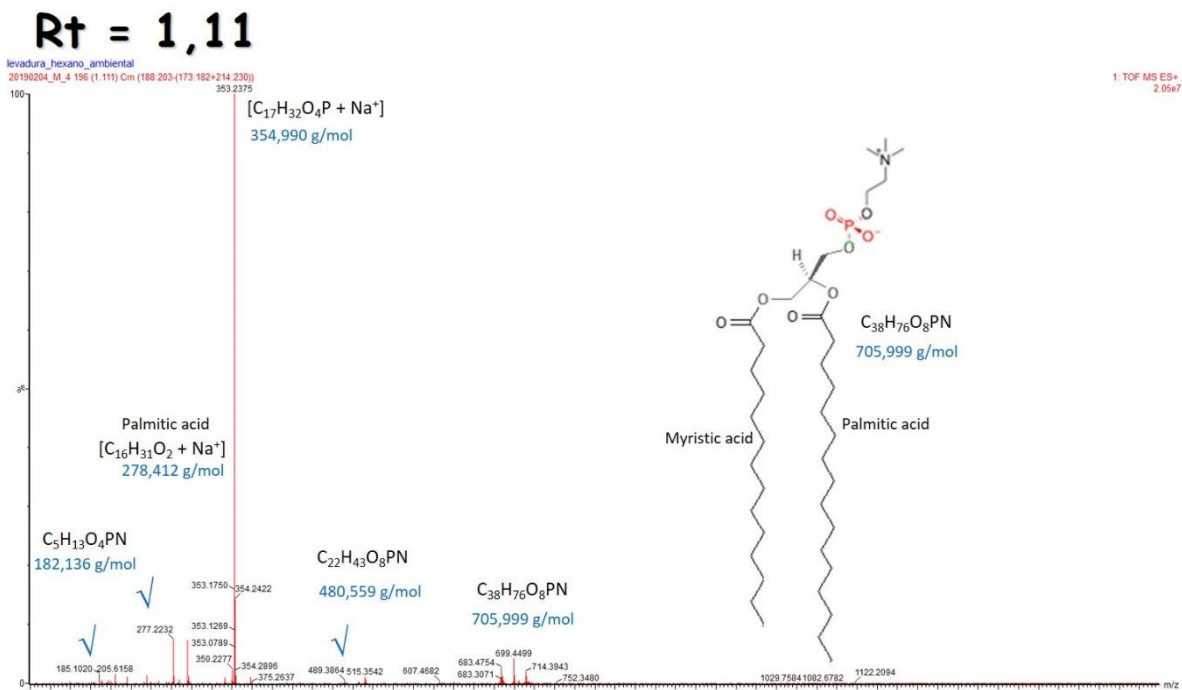


Figura Anexo 93. Espectro MS/MS para un Rt = 1,11 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

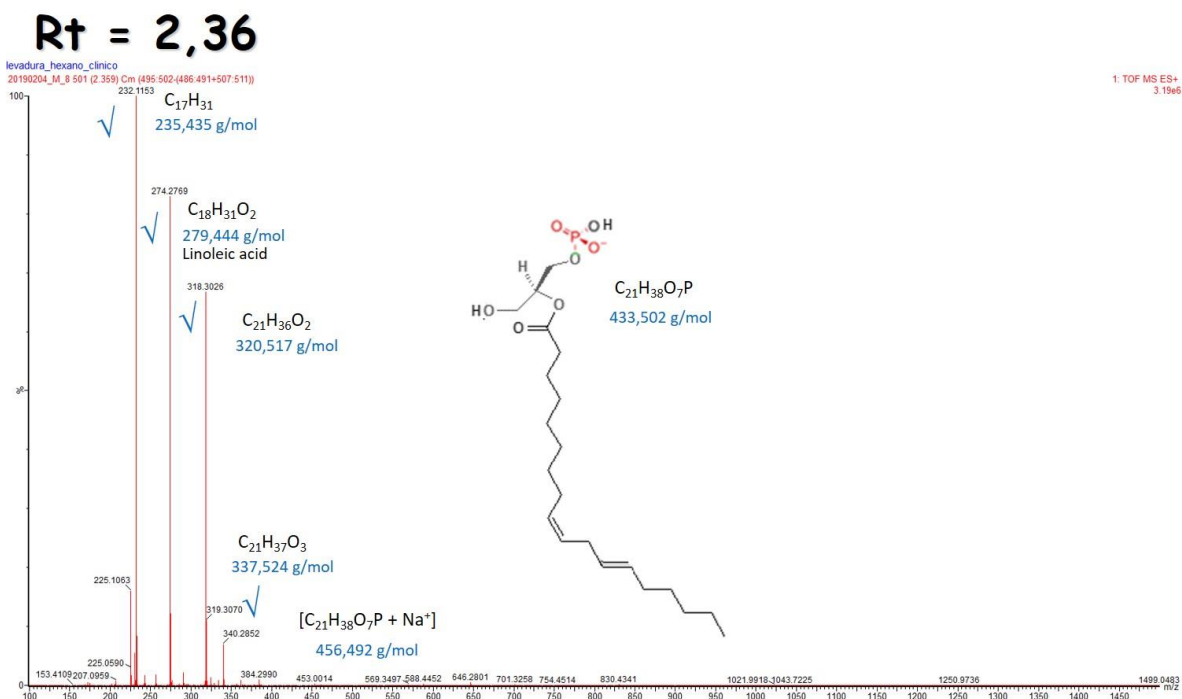


Figura Anexo 94. Espectro MS/MS para un Rt = 2,36 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

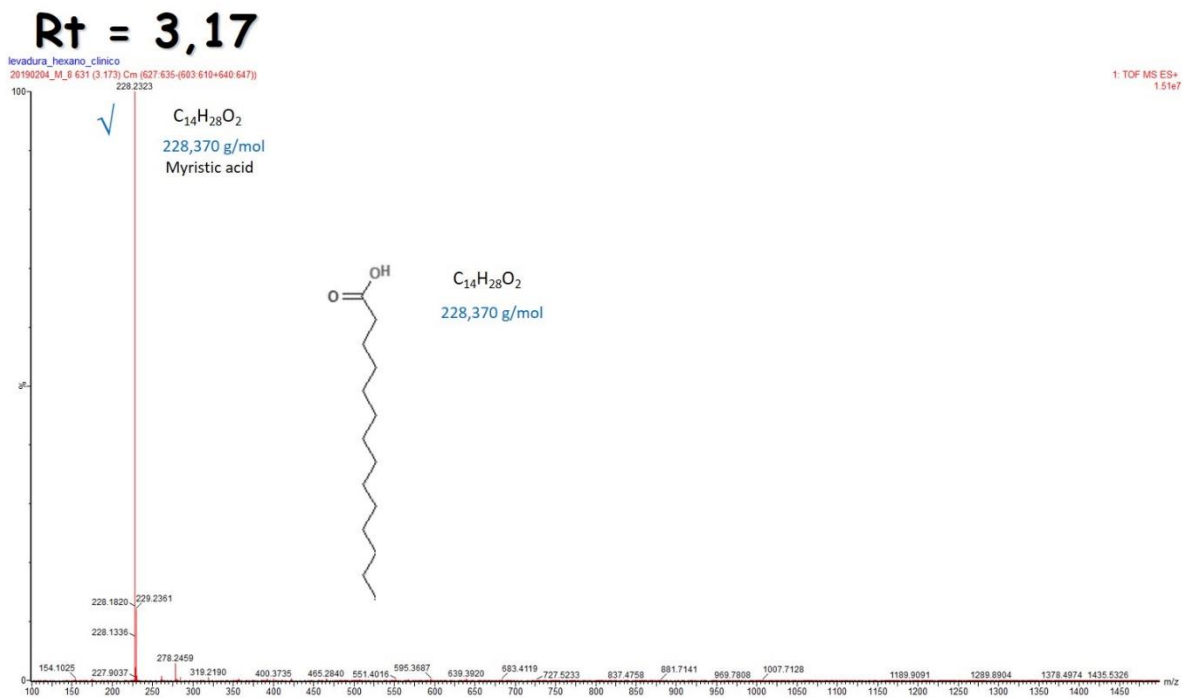


Figura Anexo 95. Espectro MS/MS para un Rt = 3,17 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

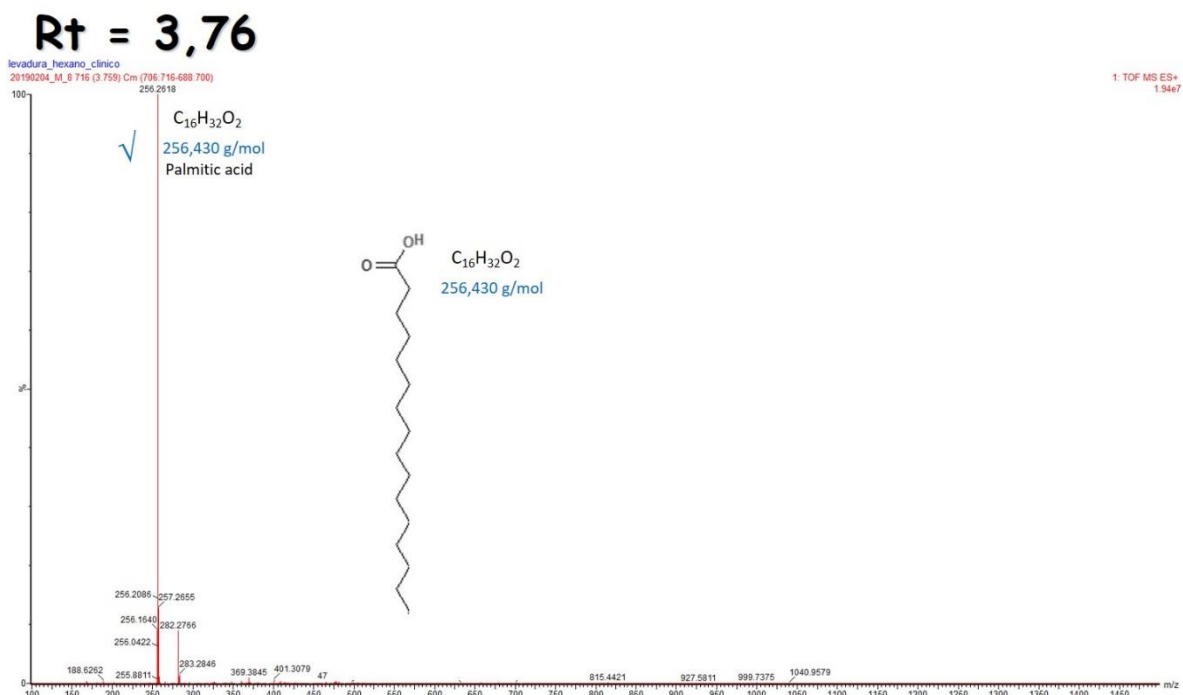


Figura Anexo 96. Espectro MS/MS para un Rt = 3,76 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

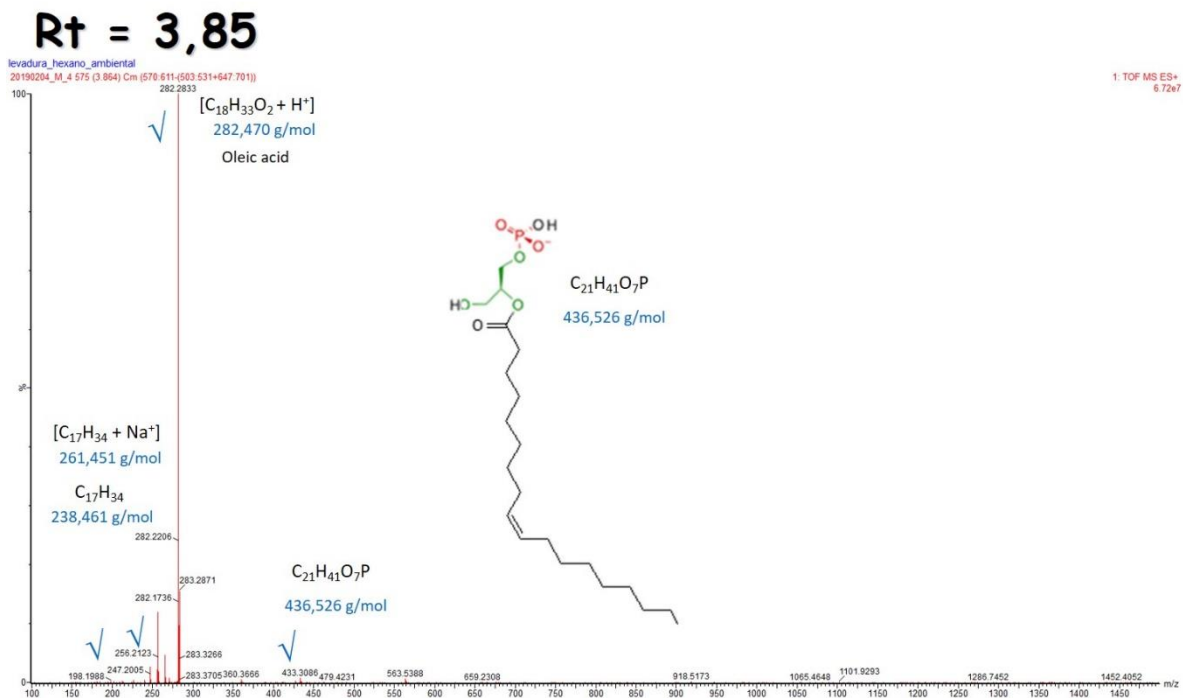


Figura Anexo 97. Espectro MS/MS para un Rt = 3,85 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

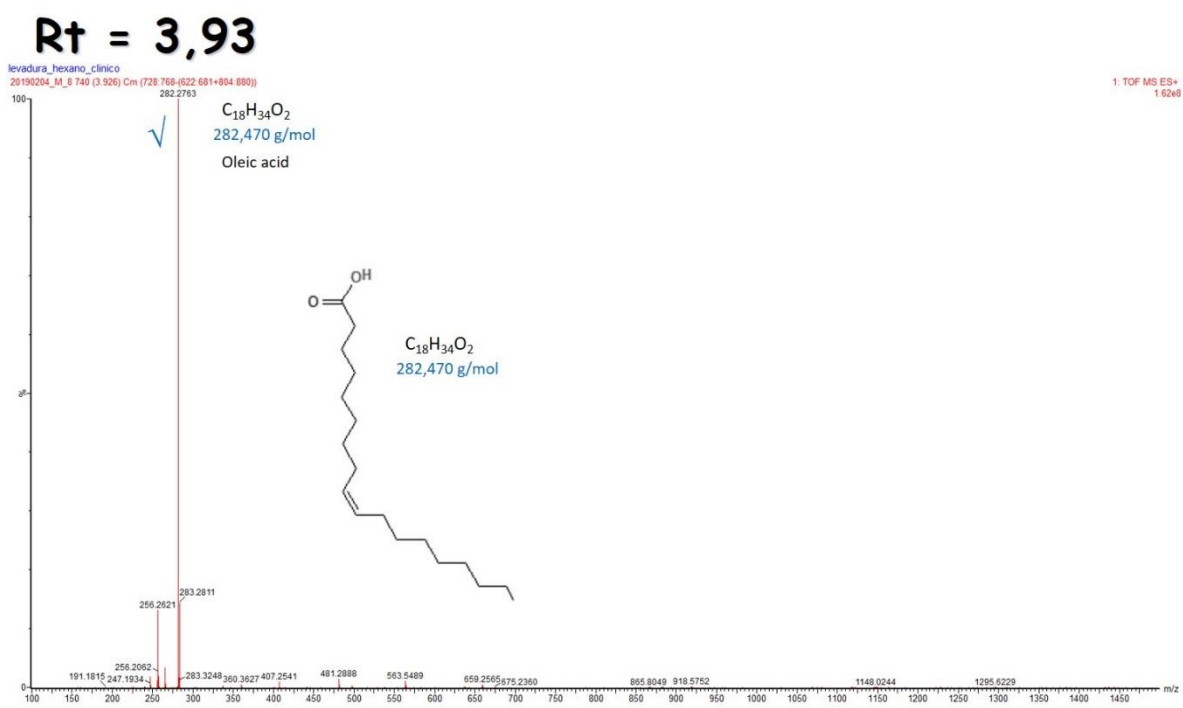


Figura Anexo 98. Espectro MS/MS para un Rt = 3,93 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

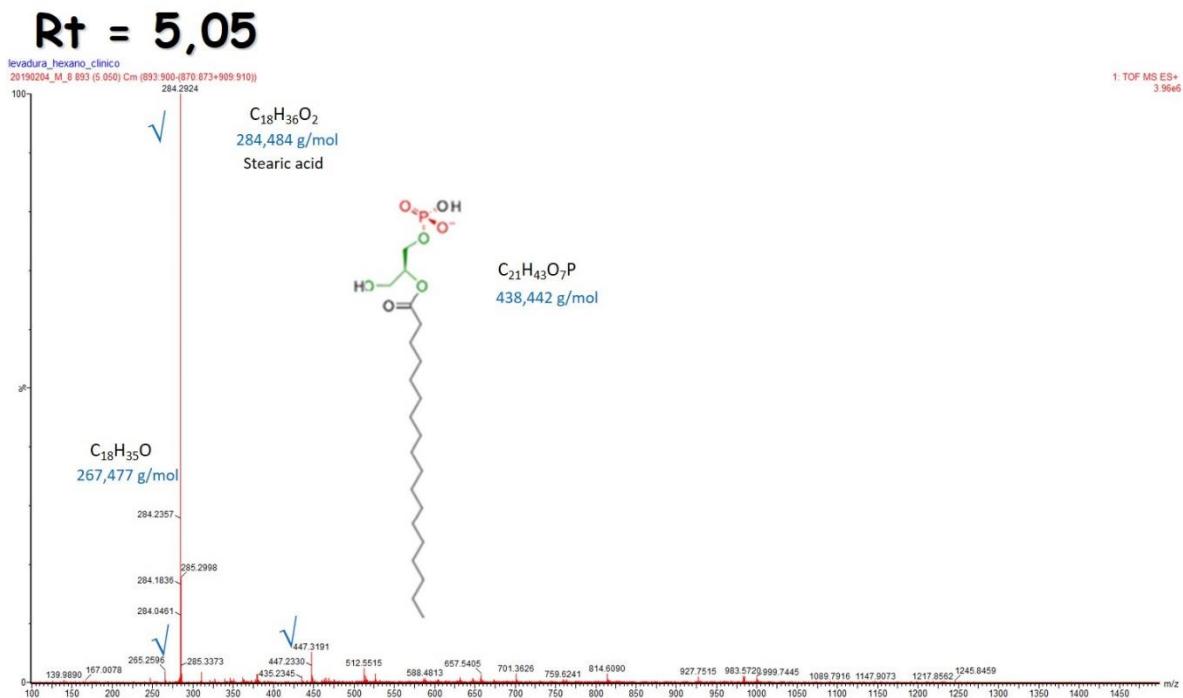


Figura Anexo 99. Espectro MS/MS para un Rt = 5,05 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

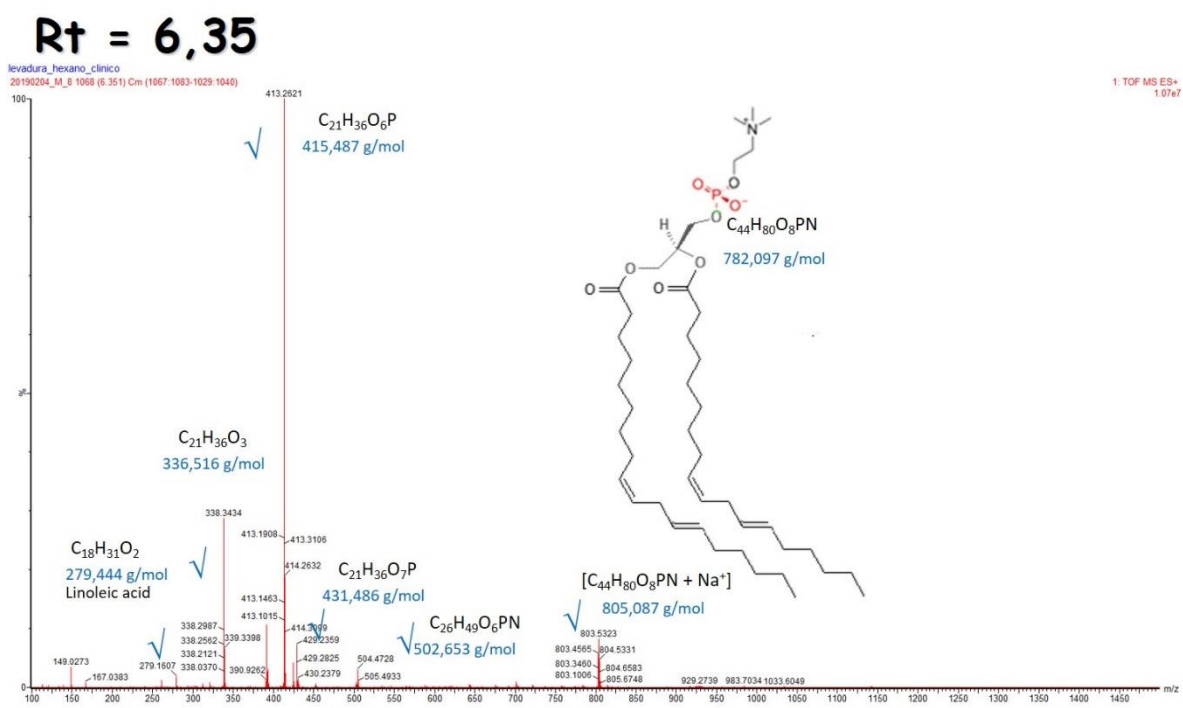


Figura Anexo 100. Espectro MS/MS para un Rt = 6,35 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

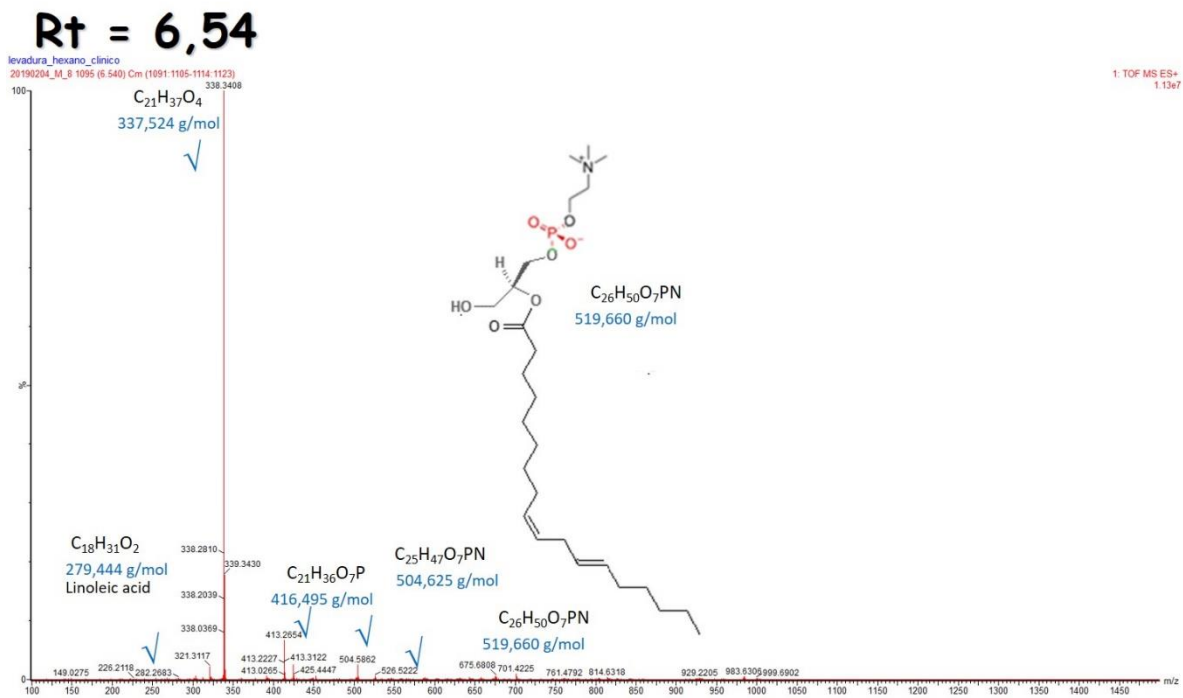


Figura Anexo 101. Espectro MS/MS para un Rt = 6,54 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

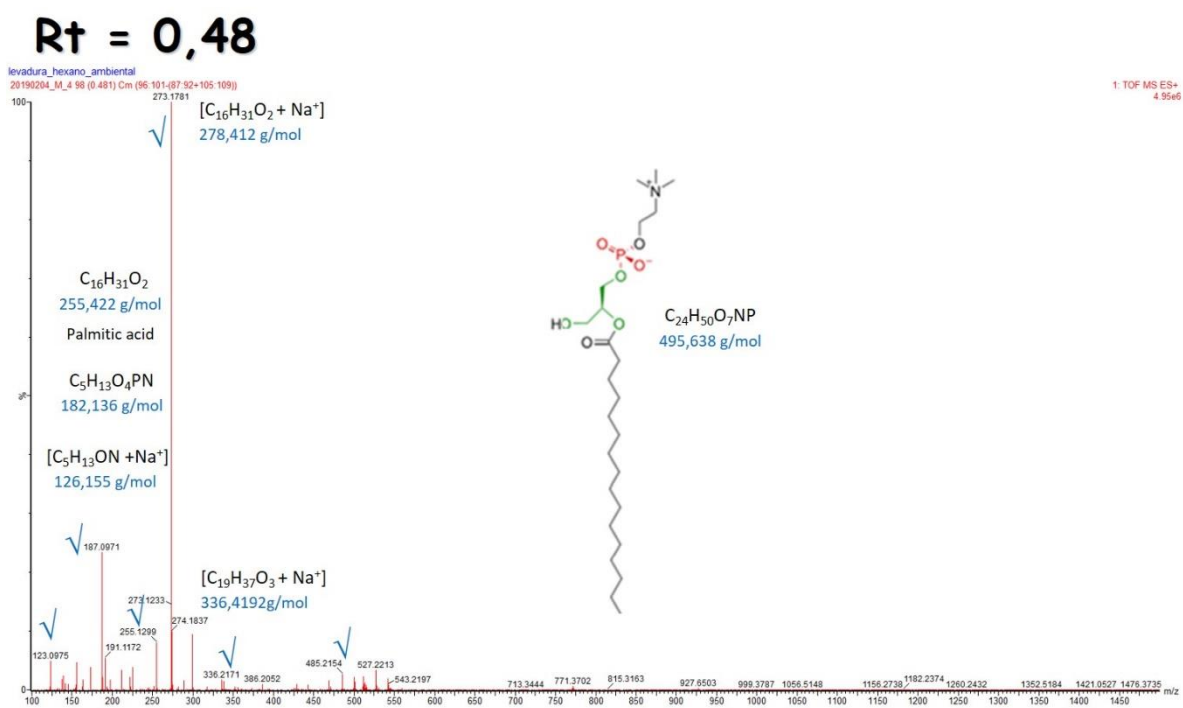


Figura Anexo 102. Espectro MS/MS para un Rt = 0,48 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

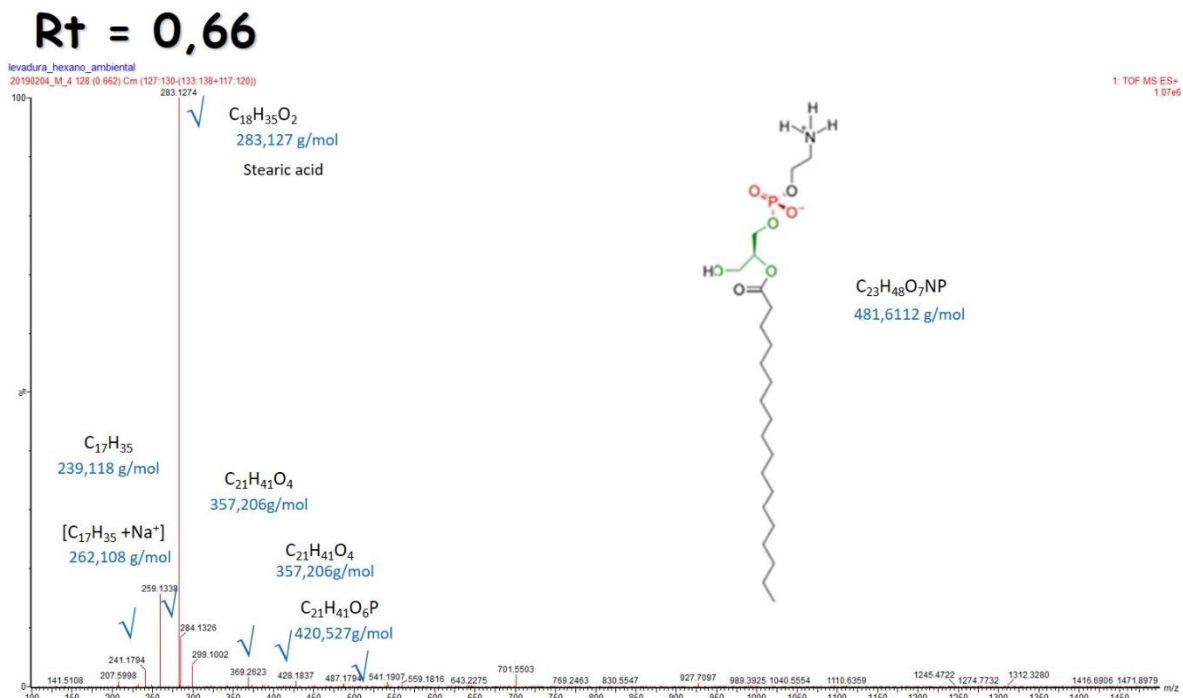


Figura Anexo 103. Espectro MS/MS para un Rt = 0,66 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

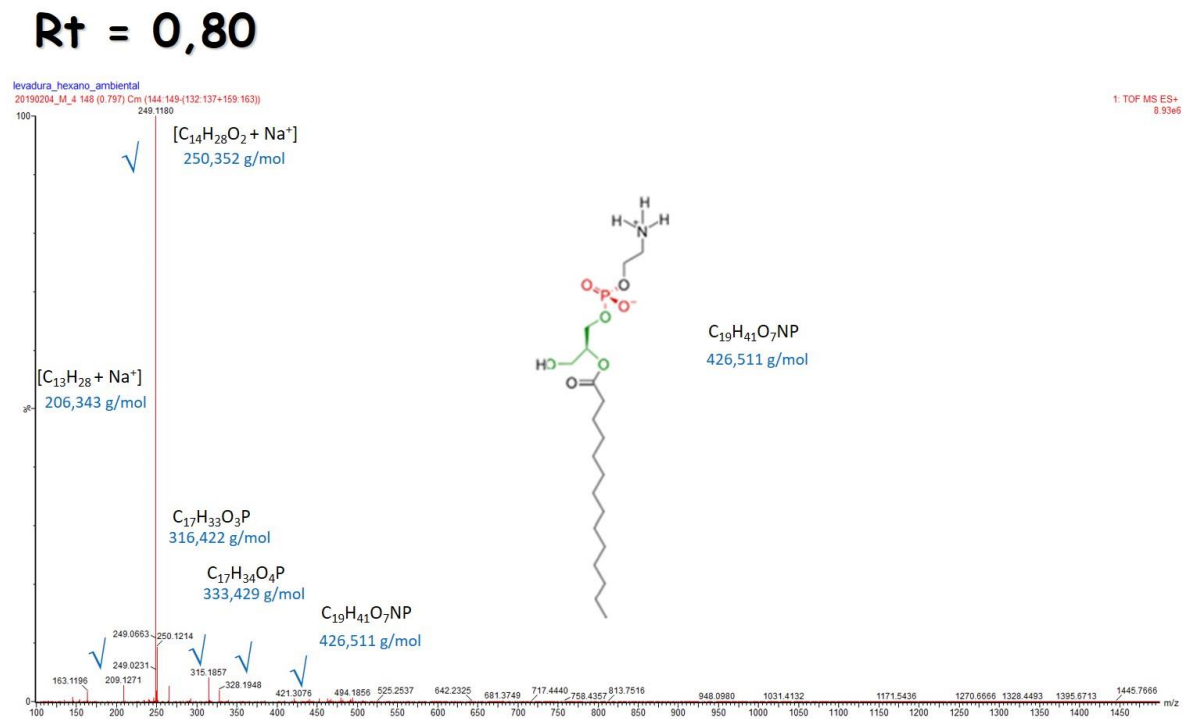


Figura Anexo 104. Espectro MS/MS para un Rt = 0,80 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

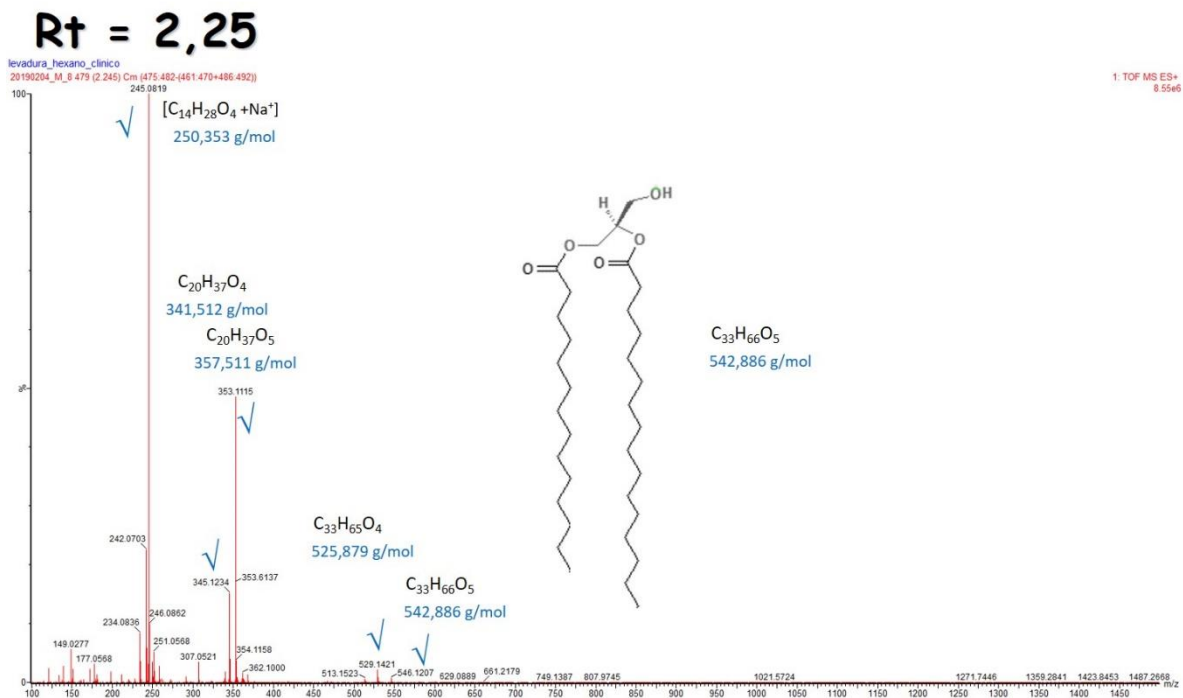


Figura Anexo 105. Espectro MS/MS para un Rt = 2,25 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

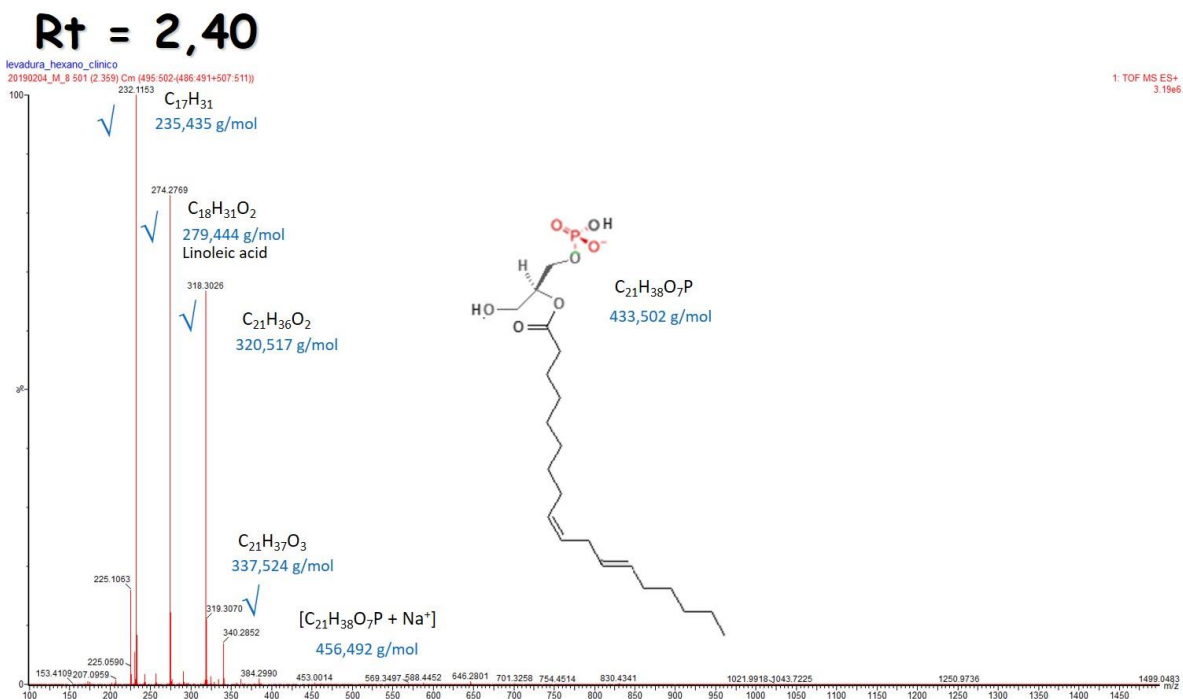


Figura Anexo 106. Espectro MS/MS para un Rt = 2,40 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

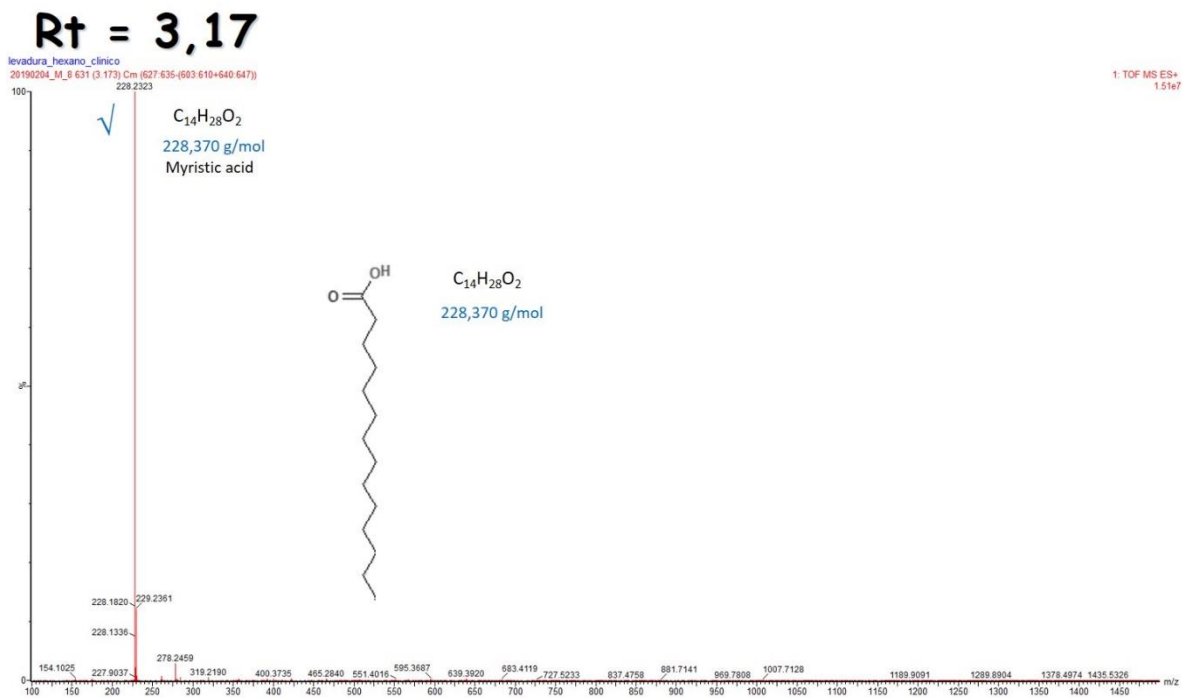


Figura Anexo 107. Espectro MS/MS para un Rt = 3,17 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

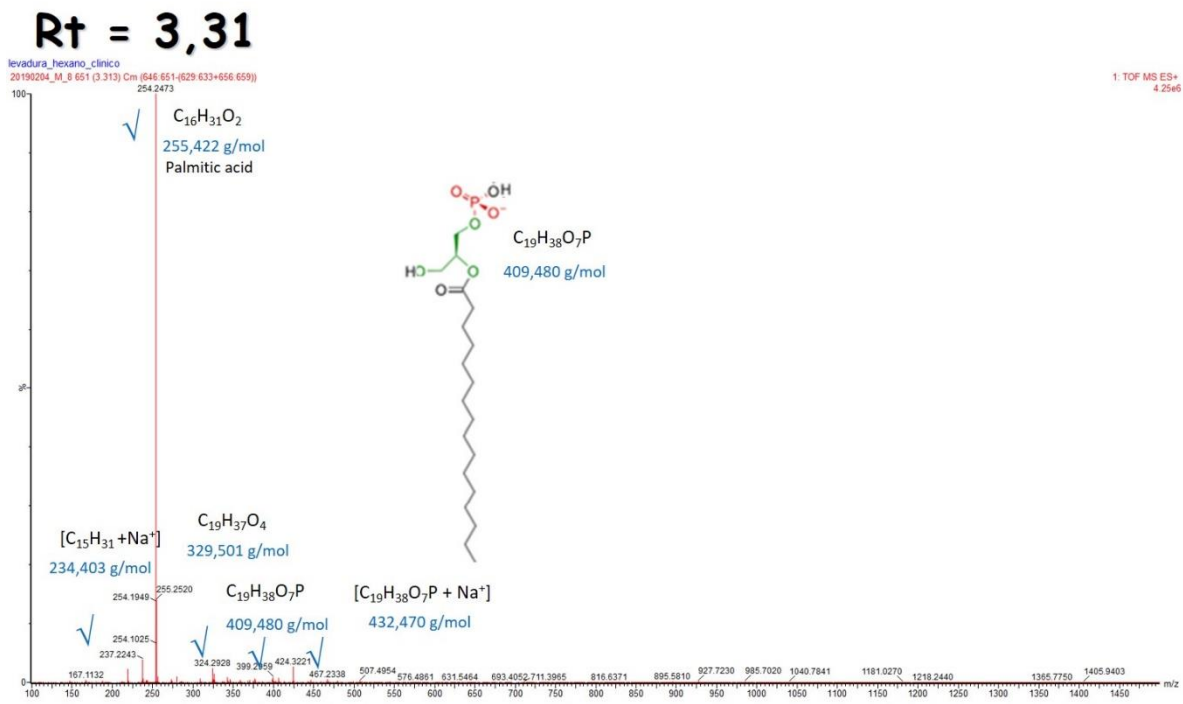


Figura Anexo 108. Espectro MS/MS para un Rt = 3,31 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

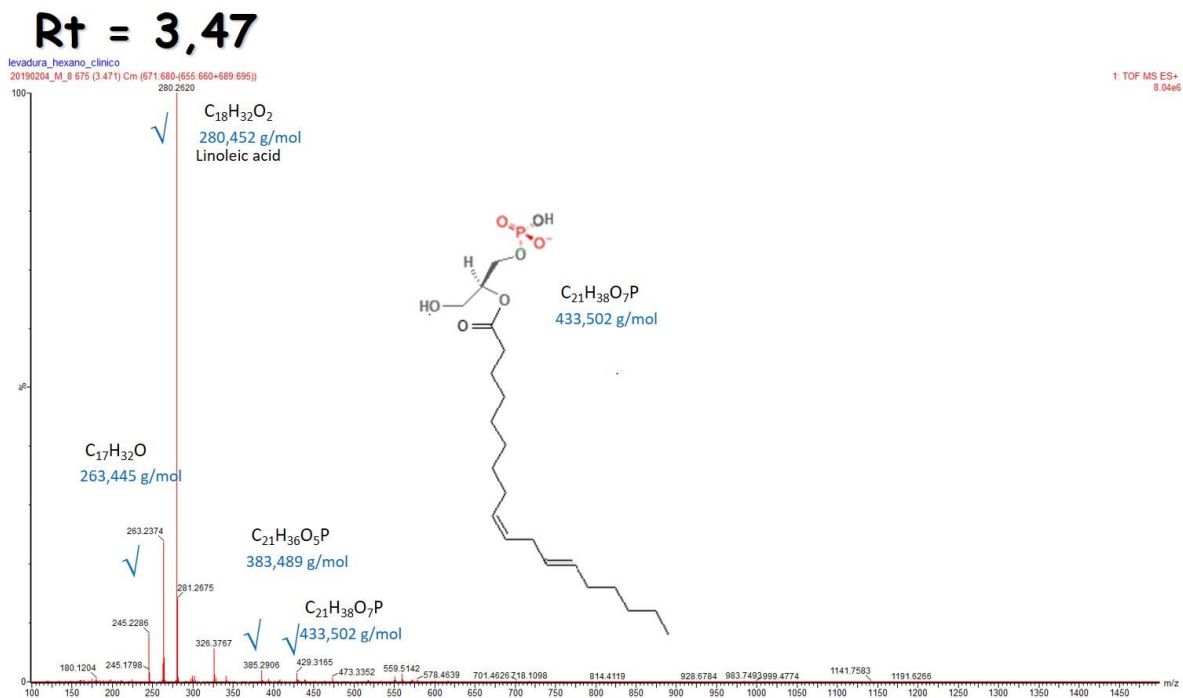


Figura Anexo 109. Espectro MS/MS para un Rt = 3,47 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

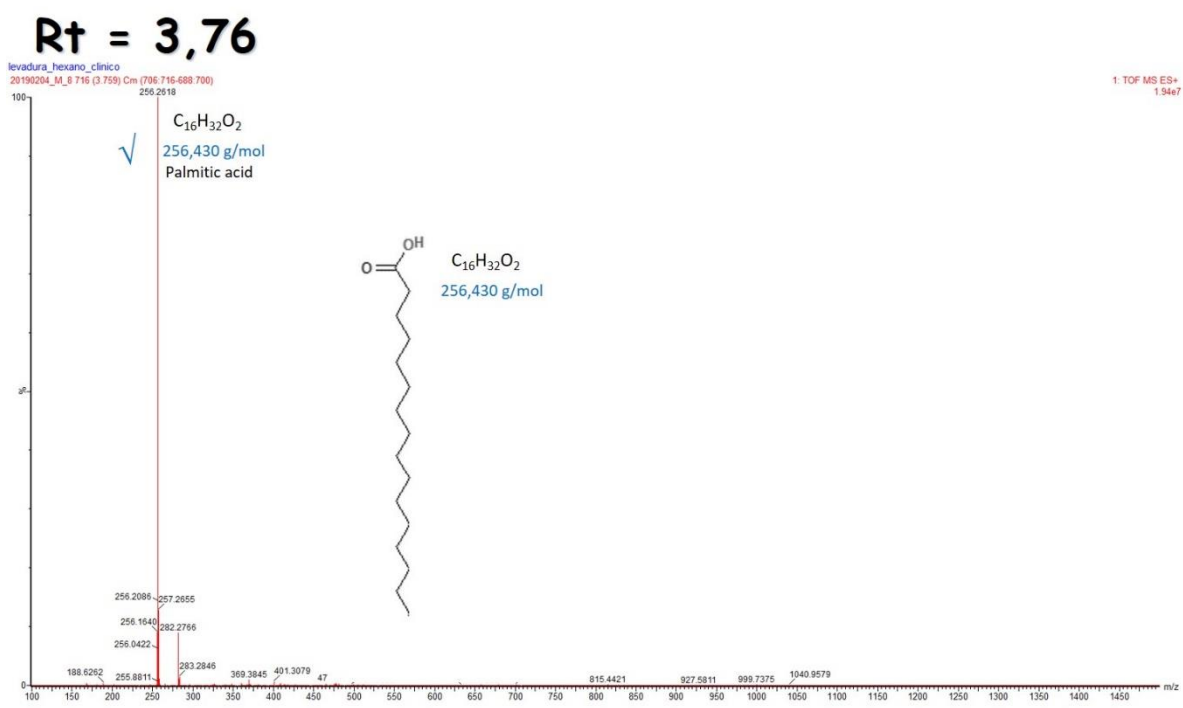


Figura Anexo 110. Espectro MS/MS para un Rt = 3,76 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

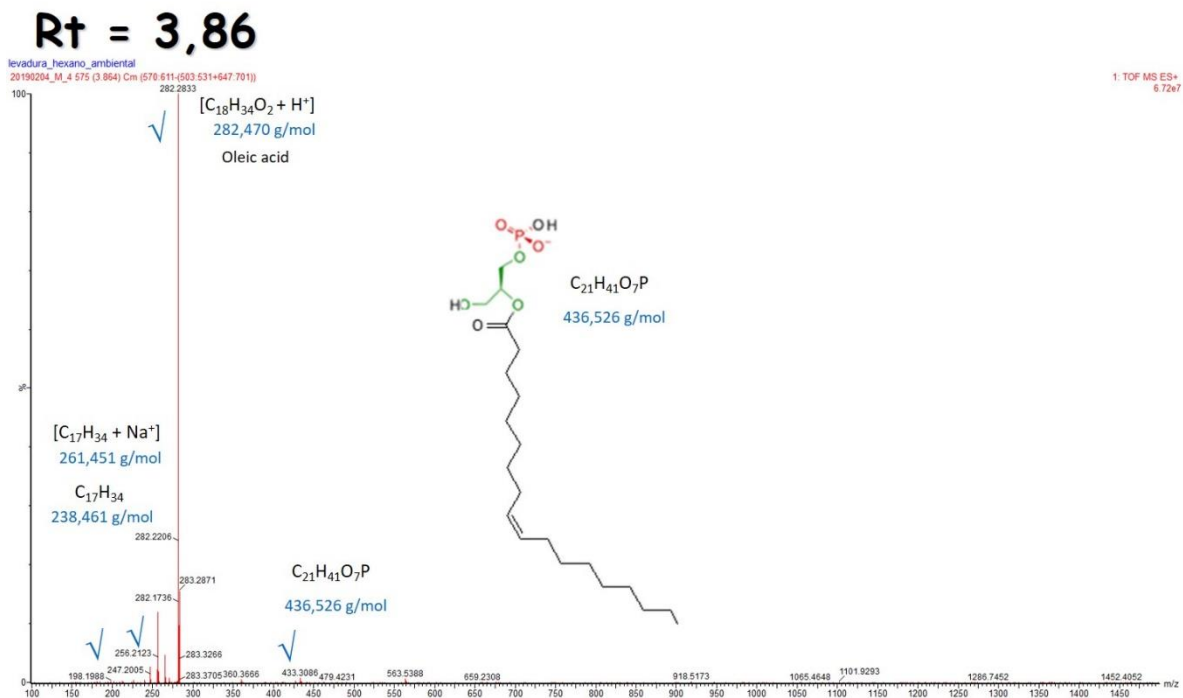


Figura Anexo 111. Espectro MS/MS para un Rt = 3,86 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

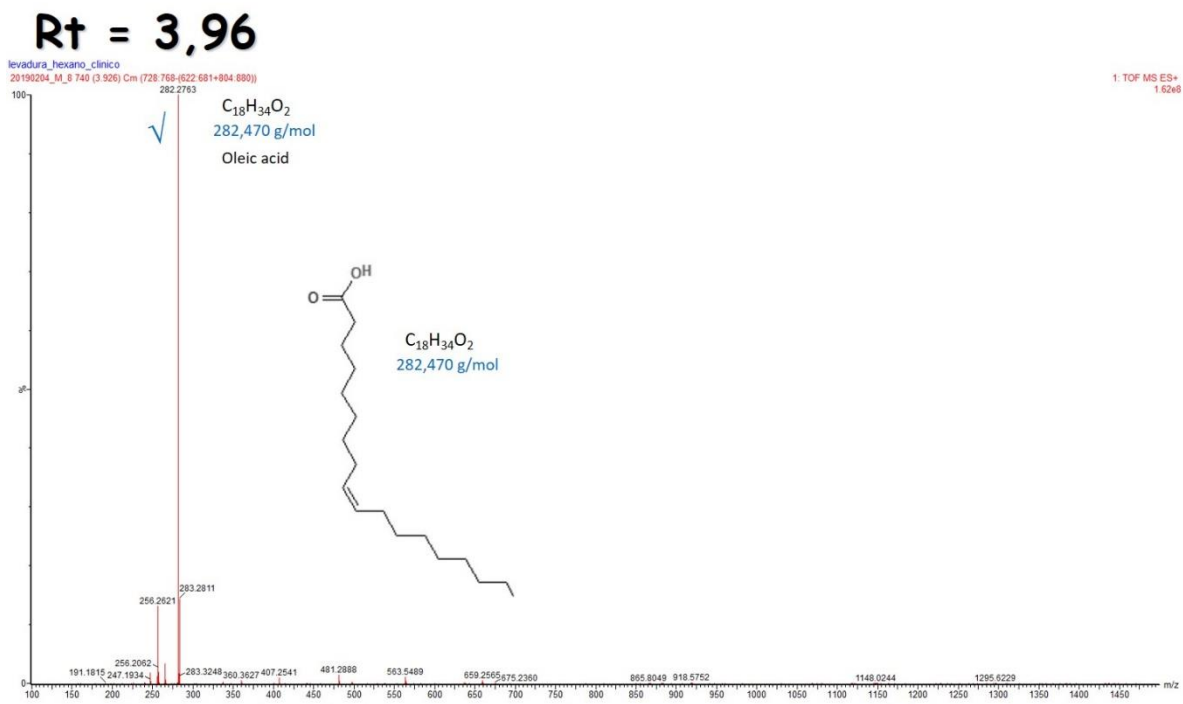


Figura Anexo 112. Espectro MS/MS para un Rt = 3,96 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

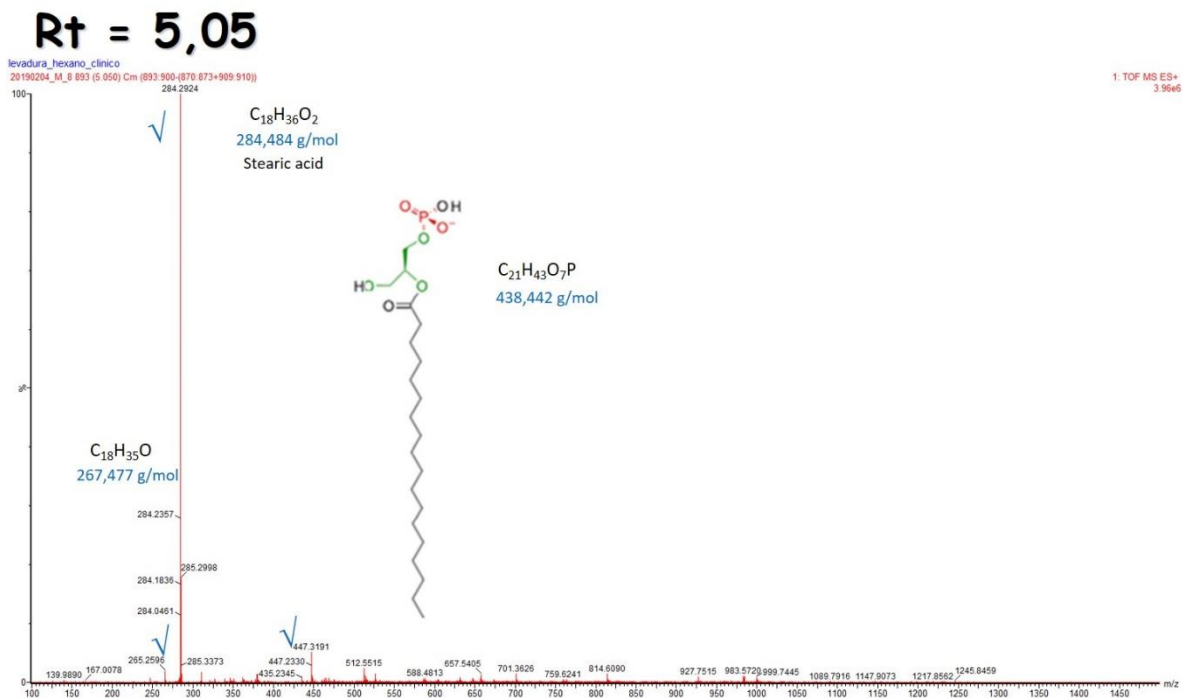


Figura Anexo 113. Espectro MS/MS para un Rt = 5,05 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

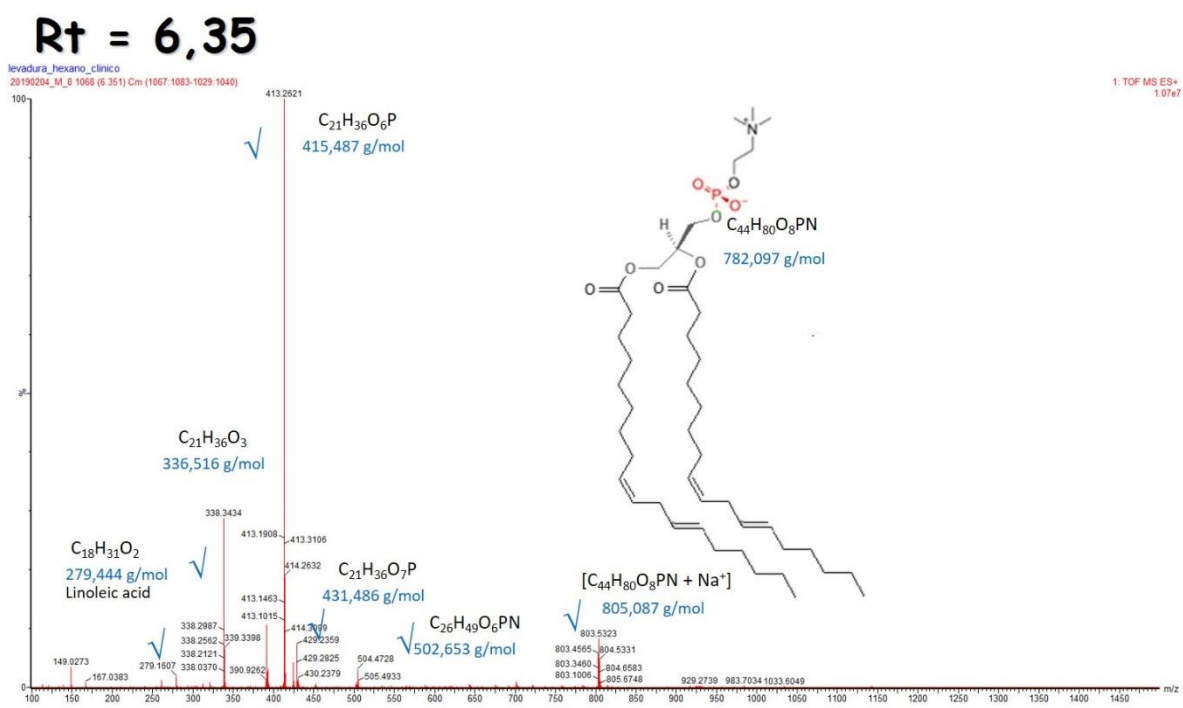


Figura Anexo 114. Espectro MS/MS para un Rt = 6,35 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

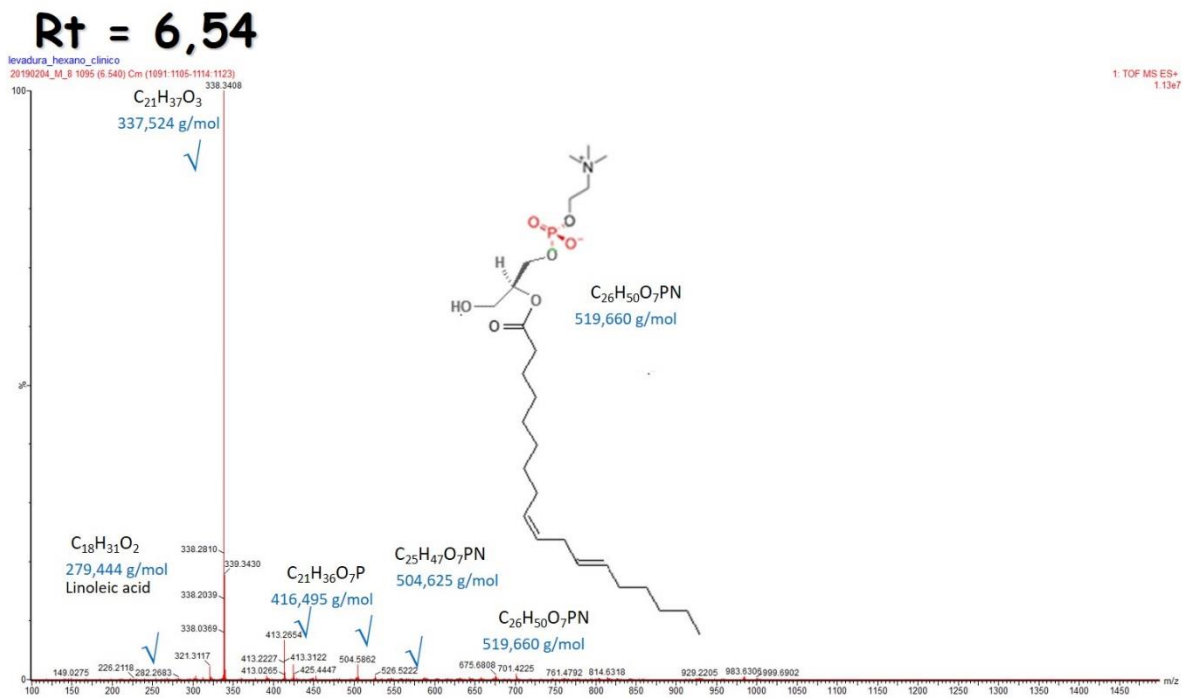


Figura Anexo 115. Espectro MS/MS para un Rt = 6,54 fracción hexano de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.8 Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

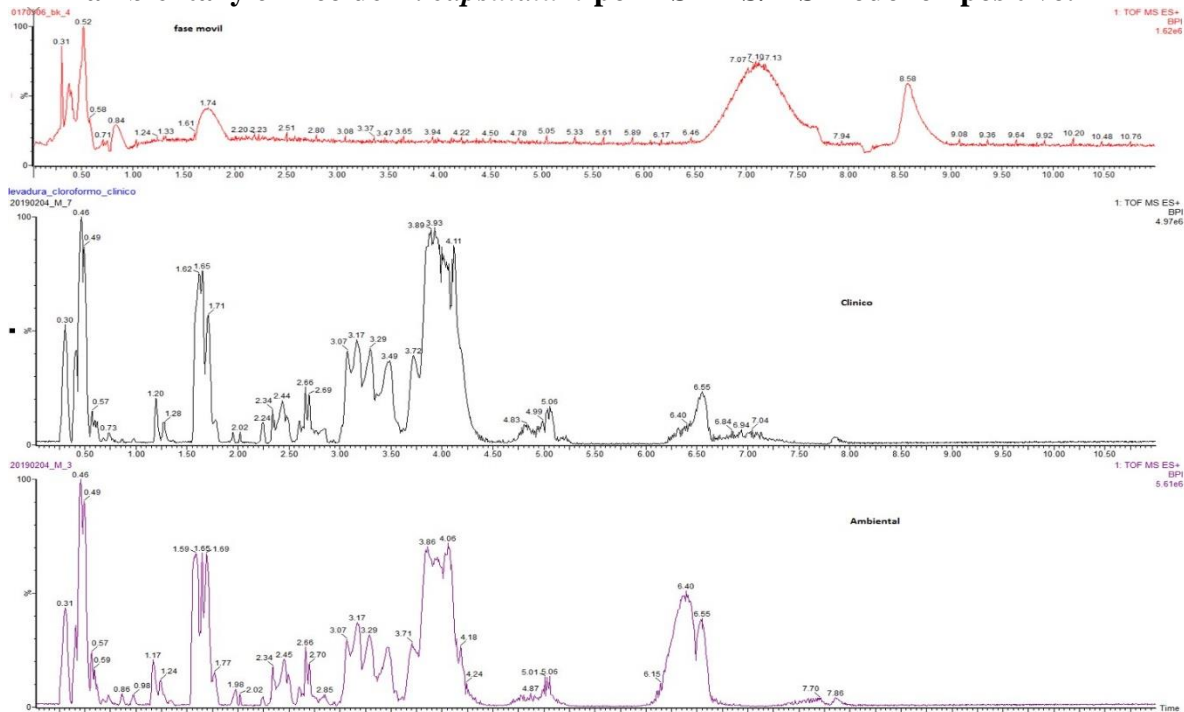


Figura Anexo 116. Análisis fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

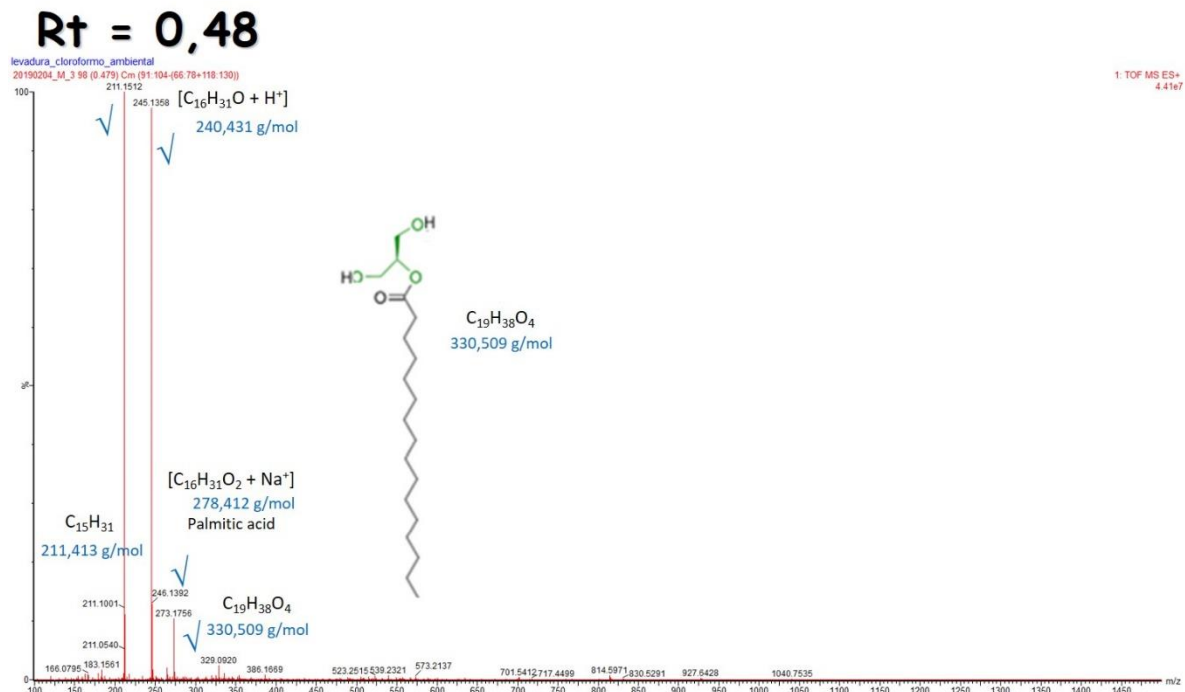


Figura Anexo 117. Espectro MS/MS para un Rt = 0,48 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

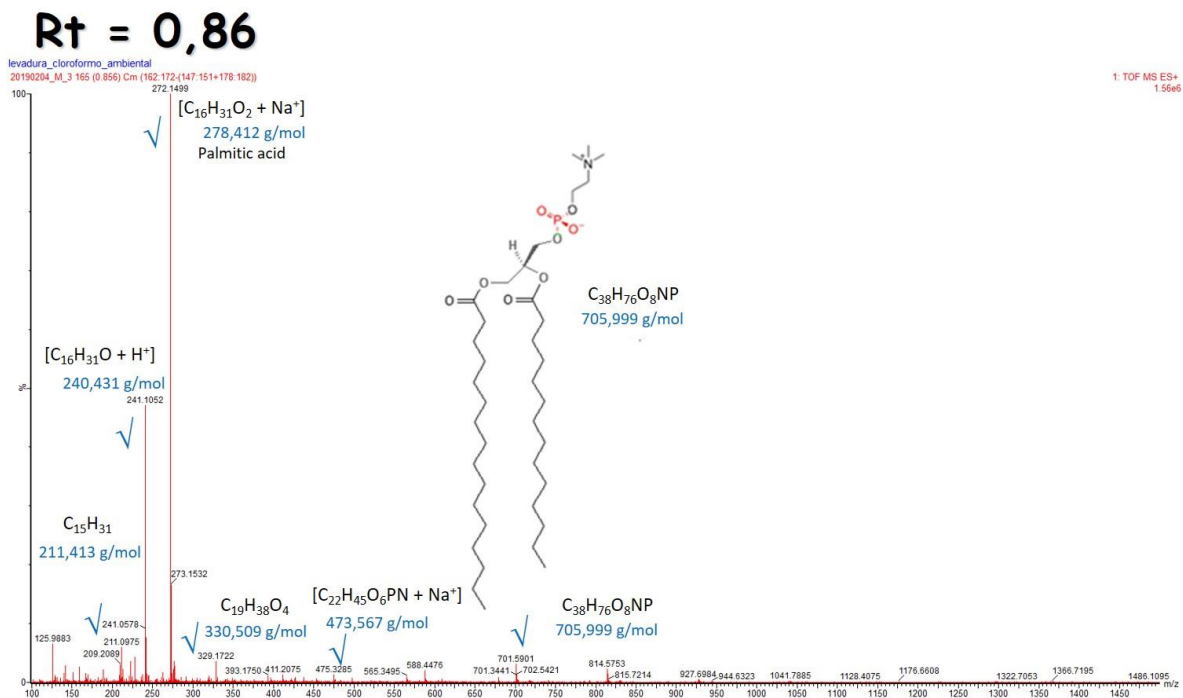


Figura Anexo 118. Espectro MS/MS para un Rt = 0,86 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

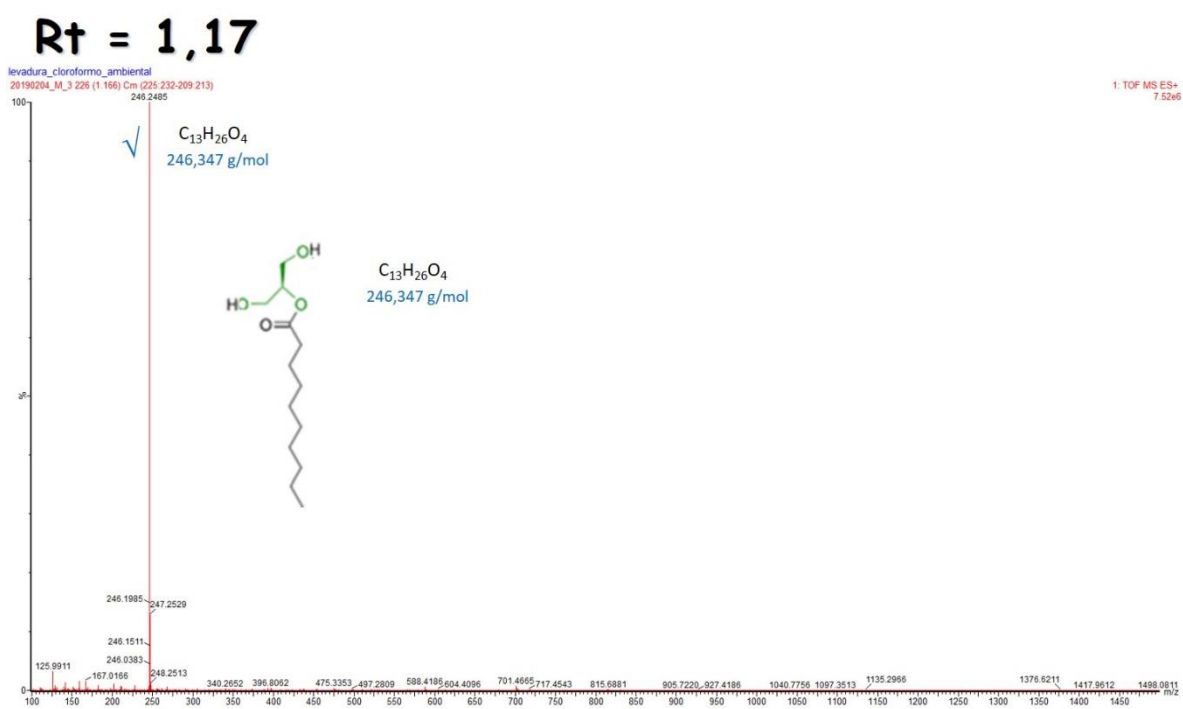


Figura Anexo 119. Espectro MS/MS para un Rt = 1,17 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

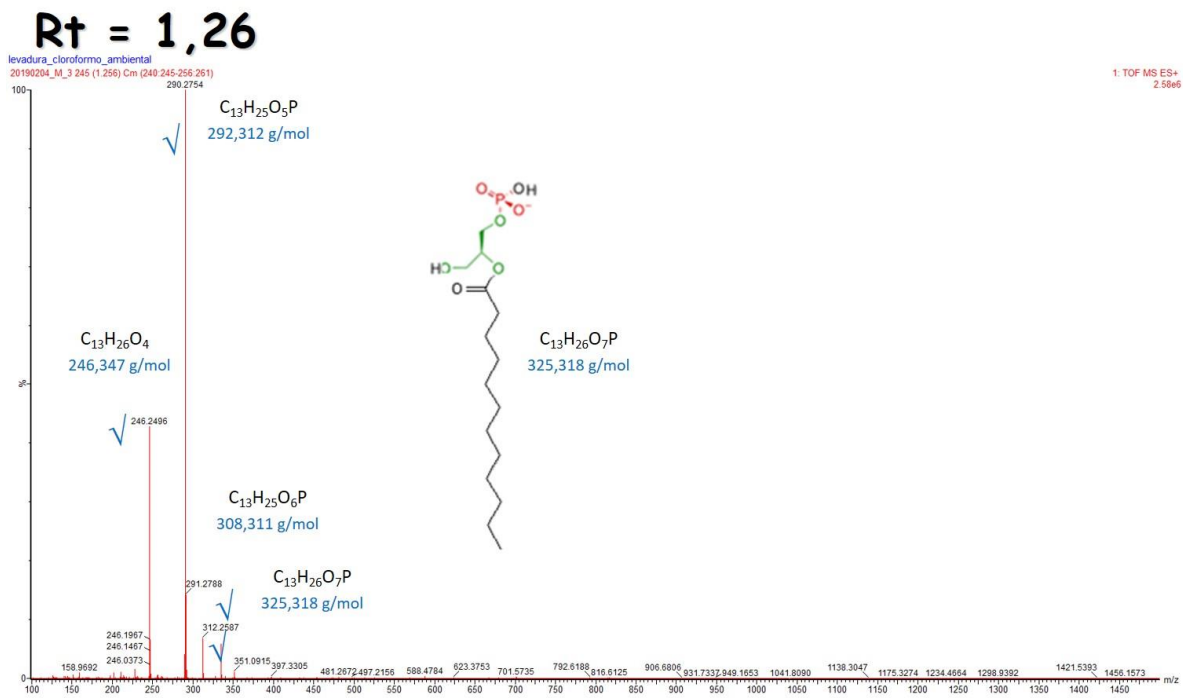


Figura Anexo 120. Espectro MS/MS para un Rt = 1,26 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

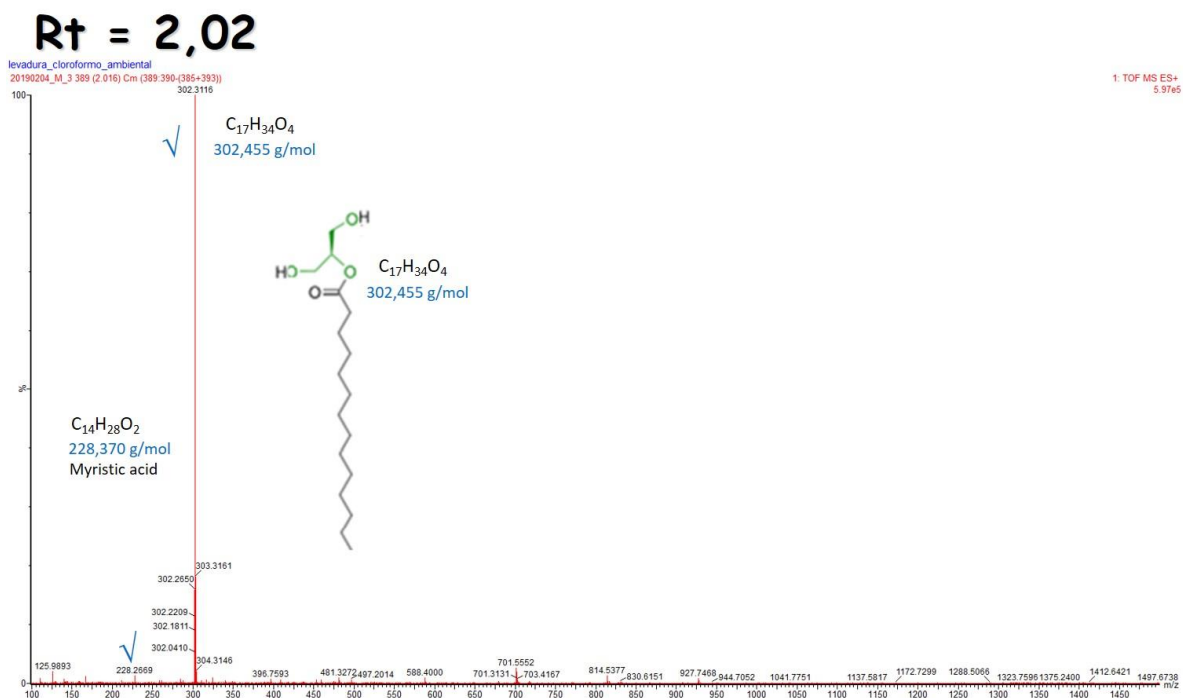


Figura Anexo 121. Espectro MS/MS para un Rt = 2,02 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

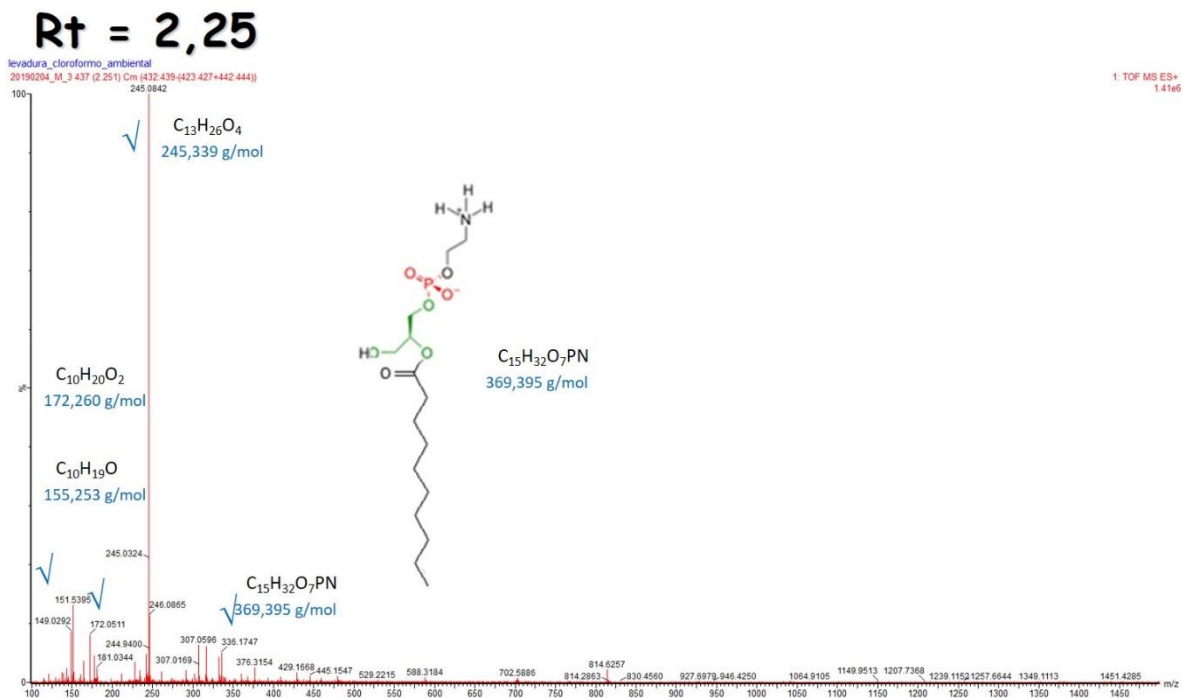


Figura Anexo 122. Espectro MS/MS para un Rt = 2,25 fracción cloroforno de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

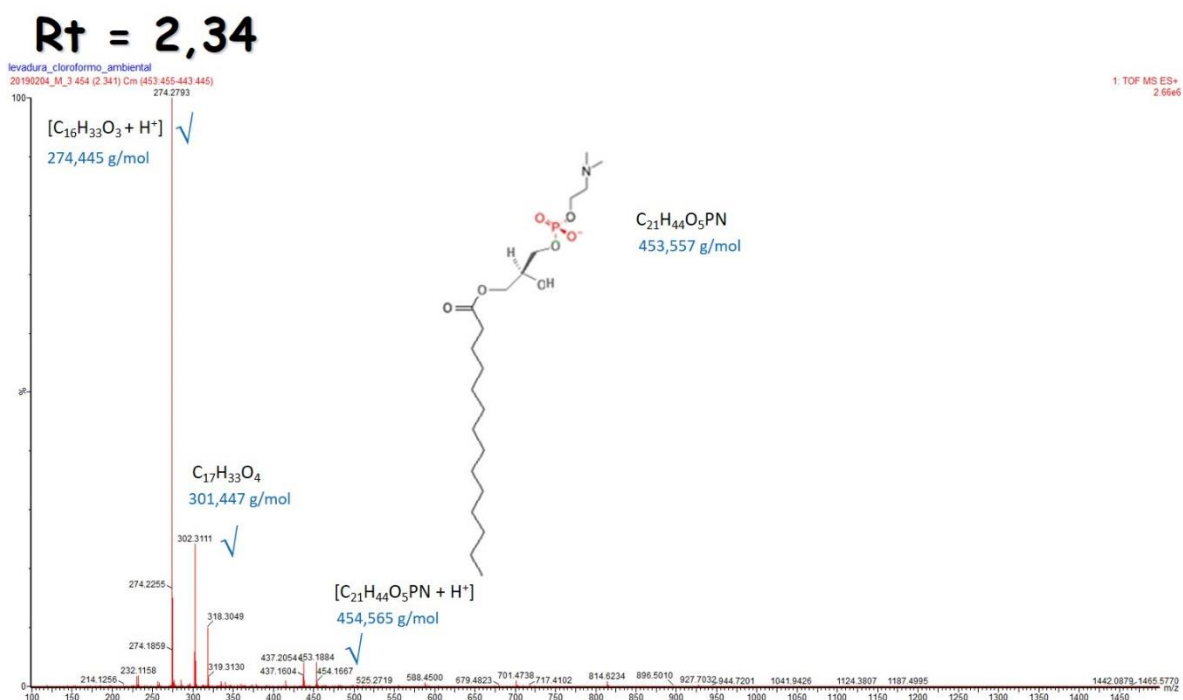


Figura Anexo 123. Espectro MS/MS para un Rt = 2,34 fracción cloroforno de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

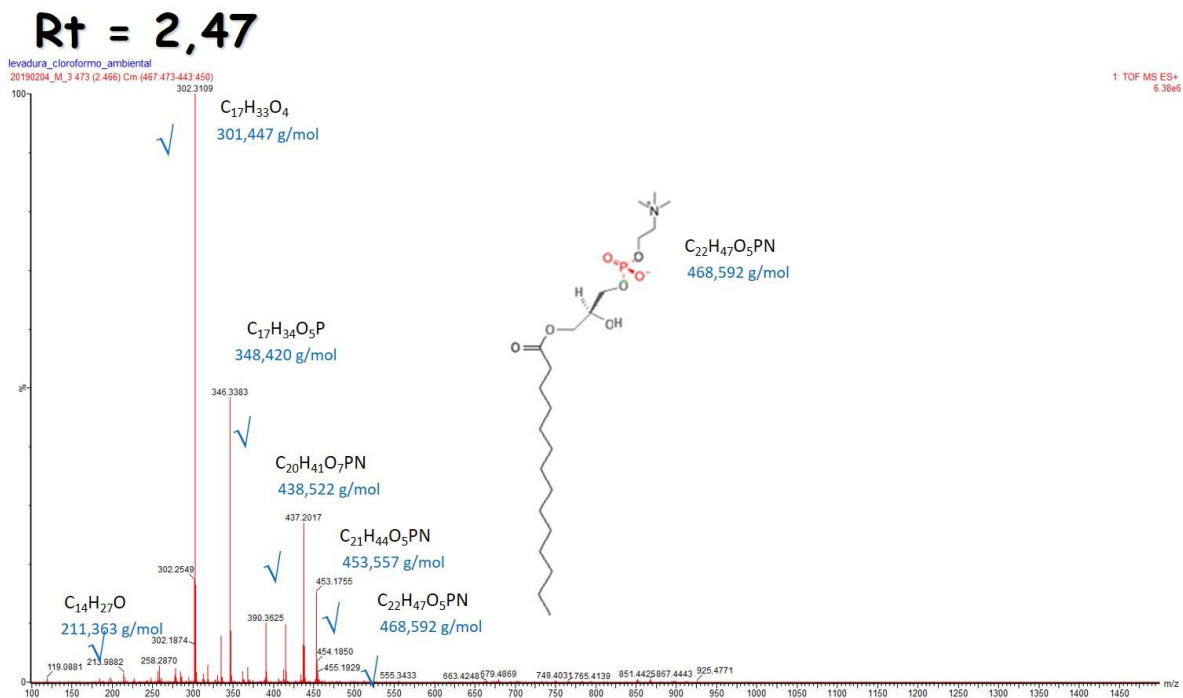


Figura Anexo 124. Espectro MS/MS para un Rt = 2,47 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

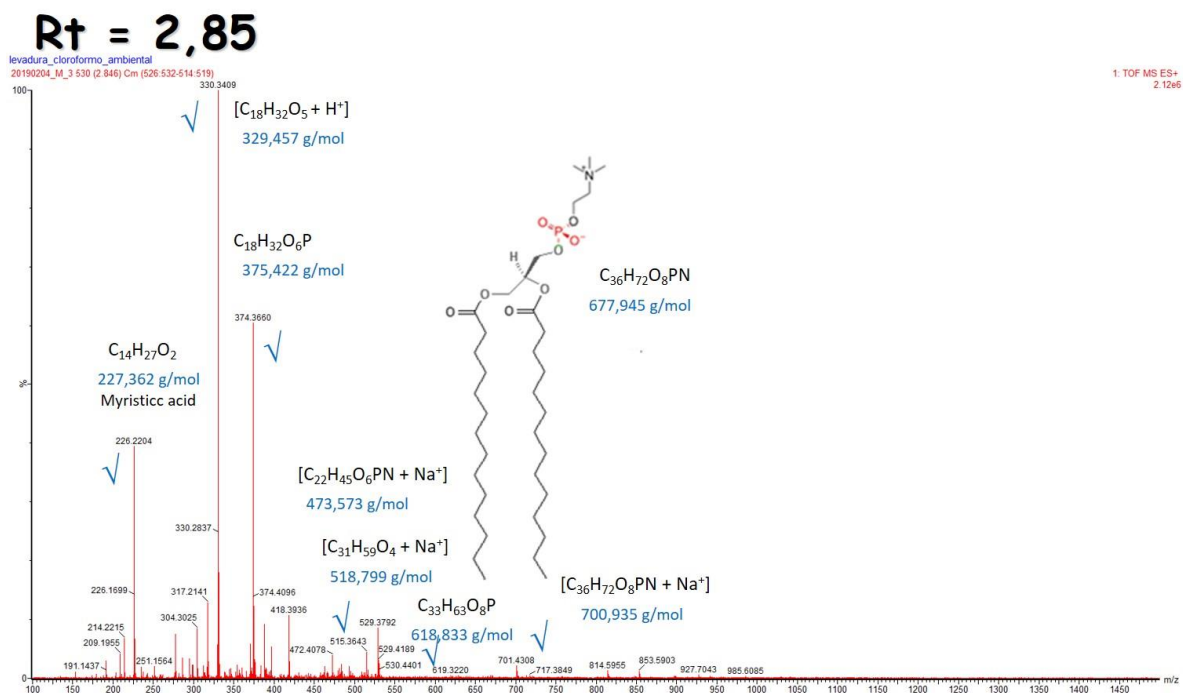


Figura Anexo 125. Espectro MS/MS para un Rt = 2,85 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

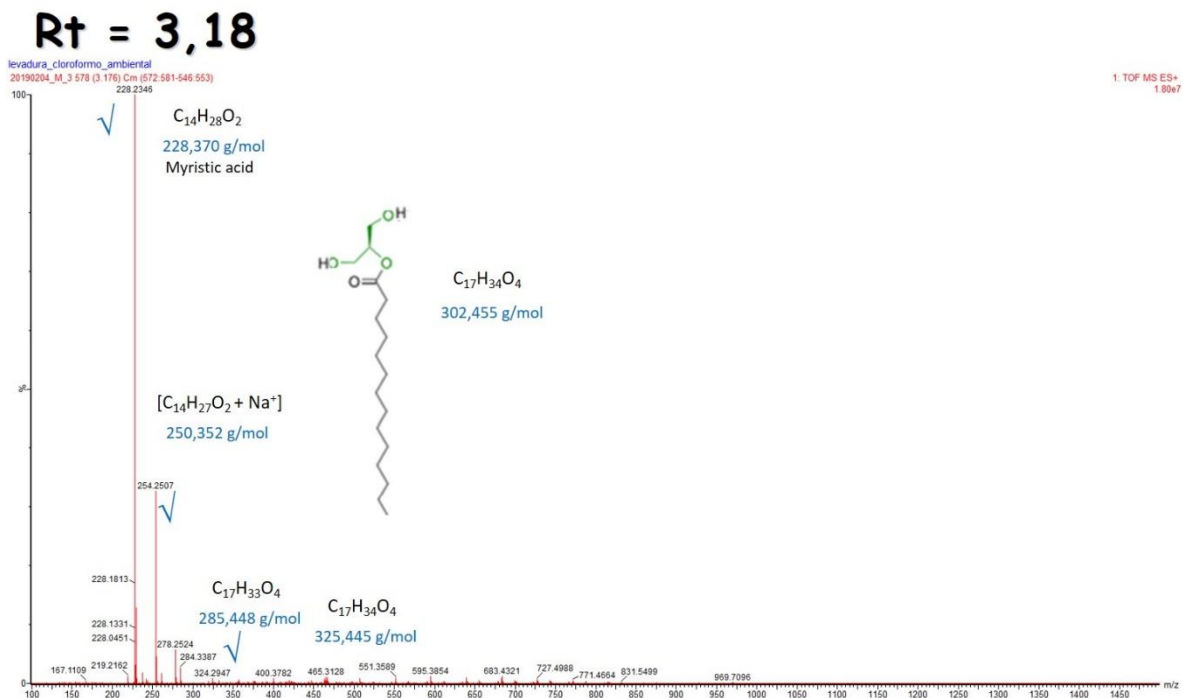


Figura Anexo 126. Espectro MS/MS para un Rt = 3,18 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

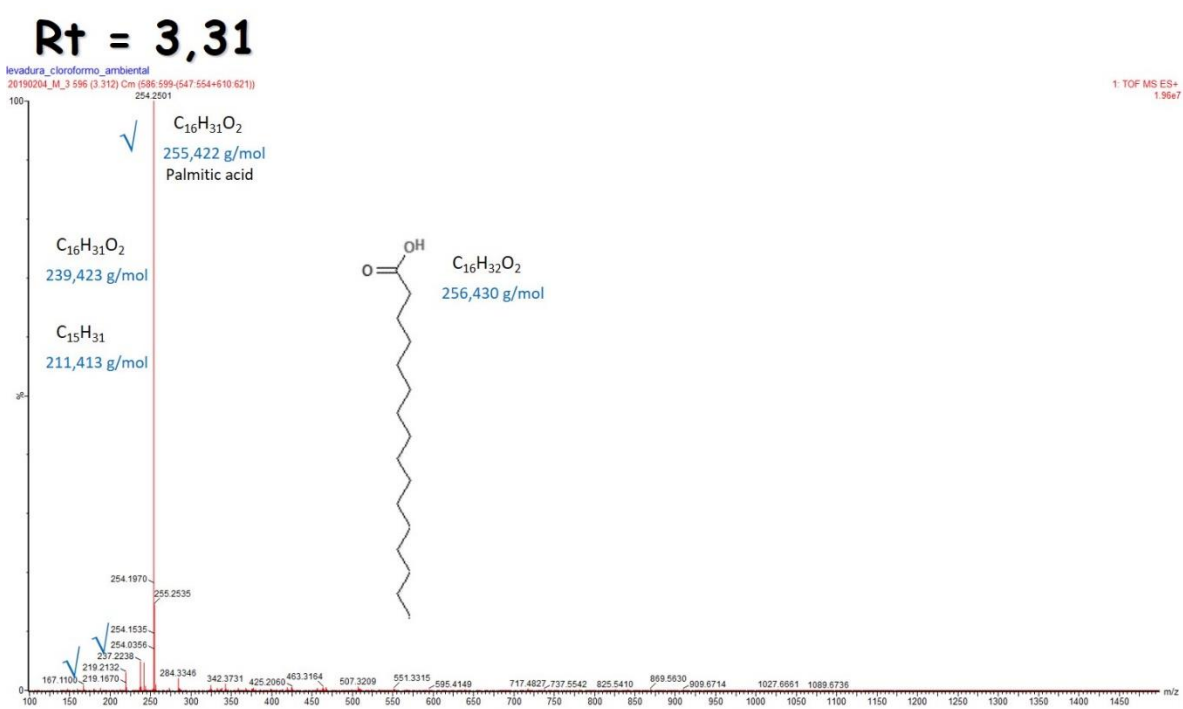


Figura Anexo 127. Espectro MS/MS para un Rt = 3,31 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

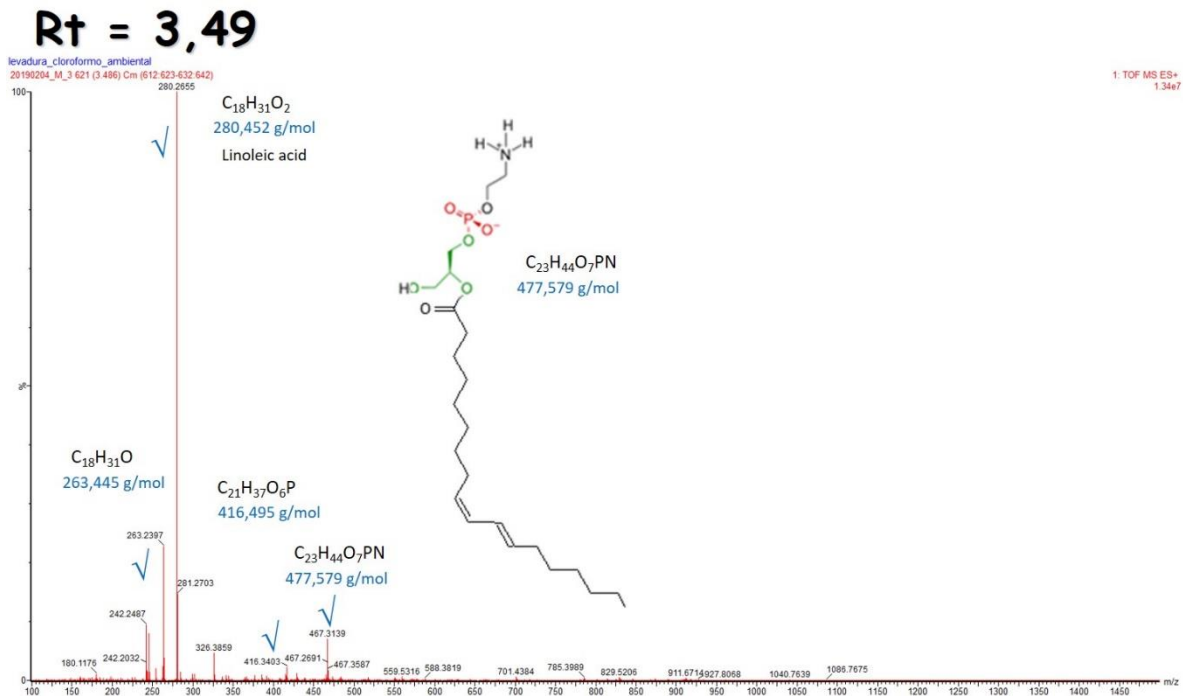


Figura Anexo 128. Espectro MS/MS para un Rt = 3,49 fracción cloroforno de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

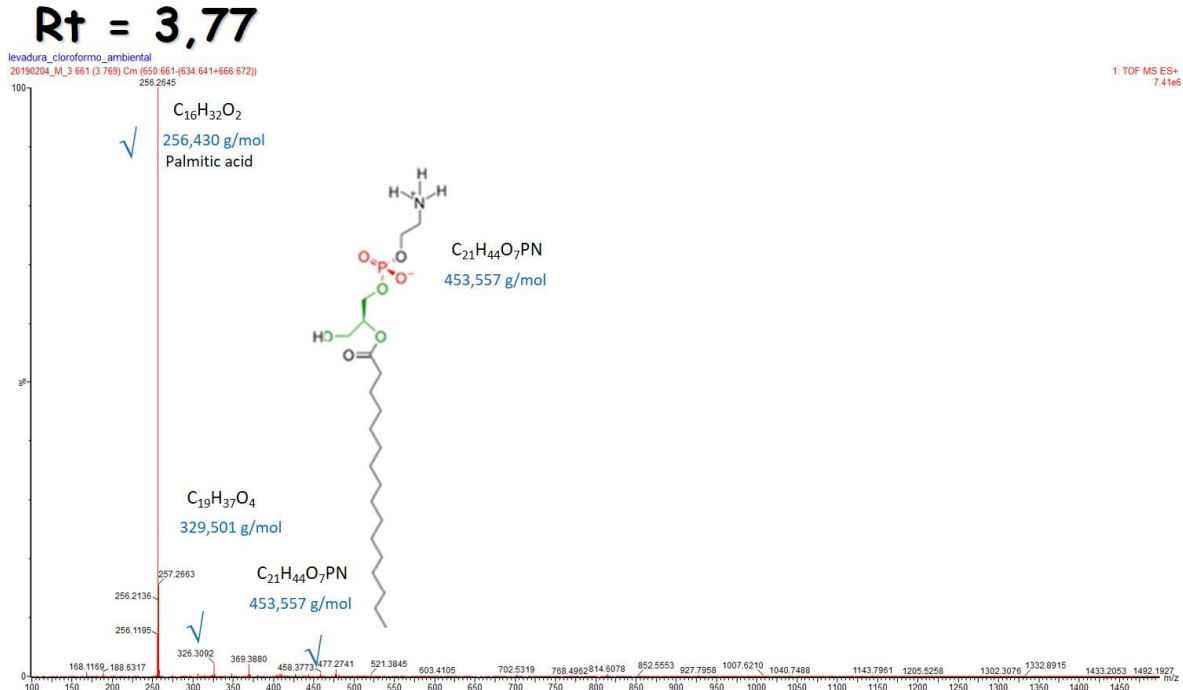


Figura Anexo 129. Espectro MS/MS para un Rt = 3,77 fracción cloroforno de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

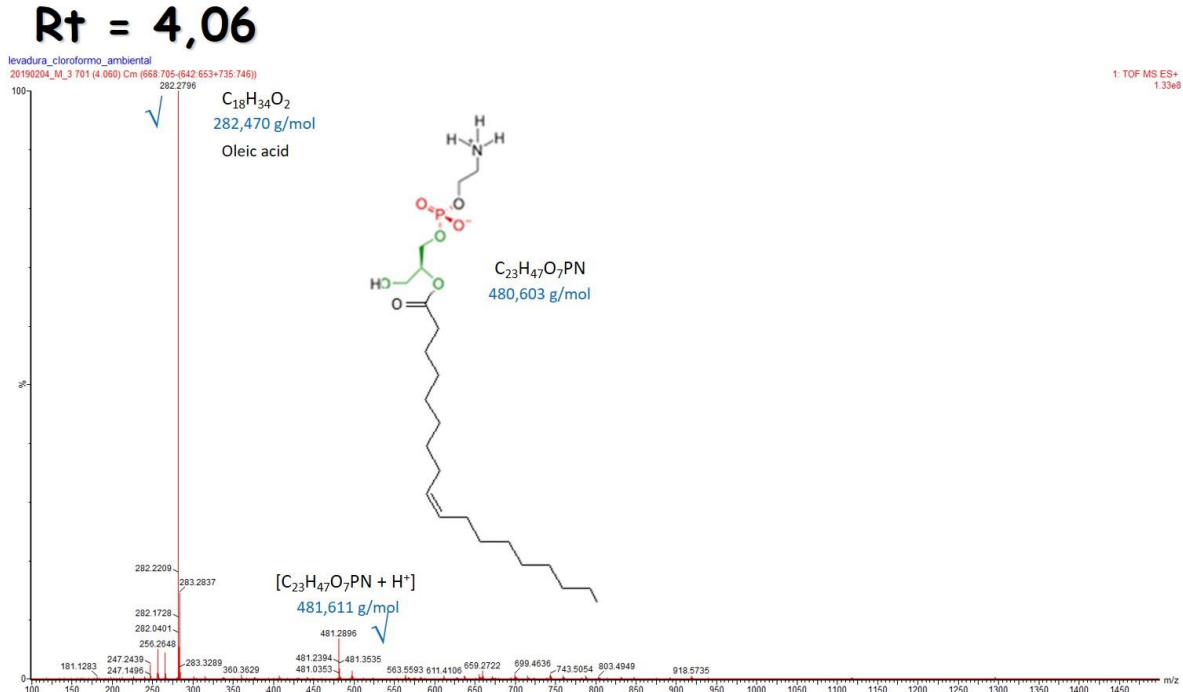


Figura Anexo 130. Espectro MS/MS para un Rt = 4,06 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

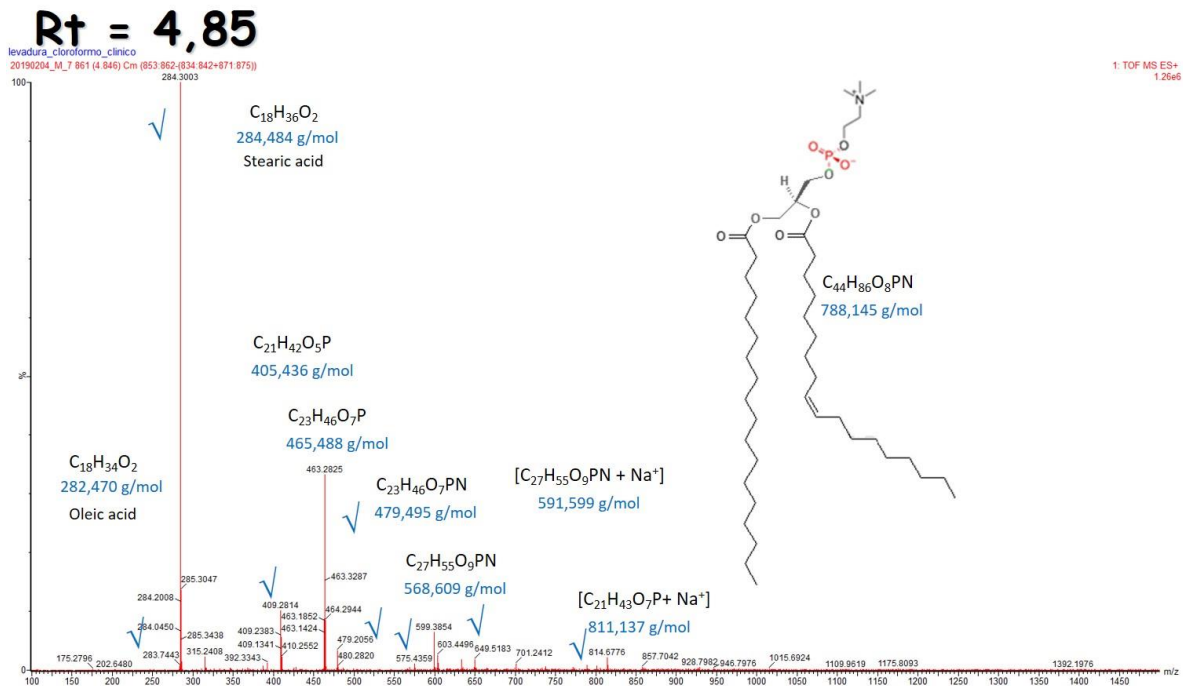


Figura Anexo 131. Espectro MS/MS para un Rt = 4,85 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

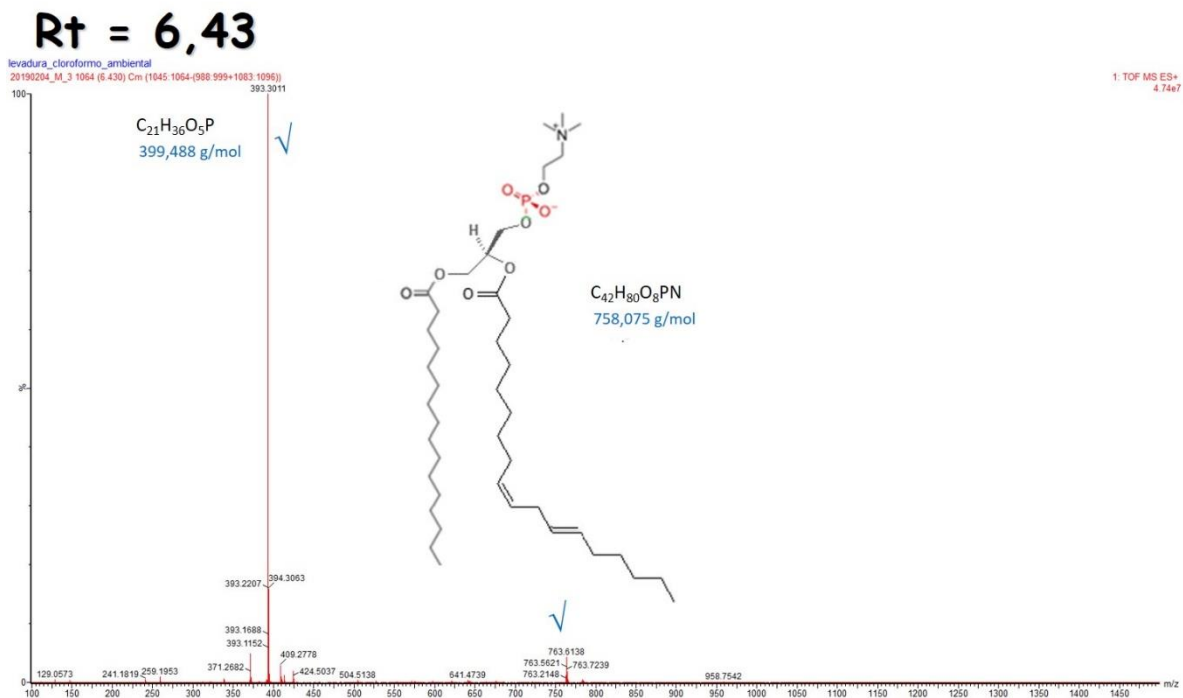


Figura Anexo 132. Espectro MS/MS para un Rt = 6,43 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamiento ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

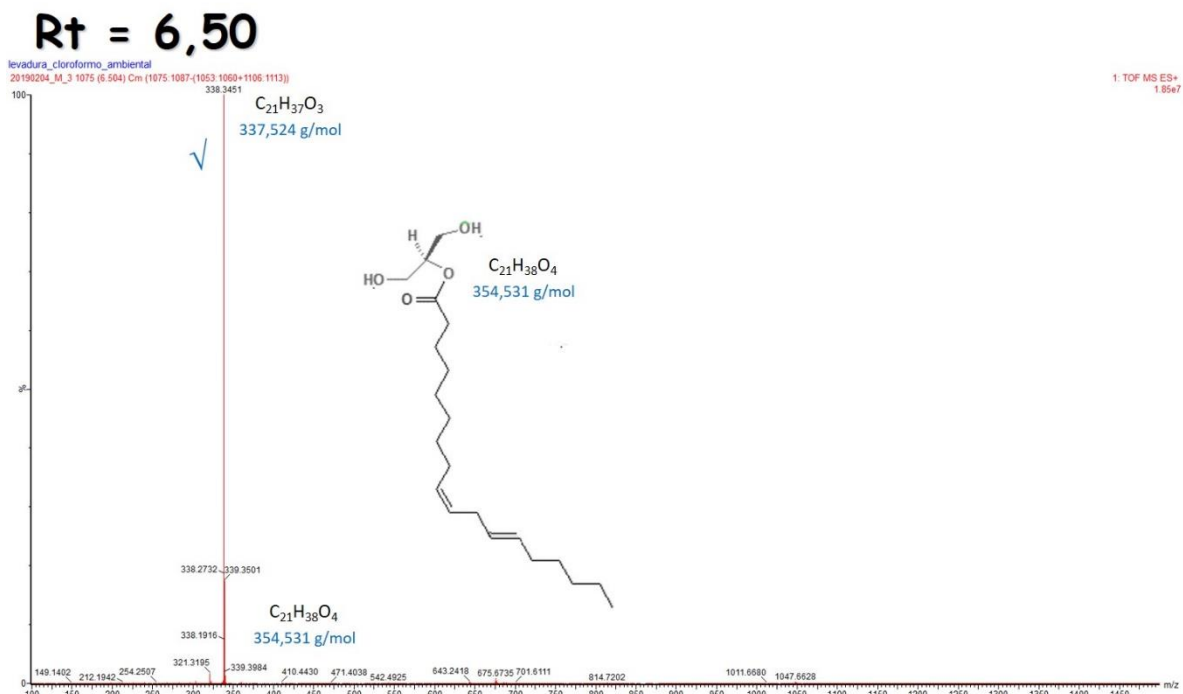


Figura Anexo 133. Espectro MS/MS para un Rt = 6,50 fracción cloroformo de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

11.9 Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

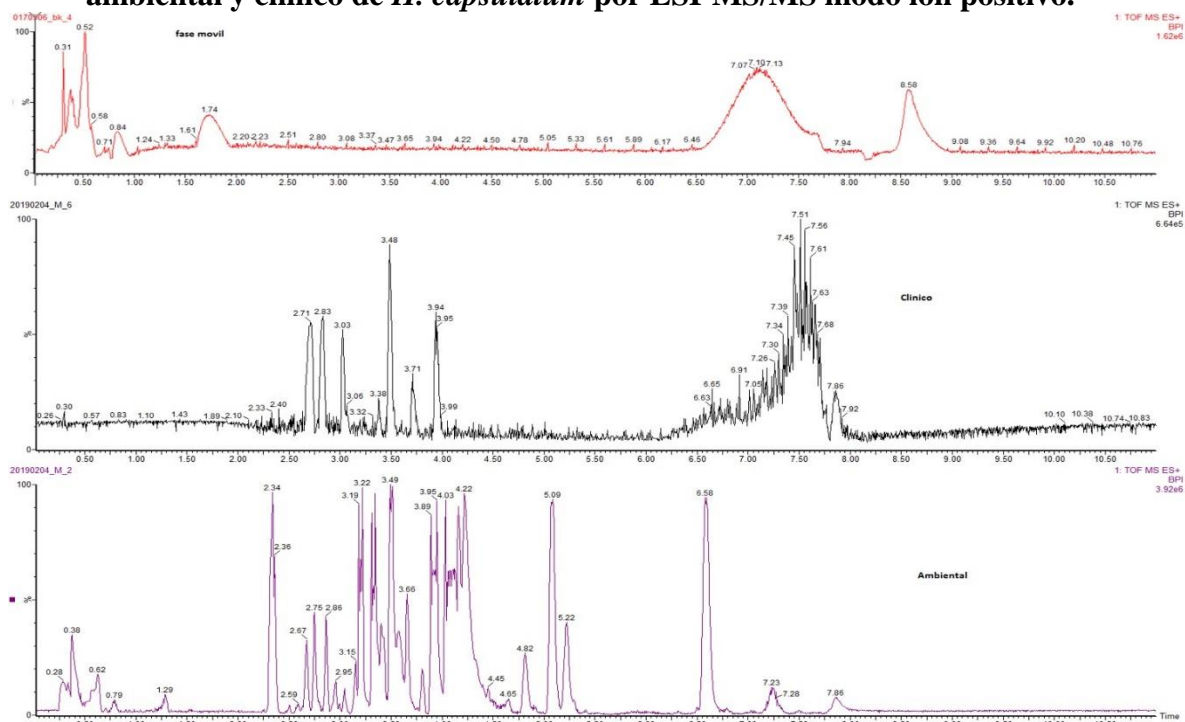


Figura Anexo 134. Análisis fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

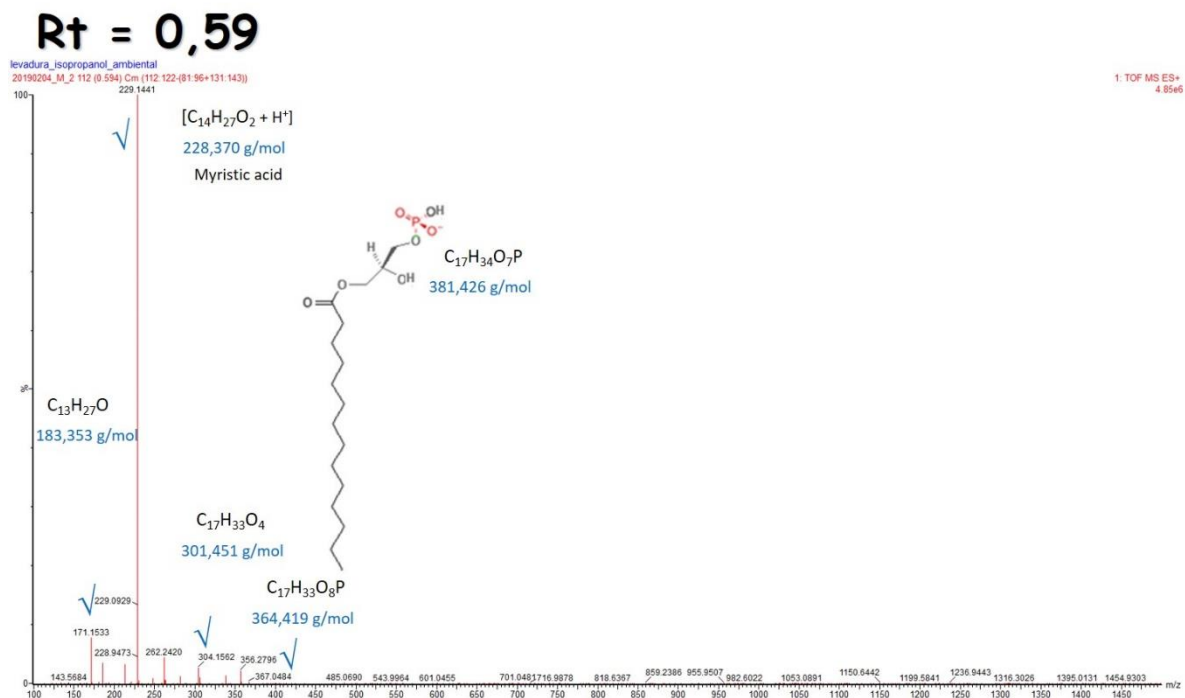


Figura Anexo 135. Espectro MS/MS para un Rt = 0,59 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

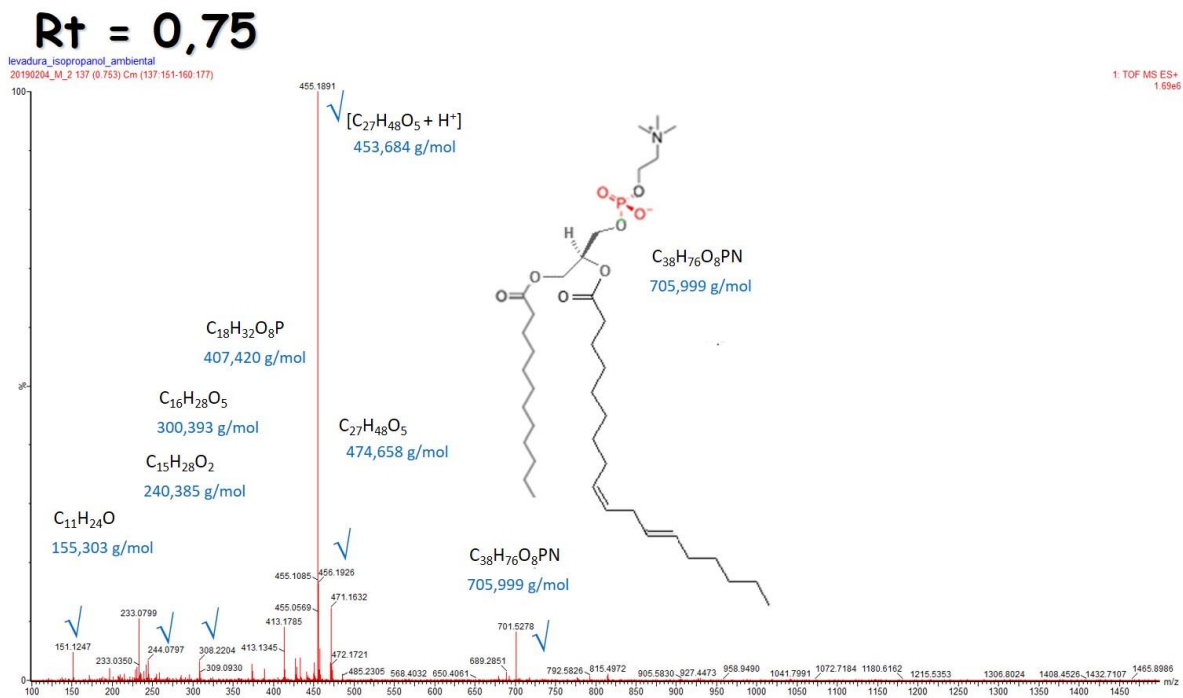


Figura Anexo 136. Espectro MS/MS para un Rt = 0,75 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

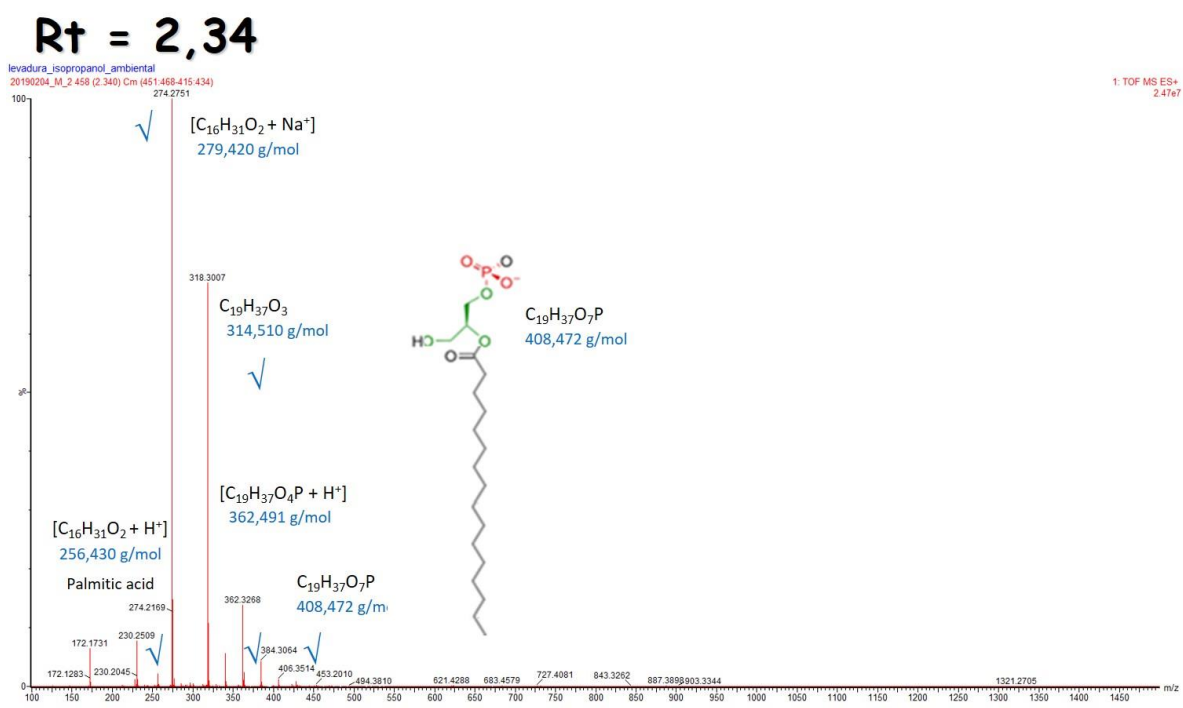


Figura Anexo 137. Espectro MS/MS para un Rt = 2,34 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

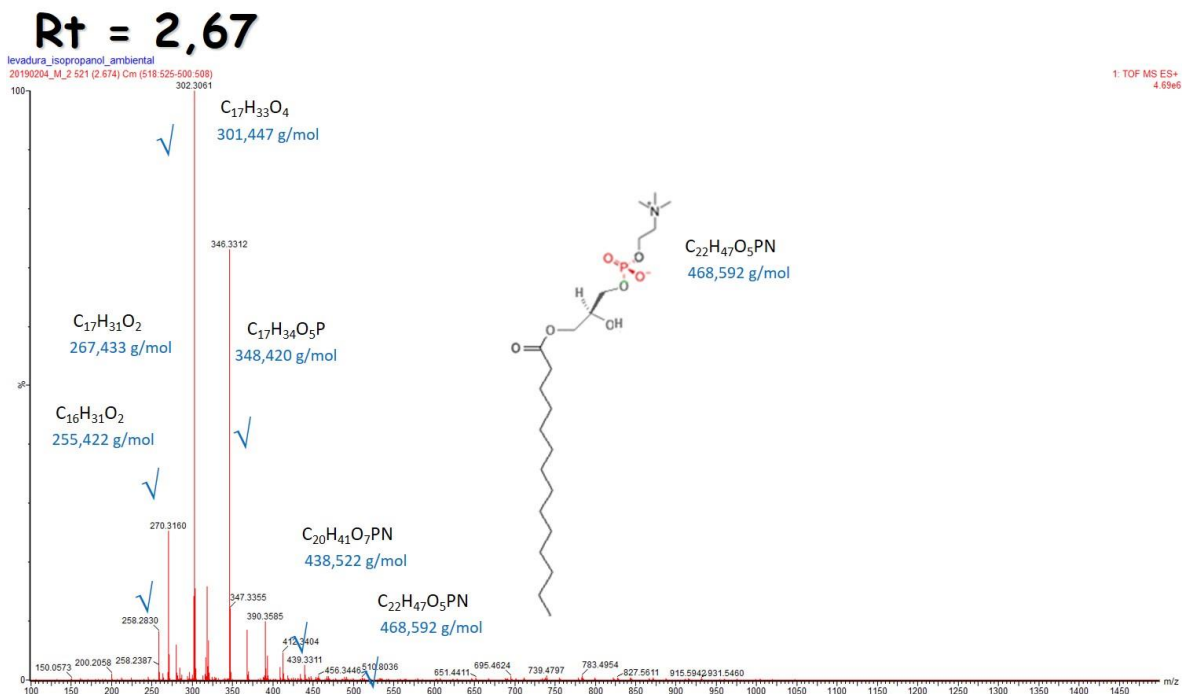


Figura Anexo 138. Espectro MS/MS para un Rt = 2,67 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

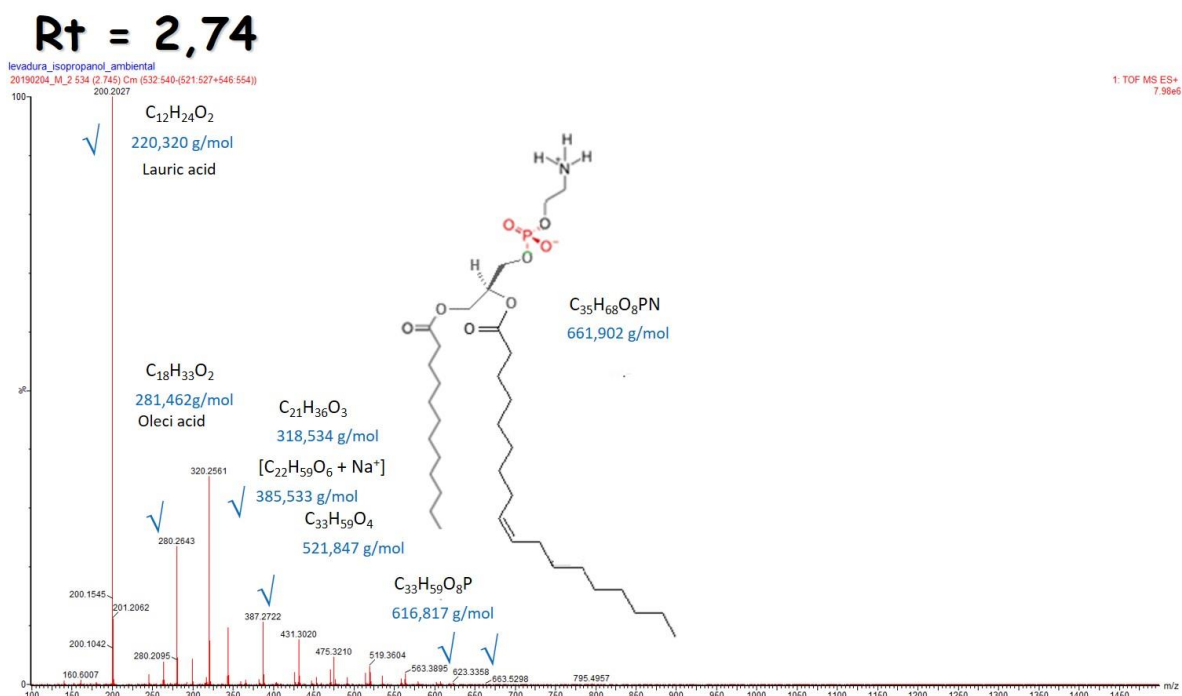


Figura Anexo 139. Espectro MS/MS para un Rt = 2,74 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

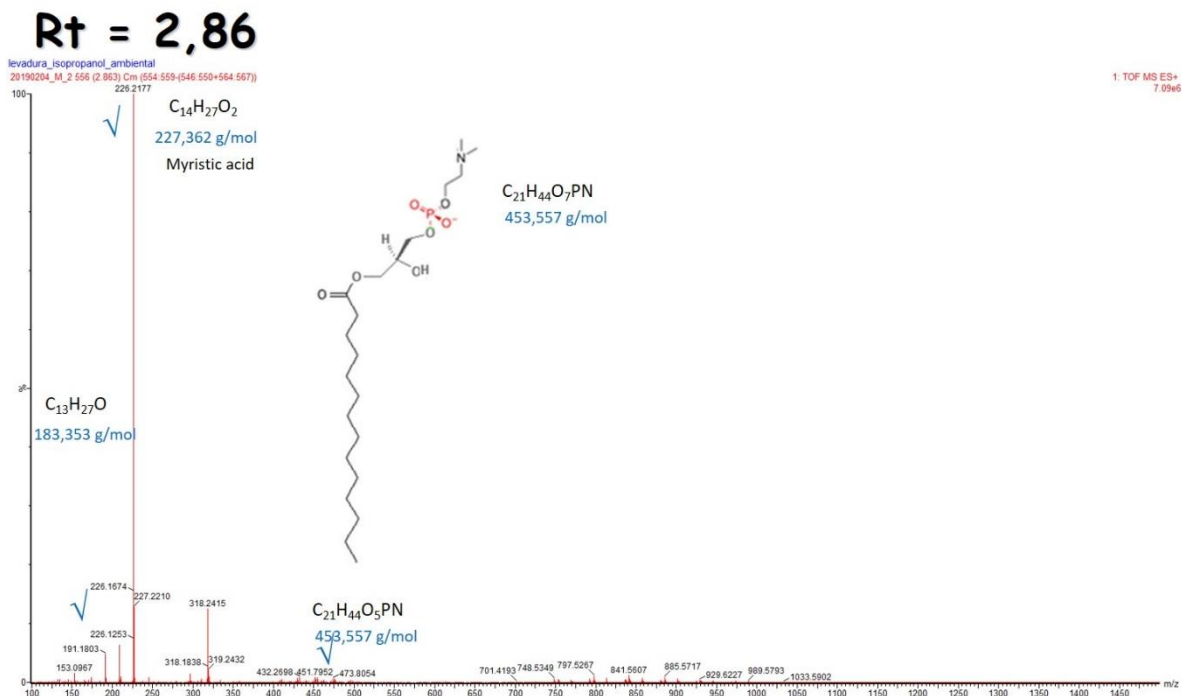


Figura Anexo 140. Espectro MS/MS para un Rt = 2,86 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

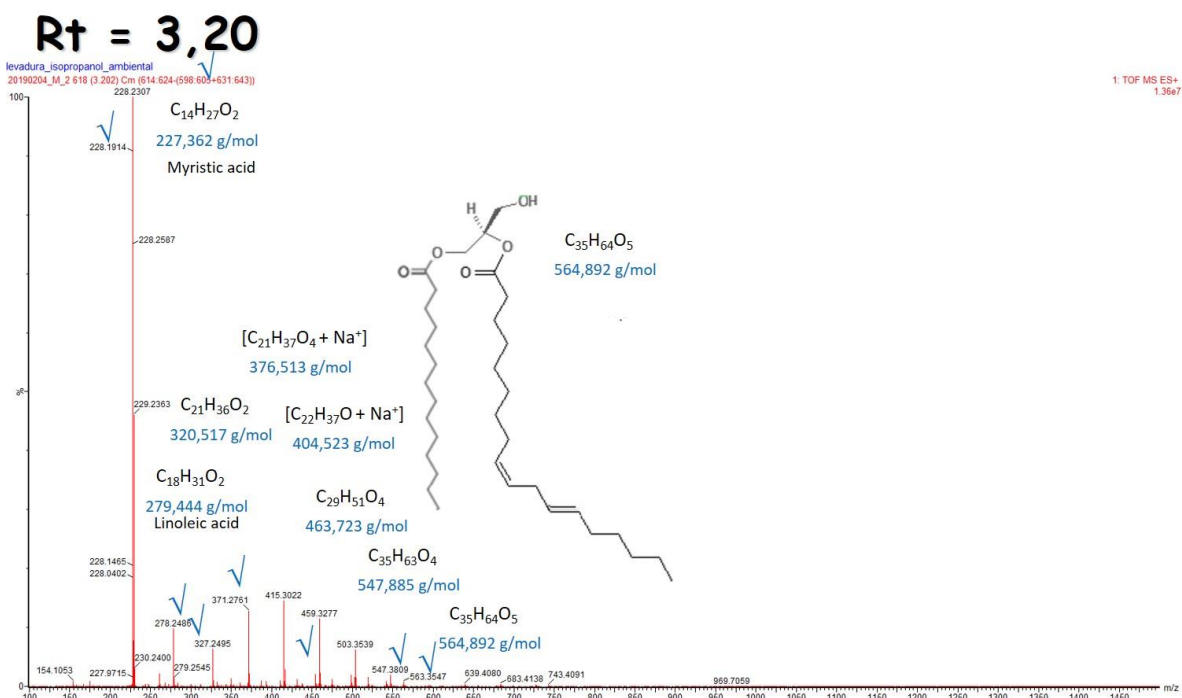


Figura Anexo 141. Espectro MS/MS para un Rt = 3,20 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

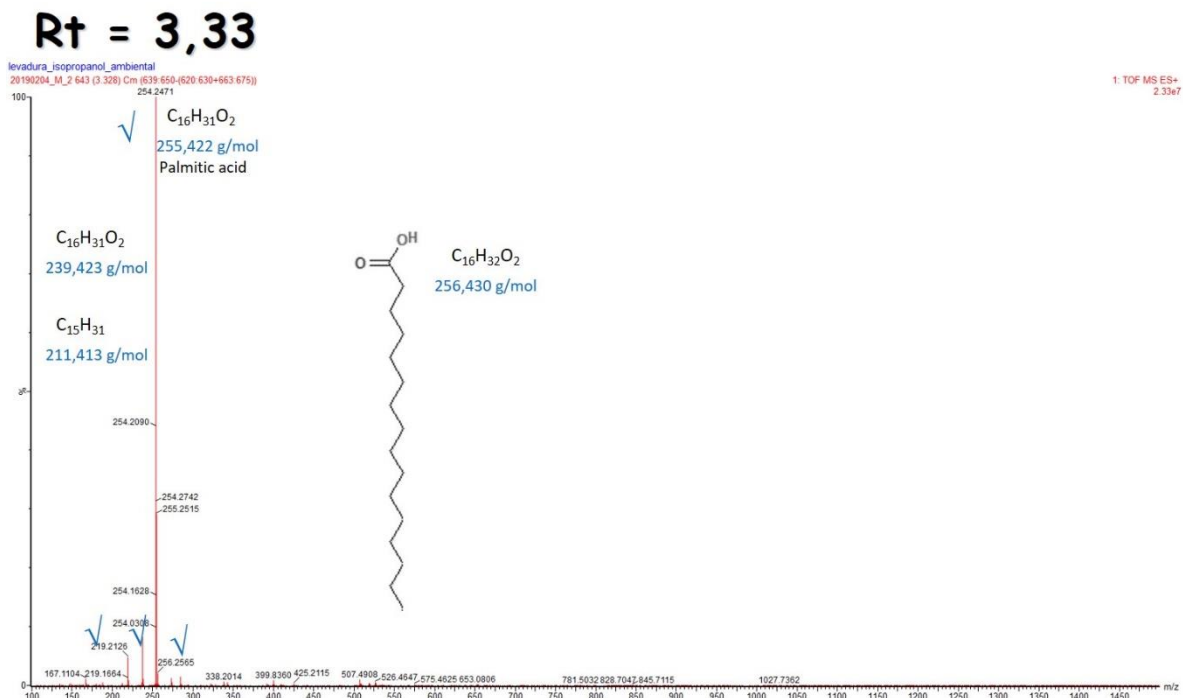


Figura Anexo 142. Espectro MS/MS para un Rt = 3,33 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

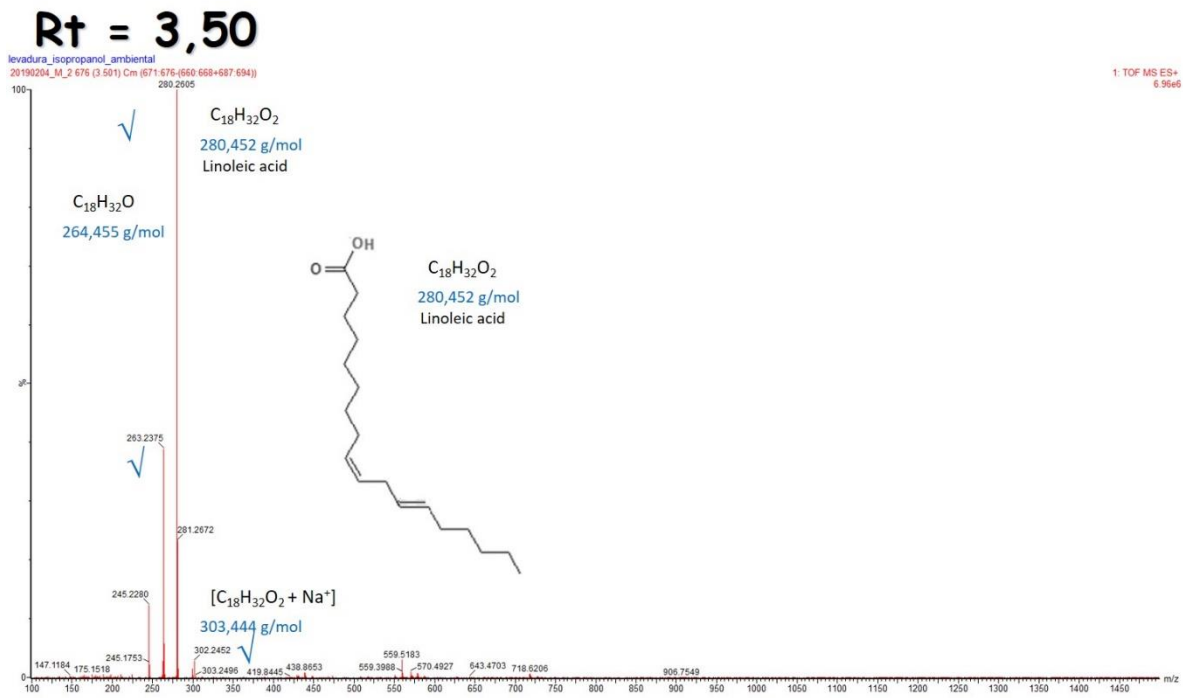


Figura Anexo 143. Espectro MS/MS para un Rt = 3,50 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

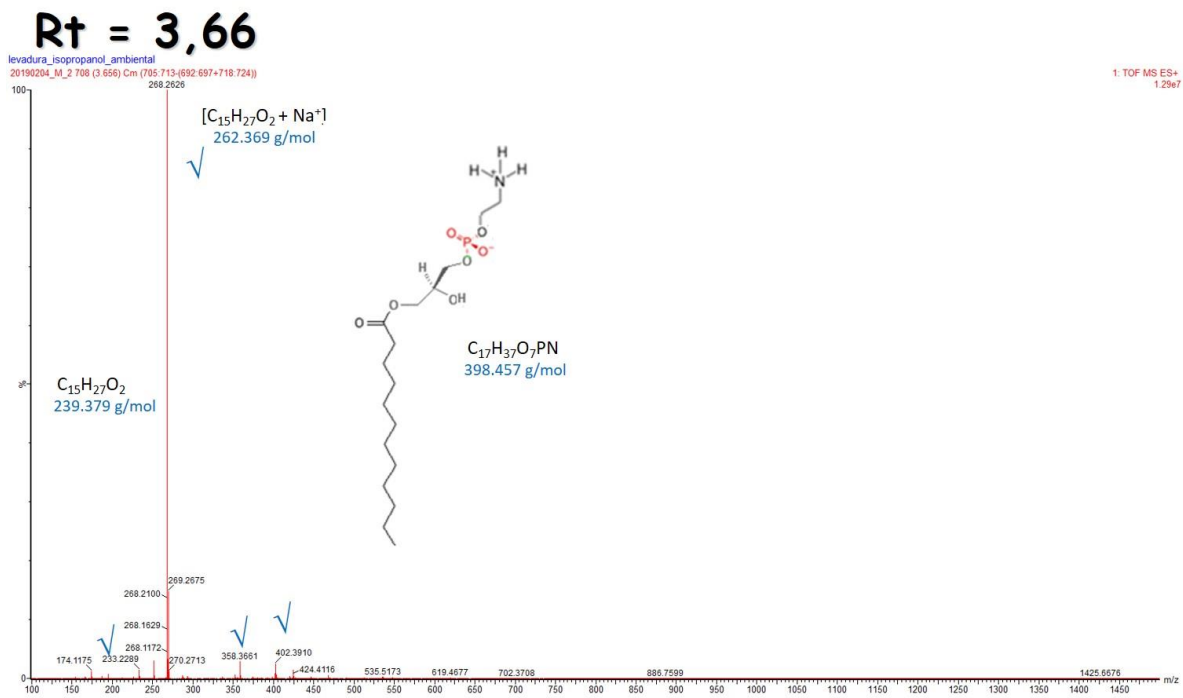


Figura Anexo 144. Espectro MS/MS para un Rt = 3,66 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

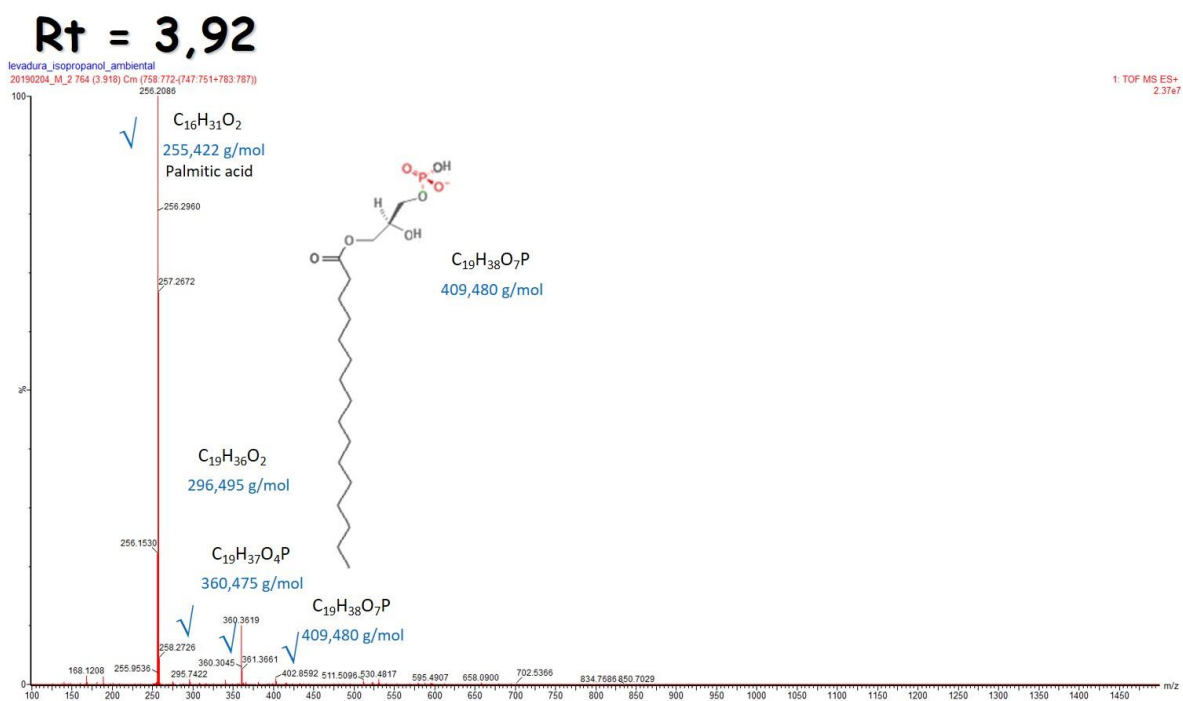


Figura Anexo 145. Espectro MS/MS para un Rt = 3,92 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

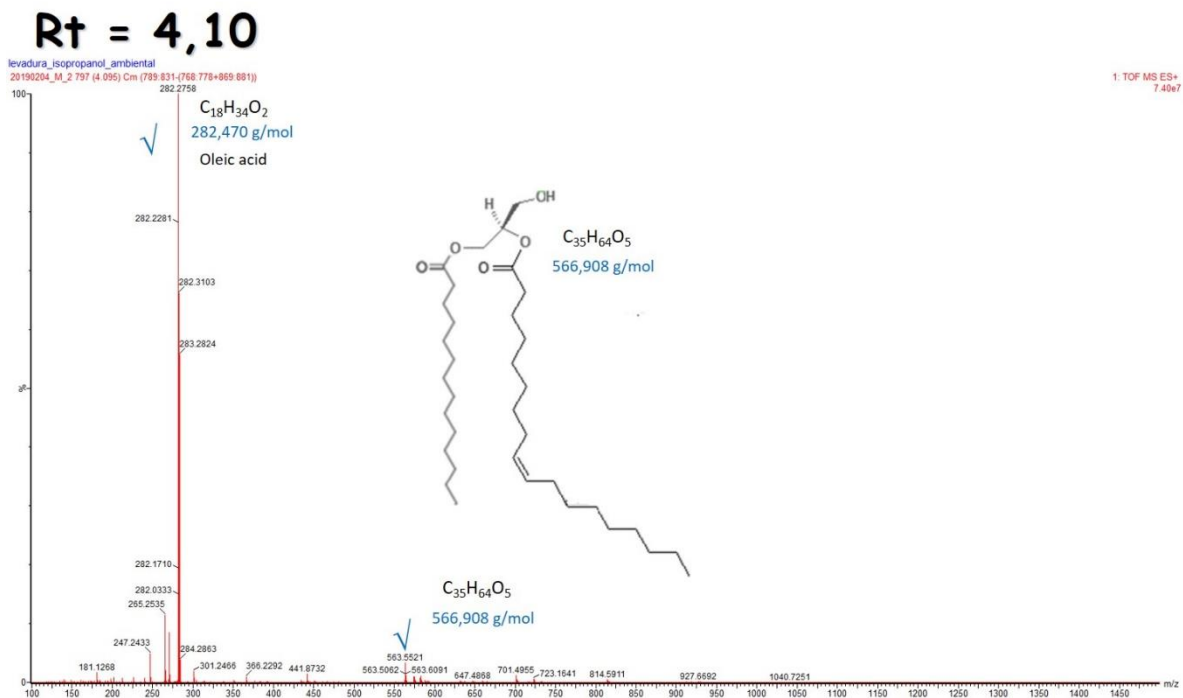


Figura Anexo 146. Espectro MS/MS para un Rt = 4,10 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

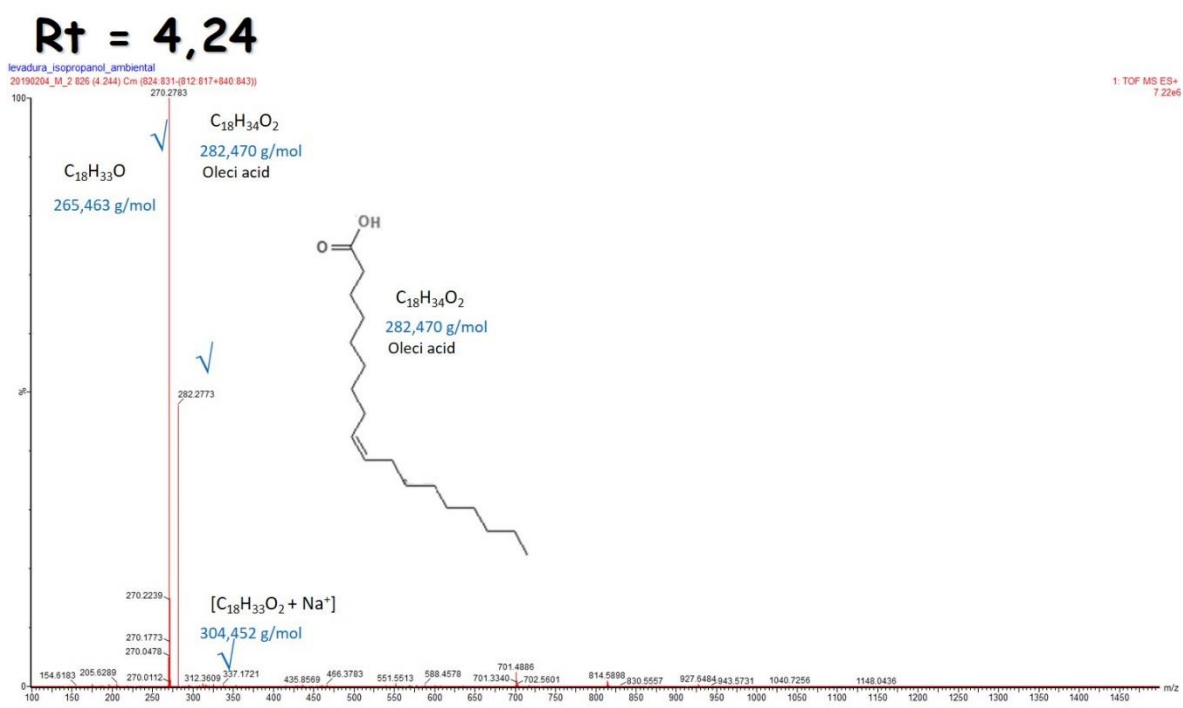


Figura Anexo 147. Espectro MS/MS para un Rt = 4,24 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 4,81

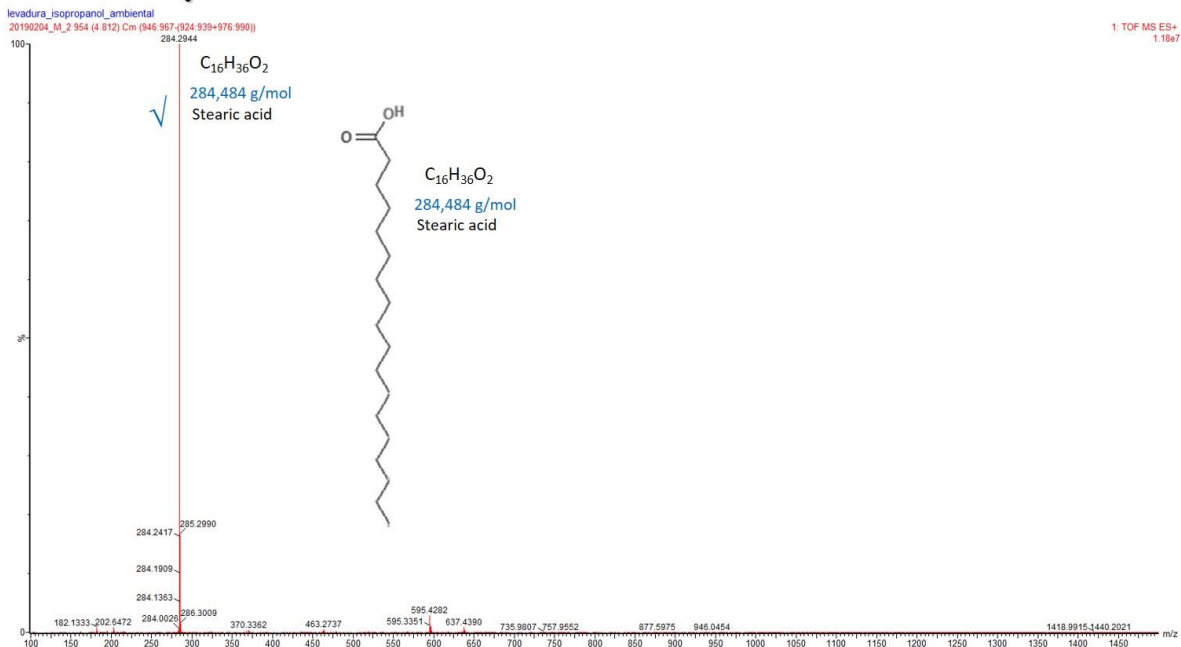


Figura Anexo 148. Espectro MS/MS para un Rt = 4,81 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 5,22

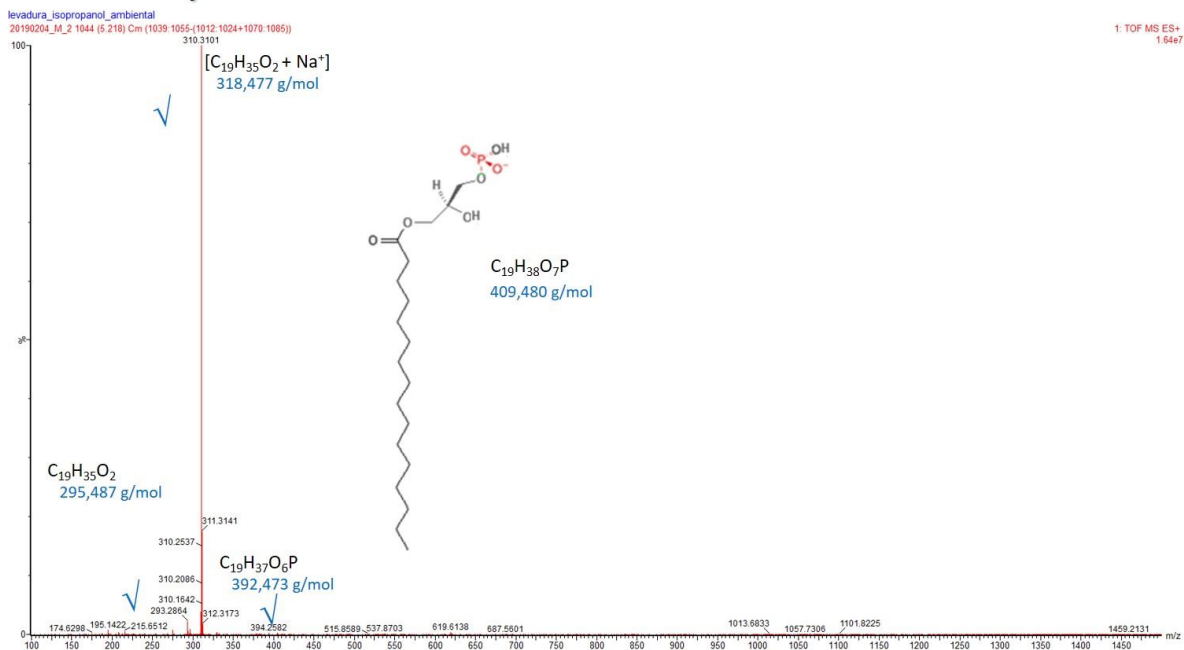


Figura Anexo 149. Espectro MS/MS para un Rt = 5,22 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 6,59

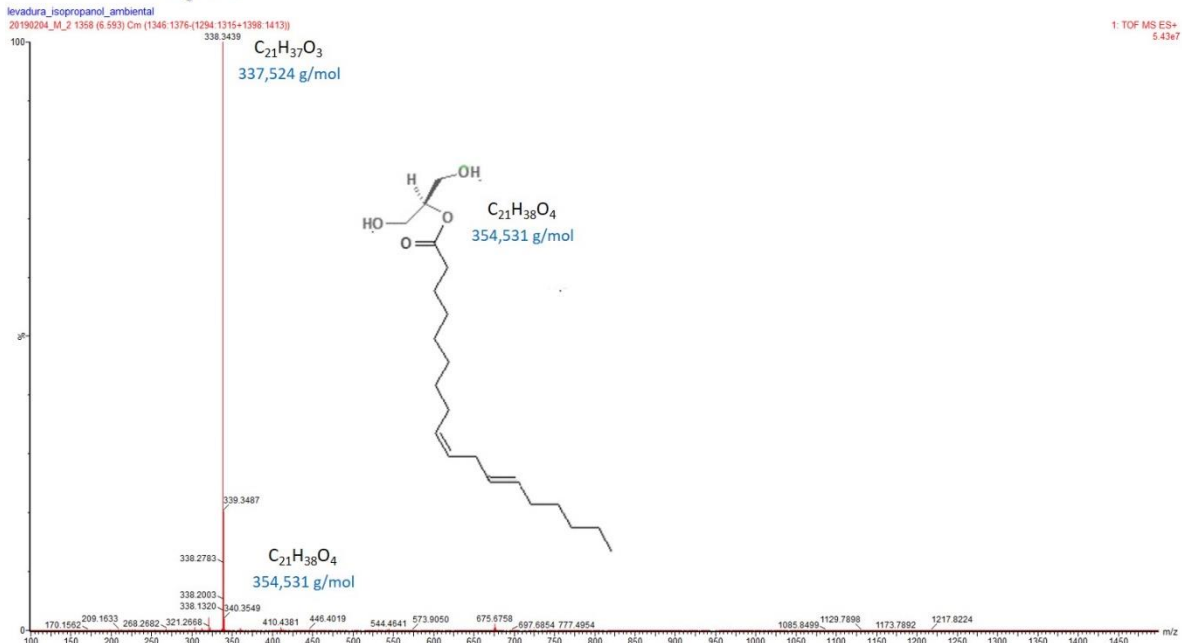


Figura Anexo 150. Espectro MS/MS para un Rt = 6,59 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

Rt = 7,25

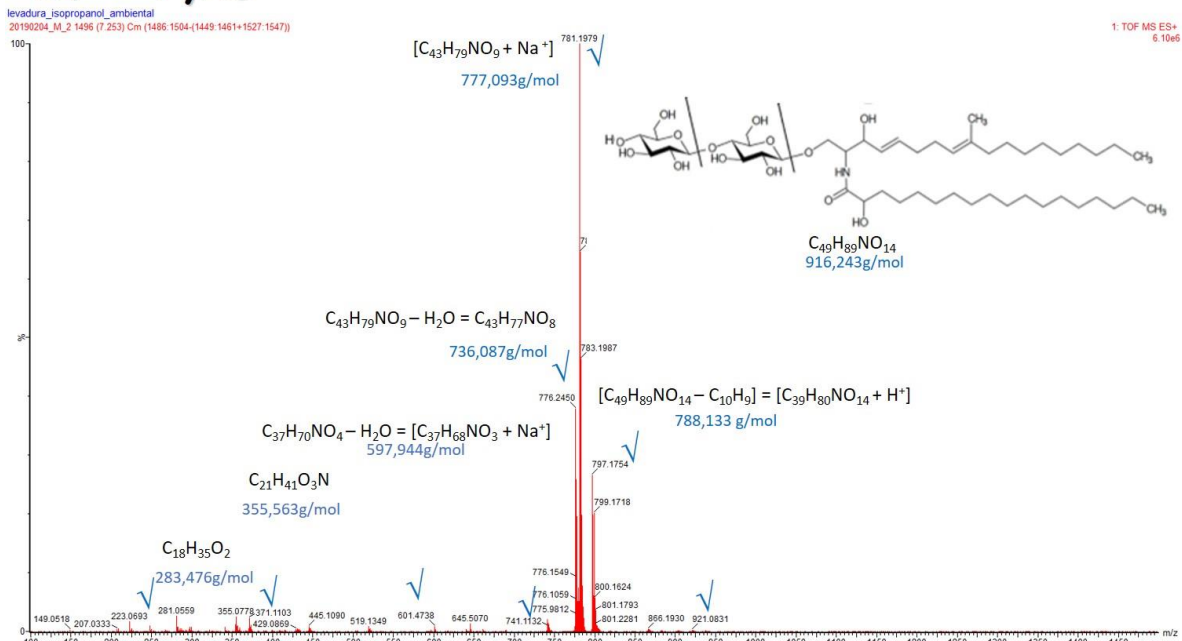


Figura Anexo 151. Espectro MS/MS para un Rt = 7,25 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 7,57

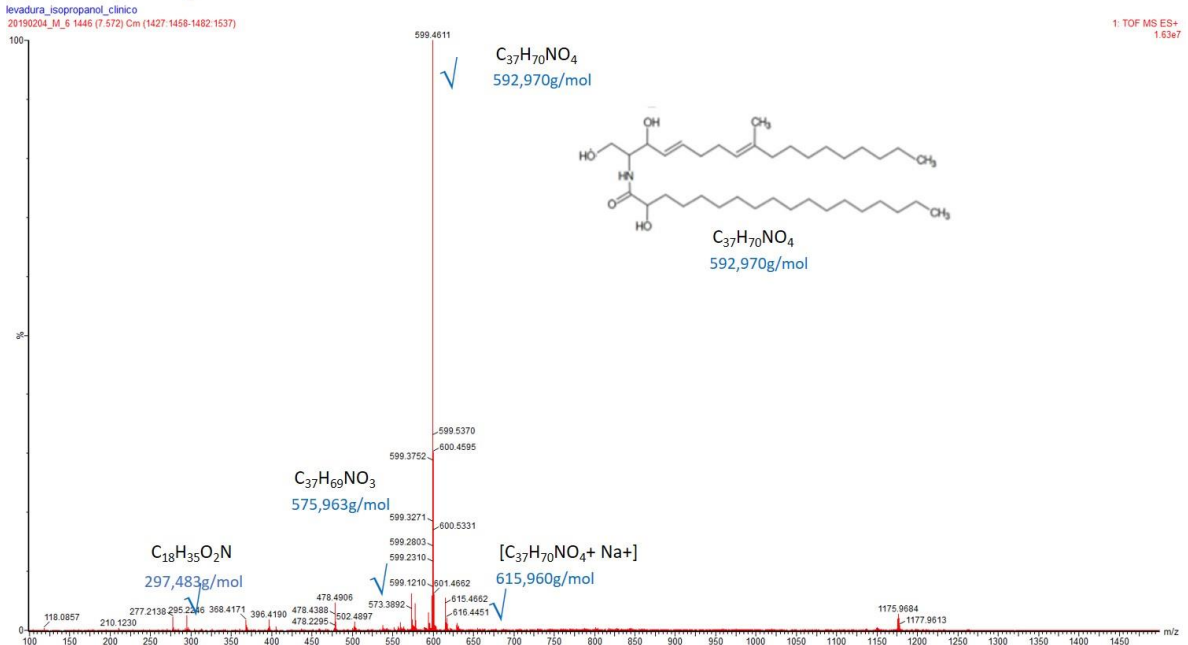


Figura Anexo 152. Espectro MS/MS para un Rt = 7,57 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 2,72

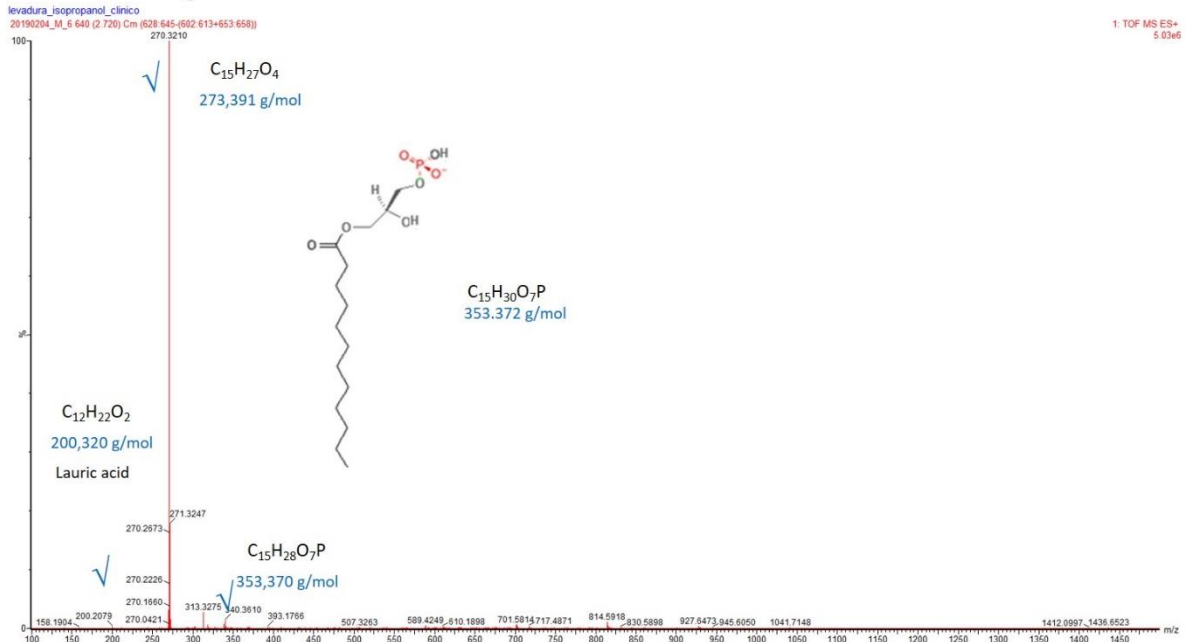


Figura Anexo 153. Espectro MS/MS para un Rt = 2,72 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

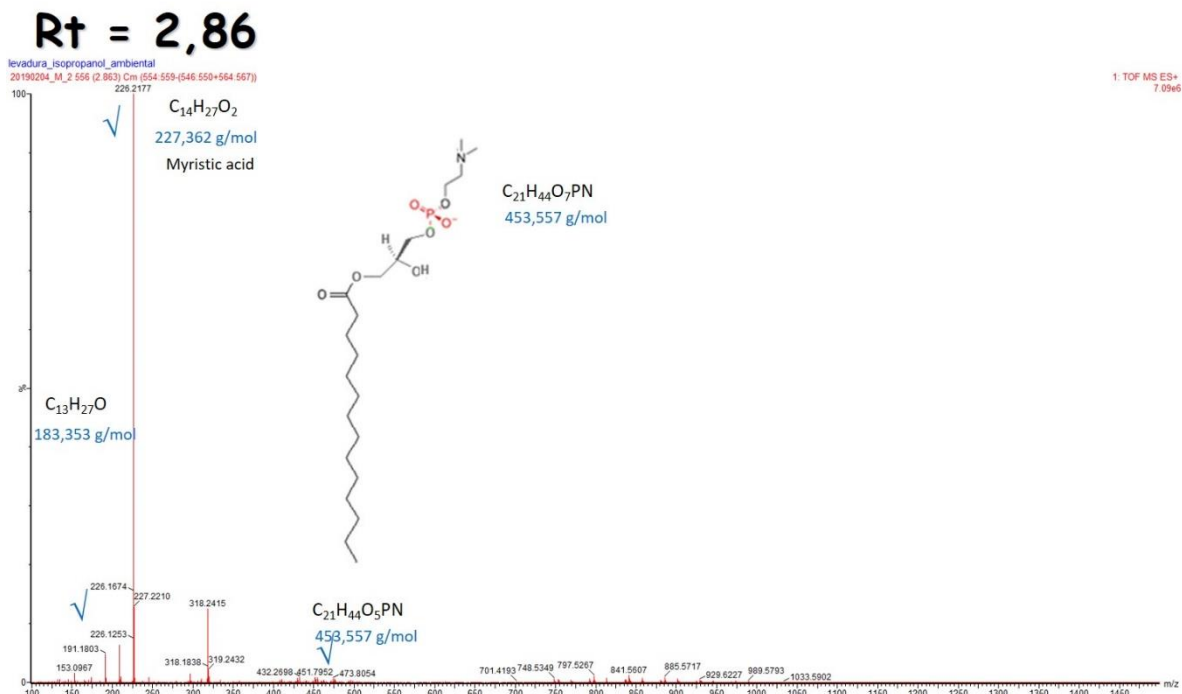


Figura Anexo 154. Espectro MS/MS para un Rt = 2,86 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

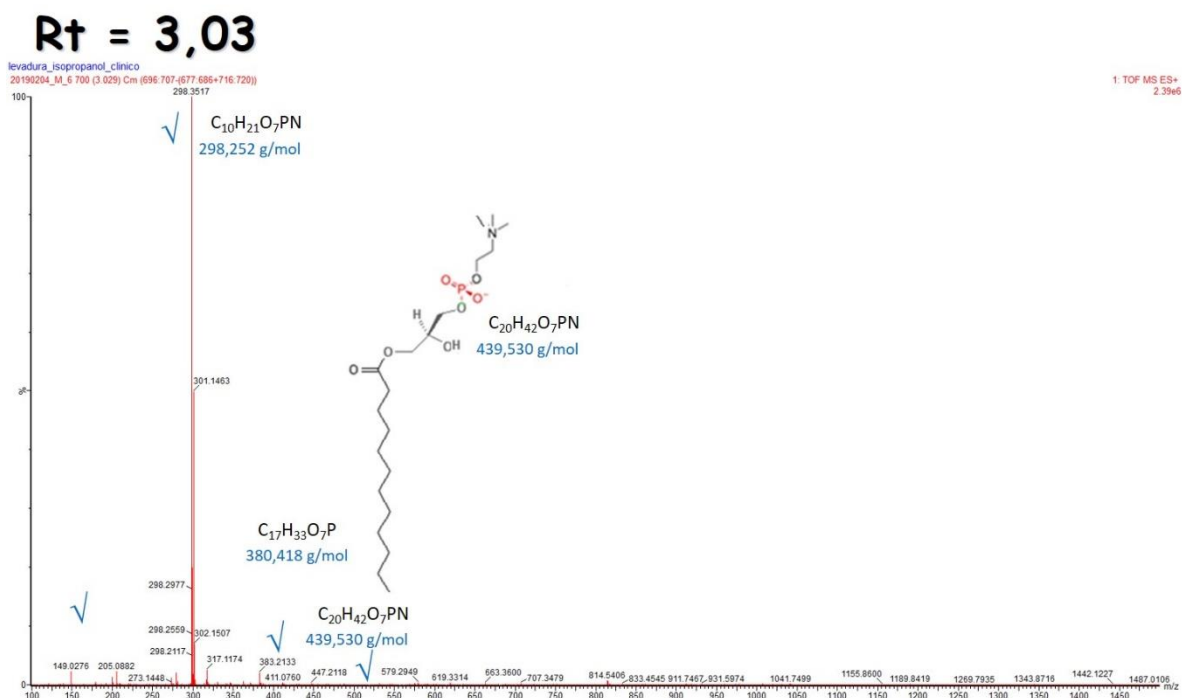


Figura Anexo 155. Espectro MS/MS para un Rt = 3,03 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 3,04

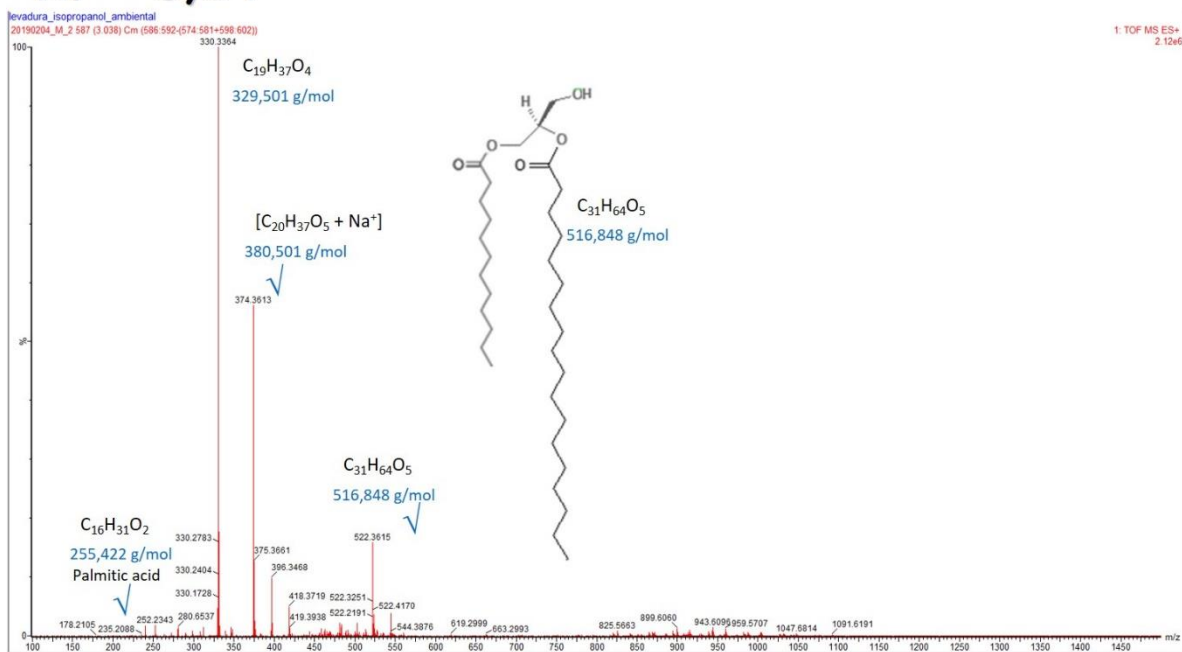


Figura Anexo 156. Espectro MS/MS para un Rt = 3,04 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

Rt = 3,33

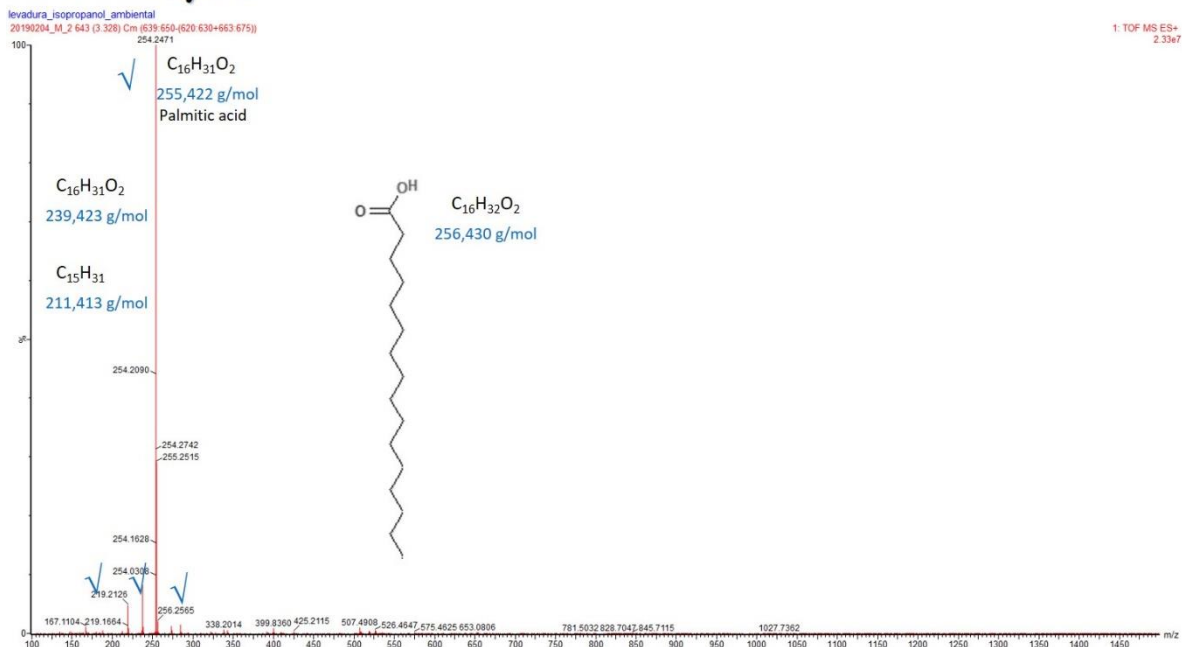


Figura Anexo 157. Espectro MS/MS para un Rt = 3,33 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

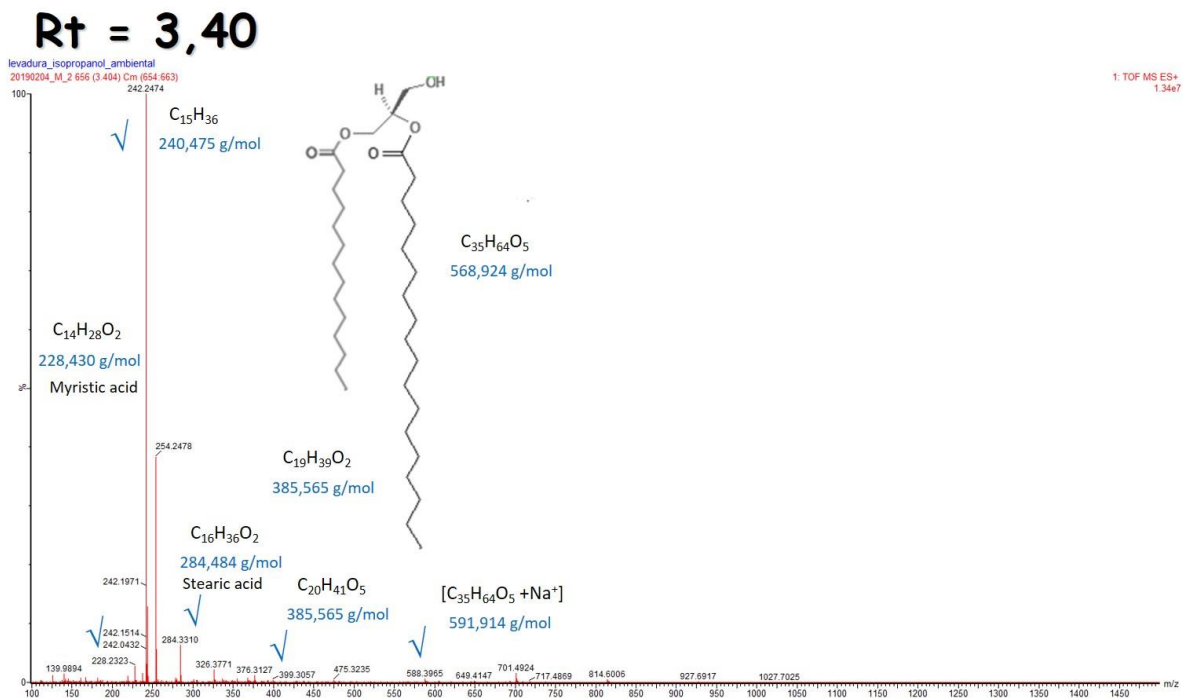


Figura Anexo 158. Espectro MS/MS para un Rt = 3,40 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

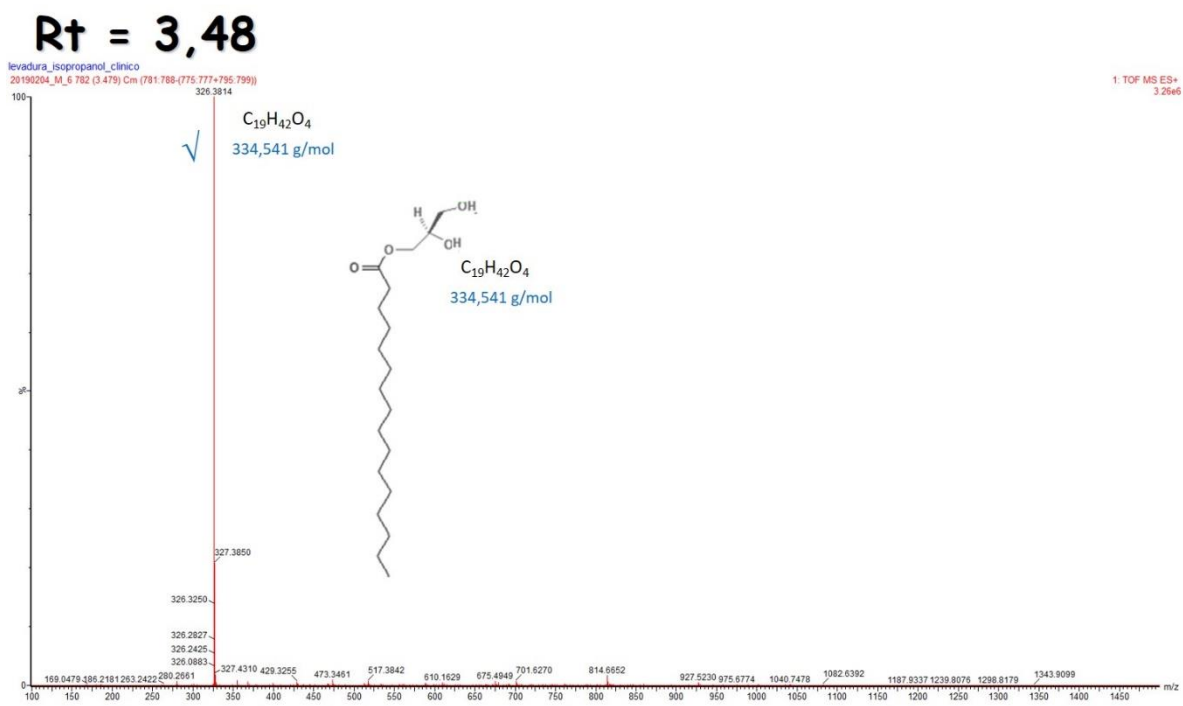


Figura Anexo 159. Espectro MS/MS para un Rt = 3,48 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

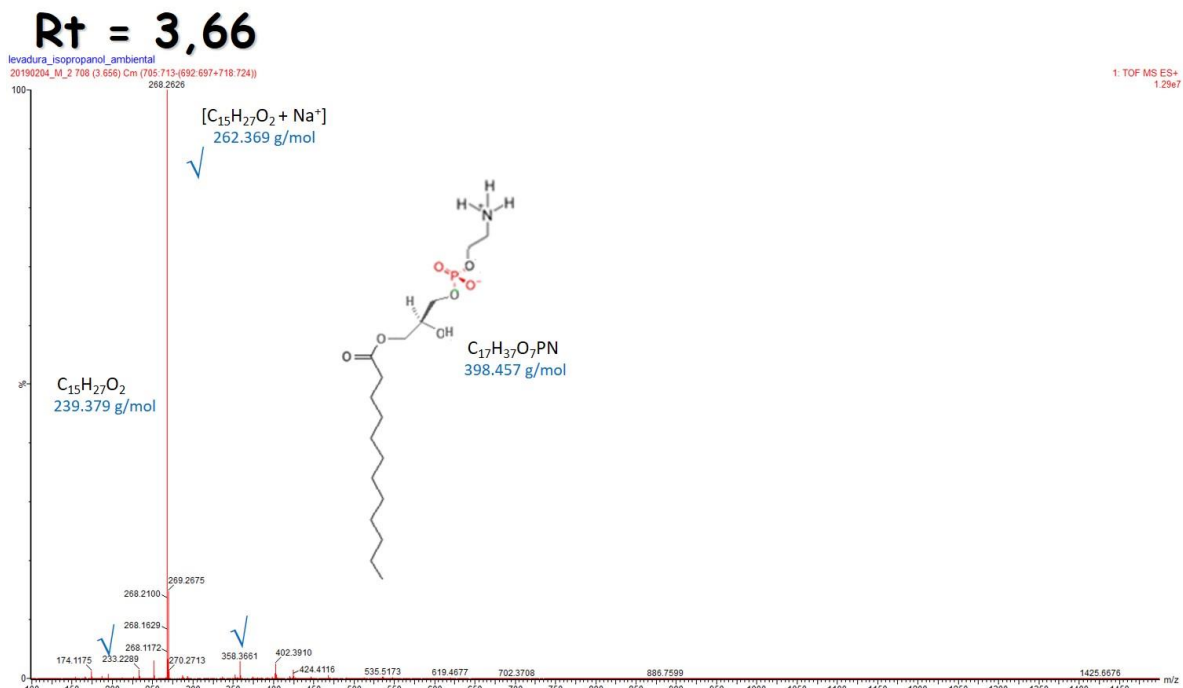


Figura Anexo 160. Espectro MS/MS para un Rt = 3,66 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

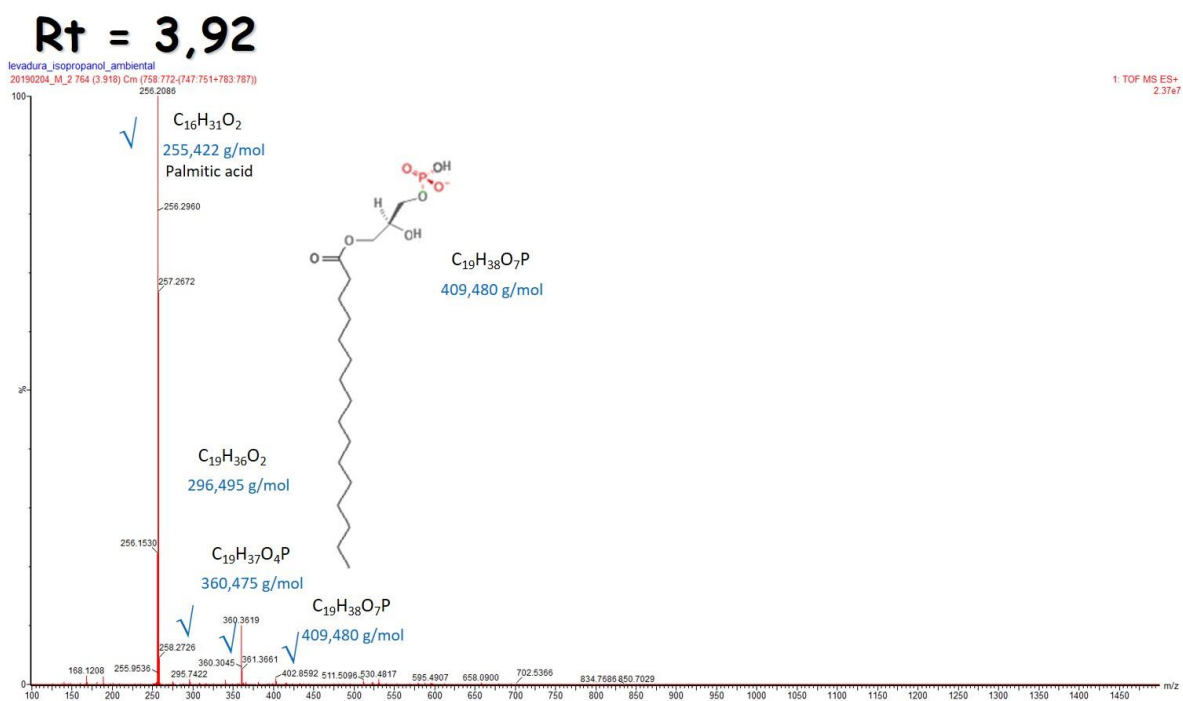


Figura Anexo 161. Espectro MS/MS para un Rt = 3,92 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

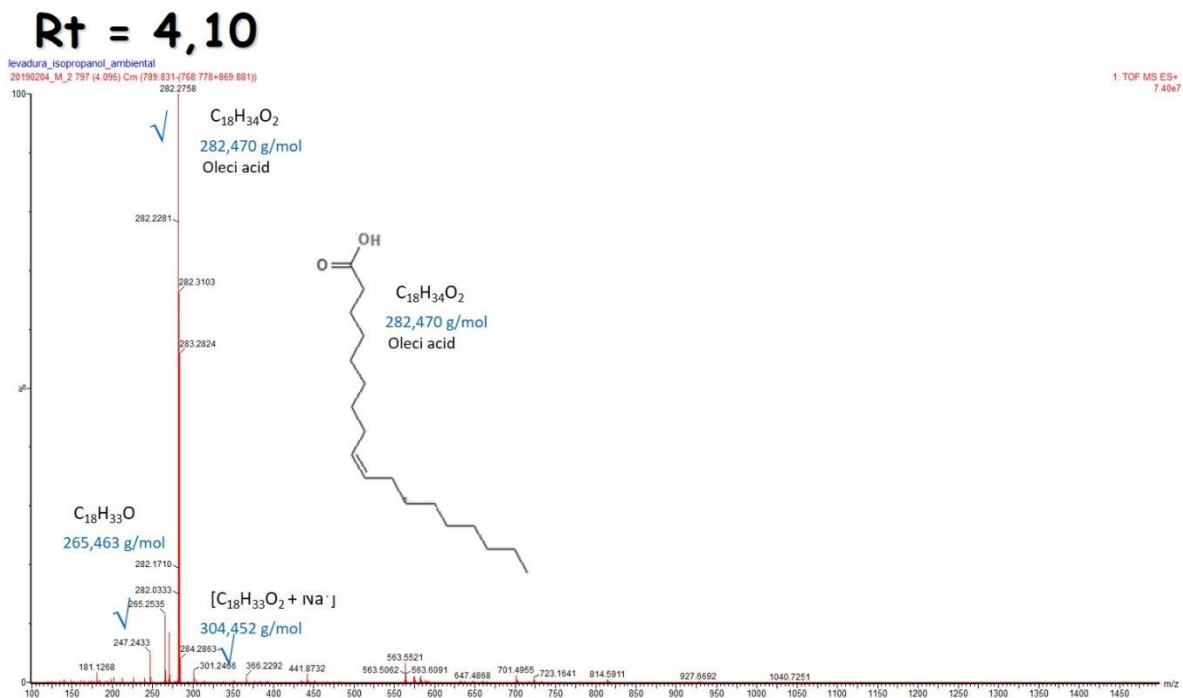


Figura Anexo 162. Espectro MS/MS para un Rt = 4,10 fracción isopropanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

11.10 Análisis fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

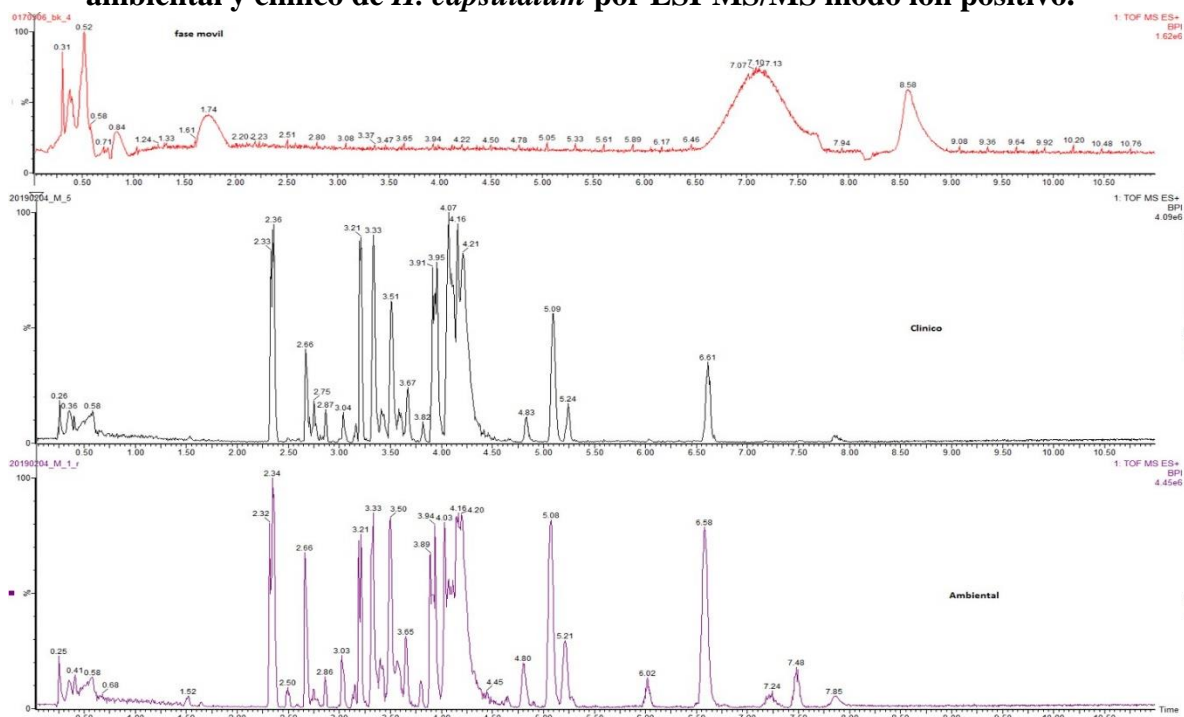


Figura Anexo 163. Análisis fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum* por ESI-MS/MS modo ion positivo.

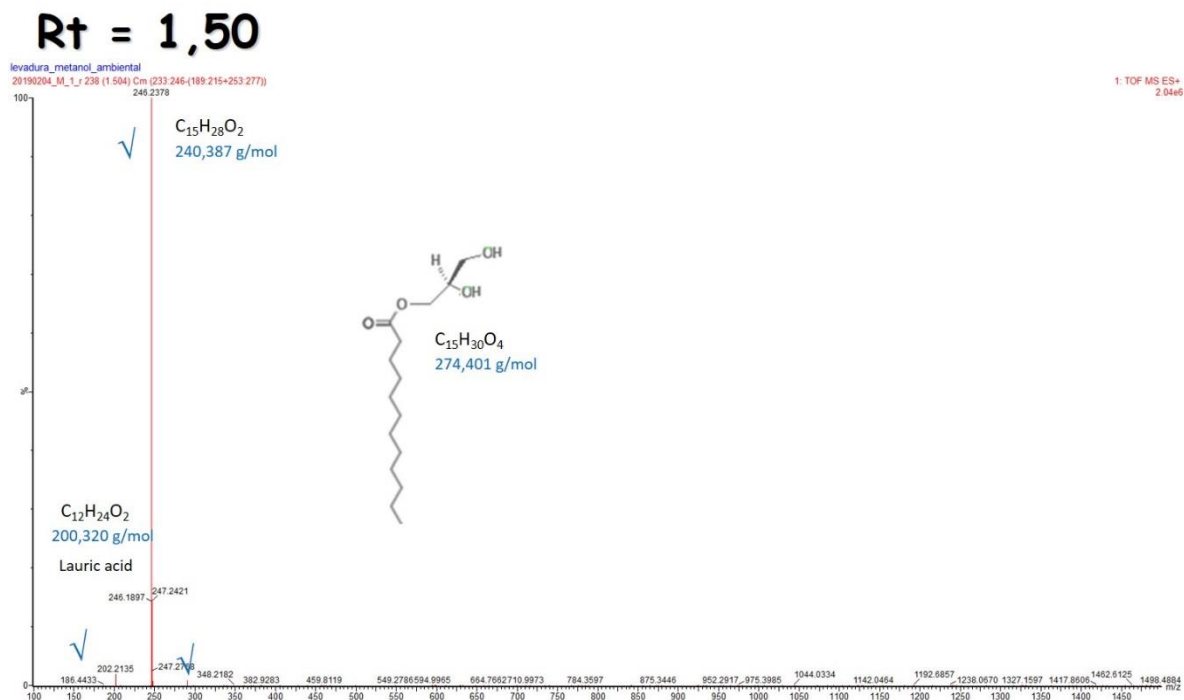


Figura Anexo 164. Espectro MS/MS para un Rt = 1,50 fracción metanol de extracto lipídico de levadura del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

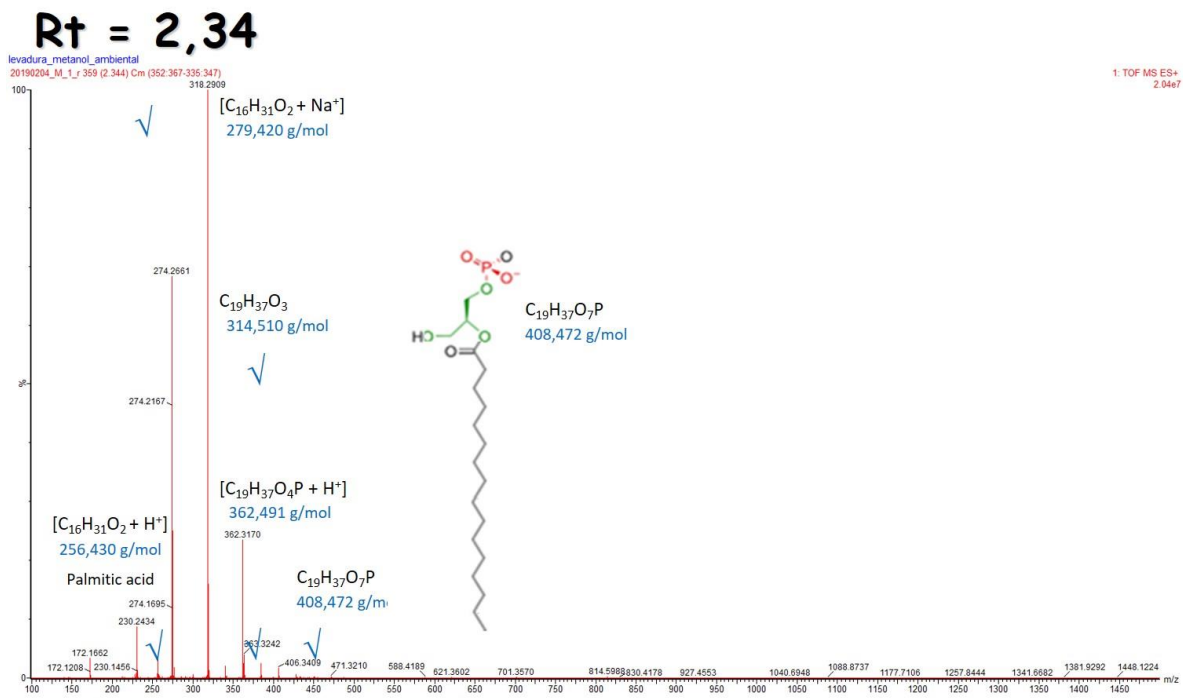


Figura Anexo 165. Espectro MS/MS para un Rt = 2,34 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

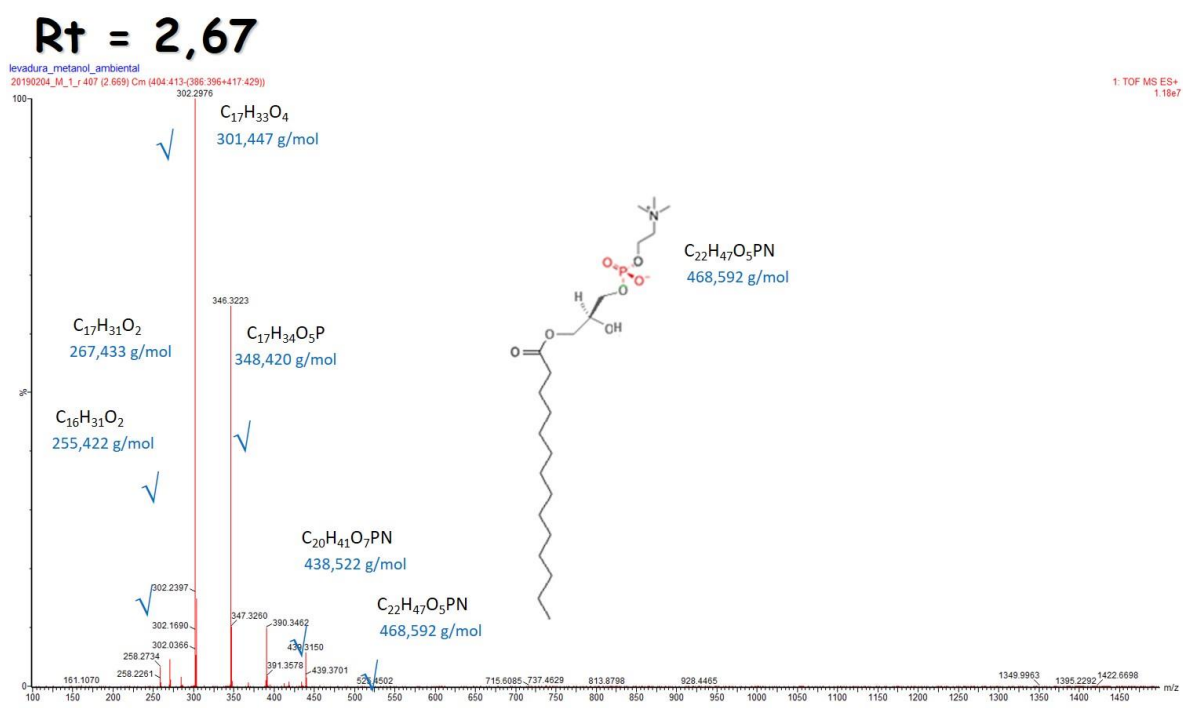


Figura Anexo 166. Espectro MS/MS para un Rt = 2,67 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

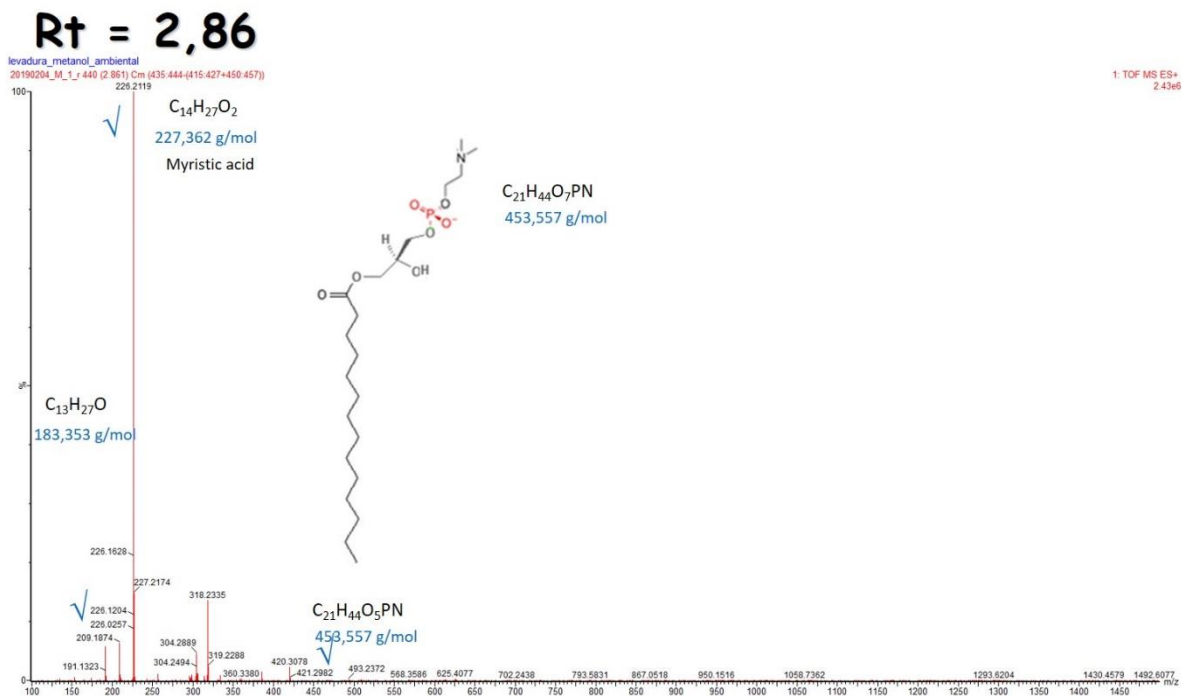


Figura Anexo 167. Espectro MS/MS para un Rt = 2,86 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

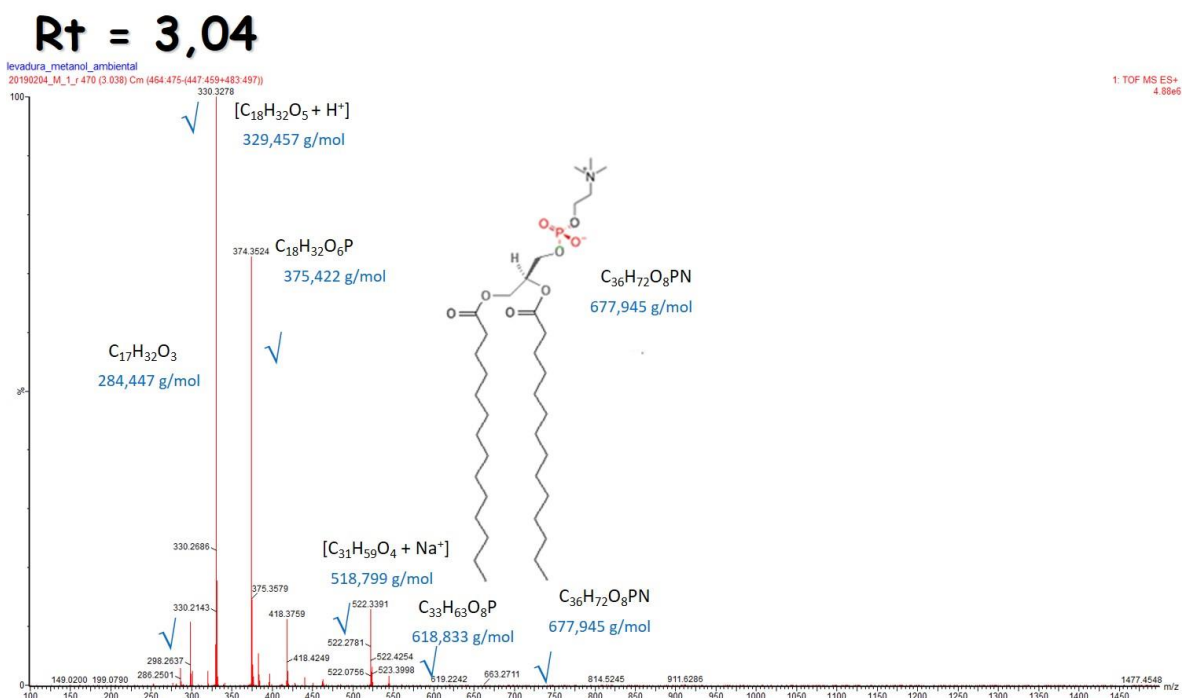


Figura Anexo 168. Espectro MS/MS para un Rt = 3,04 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

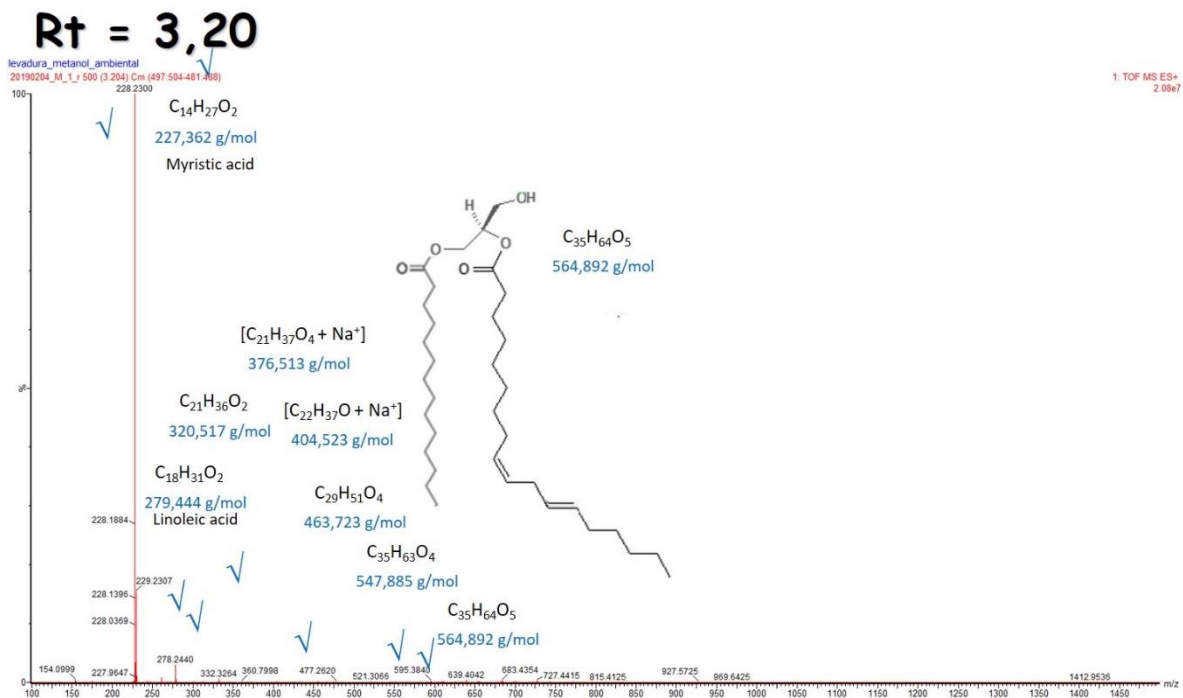


Figura Anexo 169. Espectro MS/MS para un Rt = 3,20 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

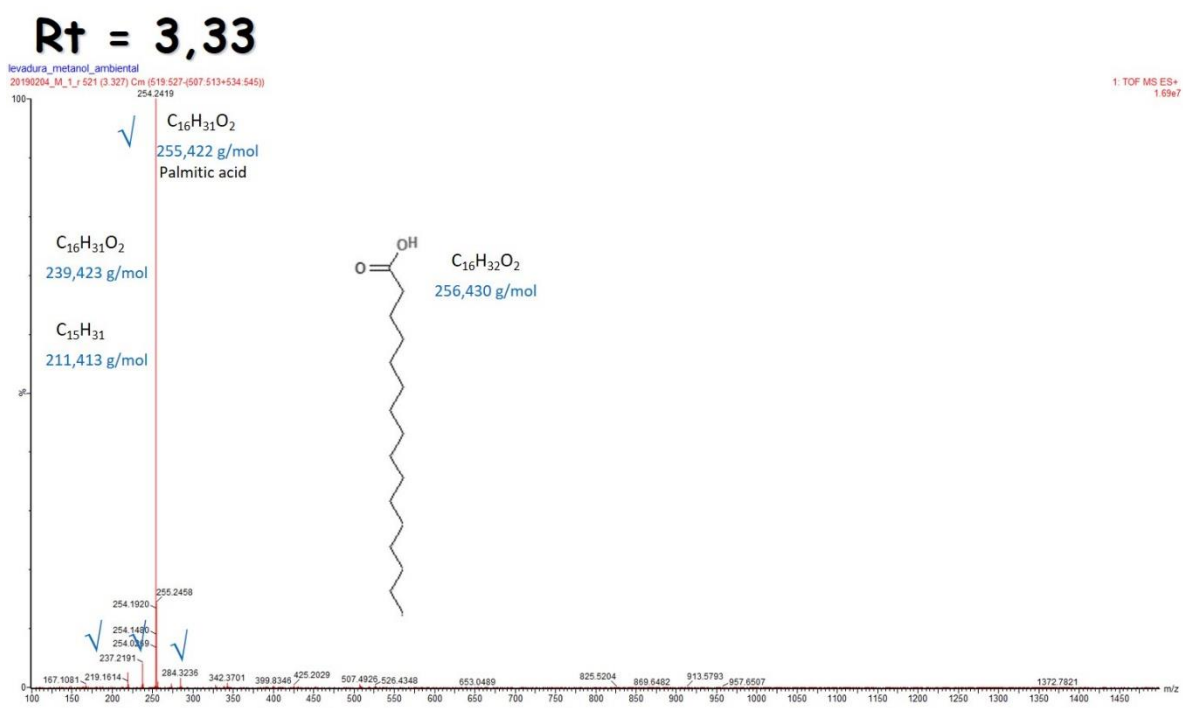


Figura Anexo 170. Espectro MS/MS para un Rt = 3,33 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

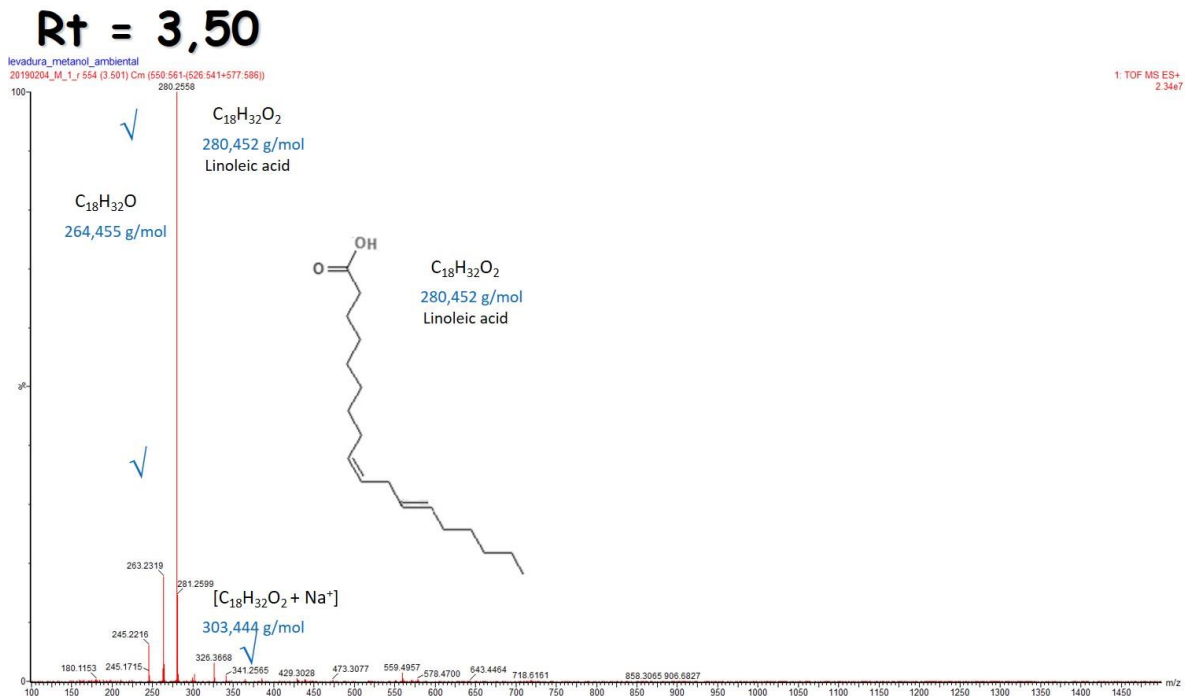


Figura Anexo 171. Espectro MS/MS para un Rt = 3,50 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

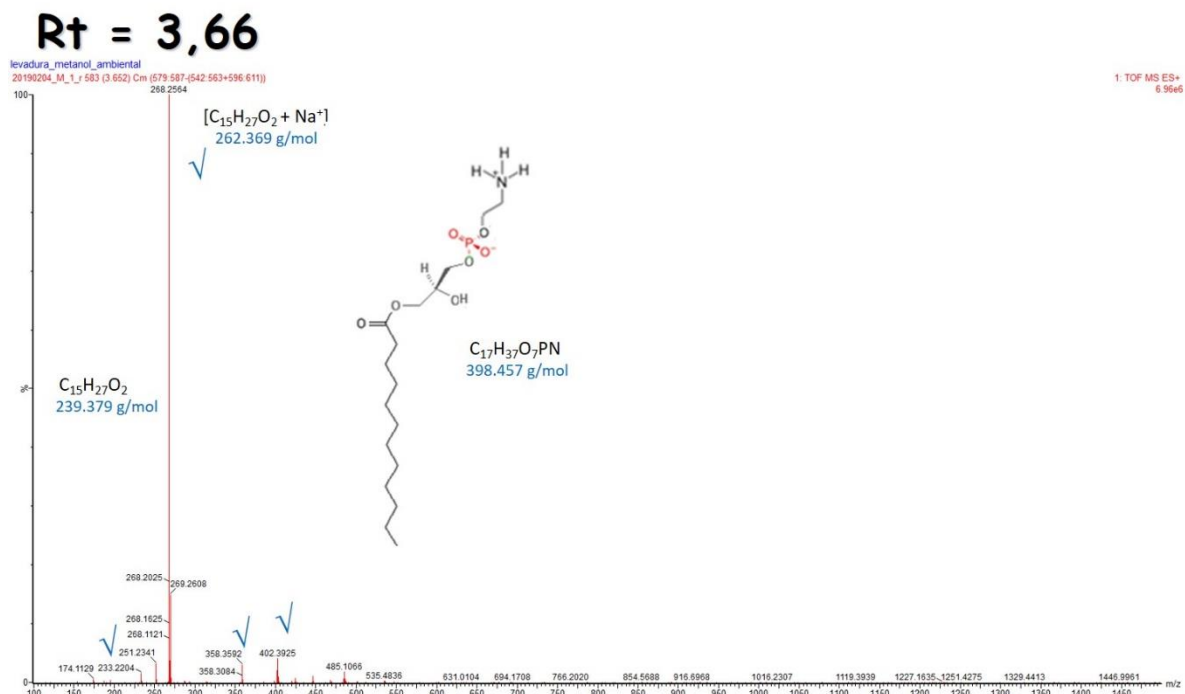


Figura Anexo 172. Espectro MS/MS para un Rt = 3,66 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

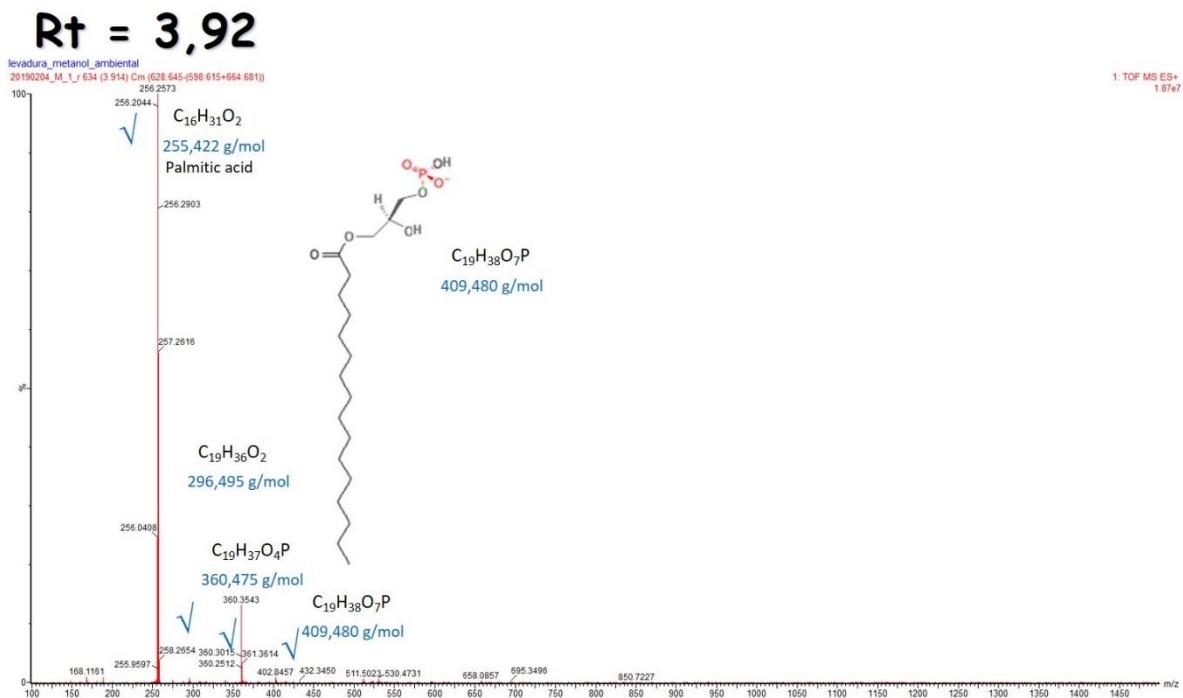


Figura Anexo 173. Espectro MS/MS para un Rt = 3,92 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

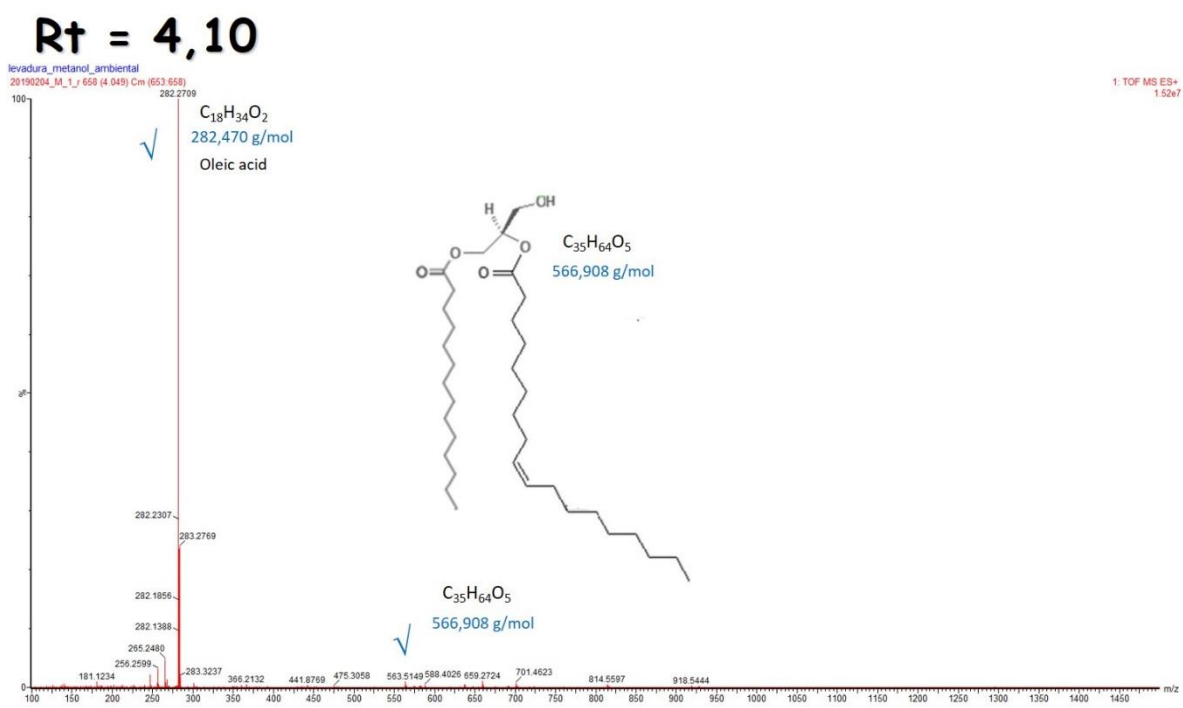


Figura Anexo 174. Espectro MS/MS para un Rt = 4,10 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

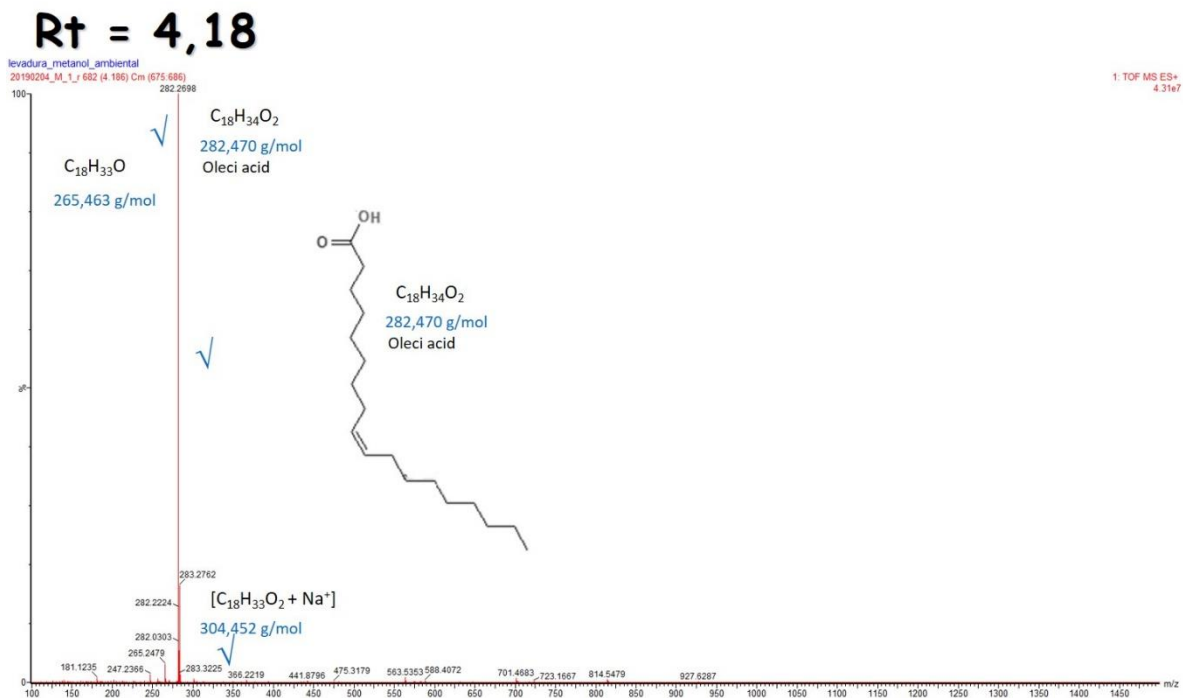


Figura Anexo 175. Espectro MS/MS para un Rt = 4,18 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

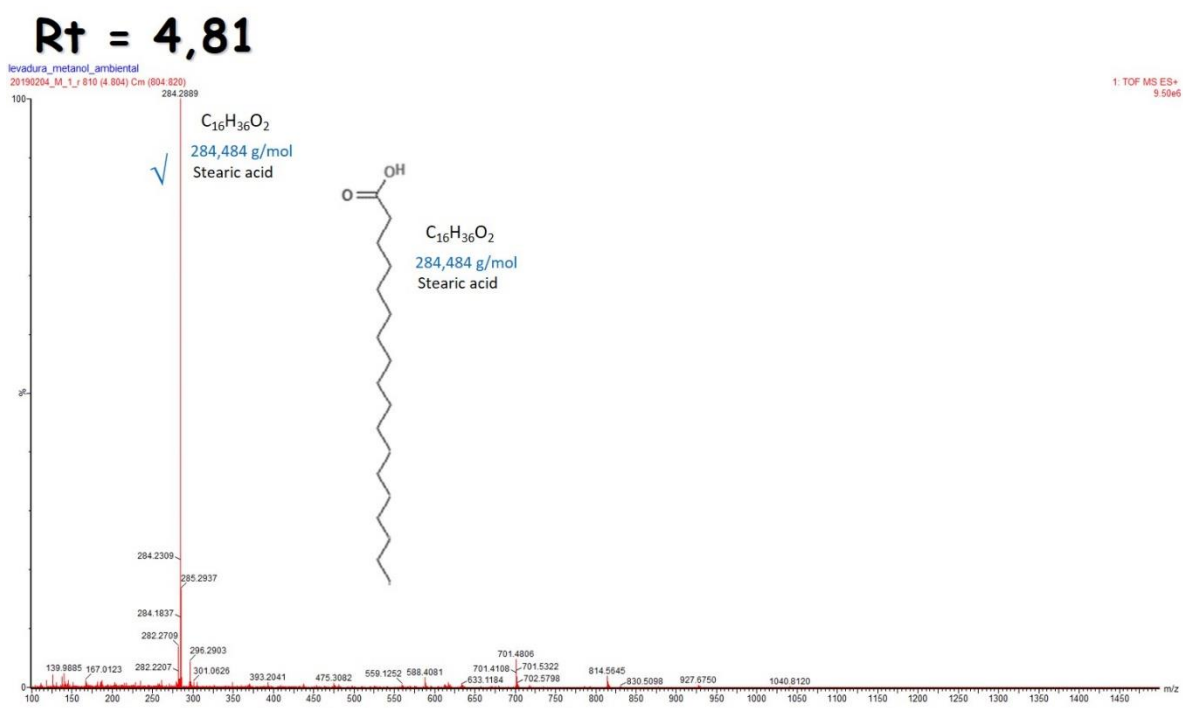


Figura Anexo 176. Espectro MS/MS para un Rt = 4,81 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

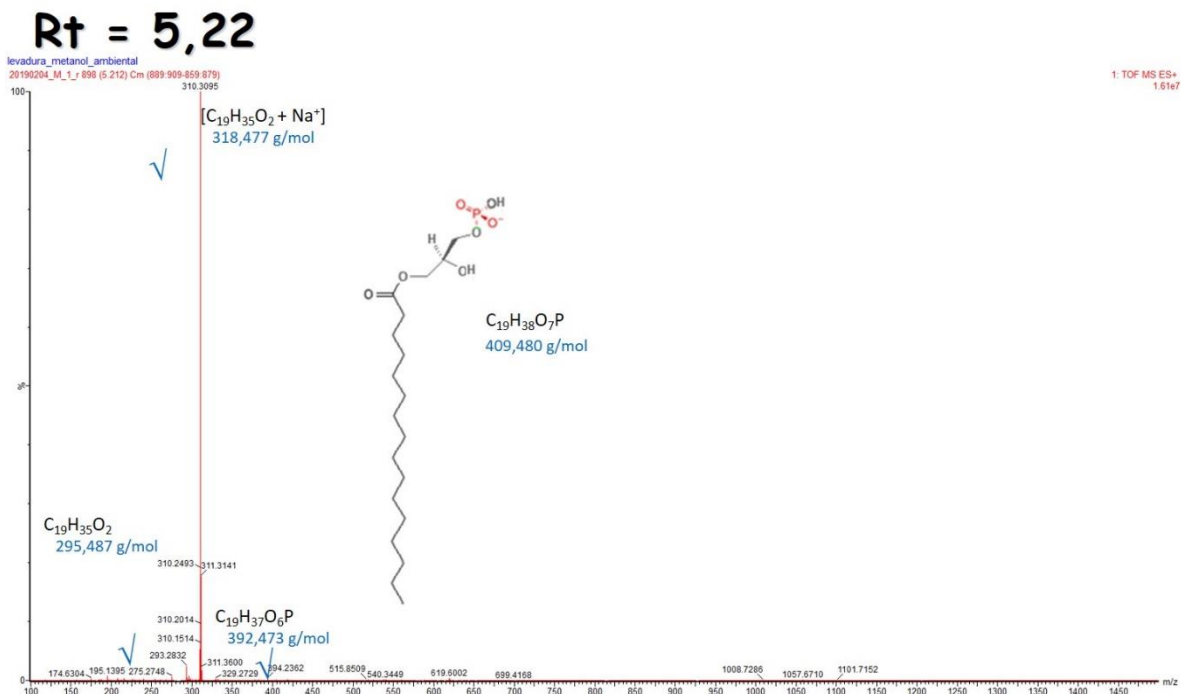


Figura Anexo 177. Espectro MS/MS para un Rt = 5,22 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

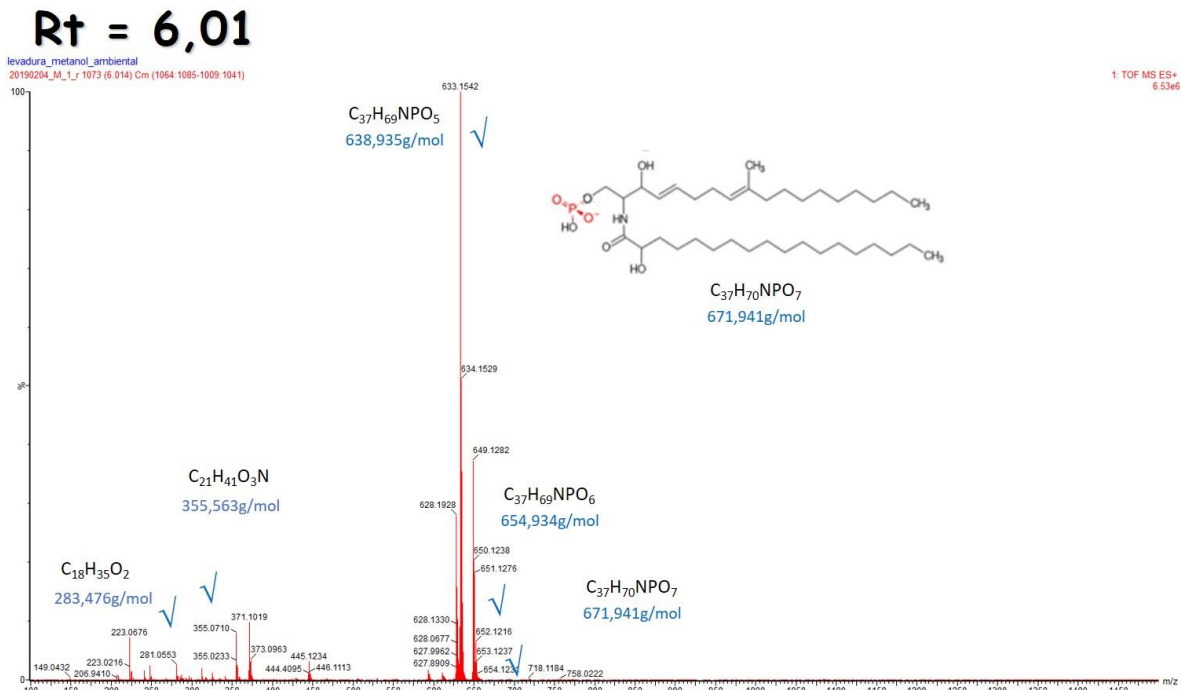


Figura Anexo 178. Espectro MS/MS para un Rt = 6,01 fracción metanol de extracto lipídico de levadura de los aislamientos ambiental y clínico de *H. capsulatum*.

11.11 Caracterización fisicoquímica de liposomas

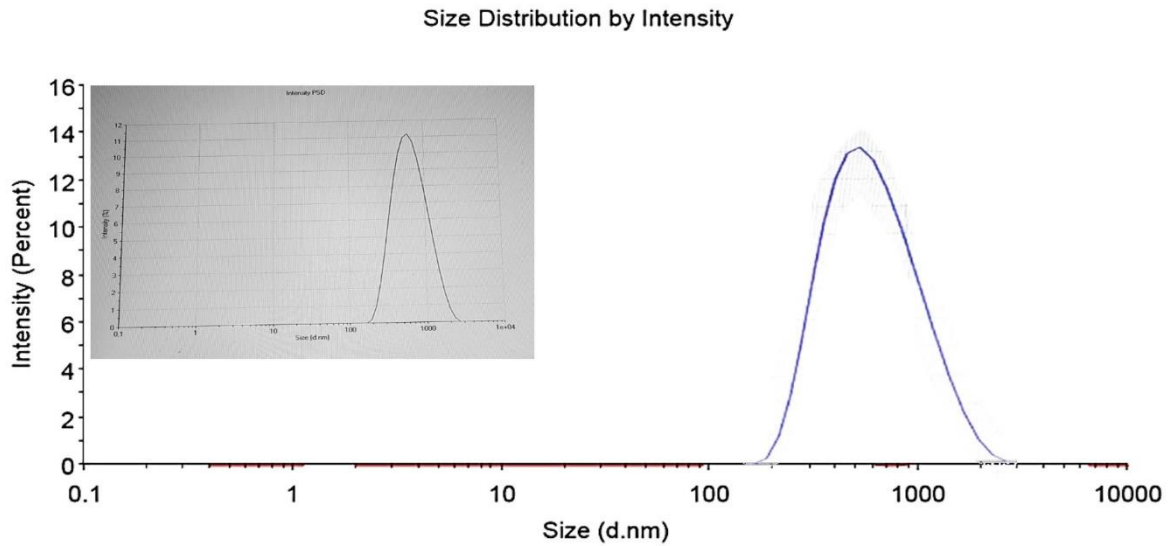


Figura Anexo 179. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum*.

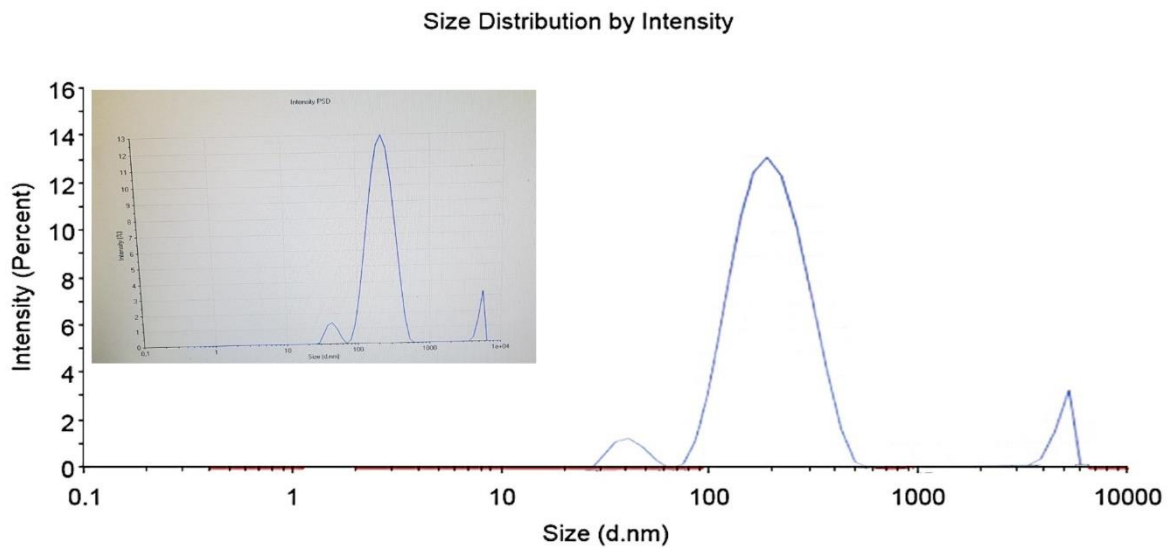


Figura Anexo 180. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento ambiental de *H. capsulatum* con anfotericina B.

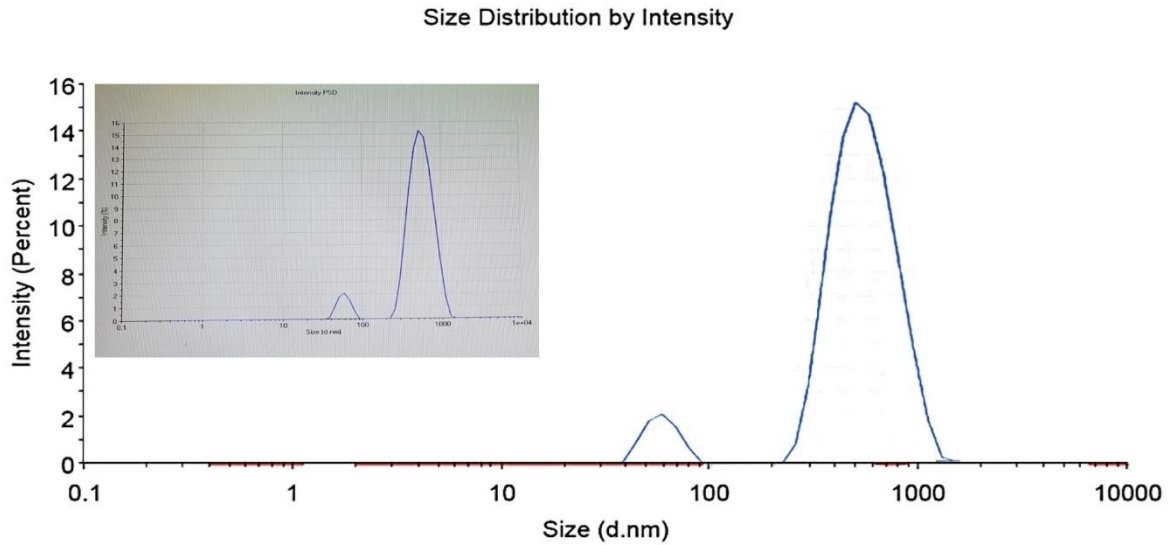


Figura Anexo 181. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum*.

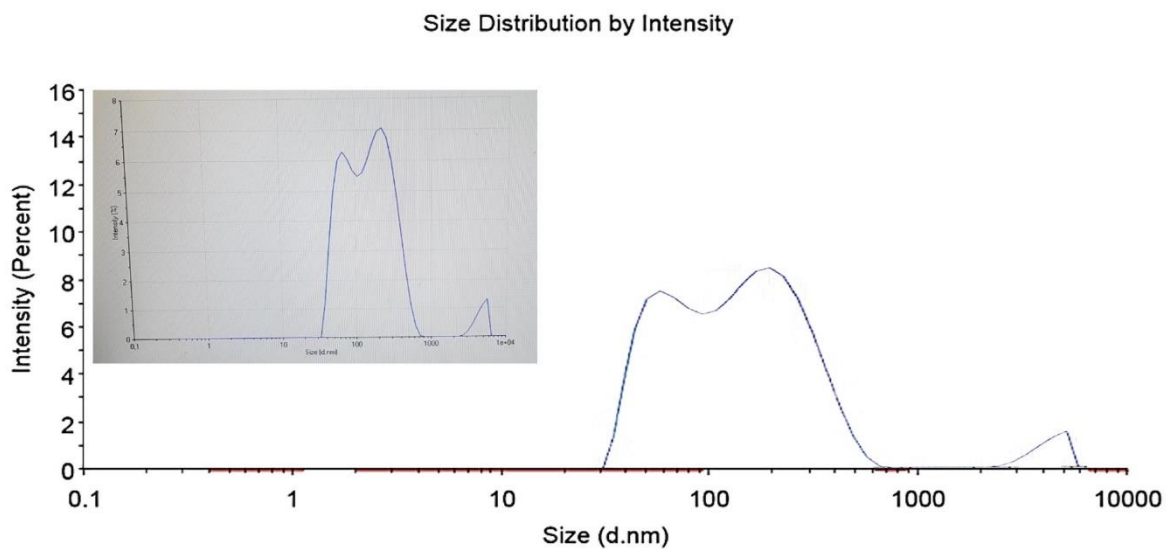


Figura Anexo 182. Distribución de tamaño de partícula para el liposoma del extracto lipídico de micelio del aislamiento clínico de *H. capsulatum* con anfotericina B.

11.12 Cromatografía de capa fina (CCF)

En las figuras anexo se presentan los resultados de la cromatografía en capa fina con los sistemas de solventes: cloroformo (15A-a); cloroformo/metanol 95:5 (15A-b); cloroformo/metanol 90:10 (15A-c) y cloroformo/metanol 70:30 (15A-d).

11.12.1 Fracción hexano de micelio de *H. capsulatum*

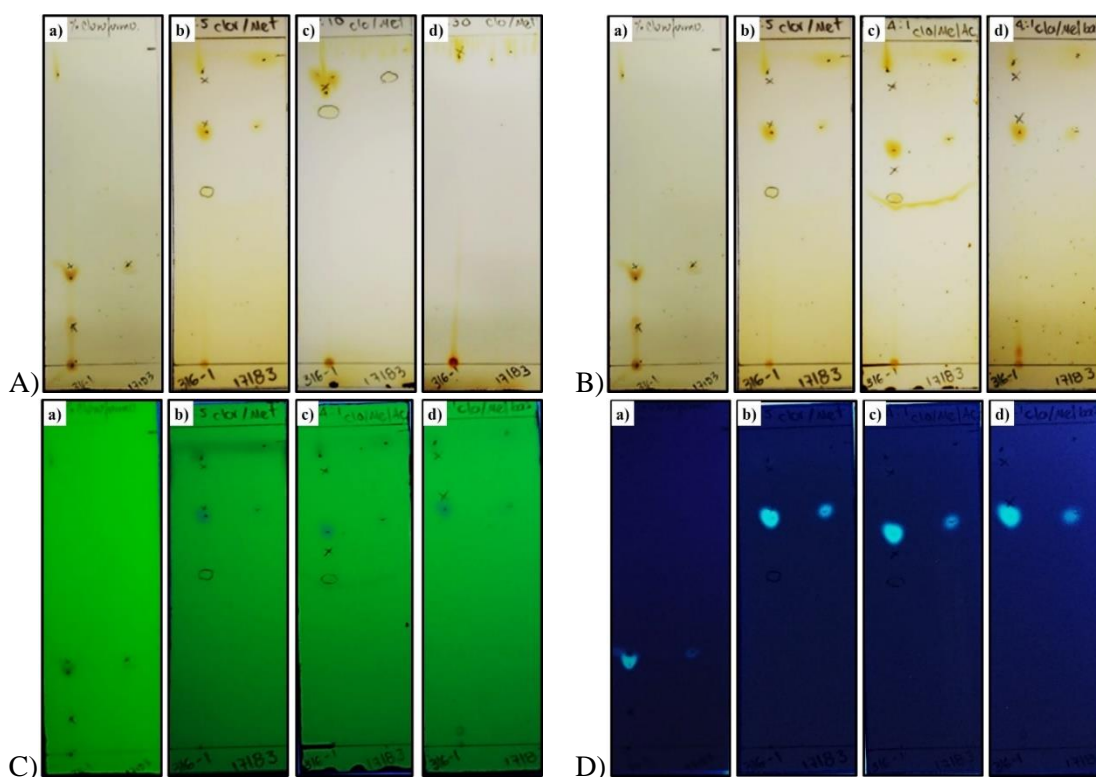


Figura Anexo 182. Placas cromatográficas de la fracción hexano del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción hexano del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Componentes	Cloroformo/metanol/a. acético (95:4:1)	
	Ambiental (Rf)	Clínico (Rf)
1	0,92	0,95
2	0,87	---
3	0,67	0,70
4	0,60	---
5	0,52	---

11.12.2 Fracción cloroformo de micelio de *H. capsulatum*

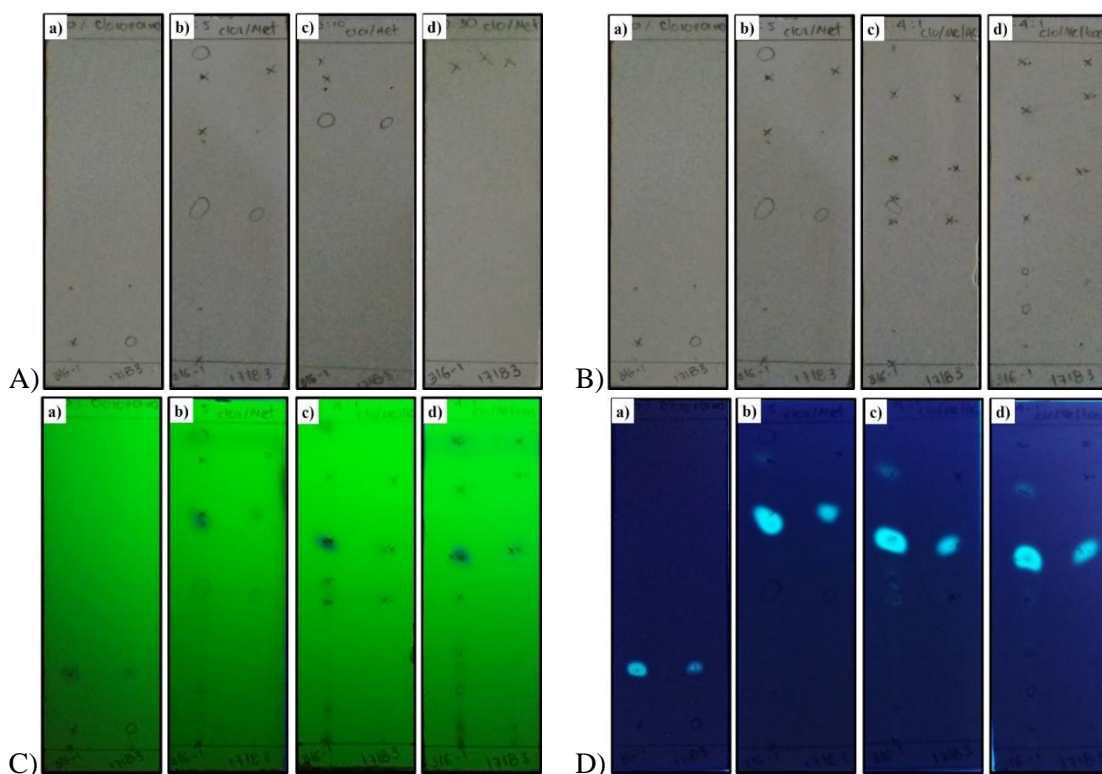


Figura Anexo 183. Placas cromatografías de la fracción cloroformo del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción cloroformo del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Componentes	Cloroformo/metanol/h. amonio (95:4:1)	
	Ambiental (Rf)	Clínico (Rf)
1	0,97	0,97
2	0,81	0,86
3	0,59	0,62
4	0,48	-----
5	0,30	-----
6	0,25	0,26
7	0,17	-----
8	0,06	0,06

11.12.3 Fracción isopropanol de micelio de *H. capsulatum*

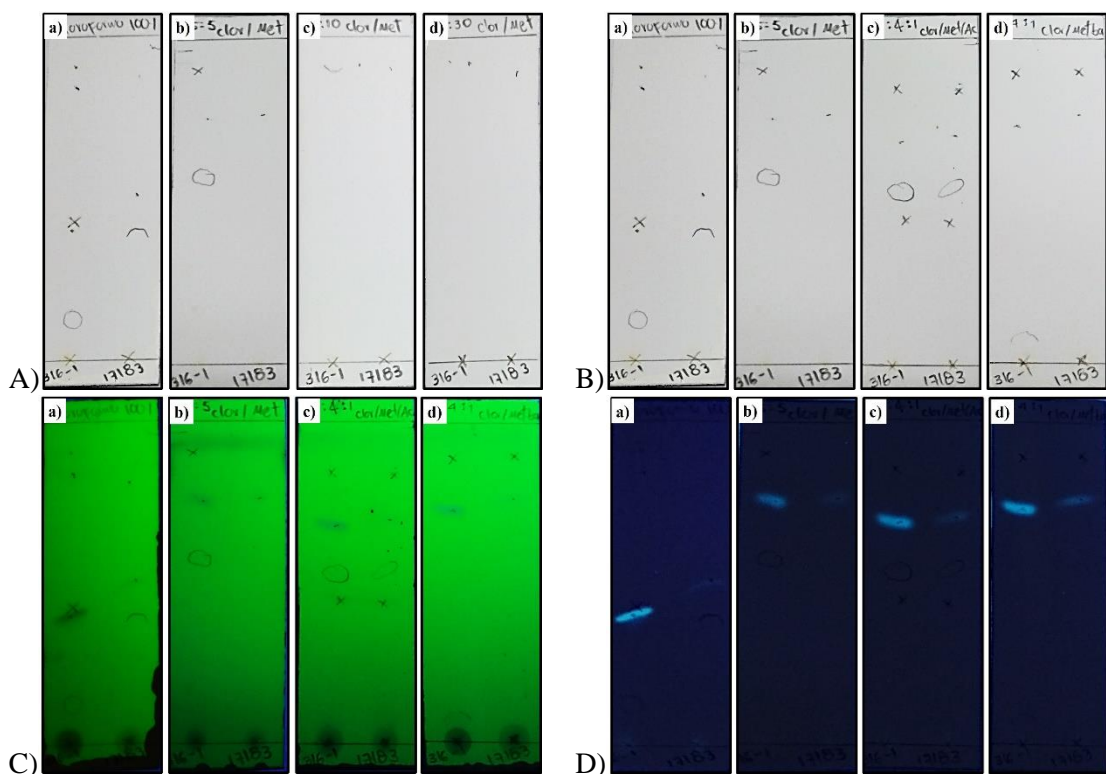


Figura Anexo 184. Placas cromatografías de la fracción isopropanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción isopropanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Componentes	Cloroformo/metanol/A. Acético (95:4:1)	
	Ambiental	Clínico
1	0,86	0,84
2	0,69	0,70
3	0,53	0,54
4	0,44	0,44

11.12.4 Fracción metanol de micelio de *H. capsulatum*

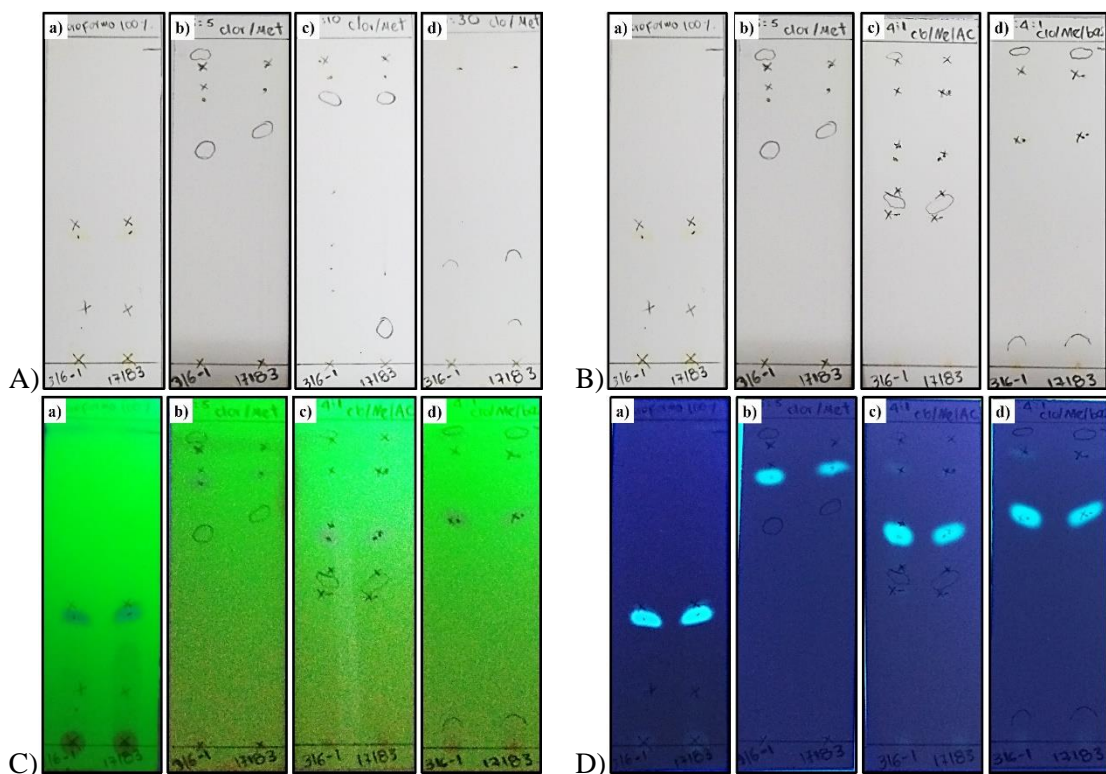


Figura Anexo 185. Placas cromatografías de la fracción metanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) y B) revelado con yodo; C) revelado con luz ultravioleta de onda corta; D) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción metanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de micelio de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Componentes	Cloroformo/metanol/a. acético (95:4:1)	
	Ambiental (Rf)	Clínico (Rf)
1	0,95	0,95
2	0,85	0,85
3	0,63	0,63
4	0,53	0,53
5	0,50	0,49

11.12.5 Fracción de levadura de *H. capsulatum*

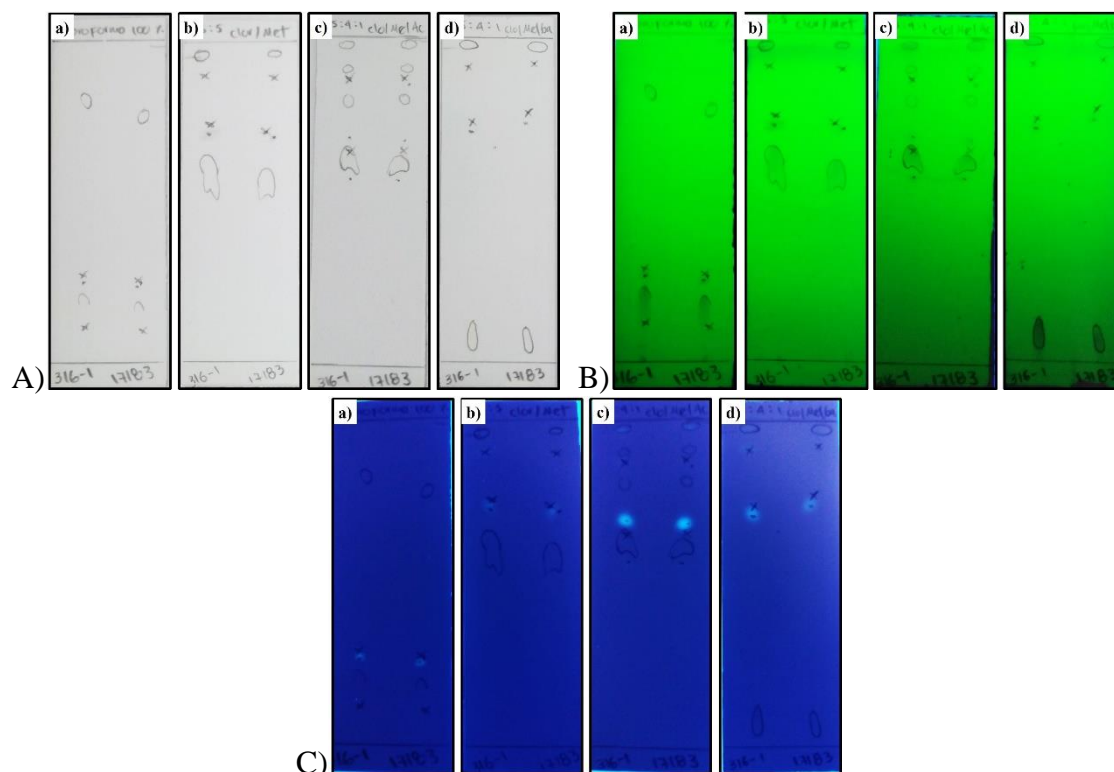


Figura Anexo 186. Placas cromatografías de la fracción hexano del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción hexano del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico

Componentes	Cloroformo/metanol/a. acético (95:4:1)	
	Ambiental (Rf)	Clínico (Rf)
1	0,98	0,98
2	0,91	0,91
3	0,87	0,88
4	0,80	0,81
5	0,69	0,68
6	0,61	0,60

11.12.6 Fracción cloroformo de levadura de *H. capsulatum*

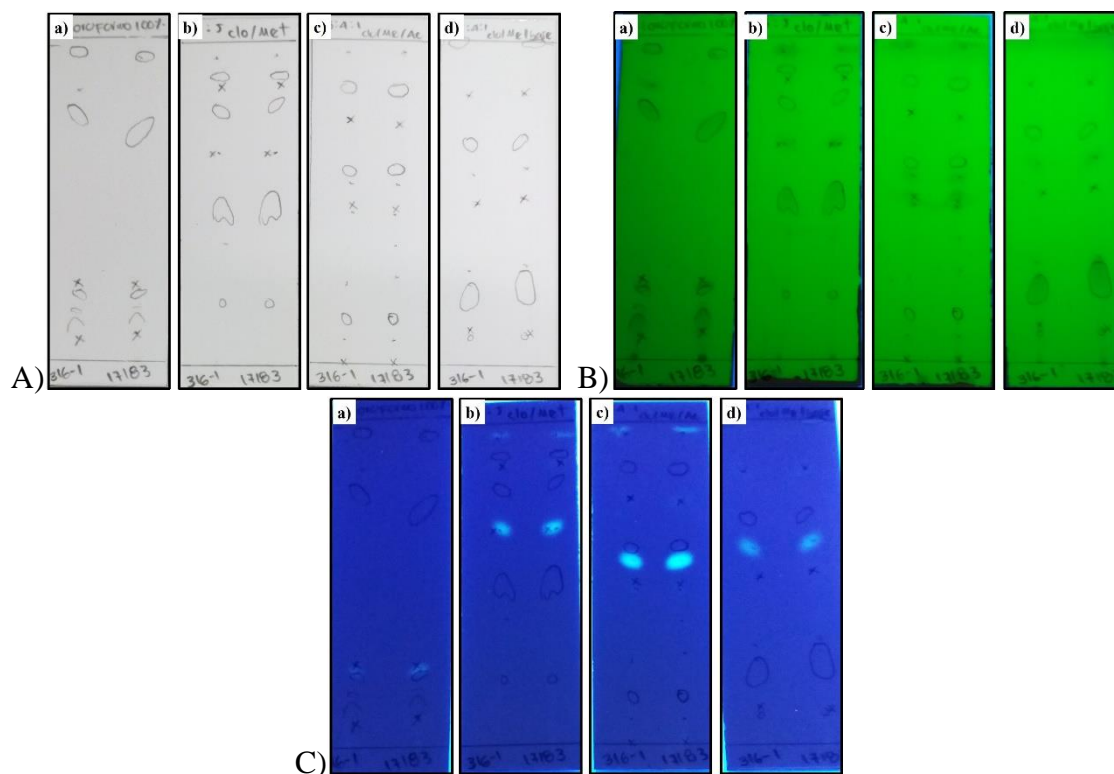


Figura Anexo 187. Placas cromatografías de la fracción cloroformo del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción cloroformo del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico

Componentes	Cloroformo/metanol/a. acético (95:4:1)	
	Ambiental (Rf)	Clínico (Rf)
1	0,96	0,96
2	0,85	0,84
3	0,75	0,74
4	0,60	0,60
5	0,56	0,56
6	0,50	0,48
7	0,37	0,37
8	0,25	0,27
9	0,14	0,14
10	0,08	0,08

11.12.7 Fracción isopropanol de levadura *H. capsulatum*

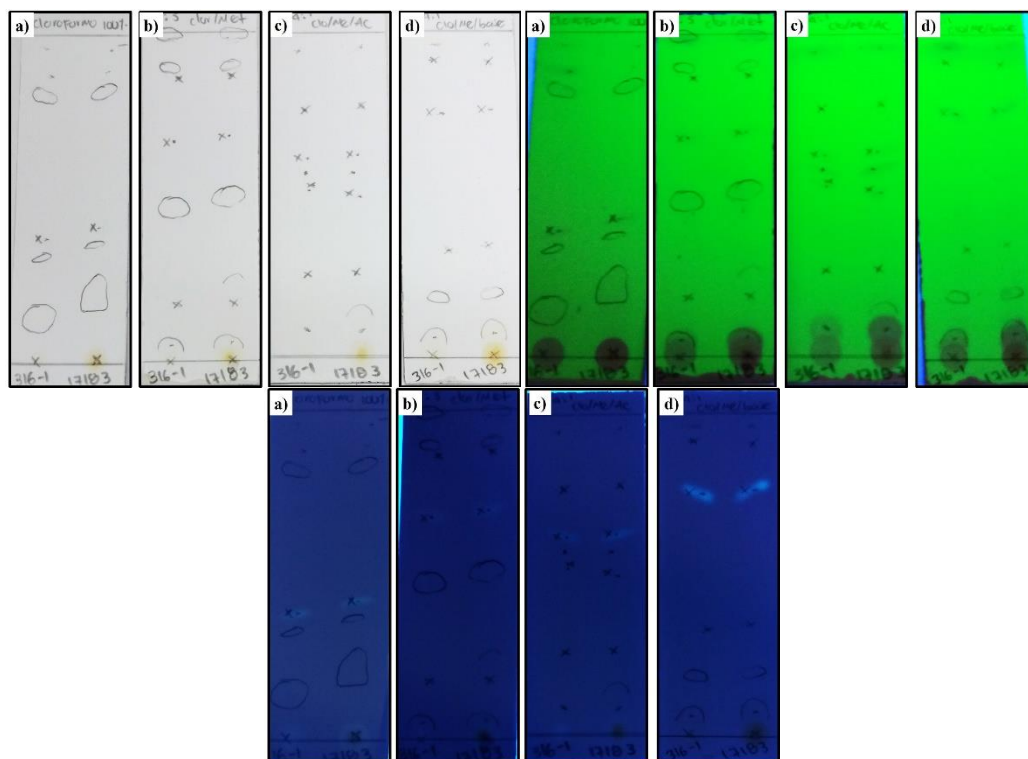


Figura Anexo 188. Placas cromatográficas de la fracción isopropanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción isopropanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Componentes	Cloroformo/metanol/a. acético (95:4:1)	
	Ambiental (Rf)	Clínico (Rf)
1	0,94	0,95
2	0,76	0,77
3	0,60	0,62
4	0,57	0,57
5	0,51	0,49
6	0,26	0,26
7	0,08	0,08

11.12.8 Fracción metanol de levadura de *H. capsulatum*

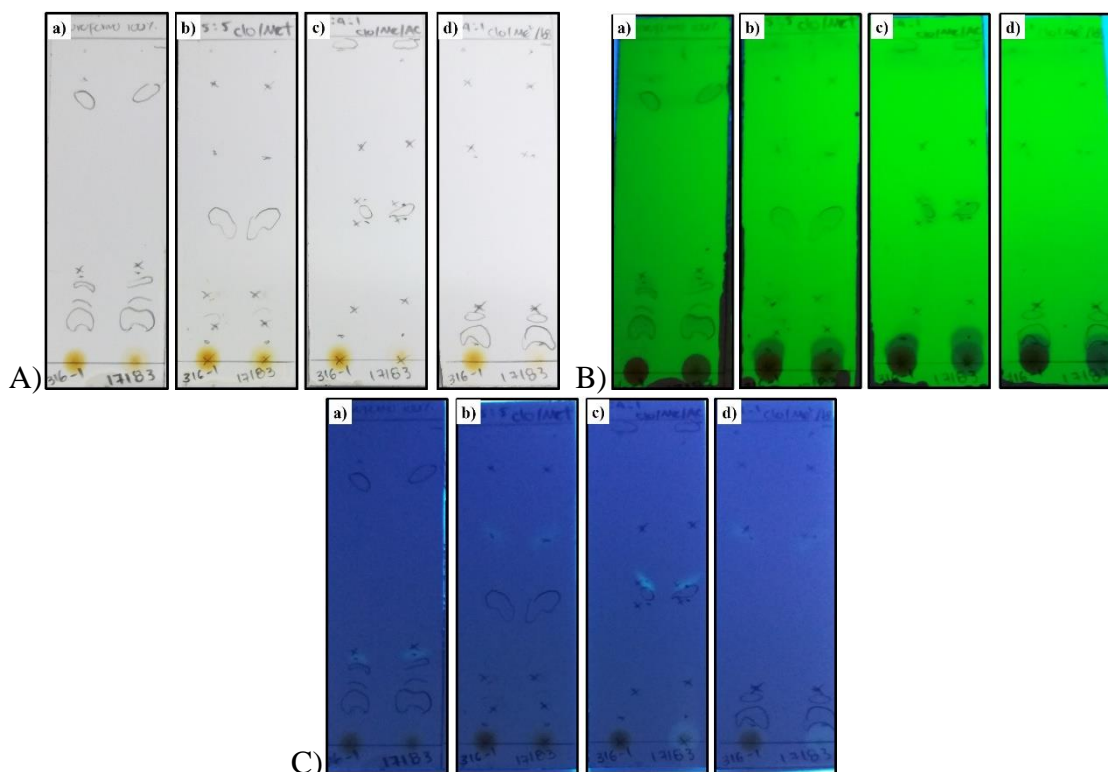


Figura Anexo 189. Placas cromatografías de la fracción metanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico: A) revelado con yodo; B) revelado con luz ultravioleta de onda corta; C) revelado con luz ultravioleta de onda larga.

Tabla. Factores de retención (Rf) de la fracción metanol del extracto lipídico asociado a la pared celular de levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

Componentes	Cloroformo/metanol/a. acético (95:4:1)	
	Ambiental (Rf)	Clínico (Rf)
1	0,98	0,98
2	0,66	0,67
3	0,50	0,48
4	0,46	0,46
5	0,42	0,43
6	0,15	0,18
7	0,08	0,08

11.13 Soporte Estadístico

Soporte estadístico del análisis de los perfiles de ácidos grasos de los extractos de la pared celular de micelio y levadura de *H. capsulatum* de los aislamientos ambiental y clínico.

11.13.1 ANOVA Simple – aislamiento clínico fase micelio

Variable dependiente: Aislamiento clínico

Factor: Ácidos grasos

Selección de la Variable: Clínico

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para el aislamiento clínico *H. capsulatum* fase micelio

Ácidos grasos	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
Esteárico	3	7,911	0,003	0,0379219%	7,908	7,914
Linolénico	3	0,023	0,004	17,3913%	0,019	0,027
Lionoleico	3	34,8	0,1	0,287356%	34,7	34,9
Mirístico	3	4,96	0,1	2,01613%	4,86	5,06
Oleico	3	26,987	0,008	0,0296439%	26,979	26,995
Palmítico	3	25,33	0,1	0,394789%	25,23	25,43
Total	18	16,6685	13,2917	79,7412%	0,019	34,9

Ácidos grasos	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
Esteárico	0,006	2,82613E-12	
Linolénico	0,008	0	
Lionoleico	0,2	0	
Mirístico	0,2	0	
Oleico	0,016	1,41298E-12	
Palmítico	0,2	0	
Total	34,881	0,120182	-1,54805

Tabla ANOVA para Clínico por Ácidos grasos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3003,3	5	600,66	119776,63	0,0000
Intra grupos	0,060178	12	0,00501483		
Total (Corr.)	3003,36	17			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de aislamiento clínico en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 119777, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre

la media de Clínico entre un nivel de Ácidos grasos y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Tabla de Medias para aislamiento clínico por Ácidos grasos con intervalos de confianza del 95,0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Ácidos grasos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Esteárico	3	7,911	0,0408853	7,84801	7,97399
Linoléico	3	0,023	0,0408853	-0,0399903	0,0859903
Lionoleico	3	34,8	0,0408853	34,737	34,863
Mirístico	3	4,96	0,0408853	4,89701	5,02299
Oleico	3	26,987	0,0408853	26,924	27,05
Palmítico	3	25,33	0,0408853	25,267	25,393
Total	18	16,6685			

Esta tabla muestra la media de Clínico para cada nivel de Ácidos grasos. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Pruebas de Múltiple Rangos para Clínico por Ácidos grasos

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Ácidos grasos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Linoléico	3	0,023	X
Mirístico	3	4,96	X
Esteárico	3	7,911	X
Palmítico	3	25,33	X
Oleico	3	26,987	X
Lionoleico	3	34,8	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Esteárico - Linoléico	*	7,888	0,125981
Esteárico - Lionoleico	*	-26,889	0,125981
Esteárico - Mirístico	*	2,951	0,125981
Esteárico - Oleico	*	-19,076	0,125981
Esteárico - Palmítico	*	-17,419	0,125981
Linoléico - Lionoleico	*	-34,777	0,125981
Linoléico - Mirístico	*	-4,937	0,125981
Linoléico - Oleico	*	-26,964	0,125981
Linoléico - Palmítico	*	-25,307	0,125981

Lionoleico - Mirístico	*	29,84	0,125981
Lionoleico - Oleico	*	7,813	0,125981
Lionoleico - Palmítico	*	9,47	0,125981
Mirístico - Oleico	*	-22,027	0,125981
Mirístico - Palmítico	*	-20,37	0,125981
Oleico - Palmítico	*	1,657	0,125981

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 15 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	2,16183	0,127151

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
Esteárico / Linoléico	0,003	0,004	0,5625	0,7200
Esteárico / Lionoleico	0,003	0,1	0,0009	0,0018
Esteárico / Mirístico	0,003	0,1	0,0009	0,0018
Esteárico / Oleico	0,003	0,008	0,140625	0,2466
Esteárico / Palmítico	0,003	0,1	0,0009	0,0018
Linoléico / Lionoleico	0,004	0,1	0,0016	0,0032
Linoléico / Mirístico	0,004	0,1	0,0016	0,0032
Linoléico / Oleico	0,004	0,008	0,25	0,4000
Linoléico / Palmítico	0,004	0,1	0,0016	0,0032
Lionoleico / Mirístico	0,1	0,1	1,0	1,0000
Lionoleico / Oleico	0,1	0,008	156,25	0,0127
Lionoleico / Palmítico	0,1	0,1	1,0	1,0000
Mirístico / Oleico	0,1	0,008	156,25	0,0127
Mirístico / Palmítico	0,1	0,1	1,0	1,0000
Oleico / Palmítico	0,008	0,1	0,0064	0,0127

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de Clínico dentro de cada uno de los 6 niveles de Ácidos grasos es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente

significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 9, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Prueba de Kruskal-Wallis para Clínico por Ácidos grasos

Ácidos grasos	Tamaño Muestra	Rango Promedio
Esteárico	3	8,0
Linolénico	3	2,0
Lionoleico	3	17,0
Mirístico	3	5,0
Oleico	3	14,0
Palmítico	3	11,0

Estadístico = 16,5789 Valor-P = 0,00537165

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de Clínico dentro de cada uno de los 6 niveles de Ácidos grasos son iguales. Primero se combinan los datos de todos los niveles y se ordenan de menor a mayor. Luego se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada nivel. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes, de la lista de Opciones Gráficas, y seleccione la opción de muesca de mediana.

Prueba de la Mediana de Mood para Clínico por Ácidos grasos

Total n = 18

Gran mediana = 16,572

Ácidos grasos	Tamaño de Muestra	n<=	n>	Mediana	LC inferior 95,0%	LC superior 95,0%
Esteárico	3	3	0	7,911		
Linolénico	3	3	0	0,023		
Lionoleico	3	0	3	34,8		
Mirístico	3	3	0	4,96		
Oleico	3	0	3	26,987		
Palmítico	3	0	3	25,33		

Estadístico = 18,0 Valor-P = 0,00294643

La prueba de medianas de Mood evalúa la hipótesis de que las medianas de todas las 6 muestras son iguales. Lo hace contando el número de observaciones en cada muestra, a cada lado de la mediana global, la cual es igual a 16,572. Puesto que el valor-P para la prueba de chi-cuadrada es menor que 0,05, las medianas de las muestras son significativamente diferentes con un nivel de confianza del

95,0%. También se incluyen (si están disponibles) los intervalos del 95,0% de confianza para mediana, basados en los estadísticos de orden de cada muestra.

11.13.2 ANOVA Simple – aislamiento ambiental fase micelio

Variable dependiente: Ambiental

Factor: Ácidos grasos

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Ambiental

Ácidos grasos	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
Esteárico	3	13,46	0,07	0,520059%	13,39	13,53
Linolénico	3	0,03051	0	0%	0,03051	0,03051
Lionoleico	3	27,2	0,3	1,10294%	26,9	27,5
Mirístico	3	4,97	0,04	0,804829%	4,93	5,01
Oleico	3	29,7	0,3	1,0101%	29,4	30,0
Palmítico	3	24,6	0,5	2,03252%	24,1	25,1
Total	18	16,6601	11,641	69,8735%	0,03051	30,0

Ácidos grasos	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
Esteárico	0,14	0	
Linolénico	0		
Lionoleico	0,6	0	
Mirístico	0,08	0	
Oleico	0,6	0	
Palmítico	1,0	0	
Total	29,9695	-0,50838	-1,4605

Tabla ANOVA para Ambiental por Ácidos grasos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2302,84	5	460,568	6330,83	0,0000
Intra grupos	0,873	12	0,07275		
Total (Corr.)	2303,71	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Ambiental en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 6330,83, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Ambiental entre un nivel de Ácidos grasos y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Tabla de Medias para Ambiental por Ácidos grasos con intervalos de confianza del 95,0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Ácidos grasos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Esteárico	3	13,46	0,155724	13,2201	13,6999
Linolénico	3	0,03051	0,155724	-0,209407	0,270427
Lionoleico	3	27,2	0,155724	26,9601	27,4399
Mirístico	3	4,97	0,155724	4,73008	5,20992
Oleico	3	29,7	0,155724	29,4601	29,9399
Palmítico	3	24,6	0,155724	24,3601	24,8399
Total	18	16,6601			

Esta tabla muestra la media de Ambiental para cada nivel de Ácidos grasos. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Pruebas de Múltiple Rangos para Ambiental por Ácidos grasos

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Ácidos grasos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Linolénico	3	0,03051	X
Mirístico	3	4,97	X
Esteárico	3	13,46	X
Palmítico	3	24,6	X
Lionoleico	3	27,2	X
Oleico	3	29,7	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Esteárico - Linolénico	*	13,4295	0,479835
Esteárico - Lionoleico	*	-13,74	0,479835
Esteárico - Mirístico	*	8,49	0,479835
Esteárico - Oleico	*	-16,24	0,479835
Esteárico - Palmítico	*	-11,14	0,479835
Linolénico - Lionoleico	*	-27,1695	0,479835
Linolénico - Mirístico	*	-4,93949	0,479835
Linolénico - Oleico	*	-29,6695	0,479835
Linolénico - Palmítico	*	-24,5695	0,479835
Lionoleico - Mirístico	*	22,23	0,479835

Lionoleico - Oleico	*	-2,5	0,479835
Lionoleico - Palmítico	*	2,6	0,479835
Mirístico - Oleico	*	-24,73	0,479835
Mirístico - Palmítico	*	-19,63	0,479835
Oleico - Palmítico	*	5,1	0,479835

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 15 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	2,11666	0,13334

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
Esteárico / Linoléico	0,07	0	1,#INF	0,0000
Esteárico / Lionoleico	0,07	0,3	0,0544444	0,1033
Esteárico / Mirístico	0,07	0,04	3,0625	0,4923
Esteárico / Oleico	0,07	0,3	0,0544444	0,1033
Esteárico / Palmítico	0,07	0,5	0,0196	0,0384
Linoléico / Lionoleico	0	0,3	0	0,0000
Linoléico / Mirístico	0	0,04	0	0,0000
Linoléico / Oleico	0	0,3	0	0,0000
Linoléico / Palmítico	0	0,5	0	0,0000
Lionoleico / Mirístico	0,3	0,04	56,25	0,0349
Lionoleico / Oleico	0,3	0,3	1,0	1,0000
Lionoleico / Palmítico	0,3	0,5	0,36	0,5294
Mirístico / Oleico	0,04	0,3	0,0177778	0,0349
Mirístico / Palmítico	0,04	0,5	0,0064	0,0127
Oleico / Palmítico	0,3	0,5	0,36	0,5294

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de Ambiental dentro de cada uno de los 6 niveles de Ácidos grasos es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente

significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 9, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Prueba de Kruskal-Wallis para Ambiental por Ácidos grasos

Ácidos grasos	Tamaño Muestra	Rango Promedio
Esteárico	3	8,0
Linolénico	3	2,0
Lionoleico	3	14,0
Mirístico	3	5,0
Oleico	3	17,0
Palmítico	3	11,0

Estadístico = 16,6477 Valor-P = 0,00521888

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de Ambiental dentro de cada uno de los 6 niveles de Ácidos grasos son iguales. Primero se combinan los datos de todos los niveles y se ordenan de menor a mayor. Luego se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada nivel. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes, de la lista de Opciones Gráficas, y seleccione la opción de muesca de mediana.

Prueba de la Mediana de Mood para Ambiental por Ácidos grasos

Total n = 18

Gran mediana = 18,815

Ácidos grasos	Tamaño de Muestra	n<=	n>	Mediana	LC inferior 95,0%	LC superior 95,0%
Esteárico	3	3	0	13,46		
Linolénico	3	3	0	0,03051		
Lionoleico	3	0	3	27,2		
Mirístico	3	3	0	4,97		
Oleico	3	0	3	29,7		
Palmítico	3	0	3	24,6		

Estadístico = 18,0 Valor-P = 0,00294643

La prueba de medianas de Mood evalúa la hipótesis de que las medianas de todas las 6 muestras son iguales. Lo hace contando el número de observaciones en cada muestra, a cada lado de la mediana global, la cual es igual a 18,815. Puesto que el valor-P para la prueba de chi-cuadrada es menor que 0,05, las medianas de las muestras son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%. También se incluyen (si están disponibles) los intervalos del 95,0% de confianza para mediana, basados en los estadísticos de orden de cada muestra.

11.13.3 ANOVA Simple – Abundancia relativas fase micelio

Variable dependiente: Abundancia relativa

Factor: Ácidos grasos

Número de observaciones: 36

Número de niveles: 12

Resumen Estadístico para Abundancia relativa

Ácidos grasos	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
EsteáricoA	3	13,46	0,07	0,520059%	13,39	13,53
EsteáricoC	3	7,911	0,003	0,0379219%	7,908	7,914
LinolénicoA	3	0,03051	0	0%	0,03051	0,03051
LinolénicoC	3	0,023	0,004	17,3913%	0,019	0,027
LionoleicoA	3	27,2	0,3	1,10294%	26,9	27,5
LionoleicoC	3	34,8	0,1	0,287356%	34,7	34,9
MirísticoA	3	4,97	0,04	0,804829%	4,93	5,01
MirísticoC	3	4,96	0,1	2,01613%	4,86	5,06
OleicoA	3	29,7	0,3	1,0101%	29,4	30,0
OleicoC	3	26,987	0,008	0,0296439%	26,979	26,995
PalmíticoA	3	24,6	0,5	2,03252%	24,1	25,1
PalmíticoC	3	25,33	0,1	0,394789%	25,23	25,43
Total	36	16,6643	12,3138	73,8936%	0,019	34,9

Ácidos grasos	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
EsteáricoA	0,14	0	
EsteáricoC	0,006	2,82613E-12	
LinolénicoA	0		
LinolénicoC	0,008	0	
LionoleicoA	0,6	0	
LionoleicoC	0,2	0	
MirísticoA	0,08	0	
MirísticoC	0,2	0	
OleicoA	0,6	0	
OleicoC	0,016	1,41298E-12	
PalmíticoA	1,0	0	
PalmíticoC	0,2	0	
Total	34,881	-0,179613	-2,02107

Tabla ANOVA para Abundancia relativa por Ácidos grasos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5306,14	11	482,376	12406,02	0,0000
Intra grupos	0,933178	24	0,0388824		
Total (Corr.)	5307,07	35			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Abundancia relativa en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 12406,0, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Abundancia relativa entre un nivel de Ácidos grasos y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Tabla de Medias para Abundancia relativa por Ácidos grasos con intervalos de confianza del 95,0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Ácidos grasos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
EsteáricoA	3	13,46	0,113846	13,2939	13,6261
EsteáricoC	3	7,911	0,113846	7,74485	8,07715
LinoléicoA	3	0,03051	0,113846	-0,135636	0,196656
LinoléicoC	3	0,023	0,113846	-0,143146	0,189146
LionoleicoA	3	27,2	0,113846	27,0339	27,3661
LionoleicoC	3	34,8	0,113846	34,6339	34,9661
MirísticoA	3	4,97	0,113846	4,80385	5,13615
MirísticoC	3	4,96	0,113846	4,79385	5,12615
OleicoA	3	29,7	0,113846	29,5339	29,8661
OleicoC	3	26,987	0,113846	26,8209	27,1531
PalmíticoA	3	24,6	0,113846	24,4339	24,7661
PalmíticoC	3	25,33	0,113846	25,1639	25,4961
Total	36	16,6643			

Esta tabla muestra la media de Abundancia relativa para cada nivel de Ácidos grasos. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Pruebas de Múltiple Rangos para Abundancia relativa por Ácidos grasos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ácidos grasos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
LinolénicoC	3	0,023	X
LinolénicoA	3	0,03051	X
MirísticoC	3	4,96	X
MirísticoA	3	4,97	X
EsteáricoC	3	7,911	X
EsteáricoA	3	13,46	X
PalmíticoA	3	24,6	X
PalmíticoC	3	25,33	X
OleicoC	3	26,987	X
LionoleicoA	3	27,2	X
OleicoA	3	29,7	X
LionoleicoC	3	34,8	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
EsteáricoA - EsteáricoC	*	5,549	0,332292
EsteáricoA - LinolénicoA	*	13,4295	0,332292
EsteáricoA - LinolénicoC	*	13,437	0,332292
EsteáricoA - LionoleicoA	*	-13,74	0,332292
EsteáricoA - LionoleicoC	*	-21,34	0,332292
EsteáricoA - MirísticoA	*	8,49	0,332292
EsteáricoA - MirísticoC	*	8,5	0,332292
EsteáricoA - OleicoA	*	-16,24	0,332292
EsteáricoA - OleicoC	*	-13,527	0,332292
EsteáricoA - PalmíticoA	*	-11,14	0,332292
EsteáricoA - PalmíticoC	*	-11,87	0,332292
EsteáricoC - LinolénicoA	*	7,88049	0,332292
EsteáricoC - LinolénicoC	*	7,888	0,332292
EsteáricoC - LionoleicoA	*	-19,289	0,332292
EsteáricoC - LionoleicoC	*	-26,889	0,332292
EsteáricoC - MirísticoA	*	2,941	0,332292
EsteáricoC - MirísticoC	*	2,951	0,332292
EsteáricoC - OleicoA	*	-21,789	0,332292
EsteáricoC - OleicoC	*	-19,076	0,332292
EsteáricoC - PalmíticoA	*	-16,689	0,332292
EsteáricoC - PalmíticoC	*	-17,419	0,332292
LinolénicoA - LinolénicoC		0,00751	0,332292
LinolénicoA - LionoleicoA	*	-27,1695	0,332292
LinolénicoA - LionoleicoC	*	-34,7695	0,332292
LinolénicoA - MirísticoA	*	-4,93949	0,332292
LinolénicoA - MirísticoC	*	-4,92949	0,332292
LinolénicoA - OleicoA	*	-29,6695	0,332292
LinolénicoA - OleicoC	*	-26,9565	0,332292
LinolénicoA - PalmíticoA	*	-24,5695	0,332292
LinolénicoA - PalmíticoC	*	-25,2995	0,332292

LinolénicoC - LionoleicoA	*	-27,177	0,332292
LinolénicoC - LionoleicoC	*	-34,777	0,332292
LinolénicoC - MirísticoA	*	-4,947	0,332292
LinolénicoC - MirísticoC	*	-4,937	0,332292
LinolénicoC - OleicoA	*	-29,677	0,332292
LinolénicoC - OleicoC	*	-26,964	0,332292
LinolénicoC - PalmíticoA	*	-24,577	0,332292
LinolénicoC - PalmíticoC	*	-25,307	0,332292
LionoleicoA - LionoleicoC	*	-7,6	0,332292
LionoleicoA - MirísticoA	*	22,23	0,332292
LionoleicoA - MirísticoC	*	22,24	0,332292
LionoleicoA - OleicoA	*	-2,5	0,332292
LionoleicoA - OleicoC		0,213	0,332292
LionoleicoA - PalmíticoA	*	2,6	0,332292
LionoleicoA - PalmíticoC	*	1,87	0,332292
LionoleicoC - MirísticoA	*	29,83	0,332292
LionoleicoC - MirísticoC	*	29,84	0,332292
LionoleicoC - OleicoA	*	5,1	0,332292
LionoleicoC - OleicoC	*	7,813	0,332292
LionoleicoC - PalmíticoA	*	10,2	0,332292
LionoleicoC - PalmíticoC	*	9,47	0,332292
MirísticoA - MirísticoC		0,01	0,332292
MirísticoA - OleicoA	*	-24,73	0,332292
MirísticoA - OleicoC	*	-22,017	0,332292
MirísticoA - PalmíticoA	*	-19,63	0,332292
MirísticoA - PalmíticoC	*	-20,36	0,332292
MirísticoC - OleicoA	*	-24,74	0,332292
MirísticoC - OleicoC	*	-22,027	0,332292
MirísticoC - PalmíticoA	*	-19,64	0,332292
MirísticoC - PalmíticoC	*	-20,37	0,332292
OleicoA - OleicoC	*	2,713	0,332292
OleicoA - PalmíticoA	*	5,1	0,332292
OleicoA - PalmíticoC	*	4,37	0,332292
OleicoC - PalmíticoA	*	2,387	0,332292
OleicoC - PalmíticoC	*	1,657	0,332292
PalmíticoA - PalmíticoC	*	-0,73	0,332292

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 63 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 9 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las

medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	2,55116	0,026688

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
EsteáricoA / EsteáricoC	0,07	0,003	544,444	0,0037
EsteáricoA / LinolénicoA	0,07	0	1,#INF	0,0000
EsteáricoA / LinolénicoC	0,07	0,004	306,25	0,0065
EsteáricoA / LionoleicoA	0,07	0,3	0,0544444	0,1033
EsteáricoA / LionoleicoC	0,07	0,1	0,49	0,6577
EsteáricoA / MirísticoA	0,07	0,04	3,0625	0,4923
EsteáricoA / MirísticoC	0,07	0,1	0,49	0,6577
EsteáricoA / OleicoA	0,07	0,3	0,0544444	0,1033
EsteáricoA / OleicoC	0,07	0,008	76,5625	0,0258
EsteáricoA / PalmíticoA	0,07	0,5	0,0196	0,0384
EsteáricoA / PalmíticoC	0,07	0,1	0,49	0,6577
EsteáricoC / LinolénicoA	0,003	0	1,#INF	0,0000
EsteáricoC / LinolénicoC	0,003	0,004	0,5625	0,7200
EsteáricoC / LionoleicoA	0,003	0,3	0,0001	0,0002
EsteáricoC / LionoleicoC	0,003	0,1	0,0009	0,0018
EsteáricoC / MirísticoA	0,003	0,04	0,005625	0,0112
EsteáricoC / MirísticoC	0,003	0,1	0,0009	0,0018
EsteáricoC / OleicoA	0,003	0,3	0,0001	0,0002
EsteáricoC / OleicoC	0,003	0,008	0,140625	0,2466
EsteáricoC / PalmíticoA	0,003	0,5	0,000036	0,0001
EsteáricoC / PalmíticoC	0,003	0,1	0,0009	0,0018
LinolénicoA / LinolénicoC	0	0,004	0	0,0000
LinolénicoA / LionoleicoA	0	0,3	0	0,0000
LinolénicoA / LionoleicoC	0	0,1	0	0,0000
LinolénicoA / MirísticoA	0	0,04	0	0,0000
LinolénicoA / MirísticoC	0	0,1	0	0,0000
LinolénicoA / OleicoA	0	0,3	0	0,0000
LinolénicoA / OleicoC	0	0,008	0	0,0000
LinolénicoA / PalmíticoA	0	0,5	0	0,0000
LinolénicoA / PalmíticoC	0	0,1	0	0,0000
LinolénicoC / LionoleicoA	0,004	0,3	0,000177778	0,0004
LinolénicoC / LionoleicoC	0,004	0,1	0,0016	0,0032
LinolénicoC / MirísticoA	0,004	0,04	0,01	0,0198
LinolénicoC / MirísticoC	0,004	0,1	0,0016	0,0032
LinolénicoC / OleicoA	0,004	0,3	0,000177778	0,0004
LinolénicoC / OleicoC	0,004	0,008	0,25	0,4000
LinolénicoC / PalmíticoA	0,004	0,5	0,000064	0,0001
LinolénicoC / PalmíticoC	0,004	0,1	0,0016	0,0032

LionoleicoA / LionoleicoC	0,3	0,1	9,0	0,2000
LionoleicoA / MirísticoA	0,3	0,04	56,25	0,0349
LionoleicoA / MirísticoC	0,3	0,1	9,0	0,2000
LionoleicoA / OleicoA	0,3	0,3	1,0	1,0000
LionoleicoA / OleicoC	0,3	0,008	1406,25	0,0014
LionoleicoA / PalmíticoA	0,3	0,5	0,36	0,5294
LionoleicoA / PalmíticoC	0,3	0,1	9,0	0,2000
LionoleicoC / MirísticoA	0,1	0,04	6,25	0,2759
LionoleicoC / MirísticoC	0,1	0,1	1,0	1,0000
LionoleicoC / OleicoA	0,1	0,3	0,111111	0,2000
LionoleicoC / OleicoC	0,1	0,008	156,25	0,0127
LionoleicoC / PalmíticoA	0,1	0,5	0,04	0,0769
LionoleicoC / PalmíticoC	0,1	0,1	1,0	1,0000
MirísticoA / MirísticoC	0,04	0,1	0,16	0,2759
MirísticoA / OleicoA	0,04	0,3	0,0177778	0,0349
MirísticoA / OleicoC	0,04	0,008	25,0	0,0769
MirísticoA / PalmíticoA	0,04	0,5	0,0064	0,0127
MirísticoA / PalmíticoC	0,04	0,1	0,16	0,2759
MirísticoC / OleicoA	0,1	0,3	0,111111	0,2000
MirísticoC / OleicoC	0,1	0,008	156,25	0,0127
MirísticoC / PalmíticoA	0,1	0,5	0,04	0,0769
MirísticoC / PalmíticoC	0,1	0,1	1,0	1,0000
OleicoA / OleicoC	0,3	0,008	1406,25	0,0014
OleicoA / PalmíticoA	0,3	0,5	0,36	0,5294
OleicoA / PalmíticoC	0,3	0,1	9,0	0,2000
OleicoC / PalmíticoA	0,008	0,5	0,000256	0,0005
OleicoC / PalmíticoC	0,008	0,1	0,0064	0,0127
PalmíticoA / PalmíticoC	0,5	0,1	25,0	0,0769

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de Abundancia relativa dentro de cada uno de los 12 niveles de Ácidos grasos es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 38, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Prueba de Kruskal-Wallis para Abundancia relativa por Ácidos grasos

Ácidos grasos	Tamaño Muestra	Rango Promedio
EsteáricoA	3	17,0
EsteáricoC	3	14,0
LinolénicoA	3	5,0
LinolénicoC	3	2,0
LionoleicoA	3	28,0
LionoleicoC	3	35,0
MirísticoA	3	9,66667
MirísticoC	3	9,33333
OleicoA	3	32,0
OleicoC	3	27,0
PalmíticoA	3	20,0
PalmíticoC	3	23,0

Estadístico = 34,5734 Valor-P = 0,000291304

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de Abundancia relativa dentro de cada uno de los 12 niveles de Ácidos grasos son iguales. Primero se combinan los datos de todos los niveles y se ordenan de menor a mayor. Luego se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada nivel. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes, de la lista de Opciones Gráficas, y seleccione la opción de muesca de mediana.

Prueba de la Mediana de Mood para Abundancia relativa por Ácidos grasos

Total n = 36

Gran mediana = 18,815

Ácidos grasos	Tamaño de Muestra	n<=	n>	Mediana	LC inferior 95,0%	LC superior 95,0%
EsteáricoA	3	3	0	13,46		
EsteáricoC	3	3	0	7,911		
LinolénicoA	3	3	0	0,03051		
LinolénicoC	3	3	0	0,023		
LionoleicoA	3	0	3	27,2		
LionoleicoC	3	0	3	34,8		
MirísticoA	3	3	0	4,97		
MirísticoC	3	3	0	4,96		
OleicoA	3	0	3	29,7		
OleicoC	3	0	3	26,987		
PalmíticoA	3	0	3	24,6		
PalmíticoC	3	0	3	25,33		

Estadístico = 36,0 Valor-P = 0,000169236

La prueba de medianas de Mood evalúa la hipótesis de que las medianas de todas las 12 muestras son iguales. Lo hace contando el número de observaciones en cada muestra, a cada lado de la mediana global, la cual es igual a 18,815. Puesto que el valor-P para la prueba de chi-cuadrada es menor que 0,05, las medianas de las muestras son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%. También se incluyen (si están disponibles) los intervalos del 95,0% de confianza para mediana, basados en los estadísticos de orden de cada muestra.

11.13.4 ANOVA Simple – Relación insaturados/saturados para micelio

Variable dependiente: relación insaturados/saturados

Factor: Solvente

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Resumen Estadístico para relación insaturados/saturados

<i>Solvente</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Cloroformo A	3	1,76	0,05	2,84091%	1,71	1,81
Cloroformo C	3	1,34	0,05	3,73134%	1,29	1,39
Hexano A	3	2,19	0,05	2,28311%	2,14	2,24
Hexano C	3	2,12	0,05	2,35849%	2,07	2,17
Isopropanol A	3	1,58	0,05	3,16456%	1,53	1,63
Isopropanol C	3	2,61	0,05	1,91571%	2,56	2,66
Metanol A	3	0,57	0,05	8,77193%	0,52	0,62
Metanol C	3	0,62	0,05	8,06452%	0,57	0,67
Total	24	1,59875	0,700945	43,8433%	0,52	2,66

<i>Solvente</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
Cloroformo A	0,1	0	
Cloroformo C	0,1	0	
Hexano A	0,1	0	
Hexano C	0,1	0	
Isopropanol A	0,1	0	
Isopropanol C	0,1	0	
Metanol A	0,1	0	
Metanol C	0,1	0	
Total	2,14	-0,542942	-1,10377

Tabla ANOVA para relación insaturados/saturados por Solvente

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	11,2605	7	1,60864	643,45	0,0000
Intra grupos	0,04	16	0,0025		
Total (Corr.)	11,3005	23			

La tabla ANOVA descompone la varianza de relación insaturados/saturados en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 643,455, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Índice de INSaturación entre un nivel de Solvente y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Tabla de Medias para relación insaturados/saturados por Solvente con intervalos de confianza del 95,0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Solvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Cloroformo A	3	1,76	0,0288675	1,71673	1,80327
Cloroformo C	3	1,34	0,0288675	1,29673	1,38327
Hexano A	3	2,19	0,0288675	2,14673	2,23327
Hexano C	3	2,12	0,0288675	2,07673	2,16327
Isopropanol A	3	1,58	0,0288675	1,53673	1,62327
Isopropanol C	3	2,61	0,0288675	2,56673	2,65327
Metanol A	3	0,57	0,0288675	0,526728	0,613272
Metanol C	3	0,62	0,0288675	0,576728	0,663272
Total	24	1,59875			

Esta tabla muestra la media de relación insaturados/saturados para cada nivel de Solvente. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Pruebas de Múltiple Rangos para relación insaturados/saturados por Solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Solvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Metanol A	3	0,57	×
Metanol C	3	0,62	×
Cloroformo C	3	1,34	×
Isopropanol A	3	1,58	×
Cloroformo A	3	1,76	×

Hexano C	3	2,12	X
Hexano A	3	2,19	X
Isopropanol C	3	2,61	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Cloroformo A - Cloroformo C	*	0,42	0,086545
Cloroformo A - Hexano A	*	-0,43	0,086545
Cloroformo A - Hexano C	*	-0,36	0,086545
Cloroformo A - Isopropanol A	*	0,18	0,086545
Cloroformo A - Isopropanol C	*	-0,85	0,086545
Cloroformo A - Metanol A	*	1,19	0,086545
Cloroformo A - Metanol C	*	1,14	0,086545
Cloroformo C - Hexano A	*	-0,85	0,086545
Cloroformo C - Hexano C	*	-0,78	0,086545
Cloroformo C - Isopropanol A	*	-0,24	0,086545
Cloroformo C - Isopropanol C	*	-1,27	0,086545
Cloroformo C - Metanol A	*	0,77	0,086545
Cloroformo C - Metanol C	*	0,72	0,086545
Hexano A - Hexano C		0,07	0,086545
Hexano A - Isopropanol A	*	0,61	0,086545
Hexano A - Isopropanol C	*	-0,42	0,086545
Hexano A - Metanol A	*	1,62	0,086545
Hexano A - Metanol C	*	1,57	0,086545
Hexano C - Isopropanol A	*	0,54	0,086545
Hexano C - Isopropanol C	*	-0,49	0,086545
Hexano C - Metanol A	*	1,55	0,086545
Hexano C - Metanol C	*	1,5	0,086545
Isopropanol A - Isopropanol C	*	-1,03	0,086545
Isopropanol A - Metanol A	*	1,01	0,086545
Isopropanol A - Metanol C	*	0,96	0,086545
Isopropanol C - Metanol A	*	2,04	0,086545
Isopropanol C - Metanol C	*	1,99	0,086545
Metanol A - Metanol C		-0,05	0,086545

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 26 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la

diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0	1,0

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
Cloroformo A / Cloroformo C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo A / Hexano A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo A / Hexano C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo A / Isopropanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo A / Isopropanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo A / Metanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo A / Metanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo C / Hexano A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo C / Hexano C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo C / Isopropanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo C / Isopropanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo C / Metanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Cloroformo C / Metanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano A / Hexano C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano A / Isopropanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano A / Isopropanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano A / Metanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano A / Metanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano C / Isopropanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano C / Isopropanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano C / Metanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Hexano C / Metanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Isopropanol A / Isopropanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Isopropanol A / Metanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Isopropanol A / Metanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Isopropanol C / Metanol A	0,05	0,05	1,0	1,0000
Isopropanol C / Metanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000
Metanol A / Metanol C	0,05	0,05	1,0	1,0000

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de relación insaturados/saturados dentro de cada uno de los 8 niveles de Solvente es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 0, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Prueba de Kruskal-Wallis para relación insaturados/saturados por Solvente

<i>Solvente</i>	<i>Tamaño Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
Cloroformo A	3	14,0
Cloroformo C	3	8,0
Hexano A	3	19,6667
Hexano C	3	17,3333
Isopropanol A	3	11,0
Isopropanol C	3	23,0
Metanol A	3	2,66667
Metanol C	3	4,33333

Estadístico = 22,4062 Valor-P = 0,00216142

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de relación insaturados/saturados dentro de cada uno de los 8 niveles de Solvente son iguales. Primero se combinan los datos de todos los niveles y se ordenan de menor a mayor. Luego se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada nivel. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes, de la lista de Opciones Gráficas, y seleccione la opción de muesca de mediana.

Prueba de la Mediana de Mood para relación insaturados/saturados por Solvente

Total n = 24

Gran mediana = 1,67

<i>Solvente</i>	<i>Tamaño de Muestra</i>	<i>n<=</i>	<i>n></i>	<i>Mediana</i>	<i>LC inferior 95,0%</i>	<i>LC superior 95,0%</i>
Cloroformo A	3	0	3	1,76		
Cloroformo C	3	3	0	1,34		
Hexano A	3	0	3	2,19		
Hexano C	3	0	3	2,12		
Isopropanol A	3	3	0	1,58		
Isopropanol C	3	0	3	2,61		
Metanol A	3	3	0	0,57		
Metanol C	3	3	0	0,62		

Estadístico = 24,0 Valor-P = 0,00113935

La prueba de medianas de Mood evalúa la hipótesis de que las medianas de todas las 8 muestras son iguales. Lo hace contando el número de observaciones en cada muestra, a cada lado de la mediana global, la cual es igual a 1,67. Puesto que el valor-P para la prueba de chi-cuadrada es menor que 0,05, las medianas de las muestras son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%. También se incluyen (si están disponibles) los intervalos del 95,0% de confianza para mediana, basados en los estadísticos de orden de cada muestra.

11.13.5 ANOVA Simple – Abundancia relativas fase levadura

Variable dependiente: Abundancia relativa leva

Factor: Ácidos grasos levadura

Número de observaciones: 36

Número de niveles: 12

Resumen Estadístico para Abundancia relativa leva

Ácidos grasos levadura	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo
EsteáricoA	3	22,306	0,003	0,0134493%	22,303
EsteáricoC	3	29,33	0,07	0,238663%	29,26
LinolénicoA	3	0	0	%	0
LinolénicoC	3	0,07	0,04	57,1429%	0,03
LionoleicoA	3	12,3	0,1	0,813008%	12,2
LionoleicoC	3	6,82667	0,0702377	1,02887%	6,76
MirísticoA	3	0,5	0,1	20,0%	0,4
MirísticoC	3	0,98	0,006	0,612245%	0,974
OleicoA	3	23,9333	0,061101	0,255297%	23,88
OleicoC	3	18,9	0,3	1,5873%	18,6
PalmíticoA	3	41,0	0,1	0,243902%	40,9
PalmíticoC	3	43,87	0,05	0,113973%	43,82
Total	36	16,668	15,3773	92,2567%	0

Ácidos grasos levadura	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
EsteáricoA	22,309	0,006	0	
EsteáricoC	29,4	0,14	0	
LinolénicoA	0	0		
LinolénicoC	0,11	0,08	0	
LionoleicoA	12,4	0,2	0	
LionoleicoC	6,9	0,14	0,299299	
MirísticoA	0,6	0,2	0	
MirísticoC	0,986	0,012	0	
OleicoA	24,0	0,12	0,6613	
OleicoC	19,2	0,6	0	
PalmíticoA	41,1	0,2	0	
PalmíticoC	43,92	0,1	0	
Total	43,92	43,92	1,15006	-1,29376

Tabla ANOVA para Abundancia relativa leva por Ácidos grasos levadura

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	8275,92	11	752,356	65559,27	0,0000
Intra grupos	0,275423	24	0,011476		
Total (Corr.)	8276,2	35			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Abundancia relativa leva en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 65559,3, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Abundancia relativa leva entre un nivel de Ácidos grasos levadura y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Tabla de Medias para Abundancia relativa leva por Ácidos grasos levadura con intervalos de confianza del 95,0%

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i> <i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
EsteáricoA	3	22,306	0,0618492	22,2157	22,3963
EsteáricoC	3	29,33	0,0618492	29,2397	29,4203
LinolénicoA	3	0	0,0618492	-0,0902627	0,0902627
LinolénicoC	3	0,07	0,0618492	-0,0202627	0,160263
LionoleicoA	3	12,3	0,0618492	12,2097	12,3903
LionoleicoC	3	6,82667	0,0618492	6,7364	6,91693
MirísticoA	3	0,5	0,0618492	0,409737	0,590263
MirísticoC	3	0,98	0,0618492	0,889737	1,07026
OleicoA	3	23,9333	0,0618492	23,8431	24,0236
OleicoC	3	18,9	0,0618492	18,8097	18,9903
PalmíticoA	3	41,0	0,0618492	40,9097	41,0903
PalmíticoC	3	43,87	0,0618492	43,7797	43,9603
Total	36	16,668			

Esta tabla muestra la media de Abundancia relativa leva para cada nivel de Ácidos grasos levadura. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Pruebas de Múltiple Rangos para Abundancia relativa leva por Ácidos grasos levadura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
LinolénicoA	3	0	X
LinolénicoC	3	0,07	X
MirísticoA	3	0,5	X
MirísticoC	3	0,98	X
LionoleicoC	3	6,82667	X
LionoleicoA	3	12,3	X
OleicoC	3	18,9	X
EsteáricoA	3	22,306	X
OleicoA	3	23,9333	X
EsteáricoC	3	29,33	X
PalmíticoA	3	41,0	X
PalmíticoC	3	43,87	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
EsteáricoA - EsteáricoC	*	-7,024	0,180525
EsteáricoA - LinolénicoA	*	22,306	0,180525
EsteáricoA - LinolénicoC	*	22,236	0,180525
EsteáricoA - LionoleicoA	*	10,006	0,180525
EsteáricoA - LionoleicoC	*	15,4793	0,180525
EsteáricoA - MirísticoA	*	21,806	0,180525
EsteáricoA - MirísticoC	*	21,326	0,180525
EsteáricoA - OleicoA	*	-1,62733	0,180525
EsteáricoA - OleicoC	*	3,406	0,180525
EsteáricoA - PalmíticoA	*	-18,694	0,180525
EsteáricoA - PalmíticoC	*	-21,564	0,180525
EsteáricoC - LinolénicoA	*	29,33	0,180525
EsteáricoC - LinolénicoC	*	29,26	0,180525
EsteáricoC - LionoleicoA	*	17,03	0,180525
EsteáricoC - LionoleicoC	*	22,5033	0,180525
EsteáricoC - MirísticoA	*	28,83	0,180525
EsteáricoC - MirísticoC	*	28,35	0,180525
EsteáricoC - OleicoA	*	5,39667	0,180525
EsteáricoC - OleicoC	*	10,43	0,180525
EsteáricoC - PalmíticoA	*	-11,67	0,180525
EsteáricoC - PalmíticoC	*	-14,54	0,180525
LinolénicoA - LinolénicoC		-0,07	0,180525
LinolénicoA - LionoleicoA	*	-12,3	0,180525
LinolénicoA - LionoleicoC	*	-6,82667	0,180525
LinolénicoA - MirísticoA	*	-0,5	0,180525
LinolénicoA - MirísticoC	*	-0,98	0,180525
LinolénicoA - OleicoA	*	-23,9333	0,180525
LinolénicoA - OleicoC	*	-18,9	0,180525
LinolénicoA - PalmíticoA	*	-41,0	0,180525
LinolénicoA - PalmíticoC	*	-43,87	0,180525

LinolénicoC - LionoleicoA	*	-12,23	0,180525
LinolénicoC - LionoleicoC	*	-6,75667	0,180525
LinolénicoC - MirísticoA	*	-0,43	0,180525
LinolénicoC - MirísticoC	*	-0,91	0,180525
LinolénicoC - OleicoA	*	-23,8633	0,180525
LinolénicoC - OleicoC	*	-18,83	0,180525
LinolénicoC - PalmíticoA	*	-40,93	0,180525
LinolénicoC - PalmíticoC	*	-43,8	0,180525
LionoleicoA - LionoleicoC	*	5,47333	0,180525
LionoleicoA - MirísticoA	*	11,8	0,180525
LionoleicoA - MirísticoC	*	11,32	0,180525
LionoleicoA - OleicoA	*	-11,6333	0,180525
LionoleicoA - OleicoC	*	-6,6	0,180525
LionoleicoA - PalmíticoA	*	-28,7	0,180525
LionoleicoA - PalmíticoC	*	-31,57	0,180525
LionoleicoC - MirísticoA	*	6,32667	0,180525
LionoleicoC - MirísticoC	*	5,84667	0,180525
LionoleicoC - OleicoA	*	-17,1067	0,180525
LionoleicoC - OleicoC	*	-12,0733	0,180525
LionoleicoC - PalmíticoA	*	-34,1733	0,180525
LionoleicoC - PalmíticoC	*	-37,0433	0,180525
MirísticoA - MirísticoC	*	-0,48	0,180525
MirísticoA - OleicoA	*	-23,4333	0,180525
MirísticoA - OleicoC	*	-18,4	0,180525
MirísticoA - PalmíticoA	*	-40,5	0,180525
MirísticoA - PalmíticoC	*	-43,37	0,180525
MirísticoC - OleicoA	*	-22,9533	0,180525
MirísticoC - OleicoC	*	-17,92	0,180525
MirísticoC - PalmíticoA	*	-40,02	0,180525
MirísticoC - PalmíticoC	*	-42,89	0,180525
OleicoA - OleicoC	*	5,03333	0,180525
OleicoA - PalmíticoA	*	-17,0667	0,180525
OleicoA - PalmíticoC	*	-19,9367	0,180525
OleicoC - PalmíticoA	*	-22,1	0,180525
OleicoC - PalmíticoC	*	-24,97	0,180525
PalmíticoA - PalmíticoC	*	-2,87	0,180525

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 65 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 11 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las

medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	2,20292	0,0512853

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
EsteáricoA / EsteáricoC	0,003	0,07	0,00183673	0,0037
EsteáricoA / LinolénicoA	0,003	0	1,#INF	0,0000
EsteáricoA / LinolénicoC	0,003	0,04	0,005625	0,0112
EsteáricoA / LionoleicoA	0,003	0,1	0,0009	0,0018
EsteáricoA / LionoleicoC	0,003	0,0702377	0,00182432	0,0036
EsteáricoA / MirísticoA	0,003	0,1	0,0009	0,0018
EsteáricoA / MirísticoC	0,003	0,006	0,25	0,4000
EsteáricoA / OleicoA	0,003	0,061101	0,00241071	0,0048
EsteáricoA / OleicoC	0,003	0,3	0,0001	0,0002
EsteáricoA / PalmíticoA	0,003	0,1	0,0009	0,0018
EsteáricoA / PalmíticoC	0,003	0,05	0,0036	0,0072
EsteáricoC / LinolénicoA	0,07	0	1,#INF	0,0000
EsteáricoC / LinolénicoC	0,07	0,04	3,0625	0,4923
EsteáricoC / LionoleicoA	0,07	0,1	0,49	0,6577
EsteáricoC / LionoleicoC	0,07	0,0702377	0,993243	0,9966
EsteáricoC / MirísticoA	0,07	0,1	0,49	0,6577
EsteáricoC / MirísticoC	0,07	0,006	136,111	0,0146
EsteáricoC / OleicoA	0,07	0,061101	1,3125	0,8649
EsteáricoC / OleicoC	0,07	0,3	0,0544444	0,1033
EsteáricoC / PalmíticoA	0,07	0,1	0,49	0,6577
EsteáricoC / PalmíticoC	0,07	0,05	1,96	0,6757
LinolénicoA / LinolénicoC	0	0,04	0	0,0000
LinolénicoA / LionoleicoA	0	0,1	0	0,0000
LinolénicoA / LionoleicoC	0	0,0702377	0	0,0000
LinolénicoA / MirísticoA	0	0,1	0	0,0000
LinolénicoA / MirísticoC	0	0,006	0	0,0000
LinolénicoA / OleicoA	0	0,061101	0	0,0000
LinolénicoA / OleicoC	0	0,3	0	0,0000
LinolénicoA / PalmíticoA	0	0,1	0	0,0000
LinolénicoA / PalmíticoC	0	0,05	0	0,0000
LinolénicoC / LionoleicoA	0,04	0,1	0,16	0,2759
LinolénicoC / LionoleicoC	0,04	0,0702377	0,324324	0,4898
LinolénicoC / MirísticoA	0,04	0,1	0,16	0,2759
LinolénicoC / MirísticoC	0,04	0,006	44,4444	0,0440
LinolénicoC / OleicoA	0,04	0,061101	0,428571	0,6000
LinolénicoC / OleicoC	0,04	0,3	0,0177778	0,0349
LinolénicoC / PalmíticoA	0,04	0,1	0,16	0,2759

LinolénicoC / PalmíticoC	0,04	0,05	0,64	0,7805
LionoleicoA / LionoleicoC	0,1	0,0702377	2,02703	0,6607
LionoleicoA / MirísticoA	0,1	0,1	1,0	1,0000
LionoleicoA / MirísticoC	0,1	0,006	277,778	0,0072
LionoleicoA / OleicoA	0,1	0,061101	2,67857	0,5437
LionoleicoA / OleicoC	0,1	0,3	0,111111	0,2000
LionoleicoA / PalmíticoA	0,1	0,1	1,0	1,0000
LionoleicoA / PalmíticoC	0,1	0,05	4,0	0,4000
LionoleicoC / MirísticoA	0,0702377	0,1	0,493333	0,6607
LionoleicoC / MirísticoC	0,0702377	0,006	137,037	0,0145
LionoleicoC / OleicoA	0,0702377	0,061101	1,32143	0,8615
LionoleicoC / OleicoC	0,0702377	0,3	0,0548148	0,1039
LionoleicoC / PalmíticoA	0,0702377	0,1	0,493333	0,6607
LionoleicoC / PalmíticoC	0,0702377	0,05	1,97333	0,6726
MirísticoA / MirísticoC	0,1	0,006	277,778	0,0072
MirísticoA / OleicoA	0,1	0,061101	2,67857	0,5437
MirísticoA / OleicoC	0,1	0,3	0,111111	0,2000
MirísticoA / PalmíticoA	0,1	0,1	1,0	1,0000
MirísticoA / PalmíticoC	0,1	0,05	4,0	0,4000
MirísticoC / OleicoA	0,006	0,061101	0,00964286	0,0191
MirísticoC / OleicoC	0,006	0,3	0,0004	0,0008
MirísticoC / PalmíticoA	0,006	0,1	0,0036	0,0072
MirísticoC / PalmíticoC	0,006	0,05	0,0144	0,0284
OleicoA / OleicoC	0,061101	0,3	0,0414815	0,0797
OleicoA / PalmíticoA	0,061101	0,1	0,373333	0,5437
OleicoA / PalmíticoC	0,061101	0,05	1,49333	0,8021
OleicoC / PalmíticoA	0,3	0,1	9,0	0,2000
OleicoC / PalmíticoC	0,3	0,05	36,0	0,0541
PalmíticoA / PalmíticoC	0,1	0,05	4,0	0,4000

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de Abundancia relativa leva dentro de cada uno de los 12 niveles de Ácidos grasos levadura es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 30, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Prueba de Kruskal-Wallis para Abundancia relativa leva por Ácidos grasos levadura

Ácidos grasos levadura	Tamaño Muestra	Rango Promedio
EsteáricoA	3	23,0
EsteáricoC	3	29,0
LinolénicoA	3	2,0
LinolénicoC	3	5,0
LionoleicoA	3	17,0
LionoleicoC	3	14,0
MirísticoA	3	8,0
MirísticoC	3	11,0
OleicoA	3	26,0
OleicoC	3	20,0
PalmíticoA	3	32,0
PalmíticoC	3	35,0

Estadístico = 34,8017 Valor-P = 0,000267167

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de Abundancia relativa leva dentro de cada uno de los 12 niveles de Ácidos grasos levadura son iguales. Primero se combinan los datos de todos los niveles y se ordenan de menor a mayor. Luego se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada nivel. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes, de la lista de Opciones Gráficas, y seleccione la opción de muesca de mediana.

Prueba de la Mediana de Mood para Abundancia relativa leva por Ácidos grasos levadura

Total n = 36

Gran mediana = 15,5

Ácidos grasos levadura	Tamaño de Muestra	n<=	n>	Mediana	LC inferior 95,0%	LC superior 95,0%
EsteáricoA	3	0	3	22,306		
EsteáricoC	3	0	3	29,33		
LinolénicoA	3	3	0	0		
LinolénicoC	3	3	0	0,07		
LionoleicoA	3	3	0	12,3		
LionoleicoC	3	3	0	6,82		
MirísticoA	3	3	0	0,5		
MirísticoC	3	3	0	0,98		
OleicoA	3	0	3	23,92		
OleicoC	3	0	3	18,9		
PalmíticoA	3	0	3	41,0		
PalmíticoC	3	0	3	43,87		

Estadístico = 36,0 Valor-P = 0,000169236

La prueba de medianas de Mood evalúa la hipótesis de que las medianas de todas las 12 muestras son iguales. Lo hace contando el número de observaciones en cada muestra, a cada lado de la mediana

global, la cual es igual a 15,5. Puesto que el valor-P para la prueba de chi-cuadrada es menor que 0,05, las medianas de las muestras son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%. También se incluyen (si están disponibles) los intervalos del 95,0% de confianza para mediana, basados en los estadísticos de orden de cada muestra.