



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

EFFECTO DE ONDAS DE CHOQUE MONOPULSO Y TÁNDEM SOBRE LA PARED  
CELULAR DE CONIDIOS DEL HONGO *ASPERGILLUS NIGER*

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERA DE MATERIALES

PRESENTA:  
DANIEL LARRAÑAGA ORDAZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. ACHIM MAX LOSKE MEHLING  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

COMITÉ TUTOR  
DRA. BLANCA EDITH MILLÁN CHIU  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA - CONSEJO NACIONAL DE  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
DR. MIGUEL ÁNGEL GÓMEZ LIM  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO NOVIEMBRE DEL 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# CONTENIDO

- RESUMEN ..... 10
- 1. ONDAS DE CHOQUE APLICADAS A BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS..... 12
  - 1.1 TRANSFORMACIÓN GÉNÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS UTILIZANDO ONDAS DE CHOQUE ..... 12
  - 1.2 FENÓMENOS FÍSICOS ASOCIADOS A LA TRANSFORMACIÓN GÉNÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS UTILIZANDO ONDAS DE CHOQUE..... 14
- 2. ONDAS DE CHOQUE ..... 18
  - 2.1 DEFINICIÓN ..... 18
  - 2.2 PROPAGACIÓN DE LAS ONDAS DE CHOQUE ..... 22
  - 2.3 CAVITACIÓN ACÚSTICA..... 24
  - 2.4 GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE PIEZOELÉCTRICO MONOPULSO Y TÁNDEM..... 26
  - 2.5 MODELADO MATEMÁTICO Y DINÁMICA DE FLUIDOS COMPUTACIONAL EN EL ANÁLISIS DE LA CAVITACIÓN ACÚSTICA..... 30
- 3. *ASPERGILLUS NIGER*..... 36
  - 3.1 CICLO DE REPRODUCCIÓN ASEXUAL DE LOS CONIDIOS DE *ASPERGILLUS NIGER* ..... 36
  - 3.2 PARED CELULAR DE LOS CONIDIOS DE *ASPERGILLUS NIGER*..... 37
- 4. JUSTIFICACIÓN..... 41
- 5. HIPÓTESIS..... 41
- 6. OBJETIVO GENERAL ..... 42
- 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 42
- 8. METODOLOGÍA..... 43
  - 8.1 GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE PIEZOELÉCTRICO MULTIFUNCIONAL..... 43
  - 8.2 MEDICIONES DE PRESIÓN ..... 44
  - 8.3 FOTOGRAFÍAS DE ALTA VELOCIDAD ..... 45
  - 8.4 CULTIVO Y OBTENCIÓN DE LOS CONIDIOS DE *ASPERGILLUS NIGER* ..... 46
  - 8.5 EXPOSICIÓN DE *ASPERGILLUS NIGER* A ONDAS DE CHOQUE ..... 46
  - 8.6 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR ..... 48
  - 8.7 ANÁLISIS MORFOLÓGICO..... 49
  - 8.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y TRANSMISIÓN ..... 49

<b>9. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>9.1 MEDICIONES DE PRESIÓN EN EL GENERADOR MULTIFUNCIONAL .....</b>	<b>52</b>
<b>9.2 RETRASO ÓPTIMO PARA ONDAS DE CHOQUE EN MODO TÁNDEM .....</b>	<b>53</b>
<b>9.3 MORFOLOGÍA SUPERFICIAL DE LA PARED CELULAR OBSERVADA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....</b>	<b>58</b>
<b>9.4 CAMBIOS EN LA PARED CELULAR OBSERVADA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>9.5 VIABILIDAD DE LOS CONIDIOS DESPUÉS DE SER EXPUESTOS A ONDAS DE CHOQUE .....</b>	<b>69</b>
<b>9.6 INFLUENCIA DE LAS ONDAS DE CHOQUE EN LAS FASES DE CRECIMIENTO POLARIZADO Y GERMINACIÓN DE LOS CONIDIOS .....</b>	<b>70</b>
<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>84</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imagen de la simulación realizada por Kfoury et al. (2019) en donde se ve la interacción de una onda de choque que se propaga en femtosegundos de izquierda a derecha a través de una membrana celular arbitraria. La ubicación del pulso de compresión se resaltó con rectángulos verdes punteados. El agua se representó con puntos rojos pequeños, con azules la POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina) como la fosfatidilcolina, con amarillo el colesterol y las esferas rojas grandes representan los átomos de fósforo. T = 0 es el tiempo inicial, antes de la llegada de la onda de choque a la membrana celular. T = 350 fs es el momento en que el pulso positivo comprime la membrana celular, desordenando sus moléculas. En T = 700 fs el pulso de compresión ya pasó completamente la membrana celular.....	15
Figura 2: Micrografías electrónicas de barrido de células HEK (células embrionarias de riñón humano) tratadas con ondas de choque. (a) Células control; (b-d) células expuestas a ondas de choque. Se marcan con flechas los orificios transitorios y las vesículas formadas después del tratamiento. Referencia de la imagen (López-Marín et al., 2017).....	17
Figura 3: Perfil típico de una onda de choque en agua.....	20
Figura 4: Esquema que ilustra la zona focal de -6 dB, el eje de simetría y el plano focal. ....	21
Figura 5: Dinámica de una burbuja de aire suspendida en un líquido al interactuar con una onda de choque.....	25
Figura 6: Burbuja colapsando asimétricamente después de que una onda de choque pasó de izquierda a derecha. Modificado de (Wess, 2004). ....	26
Figura 7: Esquema de un generador piezoeléctrico. Figura modificada de (8). Los rayos azules representan la propagación de la onda de choque esférica. La zona focal roja está localizada en el centro del arreglo esférico. Los cristales piezoeléctricos se representaron por los cuadros grises en la base, la cual se recubre con un polímero aislante. ....	27
Figura 8: Transformación de un pulso de presión en una onda de choque al propagarse por el medio. ....	28
Figura 9: Ejemplo de una onda de choque tándem actuando sobre una burbuja de 70 $\mu\text{m}$ sumergida en agua.....	29
Figura 10: Ciclo de reproducción asexual de <i>A. niger</i> . Modificada de (Kavanagh, 2017). ....	37

<b>Figura 11: Modelo celular simplificado de un conidio de <i>A. niger</i>. Modificada de (Cole, 1986). .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 12: (a) molécula de quitina; (b) estructura ortorrómbica atribuida a la quitina. Estructura cristalina de <math>\alpha</math>-quitina: (c) plano ac; (d) plano bc; (e) plano ab. Estructura cristalina de <math>\beta</math>-quitina anhidra: (f) plano ac; (g) plano bc; (h) plano ab. Referencia de la imagen (Rinaudo, 2006). .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 13: Vista del Generador de Ondas de Choque Piezoeléctrico Multifuncional ubicado en el Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA, campus UNAM Juriquilla.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 14: Vista superior del generador de ondas de choque piezoeléctrico.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 15: Arreglo utilizado para la captura de imágenes de alta velocidad.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 16: Portamuestras y ejemplo de pipeta de transferencia (vial) utilizados en este estudio. Por claridad, para esta fotografía el vial se llenó con tinta roja. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 17: Esquema de los dos diseños experimentales. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 18: (Izquierda) Equipo de secado por punto crítico ubicado en el Laboratorio de Microscopía del CFATA. (Derecha) Portamuestras del equipo. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 19: Diagrama termodinámico P-t del CO<sub>2</sub> (Murray, Visintini, Bidoglio, &amp; Henry, 1996).51</b>	
<b>Figura 20: Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámicode burbujas dentro de un vial, expuesto a una onda de choque generada a 5.5 kV en modo monopulso lleno con: (a) agua destilada y (b) agua destilada con conidios. T = 33 <math>\mu</math>s. La flecha (1) indica la dirección de propagación de la onda de choque a través del agua dentro de la tina del generador (2). La flecha (3) indica el fondo del vial. La interfase entre el líquido y el aire dentro del vial se señala con la flecha (4). La difracción de la luz (5) dentro del vial aparece en cada imagen y es irrelevante para los propósitos de este estudio.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 21: Fotografías de alta velocidad (50,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a una onda de choque generada con 5.5 kV en modo: (a) monopulso; (b) tándem con un retraso de 40 <math>\mu</math>s y (c) tándem con un retraso de 160 <math>\mu</math>s. T = 20 <math>\mu</math>s. La flecha negra indica el sentido de propagación de la onda de choque. Las flechas rojas en los cuadros 2T y 8T señalan las burbujas para las que se seleccionó el retraso de 40 y 160 <math>\mu</math>s, respectivamente. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 22: Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámicode burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a ondas de choque generadas a 4 kV en modo (a) monopulso y (b) tándem con un retraso de 66.6 <math>\mu</math>s. La flecha negra en (a) indica</b>	

la dirección de propagación de la onda de choque. La flecha blanca indica un borde que tiene el vial debido a su fabricación y que no tiene relevancia en este estudio.  $T \approx 33.33 \mu\text{s}$ ..... 56

**Figura 23:** Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a ondas de choque generadas a 5 kV en modo (a) monopolso y (b) tándem con un retraso de 99.9  $\mu\text{s}$ . La flecha negra en (a) indica la dirección de propagación de la onda de choque. La flecha blanca indica un borde que tiene el vial debido a su fabricación y que no tiene relevancia en este estudio.  $T \approx 33.33 \mu\text{s}$ ..... 57

**Figura 24:** Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a ondas de choque generadas a 6 kV en modo (a) monopolso y (b) tándem con un retraso de 166.5  $\mu\text{s}$ . La flecha negra en (a) indica la dirección de propagación de la onda de choque. La flecha blanca indica un borde que tiene el vial debido a su fabricación y que no tiene relevancia en este estudio.  $T \approx 33.33 \mu\text{s}$ ..... 58

**Figura 25:** Micrografía electrónica de barrido de conidios de *A. niger* del grupo control (no expuestos a ondas de choque). ..... 59

**Figura 26:** Micrografía electrónica de barrido (20,000 aumentos) de conidios de *A. niger* expuestos a: (a) 50, (b) 100 y (c) 200 ondas de choque en modo monopolso. La flecha en (a) señala una vesícula formada después del tratamiento. En (b) las flechas indican pequeños orificios producto del tratamiento con ondas de choque. .... 61

**Figura 27:** Micrografía electrónica de barrido (20,000 aumentos), de conidios de *A. niger* expuestos a: (a) 50, (b) 100 y (c) 200 ondas de choque tándem con un retraso corto (40  $\mu\text{s}$ ); (d) 50, (e) 100 y (f) 200 ondas de choque tándem con un retraso largo (160  $\mu\text{s}$ )..... 62

**Figura 28:** Micrografía electrónica de transmisión de un conidio de *A. niger* no expuesto a ondas de choque. Los conidios exhiben un área transversal ovalada, casi circular. La capa interna de la pared celular se observa con una tonalidad entre blanco y gris oscuro y la externa se ve de color negro, debido a la melanina. .... 63

**Figura 29:** a) Micrografía electrónica de transmisión de un conidio de *A. niger* expuesto a 50 ondas de choque en modo monopolso. La imagen (b) es un acercamiento de una zona de la imagen (a), en donde aparentemente la capa externa de la pared se ve levantada, sobre todo en los sitios indicados con las flechas negras. .... 64

**Figura 30:** Micrografías electrónicas de transmisión de un conidio de *A. niger* expuesto a: a) 100 y b) 200 ondas de choque en modo monopolso. La flecha negra y las zonas encerradas en las elipses, en la figura (a), señalan desprendimientos de la capa externa de la pared celular. El conidio de la figura (b) tiene una mayor cantidad de zonas donde se desprendió la capa externa, así como una pared celular ondulada..... 65

**Figura 31: Micrografías electrónicas de transmisión de conidios expuestos a: a) 50, b) 100 y c) 200 ondas de choque en modo tándem con un retraso largo (160  $\mu$ s). Las flechas indican parte de la capa externa de la pared que se desprendió y la zona donde la membrana celular penetró hacia el citoplasma. El cuadro blanco en (b) indica un acercamiento a dicha zona. d) Muestra un acercamiento de la zona resaltada con un cuadro negro en la imagen (c). ..... 66**

**Figura 32: Micrografías electrónicas de barrido de conidios expuestos a a) 50, b) 100 y c) 200 ondas de choque en modo tándem con un retraso corto (40  $\mu$ s). Las flechas señalan parte de la capa externa de la pared que se desprendió, formación de vesículas, abultamientos de la pared y la presencia de material extraño en la célula. El cuadro blanco en (b) es un acercamiento a dicha zona. d) Acercamiento de la zona resaltada con un cuadro negro en (c). ..... 68**

**Figura 33 :Viabilidad observada en los diferentes tratamientos con ondas de choque. Monopulso ..... 69**

**Figura 34: Fotografías de conidios no tratados con ondas de choque, observados bajo un microscopio óptico a: a) después de 0 h, es decir, justo después de ser inoculados en el medio de cultivo para conidiación; b) después de 6 h, es decir, durante la fase de crecimiento isotrópico y c) después de 8 h, es decir, durante la fase de crecimiento polarizado. Las flechas indican el tubo germinal de los conidios que lo desarrollaron..... 70**

**Figura 35: Gráficas que muestran el crecimiento de los conidios, midiendo el área de la imagen plana capturada por la cámara, después de exponerlos a 50 ondas de choque generadas con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control..... 71**

**Figura 36: Gráficas que muestran el crecimiento de los conidios, midiendo el área de la imagen plana capturada por la cámara, después de exponerlos a 100 ondas de choque generadas con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control..... 72**

**Figura 37: Gráficas que muestran el crecimiento de los conidios, midiendo el área de la imagen plana capturada por la cámara, después de exponerlas a 200 ondas de choque generadas**



con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopolso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control..... 73

**Figura 38:** Gráficas que muestran el porcentaje de los conidios que desarrollaron tubo germinal, en el periodo de 6 a 12 h, después de exponerlos a 50 ondas de choque generadas con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopolso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control..... 74

**Figura 39:** Gráficas que muestran el porcentaje de los conidios que desarrollaron tubo germinal, en el periodo de 6 a 12 h, después de exponerlas a 100 ondas de choque generadas con un voltaje a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopolso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control..... 75

**Figura 40:** Gráficas que muestran el porcentaje de los conidios que desarrollaron tubo germinal, en el periodo de 6 a 12 h, después de exponerlas a 200 ondas de choque generadas con un voltaje a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopolso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control..... 76

## AGRADECIMIENTOS

Una gran cantidad de personas me ayudaron durante este trabajo. En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mi asesor, el Dr. Achim Max Loske Mehling por sus valiosas enseñanzas, paciencia y acompañamiento durante mi estancia en el *Laboratorio de Ondas de Choque*. Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Blanca Edith Millán Chiu, miembro de mi comité tutor, por todo el tiempo y esfuerzo dedicado a este trabajo. El nivel de compromiso de ambos estuvo al nivel de los mejores tutores y me ayudaron extraordinariamente a mejorar mis aptitudes profesionales. Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, investigador en CINVESTAV y miembro de mi comité tutor, por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

Se agradece el apoyo del M. en C. Francisco Fernández Escobar en la captura de las imágenes de alta velocidad. Al Dr. Eduardo Castaño Tostado, investigador del Posgrado de la Facultad de Química de la UAQ, cuyas preguntas críticas, apoyo con el diseño de los experimentos y los modelos estadísticos fueron parte fundamental de este trabajo. Al Dr. Miguel Ángel Martínez Maldonado, colaborador importante en todo el proceso de la obtención e interpretación de los resultados biológicos.

Mi más profundo agradecimiento a otras personas como la laboratorista Paula Bernardino Peláez, la IQF. Lili Diana Pérez Cárdenas y el estudiante de licenciatura Eduardo Ortiz Olan del Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA que me ayudaron, durante mis experimentos.

Al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica del CFATA entre los que se encuentran la M. en I.Q. Alicia del Real López, quien me capacitó en el uso del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6060LV. Al M. en C. Manuel Aguilar Franco por la obtención de micrografías electrónicas de barrido de alta resolución. Al Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz y la Dra. Carmen Peza Ledezma por permitirme el uso del equipo JEOL JSM-6060LV.

A la M. en C. Ana Lucía Tovar Álvarez del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, que sin su ayuda desinteresada no hubiera podido concluir la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido. También a la IBQ. Ma. Lourdes Palma Tirado, técnica del microscopio electrónico de transmisión del Instituto de

Neurobiología de la UNAM, que me apoyó con la preparación de las muestras para ambas microscopías electrónicas.

Al Dr. Juan José Gervacio Arciniega de la BUAP, que me instruyó en microscopía de fuerza atómica y me apoyó con la obtención de los resultados preliminares de esta técnica, aunque por complicaciones derivadas del COVID-19 no se pudo continuar con esta caracterización.

Al Dr. Rodrigo Alonso Esparza Muñoz, con quien tuve el gusto de compartir varias tardes en el SEM y quien me enseñó todos los principios de la misma técnica, sus enseñanzas y consejos me ayudaron en todas las microscopías que he utilizado. Dos personas que me apoyaron fuera del doctorado pero cuyas opiniones me ayudaron a mejorar el presente trabajo, son el Dr. Marco Antonio Zamora Antuñano y el José Antonio Cervantes Chávez.

Una persona muy importante que me ha asesorado durante toda mi estancia en el CFATA es el Dr. Álvaro de Jesús Ruiz Baltazar, gran amigo personal y clave fundamental en mi desarrollo profesional. Muchas situaciones las he resuelto más eficientemente gracias a sus enseñanzas. El aportó mucho al presente trabajo de manera desinteresada.

Un agradecimiento especial a mi esposa, la M. en C. Janet Sánchez Sánchez, por su ayuda, apoyo y trabajo en equipo durante esta etapa de mi vida. Fue pilar fundamental en el desarrollo de este proyecto.

Este trabajo se realizó con el soporte de la beca nacional de posgrado (2018-000012-01NACF-11394) por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el proyecto CONACYT A1-S-21130.

## RESUMEN

*Aspergillus niger* es una especie de hongo filamentoso aprovechado industrialmente para la producción de ácido cítrico. En el área de la biotecnología se utiliza para la expresión de genes heterólogos para producir diversas proteínas recombinantes. Para transformar genéticamente este tipo de microorganismos existen diversas técnicas que son caras y/o poco reproducibles. Uno de los métodos más nuevos y prometedores es la transformación con ondas de choque, que elimina la necesidad de trabajar con protoplastos. Desafortunadamente todavía no se conocen los detalles de los mecanismos involucrados en este proceso.

Actualmente se piensa que microcorrientes de fluido de alta presión y velocidad (microjets), derivados de la cavitación acústica, son los principales responsables de aumentar la permeabilidad en las células al utilizar ondas de choque en la transformación genética. Esta hipótesis se basa en que, usando microscopía electrónica, se han observado orificios transitorios en la membrana de células de mamíferos previamente tratadas con ondas de choque. Algunos autores sugieren que los esfuerzos mecánicos, ocasionados únicamente por la interacción de las ondas de choque con las células, son suficientes para aumentar la permeabilidad celular, es decir, opinan que el fenómeno puede darse sin la contribución de microjets. Esta hipótesis propone que los esfuerzos de compresión, generados por el pulso positivo de la onda, producen un aumento en el desorden en la bicapa lipídica, formando microporos. Otra hipótesis sugiere que la viscosidad superficial de las células influye significativamente en el fenómeno mencionado.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos físicos que sufre la pared celular de conidios del hongo *A. niger* al ser expuestos a ondas de choque con dos modos distintos de aplicación, monopulso y tándem. Para lograr este objetivo, se obtuvieron micrográficas electrónicas de barrido y transmisión de los conidios antes y después de ser sometidos a diferentes dosis (número de ondas y presión) de ondas de choque. Se encontró que las ondas de choque, especialmente en modo tándem, ocasionan deformaciones en la superficie de los conidios, así como mayor desbaste de la pared celular. Era de esperarse que dicha alteración repercutiera en la viabilidad y en el desarrollo del hongo. Por ello se estudió la viabilidad, así como el crecimiento isotrópico y anisotrópico de los conidios durante sus primeras 12 horas de vida. Los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones en las que se aplicaron las ondas de choque no hubo una afectación significativa. Los tratamientos con 50 y 100 ondas monopulso, generadas a 4 kV, incluso estimularon el crecimiento antes de las 4 h de vida. Esto es deseable para aplicaciones como la transformación genética. Además, entender los mecanismos a través de los cuales la

cavitación afecta las células, permitirá optimizar otras aplicaciones biotecnológicas como, por ejemplo, aquellas que requieren desprender parte de la superficie celular para obtener compuestos derivados de esta o mejorar algún proceso para la obtención de metabolitos.

# 1. ONDAS DE CHOQUE APLICADAS A BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS

Las ondas de choque generalmente son asociadas a fenómenos destructivos, sin embargo, desde hace aproximadamente 40 años se utilizan en aplicaciones relacionadas con la salud. Aprovechando esto y la propiedad que tienen las ondas de choque de propagarse a través de los tejidos blandos sin causar daños irreversibles, empezaron a utilizarse para destruir cálculos urinarios. Esta técnica fue nombrada **litotricia extracorpórea por ondas de choque** (LEOCH), en donde la palabra “*litotricia*” significa literalmente trituración de piedras. La LEOCH resultó ser una alternativa no invasiva muy eficiente para tratar este padecimiento. La primera LEOCH realizada fue el 7 de febrero de 1980 (Chaussy, Brendel, & Schmiedt, 1980). De acuerdo con la empresa Dornier, fabricante del primer generador clínico de ondas de choque, actualmente el 40% de estos padecimientos a nivel mundial son tratados mediante LEOCH (DornierMedTech, 2019). A partir de esta primera aplicación han surgido otras, las cuales han heredado la tecnología utilizada para la generación y aplicación de las ondas de choque.

Otra aplicación clínica ampliamente utilizada en la actualidad es la **terapia extracorpórea con ondas de choque** (TEOCH) que se utiliza para desórdenes musculoesqueléticos. Al igual que la LEOCH, esta técnica tiene gran aceptación porque no es invasiva. Algunos casos en donde es utilizada la TEOCH son: fascitis plantar, tendinitis calcificante de hombro, pseudoartrosis, disfunción eréctil, así como la estimulación en la síntesis de colágeno para ayudar a reducir la celulitis (Hammer et al., 2002; Hsu et al., 2008; Lei et al., 2013; Schaden et al., 2015; Silva, 2017). En biotecnología se ha encontrado que las ondas de choque pueden inactivar bacterias, como por ejemplo *E. Coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimrium* (Alvarez, Loske, Castano-Tostado, & Prieto, 2004; Sun et al., 2018).

## 1.1 TRANSFORMACIÓN GÉNÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS UTILIZANDO ONDAS DE CHOQUE

Una aplicación más reciente es la transformación genética, que permite introducir ADN exógeno al interior de células en suspensión. Esta técnica se ha utilizado tanto en transfección celular (transformación de células animales) (Millán-Chiu et al., 2014), como en transformación de

bacterias (A. Loske, Campos-Guillén, de Icaza-Herrera, Fernández, & Castaño-Tostado, 2012) y hongos (A. M. Loske et al., 2014). El caso particular de los hongos es ampliamente estudiado porque a partir de ellos se pueden obtener muchos productos útiles para la vida diaria. Un claro ejemplo es el hongo microscópico *A. niger*, uno de los hongos más importantes y estudiados para la fabricación de ácido cítrico, así como para la obtención de proteínas recombinantes y diversos metabolitos como la penicilina y la glucoamilasa (D. Li, Tang, Lin, & Cai, 2017; Son & Park, 2021). *A. niger* junto con *Penicillium* y *Trichoderma* abarcan más del 50% de las investigaciones actuales (Passos, Pereira, & Castro, 2018). El método de transformación convencional más utilizado es mediante la generación de protoplastos. En ese caso se utilizan enzimas para remover la pared celular, estructura protectora de la célula. Después, es necesario mantener una presión osmótica estable para evitar dañarlas. Una segunda metodología es adicionar iones de calcio para abrir canales en la membrana celular, por los cuales se facilita la entrada del ADN exógeno (D. Li et al., 2017; Penttilä, Nevalainen, Rättö, Salminen, & Knowles, 1987). Otro método biológico es hacer uso de bacterias del género *Agrobacterium*. Estos microorganismos son conocidos por infectar a las plantas formando un tumor sobre ellas, que les permite insertar material genético dentro de otras células (De Groot, Bundock, Hooykaas, & Beijersbergen, 1998). Estas bacterias usan plásmido pTi (del inglés plasmid tumor inductor) para integrar parte de su cadena de ADN al de las células, el cual se denomina T-ADN o ADN de transferencia (Martínez & Hernández, 2012). Existen métodos físicos como la electroporación, que consiste en someter las células a un campo eléctrico para aumentar la permeabilidad de la membrana (Weaver & Chizmadzhev, 1996). Otro método común es el de biobalística, en el cual se recubren partículas de oro o tungsteno con material genético y se aceleran a velocidades de 500 m/s para que puedan penetrar tanto la membrana como la pared celular (Armaleo et al., 1990).

La técnica con mayor similitud a la transformación con ondas de choque es el ultrasonido. (Mestas et al., 2015; Miller & Song, 2002). La diferencia entre ambos métodos radica en el hecho de que las ondas de choque son pulsos de presión, mientras que el ultrasonido es una onda armónica con frecuencias desde 20 kHz hasta 50 MHz, con presiones de sólo 2 Pa a 3 kPa por encima de la presión atmosférica (Miller, Pislaru, & Greenleaf, 2002; Yang, Li, Guo, Tu, & Zhang, 2020). Como en el ultrasonido no surgen variaciones de presión tan abruptas, generalmente es necesario introducir núcleos artificiales de cavitación de hexafluoruro de azufre (SonoVue) (Lin et al., 2017). En ambas técnicas, la hipótesis es que el principal fenómeno involucrado en modificar la permeabilidad de las membranas celulares, así como el responsable de la inserción de ADN exógeno al interior de las células, son los microjets (Kfoury, Marzban, Makki, Greenfield, & Yuan, 2019; Tetsuya Kodama, Hamblin, & Doukas, 2000; López-Marín et al., 2017; Mestas et al., 2015; Miller & Song, 2002). Además, la expansión y compresión de las burbujas genera corrientes que producen esfuerzos de corte en las superficies cercanas a ellas y la expansión de

las burbujas puede golpear cualquier objeto que se encuentre lo suficientemente cerca. Ambos mecanismos se han reportado también como responsables de la aparición de poros transitorios utilizando ultrasonido, aunque no se han explorado las implicaciones que tienen en el caso de la aplicación de ondas de choque (Qin, Han, Alfred, & Xu, 2018; Yang et al., 2020).

La transformación genética utilizando ondas de choque permite la inserción de material genético dentro de los conidios de hongos microscópicos, sin necesidad de tratamientos previos. Con este método se han reportado eficiencias de transformación mayores que con aquellas obtenidas con los métodos convencionales, siendo de 280 y 5400 veces mayor que la reportada con protoplastos y *Agrobacterium*, respectivamente (Gómez-Lim, Ortíz, Fernández, & Loske, 2015). Al propagarse las ondas de choque y pasar a través de las células, causan efectos físicos en la célula, tanto superficiales como internos. Varios de estos fenómenos han sido estudiados en otras aplicaciones biomédicas, como en la litotricia extracorpórea, aunque debe tenerse en mente que la respuesta de las células humanas es diferente a la de los conidios.

## **1.2 FENÓMENOS FÍSICOS ASOCIADOS A LA TRANSFORMACIÓN GÉNÉTICA DE CÉLULAS FÚNGICAS UTILIZANDO ONDAS DE CHOQUE**

Las ondas de choque generan esfuerzos mecánicos internos sobre cualquier medio que interactúe con ellas. Un tipo es el esfuerzo normal, una fuerza aplicada sobre un área transversal, de compresión y tensión ocasionada por el pulso de compresión y rarefacción, respectivamente. De acuerdo con autores como Koshiyama et al. (2006) o Kfoury y colaboradores (2019), los esfuerzos mecánicos normales de compresión, producidos por el paso de una onda de choque en la superficie celular, tienen un efecto considerable (Koshiyama, Kodama, Yano, & Fujikawa, 2006). El equipo de Kfoury propone con base en una simulación de dinámica molecular (figura 1), que el pulso de compresión es el responsable de aumentar la permeabilidad celular. Al comprimirse las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos propician la aparición de huecos que permiten que moléculas externas a la célula atraviesen la membrana.



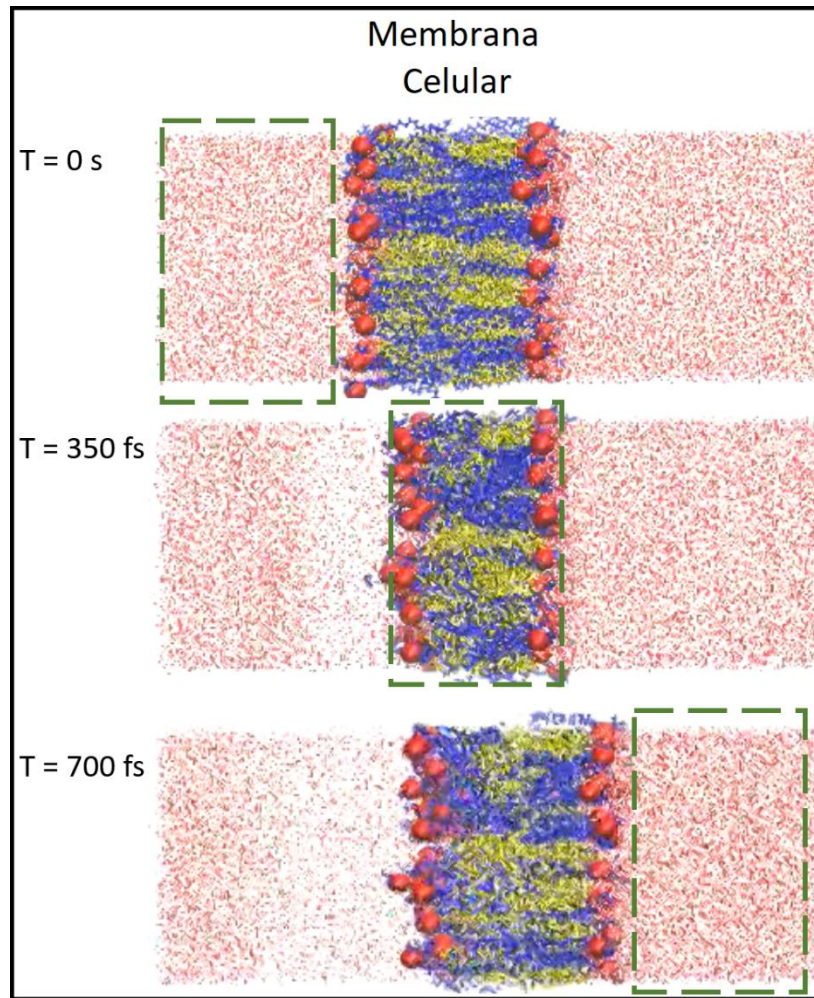


Figura 1: Imagen de la simulación realizada por Kfoury et al. (2019) en donde se ve la interacción de una onda de choque que se propaga en femtosegundos de izquierda a derecha a través de una membrana celular arbitraria. La ubicación del pulso de compresión se resaltó con rectángulos verdes punteados. El agua se representó con puntos rojos pequeños, con azules la POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina) como la fosfatidilcolina, con amarillo el colesterol y las esferas rojas grandes representan los átomos de fósforo.  $T = 0$  es el tiempo inicial, antes de la llegada de la onda de choque a la membrana celular.  $T = 350 \text{ fs}$  es el momento en que el pulso positivo comprime la membrana celular, desordenando sus moléculas. En  $T = 700 \text{ fs}$  el pulso de compresión ya pasó completamente la membrana celular.

Otro tipo de esfuerzos mecánicos que aparentemente también son relevantes son los esfuerzos cortantes, es decir, fuerzas paralelas a la superficie. Kodama y colaboradores (2000) propusieron que este tipo de esfuerzos se dan sobre la superficie celular por causa de la viscosidad y que un pulso de compresión más largo sería más eficiente para aumentar el número de células transformadas. Si se considera el caso de células esféricas, se estaría apreciando el efecto de

fuerzas tangentes a la curvatura celular, que podrían desprender moléculas superficiales que están directamente en contacto con las corrientes originadas por una onda de choque. Además, una onda mecánica al propagarse por un medio genera un gradiente de presión, que a su vez produce deformaciones graduales que dependerán de las propiedades mecánicas del medio de propagación. Los hongos filamentosos han sido poco estudiados desde una perspectiva biomecánica. Esto se debe a la complejidad de analizar las propiedades mecánicas en células.

Al transformar células utilizando ondas de choque, se han detectado orificios transitorios en la membrana celular de células embrionarias de riñón humano (HEK 293) (figura 2). Con base en esto y su similitud al daño observado en cálculos renales en LEOCH, se piensa que los microjets podrían funcionar como microjeringas capaces de inyectar fluido y así transportar ADN al interior de las células (López-Marín et al., 2017; C. Ohl & Ikink, 2003).

De acuerdo con una estimación reportada por Ohl e Ikink (2003), el volumen de líquido ( $v_j$ ) que es insertado por un microjet está en función de su radio inicial ( $r_0$ ):

$$v_j = 0.1r_0^3$$

Ecuación 1

En un trabajo anterior (López-Marín et al., 2017) se comparó la eficiencia de transformación de ondas de choque convencionales con ondas de choque tándem (ver **sección 2.4**), para transformar *A. niger*. Dicha publicación reporta que se fue aumentando el tiempo de retraso entre la primera y la segunda onda de 200 a 500  $\mu\text{s}$  en intervalos de 100  $\mu\text{s}$ . Con un retraso de 300  $\mu\text{s}$  se obtuvieron los mejores resultados de transformación (con una eficiencia hasta 50% mayor que con ondas de choque convencionales). Sin embargo, al ir aumentando el retraso también fue disminuyendo la viabilidad de las cepas, llegando a una reducción del 92% con un retraso de 500  $\mu\text{s}$  (A. M. Loske et al., 2014). Estos datos parecen sugerir que los microjets son importantes para insertar ADN dentro de las células; sin embargo, por la dificultad de observar el proceso, debido a las velocidades y escalas a las que se desarrolla, es necesario buscar más evidencias.

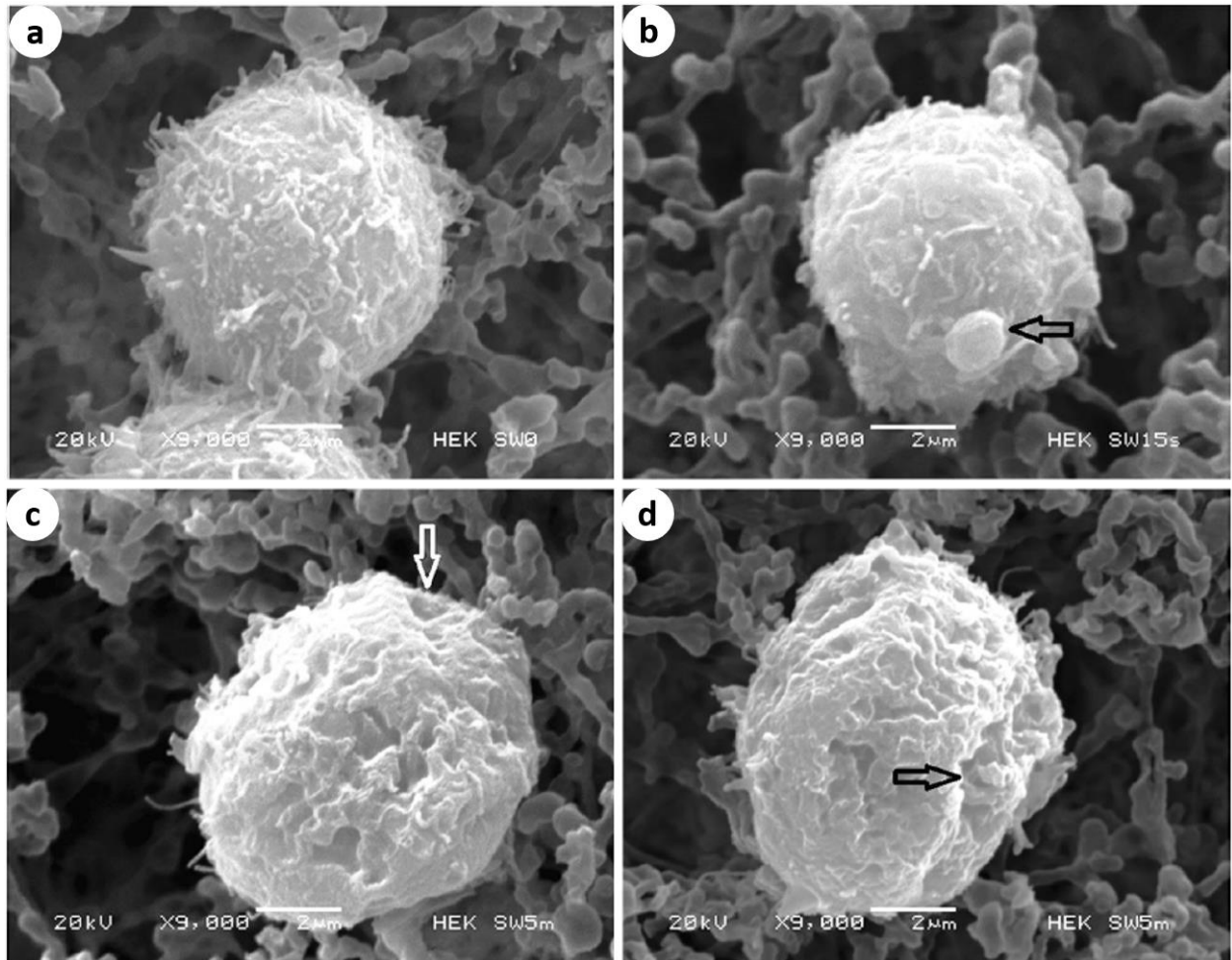


Figura 2: Micrografías electrónicas de barrido de células HEK (células embrionarias de riñón humano) tratadas con ondas de choque. (a) Células control; (b-d) células expuestas a ondas de choque. Se marcan con flechas los orificios transitorios y las vesículas formadas después del tratamiento. Referencia de la imagen (López-Marín et al., 2017).

## 2. ONDAS DE CHOQUE

### 2.1 DEFINICIÓN

De acuerdo con la Organización Internacional de Normalización (ISO, 2018), las ondas de choque (OCH) se definen como un pulso o perturbación que se propaga en un medio elástico, generando cambios rápidos de presión, densidad y velocidad de las partículas involucradas. En la naturaleza este tipo de ondas provienen de algún fenómeno súbito, por ejemplo, un rayo durante una tormenta eléctrica. Las ondas de choque se propagan a velocidades superiores a la velocidad del sonido, es decir, su número de Mach es mayor a 1, lo que puede ocasionar que cambien algunas de las propiedades del fluido con el que interactúa la onda de choque. Si el número de Mach es cercano a 1, como sucede con las ondas de choque de uso biomédico y biotecnológico, se utiliza el adjetivo “débil”. Por definición, el número de Mach (ecuación 2) es la velocidad de un objeto o partícula ( $v_p$ ), dividido entre la velocidad del sonido ( $c$ ) en el medio por el que se propaga dicho objeto.

$$Ma = \frac{v_p}{c}$$

Ecuación 2

La velocidad del sonido en el aire es de 346 m/s, a una temperatura aproximada de 27°C y presión de 101.3 kPa. En el agua este valor aumenta aproximadamente a 1500 m/s. Los datos anteriores se pueden calcular si se conocen el módulo de compresibilidad ( $K$ ) y la densidad ( $\rho$ ) del medio, haciendo uso de la ecuación (3) de Newton-Laplace:

$$c = \sqrt{\frac{K}{\rho}}$$

Ecuación 3

La velocidad de una partícula de fluido un instante después del paso de una onda de choque ( $\overline{u_2}$ ) puede ser calculada mediante la ecuación 4, en donde  $P$  es la presión del fluido por el que se propaga la onda de choque. Los estados “1” y “2” se refiere a las condiciones antes y después de la onda de choque (Ball, Howell, Leighton, & Schofield, 2000; Flores & Holt, 1981).

$$\overline{u_2} - \overline{u_1} = \sqrt{\frac{\rho_2 - \rho_1}{\rho_2 \rho_1} (P_2 - P_1)}$$

Ecuación 4

Para determinar los cambios de densidad en el fluido generalmente se utiliza la ecuación (5) de Tait, en donde  $\rho_0 \approx 1000 \text{ Kg/m}^3$ , considerando que las ondas de choque se propaguen en agua. Los valores de  $A$ ,  $B$  y  $n$  son valores experimentales. Una interpretación teórica identifica a  $A$  como una función universal de las variables reducidas y a  $B$  como una cantidad de presión característica específica del sistema (Nanda & Simha, 1964). Para agua pura se considera  $n = 7$ . Acorde a lo reportado en la literatura, esta ecuación no presenta errores significativos cuando la presión en el líquido se mantiene por debajo de 10 GPa (Haas & Sturtevant, 1987). La presión de las ondas de choque utilizadas en ciencias biomédicas y en biotecnología usualmente es del orden de MPa.

$$P = A \left( \frac{\rho}{\rho_0} \right)^n - B$$

Ecuación 5

Al registrar las variaciones de presión en el foco de un generador de ondas de choque, se obtiene un perfil similar al mostrado en la figura 1, en donde se representan los principales parámetros utilizados por convención. El primero de estos parámetros es la presión positiva  $P^+$ , definida como el valor máximo de presión del pulso de compresión de la onda de choque. Se considera positivo cualquier valor por encima de la presión de equilibrio en el sistema estacionario. En el caso de algunos equipos biomédicos experimentales, las ondas de choque se propagan por un líquido, generalmente agua, por lo que la presión en el punto de medición es el valor de referencia en donde se considera que la presión tiene el valor de 0. De acuerdo con la “Comisión Electrotécnica Internacional”, el tiempo de subida o ascenso de la presión ( $t_s$ ), también conocido como el espesor de choque de Taylor de la onda de choque, es el tiempo que tarda la presión en aumentar ( $\Delta P$ ) de un 10% a un 90% de la presión positiva máxima (Cleveland & McAteer, 2012; IEC, 2014b).

Es posible estimar el tiempo de subida para ondas de choque en agua con la ecuación (6) de Taylor (Cleveland & McAteer, 2012):

$$t_s = \frac{5}{\Delta P} [ns \cdot MPa]$$

Ecuación 6

en donde  $t_s$  está dado en ns y  $\Delta P$  en MPa. Otro valor comúnmente usado es el tiempo correspondiente al ancho del pulso positivo a la altura media o 50% de la altura del pico, abreviado FWHM (del inglés “full width at half maximum”). Este tiempo puede ser utilizado para simplificar cálculos para los cuales interesa determinar el área bajo la curva en una gráfica de presión contra tiempo (figura 1), considerando el pico como un pulso cuadrado. Las ecuaciones 7 y 8 son un ejemplo del uso de esta aproximación. Así mismo, resulta de interés la duración del pulso positivo o de compresión ( $t_{PC}$ ), que se mide desde el momento en que la presión asciende por encima del 10% de  $P^+$  hasta que desciende al mismo valor. Este tiempo oscila entre 0.5 y 3  $\mu s$ .

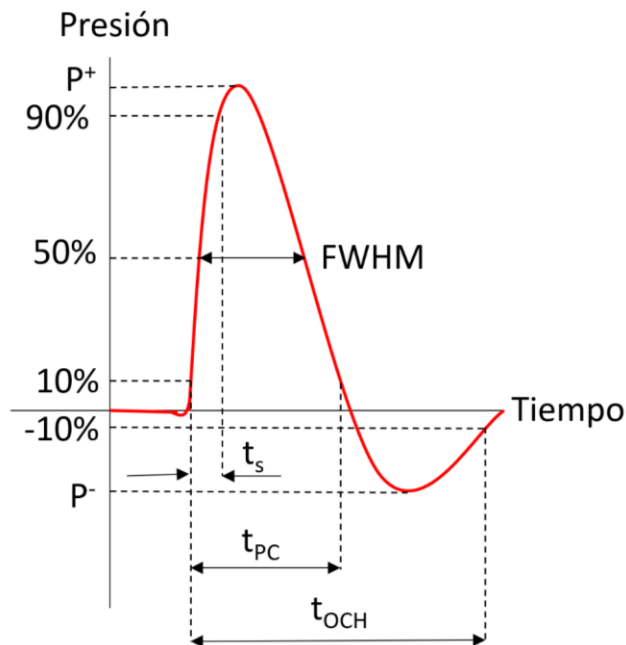


Figura 3: Perfil típico de una onda de choque en agua.

La duración de la onda de choque ( $t_{OCH}$ ) se define como el tiempo que transcurre entre el instante en que la onda alcanza por primera vez el 10% de la presión positiva, al momento en que la presión negativa asciende a un 10% de  $P^-$ .  $P^-$  se define como la amplitud máxima (en valor absoluto del pulso negativo). La fase de rarefacción o pulso de presión “negativo” es de gran interés, porque se relaciona directamente con la cavitación (ver **sección 2.3**). El valor de  $P^-$  suele ser aproximadamente equivalente al 20% de  $P^+$ .

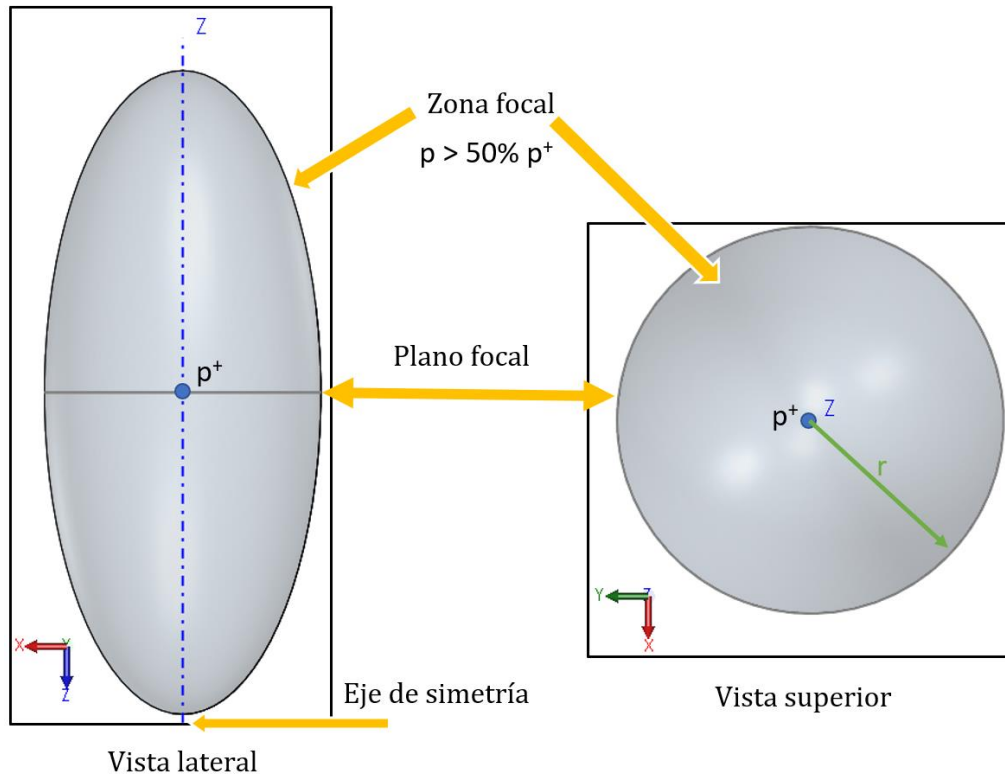


Figura 4: Esquema que ilustra la zona focal de -6 dB, el eje de simetría y el plano focal.

Una característica de las ondas mecánicas es la capacidad de transportar energía sin que exista transporte neto de masa. En el caso específico de las ondas de choque utilizadas en biotecnología, la energía frecuentemente se calcula en el área transversal (plano focal  $A$ ) de una zona conocida como zona focal de -6 dB (figura 2). El nombre se debe a que en este volumen se asegura que la presión es de al menos el 50% de  $P^+$  y tiene una geometría de elipsoide de revolución. La Comisión Internacional Electrotécnica o IEC (del inglés “International Electrotechnical Commission”) define la energía de un pulso (ecuación 7) como una doble integral temporal y de área:

$$E = \frac{1}{Z} \iint p^2(r, \theta, t) dt dA [J]$$

Ecuación 7

Del mismo modo, la IEC también define la energía por unidad de área (ecuación 8), refiriéndose al sitio en donde se tomó la medición, como densidad de flujo de energía. Se calcula con una integral temporal similar a la anterior (A. M. Loske, 2017):

$$DFE = \frac{1}{Z} \int p^2(r, \theta, t) dt = \frac{A}{Z} \int p^2(t) dt \left[ \frac{J}{m^2} \right]$$

Ecuación 8

En ambos casos es importante considerar la impedancia acústica ( $Z$ ) o resistencia que ofrece el medio a la propagación de la onda. La impedancia acústica (ecuación 9) depende directamente de la densidad y de la velocidad del sonido ( $c$ ) en el medio de propagación de la onda (Kinsler, Frey, Coppens, & Sanders, 1999):

$$Z = \rho c \left[ \frac{Pa \cdot s}{m} \right]$$

Ecuación 9

## 2.2 PROPAGACIÓN DE LAS ONDAS DE CHOQUE

Durante la propagación de las ondas mecánicas se producen diversos fenómenos. Para representarlos, frecuentemente se utilizan los llamados “rayos de la onda”, mejor conocidos como diagramas de rayos de Whitman, un campo de la acústica geométrica que ayuda a explicar el paso de la onda por un medio. Los rayos se dibujan de forma perpendicular al frente de la onda mediante flechas rectas. Los diagramas de rayos sólo son válidos para presiones bajas, aunque con el uso de la acústica lineal es posible obtener buenas aproximaciones, ya que el módulo de compresibilidad del agua es alto ( $K_{agua} = 2.2 \text{ GPa}$ ). La definición del módulo de compresibilidad se describe con la ecuación 10, en donde  $V$  es el volumen del fluido:



$$K = -V \frac{\Delta P}{\Delta V} [Pa]$$

Ecuación 10

Sin embargo, a presiones altas los efectos no lineales descritos a continuación no son despreciables. La velocidad de propagación de las ondas depende de la presión de estas y de las propiedades del medio. Las principales propiedades del medio que intervienen son la elasticidad, la densidad y la temperatura. Además, en los sólidos influye la geometría y el hecho de que los materiales raramente son isotrópicos, aunque para fines prácticos en muchos casos se les considera como tales (Beranek & Martin, 1989; A. M. Loske, 2017). A su paso por un medio, las ondas de choque van sufriendo una desviación en su trayectoria, fenómeno mejor conocido como dispersión. Esto se debe a que conforme las ondas se propagan por el medio, su densidad varía, causando un cambio en la impedancia acústica y, por lo tanto, también en la velocidad y dirección de propagación de la onda. Sin embargo, en aplicaciones biomédicas se utiliza agua como medio de propagación, la cual tiene un módulo de compresibilidad alto. Debido a ello, las variaciones en la densidad son pequeñas y consecuentemente lo es también la dispersión. Lo anterior permite utilizar la acústica lineal con buenas aproximaciones.

Cuando las ondas se propagan de un medio a otro, cuya densidad y elasticidad difiere, éstas se refractan o cambian su velocidad y dirección de propagación. El cambio de densidad causa que una porción de la onda incidente se refleje hacia el primer medio y otra se transmita hacia el segundo medio. Si la densidad del segundo medio es mayor a la del primer medio, las fases de las ondas transmitida y reflejada se mantienen. En el caso contrario, cuando la densidad del segundo medio es menor a la del primero, la fase de la onda transmitida se mantiene; sin embargo, la fase de la onda reflejada se invierte. La velocidad de la onda transmitida aumenta si la densidad del segundo medio es mayor, y disminuye si la densidad de ese medio es menor.

Al incidir las ondas de choque sobre algún obstáculo que no les es “transparente”, es decir, cuando pasan por una abertura con dimensiones menores a su longitud de onda o cuando interactúan con un borde, se produce difracción. Para presiones bajas el fenómeno se explica con el principio de Fresnel – Huygens que dice: *“Todo punto de un frente de onda inicial puede considerarse como una fuente de ondas esféricas secundarias que se extienden en todas las direcciones con la misma velocidad, frecuencia y longitud de onda que el frente de onda del que*

*proceden*". La difracción puede darse en los equipos utilizados para aplicaciones biomédicas (**sección 2.3**), porque no se utiliza agua totalmente desairada como medio de propagación, sino agua que contiene microburbujas de aire cuya impedancia acústica es mucho menor a la del agua.

## 2.3 CAVITACIÓN ACÚSTICA

La cavitación es la formación, expansión y posterior colapso de burbujas de gas dentro de un líquido. Ocurre cuando la presión en el líquido desciende por debajo de la presión de saturación sin que exista un cambio significativo en la temperatura. Para agua a 100 °C la presión de saturación es de 101.42 kPa, mientras que a 25 °C es de 3.17 kPa, ambas presiones absolutas (Mataix, 1982). El término "cavitación acústica" se aplica cuando este proceso se debe a la influencia de un campo acústico (Neppiras, 1980). En la mayoría de los generadores de ondas de choque para aplicaciones biomédicas se utiliza agua como medio de propagación. El agua generalmente contiene microburbujas e impurezas que actúan como sitios de nucleación, facilitando la generación de cavitación acústica (Holl, 1970). Haciendo uso de la ecuación 11 se puede estimar el tiempo de interacción directa entre la onda de choque y la burbuja si se conoce el radio inicial de la burbuja ( $r_0$ ) y la velocidad del sonido en el medio ( $c$ ). Si se considera un  $r_0 = 7 \mu m$  (C.-D. Ohl & Ohl, 2013):

$$t_{OCH-B} = \frac{2r_0}{c} \approx 10 \text{ ns}$$

Ecuación 11

Este tiempo es de interés, ya que cuando una onda de choque interactúa con una microburbuja suspendida en el líquido (figura 3), la burbuja colapsa, forzada por el pulso de compresión. La onda se propaga a menor velocidad dentro de la burbuja, debido a que la densidad del gas en su interior es mucho menor que la densidad del líquido que se encuentra afuera de la misma. Una vez que el pulso positivo de presión pasa, la burbuja se expande súbitamente en un lapso de entre 50  $\mu s$  y 100  $\mu s$ . La expansión es tan abrupta que genera una onda de choque secundaria con una presión que puede superar a la de la onda original (Tomita & Shima, 1986). Una vez que la tensión superficial del líquido es suficiente para detener la expansión de la burbuja, ésta colapsa asimétricamente en consecuencia del gradiente de presión generado entre el interior y

el exterior y porque una parte del frente de choque se reflejó como un pulso de rarefacción (Philipp, Delius, Scheffczyk, Vogel, & Lauterborn, 1993).

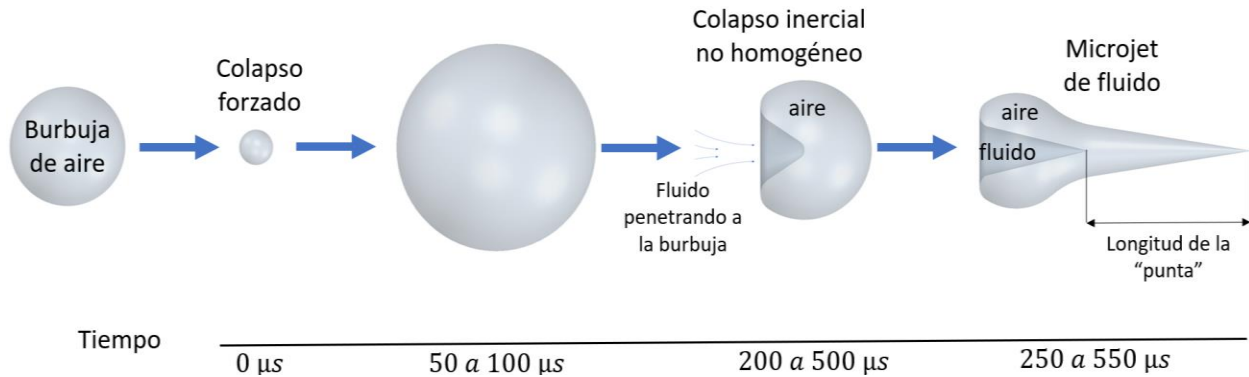


Figura 5: Dinámica de una burbuja de aire suspendida en un líquido al interactuar con una onda de choque.

Si se considera el caso de una burbuja colapsando inercialmente, por consecuencia del paso de una onda de choque, que viajó de izquierda a derecha como en la figura 4, la presión será mayor en la parte derecha. Por lo tanto el líquido que rodea a la burbuja fluye, formándose una microcorriente, en la parte izquierda y después hacia el centro de la burbuja, ocasionando que la pared (del lado izquierdo) que entró en contacto primero con la onda de choque se dirija hacia la pared opuesta hasta que impactan (Jamaluddin, Ball, Turangan, & Leighton, 2011). El choque entre ambas paredes es tan violento que se genera otra onda de choque secundaria (diferente a la mencionada anteriormente) (Turangan, Jamaluddin, Ball, & Leighton, 2008), así como la emisión de radiación electromagnética, que se ha detectado desde el espectro visible hasta el espectro del ultravioleta (Dear, Field, & Walton, 1988). Después del impacto, la corriente sigue fluyendo en la misma dirección, creando un chorro de alta presión y velocidad denominado *microjet*. La dirección del microjet es preferentemente paralela al vector de propagación de la onda de choque.

Se han reportado microjets con una velocidad de 400 hasta 790 m/s (M. Arora, Ohl, & Lohse, 2007). Para burbujas con un radio inicial entre 7 y 55  $\mu\text{m}$ , Ohl e Ikink (2003) reportan un rango de valores para la longitud de la "punta" del microjet de 11 hasta 142  $\mu\text{m}$ . De acuerdo a datos publicados por Kodama y Tomita (2000), el radio de estos microjets ( $r_j$ ) es de una décima parte del radio inicial ( $r_0$ ) de la burbuja (T Kodama & Tomita, 2000). Según lo reportado por Philipp y colaboradores (1993), se ha encontrado que todas las burbujas con radios menores a 0.75 mm

expuestas a ondas de choque generan microjets. La explicación que ofrecen los autores es que a mayor tamaño de burbuja, sus fase de colapso y expansión duran más, por consiguiente el colapso se ve amortiguado por la onda de rarefacción posterior al pulso positivo (Philipp et al., 1993).

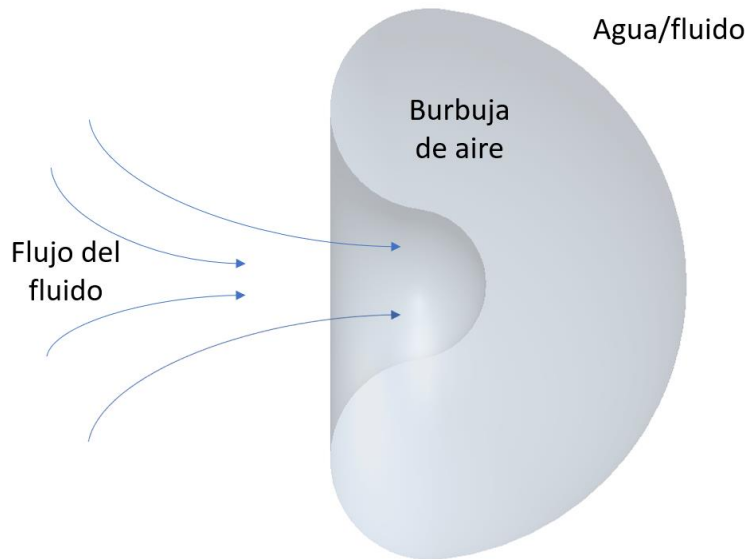


Figura 6: Burbuja colapsando asimétricamente después de que una onda de choque pasó de izquierda a derecha. Modificado de (Wess, 2004).

## 2.4 GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE PIEZOELÉCTRICO MONOPULSO Y TÁNDEM

Uno de los principales generadores de ondas de choque, utilizados en ciencias biomédicas, es el generador piezoeléctrico. Los materiales piezoeléctricos son cristales en los que se generan diferencias de potencial eléctrico al aplicarles un esfuerzo mecánico repentino. Al retirar este esfuerzo, el cristal se despolariza (IEC, 2014a). En los generadores piezoeléctricos (figura 5) se montan alrededor de 3000 cristales piezoeléctricos sobre una base de aluminio, con geometría de casquete esférico y se recubren con un polímero aislante. Al aplicarles una descarga eléctrica entre 1 y 10 kV, se produce el efecto piezoeléctrico inverso, es decir, una expansión súbita en los cristales que se transmite al fluido (agua).

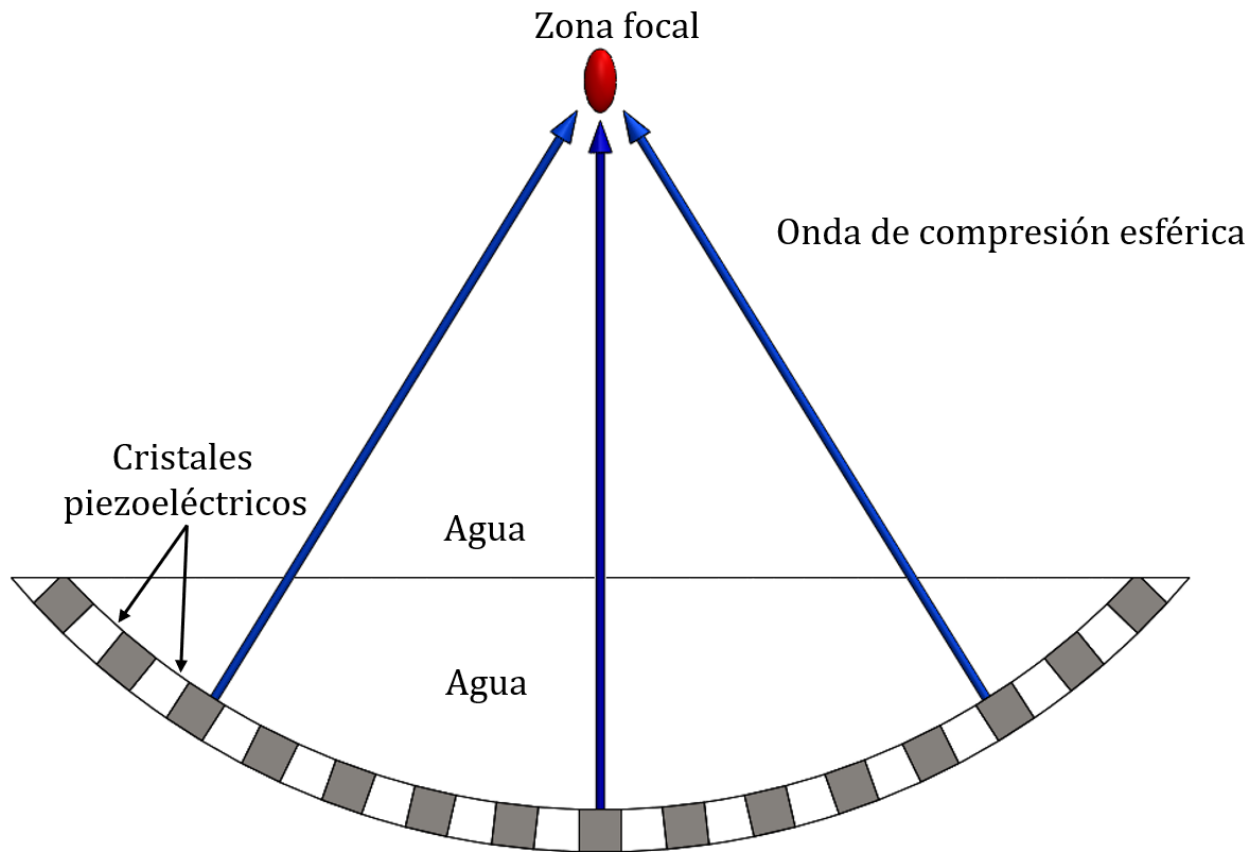


Figura 7: Esquema de un generador piezoeléctrico. Figura modificada de (8). Los rayos azules representan la propagación de la onda de choque esférica. La zona focal roja está localizada en el centro del arreglo esférico. Los cristales piezoeléctricos se representaron por los cuadros grises en la base, la cual se recubre con un polímero aislante.

Los cristales piezoeléctricos pueden soportar más de  $1 \times 10^6$  descargas eléctricas manteniendo sus propiedades de expansión y compresión, lo que se traduce en un equipo con una larga vida útil. Además, en algunos equipos es posible excitar sólo los cristales deseados, lo que permite modificar la onda generada. Al utilizarse un arreglo de cristales piezoeléctricos esférico es posible enfocar la onda en el centro geométrico  $F$ ; además, de que esto ocasiona una superposición de los pulsos generados por todos los cristales excitados, ayudando a la formación de la onda de choque. Por otro lado, los efectos no lineales contribuyen a que en la vecindad de  $F$  se forme una onda de choque. La presión y la densidad en la cresta (zona de mayor presión) de la onda son mayores que en el valle (zona de menor presión), produciéndose un gradiente de velocidad de propagación, siendo la velocidad máxima en la cresta y mínima en el valle. Como consecuencia, al avanzar hacia  $F$ , la onda degenera en un perfil de presión con forma de diente de sierra (figura 6) (A. M. Loske, Prieto, Fernández, & van Cauwelaert, 2002).

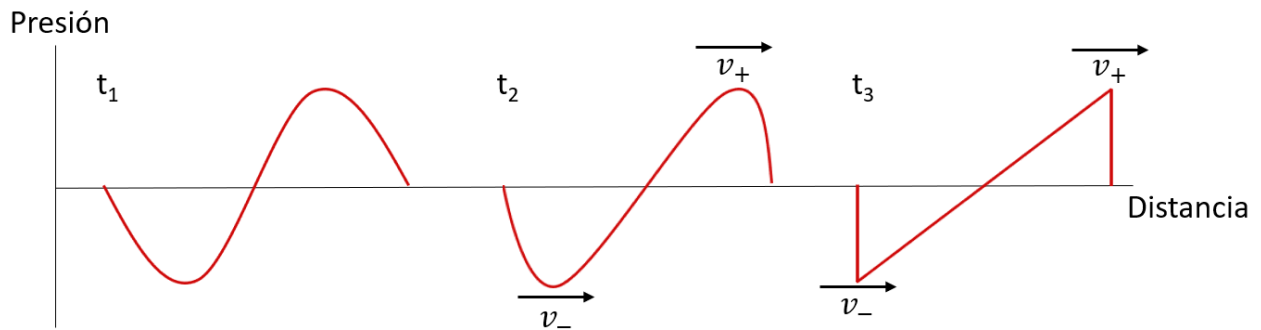


Figura 8: Transformación de un pulso de presión en una onda de choque al propagarse por el medio.

El circuito eléctrico de este tipo de generadores consta de una fuente de alimentación de alto voltaje, uno o varios capacitores para almacenar la energía eléctrica (circuito de carga), un interruptor (ya sea de chispa o tiristor) para la descarga, así como un sistema de control para regular el voltaje de descarga y la frecuencia de emisión de ondas de choque. Los cristales piezoeléctricos están conectados en paralelo sobre una base metálica descrito anteriormente. Por estar fuera de los objetivos de este trabajo no se describirán los detalles del circuito eléctrico.

Los generadores piezoeléctricos tienen la ventaja de poder generar ondas de choque en modo tándem. El sistema tándem se refiere a la generación de dos ondas de choque consecutivas en un tiempo muy corto (10 a 1000  $\mu\text{s}$ ). Esto se puede lograr duplicando el circuito eléctrico del generador, de manera que el segundo interruptor se activa después de un retraso previamente seleccionado. El modo tándem se utiliza cuando se desea intensificar los efectos de la cavitación (figura 7). El tiempo de retraso ideal para hacer incidir la segunda onda de choque, es justo cuando la burbuja se encuentra en la fase del colapso inercial, con el fin de aumentar la energía con la que se producen los microjets. El tiempo de retraso óptimo también puede variar dependiendo del perfil de presión de la segunda onda de choque. Como se menciona en la sección 2.1, el tiempo de subida es del orden de nanosegundos (el cual se puede calcular con la ecuación 6). Si se considera que el tiempo del colapso inercial de una burbuja es de hasta centenas de microsegundos, el pulso de compresión pasaría a través de la burbuja tan rápido que el pulso negativo de la onda alcanzaría a la burbuja, desacelerando el colapso. Una solución es alargar los tiempos en que se desarrolla el pulso positivo, incluyendo el tiempo de subida, para que el pulso de rarefacción no alcance la burbuja mientras colapsa. Una consecuencia de ello es que la segunda onda no pueda ser considerada onda de choque por no obedecer la relación del espesor de Taylor (ecuación 6) (Canseco, de Icaza-Herrera, Fernández, & Loske, 2011). Otro factor

que influye en el retraso óptimo es la cantidad de microburbujas contenidas en el líquido, así como las burbujas formadas por el paso de la primera onda de choque, que pueden disminuir la amplitud de la segunda onda de choque. (A. M. Loske et al., 2014; A. M. Loske et al., 2002). Estrictamente hablando, no es recomendable hablar de un retraso óptimo, ya que en el medio se encuentran microburbujas con una gran variedad de tamaños, aunque sí se puede hablar del retraso que maximice la cavitación para un gran número de burbujas.

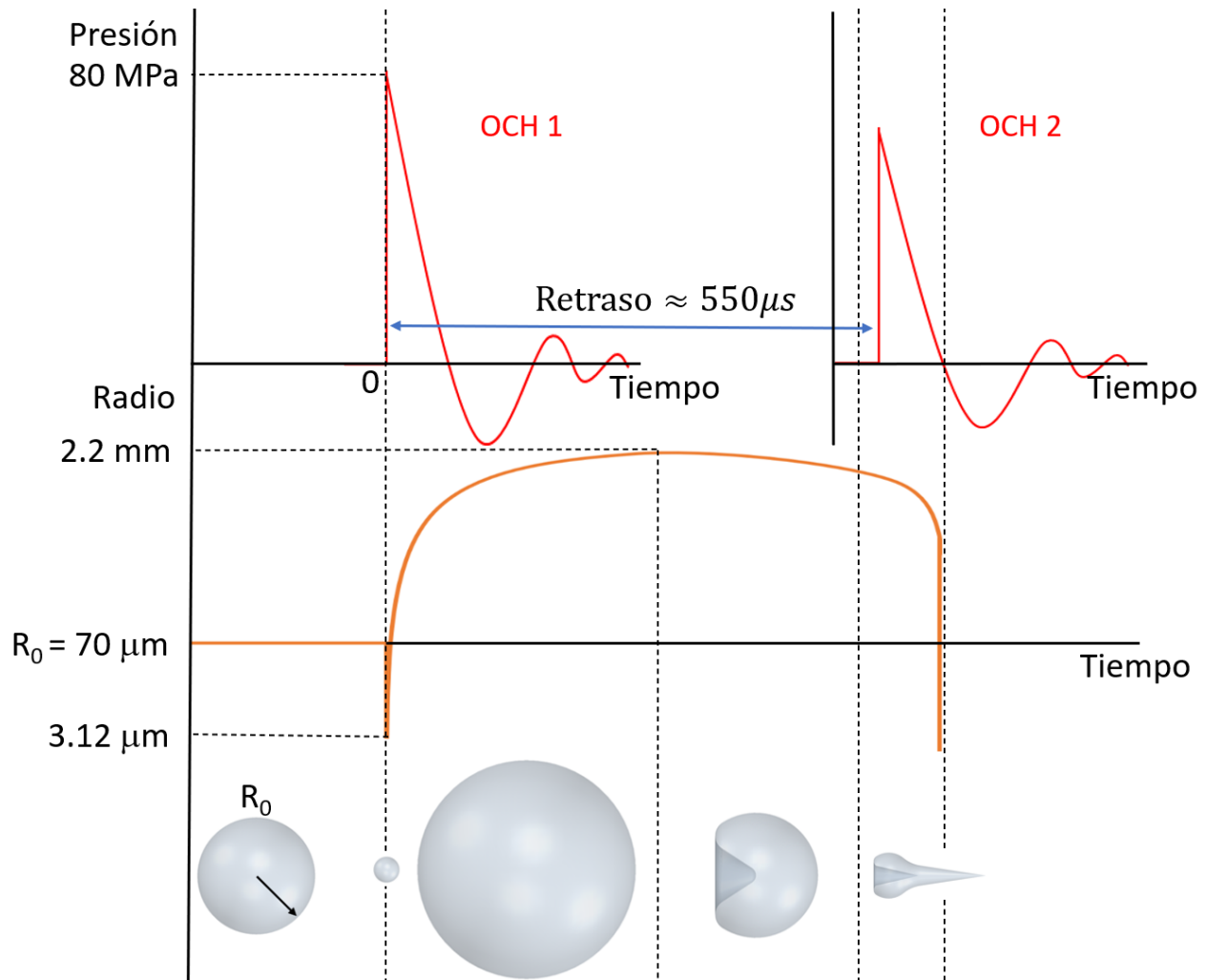


Figura 9: Ejemplo de una onda de choque tándem actuando sobre una burbuja de  $70\ \mu\text{m}$  sumergida en agua.

Existen otros tipos de generadores de ondas de choque que se usan para aplicaciones clínicas y experimentales, sin embargo no se describirán en este trabajo (A. M. Loske, 2017):

- Electrohidráulicos
- Electromagnéticos
- Fuentes utilizando laser
- Fuente de ondas de choque a partir de micro explosiones
- Sistemas combinados
- Fuentes de descarga multicanal
- Generadores balísticos

## 2.5 MODELADO MATEMÁTICO Y DINÁMICA DE FLUIDOS COMPUTACIONAL EN EL ANÁLISIS DE LA CAVITACIÓN ACÚSTICA

La mecánica de fluidos es la ciencia que estudia el comportamiento de los fluidos, tanto en reposo ( $v = 0$ ) como en movimiento. Dentro de esta rama se han planteado modelos matemáticos para analizar el flujo de un fluido. Este es uno de los campos más complejos de la física. Una técnica que ha funcionado es el análisis diferencial, que permite conocer el movimiento de cualquier punto dentro de un campo de flujo mediante el uso de ecuaciones diferenciales. Un modelo matemático que surgió con este análisis es la ecuación (12) de Navier-Stokes (Cengel & John, 2006):

$$\rho \frac{D\vec{V}}{Dt} = -\vec{\nabla}P + \rho\vec{g} + \mu\nabla^2\vec{V}$$

Ecuación 12

en donde  $\vec{V}$  es el vector de velocidad y  $\mu$  es el coeficiente de viscosidad. La ecuación de Navier-Stokes es una modificación de la ecuación de Euler, la cual surge al aplicar las leyes de conservación de masa, momento lineal (segunda ley de Newton) y energía a un volumen de control (Landau & Lifshitz, 1987). Esta ecuación se utiliza para modelar el comportamiento de los fluidos newtonianos, como pueden ser burbujas de gas dentro de un líquido, así como en infinidad de aplicaciones en ciencia y tecnología. En 1933, Jean Leray resolvió la ecuación de Navier-Stokes planteada para dos dimensiones en su tesis doctoral. A partir de entonces se ha



buscado una solución para el problema en tres dimensiones y casi 90 años después solo se han encontrado aproximaciones con soluciones numéricas.

Si se pretende analizar la dinámica de una burbuja resulta más conveniente utilizar la ecuación de Navier-Stokes en coordenadas esféricas, adoptando la forma de las ecuaciones 13, 14 y 15 (Shames, 1995):

Para  $r$

$$\begin{aligned} \rho \left( \frac{\partial v_r}{\partial t} + v_r \frac{\partial v_r}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r} \frac{\partial v_r}{\partial \theta} + \frac{v_\phi}{r \text{Sen}\theta} \frac{\partial v_r}{\partial \phi} - \frac{v_\theta^2 + v_\phi^2}{r} \right) \\ = -\frac{\partial P}{\partial r} + \mu \left( \nabla^2 v_r - \frac{2v_r}{r^2} - \frac{2}{r^2} \frac{\partial v_\theta}{\partial \theta} - \frac{2v_\theta \text{Cot}\theta}{r^2} - \frac{2}{r^2 \text{Sen}^2\theta} \frac{\partial v_\phi}{\partial \phi} \right) + \rho g_r \end{aligned}$$

Ecuación 13

Para  $\theta$

$$\begin{aligned} \rho \left( \frac{\partial v_\theta}{\partial t} + v_r \frac{\partial v_\theta}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r} \frac{\partial v_\theta}{\partial \theta} + \frac{v_\phi}{r \text{Sen}\theta} \frac{\partial v_\theta}{\partial \phi} + \frac{v_r v_\theta}{r} - \frac{v_\phi^2 \text{Cot}\theta}{r} \right) \\ = -\frac{1}{r} \frac{\partial P}{\partial \theta} + \mu \left( \nabla^2 v_\theta + \frac{2}{r^2} \frac{\partial v_r}{\partial \theta} - \frac{1}{r^2} \frac{v_\theta}{\text{Sen}^2\theta} - \frac{2 \text{Cos}\theta}{r^2 \text{Sen}^2\theta} \frac{\partial v_\phi}{\partial \phi} \right) + \rho g_\theta \end{aligned}$$

Ecuación 14

Para  $\phi$

$$\begin{aligned} \rho \left( \frac{\partial v_\phi}{\partial t} + v_r \frac{\partial v_\phi}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r} \frac{\partial v_\phi}{\partial \theta} + \frac{v_\phi}{r \text{Sen}\theta} \frac{\partial v_\phi}{\partial \phi} + \frac{v_r v_\phi}{r} - \frac{v_\theta v_\phi \text{Cot}\theta}{r} \right) \\ = -\frac{1}{r \text{Sen}\theta} \frac{\partial P}{\partial \phi} + \mu \left( \nabla^2 v_\phi + \frac{2}{r^2 \text{Sen}\theta} \frac{\partial v_r}{\partial \phi} - \frac{1}{r^2} \frac{v_\theta}{\text{Sen}^2\theta} + \frac{2 \text{Cos}\theta}{r^2 \text{Sen}^2\theta} \frac{\partial v_\theta}{\partial \theta} \right) + \rho g_\phi \end{aligned}$$

Ecuación 15

Donde el operador laplaciano  $\nabla^2$  se define por la ecuación 16:

$$\nabla^2 = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \text{Sen}\theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \text{Sen}\theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \text{Sen}^2\theta} \left( \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} \right)$$

Ecuación 16

Aun con ayuda de la computación es difícil resolverlas. Esto ha llevado a que se planteen ecuaciones derivadas a partir de hacer una serie de consideraciones para casos específicos. Una manera de simplificar estas ecuaciones es considerar una burbuja esférica, en cuyo caso no se tienen variaciones de velocidad en las direcciones angulares ( $\theta$  y  $\phi$ ). Después de esta primera simplificación se han realizado otras, llevando a diferentes tipos de ecuaciones. Una de ellas es la ecuación (17) de Rayleigh-Plesset (Franc, 2007), que considera que la burbuja se mantiene esférica:

$$\rho \left[ R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right] = [P_V - P_\infty(t)] + P_{g0} \left( \frac{R_0}{R} \right)^{3k} - \frac{2S}{R} + 4\mu \frac{\dot{R}}{R}$$

Ecuación 17

Con esta ecuación de segundo orden se busca conocer el radio en todo momento  $R(t)$  de una burbuja que está rodeada por un líquido infinito. Para este caso  $\dot{R}$  y  $\ddot{R}$  son la primera y segunda derivada de la función que gobierna el radio de la burbuja.  $P_\infty(t)$  es la presión del fluido en el exterior de la burbuja,  $P_V$  la presión de vapor y  $P_g$  es la presión del gas dentro de la burbuja. El líquido en el exterior de la burbuja se trata como un fluido incompresible. La tensión superficial  $S$  es de la pared de líquido que rodea a la burbuja, refiriéndose el término “pared” a la capa o interfase gas – líquido en el límite de la burbuja. El subíndice 0 hace referencia a las condiciones iniciales. El gas en el interior se considera no condensable, con masa constante. El coeficiente  $k$  representa el comportamiento termodinámico politrópico del gas que se rige por la ley del gas ideal (ecuación 18).

$$P_g V_{Burbuja} = R_g T_g$$

Ecuación 18

Otro modelo matemático derivado de las ecuaciones de Navier-Stokes es la ecuación (19) de Gilmore-Akulichev, (Gilmore, 1952). Esta ecuación se utiliza para describir el movimiento de la

pared de una burbuja. En esta ecuación, Gilmore cambia las letras de las variables a mayúsculas para expresar que son del líquido de la pared de la burbuja. Las variables  $U$ ,  $C$  y  $H$  se definen por las ecuaciones 20, 21 y 22 respectivamente:

$$R \left(1 - \frac{U}{C}\right) \frac{dU}{dt} + \frac{3}{2} \left(1 - \frac{U}{3C}\right) U^2 = H \left(1 + \frac{U}{C}\right) + \frac{RU}{C} \left(1 - \frac{U}{C}\right) \frac{dH}{dR}$$

Ecuación 19

$$U = \frac{dR}{dt}$$

Ecuación 20

$$C = \sqrt{C_l^2 + 6H}$$

Ecuación 21

$$H = \int_{P_\infty}^P \frac{dP}{\rho}$$

Ecuación 22

En donde  $C$  es la velocidad del sonido en la pared de la burbuja. La velocidad del sonido en el líquido se representa con  $C_l = 1509.7$ .  $H$  es la entalpía del líquido en función de la presión.  $P$  y  $\rho$  son la presión y la densidad del líquido y están en función del tiempo. Algunas de las consideraciones que se hacen al utilizar esta ecuación son que el radio inicial de la burbuja es mucho más pequeño que la longitud de onda del pulso de presión al que se expone. Si una burbuja oscila en un líquido hipotético infinito, su tamaño es simétrico y el fluido que rodea la burbuja es irrotacional, despreciando efectos asimétricos como el de la gravedad. Se considera que el líquido que rodea una burbuja esférica es compresible. Este último punto hace que la ecuación de Gilmore-Akulichev, así como otros modelos con esta misma asunción (Gong, 1999) como la ecuación de Herring, resulten más precisos que la ecuación de Rayleigh-Plesset. La ecuación de Herring abordará en este trabajo porque es utilizada cuando la onda acústica aplicada tiene amplitudes bajas (por ejemplo el ultrasonido) y velocidades de flujo moderadas

(Vokurka, 1986). Como se mencionó en las secciones **2.3** y **2.4**, la cavitación derivada del paso de una onda de choque se da en escalas de tiempo muy cortas y, por lo tanto, las velocidades implicadas son muy altas.

Debido a la complejidad de manejar estas ecuaciones y, en general, cualquiera relacionada con el flujo de fluidos, surgió la dinámica de fluidos computacional, rama que se apoya en el uso de herramientas de informática para obtener mejores y más rápidas predicciones. La ecuación de Gilmore-Akulichev fue utilizada por primera vez para simular la dinámica de una burbuja expuesta al paso de una onda de choque por Church (Church, 1989). En su trabajo Church propuso la ecuación 23 para modelar un pulso de presión como los que se obtienen en los generadores de ondas de choque. Aquí,  $\alpha$  es la constante de decaimiento y  $\omega$  es la frecuencia angular.

$$P(t) = 2P^+ e^{-\alpha t} \text{Cos}\left(\omega t + \frac{\pi}{3}\right)$$

Ecuación 23

Un importante hallazgo que resultó simulando el colapso de una burbuja sometida al paso de una onda de choque, fue la onda de choque secundaria que se genera cuando la pared de una burbuja colapsando golpea contra la pared opuesta, fenómeno que se explicó con mayor detalle en la **sección 2.3** (Turangan et al., 2008). Con el avance de la tecnología se han realizado simulaciones más sofisticadas, como la realizada por Vedadi y colaboradores (2010). Este grupo de trabajo simuló, mediante dinámica molecular, el colapso de burbujas nanométricas ( $r_0 = 10 \text{ nm}$ ) colapsando a causa de la interacción con un frente de choque plano de 18.8 GPa. El tiempo de colapso de las burbujas fue de 3.7 ps. En su trabajo reportan la emisión de una onda de choque secundaria con una amplitud mayor ( $P^+ = 29 \text{ GPa}$ ) que la onda de choque principal, que se propaga en dirección contraria de la onda primaria. Esta onda de choque secundaria (con una velocidad de propagación de 3 km/s) se genera por la compresión que sufre debido a la onda de choque principal (Vedadi et al., 2010). Con la tecnología actual es imposible ver este fenómeno en un generador de ondas de choque. Asimismo, ha resultado útil para el mejoramiento de la tecnología utilizada en los generadores de ondas de choque.

Como se describió en la sección anterior, las ondas de choque tándem se utilizan para incrementar la energía de colapso de las burbujas, que al aumentar propicia la emisión de

microjets con mayor energía. En trabajos previos, se ha evaluado, mediante simulación numérica, el radio mínimo de burbujas durante los colapsos forzado e inercial estimuladas por ondas de choque convencionales y en el modo tándem (Canseco et al., 2011; de Icaza-Herrera, Fernández, & Loske, 2015; Gutiérrez-Prieto, de Icaza-Herrera, Loske, & Castaño-Tostado, 2019). Un resultado importante es que las ondas de choque en el modo tándem ocasionan que las burbujas alcancen tamaños más pequeños durante el colapso forzado (momento en el que se producen los microjets) que con una única onda de choque.

### **3. ASPERGILLUS NIGER**

*A. niger* es un hongo filamentoso, hialino, saprofita, que participa en los procesos de descomposición de materia orgánica, por tal motivo es importante en los procesos ecológicos del planeta. Segrega un amplio rango de enzimas capaces de degradar material orgánico en azúcares monoméricos y aminoácidos. También es capaz de absorber metales pesados (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Además, es ampliamente usado en la industria alimenticia; por ejemplo, más del 90% del ácido cítrico (1.75 millones de toneladas anualmente), producido a nivel mundial y aprovechado en las áreas de alimentos y farmacéutica, se obtiene mediante fermentación con base en algunas cepas de *A. niger*. En muchos casos se utilizan cepas modificadas genéticamente para optimizar la producción o evitar metabolitos no deseados en el proceso (Soccol, Vandenberghe, Rodrigues, & Pandey, 2006). En el área de la biotecnología es una de las especies más importantes. Una aplicación común es la producción de proteínas recombinantes (Meyer, Wu, & Ram, 2011; Ward, 2012).

#### **3.1 CICLO DE REPRODUCCIÓN ASEJUAL DE LOS CONIDIOS DE ASPERGILLUS NIGER**

*A. niger* es un hongo capaz de reproducirse sexual y asexualmente. Su ciclo asexual (figura 10) comienza con los conidios, que son células no móviles en estado de dormancia, con un sólo núcleo. Los conidios viajan en las corrientes de aire. En el momento que encuentran un ambiente con condiciones adecuadas para activar su metabolismo, empiezan a hincharse debido a la absorción de líquidos y nutrientes, fase conocida como crecimiento isotrópico (Ramachandran, Fontanille, Pandey, & Larroche, 2008). Aproximadamente 6 a 8 horas después, comienza la fase de germinación, periodo en que los conidios empiezan a tener un crecimiento anisotrópico o polarizado, desarrollando un tubo germinal (Baltussen, Zoll, Verweij, & Melchers, 2020). A partir de este momento, los hongos, compuestos de conidio y tubo germinal, experimentan un crecimiento apical formando una hifa (crecimiento somático), que es una estructura celular multinucleada dividida en septos. La hifa continúa su crecimiento en una sola dirección hasta encontrar nutrientes para su desarrollo óptimo, para así ramificarse en diferentes direcciones. Algunas de estas ramificaciones se desarrollan como conidióforos, estructuras especializadas en la producción de conidios clones, mediante mitosis a partir del parental (Kavanagh, 2017; Osherov & May, 2001; van Leeuwen et al., 2013)

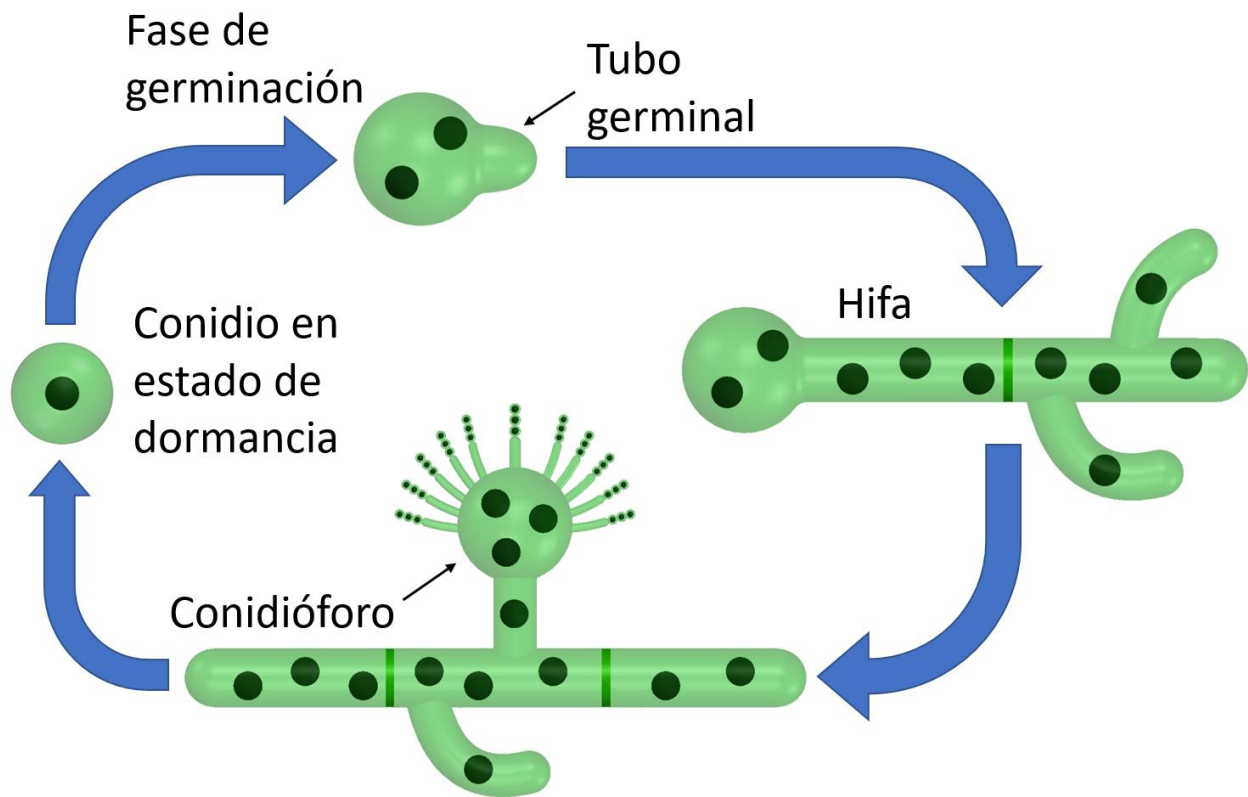


Figura 10: Ciclo de reproducción asexual de *A. niger*. Modificada de (Kavanagh, 2017).

### 3.2 PARED CELULAR DE LOS CONIDIOS DE *ASPERGILLUS NIGER*

La figura 11 muestra el esquema de un conidio con algunos de sus organelos más importantes. Se dibuja el núcleo, región en donde se encuentran los cromosomas celulares. Junto al núcleo se representan el retículo endoplásmico, sitio en el que se lleva a cabo la síntesis de proteínas, polipéptidos y que está directamente relacionado con el metabolismo de los lípidos. También, se muestra el aparato de Golgi, organelo que contribuye a la modificación y el empaquetamiento de polipéptidos y lípidos. Las respiración celular se lleva a cabo en la mitocondria, proceso esencial para la obtención de energía celular (Starr, Evers, & Starr, 2013). Los conidios, además de la membrana celular cuentan con una pared celular semirrígida permeable, que funciona como filtro controlando la secreción y el consumo de moléculas en la célula. Este organelo les confiere una resistencia mecánica, además de una protección ante condiciones ambientales adversas, como el estrés térmico, la deshidratación, la presión osmótica, el estrés oxidativo, las variaciones de pH y la radiación ultravioleta (Baltussen et al., 2020; Cole, 1986). La pared celular ha sido estudiada y caracterizada ampliamente por diversos autores (de Nobel et al., 2000;

Krijgsheld et al., 2008; van Leeuwen et al., 2013; Zhao, Schaefer, Xu, et al., 2005). Alterar su estructura podría afectar directamente el proceso de germinación (Meyer et al., 2011; Osherov & May, 2001; Socol et al., 2006).

La pared celular define la geometría de la célula y esta va en función de la rigidez. Los conidios del género *Aspergillus* tienen una capa externa hidrofóbica constituida de melanina e hidrofobinas. Las hidrofobinas son proteínas que solo se expresan en los hongos filamentosos. Existen dos tipos de hidrofobinas, las de clase I, son polímeros solubles solo en ácidos fuertes que se autoensamblan en películas anfipáticas de nanotubos/nanorodillos de aproximadamente 5 nm de diámetro y de 120 a 220 nm de longitud, con la parte hidrofóbica orientada hacia la superficie. Las de clase 2 son películas amorfas solubles en algunos solventes orgánicos (Sunde, Kwan, Templeton, Beaver, & Mackay, 2008). Estas placas juegan un factor fundamental en la supervivencia del hongo, facilitando la dispersión por las corrientes de aire y la adherencia a superficies hidrofóbicas (Cuenot, Zykwiniska, Radji, & Bouchara, 2017; Gow, Latge, & Munro, 2017).

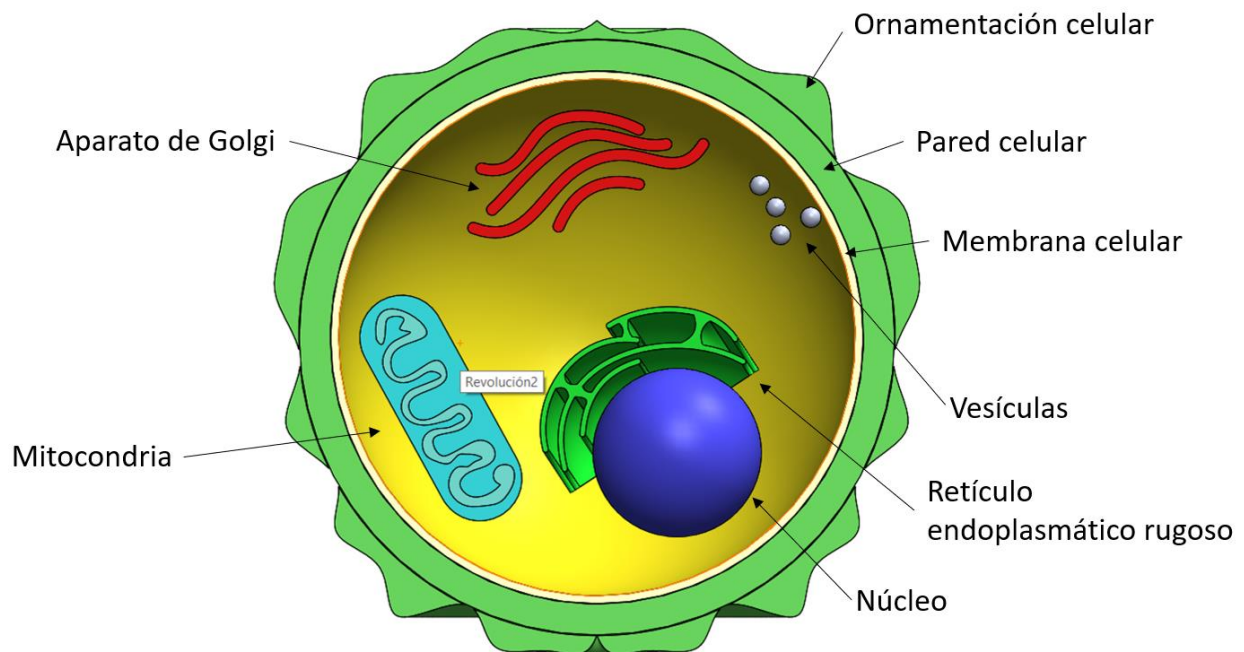


Figura 11: Modelo celular simplificado de un conidio de *A. niger*. Modificada de (Cole, 1986).



Por debajo de la película superficial, la pared celular está compuesta principalmente de glicoproteínas y carbohidratos. Los carbohidratos constituyen entre un 73% y 83% de la pared (Beauvais, Fontaine, Aïmanianda, & Latgé, 2014), en donde el principal componente estructural es la quitina (figura 12a), un biopolímero semicristalino (Kuhn, Trinci, Jung, Goosey, & Copping, 2012). La quitina forma enlaces a y b. La  $\alpha$ -quitina tiene un grupo espacial  $P2_12_12_1$  propio de una estructura cristalina ortorrómbica (figura 12b - 12e) con parámetros de red  $a = 0.474$  nm,  $b = 1.886$  nm y  $c = 1.032$  nm. En el caso de la  $\beta$ -quitina anhidra, el grupo espacial es  $P2_1$  también derivado de una celda unitaria ortorrómbica (figura 12f - 12h) con parámetros de red  $a = 0.485$  nm,  $b = 0.926$  nm y  $c = 1.038$  nm (Rinaudo, 2006).

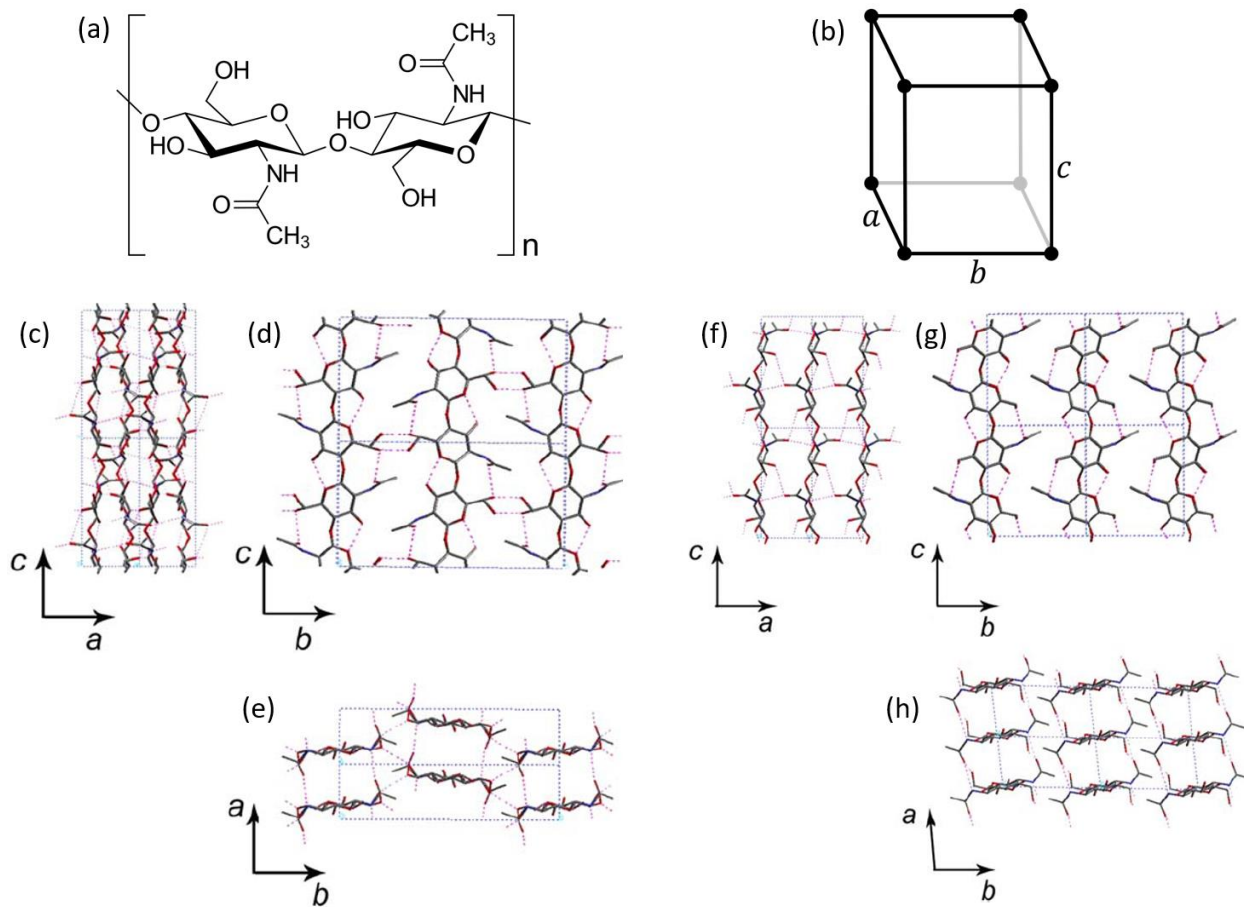


Figura 12: (a) molécula de quitina; (b) estructura ortorrómbica atribuida a la quitina. Estructura cristalina de  $\alpha$ -quitina: (c) plano  $ac$ ; (d) plano  $bc$ ; (e) plano  $ab$ . Estructura cristalina de  $\beta$ -quitina anhidra: (f) plano  $ac$ ; (g) plano  $bc$ ; (h) plano  $ab$ . Referencia de la imagen (Rinaudo, 2006).

Zhao y colaboradores (2005) obtuvieron dos propiedades mecánicas de las hifas de *Aspergillus nidulans*, otra especie del género *Aspergillus*. Calcularon una constante elástica de  $0.29 \pm 0.02$  N/m y un módulo de elasticidad de  $110 \pm 10$  MPa. Ambas constantes se obtuvieron con análisis por elemento finito utilizando el software COMSOL. Para obtener estos valores, los autores trataron a las hifas como si fueran cilindros isotrópicos de pared delgada incompresible y longitud infinita (Zhao, Schaefer, Xu, et al., 2005). En un estudio más reciente, se publicaron propiedades mecánicas medidas directamente de los conidios por medio de microscopía de fuerza atómica. Encontraron que los conidios tienen una rugosidad promedio de aproximadamente 33 nm. También reportaron valores para el módulo de Young y la dureza de la pared de hasta 21.4 GPa y 0.17 GPa, respectivamente, así como una carga crítica de flexión de la membrana celular de 290  $\mu$ N (Fang, Kang, Hong, & Wu, 2012).

## 4. JUSTIFICACIÓN

Desarrollar métodos más eficientes, reproducibles y económicos para la transformación genética de hongos microscópicos, como *A. niger*, es de gran interés para la industria farmacéutica y alimentaria. Para ejemplificar lo anterior, tan solo en 2016 el valor de mercado de la industria de producción de biomasa, en la cual se utilizan enzimas provenientes de hongos filamentosos, fue de 4.7 billones de euros, esperando que este valor se duplique para el 2026 (Meyer et al., 2016). Se ha demostrado que la transformación genética de hongos con ondas de choque es eficiente y sencilla, sin embargo, se desconocen los detalles de los fenómenos físicos involucrados. Contar con más información sobre los principales mecanismos de acción, ayudará a determinar los parámetros más importantes para optimizar el proceso.

## 5. HIPÓTESIS

Aumentar la energía del colapso de las burbujas durante la cavitación, mediante la aplicación de ondas de choque en modo tándem, ocasionará que los efectos en la pared celular de los conidios de *A. niger* resulten más evidentes que los derivados de ondas de choque convencionales.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos derivados de la cavitación acústica y los esfuerzos mecánicos, sobre la pared celular de los conidios del hongo *Aspergillus niger* expuestos a ondas de choque del tipo usado para aplicaciones biomédicas.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la viabilidad de los conidios de *A. niger* después de ser expuestos a ondas de choque.
- Analizar si existe alteración en el crecimiento celular y en la formación del tubo germinativo de conidios de *A. niger* expuestos a diferentes dosis ondas de choque.
- Documentar a nivel ultraestructural la morfología superficial de conidios de *A. niger*.
- Evaluar si existe daño asociado superficial a la exposición a ondas de choque.
- Evaluar los efectos sobre la pared de los conidios, al aumentar la energía del colapso de las microburbujas contenidas en la suspensión de conidios, aplicando ondas de choque tándem.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE PIEZOELÉCTRICO MULTIFUNCIONAL

El Generador Piezoeléctrico Multifuncional, capaz de emitir ondas de choque en modo monopulso y tándem, utilizado en los diferentes ensayos reportados en esta tesis, se encuentra en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la Universidad Nacional Autónoma México (UNAM) (figuras 13 y 14). El equipo está basado en un generador de ondas de choque *Piezolith 2501* (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania). La configuración es de 3000 cristales piezoeléctricos montados sobre una superficie con geometría de casquete esférico con un radio de 345 mm. Generalmente, se opera con un voltaje de descarga de 2 a 6 kV con una frecuencia de descarga de 0.5 Hz. Las muestras se colocaron con un posicionador con movimiento en los ejes “x”, “y” y “z”. El equipo cuenta con una tina de acrílico transparente de 90 x 80 x 45 cm.

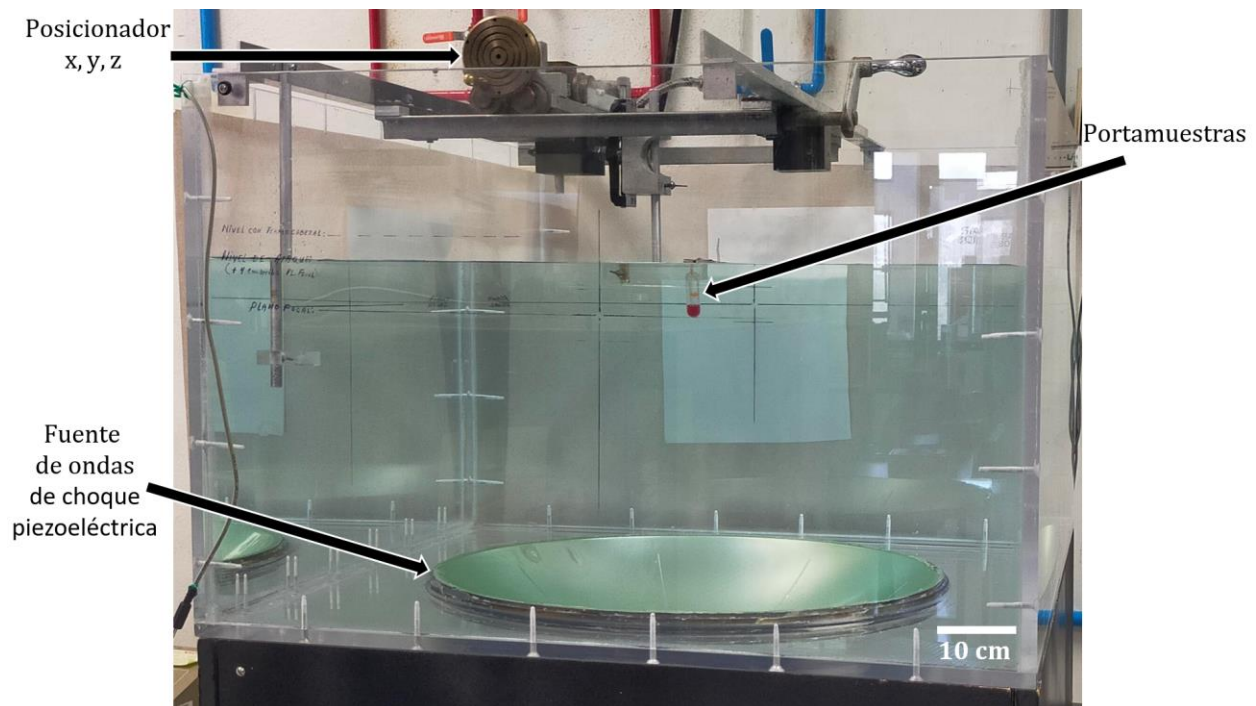


Figura 13: Vista del Generador de Ondas de Choque Piezoeléctrico Multifuncional ubicado en el Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA, campus UNAM Juriquilla.

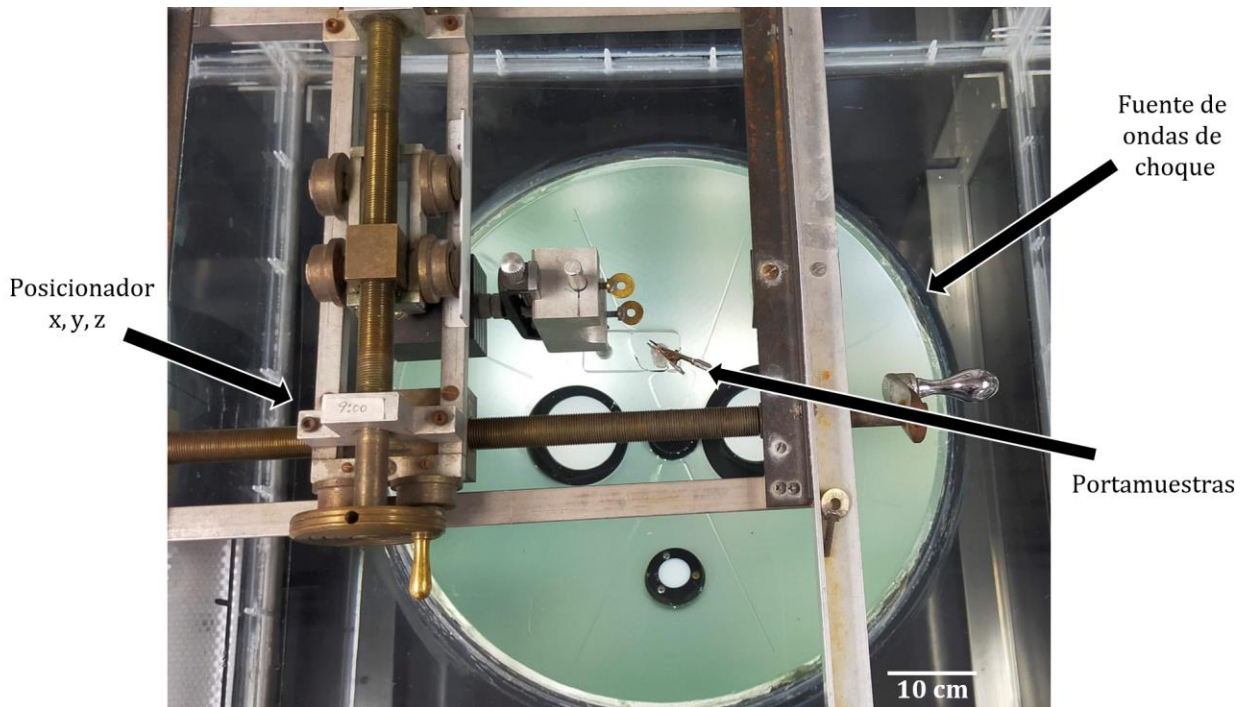


Figura 14: Vista superior del generador de ondas de choque piezoeléctrico.

## 8.2 MEDICIONES DE PRESIÓN

La presión se midió en el punto focal, así como en el plano y altura en z (ver figura 2), hasta el punto en donde se obtuvo el 50% de la presión máxima con el fin de estimar el tamaño de la zona focal de -6 dB. Esto se realizó con un transductor de aguja de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Imotec GmbH, D-5102 Würselen, Alemania) con un tiempo de respuesta de 20 ns, conectado a un osciloscopio Tektronix TDS 3032 con una capacidad de 13 F. Las mediciones de presión se llevaron a cabo variando el voltaje del equipo en intervalos de 1 kV, empezando en 4 kV y considerando también 5.5 kV. Para cada voltaje se obtuvieron tres oscilogramas. Los desplazamientos del transductor se hicieron con el posicionador mencionado anteriormente. El equipo que se utilizó tiene un factor de equivalencia  $FE = 14.86 \text{ mV/MPa}$ , con el que es posible conocer la presión a partir del voltaje medido con el osciloscopio.

### 8.3 FOTOGRAFÍAS DE ALTA VELOCIDAD

Para grabar la cavitación acústica en las cercanías de  $F$ , se utilizó una cámara de alta velocidad Motion Pro x4 (Integrated Design Tools, Inc., CA, USA) que cuenta con un sensor CMOS. La cámara se conectó al generador de pulsos, del circuito eléctrico del generador, mediante un conector BNC. La cámara se conectó a una computadora mediante un cable Giga-Ethernet (1000 Mbps), con el software proporcionado por el fabricante previamente instalado. La velocidad de captura seleccionada fue de 5,100 fps (fotogramas por segundo) a una resolución de 512 x 512 píxeles. Disminuyendo la resolución a 512 x 76 píxeles y capturando solamente una zona del ancho del vial, se aumentó la velocidad de captura de imágenes hasta 30,000 fps. Recortando la zona de enfoque a un ancho menor al de vial y ajustando la resolución a 512 x 40 píxeles, se alcanzó una velocidad de captura de 50,000 fps. Al aumentar la velocidad de captura, fue necesario aumentar la ganancia de luz del sensor y utilizar una lampara 350 W con una pantalla difusora, apuntando directamente a la cámara desde el lado opuesto de la tina del generador (figura 15). La captura de las imágenes se llevó a cabo dentro de los viales llenos, ya sea con agua destilada o con medio mínimo para conidiación, ambos con y sin conidios suspendidos. El crecimiento y colapso de las burbujas fue capturado a 30,000 y 50,000 fps. La adquisición de las imágenes se hizo por duplicado.

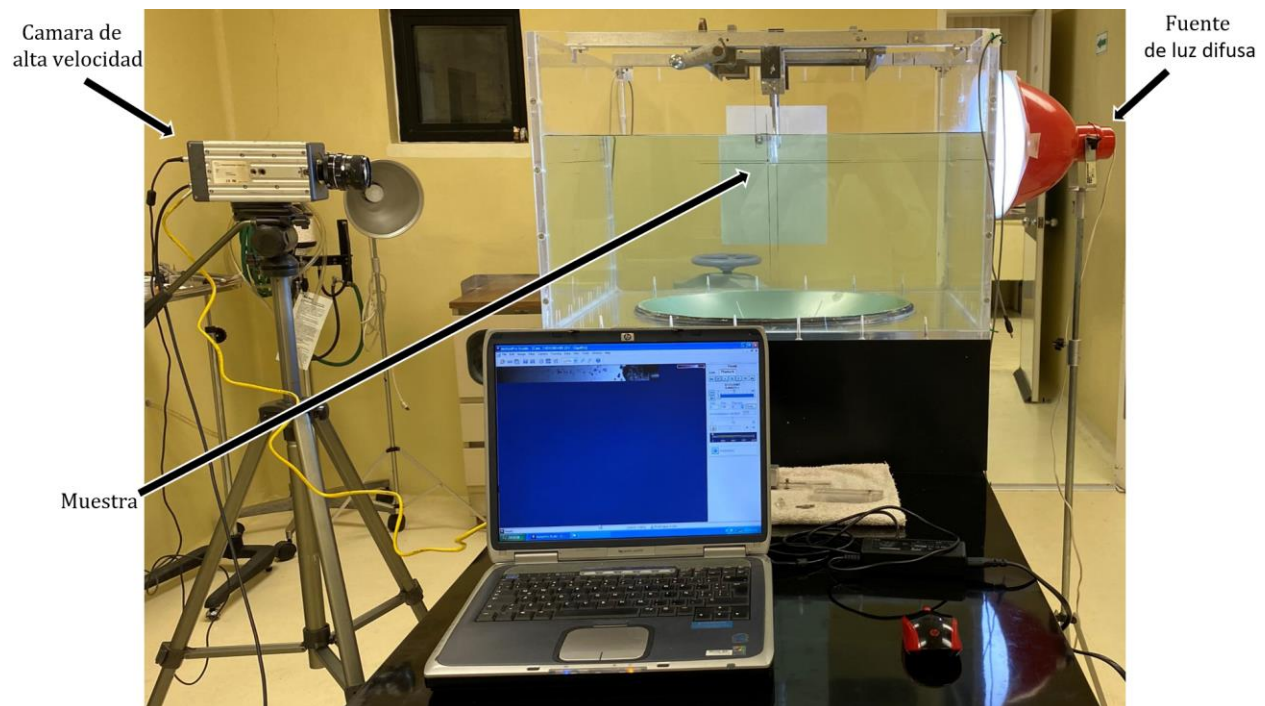


Figura 15: Arreglo utilizado para la captura de imágenes de alta velocidad.

## 8.4 CULTIVO Y OBTENCIÓN DE LOS CONIDIOS DE *ASPERGILLUS NIGER*

Todas las colonias de *Aspergillus niger* CBS 513.88 se cultivaron usando la misma metodología. Se sembraron en una caja Petri con medio mínimo agar (sólido) durante 6 días para promover la conidiación. Una vez que se cumplió el plazo, se recolectaron los conidios del hongo, agregando 5 ml de medio mínimo líquido. Con un asa bacteriológica se raspó suavemente sobre la superficie de los hongos. Se adicionaron 5 ml más de medio mínimo líquido. Para separar los conidios de los conidióforos y partes del micelio desprendidos durante el cosechado, se filtraron utilizando 3 capas de Miracloth (EMD Millipore, MA, USA, número de catálogo: 475855). Se obtuvo la concentración de la suspensión de conidios utilizando una cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración a  $2 \times 10^6$  conidios/mililitro.

## 8.5 EXPOSICIÓN DE *ASPERGILLUS NIGER* A ONDAS DE CHOQUE

Para cada tratamiento, 1.5 ml de muestra se colocaron dentro de una pipeta de transferencia estéril de polietileno de 4 ml (41 mm de largo, 13 mm de diámetro), se sellaron con calor y se cortaron aproximadamente 20 mm por encima del depósito. Las pipetas se montaron verticalmente en un portamuestras especial (figura 16) y se centraron en el foco *F* del generador, haciendo uso del posicionador. Definiendo un “evento” en el modo tándem como dos ondas de choque consecutivas, se aplicaron la mitad de los eventos en modo tándem en comparación con ondas monopulso, es decir, en ambos modos las muestras recibieron el mismo número de ondas de choque en cada grupo. Con ello se igualó el número de ondas de choque y la energía total que recibieron las muestras en cada grupo.



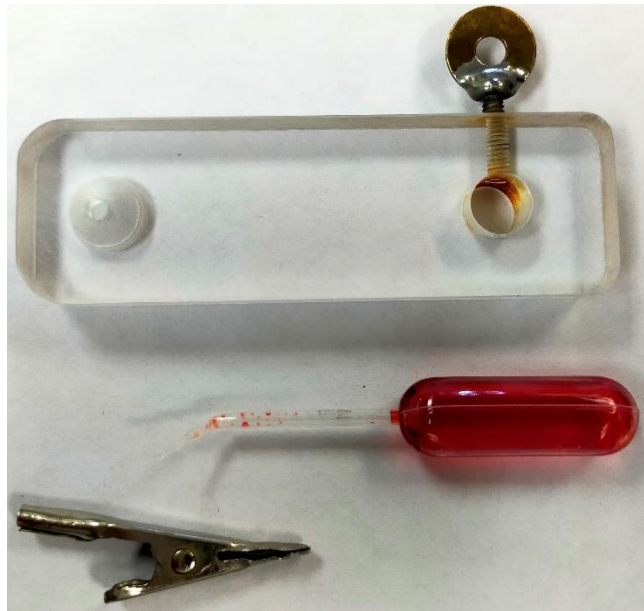


Figura 16: Portamuestras y ejemplo de pipeta de transferencia (vial) utilizados en este estudio. Por claridad, para esta fotografía el vial se llenó con tinta roja.

Se realizaron 2 diseños experimentales (figura 17). En el primero se aplicó una presión de  $73.62 \pm 1.35$  MPa, generada con un voltaje de  $5.5 \pm 0.125$  kV, valores utilizados en trabajos previos (A. M. Loske et al., 2014). Los valores después de los signos  $\pm$  son la incertidumbre absoluta, la cual es la suma de incertidumbre sistemática (la mitad de la escala de mínima) y la incertidumbre estocástica. Los parámetros que se variaron fueron la cantidad de ondas de choque (50, 100 y 200) y el modo de aplicación (monopulso, tándem con retraso corto y tándem con retraso largo). El retraso corto se utilizó para maximizar el colapso de las burbujas más pequeñas que se aprecian en las imágenes de alta velocidad, y el retraso largo para maximizar el colapso de burbujas más grandes.

En el segundo diseño se probó la combinación de tres valores de presión ( $42.04 \pm 1.06$  MPa generado a 4 kV,  $66.48 \pm 1.49$  MPa generado a 5.0 kV y  $82.77 \pm 1.21$  MPa generado a 6.0 kV) con tres números de ondas de choque (50, 100 y 200) y los dos modos de aplicación (monopulso y tándem). La combinación de estas condiciones, junto con las muestras control, y al realizarlas por triplicado da un total de 57 muestras. La temperatura del agua se mantuvo en  $24^{\circ}\text{C}$ .

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, incluyendo el control. La aplicación de los tratamientos de ondas de choque fue aleatoria. Por simplicidad, a partir de este punto se hará referencia al voltaje utilizado en cada tratamiento en lugar de los valores de presión.

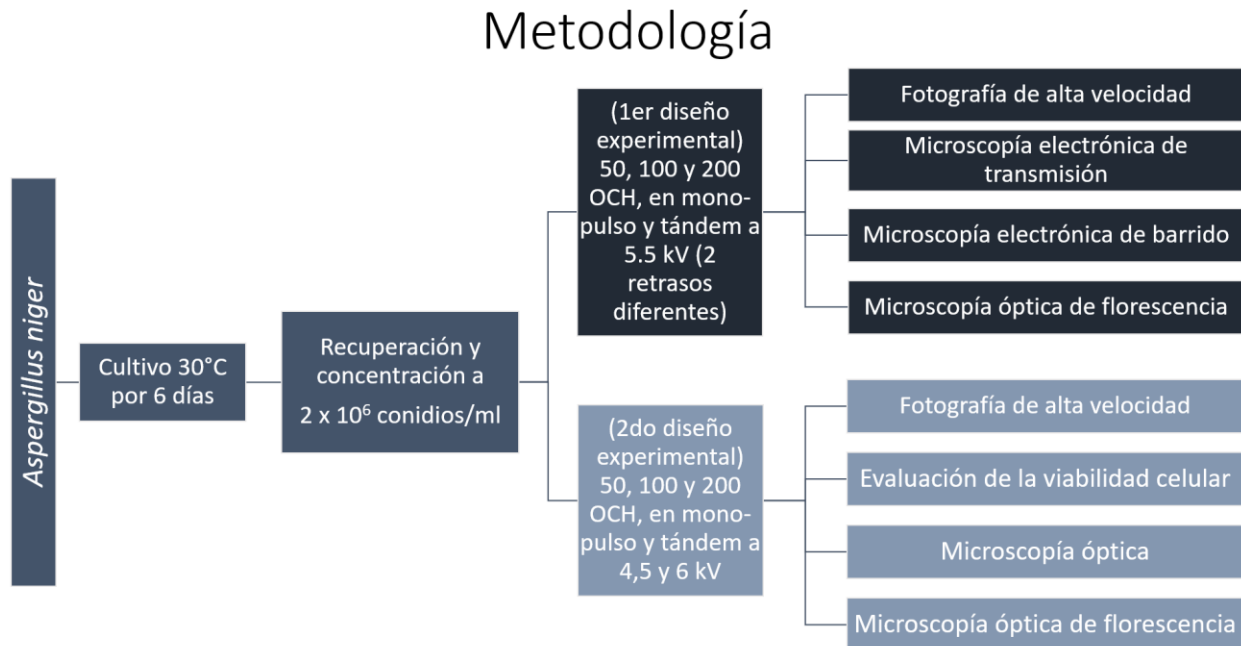


Figura 17: Esquema de los dos diseños experimentales.

## 8.6 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

El segundo diseño experimental consistió en evaluar la supervivencia celular, utilizando la técnica de recuento en placa por unidades formadoras de colonia (UFC). Inmediatamente después de la aplicación de ondas de choque a las 57 muestras, se realizaron diluciones de manera serial (1:10) hasta alcanzar una concentración final de  $1 \times 10^4$  conidios/mililitro. De estas últimas diluciones se tomaron 25  $\mu$ l, se sembraron en cajas Petri con medio mínimo agar nuevas y se incubaron a 30°C por 48 h. Al término de este periodo se contó a contraluz el número de colonias formadas. Los datos de las muestras tratadas fueron comparados con el grupo control. Los resultados se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis utilizando el software GraphPad Prism 7.

## 8.7 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

El objetivo de esta prueba fue evidenciar si las ondas de choque afectan el crecimiento inicial de las células de *A. niger*. Para ello se consideraron dos parámetros. El primero fue el hinchamiento de los conidios durante la fase de crecimiento isotrópico, midiendo su área. El segundo parámetro observado fue el porcentaje de células que desarrollaron tubo germinal.

Para la obtención de estos datos se recubrieron cajas Petri con una película delgada de medio mínimo agar, con un espesor que permitió que pasara la luz del microscopio óptico. Sobre las cajas se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de conidios en suspensión, inmediatamente después de ser tratados con ondas de choque. A todas las cajas Petri se les colocó su tapa y se envolvieron con Parafilm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para proteger las muestras. Las muestras fueron observadas con un microscopio óptico de transmisión BX40 (Olympus Co., Tokio, Japón) 0, 4, 6, 8, 10 y 12 horas después de la exposición a ondas de choque. Las muestras se mantuvieron a 30°C. Se analizaron un total de 100 conidios por muestra y se fotografiaron con una cámara para microscopio CS2100M-USB (Thorlabs, Inc., NJ, USA). Todas las fotografías fueron capturadas utilizando el mismo aumento. El análisis de las fotografías fue realizado con un software para procesar imágenes (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Para estimar el tamaño de los conidios también se fotografió una reglilla para microscopio de 0.1 mm  $\pm$  0.01 mm. Los datos de hinchamiento celular se obtuvieron midiendo el área de los conidios fotografiados en píxeles y se convirtieron a  $\mu\text{m}^2$ . El hinchamiento fue medido hasta las 10 h de vida, debido a que en las imágenes tomadas a las 12 h la cantidad de hifas formadas impedía diferenciar con claridad las células individuales. El porcentaje de células que desarrollaron un tubo germinal se obtuvo a partir de las 6 h. Para ver las diferencias entre tratamientos, se ajustó una curva polinomial para los datos de cada grupo. A continuación, se obtuvieron intervalos Bootstrap del 95%. Los cálculos se realizaron en el software R.

## 8.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y TRANSMISIÓN

Para poder observar las muestras por microscopía electrónica, tanto de barrido como de transmisión, fue necesario llevar a cabo un proceso de fijación celular. Para ello, se colocaron 1 ml de células en suspensión más 1 volumen igual de glutaraldehído disuelto en buffer de cacodilato de sodio (1 M y pH de 7.4) (BCS) y se dejaron en reposo por 2 h. Después, la mezcla se

centrifugó por 10 min a 12,500 xg y se retiró el líquido sobrenadante (este proceso se repitió a continuación entre cada paso consecutivo para sustituir un líquido con otro). Se lavaron las muestras en dos ocasiones con BCS; un lavado fue por 10 min y el segundo se dejó por 24 h. El buffer se sustituyó por tetraóxido de osmio disuelto en BCS y se dejaron las muestras 2 h en reposo. Después de este proceso, las muestras para microscopía electrónica de transmisión fueron procesadas por la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología de la UNAM. A continuación, las muestras para microscopía electrónica de barrido se lavaron dos veces más con BCS. Una vez fijadas, las células se deshidrataron mediante la inmersión consecutiva en etanol a las siguientes concentraciones: 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100%.



Figura 18: (Izquierda) Equipo de secado por punto crítico ubicado en el Laboratorio de Microscopía del CFATA. (Derecha) Portamuestras del equipo.

Una vez que las muestras se encontraron suspendidas en etanol al 100%, se procedió a eliminar el solvente utilizando un equipo de secado por punto crítico CPD2 (Ted Pella, Inc., California, USA) utilizando  $\text{CO}_2$  (figura 18 izquierda). Se armaron sobres cuadrados con papel filtro con un tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$  (EMD Millipore, MA, USA, número de catálogo: WHA10401114) de 1 cm por lado. Posteriormente se colocaron  $50 \mu\text{l}$  de suspensión en cada sobre y se cerraron. Para asegurar que no se abrieran, se engraparon en la parte superior. Fue importante evitar que el sobre se secase en el ambiente, ya que esto puede provocar el colapso celular.

Se colocaron los sobres en el portamuestras del equipo, el portamuestras se insertó en la cámara de deshidratación (figura 18 derecha) y se cerró el equipo. Se llenó la cámara con  $\text{CO}_2$  y se elevó la presión hasta que  $\frac{3}{4}$  partes del  $\text{CO}_2$  se convirtieron en líquido, con el fin de sustituir el solvente. Una vez realizado esto, se procedió a llevar el  $\text{CO}_2$  a un estado termodinámico por encima del

punto crítico (figura 19), generando una evaporación simultánea del CO<sub>2</sub> afuera y adentro de las células. A partir de este punto, se liberó el CO<sub>2</sub> lentamente, evitando la recondensación del gas dentro del equipo, hasta alcanzar la presión atmosférica. Finalmente, se colocaron los sobres abiertos sobre portamuestras para SEM y se recubrieron dos veces con oro.

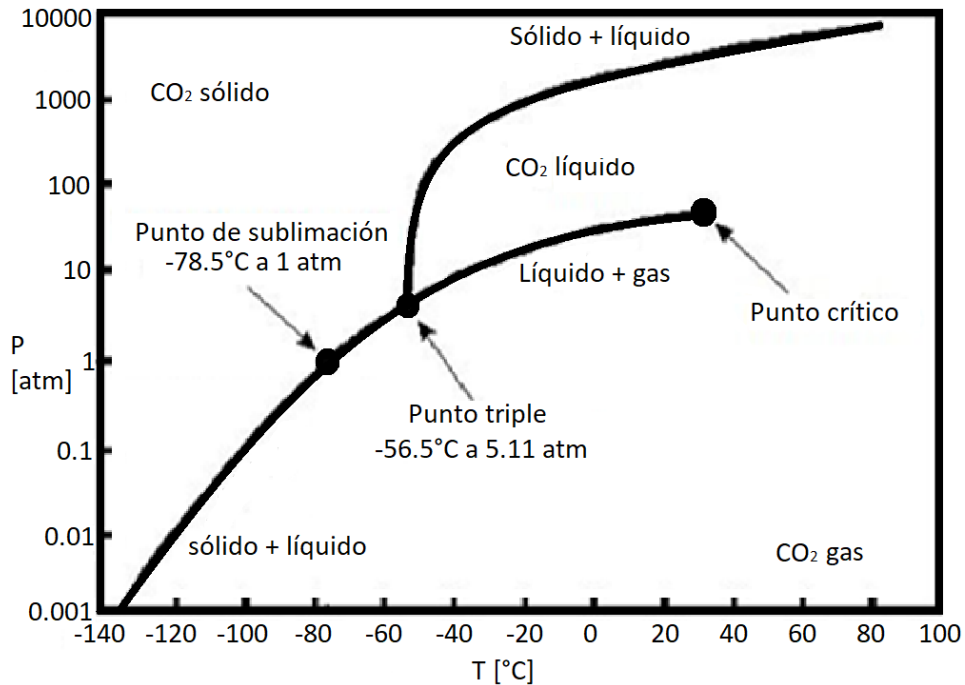


Figura 19: Diagrama termodinámico P-t del CO<sub>2</sub> (Murray, Visintini, Bidoglio, & Henry, 1996).

Para la obtención de las micrografías de barrido, se utilizó un microscopio electrónico de barrido JSM-6060LV (JEOL, Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 20 kV para la emisión del haz de electrones del microscopio, logrando una resolución que permitió la apreciación de diversos detalles con una amplificación máxima de 20,000x.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 MEDICIONES DE PRESIÓN EN EL GENERADOR MULTIFUNCIONAL

Las mediciones de presión permitieron estimar las dimensiones de la zona focal (tabla 1). Debido a que la impedancia acústica del agua y del polietileno son similares, la atenuación de la presión  $P^+$  al pasar la onda de choque a través la pared del vial resultó ser menor del 1%, disminuyendo hasta un 0.81% al utilizar 6 kV como voltaje de descarga para generar la onda de choque. Los valores de  $P^+$  tienen una incertidumbre sistemática de  $\pm 0.54$  MPa. De igual manera, la incertidumbre sistemática para los valores de FWHM fue de  $\pm 16$  ns. En la tabla 1 se reporta la incertidumbre absoluta para los valores de  $P^+$  en el foco, la cual es la suma de la desviación estándar de las mediciones repetidas, más la incertidumbre sistemática. También se obtuvieron los valores para  $r$  y  $z$  de la zona focal y sus respectivos FWHM (revisar figuras 3 y 4 en la sección 2.1).

Tabla 1: Valores obtenidos de los perfiles de presión registrados.

V [kV] <sup>a</sup>	$P^+$ [MPa] <sup>b</sup>	FWHM [ns] <sup>c</sup>	$r$ [mm] <sup>d</sup>	$z$ [mm] <sup>e</sup>	FWHM[ $\mu$ s]-( $r,0$ ) <sup>f</sup>	FWHM[ $\mu$ s]-( $0,z$ ) <sup>g</sup>
4.0	$42.05 \pm 1.06$	$230 \pm 16$	0.95	6.00	312	314
5.0	$66.49 \pm 1.49$	$192 \pm 16$	0.85	4.10	510	506
5.5	$73.62 \pm 1.44$	$194 \pm 16$	0.88	3.50	556	514
6.0	$82.77 \pm 1.21$	$196 \pm 16$	0.90	3.30	623	610

- a. Voltaje de descarga del equipo.
- b. Presión máxima del pulso positivo.
- c. Ancho del pulso positivo a la altura media (FWHM).
- d. Valores de “ $r$ ” en el plano focal.
- e. Valores de “ $z$ ” de la zona focal.
- f. Valores de FWHM para “ $r$ ”.
- g. Valores de FWHM para “ $z$ ”.

## 9.2 RETRASO ÓPTIMO PARA ONDAS DE CHOQUE EN MODO TÁNDEM

En las figuras 20 a 22 se muestra la dinámica de las burbujas dentro del vial a diferentes presiones, en modo monopolso y tándem. Se trata de una sucesión de fotografías de alta velocidad tomadas con un tiempo  $T$  de diferencia entre cuadros. En la primera fotografía de cada imagen se observa el vial antes de la llegada de la onda de choque.

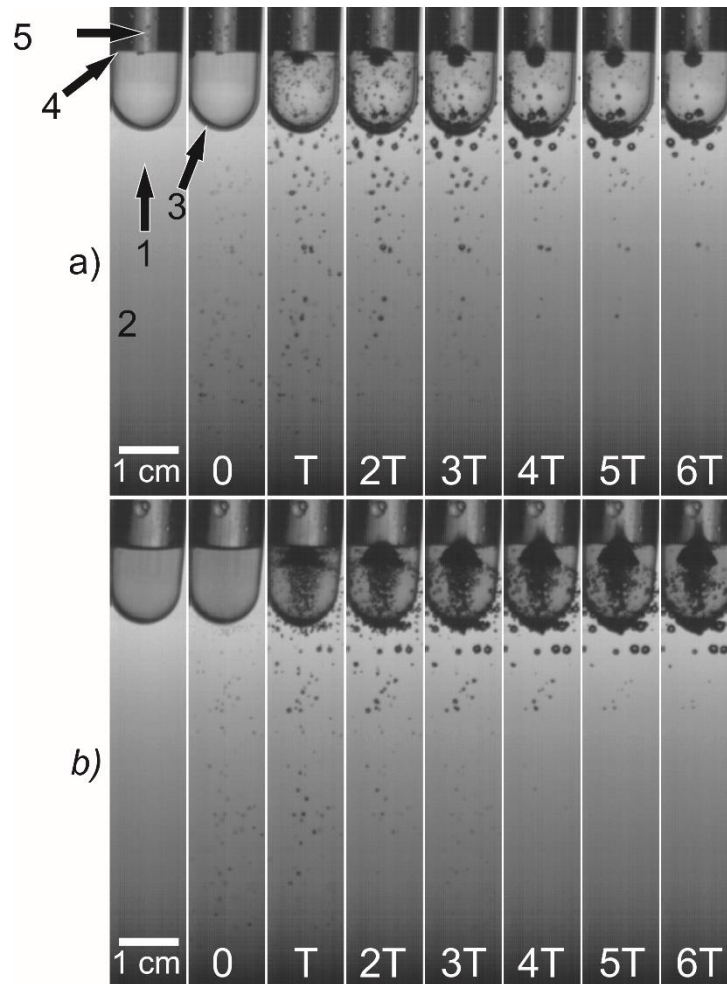


Figura 20: Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial, expuesto a una onda de choque generada a 5.5 kV en modo monopolso lleno con: (a) agua destilada y (b) agua destilada con conidios.  $T = 33 \mu\text{s}$ . La flecha (1) indica la dirección de propagación de la onda de choque a través del agua dentro de la tina del generador (2). La flecha (3) indica el fondo del vial. La interfase entre el líquido y el aire dentro del vial se señala con la flecha (4). La difracción de la luz (5) dentro del vial aparece en cada imagen y es irrelevante para los propósitos de este estudio.

Se grabaron imágenes de viales con 1.5 ml de agua destilada, tratados con ondas de choque generadas a 5.5 kV. En la figura 20a se muestran las fotografías a 30,000 fps ( $T = 33 \mu\text{s}$  entre cada fotograma), del vial durante la llegada de una onda de choque en modo monopolso y la consecuente formación de burbujas. También se capturó el vial con agua destilada con conidios suspendidos en el líquido (figura 20b). Se puede observar que la cantidad de microburbujas formadas dentro del vial es mayor que en el vial que únicamente contenía agua.

La nube formada dentro del vial consiste en microburbujas con una gran distribución de tamaños. A mayor tamaño inicial de las burbujas, la expansión y el colapso inercial requieren más tiempo, por lo que es posible que las burbujas más pequeñas ya hayan formado microjets, mientras que las de mayor tamaño aún se encuentren en la fase de expansión. Debido a ello, no es posible seleccionar un retraso en el modo tándem para que la segunda onda de choque llegue al iniciarse el colapso de todas las burbujas que se forman dentro del vial. Por este motivo, se definieron diferentes criterios para seleccionar un retraso apropiado.

En el primer diseño experimental (ver figura 21), para el que se utilizó un voltaje de descarga de 5.5 kV, se tomaron fotografías a 50,000 fps ( $T = 20 \mu\text{s}$ ). En la figura 21a se muestra el vial al aplicarle una onda de choque en modo monopolso. En el cuadro 2T se señalan las burbujas más pequeñas observables cuando su volumen es máximo (diámetro aproximado de 0.8 mm). A partir del cuadro 3T se aprecia que su tamaño empieza a disminuir. Tomando en cuenta lo anterior, se determinó que un retraso de  $40 \mu\text{s}$  es adecuado para que la segunda onda de choque llegue a  $F$  cuando la mayoría de estas burbujas pequeñas se encuentran en su fase de colapso inercial. La secuencia de imágenes cuando se le aplicó al vial un evento en modo tándem con este retraso corto ( $40 \mu\text{s}$ ) es mostrada en la figura 21b. En teoría, la llegada del pulso de compresión de la segunda onda de choque debe desacelerar el crecimiento de las burbujas más grandes. Esto no pudo corroborarse. Un criterio similar se consideró para maximizar la cavitación de las burbujas más grandes (diámetro máximo aproximado de 2.4 mm), señalándolas con flechas en el cuadro 8T de la figura 21a. En este caso, se determinó un retraso “adecuado” de  $160 \mu\text{s}$  y se probó en modo tándem (figura 21c).



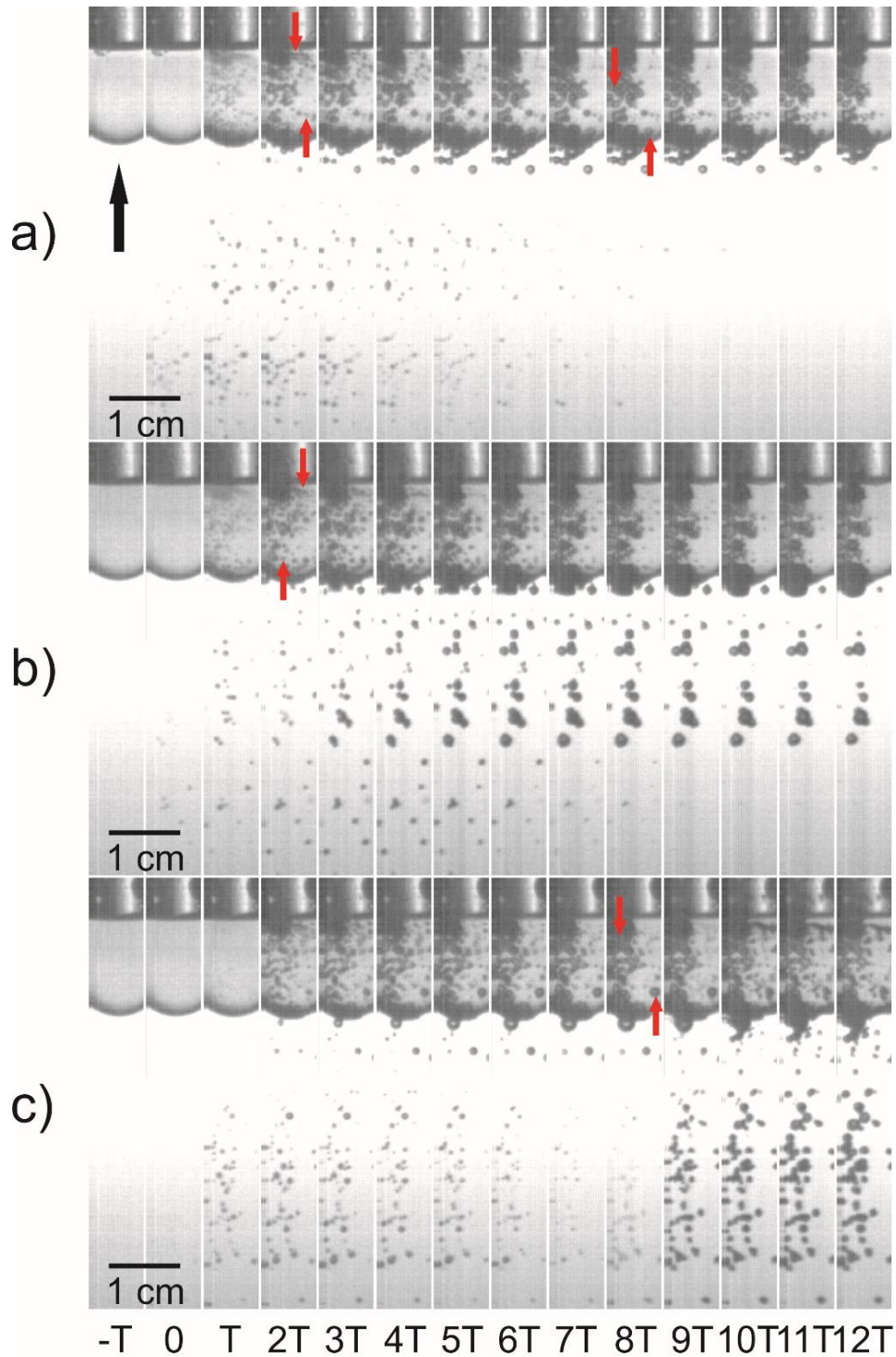


Figura 21: Fotografías de alta velocidad (50,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a una onda de choque generada con 5.5 kV en modo: (a) monopulso; (b) tándem con un retraso de 40  $\mu$ s y (c) tándem con un retraso de 160  $\mu$ s. T = 20  $\mu$ s. La flecha negra indica el sentido de propagación de la onda de choque. Las flechas rojas en los cuadros 2T y 8T señalan las burbujas para las que se seleccionó el retraso de 40 y 160  $\mu$ s, respectivamente.

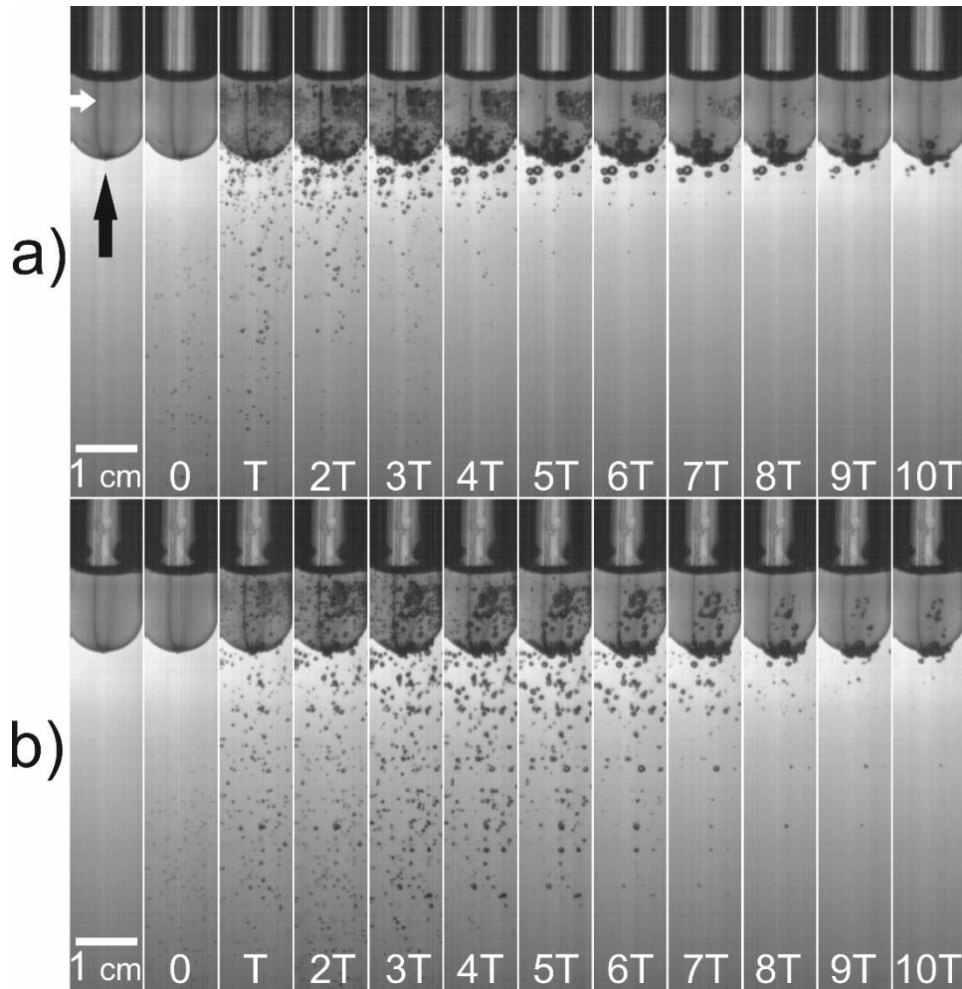


Figura 22: Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a ondas de choque generadas a 4 kV en modo (a) monopulso y (b) tándem con un retraso de  $66.6 \mu\text{s}$ . La flecha negra en (a) indica la dirección de propagación de la onda de choque. La flecha blanca indica un borde que tiene el vial debido a su fabricación y que no tiene relevancia en este estudio.  $T \approx 33.33 \mu\text{s}$ .

En las figuras 22, 23 y 24 se muestran las fotografías a 30,000 fps ( $T = 33.3 \mu\text{s}$  entre cada fotograma) obtenidas para el segundo diseño experimental. En esta sección, el retraso se designó para que la segunda onda de choque llegara en el momento en que la mayor cantidad de burbujas visibles, creadas por la onda de choque previa, se encuentran colapsando. Esta apreciación es subjetiva y depende del observador. Además, debe tenerse en mente que no se están tomando en cuenta las microburbujas, no visibles a simple vista; sin embargo, los efectos generados por los microjets formados durante el colapso de estas microburbujas también pueden ser significativos. Debido a que no se puede tener información exacta sobre la distribución de los tamaños de las burbujas formadas al paso de una onda de choque, los decimales reportados para

el retraso de la segunda onda en el modo tándem carecen de relevancia alguna. La dinámica de las burbujas bajo la influencia de ondas de choque generadas a 4 kV en modo monopulso y tándem se muestra en la figura 22. En este caso se consideró que la densidad de burbujas empezó a disminuir en 2T, que equivale a un retraso de 66.6  $\mu\text{s}$ . Las imágenes de burbujas correspondientes a 5 kV en monopulso y tándem se muestran en la figura 23. El retraso utilizado (99.9  $\mu\text{s}$ ) corresponde a la supuesta disminución de la densidad de burbujas en 3T. Los resultados para 6 kV en modo monopulso y tándem se muestran en la figura 24. En este caso, el retraso más adecuado se consideró para 5T (166.9  $\mu\text{s}$ ).

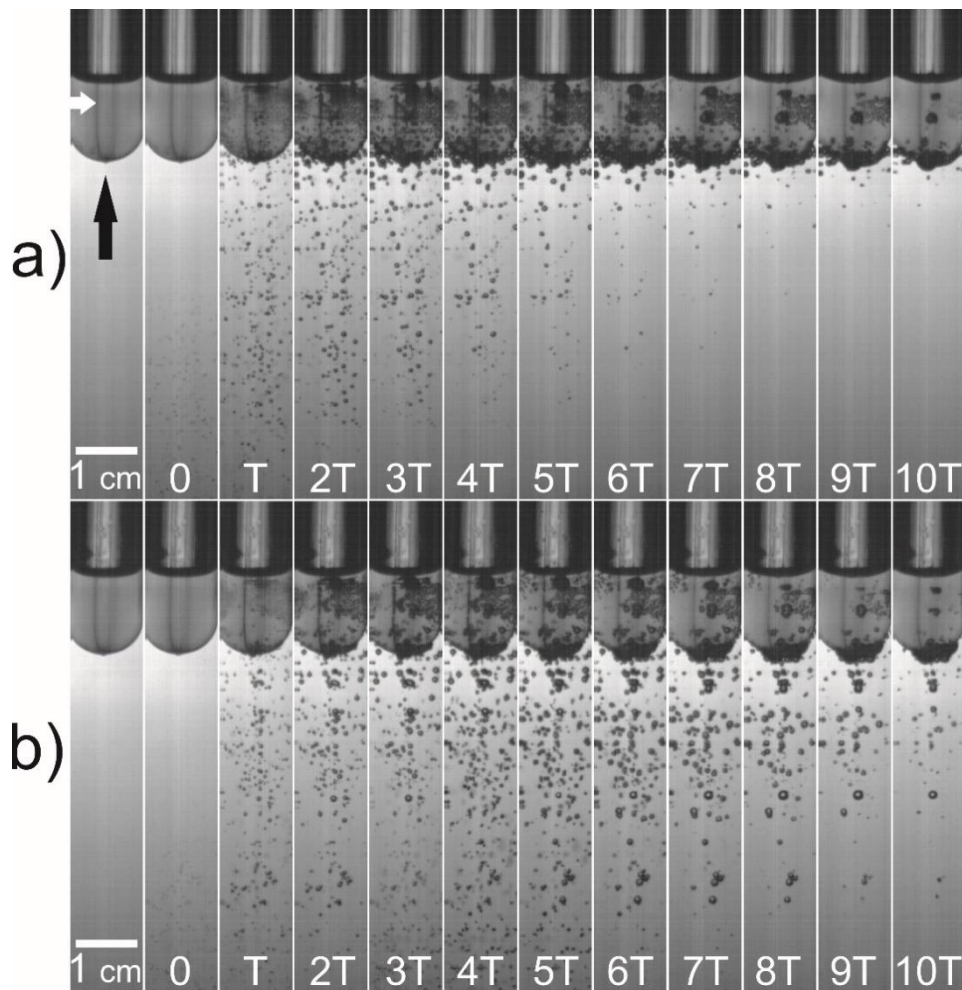


Figura 23: Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a ondas de choque generadas a 5 kV en modo (a) monopulso y (b) tándem con un retraso de 99.9  $\mu\text{s}$ . La flecha negra en (a) indica la dirección de propagación de la onda de choque. La flecha blanca indica un borde que tiene el vial debido a su fabricación y que no tiene relevancia en este estudio.  $T \approx 33.33 \mu\text{s}$ .

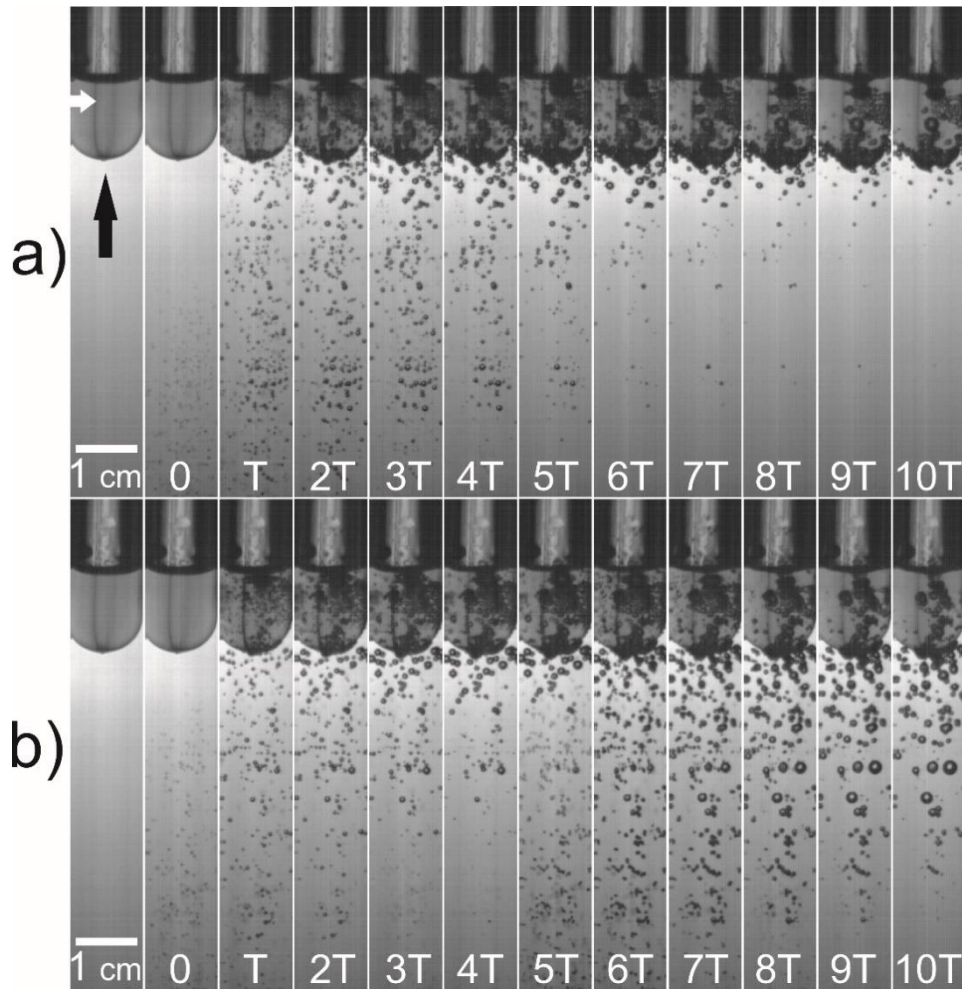


Figura 24: Fotografías de alta velocidad (30,000 fps) que muestran la dinámica de burbujas dentro de un vial con conidios en suspensión, expuesto a ondas de choque generadas a 6 kV en modo (a) monopulso y (b) tándem con un retraso de  $166.5 \mu\text{s}$ . La flecha negra en (a) indica la dirección de propagación de la onda de choque. La flecha blanca indica un borde que tiene el vial debido a su fabricación y que no tiene relevancia en este estudio.  $T \approx 33.33 \mu\text{s}$ .

### 9.3 MORFOLOGÍA SUPERFICIAL DE LA PARED CELULAR OBSERVADA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Como se comentó en la sección de métodos, se utilizó microscopía electrónica de barrido con un voltaje de aceleración de 20 kV (amplificación máxima de 20,000x) para observar irregularidades en la rugosidad y forma de la pared celular de los conidios de *A. niger*. En la figura 25 se muestran conidios con una geometría cuasi esférica con un diámetro de  $3.4 \mu\text{m}$ . La textura superficial de

la pared celular es rugosa, con una serie de dobleces y surcos, debido a la presencia de estructuras constituidas de moléculas como proteínas entre ellas hidrofobinas y melanina. En la parte inferior de la célula central se señala con una flecha una cicatriz común en los conidios, remanente de la separación con otros conidios o el conidióforo durante el ciclo reproductivo de la colonia del hongo. En el fondo de las imágenes se ve el papel filtro que sirvió como soporte.

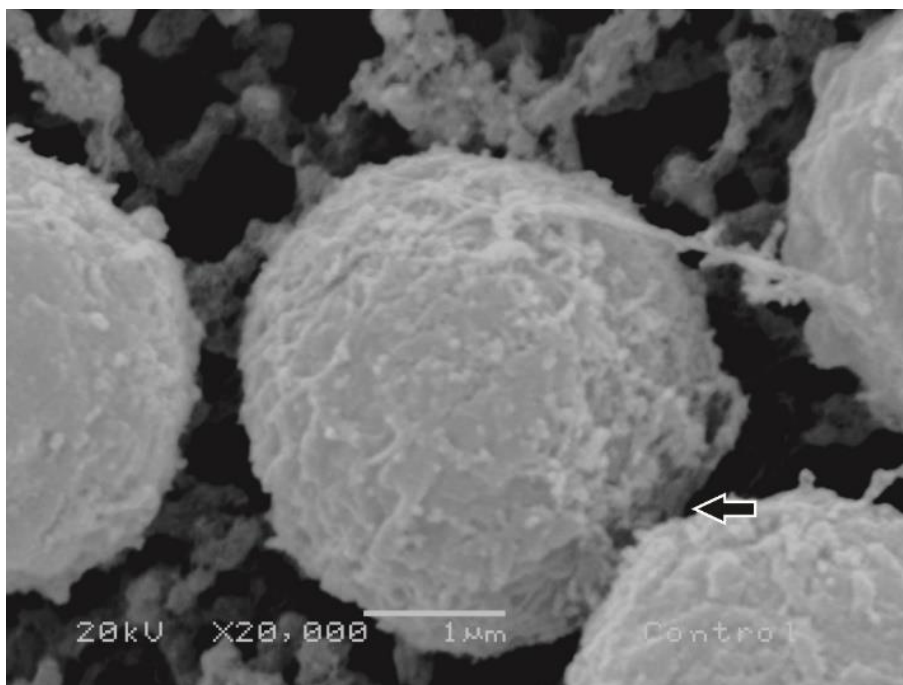


Figura 25: Micrografía electrónica de barrido de conidios de *A. niger* del grupo control (no expuestos a ondas de choque).

En la figura 26 se muestran los conidios expuestos ondas de choque en modo monopulso. Para el tratamiento con 50 ondas de choque monopulso no se apreciaron grandes diferencias en la rugosidad de la pared o morfología de la célula al compararse con los conidios del grupo control, aunque sí se observó el desarrollo de algunas vesículas. Este fenómeno apareció en algunos conidios, independientemente de la configuración con que se aplicaron las ondas de choque. Al incrementar el número a 100 y 200 ondas de choque monopulso (figuras 26b y 26c), se observaron conidios con paredes celulares más lisas en algunas secciones.

El efecto del desbaste en la superficie fue más notorio en conidios a los que se les aplicaron ondas de choque en modo tándem, tanto con un retraso corto (figuras 27a – 27c), como con un retraso

largo (figuras 27d – 27e). Aparentemente el modo tándem, utilizado para incrementar el efecto de la cavitación, aumenta el desbaste superficial. De manera análoga a los tratamientos en modo monopolso, el efecto fue más notorio al duplicar (figuras 27b y 27e) y cuadruplicar (figura 27c y 27e) el número de ondas aplicadas. El aumento en el desbaste superficial parece acentuarse en las muestras tratadas con un retraso corto en el modo tándem. En todos los conidios expuestos a ondas de choque se encontraron partes de la pared levantadas de manera diferente a los surcos vistos en los conidios de los grupos control.

En la figura 27e, se observa que el conidio sufrió un hundimiento de la pared, que apareció de manera similar en diversas células en todos los tratamientos con ondas de choque. Este efecto no se observó en los conidios del grupo control y es diferente a la cicatriz exhibida por el conidio de la figura 25. Además, en esta zona aparecen pequeños orificios (señalados con una flecha en la figura 27f) con un diámetro de 50 a 80 nm, que al igual que el hundimiento en la pared o las vesículas, se encontraron en diversas células tratadas con ondas de choque. Ejemplo de ello son los conidios mostrados en de las figuras 26b y 27e.

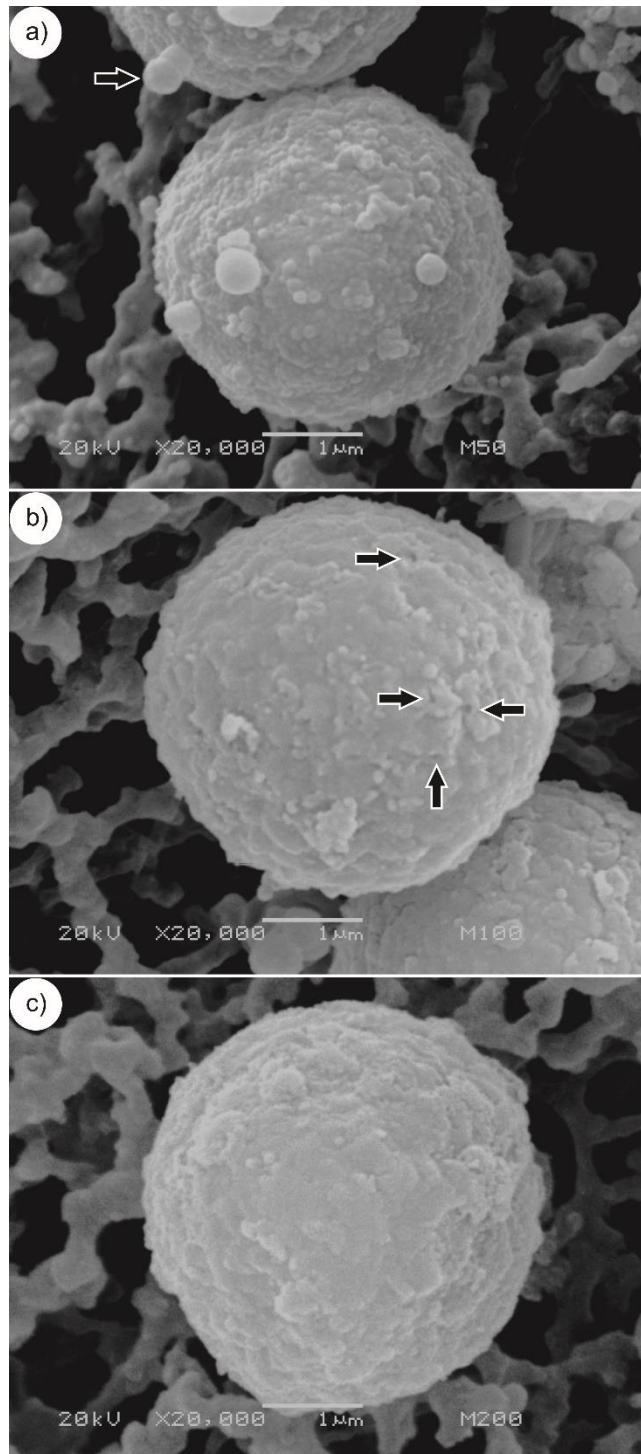


Figura 26: Micrografía electrónica de barrido (20,000 aumentos) de conidios de *A. niger* expuestos a: (a) 50, (b) 100 y (c) 200 ondas de choque en modo monopulso. La flecha en (a) señala una vesícula formada después del tratamiento. En (b) las flechas indican pequeños orificios producto del tratamiento con ondas de choque.

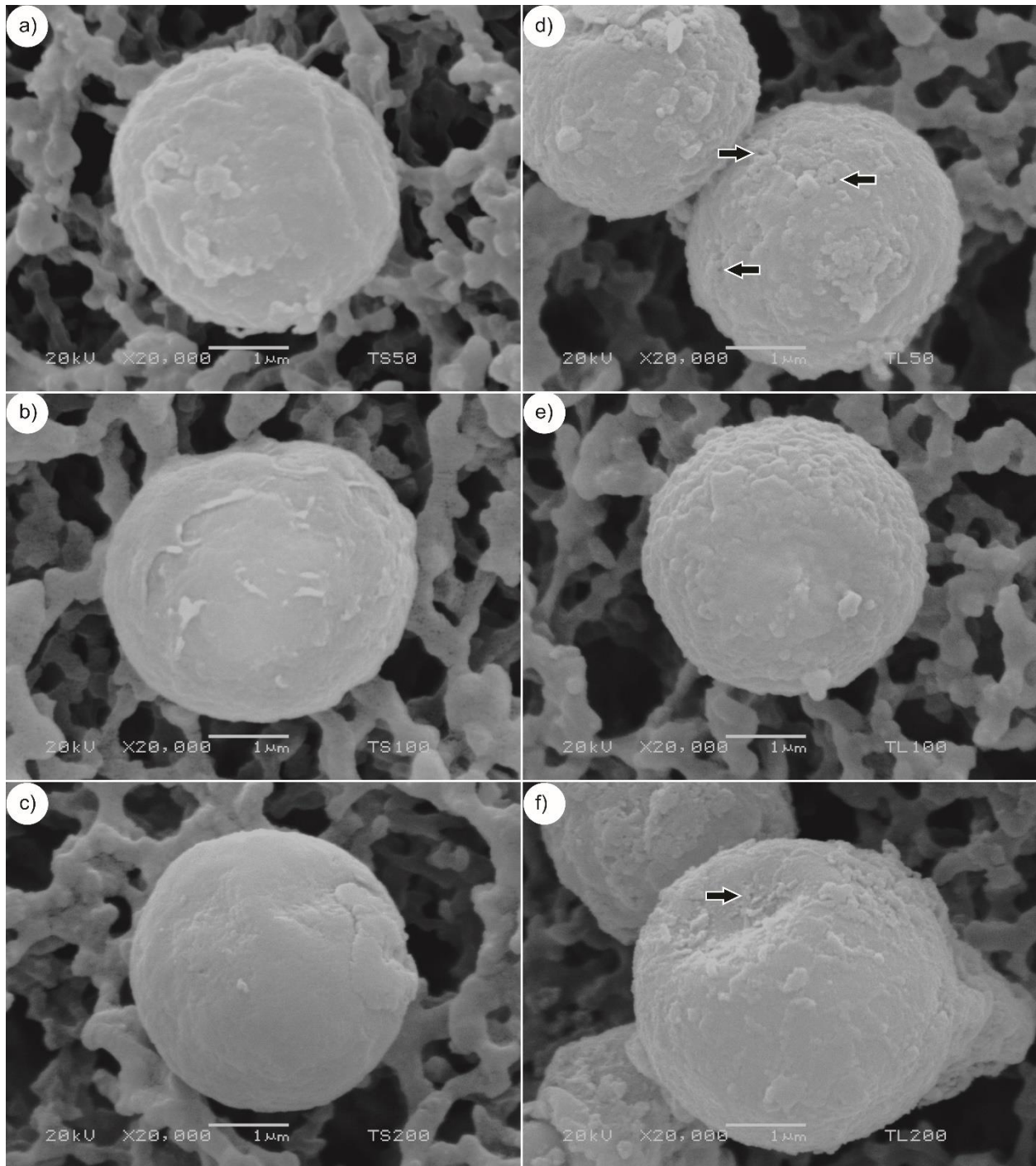


Figura 27: Micrografía electrónica de barrido (20,000 aumentos), de conidios de *A. niger* expuestos a: (a) 50, (b) 100 y (c) 200 ondas de choque tándem con un retraso corto (40  $\mu$ s); (d) 50, (e) 100 y (f) 200 ondas de choque tándem con un retraso largo (160  $\mu$ s).



## 9.4 CAMBIOS EN LA PARED CELULAR OBSERVADA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopía electrónica de transmisión fue de ayuda para observar el área transversal de los conidios y analizar, desde otra perspectiva, la pared celular. Los conidios tienen un área transversal ovalada. El conidio mostrado en la figura 28, tiene un eje mayor (con un ángulo de  $135^\circ$  con respecto a la horizontal) de aproximadamente  $3.39 \mu\text{m}$  y un eje menor (con un ángulo de  $45^\circ$  con respecto a la horizontal) de aproximadamente  $3.18 \mu\text{m}$ . Se distinguen las capas interna y externa de la pared celular, la cual tiene un grosor entre  $180$  y  $400 \text{ nm}$  aproximadamente.

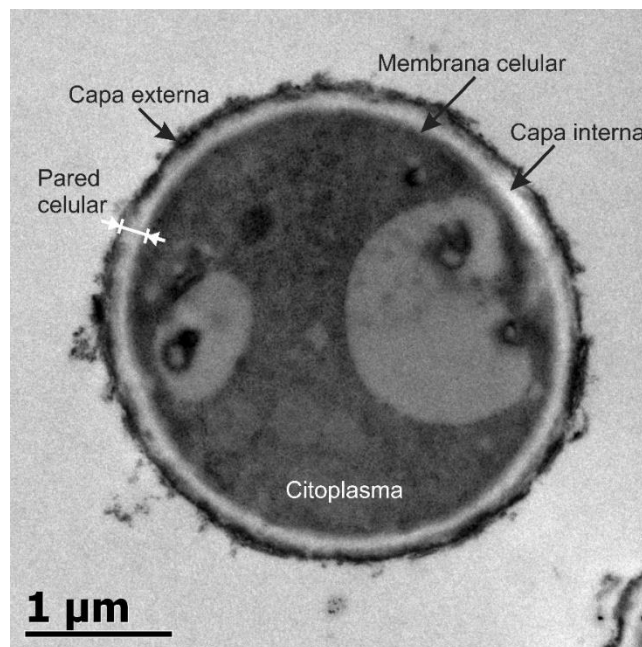


Figura 28: Micrografía electrónica de transmisión de un conidio de *A. niger* no expuesto a ondas de choque. Los conidios exhiben un área transversal ovalada, casi circular. La capa interna de la pared celular se observa con una tonalidad entre blanco y gris oscuro y la externa se ve de color negro, debido a la melanina.

Al revisar los conidios sometidos a ondas de choque, se observó un patrón similar al encontrado por microscopía electrónica de barrido. Adicionalmente, la microscopía electrónica de transmisión permitió encontrar otros cambios morfológicos en la pared celular. Los conidios sometidos a 50 ondas de choque en modo monopolso (figura 29a) se ven similares al control; sin embargo, como es posible ver en la figura 29b se observan levantamientos de la capa externa de

la pared y alrededor se encontró detrito celular. Cuando se aumentó el número de ondas de choque a 100 (figura 30a) y 200 (figura 30b), los conidios siguieron mostrando desprendimiento y levantamiento de la capa externa. Aunado a esto, la pared celular presenta ondulaciones que no fueron observadas en los conidios de control y que no son tan notorias en muestras que recibieron 50 ondas de choque.

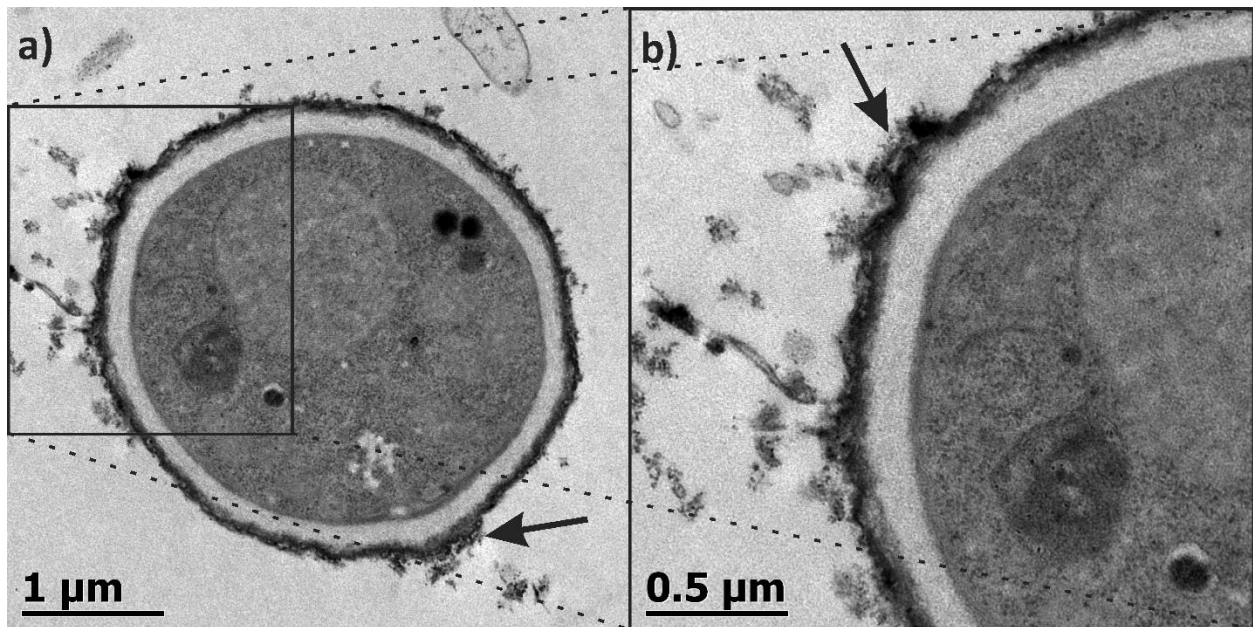


Figura 29: a) Micrografía electrónica de transmisión de un conidio de *A. niger* expuesto a 50 ondas de choque en modo monopulso. La imagen (b) es un acercamiento de una zona de la imagen (a), en donde aparentemente la capa externa de la pared se ve levantada, sobre todo en los sitios indicados con las flechas negras.

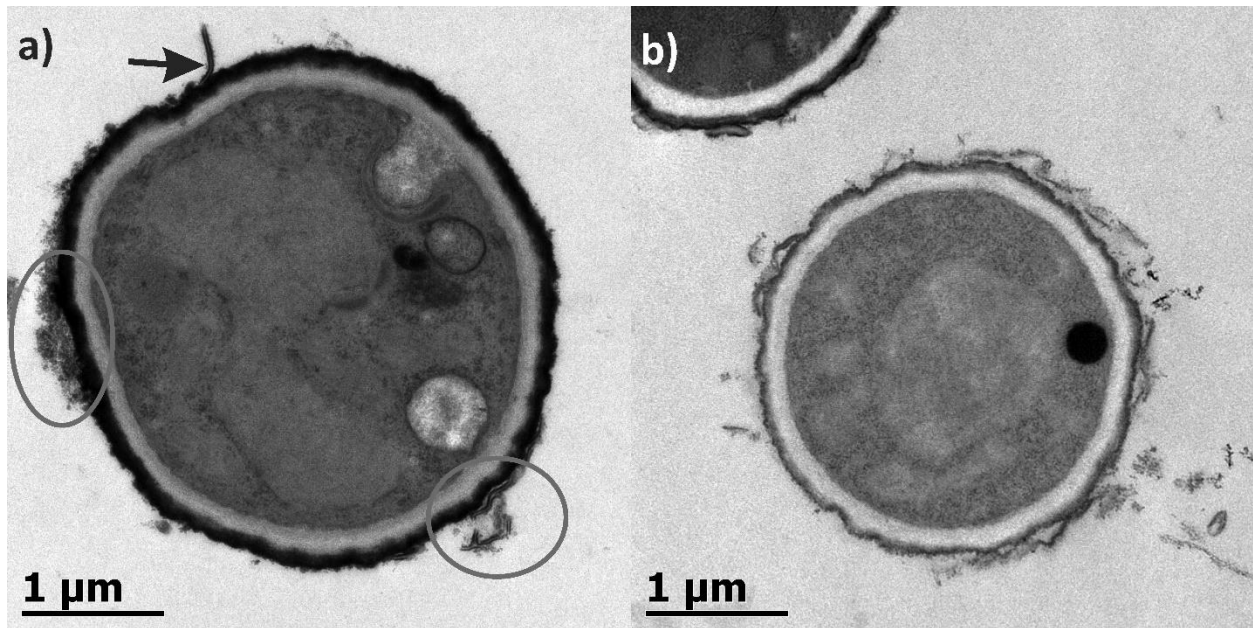


Figura 30: Micrografías electrónicas de transmisión de un conidio de *A. niger* expuesto a: a) 100 y b) 200 ondas de choque en modo monopulso. La flecha negra y las zonas encerradas en las elipses, en la figura (a), señalan desprendimientos de la capa externa de la pared celular. El conidio de la figura (b) tiene una mayor cantidad de zonas donde se desprendió la capa externa, así como una pared celular ondulada.

En células expuestas a ondas de choque tándem se encontraron efectos similares. Por ejemplo, en la figura 31 se muestran conidios que fueron expuestos al modo tándem con un retraso largo. En todas estas células también se aprecia una pared celular ondulada como en los tratamientos con mayor cantidad de ondas de choque en monopulso. Se observó que alrededor de algunos conidios hubo mayor deposición de detrito celular, como el que se muestra en la figura 31b. Al mismo tiempo este último conidio exhibe partes en donde la membrana celular se adentra a la zona del citoplasma. Otro fenómeno que se presentó fue el desprendimiento total de la capa externa de la pared en algunas zonas. Esto es posible verlo en las figuras 31c y 31d. El conidio mostrado en la figura 31a, presenta dos zonas en donde puede verse este desprendimiento, aunque no es tan claro como en el conidio de la figura 31c.

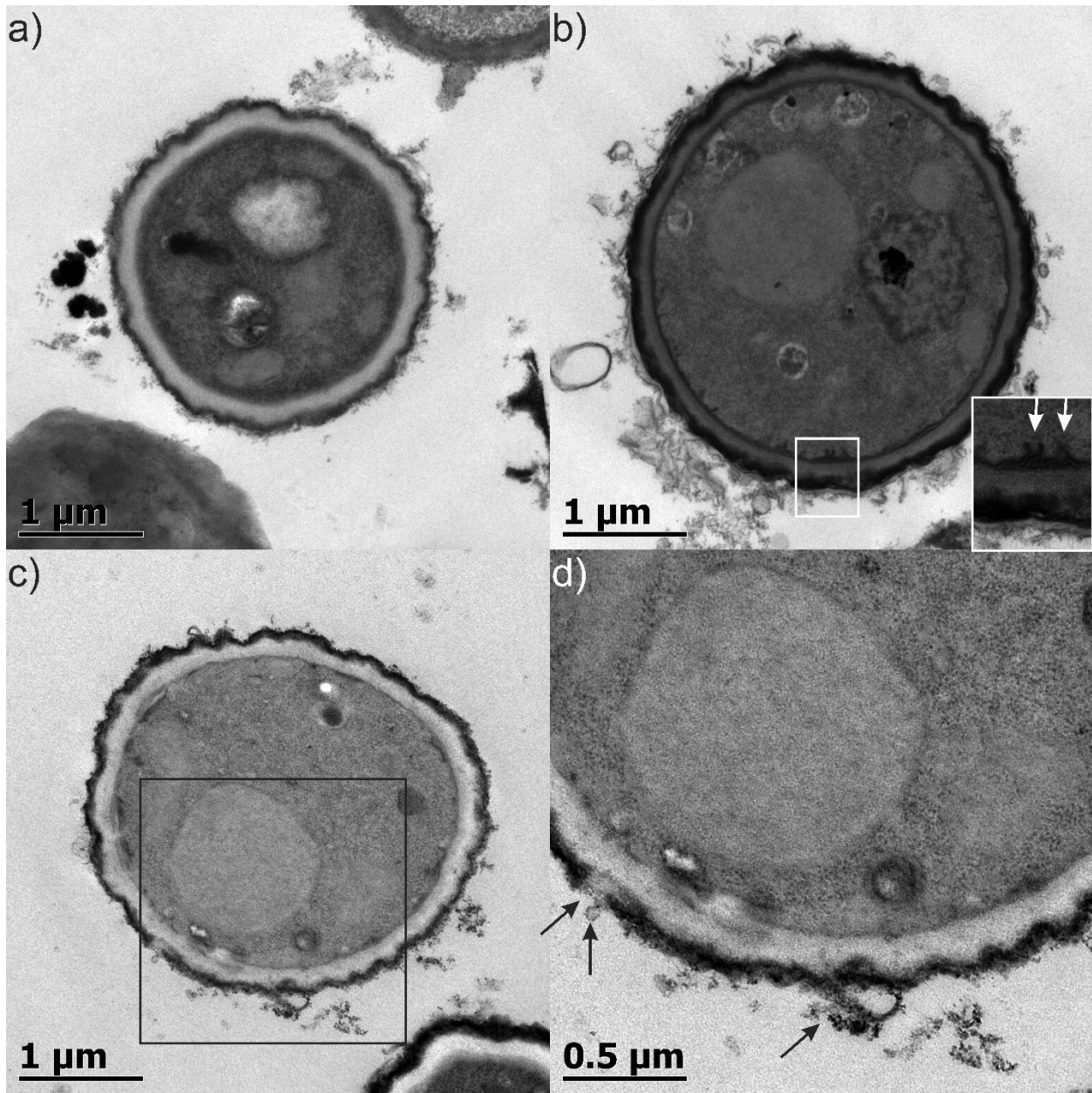


Figura 31: Micrografías electrónicas de transmisión de conidios expuestos a: a) 50, b) 100 y c) 200 ondas de choque en modo tándem con un retraso largo (160  $\mu$ s). Las flechas indican parte de la capa externa de la pared que se desprendió y la zona donde la membrana celular penetró hacia el citoplasma. El cuadro blanco en (b) indica un acercamiento a dicha zona. d) Muestra un acercamiento de la zona resaltada con un cuadro negro en la imagen (c).

En la figura 32 se muestran ejemplos de conidios expuestos a ondas de choque tándem con un retraso corto. En este caso, las deformaciones en la pared celular son más drásticas. En la figura 32a se muestra un conidio (100 ondas de choque tándem) con protuberancias alrededor de la pared. En algunas de ellas emergen vesículas con una longitud entre 100 y 400 nm. El conidio de la figura 32b, además de tener las características mencionadas en los casos anteriores, se deformó. También, puede observarse que parte del detrito celular fue introducido al menos en las capas de la pared y en la proximidad de ella. Un efecto similar se encontró en conidios que recibieron 200 ondas de choque con este modo (figura 32c y 32d). También, se observan partículas (las cuales no pudieron identificarse) que van desde la capa externa de la pared hasta el citoplasma de la célula. Aunque la pared del conidio en la imagen aquí presentada no muestra ondulaciones, sí es evidente que se formó una gran cantidad de protuberancias y vesículas de hasta 300 nm de longitud, de las cuales algunas perdieron en parte de la capa externa.

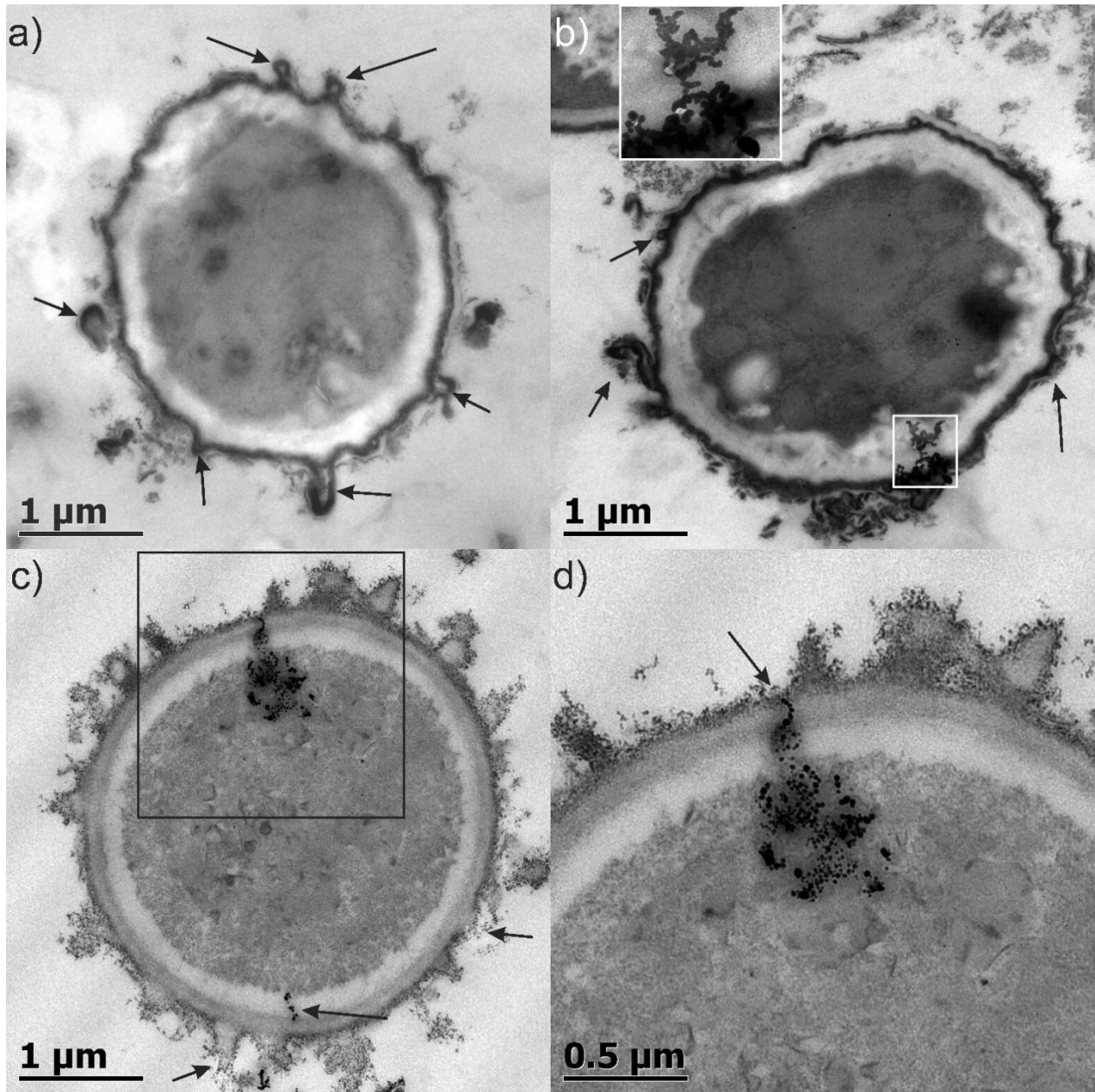


Figura 32: Micrografías electrónicas de barrido de conidios expuestos a a) 50, b) 100 y c) 200 ondas de choque en modo tándem con un retraso corto ( $40 \mu\text{s}$ ). Las flechas señalan parte de la capa externa de la pared que se desprendió, formación de vesículas, abultamientos de la pared y la presencia de material extraño en la célula. El cuadro blanco en (b) es un acercamiento a dicha zona. d) Acercamiento de la zona resaltada con un cuadro negro en (c).

## 9.5 VIABILIDAD DE LOS CONIDIOS DESPUÉS DE SER EXPUESTOS A ONDAS DE CHOQUE

Los resultados de viabilidad se muestran en la figura 33. Todos los tratamientos tienen una variabilidad que supera el 5%, alcanzando valores de hasta casi 30%, sobresaliendo los casos de 200 ondas de choque generadas a 4 kV en modo monopulso y 6 kV en modo tándem, así como 100 ondas de choque en modo tándem generadas a 4 kV. No se observaron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos ( $\chi^2 = 11.143$ , GL = 17,  $p = 0.849$ ). Adicionalmente, la viabilidad en todos los tratamientos fue superior al 70%, llegando en varios tratamientos hasta el 100%. Con lo anterior es posible afirmar que las ondas de choque, utilizando las condiciones reportadas en este trabajo, no afectaron más del 20% la viabilidad de los conidios.

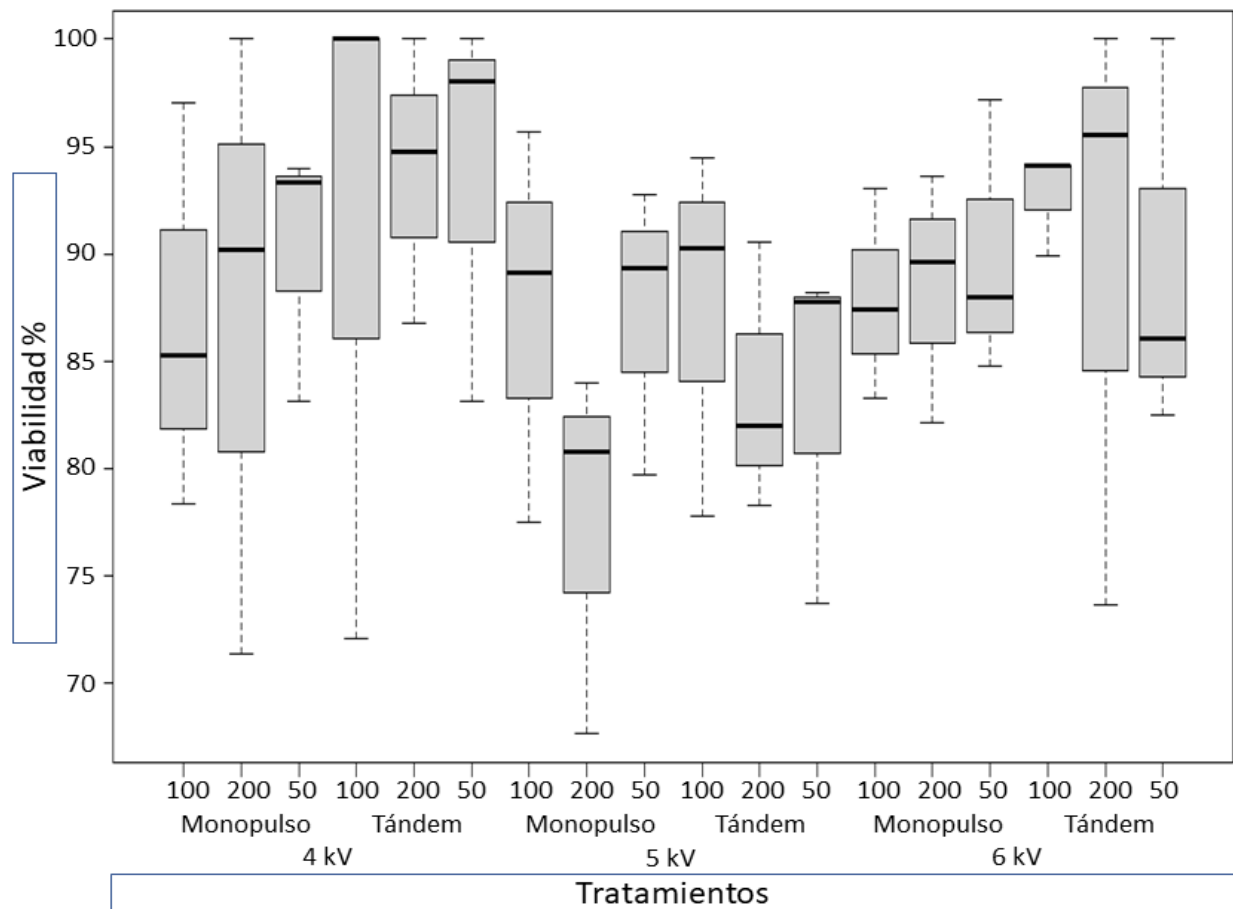


Figura 33 :Viabilidad observada en los diferentes tratamientos con ondas de choque. Monopulso

## 9.6 INFLUENCIA DE LAS ONDAS DE CHOQUE EN LAS FASES DE CRECIMIENTO POLARIZADO Y GERMINACIÓN DE LOS CONIDIOS

La figura 34 muestra tres imágenes de microscopio óptico de la secuencia del crecimiento de los conidios sin tratamiento (grupo control), observadas bajo el microscopio óptico. En la figura 34b, se observa un incremento en el tamaño de los conidios con respecto a la figura 34a. Este aumento en el tamaño es lo que se conoce como crecimiento isotrópico o hinchamiento. En la figura 32c, es posible apreciar que tres conidios formaron un tubo germinal, alcanzando la fase de crecimiento polarizado. Se considera que estas células están listas para continuar con la fase del crecimiento somático.

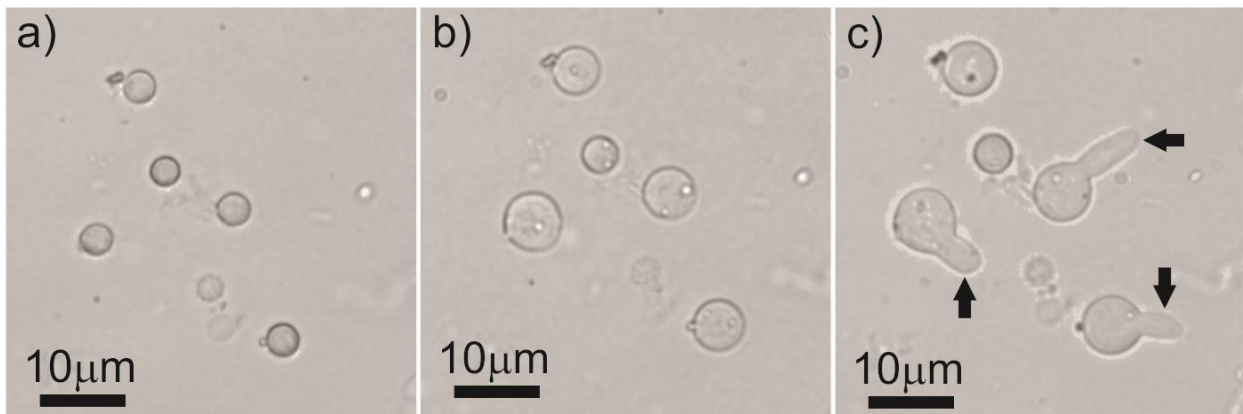


Figura 34: Fotografías de conidios no tratados con ondas de choque, observados bajo un microscopio óptico a) después de 0 h, es decir, justo después de ser inoculados en el medio de cultivo para conidiación; b) después de 6 h, es decir, durante la fase de crecimiento isotrópico y c) después de 8 h, es decir, durante la fase de crecimiento polarizado. Las flechas indican el tubo germinal de los conidios que lo desarrollaron.

Los resultados referentes a la influencia de las ondas de choque en las fases de crecimiento de los conidios se muestran en las figuras 35, 36 y 37. Todos los tratamientos, incluyendo el control, se comportaron de manera similar. El área inicial de los conidios es aproximadamente  $20 \mu\text{m}^2$ , con poca variabilidad en cada una de las muestras. Su tamaño fue incrementando gradualmente, alcanzando mayor tasa de crecimiento entre las 4 y 8 h. Al término de este periodo, entre las 8 y 10 h, su tamaño se había duplicado con respecto a su valor inicial. La muestra control es la que presentó un mayor rango de valores de área a las 10 h, en contraste con las muestras tratadas con ondas de choque, las cuales tuvieron menor dispersión de los datos. Con respecto a esto, dos



muestras resaltan, ambas expuestas a modo tándem. La primera fue la que recibió 100 ondas de choque generadas a 5 kV, con un rango similar al control. La segunda muestra fue la sometida a 200 ondas de choque generadas a 6 kV. Aunque la tendencia en el tiempo en todos los tratamientos fue similar, las muestras expuestas a 50 y 100 ondas de choque, generadas a 4 kV en monopulso mostraron un tamaño mayor que las muestras control a las 4 h. A las 12 h resultó imposible realizar la medición, debido al tamaño, la aglomeración de los conidios y la cantidad de hifas formada, ya que el software no los podía detectar como células individuales.

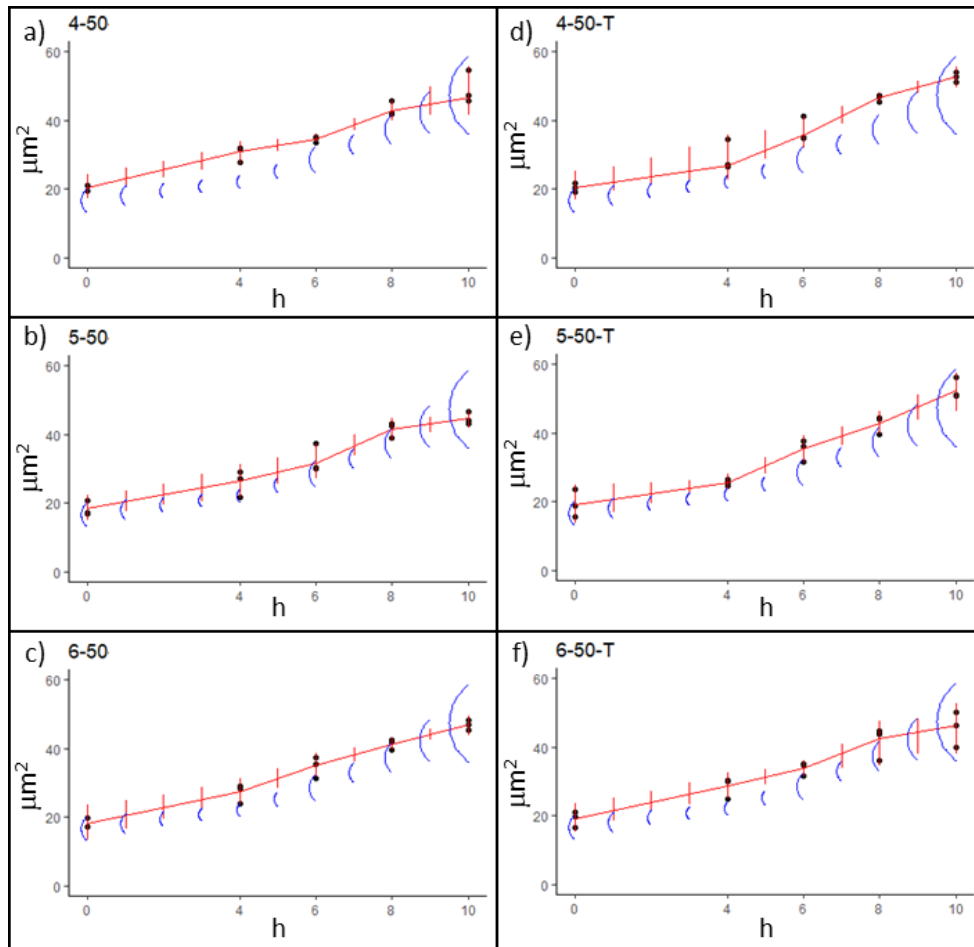


Figura 35: Gráficas que muestran el crecimiento de los conidios, midiendo el área de la imagen plana capturada por la cámara, después de exponerlos a 50 ondas de choque generadas con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu\text{s}$ , 99.9  $\mu\text{s}$  y 166.5  $\mu\text{s}$ , respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control.

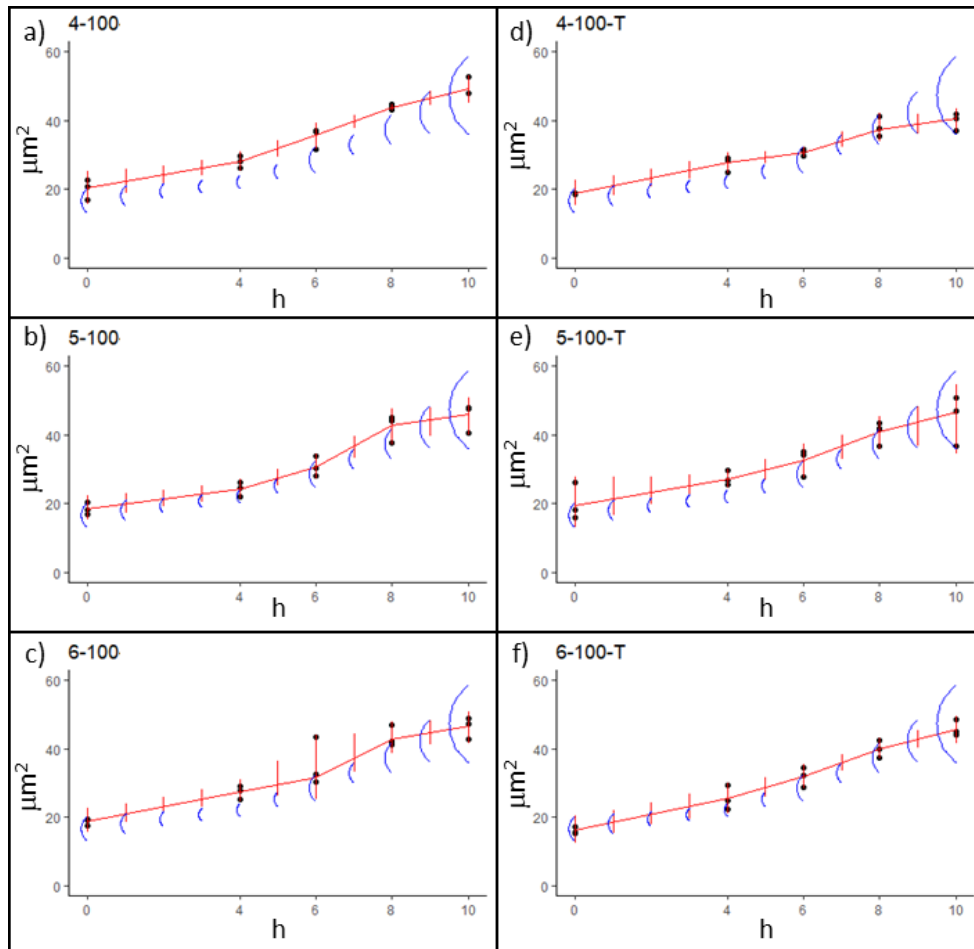


Figura 36: Gráficas que muestran el crecimiento de los conidios, midiendo el área de la imagen plana capturada por la cámara, después de exponerlos a 100 ondas de choque generadas con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu\text{s}$ , 99.9  $\mu\text{s}$  y 166.5  $\mu\text{s}$ , respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control.

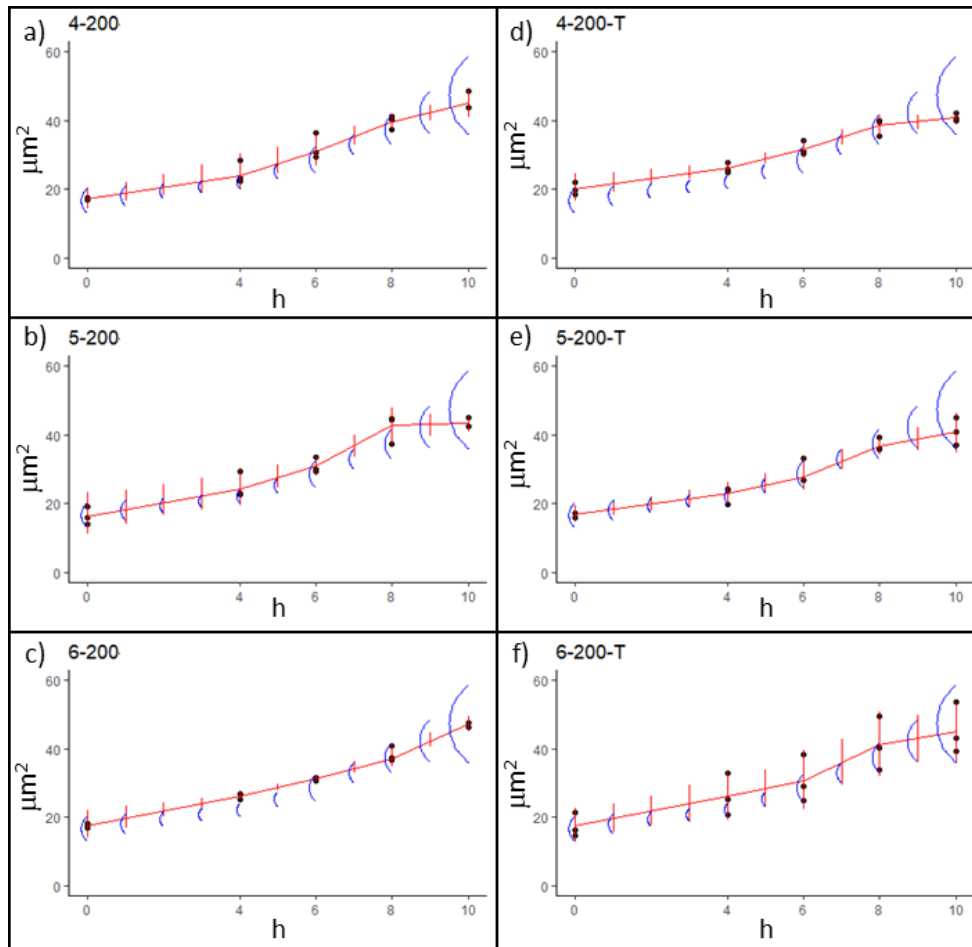


Figura 37: Gráficas que muestran el crecimiento de los conidios, midiendo el área de la imagen plana capturada por la cámara, después de exponerlas a 200 ondas de choque generadas con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu\text{s}$ , 99.9  $\mu\text{s}$  y 166.5  $\mu\text{s}$ , respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control.

En las figuras 38, 39 y 40 se presentan las gráficas de los datos del porcentaje de conidios que desarrollaron tubo germinal. La tendencia fue similar a lo largo del tiempo para todas las muestras con ondas de choque y el control. A las 4 h el porcentaje de células con tubo germinal se encontró por debajo del 1%. A las 6 h se observó, de manera más evidente, la fase de crecimiento somático. A las 10 y 12 h el porcentaje de células que germinaron fue superior al 50% y 80%, respectivamente. El análisis estadístico reveló que no existe una relación entre el porcentaje de conidios que desarrollaron tubo germinal y su tamaño.

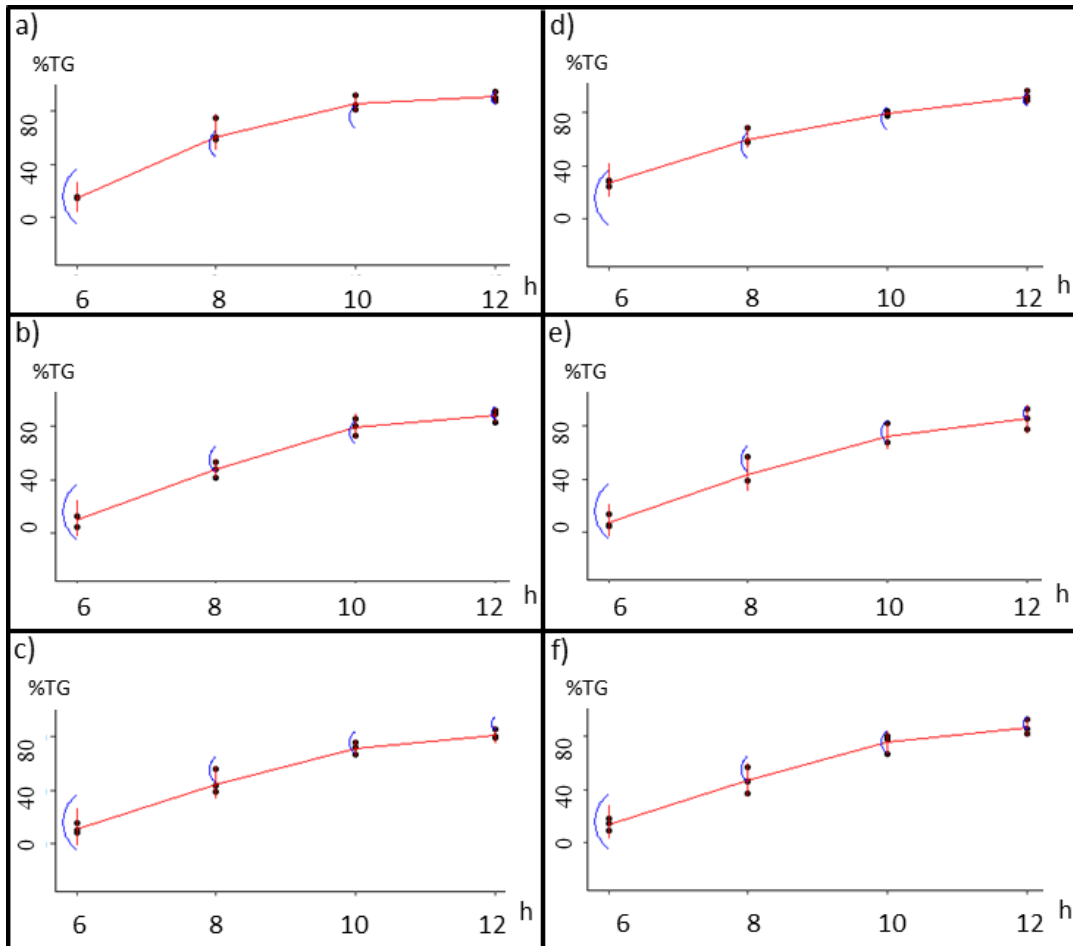


Figura 38: Gráficas que muestran el porcentaje de los conidios que desarrollaron tubo germinal, en el periodo de 6 a 12 h, después de exponerlos a 50 ondas de choque generadas con un voltaje de a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control.

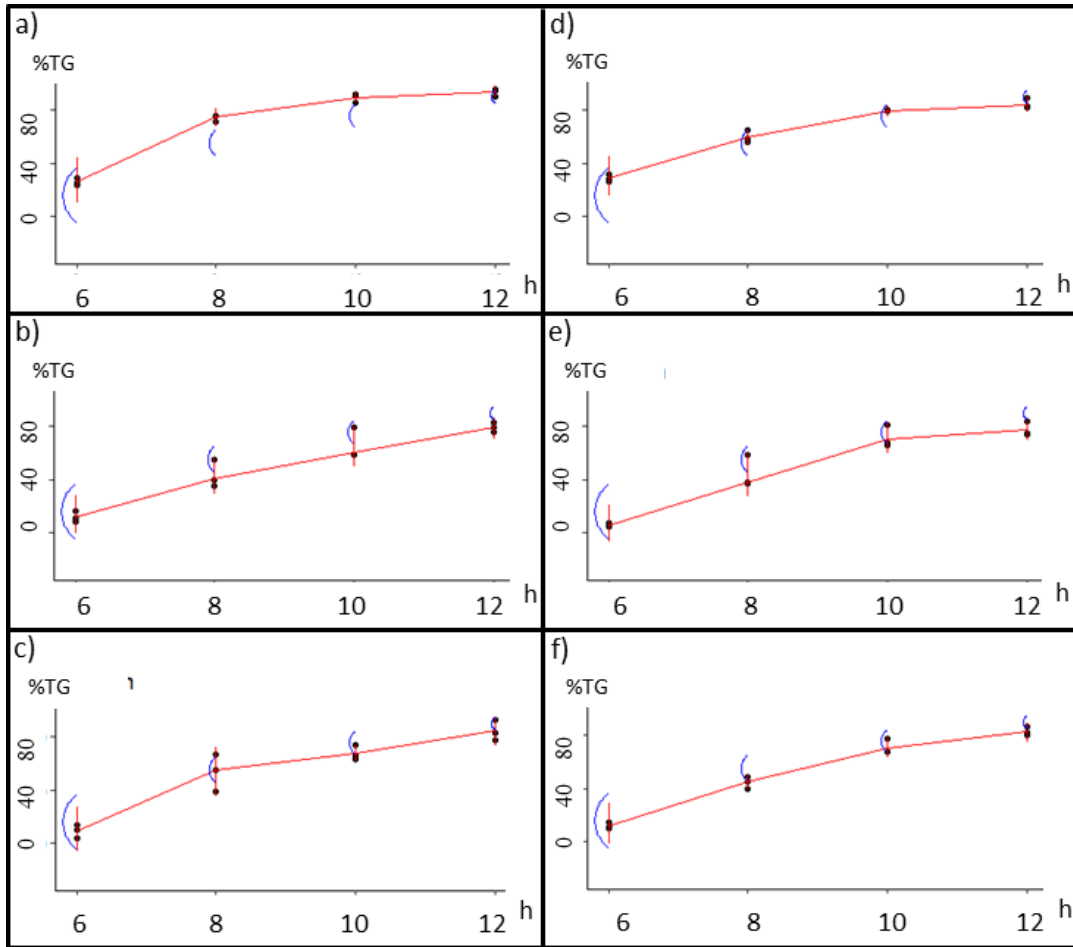


Figura 39: Gráficas que muestran el porcentaje de los conidios que desarrollaron tubo germinal, en el periodo de 6 a 12 h, después de exponerlas a 100 ondas de choque generadas con un voltaje a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control.

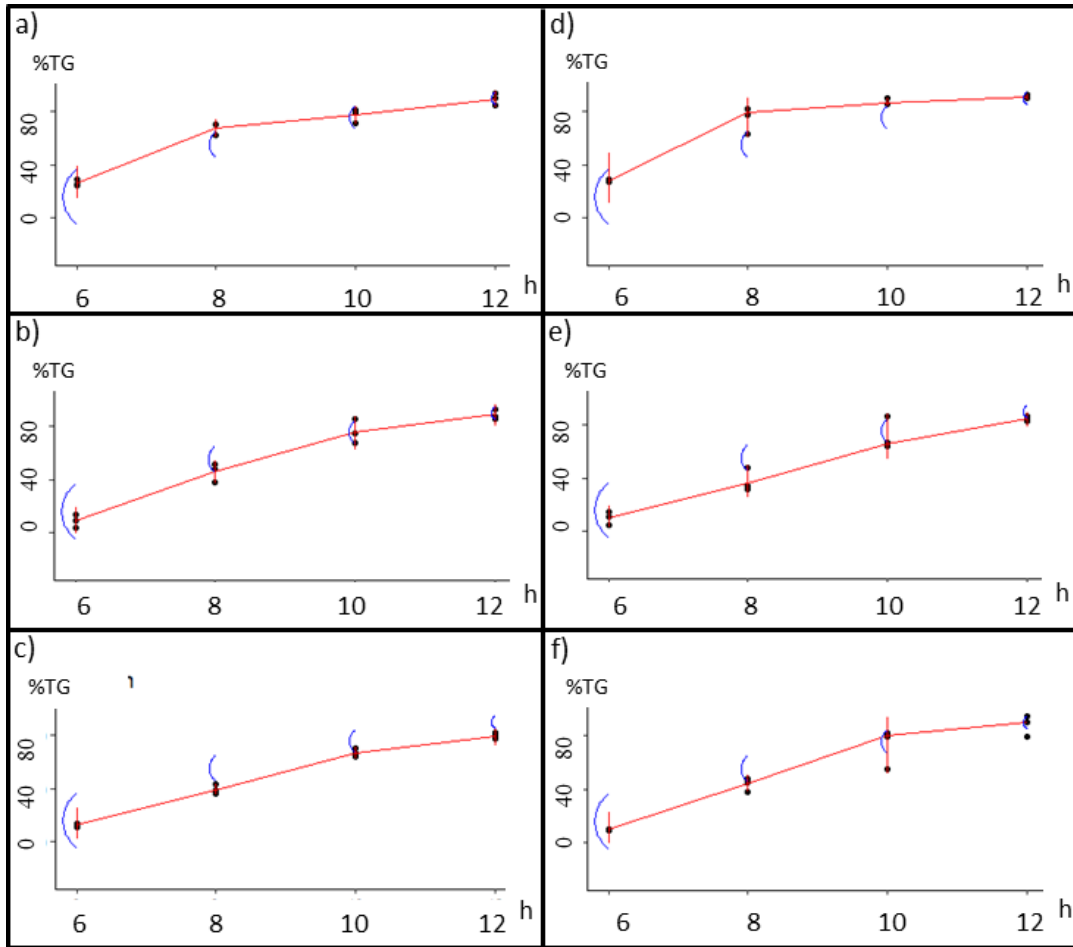


Figura 40: Gráficas que muestran el porcentaje de los conidios que desarrollaron tubo germinal, en el periodo de 6 a 12 h, después de exponerlas a 200 ondas de choque generadas con un voltaje a) 4 kV, b) 5 kV y c) 6 kV en modo monopulso; así como d) 4 kV, e) 5 kV y f) 6 kV en modo tándem con un retraso de 66.6  $\mu$ s, 99.9  $\mu$ s y 166.5  $\mu$ s, respectivamente. Los puntos indican el promedio de las mediciones de área de 100 conidios. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para los tratamientos con ondas de choque. Los arcos azules representan el intervalo de confianza Bootstrap al 95% para las muestras control.

## 10. DISCUSIÓN

Se ha reportado que las ondas de choque son capaces de inducir la permeabilización en células de varios tipos (Tetsuya Kodama et al., 2000; Kuraya, Miyafuji, Takemoto, & Itoh, 2014; López-Marín et al., 2017; A. M. Loske et al., 2014). Una de las principales hipótesis sugiere que la cavitación es la causa principal.

La dinámica de las burbujas depende de varios factores, uno de ellos es la variación de presión a la que están sometidas las microburbujas en el líquido. Como el volumen de la suspensión dentro de los viales es mayor que el de la zona focal y el frente de choque no es plano, en el generador de ondas de choque usado, las burbujas y partículas que actúan como núcleos de cavitación están sometidos a presiones diferentes al paso de una onda de choque. Esto se ve compensado después del paso de una primera onda de choque, cuando diferentes fenómenos como el reflejo de la onda en la interfase interna del vial, el crecimiento y colapso de las burbujas, así como las diferencias de presión derivadas de las ondas de choque secundarias, forman corrientes fuertes que mezclan la solución dentro de los viales. En este trabajo se aplicaron varias decenas de ondas de choque. Con la llegada de las subsecuentes ondas de choque se forma un mayor número de núcleos de cavitación incrementando este efecto.

La onda de choque sufre una atenuación muy baja (atenuación máxima registrada de 0.83% para ondas de choque generadas con 4 kV), debido a que la impedancia acústica de los viales es similar a la del agua ( $0.9 \text{ g/cm}^3$ ). Al incidir en la interfase líquido-aire en la parte superior de la muestra, el pulso de compresión se refleja invirtiendo su fase, aumentando la cavitación y sus efectos.

Hay que considerar que en el modo tándem se requiere la mitad del tiempo para generar la misma cantidad de ondas de choque como en el modo monopulso. Esto es una ventaja. Debido a la nube de burbujas que se forma después del paso de la primera onda de choque, la amplitud de la segunda onda es menor (aproximadamente un 75% de la presión alcanzada por la primera onda de choque), sin embargo, esto no afecta la eficiencia de las ondas tándem.

La gran distribución de tamaños que tienen los núcleos de cavitación (burbujas y partículas sólidas), dificulta la selección de un retraso “óptimo” para el modo tándem. A mayor tamaño de burbuja, la expansión y el colapso inercial suceden en intervalos de tiempo más largos. Esto

significa que unas burbujas colapsan antes que otras. Inclusive es posible que las burbujas más pequeñas ya hayan formado microjets, mientras que las de mayor tamaño aún se encuentren en la fase de expansión. Además, el tiempo que dura el paso de la onda de choque es menor que la duración de la fase del colapso inercial. Por tal motivo, no es posible seleccionar un retraso en el modo tándem, para que la segunda onda de choque pase por la suspensión durante el colapso de todas las burbujas dentro del vial, y tuvo que optarse por seleccionar retrasos con base en lo observado en las fotografías de alta velocidad presentadas en la sección 9.2.

La cavitación también depende en gran medida de gases disueltos, microburbujas contenidas en el fluido y partículas sólidas, que pueden considerarse impurezas o que simplemente son parte de la suspensión a tratar. En el caso específico de este trabajo, las fotografías de alta velocidad revelaron que en las muestras con conidios se forman más burbujas, observándose nubes de burbujas más densas. Los conidios de *A. niger* suspendidos en el fluido tienen hidrofobinas en la capa externa de la pared celular, por lo que existe una baja fuerza de adhesión entre la superficie celular de los conidios y el líquido circundante. De esto se infiere que los conidios actuaron como núcleos de cavitación, lo cual coincide con la teoría de Harvey que sugiere que la morfología superficial puede influenciar la cavitación (E Newton Harvey et al., 1944; E. Newton Harvey, McElroy, & Whiteley, 1947). Además, se ha reportado que no sólo la hidrofobicidad superficial, sino también la rugosidad influye en la nucleación (Manish Arora, Ohl, & Mørch, 2004). De acuerdo con lo observado en las imágenes de microscopía electrónica de barrido, los conidios tienen una superficie rugosa. Considerando la teoría de Harvey y lo reportado por Arora y colaboradores, sería lógico pensar que un conidio genera varios núcleos de cavitación.

Además de los microjets, se han reportado otros fenómenos que contribuyen al aumento de la permeabilidad celular, asociados tanto a la cavitación como al propio paso de las ondas de choque. Debido a las limitaciones tecnológicas, no es posible observar la membrana celular en tiempo real mientras es influenciada por el paso de una onda de choque. Por ello se ha simulado qué sucede durante esta interacción *in silico* (Kfoury et al., 2019; Koshiyama et al., 2006). Kfoury y colaboradores consideraron volúmenes de agua con forma de prisma rectangular, influenciados por un pulso de compresión, que interactúa con una membrana celular de 230 Å. Estas simulaciones sugieren que el cambio en la permeabilidad celular se debe a la compresión que sufre la membrana celular, al aumento de presión y al desorden molecular en la bicapa lipídica. Como se comentó anteriormente, durante el colapso de las burbujas se producen ondas de choque secundarias de diferentes magnitudes de presión y escalas de tiempo y longitud. Estas ondas de choque secundarias también pueden interactuar con los conidios y con burbujas de diferentes tamaños que se encuentran en las cercanías.



Por otra parte, el movimiento del fluido que se produce por el paso de las ondas de choque y la subsecuente cavitación, generan esfuerzos de corte sobre cualquier superficie que se encuentre en contacto con el fluido. Investigadores como Kodama y colaboradores (2000), sugieren que los esfuerzos cortantes, tangenciales a la superficie celular y derivados de las fuerzas viscoelásticas entre el fluido circundante y la capa externa de las células, podrían alterar la permeabilidad de las mismas. El efecto de los esfuerzos cortantes producidos por la cavitación también ha sido estudiado al utilizar sonoporación. Es importante mencionar que esta técnica tiene diferencias significativas con respecto al uso de ondas de choque. En sonoporación se utilizan ondas armónicas con amplitudes menores, pero frecuencias mayores, lo que produce cavitación estable, que es la oscilación cíclica de la burbuja sin llegar a formar microjets. Estas oscilaciones de las burbujas también producen corrientes de líquido y, por consiguiente, esfuerzos en cualquier partícula que se encuentre en la cercanía. En este campo, varios autores han atribuido la aparición de poros transitorios a fuerzas cortantes derivadas de microcorrientes generadas por la propia compresión y expansión de las microburbujas (Le Gac, Zwaan, van den Berg, & Ohl, 2007; W. Li, Juan, Xia-Sheng, Di, & Dong, 2014; Marmottant & Hilgenfeldt, 2003). Nejad y colaboradores (2016) reportaron que esfuerzos cortantes de hasta 35.3 Pa, derivados de la cavitación, eran suficientes para generar poros en células de linfoma humano (Nejad, Hosseini, Akiyama, & Tachibana, 2016). Dichas células resultaron ser capaces de reparar estos poros. En otro trabajo se reportó que sonicando esporas de *A. nidulans*, surgen corrientes en suspensiones de agua desionizada estéril, capaces de desprender la capa de hidrofobinas, sin que exista una deformación en la morfología de las células (Zhao, Schaefer, & Marten, 2005).

Sumado a esto, si una microburbuja se comprime suficientemente cerca de una célula, causa un efecto de vacío y succiona una parte de la capa externa de la superficie celular. En caso contrario, durante la expansión, la burbuja golpea la superficie celular (Qin et al., 2018; Van Wamel et al., 2006). En sonoporación, el efecto de succión y empuje, resultante de la compresión y expansión de las microburbujas, se repite por la aplicación ondas armónicas con frecuencias que alcanzan los megahercios. Esta oscilación de las burbujas contribuye al aumento de la permeabilidad celular (Marmottant & Hilgenfeldt, 2003). En el caso de las ondas de choque las burbujas no oscilan de esta manera, ya que se aplican con frecuencias del orden de hercios. No obstante, tanto la expansión como la compresión de las burbujas tienen una mayor cantidad de energía. Otro punto importante para mencionar es que en sonoporación se encontraron poros similares en células eucariotas como los reportados con ondas de choque (López-Marín et al., 2017; Qiu et al., 2010). Marcas muy similares se observaron en las micrografías electrónicas de barrido en este trabajo en los conidios después de haber sido expuestos a ondas de choque.

Tanto los efectos directos como los indirectos de las ondas de choque producen esfuerzos mecánicos de tensión, compresión y cortantes sobre las células, afectándolas a diferentes niveles, sin que al momento se pueda identificar el fenómeno específico que está ocasionando los daños observados en la pared. Lo que sí es evidente en las micrografías electrónicas de barrido y de transmisión es un desprendimiento de la capa externa y la ornamentación de la pared celular, que resultó más notoria cuando se aplicaron ondas de choque en modo tándem. Igualmente, los conidios expuestos al modo tándem exhibieron mayor deformación de la pared celular. Los resultados obtenidos en este trabajo parecen corroborar que la cavitación acústica es uno de los factores más importantes para la permeabilización y remoción de la capa externa de la pared, en donde se encuentran las hidrofobinas.

Aplicando entre 125 y 250 ondas de choque a células embrionarias de riñón humano y mamarías con ondas de choque con una presión positiva de 18.2 MPa y una presión negativa de 2.7 MPa, se reportaron porcentajes de supervivencia mayores al 50%. Los valores decayeron hasta un 90% cuando se aumentó el número de ondas de choque a 1000 (López-Marín et al., 2017). Por el contrario, los resultados de viabilidad, hinchamiento y germinación de los conidios de *A. niger* obtenidos en este estudio indican que los tratamientos con ondas de choque aplicados dentro de un rango de 4 a 6 kV (42 – 82 MPa), con 50 a 200 ondas de choque en los modos monopulso y tándem, no afectan negativamente el desarrollo del hongo *A. niger* durante la fase inicial de su vida. La diferencia en los resultados se puede entender si se recuerda que los conidios están protegidos con una pared celular, una cubierta compleja compuesta de una matriz polimérica de glucanos y quitina, con un módulo de elasticidad de hasta 21.4 GPa y una dureza de hasta 0.17 GPa (Fang et al., 2012). Las micrografías electrónicas de barrido revelaron que los conidios sufren un alisamiento en su superficie. Esto se corrobora con las imágenes obtenidas con microscopía electrónica de transmisión, en las cuales se nota que parte de la capa externa, que contiene hidrofobinas y melanina, es desprendida durante los tratamientos con ondas de choque. Tanto en microscopía electrónica de barrido como de transmisión, también se observó una deformación de la pared, sin encontrar rotura de ella. Los resultados de este estudio muestran que con bajas energías los conidios pueden empezar la fase de crecimiento isotrópico antes, al ayudar a remover la capa externa sin producir suficiente daño para retrasar su crecimiento. Cuando los conidios fueron expuestos a ondas de choque generadas a 5 kV y 6 kV, sí presentaron un retraso en su desarrollo. Sin embargo, el efecto que tuvieron los tratamientos no fue suficiente para afectar su viabilidad, siendo estadísticamente semejante a la del grupo control. Lo anterior concuerda con lo reportado por Valsecchi et al. (2019), cuyas conclusiones fueron que eliminar artificialmente la melanina y las hidrofobinas de esta capa externa de la pared celular no afecta

la germinación, ya que de manera natural en la fase de hinchamiento se produce una desagregación de esta capa.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, para ciertas aplicaciones industriales (por ejemplo, la obtención de metabolitos secundarios o en la producción de antibióticos) podría ser recomendable utilizar presiones cercanas a 40 MPa con un número pequeño de ondas de choque. Esto con la intención de acelerar su crecimiento o estimular la producción de los productos de interés. Sin embargo, es necesario aportar más evidencia para entender mejor como influyen parámetros como la presión en los conidios. Por ejemplo, analizar si algún gen de interés podría estimularse con un número de ondas de choque específico. Si el objetivo del tratamiento es remover parte de la pared celular, la evidencia mostrada en esta tesis sugiere que es más conveniente utilizar el modo tándem. Un ejemplo es la transformación genética que, como ya se reportó, se ve beneficiada con el uso de ondas de choque en tándem (A. M. Loske et al., 2014). Las ondas de choque tándem también podrían ser atractivas cuando se desee obtener alguna biomolécula de la pared de los conidios, como la quitina.

Los resultados de ambas técnicas de microscopía electrónica que se presentan, muestran que los tratamientos en que se aplicaron ondas de choque con un retraso corto removieron mejor la pared de los conidios, que al aplicar un retraso largo. Esto sugiere que es mejor un retraso corto que un retraso largo en el modo tándem. Especialmente si lo que se busca es intensificar el efecto de los esfuerzos cortantes derivados de la cavitación sobre los conidios. Para hacer afirmaciones contundentes sería necesario obtener imágenes que muestren el proceso de una burbuja cavitando e interactuando con un conidio en tiempo real. Una herramienta que se ha usado para entender este fenómeno con mayor claridad, es la simulación numérica utilizando la ecuación de Gilmore-Akulichev (Canseco et al., 2011). En estos estudios los autores obtuvieron información sobre la dinámica de una burbuja esférica a partir de su radio inicial. Midiendo los radios máximos de las burbujas que aparecen en las imágenes de alta velocidad del estudio presentado aquí, pueden calcularse los radios antes de la llegada de la onda de choque. Con este dato se entendería qué burbujas refuerzan la cavitación con las ondas en modo tándem. Además, podrían obtenerse las dimensiones de los microjets generados por estas burbujas (T Kodama & Tomita, 2000) y con ello buscar evidencias de daños en las células que, según la teoría, pudieran deberse a esos microjets.

## 11. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio refuerzan la hipótesis de que la cavitación acústica es uno de los principales agentes que promueven la permeabilización celular de manera artificial utilizando ondas de choque. En este estudio se demuestra que las ondas de choque modifican la pared celular de los conidios de *Aspergillus niger*, pudiendo inducir cambios en la fase de germinación. Basados en los resultados obtenidos, este cambio a la pared podría ser asociado a los esfuerzos mecánicos derivados de la cavitación acústica, aunque de momento es imposible afirmar exactamente qué fenómeno físico produce una respuesta específica. Entender cómo influyen parámetros como la amplitud de la compresión y rarefacción, el tiempo de ascenso, la duración FWHM y la frecuencia de aplicación de las ondas de choque, así como el número de ondas aplicadas, puede contribuir a generar efectos biológicos específicos con un impacto directo en posibles aplicaciones, como la transformación genética o la producción de metabolitos. Es importante resaltar que el aumento en la presión y en la cavitación inducida por ondas de choque, dentro de los parámetros utilizados aquí, no disminuye la viabilidad celular significativamente.

Un siguiente paso para futuras investigaciones podría ser el estudio de cómo influye la presencia de los conidios en la nucleación. Debido al tamaño de los conidios, sería necesario un arreglo óptico que permita observar burbujas con diámetros de micrómetros. Con esta información sería posible estimar, mediante simulaciones computacionales, el comportamiento de estas burbujas al ser influenciadas por una onda de choque. Una ventaja que traería esto sería seleccionar un retraso adecuado para reforzar la cavitación de las burbujas procedentes de los núcleos de cavitación derivados de la presencia de los conidios y evaluar los efectos residuales sobre la pared celular. También, podría pensarse en realizar simulaciones, utilizando elemento finito o dinámica molecular, de la interacción de la pared celular y una burbuja cavitando, en donde se simule el microjet golpeando la pared celular o la succión y el empuje de ésta a causa de la cavitación. Con esto podría estimarse si son suficientes para provocar la aparición de poros o el desprendimiento parcial y/o total de la pared. Para realizar estas simulaciones, se requiere caracterizar las propiedades mecánicas de la pared celular. Hasta la fecha, únicamente se han obtenido el módulo de Young y la dureza mediante microscopía de fuerza atómica, sin que se conozcan otras características, como el módulo elástico transversal.

Este estudio es un acercamiento para identificar qué parámetros son más determinantes en la alteración de la pared celular del hongo *Aspergillus niger*, contribuyendo a optimizar futuras

aplicaciones biotecnológicas con ondas de choque (transformación celular, producción de metabolitos secundarios y estimulación en la producción de antibióticos, entre otras).

# BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, U. M., Loske, A. M., Castano-Tostado, E., & Prieto, F. E. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* by underwater shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4), 459-463. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.07.002>
- Armaleo, D., Ye, G.-N., Klein, T. M., Shark, K. B., Sanford, J. C., & Johnston, S. A. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*, 17(2), 97-103. doi:<https://doi.org/10.1007/BF00312852>
- Arora, M., Ohl, C.-D., & Mørch, K. A. (2004). Cavitation inception on microparticles: a self-propelled particle accelerator. *Physical Review Letters*, 92(17), 174501. doi:<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.92.174501>
- Arora, M., Ohl, C. D., & Lohse, D. (2007). Effect of nuclei concentration on cavitation cluster dynamics. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 121(6), 3432-3436. doi:<https://doi.org/10.1121/1.2722045>
- Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2020). Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1), e00049-00019. doi:<https://doi.org/10.1128/MMBR.00049-19>
- Ball, G., Howell, B., Leighton, T., & Schofield, M. (2000). Shock-induced collapse of a cylindrical air cavity in water: a free-Lagrange simulation. *Shock Waves*, 10(4), 265-276. doi:<https://doi.org/10.1007/s001930000060>
- Beauvais, A., Fontaine, T., Aïmanianda, V., & Latgé, J.-P. (2014). *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia*, 178(5-6), 371-377. doi:<https://doi.org/10.1007/s11046-014-9766-0>
- Beranek, L. L., & Martin, D. W. (1989). Acoustical measurements. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1625 1625-1626. doi:<https://doi.org/10.1121/1.398682>
- Canseco, G., de Icaza-Herrera, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2011). Modified shock waves for extracorporeal shock wave lithotripsy: A simulation based on the Gilmore formulation. *Ultrasonics*, 51(7), 803-810. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultras.2011.03.008>
- Cengel, Y. A., & John, M. (2006). *Mecánica de fluidos* (6 ed.): McGraw-Hill.
- Cleveland, R. O., & McAteer, J. A. (2012). The physics of shock wave lithotripsy. In D. Arthur, M. D. Smith, H. Gopal, M. D. Badlani, M. Glenn, M. D. Preminger, R. Louis, & M. D. Kavoussi (Eds.), *Smith's textbook on endourology* (Vol. 1, pp. 529-558). Washiton, Estados Unidos: Wiley Online Library.
- Cole, G. T. (1986). Models of cell differentiation in conidial fungi. *Microbiological Reviews*, 50(2), 95. doi:<https://doi.org/10.1128/mr.50.2.95-132.1986>
- Cuenot, S., Zykwincka, A., Radji, S., & Bouchara, J. P. (2017). Understanding the assembly mechanism of proteins from Monte Carlo simulations. *Applied Mathematics*, 8, 280-292. doi:<https://doi.org/10.4236/am.2017.83023>
- Chaussy, C. H., Brendel, W., & Schmiedt, E. (1980). Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *The Lancet*, 316(8207), 1265-1268. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)92335-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92335-1)
- Church, C. C. (1989). A theoretical study of cavitation generated by an extracorporeal shock wave lithotripter. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 86(1), 215-227. doi:<https://doi.org/10.1121/1.398328>
- De Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J., & Beijersbergen, A. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16(9), 839. doi:<https://doi.org/10.1038/nbt0998-839>

- de Icaza-Herrera, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2015). Combined short and long-delay tandem shock waves to improve shock wave lithotripsy according to the Gilmore–Akulichev theory. *Ultrasonics*, 58, 53-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultras.2014.12.002>
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., & Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2–lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*, 146(9), 2121-2132. doi:<https://doi.org/10.1099/00221287-146-9-2121>
- Dear, J., Field, J., & Walton, A. J. (1988). Gas compression and jet formation in cavities collapsed by a shock wave. *Nature*, 332(6164), 505. doi:<https://doi.org/10.1038/332505a0>
- DornierMedTech. (2019). Retrieved from <https://www.dornier.com>
- Fang, T.-H., Kang, S.-H., Hong, Z.-H., & Wu, C.-D. (2012). Elasticity and nanomechanical response of *Aspergillus niger* spores using atomic force microscopy. *Micron*, 43(2-3), 407-411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.10.011>
- Flores, J., & Holt, M. (1981). Glimm's method applied to underwater explosions. *Journal of Computational Physics*, 44(2), 377-387. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9991\(81\)90058-9](https://doi.org/10.1016/0021-9991(81)90058-9)
- Franc, J.-P. (2007). The Rayleigh-Plesset equation: a simple and powerful tool to understand various aspects of cavitation. In L. d'Agostino & M. V. Salvetti (Eds.), *Fluid Dynamics of Cavitation and Cavitating Turbopumps* (Vol. 496, pp. 1-41). Vienna: Springer.
- Gilmore, F. R. (1952). The growth or collapse of a spherical bubble in a viscous compressible liquid.
- Gómez-Lim, M. A., Ortíz, D. M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2015). Transformation of fungi using shock waves. In M. A. van den Berg & K. Maruthachalam (Eds.), *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1* (Vol. 1, pp. 209-219). Cham: Springer International Publishing.
- Gong, C. (1999). *Ultrasound induced cavitation and sonochemical effects*. (Ph.D.), Massachusetts Institute of Technology.
- Gow, N. A., Latge, J.-P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *The Fungal Kingdom*, 5(3), 267-292. doi:<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Gutiérrez-Prieto, Á., de Icaza-Herrera, M., Loske, A. M., & Castaño-Tostado, E. (2019). Kriging model to study the dynamics of a bubble subjected to tandem shock waves as used in biomedical applications. *Ultrasonics*, 91, 10-18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultras.2018.07.005>
- Haas, J.-F., & Sturtevant, B. (1987). Interaction of weak shock waves with cylindrical and spherical gas inhomogeneities. *Journal of Fluid Mechanics*, 181, 41-76. doi:<https://doi.org/10.1017/S0022112087002003>
- Hammer, D. S., Rupp, S., Kreutz, A., Pape, D., Kohn, D., & Seil, R. (2002). Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) in patients with chronic proximal plantar fasciitis. *Foot & Ankle International*, 23(4), 309-313. doi:<https://doi.org/10.1177%2F107110070202300403>
- Harvey, E. N., Barnes, D., McElroy, W. D., Whiteley, A. H., Pease, D., & Cooper, K. (1944). Bubble formation in animals. I. Physical factors. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 24(1), 1-22. doi:<https://doi.org/10.1002/jcp.1030240102>
- Harvey, E. N., McElroy, W. D., & Whiteley, A. H. (1947). On cavity formation in water. *Journal of Applied Physics*, 18(2), 162-172. doi:<https://doi.org/10.1063/1.1697598>
- Holl, J. W. (1970). Nuclei and cavitation. *Journal of Basic Engineering*, 92(4), 681-688. doi:<https://doi.org/10.1115/1.3425105>
- Hsu, C. J., Wang, D.-Y., Tseng, K.-F., Fong, Y. C., Hsu, H. C., & Jim, Y. F. (2008). Extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 17(1), 55-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jse.2007.03.023>
- IEC. (2014a). Piezoelectric effec. Retrieved from <http://www.electropedia.org/iev/iev.nsf/display?openform&ievref=121-12-86>

- IEC. (2014b). Rise time. Retrieved from <http://www.electropedia.org/iev/iev.nsf/display?openform&ievref=561-03-27>
- ISO. (2018). Mechanical vibration, shock and condition monitoring — Vocabulary (Vol. 2041, pp. 56).
- Jamaluddin, A., Ball, G., Turangan, C., & Leighton, T. (2011). The collapse of single bubbles and approximation of the far-field acoustic emissions for cavitation induced by shock wave lithotripsy. *Journal of Fluid Mechanics*, 677, 305-341. doi:<https://doi.org/10.1017/jfm.2011.85>
- Kapoor, A., & Viraraghavan, T. (1995). Fungal biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology*, 53(3), 195-206. doi:[https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00072-M](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00072-M)
- Kavanagh, K. (2017). *Fungi Biology and Applications* (K. Kavanagh Ed. Vol. 3). Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Kfoury, R., Marzban, B., Makki, E., Greenfield, M. L., & Yuan, H. (2019). Effect of pressure profile of shock waves on lipid membrane deformation. *PLOS ONE*, 14(2), e0212566. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212566>
- Kinsler, L. E., Frey, A. R., Coppens, A. B., & Sanders, J. V. (1999). *Fundamentals of acoustics* (4 ed.): Wiley-VCH.
- Kodama, T., Hamblin, M. R., & Doukas, A. G. (2000). Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse. *Biophysical Journal*, 79(4), 1821-1832. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76432-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76432-0)
- Kodama, T., & Tomita, Y. (2000). Cavitation bubble behavior and bubble–shock wave interaction near a gelatin surface as a study of in vivo bubble dynamics. *Applied Physics B*, 70(1), 139-149. doi:<https://doi.org/10.1007/s003400050022>
- Koshiyama, K., Kodama, T., Yano, T., & Fujikawa, S. (2006). Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 91(6), 2198-2205. doi:<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.077677>
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R. v., Van Veluw, G., Wang, F., Müller, W., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. (2008). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 60(1), 1-66.
- Kuhn, P. J., Trinci, A. P., Jung, M. J., Goosey, M. W., & Copping, L. G. (2012). *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi* (1 Ed.). Alemania: Springer Science & Business Media.
- Kuraya, E., Miyafuji, Y., Takemoto, A., & Itoh, S. (2014). The effect of underwater shock waves on steam distillation of *Alpinia zerumbet* leaves. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 39(4), 447-449. doi:<https://doi.org/10.14723/tmrsj.39.447>
- Landau, L. D., & Lifshitz, E. M. (1987). *Fluid Mechanics* (2 ed. Vol. 6 of Course of Theoretical Physics): Pergamon Press.
- Le Gac, S., Zwaan, E., van den Berg, A., & Ohl, C.-D. (2007). Sonoporation of suspension cells with a single cavitation bubble in a microfluidic confinement. *Lab on a Chip*, 7(12), 1666-1672. doi:<https://doi.org/10.1039/B712897P>
- Lei, H., Liu, J., Li, H., Wang, L., Xu, Y., Tian, W., . . . Xin, Z. (2013). Low-intensity shock wave therapy and its application to erectile dysfunction. *The World Journal of Men's Health*, 31(3), 208-214. doi:<https://doi.org/10.5534/wjmh.2013.31.3.208>
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 168. doi:<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>
- Li, W., Juan, T., Xia-Sheng, G., Di, X., & Dong, Z. (2014). Microstreaming velocity field and shear stress created by an oscillating encapsulated microbubble near a cell membrane. *Chinese Physics B*, 23(12), 124302. doi:<http://dx.doi.org/10.1088/1674-1056/23/12/124302>
- Lin, Y., Lin, L., Cheng, M., Jin, L., Du, L., Han, T., . . . Qin, P. (2017). Effect of acoustic parameters on the cavitation behavior of SonoVue microbubbles induced by pulsed ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 176-184. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.016>



- López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Castaño-González, K., Aceves, C., Fernández, F., Varela-Echavarría, A., & Loske, A. M. (2017). Shock wave-induced damage and poration in eukaryotic cell membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 250(1), 41-52. doi:<https://doi.org/10.1007/s00232-016-9921-2>
- Loske, A., Campos-Guillén, J., de Icaza-Herrera, M., Fernández, F., & Castaño-Tostado, E. (2012). Improved shock wave-assisted bacteria transformation. In K. Kontis (Ed.), *28th International Symposium on Shock Waves* (pp. 813-818). Alemania: Springer.
- Loske, A. M. (2017). *Medical and biomedical applications of shock waves*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Loske, A. M., Fernández, F., Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortíz-Vázquez, E., & Gómez-Lim, M. A. (2014). Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*. *Ultrasonics*, 54(6), 1656-1662. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultras.2014.03.003>
- Loske, A. M., Prieto, F. E., Fernández, F., & van Cauwelaert, J. (2002). Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy. *Physics in Medicine & Biology*, 47(22), 3945.
- Marmottant, P., & Hilgenfeldt, S. (2003). Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936), 153-156. doi:<https://doi.org/10.1038/nature01613>
- Martínez, R. A. R., & Hernández, G. A. G. (2012). Implementación de la agrotransformación en cepas nativas mexicanas del entomopatógeno *metarhizium anisopliae*. *Veranos UG de Investigación Científica*.
- Mataix, C. (1982). *Mecánica de fluidos y máquinas hidráulicas* (5 ed.). Reino Unido: Oxford University Press.
- Mestas, J., Chettab, K., Roux, S., Prieur, F., Lafond, M., Dumontet, C., & Lafon, C. (2015). *Development of a confocal ultrasound device using an inertial cavitation control for transfection in-vitro*. Paper presented at the Journal of Physics: Conference Series.
- Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns, T. C., . . . Hertz-Fowler, C. (2016). Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3(1), 1-17.
- Meyer, V., Wu, B., & Ram, A. F. J. (2011). *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters*, 33(3), 469-476. doi:<https://doi.org/10.1007/s10529-010-0473-8>
- Millán-Chiu, B., Camacho, G., Varela-Echavarría, A., Tamariz, E., Fernández, F., López-Marín, L. M., & Loske, A. M. (2014). Shock waves and DNA-cationic lipid assemblies: a synergistic approach to express exogenous genes in human cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 40(7), 1599-1608. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2014.01.012>
- Miller, D. L., Pislaru, S. V., & Greenleaf, J. F. (2002). Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 27(1-6), 115-134. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1022983907223>
- Miller, D. L., & Song, J. (2002). Lithotripter shock waves with cavitation nucleation agents produce tumor growth reduction and gene transfer in vivo. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 28(10), 1343-1348. doi:[https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(02\)00572-0](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(02)00572-0)
- Murray, C., Visintini, L., Bidoglio, G., & Henry, B. (1996). Permanent storage of carbon dioxide in the marine environment: the solid CO<sub>2</sub> penetrator. *Energy Conversion and Management*, 37(6-8), 1067-1072. doi:[https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00299-5](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00299-5)
- Nanda, V., & Simha, R. (1964). Theoretical interpretation of Tait equation parameters. *The Journal of Chemical Physics*, 41(6), 1884-1885. doi:<https://doi.org/10.1063/1.1726176>

- Nejad, S. M., Hosseini, H., Akiyama, H., & Tachibana, K. (2016). Reparable cell sonoporation in suspension: theranostic potential of microbubble. *Theranostics*, 6(4), 446-455. doi:<https://doi.org/10.7150/thno.13518>
- Neppiras, E. A. (1980). Acoustic cavitation. *Physics Reports*, 61(3), 159-251. doi:[https://doi.org/10.1016/0370-1573\(80\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0370-1573(80)90115-5)
- Ohl, C.-D., & Ohl, S.-W. (2013). Shock wave interaction with single bubbles and bubble clouds. In C. Delale (Ed.), *Bubble Dynamics and Shock Waves* (pp. 3-31). Alemania: Springer.
- Ohl, C., & Ikink, R. (2003). Shock-wave-induced jetting of micron-size bubbles. *Physical Review Letters*, 90(21), 214502. doi:<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.90.214502>
- Osherov, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, 199(2), 153-160. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x>
- Passos, D. d. F., Pereira, N., & Castro, A. M. d. (2018). A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 60-66. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003>
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., & Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61(2), 155-164. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90110-7)
- Philipp, A., Delius, M., Scheffczyk, C., Vogel, A., & Lauterborn, W. (1993). Interaction of lithotripter-generated shock waves with air bubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 93(5), 2496-2509. doi:<https://doi.org/10.1121/1.406853>
- Qin, P., Han, T., Alfred, C., & Xu, L. (2018). Mechanistic understanding the bioeffects of ultrasound-driven microbubbles to enhance macromolecule delivery. *Journal of Controlled Release*, 272, 169-181. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.001>
- Qiu, Y., Luo, Y., Zhang, Y., Cui, W., Zhang, D., Wu, J., . . . Tu, J. (2010). The correlation between acoustic cavitation and sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection with polyethylenimine (PEI) in vitro. *Journal of Controlled Release*, 145(1), 40-48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.010>
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. (2008). Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. *Bioresource Technology*, 99(11), 4559-4565. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.055>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Schaden, W., Mittermayr, R., Haffner, N., Smolen, D., Gerdesmeyer, L., & Wang, C.-J. (2015). Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) – First choice treatment of fracture non-unions? *International Journal of Surgery*, 24, 179-183. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2015.10.003>
- Shames, I. H. (1995). *Mecánica de Fluidos* (3 ed.): Mc Graw Hill.
- Silva, C. (2017). Extracorporeal shockwave: mechanisms of action and physiological aspects for cellulite, body shaping and localized fat–systematic review. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 19. doi:<https://doi.org/10.1080/14764172.2017.1334928>
- Socol, C. R., Vandenbergh, L. P., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
- Son, Y.-E., & Park, H.-S. (2021). Genetic manipulation and transformation methods for *Aspergillus* spp. *Mycobiology*, 49(2), 95-104. doi:<https://doi.org/10.3390/biology11101396>
- Starr, C., Evers, C. A., & Starr, L. (2013). *Biología: conceptos y aplicaciones*: Cengage Learning.
- Sun, B., Xin, Y., Zhu, X., Gao, Z., Yan, Z., & Ohshima, T. (2018). Effects of shock waves, ultraviolet light, and electric fields from pulsed discharges in water on inactivation of *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*, 120, 112-119. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.11.011>

- Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. E., & Mackay, J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron*, 39(7), 773-784. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.08.003>
- Tomita, Y., & Shima, A. (1986). Mechanisms of impulsive pressure generation and damage pit formation by bubble collapse. *Journal of Fluid Mechanics*, 169, 535-564. doi:<https://doi.org/10.1017/S0022112086000745>
- Turangan, C., Jamaluddin, A., Ball, G., & Leighton, T. (2008). Free-Lagrange simulations of the expansion and jetting collapse of air bubbles in water. *Journal of Fluid Mechanics*, 598, 1-25. doi:<https://doi.org/10.1017/S0022112007009317>
- van Leeuwen, M. R., Krijgheld, P., Wyatt, T. T., Golovina, E. A., Menke, H., Dekker, A., . . . Dijksterhuis, J. (2013). The effect of natamycin on the transcriptome of conidia of *Aspergillus niger*. *Studies in Mycology*, 74, 71-85. doi:<https://doi.org/10.3114/sim0013>
- Van Wamel, A., Kooiman, K., Hartevelde, M., Emmer, M., Folkert, J., Versluis, M., & De Jong, N. (2006). Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation. *Journal of Controlled Release*, 112(2), 149-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.02.007>
- Vedadi, M., Choubey, A., Nomura, K.-i., Kalia, R., Nakano, A., Vashishta, P., & Van Duin, A. (2010). Structure and dynamics of shock-induced nanobubble collapse in water. *Physical Review Letters*, 105(1), 014503. doi:<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.014503>
- Vokurka, K. (1986). Comparison of Rayleigh's, Herring's, and Gilmore's models of gas bubbles. *Acta Acustica united with Acustica*, 59(3), 214-219.
- Ward, O. P. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1119-1139. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>
- Weaver, J. C., & Chizmadzhev, Y. A. (1996). Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(2), 135-160. doi:[https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05062-3](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05062-3)
- Wess, O. (2004). Physikalische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie. *Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskeletale Erkrankungen*, 11(4), 7-18.
- Yang, Y., Li, Q., Guo, X., Tu, J., & Zhang, D. (2020). Mechanisms underlying sonoporation: Interaction between microbubbles and cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105096. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105096>
- Zhao, L., Schaefer, D., & Marten, M. R. (2005). Assessment of elasticity and topography of *Aspergillus nidulans* spores via atomic force microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 955-960. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.955-960.2005>
- Zhao, L., Schaefer, D., Xu, H., Modi, S. J., LaCourse, W. R., & Marten, M. R. (2005). Elastic properties of the cell wall of *Aspergillus nidulans* studied with atomic force microscopy. *Biotechnology Progress*, 21(1), 292-299. doi:<https://doi.org/10.1021/bp0497233>