

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

“Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas”

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO**

**APLICACIÓN DE LOS COLORANTES *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) Y
Dactylopius coccus (COCHINILLA) EN LA TINCIÓN DE PARED CELULAR
PRESENTE EN UN FROTIS BACTERIANO**

TESISTAS

BACH. KETTY ROJAS BERASTEIN

BACH. EDITA PÉREZ TORRES

ASESOR

Dr. Q.F. HÉCTOR VILCHEZ CÁCEDA

LIMA – PERÚ

2018

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice	
Índice de Anexos	
Índice de Figuras	
Índice de Tablas	
Resumen	
Abstract	
Introducción.....	01
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	02
1.1. Descripción de la Realidad Problemática.....	02
1.2. Identificación y Formulación del Problema.....	03
1.2.1. Problema General.....	03
1.2.2. Problemas Específicos.....	03
1.3. Objetivos de la Investigación.....	03
1.3.1. Objetivo General.....	03
1.3.2. Objetivos Específicos.....	03
1.4. Justificación y Viabilidad de la Investigación.....	04
1.5. Delimitación de la Investigación.....	04
1.6. Limitaciones de la Investigación.....	04
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	05
2.1. Antecedentes de la Investigación.....	05
2.1.1. Nacionales.....	05
2.1.2. Internacionales.....	12
2.2. Bases Teóricas.....	17

2.2.1. Aspectos Botánicos de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	17
2.2.1.1. Historia.....	17
2.2.1.2. Etnobotánica.....	18
2.2.1.3. Sinonimia.....	19
2.2.1.4. Taxonomía.....	20
2.2.1.5. Distribución Geográfica.....	21
2.2.1.6. Descripción de la Planta.....	21
2.2.1.7. Variedades Nativas.....	24
2.2.1.8. Composición Química.....	24
2.2.2. Aspectos Entomológicos de <i>Dactylopius coccus</i>	25
2.2.2.1. Historia.....	25
2.2.2.2. Etnoentomología.....	26
2.2.2.3. Sinonimia.....	28
2.2.2.4. Taxonomía.....	28
2.2.2.5. Distribución Geográfica.....	29
2.2.2.6. Descripción del Insecto.....	29
2.2.2.7. Tipos.....	32
2.2.2.8. Composición Química.....	33
2.2.3. Colorantes.....	33
2.2.3.1. Color.....	33
2.2.3.2. Radicales Existentes en los Colorantes.....	34
2.2.3.3. Clasificación.....	38
2.2.3.4. Colorantes Naturales.....	39
2.2.3.5. Mecanismos Generales de la Coloración.....	42
2.2.3.6. Metabolitos Secundarios.....	43
2.2.3.7. Registro de Campo (Ubicación Geográfica).....	44
2.2.3.8. Tamizaje Fitoquímico.....	45
2.2.4. Morfología y Estructura Bacteriana.....	46
2.2.4.1. Morfología.....	46
2.2.4.2. Estructura Bacteriana.....	48
a.- Estructura Interna.....	48
b.- Estructura Externa.....	52

2.2.5. Tinciones Bacterianas.....	56
2.2.5.1. Tinción In Vivo e In Vitro.....	56
2.2.5.2. Método de Tinción In Vitro.....	57
2.2.5.3. Tinción Directa e Indirecta.....	58
2.2.5.4. Tipo de Tinciones.....	59
2.2.6. Tinción Gram.....	61
2.2.6.1. Procedimiento.....	61
2.2.6.2. Reactivos.....	62
2.2.6.3. Utilidad.....	62
2.2.6.4. Gram Positivos y Gram Negativos.....	63
2.2.6.5. Fundamento de la Diferenciación.....	64
2.2.6.6. Factores que Alteran la Tinción.....	66
2.3. Formulación de Hipótesis.....	66
2.3.1. Hipótesis General.....	66
2.3.2. Hipótesis Específicas.....	66
2.4. Operacionalización de Variables e Indicadores.....	67
2.5. Definición de Términos Básicos.....	67
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	69
3.1. Tipo y Nivel de Investigación.....	69
3.2. Diseño de la Investigación.....	69
3.2.1. Material Biológico.....	69
3.2.2. Materiales e Instrumentos de Laboratorio.....	69
3.2.3. Reactivos Químicos.....	70
3.2.4. Estudio Fitoquímico.....	71
3.2.5. Estudio Microscópico.....	72
3.3. Población y Muestra de la Investigación.....	73
3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	74
3.4.1. Descripción de los Instrumentos.....	74
3.4.2. Validación de Instrumentos.....	74
3.5. Técnicas Para el Procesamiento de Datos.....	74

3.6. Procedimiento Experimental.....	75
3.6.1. Identificación de las Muestras en Estudio.....	75
3.6.2. Obtención de los Colorantes.....	75
3.6.3. Solubilidad y Análisis de Compuestos Químicos (Metabolitos).....	76
3.6.4. Reactivación de las Bacterias.....	77
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	78
4.1 Presentación de Resultados.....	78
4.2 Contratación de Hipótesis.....	84
4.3 Discusión de Resultados.....	86
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	89
5.1 Conclusiones.....	89
5.2 Recomendaciones.....	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	101
Anexo N° 01: Matriz de Consistencia.....	102
Anexo N° 02: Testimonio Fotográfico.....	103
Anexo N° 03: Taxonomía.....	110
Anexo N° 04: Certificado Cepas ATCC.....	112
Anexo N° 05: Cepas Bacterianas de Pacientes.....	114
Anexo N° 06: Validación del Instrumento.....	115
Anexo N° 07: Método de coloración de Gram.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Planta <i>Tropaeolum tuberosum</i>	23
Figura N° 02: Tallo y Hojas.....	23
Figura N° 03: Flor de Mashua.....	23
Figura N° 04: Tubérculo de Mashua.....	23
Figura N° 05: Tubérculo de Mashua Negra.....	23
Figura N° 06: Ciclo del <i>Dactylopius coccus</i>	32
Figura N° 07: <i>Dactylopius coccus</i> en Nopal (Opuntia).....	32
Figura N° 08: Fenol y Anilina.....	37
Figura N° 09: Auxócromo – Cromóforo – Salificable.....	37
Figura N° 10: Visualización de la Morfología Celular Bacteriana.....	85
Figura N° 11: Diferenciación de Pared Celular entre Gram Positivos y Gram Negativos.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Sinonimia Mashua.....	19
Tabla N° 02: Familia Tropaeolaceae.....	20
Tabla N° 03: Variedad de la Mashua Nativa.....	24
Tabla N° 04: Composición Química de la Mashua.....	25
Tabla N° 05: Cromóforos Típicos Presentes en los Colorantes.....	35
Tabla N° 06: Auxócromos Presentes en los Colorantes.....	36
Tabla N° 07: Clasificación de Colorantes Naturales.....	39
Tabla N° 08: Operacionalización de Variables.....	67
Tabla N° 09: Resumen de Resultados Juicio de Expertos.....	75
Tabla N° 10: Determinación de Metabolitos.....	76-77
Tabla N° 11: Prueba de Solubilidad.....	78
Tabla N° 12: Identificación de Metabolitos.....	78-79
Tabla N° 13: Número de Láminas Obtenidas Según Tipo de Cepa y Tinción.....	80
Tabla N° 14: Evaluación de las Láminas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	81
Tabla N° 15: Evaluación de las Láminas <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	81
Tabla N° 16: Número de Láminas Obtenidas Según Tipo de Cepa de Paciente y Tinción.....	82
Tabla N° 17: Evaluación de las Láminas <i>Staphylococcus aureus</i>	83
Tabla N° 18: Evaluación de las Láminas <i>Escherichia coli</i>	83

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena. El Tubérculo Mashua, fue procedente de las alturas del Distrito de Yanacancha, en la Provincia de Chupaca, Región Junín. El insecto Cochinilla, se recolectó en el Distrito de San Bartolomé, Provincia de Huarochirí en el Departamento de Lima. Mediante extracción en Thomas TH-2660i / TH-2660iR, se obtuvo el colorante Mashua 100% y el colorante Cochinilla 20% se obtuvo por extracción acuosa en calor. Ambas muestras presentaron mayor solubilidad en agua y se encontraron metabolitos como flavanoles, aminoácidos libres y grupos amino en la Mashua y triterpenoides, esteroides y ácido carmínico en la Cochinilla.

Se realizaron 64 láminas, 32 con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y 32 con *Escherichia coli* ATCC 8739; de las cuales se tiñeron 16 con Mashua 100%, 16 con Cochinilla 20%, 16 con Mashua 100% - Cochinilla 20% y 16 con Gram que fue tomada como tinción patrón o *gold standard*. Adicionalmente se prepararon 60 láminas con cepas del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac, 30 con 05 cepas de *Staphylococcus aureus* y 30 con 05 cepas de *Escherichia coli*; de las cuales se tiñeron 30 con Mashua 100% - Cochinilla 20% y 30 con Gram.

En la evaluación microscópica con Mashua 100% - Cochinilla 20% se consideraron dos criterios de evaluación: Visualización de la morfología celular bacteriana y Diferenciación de pared celular; para ambas cepas ATCC se obtuvo un calificativo de 62.5% (Malo), 34.4% (Regular) y 3.1% (Bueno); para las cepas de pacientes un 73.3% (Malo) y 26.7% (Regular) con relación a la morfología celular y un 66.7% (Malo) y 33.3% (Regular) con relación a la diferenciación de pared celular.

Se concluyó que la aplicación de los colorantes Mashua y Cochinilla en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano no es buena.

Palabras Claves: Colorante, Mashua, Cochinilla, Tinción Pared Celular, Gram.

ABSTRACT

The aim of the present work was to determine if the application of the colorants *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) and *Dactylopius coccus* (Cochineal) in the cell wall stain present in a bacterial smear is good. The Mashua Tuber was from the heights of the Yanacancha District, in the Province of Chupaca, Junín Region. The insect Cochineal, was collected in the District of San Bartolomé, Province of Huarochirí in the Department of Lima. By extraction in Thomas TH-2660i / TH-2660iR, the 100% Mashua dye was obtained and the 20% cochineal dye was obtained by aqueous extraction in heat. Both samples showed greater solubility in water and metabolites were found as flavanonols, free amino acids and amino groups in Mashua and triterpenoids, steroids and carminic acid in Cochineal.

64 sheets were made, 32 with *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and 32 with *Escherichia coli* ATCC 8739; of which 16 were stained with Mashua 100%, 16 with Cochineal 20%, 16 with Mashua 100% - Cochineal 20% and 16 with Gram that was taken as standard stain or gold standard. Additionally, 60 sheets were prepared with strains from the Biological Laboratory and Clinical Analysis of Santa Rosa de Pachacamac, 30 with 05 strains of *Staphylococcus aureus* and 30 with 05 strains of *Escherichia coli*; of which 30 were stained with Mashua 100% - Cochineal 20% and 30 with Gram.

In the microscopic evaluation with Mashua 100% - Cochineal 20%, two evaluation criteria were considered: Visualization of bacterial cell morphology and Cell wall differentiation; for both ATCC strains a qualification of 62.5% (Bad), 34.4% (Regular) and 3.1% (Good) was obtained; for patient strains 73.3% (Poor) and 26.7% (Regular) in relation to cell morphology and 66.7% (Poor) and 33.3% (Regular) in relation to cell wall differentiation.

It was concluded that the application of Mashua and Cochineal dyes in cell wall staining present in a bacterial smear is not good.

Key Words: Coloring, Mashua, Cochineal, Cell Wall Stain, Gram.

INTRODUCCION

El uso de los colorantes sintéticos en los Laboratorios de Microbiología, para la visualización de la morfología celular bacteriana y diferenciación de pared celular, es una prueba simple y de bajo costo. Sin embargo, el uso de estos colorantes implican un riesgo en la salud del analista, así como para el medio ambiente. En la actualidad, se busca disminuir el impacto en la salud de los analistas y en el medio ambiente, reduciendo el uso de colorantes sintéticos y fomentando la utilización de colorantes naturales provenientes de plantas, raíces, animales, entre otros, que puedan brindar similares resultados. ^(74, 82, 98)

El *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), es un tubérculo de color negro a morado que al tener contacto con la piel o cualquier tejido o superficie brinda una coloración azul – morada duradera; asimismo el *Dactylopius coccus* (Cochinilla) es un insecto a partir del cual se extrae el ácido carmínico que presenta un color rojo – rojizo. ^(10, 49)

En este contexto el estudio a través de determinar si la aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena, tiene el propósito de contribuir a su conocimiento científico y servir de opción para la visualización de la morfología celular bacteriana y diferenciación de pared celular.

La estructura del trabajo está dividida en cinco capítulos, que describen el desarrollo del proyecto realizado.

En el Capítulo I: Se presenta planteamiento de la investigación, en el problema se describen claramente los objetivos a conseguir, la justificación y limitaciones.

En el Capítulo II: Representa los antecedentes y las bases teóricas.

En el Capítulo III: Inicia el trabajo de diseño, población, muestra y técnicas.

En el Capítulo IV: Se ofrece el análisis y discusión de los resultados.

Finalmente, en el Capítulo V: Se presenta las conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la Realidad Problemática.

La Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) es un tubérculo que se encuentra distribuido entre 2.800 y 4.000 msnm en las regiones andinas, tales como Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú^(1,2), donde se la puede hallar tanto en forma silvestre como cultivada, según su coloración se pueden clasificar en: Tubérculos de color uniforme generalmente blanco, amarillo o anaranjado; tubérculos con pigmentos de antocianina ubicados sólo en las yemas; tubérculos muy coloreados en las yemas con antocianinas; tubérculos con yemas pigmentadas y con franjas longitudinales rojas o moradas^(4,5). Asimismo, el *Tropaeolum tuberosum* es de color negro a morado teniendo capacidad tintoreal que al tener contacto con la piel o cualquier tejido o superficie brinda una coloración azul – morada duradera ^(7,10, 29)

La cochinilla (*Dactylopius coccus*) es un pequeño insecto parásito que vive en las pencas de los nopales, a partir del cual se produce uno de los colorantes naturales de gran importancia en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia en el mundo ^(36,37): El ácido carmínico o rojo carmín. La cochinilla es empleada tradicionalmente en el Perú desde las civilizaciones preincaicas en estado acuoso utilizando alumbre como mordiente, para teñir pelos de alpaca y algodón ^(49,50). El ácido carmínico se usa en unciones histológicas y bacteriológicas, como indicador químico de reacciones, asimismo tiene usos en fotografía a color y pigmentos para artistas ^(50,51).

Los colorantes extraídos de la Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) al tener semejanza con el cristal violeta en cuanto al color azul – morado y la cochinilla (*Dactylopius coccus*) al tener similitud con la Safranina en cuanto al color rojo – rojizo, surge la idea de utilizarlos en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano, además de ser ambos colorantes naturales y el riesgo de exposición, así como el daño causado a quien lo manipula es mínimo ^(74, 76).

1.2. Identificación y Formulación del Problema.

1.2.1. Problema General.

1. ¿En qué medida la Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena?

1.2.2. Problemas Específicos.

1. ¿Cuál será la composición química del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla)?
2. ¿En qué medida la aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano?
3. ¿En qué medida la aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano?

1.3. Objetivos de la Investigación.

1.3.1. Objetivo General.

1. Determinar si la Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena.

1.3.2. Objetivos Específicos.

1. Determinar la composición química del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla).
2. Evaluar si la aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano.

3. Evaluar si la aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano.

1.4. Justificación y Viabilidad de la Investigación.

La coloración de Gram es en la actualidad, la prueba de laboratorio de microbiología más simple y con el mejor costo efectividad, lo que representa un beneficio para el paciente, el clínico y el laboratorio. Se hace uso de colorantes sintéticos, alcohol, acetona y lugol. Sin embargo, el uso de estos colorantes implican un riesgo en la salud del analista, así como para el medio ambiente ⁽⁷⁴⁾. Por ello, se deben buscar formas de reducirlos utilizando productos naturales que puedan brindar similares resultados ^(82, 85). Existe un tubérculo como alternativa para colorear células procariotas sin causar daños al analista y al medio ambiente es conocida como *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), que posee propiedades tintóreas básicas semejante al cristal violeta, del mismo modo el *Dactylopius coccus* (Cochinilla) es un pequeño insecto parásito que vive en las pencas de los nopales, a partir del cual se extrae el ácido carmínico, que posee propiedades tintóreas semejantes a la safranina. En el presente estudio, se busca determinar si la Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena.

1.5. Delimitación de la Investigación.

Ámbito Geográfico: El presente estudio se realizará en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega en los Laboratorios de Especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica.

Ámbito Temporal: El estudio corresponde al Año Académico 2017 - 2018.

1.6. Limitaciones de la Investigación.

- a) El presupuesto se limita solo a estudiar al *Staphylococcus aureus* y a la *Escherichia coli*, por el elevado costo de los materiales.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación.

2.1.1. Nacionales.

Eraza E. et.al. (2004), presentaron el estudio titulado "Extracción de Ácido Camínico a Partir de Cochinilla Utilizando Tecnología más Limpia". El objetivo de este trabajo fue desarrollar un procedimiento de extracción de ácido camínico con una concentración no menor del 90%, utilizando un agente de separación de masa (MSA) no contaminante y enmarcada en los principios de producción más limpia.

El procedimiento experimental desarrollado en la extracción del ácido camínico es diferente del convencional en dos etapas: el primero, referente a la precipitación del ácido camínico formando un complejo con el (MSA R300), y el segundo, la recuperación del producto utilizando un solvente orgánico de características no contaminante ni perjudicial para la salud pública.

La extracción del ácido camínico a partir de la cochinilla usando el Agente de separación de masa (MSA R300) y el solvente orgánico permite desarrollar un proceso tecnológico más limpio de alto rendimiento mayor de 90% y obtener un producto de alta pureza 100%.⁽²⁸⁾

Cuya R. (2009), presentó el estudio titulado "Efecto de Secado en Bandeja y Atomización sobre la Actividad Antioxidante de la Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón)". El objetivo fue evaluar la pérdida de actividad antioxidante hidrofílica de la mashua, después del secado por aire caliente; en tipo bandeja a diferentes temperaturas de secado y por atomización a diferentes niveles de encapsulante, temperatura y velocidad del atomizador.

El método de secado por atomización resultó con mayor retención de la actividad antioxidante hidrofílica en contraste con el método de secado en bandeja que dio la menor retención.⁽¹⁷⁾

Pacheco E. (2015), presentaron el estudio titulado “Caracterización Morfológica y Molecular de Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) de los Departamentos de Cusco y Cajamarca”. El objetivo fue contribuir en la generación de conocimientos sobre la variabilidad genética de mashua de los departamentos de Cusco y Cajamarca.

La caracterización morfológica se realizó en 271 accesiones de mashua, mediante 45 descriptores previamente establecidos. La identificación de descriptores más discriminantes e informativos se realizó mediante el análisis de correspondencia múltiple secuencial (ACMs) y los análisis de agrupamiento e identificación de los morfotipos se realizaron con la nueva lista de descriptores. En la caracterización molecular se emplearon seis combinaciones de iniciadores AFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) y a partir de los polimorfismos encontrados se realizaron agrupamientos mediante el coeficiente de concordancia simple y análisis de coordenadas principales. Estos resultados muestran la gran variabilidad existente en el cultivo, la que ayudará en el planteamiento de futuras estrategias de manejo y mejora del cultivo de mashua en el Perú.⁽¹⁶⁾

Inostroza L. et.al. (2015), presentaron el estudio titulado “Actividad Antioxidante de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (Mashua) y su Aplicación como Colorante para Yogur. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y uso del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) como colorante para yogur.

La actividad antioxidante se determinó por los métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (Ácido 2, 2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).

El contenido total de antocianinas (AT) y polifenoles (PT) fue determinado por el método de pH diferencial y Folin-Ciocalteu, respectivamente. Los parámetros del sistema CIEL (Centro Internacional de la Iluminación) se utilizaron para medir el color morado y la concentración de pigmento empleado para colorear el yogur natural, comparándose con yogur comercial de mora, que fue tomado como referencia.

Se concluye que los pigmentos extraídos del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón, poseen actividad antioxidante, presentándose como una alternativa de colorante aplicable en alimentos de acidez intermedia como el yogur. ⁽²⁹⁾.

Masias K. (2007), presentaron el estudio titulado "Caracterización de las propiedades tintóreas del extracto de Nogal (*Juglans neotropica* Diels) proveniente de la cuenca alta del río Zaña". El objetivo del trabajo fue

Determinar las propiedades tintóreas (porcentaje sólidos, índice refracción, pH y absorción luz ultravioleta) de extractos obtenidos de hoja, fruto y corteza de tres clases diamétricas, asimismo evaluó la calidad de tinción y los colores obtenidos en función al tipo de tela teñida.

Los resultados del análisis estadístico demostraron que el porcentaje de sólidos y el pH varían en función a la parte del árbol utilizada sin embargo no varían en función a la clase diamétrica; y el índice de refracción es utilizado como control del proceso. La absorción de luz varía en función a la clase diamétrica y la parte del árbol. Se concluyó que es preferible utilizar las hojas de nogal para la obtención de colorante y la lana de oveja para la tinción. ⁽⁶⁵⁾.

Uriol P. (2004), presentó el estudio titulado "Aplicación del Colorante del Maíz Morado en la tinción Nuclear de Células presentes en un corte histológico". El objetivo fue determinar si el maíz morado posee propiedades tintóreas básicas semejantes a la hematoxilina.

Se realizó un estudio de tipo comparativo y experimental con biopsias y piezas quirúrgicas del Hospital "Dos de Mayo" y "María Auxiliadora"; las muestras lo constituyeron 100 tejidos de los siguientes órganos: apéndice, estómago, ganglio, piel y próstata. Se procedió a la coloración de los dos grupos de láminas, en el primer grupo, los cortes histológicos se procesaron con la coloración de Hematoxilina-Eosina. El segundo grupo de láminas de cortes histológicos se procesó con la tinción de MAIZ morado-eosina. El método de coloración de hematoxilina-eosina fue tomado como prueba patrón o "Gold Estándar".

La ventaja de este proceso de coloración radica principalmente en considerar una alternativa más para los procesos de tinción nuclear, como también el significativo precio del insumo principal aplicado en el presente estudio, y su fácil obtención y disponibilidad. ⁽⁸⁸⁾.

Santa Cruz O. (2014), presentó el estudio titulado "Validación del extracto del exocarpo de *Renalmia alpinia* (Kumpia) como colorante nuclear tisular". El objetivo del trabajo fue validar el extracto del exocarpo de *Renalmia alpinia* (kumpia) como colorante nuclear tisular.

Se realizó un estudio de tipo experimental con piezas quirúrgicas del Hospital Alberto Sabogal Sologuren. Se obtuvieron 102 láminas (34 para cada tejido), de las que 51 se colorearon con kumpia-eosina y 51 hematoxilina- eosina, que fue tomada como prueba patrón o Gold standard. En la evaluación microscópica se obtuvo el calificativo de 88,24 % (bueno) y 11,76 % (regular). Tinción nuclear para kumpia. Se obtuvo 94,12 % (bueno) y 5,88 % (regular); y 100 % (bueno) para hematoxilina. Diferenciación núcleo-citoplasma. Se obtuvo para ambas tinciones 100 % (bueno).

Se concluye que este colorante resulta ser bueno y eficaz. Una alternativa en la tinción nuclear tisular fácil de conseguir. En cuanto al precio del insumo, es muy cómodo. ⁽⁸⁹⁾.

Chan J. (2015), presentó el estudio titulado "Eficacia Antioxidante de los Compuestos Fenólicos de la Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) en la Estabilidad del aceite de linaza (*Linum usitatissimum L.*)". El objetivo del trabajo fue evaluar la eficacia antioxidante de un extracto de compuestos fenólicos de la mashua en la estabilidad del aceite de linaza.

La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó por el método ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico).

Se concluyó que la concentración de compuestos fenólicos de la fase acetato de etilo del extracto de mashua fue de 195.1 mg AGE/100 g mashua o 5.6 mg GAE/ml; su capacidad antioxidante por el método ABTS fue de 62.0 $\mu\text{mol TE/ml}$.⁽¹⁰⁾

Flores C. (2015), presentó el estudio titulado "Evaluación de la Aceptabilidad Organoléptica y Capacidad Antioxidante de una Bebida Alcohólica no Fermentada, Formulado con Extracto Fenólico de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) Púrpura". El objetivo fue determinar el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extracto fresco y seco de mashua púrpura.

El contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante, se evaluó mediante los métodos Folin-Ciocalteu, pH diferencial y 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), respectivamente. La formulación de la bebida con extracto de mashua fresca resultó con un contenido de compuestos fenólicos entre 14,48 y 23,78 mg AGE/100 g muestra; de antocianinas monoméricas entre 3,37 y 9,08 mg cianidina-3-glucósido/100 g muestra y de capacidad antioxidante entre 8,51 y 24,50 $\mu\text{mol ET /g}$ muestra. Las formulaciones con extracto fenólico de mashua púrpura seca presentó un contenido de compuestos fenólicos entre 17,46 y 23,09 mg AGE/100 g muestra; antocianinas monoméricas entre 5,82 y 11,79 mg cianidina-3-glucósido/100 g muestra y capacidad antioxidante entre 14,30 y 26,02 $\mu\text{mol ET /g}$ muestra.

El contenido de compuestos fenólicos de la mashua púrpura fresca y seca fueron 4 527,11 y 1 743,72 mg AGE/100 g muestra, respectivamente. De antocianinas monoméricas 886,35 y 654,73 mg cianidina-3-glucósido/100 g muestra, respectivamente, y la capacidad antioxidante de 1 631,59 y 1 421,92 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra, respectivamente. ⁽²⁴⁾.

Manosalva D. (2017), presentó el estudio titulado "Uso del Colorante Natural Ácido Carmínico al 10% obtenido de *Dactylopius coccus* (Cochinilla), en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de Coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de riñón de ovinos, Cajamarca". El objetivo fue determinar la afinidad del colorante natural Ácido Carmínico al 10% obtenido del *Dactylopius coccus* (cochinilla), en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de riñón de ovinos, Cajamarca.

Las muestras para los estudios histológicos fueron tomadas de riñones de ovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca. La técnica de inclusión en parafina se realizó en el Laboratorio de Embriología e Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca. La coloración y el montaje de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Histología SENASA-Lima

El ácido Carmínico al 10%, empleado en reemplazo de la hematoxilina, en la técnica de coloración Hematoxilina-Eosina, brinda buena afinidad de los tejidos del riñón de ovino comprobándose una nitidez considerable, lo que permite la identificación de las estructuras parenquimatosas, tejido estromal y vasos sanguíneos. ⁽⁸⁰⁾.

Velásquez C. (2015), presentó el estudio titulado "Uso del Colorante Natural Carmín - Ácido Carmínico, Obtenido de la Cochinilla (*Dactylopius coccus*), en la Técnica de Coloración Hematoxilina Eosina en Tejidos de Hígado de Ovino – Cajamarca".

El objetivo fue determinar la afinidad de los tejidos del hígado de ovino al colorante natural carmín - ácido carmínico, obtenido de la cochinilla (*Dactylopius coccus*) en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de Coloración de Hematoxilina - Eosina.

Los resultados obtenidos, muestran que los núcleos de las células del hígado, como los núcleos de las células endoteliales, de los vasos sanguíneos del hígado, tienen afinidad por el colorante. El tejido conectivo de la cápsula de Glisson y de las trabéculas del parénquima hepático; no tiene afinidad al colorante. ⁽⁵¹⁾.

Jacobo F. (2006), presentó el estudio titulado "Determinación de un Medio Acuoso Óptimo para la Extracción de Ácido Carmínico desde la Cochinilla en el Proceso de Elaboración de Carmín". El objetivo del trabajo fue optimizar la etapa de extracción acuosa, del ácido carmínico para la obtención del carmín.

El diseño utilizado fue experimental clásico, con 5 repeticiones por cada extrayente evaluado (ácido cítrico, carbonato de sodio, ácido cítrico - carbonato de sodio y citrato de sodio). Se concluyó que con 5 lavadas se extrae la mayor cantidad de ácido carmínico desde la cochinilla entera, asimismo de los diferentes extrayentes usados se concluye que carbonato de sodio es el más efectivo, aportando un rendimiento de 99,93%. ⁽⁵⁷⁾.

Garzón G. (2008), presentó el estudio titulado "Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos". El objetivo fue ofrecer un esquema actualizado de las propiedades químicas y bioactivas de las antocianinas y de su potencial como colorantes de origen natural.

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento.

Factores como su misma estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

Las antocianinas son pigmentos que representan un potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos y para la obtención de productos con valor agregado dirigidos al consumo humano. Sin embargo, mucho hay por aprender en cuanto a su estabilidad en matrices específicas y a la relación entre su estructura, la actividad biológica de los metabolitos bioactivos, los efectos sinérgicos y las dosis efectivas. ⁽⁴⁶⁾

2.1.2. Internacionales.

Castillo S. et.al. (2006), presentó el estudio titulado "Ensayo Preliminar para la Obtención de Colorantes Naturales a partir de Especies Vegetales Comestibles". El objetivo del trabajo fue realizar un ensayo preliminar para la obtención de colorantes naturales a partir de especies vegetales comestibles.

Se realizó la extracción de Flavonoides, los cuales son los responsables de la coloración de muchas flores y frutos, utilizando como muestra el hollejo de la Uva (*Vitis vinífera*), los frutos de la Fresa (*Fragaria vesca*) y de la Mora (*Morus nigra*), mediante los métodos de extracción Soxhlet y Maceración con diferentes solventes, llegando a la conclusión de que el mejor método y solvente para extraer este tipo de colorantes es el Soxhlet con solventes alcohol etílico y alcohol etílico acidificado, ya que en estos se observaba una mayor extracción del colorante y mejor estabilidad, seleccionándose estos extractos para realizar el método de secado al vacío y pruebas microbiológicas. Asimismo, el método por Maceración no se considera adecuado para obtener este tipo de colorantes, ya que no se realiza una completa extracción del mismo y el proceso requiere de mucho tiempo. ⁽⁶⁰⁾

Poma L. et.al. (2017), presentó el estudio titulado "Efecto Antimicrobiano del Extracto de Cubio (*Tropaeolum tuberosum*) frente a *Listeria monocytogenes* en Carne de Hamburguesa". El objetivo fue evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* (Cubio o Mashua) sobre *Listeria monocytogenes* in vitro y aplicado a un producto cárnico (carne de hamburguesa).

Se sometieron los Cubios a un proceso de liofilizado, la extracción se realizó por medio de centrifugación usando como solvente etanol al 70%, se extrajo el disolvente por rota evaporación y se completó el proceso en estufa a 40°C por 24 horas. Se determinó la mínima concentración inhibitoria en un estudio in vitro, obteniendo que el extracto en concentración 1:2 y 1:4 (333 mg/ml y 200 mg/ml) inhibió el crecimiento, mientras que las concentraciones 1:6 y 1:8 permitieron el crecimiento de la bacteria.

Se concluyó que el extracto de Cubio tuvo efecto antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes* a concentraciones de 200 mg/ml y 333 mg/ml en las pruebas in vitro. Concluyendo que el extracto de Cubio puede ser un bioconservante prometedor para la industria de alimentos.⁽²²⁾

Díaz L. et.al. (2017), presentó el estudio titulado "Capacidad Antimicrobiana del Extracto de la parte aérea de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*". El objetivo fue determinar la capacidad antimicrobiana de extractos de hojas y tallos de *Tropaeolum tuberosum* (mashua) frente al crecimiento de las bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

El desarrollo del proyecto se realizó mediante la obtención del material vegetal seco por medio de la liofilización, seguido de la preparación de los extractos etanólico y acuoso, su concentración y la posterior cuantificación de los fenoles totales para finalmente realizar la prueba antimicrobiana.

Se obtuvieron altos niveles de fenoles totales en todos los extractos, superando la cantidad en equivalentes de ácido gálico de muestras de otras plantas, especialmente los de hojas, por tanto se sugiere plantear protocolos para estudiar la actividad antioxidante de los extractos encontrados. Al finalizar el estudio no hubo actividad antimicrobiana de ninguno de los extractos usados, etanólico o acuoso de tallos, hojas y mezcla de ambos frente *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*, por tal razón es necesario conocer los mecanismos de resistencia de estas bacterias ya que algunas poseen gran capacidad de adaptación, supervivencia y resistencia a los antimicrobianos. (27).

Agreda M. (2009), presentó el estudio titulado "Evaluación de Seis Métodos para la Extracción de Ácido Carmínico Obtenida a partir de Cochinilla (*Dactylopius coccus*) según condiciones de Laboratorio". El objetivo fue evaluar 6 métodos de extracción de ácido carmínico.

Se puede comprobar que la mejor metodología para extracción de ácido carmínico en condiciones de laboratorio de la Facultad de Agronomía es la extracción de ácido carmínico con carbonato de potasio, obteniéndose diferencia significativa al realizar análisis de varianza completamente al azar, colocándose siempre como el mejor método en la comparación de medias de TUKEY, con relación a su porcentaje de ácido carmínico, porcentaje de proteínas y su pH, siendo el único que cumple con los estándares de calidad que exige la FDA, obteniéndose un 20.53% de ácido carmínico, un pH de 7.58 y un 1.57% de proteína, encontrándose ausente el arsénico y el plomo. (36).

Ortega V. (2011), presentó el estudio titulado "Comparación del rendimiento del Ácido Carmínico entre dos procesos de deshidratación de la Cochinilla de tunas cultivadas en Guano". El objetivo fue deshidratar la cochinilla para obtener un mayor rendimiento de ácido carmínico.

Se comparó el rendimiento del ácido carmínico entre dos procesos de deshidratación de la cochinilla de la tuna, obteniendo así por estufa de aire caliente los rendimientos más altos de ácido carmínico son de 19.05% a temperatura de 51°C- 60°C y por 8h, seguido por la deshidratación a 4h en las mismas condiciones de temperatura de deshidratación con un porcentaje de rendimiento de ácido carmínico de 18,16%, mientras que los valores más elevados del rendimiento de ácido carmínico por exposición directa al sol son los valores obtenidos en un tiempo de 8 días presentando un porcentaje de 14.06%, concluyendo que el mejor método de deshidratación es el de estufa de aire caliente por un periodo de 8h y a un rango de temperatura de 51°C a 60°C. ⁽³⁷⁾

Téllez A. (2010), presentó el estudio titulado "Solubilización y Estabilidad de las Microemulsiones del Colorante Natural Neocandénatona". El objetivo del trabajo fue determinar la solubilidad y estabilidad de las dispersiones del pigmento natural Neocandénatona en presencia de tensoactivos y ciclodextrinas y aditivos utilizados en la industria de los alimentos en soluciones acuosas.

El trabajo se desarrolló en varias etapas. En la primera etapa se obtuvo el pigmento Neocandénatona y se determinó su pureza por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Posteriormente se determinó su solubilidad en diferentes disolventes orgánicos y en mezclas de etanol/agua en las cuales presenta cierta solubilidad. Se concluyó que la Neocandénatona puede solubilizarse en agua mediante el uso de tensoactivos y ciclodextrinas. La estabilidad y la solubilidad de las soluciones obtenidas depende del tensoactivo utilizado y del pH del medio. ⁽³⁸⁾

Arroyo G. et al. (2010), presentó el estudio titulado "Aplicación de Productos Derivados del Insecto *Dactylopius coccus* Costa (Homóptera, Dactylopiidae)".

El objetivo del trabajo fue difundir la aplicación del insecto grana carmín y los productos derivados del mismo en el teñido de una tela de algodón. El método de teñido más utilizado a nivel artesanal son el pre-mordentado, meta-mordentado y pos-mordentado. El primero consiste en mordentar la tela antes de ser teñida y fue el método utilizado en la investigación. La aplicación de los productos obtenidos del insecto grana carmín provee de muchas ventajas al industrial, de entre ellas obtener un valor agregado del producto, por ser éste de procedencia natural. Asimismo el uso de este colorante protege al medio ambiente y la salud del ser humano. ⁽⁴⁴⁾.

González M. et.al. (2011), presentó el estudio titulado "Técnica de Tinción de estructuras Fúngicas con colorantes Vegetales como una Alternativa no Contaminante". El objetivo fue demostrar el uso de colorantes vegetales como alternativa para teñir estructuras fúngicas. Se desarrolló una técnica de tinción para estructuras fúngicas con colorantes vegetales solubles en agua usados en la industria de alimentos tales como el rojo allura N° 40 (16035) y azul brillante N° 1 (42090). Para la mezcla de cada colorante se utilizó 1 mL de rojo de allura N° 40 o azul brillante N° 1 más ácido acético (10 mL) y glicerina (15 mL) en 75 mL de agua destilada esterilizada. Para la preparación de láminas se utilizaron colonias de varios tipos de hongos y Chromistas que crecían en sustrato natural o en medios agarificados.

Los montajes preparados con rojo allura y azul brillante fueron comparados con láminas preparadas con colorantes usados en el diagnóstico rutinario de hongos como son azul de anilina y fucsina ácida en lactofenol. La técnica desarrollada es simple, segura, con productos de fácil obtención y también puede ser aplicable a otros organismos como Chromistas. Además, resultó confiable, no costosa, no tóxica, con alta capacidad de tinción y con larga durabilidad. La técnica constituye una buena alternativa para fines didácticos, de investigación y lo más importante es que no es contaminante, ya que los reactivos son inocuos al humano y al ambiente. ⁽⁸²⁾.

2.2. Bases Teóricas.

2.2.1. Aspectos Botánicos de *Tropaeolum tuberosum*.

2.2.1.1. Historia.

El *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) es un tubérculo que se halla en los Andes desde Colombia hasta el noroeste de Argentina, las evidencias arqueológicas sugieren que sus tubérculos ya eran consumidos desde hace más de 7500 años. Se sabe poco sobre el historial y la dispersión de sus cultivos. ⁽¹⁾

La primera evidencia arqueológica de la Mashua data 650 - 1350 años después de Cristo (Persall 1982) en los sedimentos de las cuevas de Huachumachay, ubicadas en el valle del Jauja, Perú. Sobre la base de los usos y creencias medicinales actuales en torno a la Mashua, así como el uso de la planta como ornamento en el noreste de Argentina (Fernández 1973, Hermann 1992), Johns et al. (1982) sugieren que la Mashua tuvo un lugar significativo en el pasado distante por razones distintas a la alimentación, y que su domesticación puede estar relacionada con su importancia como medicina. ⁽⁴⁾

En la cerámica Nazca, se encuentran bellas representaciones inequívocas de Mashua, lo que sugiere que, a pesar de ser un cultivo de altura, también era bien conocido en las zonas costeras del Perú. La primera referencia histórica de la planta aparece en una crónica citada por Yacovleff y Herrera (1935). La Mashua, bajo sus nombres comunes y alternativos "añus" y "masuas", es también descrita más adelante por Garcilaso de la Vega (1966). ⁽⁴⁾

Bernabé Cobo (1956), describe los efectos antifrodisiacos atribuidos a este tubérculo, y cómo estos fueron explotados por el ejército Inca para mantener a sus soldados tranquilos. Mucho más tarde, Ruiz y Pavón (1802) hicieron la primera y todavía válida descripción botánica. ⁽¹⁾

Excavaciones arqueológicas en la cueva de Huachumachay ubicada en el valle de Jauja en Perú encontraron sedimentos de Mashua que datan de 850 - 1350 D.C., siendo los restos más antiguos encontrados de la planta. (Grau Alfredo, 2003). Representaciones de la planta en cerámica están presentes en la cultura Nazca, que datan de 1000 D.C. (Grau Alfredo, 2003), lo que pone en evidencia la importancia de la planta, fuera de sus propiedades alimenticias, para los pueblos ancestrales. El origen exacto de la planta es incierto por la falta de registros e investigación arqueológica. ^(1, 4, 13)

2.2.1.2. Etnobotánica.

Las creencias sobre los usos medicinales de la "Mashua" son bastante diversas, pero se sugieren algunos aspectos como: ⁽¹⁶⁾

García Barriga (1975) informa que en Colombia los tubérculos se consideran diuréticos; relajan la vejiga; disuelve los cálculos renales y; se usan para tratar el dolor renal y otras enfermedades renales. Soukup (1970) y Oblitas Poblete (1989) informan usos similares en Perú y Bolivia, respectivamente. García Barriga (1975) también informa que los tubérculos son efectivos para tratar enfermedades de la piel como el eccema y el herpes. Valdizan y Maldonado, (1922) informan que en Perú las flores se usan para las manchas ("empeines") en la cara y Oblitas Poblete (1989) reporta que los tubérculos se usan para tratamientos de las úlceras cutáneas causadas por insectos tropicales.

Los isotiocianatos presentes en *Tropaeolum tuberosum* (Kjaer et al., 1978), se le ha reportado propiedades antibióticas. Así como los glucosinolatos son insecticidas (Sehgal y Ujagir, 1977; Blau et al., 1978). A. Camino (1977), considera las propiedades antifúngicas e insecticidas de la mashua. Oblitas Poblete (1989) informa que se usa para tratar enfermedades nerviosas; como un expectorante y como un remedio contra la tos; y para combatir la policitemia (Fuchs, 1978). ⁽¹⁷⁾

En el departamento de Ancash, en el centro del Perú, Vásquez Varela (1952) registra que la "Mashua" se considera alimento para las mujeres. Los hombres se niegan a comer estos tubérculos porque creen que hacerlo produce impotencia. ⁽¹⁷⁾

2.2.1.3. Sinonimia.

Acorde con (Grau Alfredo, 2003), la palabra Mashua o Maswa es de origen quechua y su significado se ha perdido a través del tiempo. A continuación, una variedad de nombres para llamar a la Mashua: ⁽¹⁾

TABLA N° 01: SINONIMIA MASHUA

NOMBRE	LENGUAJE	REGION/PAIS	REFERENCIA
Allausu	-	Perú	Mejía 1931
Añu	Quechua	Perú	Cárdenas 1989
Apilla	Quechua	Bolivia	Cárdenas 1989
Apñamama	Quechua	Perú	Herrera 1941
Capuchinha tuberosa	Portugués	Portugal	Sánchez-Monge 1981
Capucine tubéreuse	Francés	Francia	Sánchez-Monge 1981
Cubios	Español	Colombia	Pérez Arbelaez 1947
Gallu gallu	-	Colombia	Sparré y Anderson 1991
Isaño	Aymara	Bolivia/Tiicaca	Cárdenas 1989
Majua	Español	Ecuador	Lescano 1994, Espinosa et al. 1997, Patiño 1964
Mashua	Quechua	Ecuador	Tapia et al. 1996, Espinosa et al. 1997, Estrella 1988
Mashua	-	Perú	Herrera 1941
Maxua	Español	Ecuador	Lescano 1994, Patiño 1964
Navios	Español	Colombia	Pérez Arbelaez 1947
Navos	Español	Colombia	Pérez Arbelaez 1947
Ocaquisaño	Quechua	Bolivia	Cárdenas 1989
Pane	Guambiano	Colombia	Patiño 1964
Peruanische Knollenkresse	Alemán	Alemania	Sánchez-Monge 1981
Puel	Páez	Colombia del sur	Consejo Nacional de Investigación 1989, Patiño 1964
Sisaño	Aymara	Argentina-Jujuy	Hermann 1992, observación personal
Tropeolo del Perú	Italiano	Italia	Sánchez-Monge 1981
Tuber nasturium	Ingles	Reino unido	Sánchez-Monge 1981

Elaborado por: Pablo Roberto Almeida Chérrez. ⁽⁴⁾
Fuente: (Grau Alfredo, 2003).

2.2.1.4. Taxonomía.

La Mashua es una planta andina que pertenece a la familia de las Tropaeolaceae, que es un grupo pequeño, pero bastante homogéneo de especies herbáceas, que en su mayoría son trepadoras. Esta familia incluye tres géneros, de los cuales 2 de ellos son totalmente restringidos a la región de la Patagonia. El género más grande es el *Tropaeastrum*, que contiene cerca de 86 especies, distribuidas desde el sur de México hasta América del Sur (Sparre y Anderson, 1991).^(4,9)

La capacidad para la formación de tubérculos, está presente en todos los géneros de la esta familia. Así pues, se han enumerado, positivamente, todas las especies como formadoras de tubérculos.⁽⁹⁾

Al respecto sobre la Mashua o *Tropaeolum tuberosum*, esta especie fue descrita por Ruiz y Pavón (1802) en su magnífica obra "*Flora Peruviana et Chilensis*", en la cual por primera vez dieron a conocer un relato detallado e ilustrado de la especie.⁽¹⁸⁾

TABLA N° 02: FAMILIA TROPAEOLACEAE

Se extiende desde Centro hasta Sudamérica, los tres géneros de la familia forman tubérculos		
Tropaeastrum	Magallana C.V	Tropaeolum
Ubicada únicamente en la Patagonia.	Ubicada únicamente en la Patagonia.	El género más grande de la familia, con más de 86 especies distribuidas desde el sur de México hasta Sudamérica. Una de estas especies, <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) fue descrita por primera vez en 1802 por Ruiz y Pavón en su obra " <i>Flora Peruviana y Chilensis</i> ".

Elaborado por: Pablo Roberto Almeida Chérrez.⁽⁴⁾
Fuente: (Grau Alfredo, 2003)

En cuando a la clasificación taxonómica la Mashua, es la que sigue:

División: Espermatofitas

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Superorden: Dicotifloras

Orden: Geraniales

Familia: Tropaeolaceae

Género: *Tropaeolum*

Especie: *Tropaeolum tuberosum* R. et P.

2.2.1.5. Distribución Geográfica.

Su cultivo se concentra a partir de los 1500 hasta los 4200 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) y su distribución geográfica va desde Colombia hasta Bolivia. Es una planta que soporta bien el frío. Considerando que este tubérculo se encuentra cultivado en las regiones andinas de Bolivia ubicadas a 3.900 metros sobre el nivel del mar, puede soportar temperaturas elevadas y crecer en suelos pobres.

En las regiones de Perú (Ayacucho, Cajamarca, Huancayo, Cuzco y Puno) se cultiva a 3.000 m.s.n.m. En Balcarce, Argentina, se la cultiva a alturas que están entre los 2.800 y 3.000 metros sobre el nivel del mar. ^(14, 28)

2.2.1.6. Descripción de la Planta.

La Mashua es una planta anual, de follaje compacto y flores con cinco sépalos rojos y cinco pétalos amarillos. Se presenta de una forma muy compacta con 1 centímetro de diámetro que, cuando alcanza una altura de entre 20 y 80 cm, produce tubérculos cuyo color varía entre el blanco, amarillo y anaranjado. ⁽²⁷⁾

La Mashua cruda tiene un sabor amargo, algo picante, parecido al sabor del rábano o la mostaza. Esta característica ha hecho que se la consuma únicamente luego de cocinarla. Al ser cocinada, elimina un compuesto denominado isotiocianato. Las hojas de este tubérculo son muy ricas como vegetales verdes y sus flores lo son aún más todavía pues contienen valores nutritivos al momento de comerlas. ⁽²⁷⁾.

TALLOS

Los tallos son de forma cilíndrica; su crecimiento es recto o en posición semiprostrada y presenta ciertas ramificaciones de color violeta oscuro.

HOJAS

La Mashua tiene hojas delgadas con forma redondeada de color verde oscuro brillante en el haz y un poco más claras en el envés, lo que les permite tener un follaje compacto. Las hojas tienen una forma redondeada. ⁽²⁸⁾.

FLORES

Las flores son de varios colores que van desde las tonalidades amarillas o anaranjadas hasta un rojo oscuro, con cinco sépalos rojos y cinco pétalos amarillos. Tienen entre 8 y 13 estambres y el tiempo en que las flores permanecen abiertas es entre 9 y 15 días. ⁽²⁸⁾.

TUBÉRCULOS

Son cónicos, alargados y de yemas profundas; miden entre 5 y 15 cm de largo y poseen una textura arenosa debido al elevado contenido de carbohidratos y agua. Sus colores son variados, tales como el amarillo, anaranjado, blanco, rojo, morado, gris y negro. Su sabor es picante. ⁽¹⁾.

La Mashua cruda tiene un sabor amargo, algo picante, parecido al sabor del rábano o la mostaza. Esta característica ha hecho que se la consuma únicamente luego de cocinarla. Al ser cocinada, elimina un compuesto denominado isotiocianato. Las hojas de este tubérculo son muy ricas como vegetales verdes y sus flores lo son aún más todavía pues contienen valores nutritivos al momento de comerlas. ⁽²⁷⁾.

TALLOS

Los tallos son de forma cilíndrica; su crecimiento es recto o en posición semiprostrada y presenta ciertas ramificaciones de color violeta oscuro.

HOJAS

La Mashua tiene hojas delgadas con forma redondeada de color verde oscuro brillante en el haz y un poco más claras en el envés, lo que les permite tener un follaje compacto. Las hojas tienen una forma redondeada. ⁽²⁸⁾.

FLORES

Las flores son de varios colores que van desde las tonalidades amarillas o anaranjadas hasta un rojo oscuro, con cinco sépalos rojos y cinco pétalos amarillos. Tienen entre 8 y 13 estambres y el tiempo en que las flores permanecen abiertas es entre 9 y 15 días. ⁽²⁸⁾.

TUBÉRCULOS

Son cónicos, alargados y de yemas profundas; miden entre 5 y 15 cm de largo y poseen una textura arenosa debido al elevado contenido de carbohidratos y agua. Sus colores son variados, tales como el amarillo, anaranjado, blanco, rojo, morado, gris y negro. Su sabor es picante. ⁽¹⁾



Figura N° 01: Planta *Tropaeolum tuberosum*
Fuente: Espín C. (2013) ⁽⁶⁵⁾



Figura N° 03: Flor de *Mashua*
Fuente: Espín C. (2013) ⁽⁶⁵⁾



Figura N° 02: Tallo y Hojas.
Fuente: Espín C. (2013) ⁽⁶⁵⁾



Figura N° 04: Tubérculo de *Mashua*
Fuente: Suquilanda M. (2018) ⁽⁶¹⁾



Figura N° 06: Tubérculo de *Mashua Negra*
Fuente: Inostroza L. et.al. (2015) ⁽²⁶⁾

2.2.1.7. Variedades Nativas.

En otros países como Bolivia se han reconocido más de 100 variedades de mashua. En el Perú este tubérculo se lo clasifica según su coloración. ⁽²⁸⁾

TABLA N° 03: VARIEDAD DE LA MASHUA NATIVA



VARIEDAD DE MASHUA NATIVA	COLOR
Occo Izaño	Plomo
Chiara Izaño	Negro
Chupica Izaño	Rojo
Cheche Izaño	Amarillo con ojos azules
Izaño	Amarillo
Wilajachasquiri Izaño	Amarillo con rayas rojas

Fuente: (Beltrán Andrés, 2014). ⁽²⁹⁾

2.2.1.8. Composición Química.

La composición química del *Tropaeolum Tuberosum* se presenta en la Tabla N° 04. Con estos valores establecidos, se demuestra que la Mashua es uno de los tubérculos con mayor cantidad en porcentajes nutritivos, ya que posee un alto contenido de proteínas, carbohidratos, fibras y calorías, las cuales son una fuente de calor, energía, incluso supera con su valor nutritivo a algunos cereales y a la papa.

Más que nada es un producto con un alto contenido de almidón, un balance apropiado de aminoácidos y gran fuente de vitaminas como la B y C. Si bien su sabor es conocido por su amargor, los valores nutritivos son muy propicios para la alimentación diaria. ^(2, 7, 8, 10, 11, 16, 19, 27)

TABLA N° 04: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MASHUA



COMPONENTES	BASE HUMEDAD			BASE SECA	
	Rango	Promedio	Promedio	Rango	Promedio
Humedad (%)	79.10–88.8	87.4	86	78.3–92.4	—
Carbohidratos (g)	—	9.8	11	—	—
Proteínas (g)	1.13–2.85	1.5	1.6	6.9–15.7	11.4
Grasa (g)	—	—	0.6	0.1–1.4	4.3
Ceniza (g)	0.56–1.08	—	0.8	4.2–6.5	5.7
Fibra (g)	—	—	0.8	7.8–8.6	—
Azúcares (g)	5.37–1.08	—	—	—	—
Potasio (g)	1.28–1.76	—	—	—	—
Fósforo (g)	0.61–0.83	29	42	—	300
Calcio (g)	—	12	7	—	50
Hierro (g)	—	1.0	1.2	—	8.6
Vitamina A (mg)	—	—	1.5	—	214
Tiamina (mg)	—	0.10	0.06	—	0.46
Riboflavina (mg)	—	0.12	0.08	—	0.57
Niacina (mg)	—	0.67	0.6	—	4.3
Vitamina C (mg)	—	77.5	67	—	476

Fuente: (3, 7, 8, 10, 11, 14, 18, 27).

2.2.2. Aspectos Entomológicos de *Dactylopius coccus*.

2.2.2.1. Historia.

A pesar de su larga historia de uso por el hombre, la familia Dactylopiidae es un grupo poco conocido y gran parte de la información disponible es inexacta e incluso anecdótica. ⁽³⁹⁾

De acuerdo con las últimas revisiones la familia comprende sólo el género *Dactylopius* con nueve especies, todas de origen americano, sésiles y especialistas en cactáceas del género *Opuntia*. Una de estas especies, *Dactylopius coccus*, se encuentra tanto en México como en Perú, y ha sido utilizada como fuente de colorantes naturales por los indígenas de ambos países desde tiempo precolombinos. ⁽⁵⁰⁾

El origen y la distribución disjunta de *Dactylopius coccus* ha sido motivo antiguo de polémica y controversia entre arqueólogos e historiadores tanto en México como en Perú. ⁽⁵¹⁾

Las evidencias más antiguas del uso del insecto como fuente de colorante se han encontrado en textiles de la cultura Paracas, en Perú, anteriores a la era cristiana, en tanto que las evidencias del cultivo y aprovechamiento sistemático del insecto se encuentran en México en establecimientos de la cultura Tolteca de alrededor del siglo X. ⁽⁵¹⁾

Historia de la Cochinilla en América del Sur

La cochinilla parece haber sido utilizada en Perú hace aproximadamente 1500 años y en México hace 1200 años. Los primeros hilos de color rojo en Perú datan de alrededor del 2000 a. C., pero estos fueron teñidos con las raíces del reibun (*Relbunium* spp), una planta estrechamente relacionada con la rubia (*Rubia* spp), una planta euroasiática perteneciente a la familia de las Rubiaceae, mas no con la cochinilla. Sin embargo, los primeros teñidos con cochinilla aparecen primero en el sitio de enterramiento de la cultura Nazca excavado por Lothrop y Mahler, que databa de los años 450–850 d.c., en el área de Ayacucho desde el año 750 d.C. en adelante y esto precede al extenso cultivo de la cochinilla por la cultura Tolteca en México desde el año 800 d.C. Rodríguez y Niemeyer muestran que Perú había estado comerciando con el sur de México a través del mar durante unos 2000 años (desde 1450 a.C.). La mandioca dulce y el maíz tierno se enviaban desde Perú a México a cambio de los aguacates y chiles que viajaban de México a los Andes. Esto probablemente explica la adopción de la cochinilla por parte de México hacia Perú. ^(50, 51)

2.2.2.2. Etnoentomología.

La cochinilla tenía un gran valor en la época prehispánica: "Con grana se pintaban las prendas de la alta sociedad, debido a la importancia del color rojo en esa época. ⁽⁴⁰⁾

Antes de la conquista española, los pueblos Aztecas, Mixtecos y Zapotecas de México y los Incas del Perú, habían desarrollado formas sofisticadas como el tejer en telares de cintura. Junto con esta producción de textiles vino el desarrollo y la práctica de tinción y teñido. Documentos escritos por conquistadores y personajes religiosos comentan la habilidad de los nativos del Nuevo Mundo en el uso de pigmentos naturales. ⁽⁴⁰⁾.

Tejidos Teñidos en Perú

La datación por radiocarbono ha establecido que los humanos ocuparon las regiones áridas y arenosas de la costa del Pacífico del Perú ya en el año 6000 a. C., y se establecieron en el altiplano andino en el 2000 a. C. Los ocupantes de las regiones áridas del Perú estaban familiarizados con el hilado de fibras de agave y el algodón que trenzaban y decoraban con patrones geométricos frotados con polvos colorantes. La tecnología del tejido se desarrolló hacia el año 2000 a. C., y se detectó la presencia de tintes en textiles que datan del nacimiento de Cristo. El uso de colorantes aumentó con la domesticación de los camélidos (alpaca y llama). Por el 300 a. C. y con el uso de fibras cameloides, se lograron grandes avances en la aplicación de tintes y técnicas de tintura. ⁽⁴⁴⁾.

A lo largo de la árida región costera del Perú, las civilizaciones preincaicas usaban tintes desde el año 500 a. C. La información derivada del análisis de colorantes en textiles peruanos antiguos revela la presencia de tintes de cochinilla e índigo y justifica este uso por parte de los preincas. Los cronistas incas, que escribieron alrededor de 1530, dieron información sobre el teñido y la recolección del insecto productor de cochinilla en el Perú. No se ha probado la domesticación del insecto productor de cochinilla en el Perú, pero gracias a los cronistas se sabe que, de su tamaño, que según se informó era del tamaño de un frijol. ⁽⁴⁴⁾.

2.2.2.3. Sinonimia.

Si hacemos caso de Sahagún, uno de los primeros hombres en registrar de forma metódica los recursos naturales de Nueva España, el primer nombre con que se le conoció a la cochinilla por parte del europeo fue el vocablo náhuatl Nocheztli, cuyo significado es "Sangre de Tuna". Sin embargo, llama la atención, que en ese mismo periodo temprano se le agregó el nombre de "grana" para ser conocida como "Grana Nocheztli".⁽⁴¹⁾

El segundo de los nombres con que se conoce al insecto: "cochinilla", es el que puede generar un poco más de polémica, ya que, existen autores que señalan su procedencia igualmente de la lengua latina, específicamente de "Coccinum" que significa "escarlata".⁽⁴¹⁾

Otras culturas mesoamericanas habían acuñado un término para denominar al insecto como "Induco" entre los mixtecos, o bi-yaa entre los zapotecos, los cuales nunca ganaron terreno entre los demás términos, a pesar de provenir de culturas del actual estado de Oaxaca – México, lugar por excelencia para la cría del insecto.⁽⁴¹⁾

2.2.2.4. Taxonomía.

La Cochinilla se denominaba en la época Pre-hispánica como Nocheztli, término náhuatl que significa "Sangre de nopal", el cual servía para designar al insecto y al colorante que produce, desde entonces su clasificación ha sido continuamente modificada; Linneo la llamó *Coccus cacti* en 1758, más tarde Burmeister en 1839 la describió como *Pseudococcus cacti*, pero más de 100 años antes, en 1835, Costa ya la había clasificado como *Dactylopius coccus*. Este nombre se ha mantenido en Perú hasta nuestros días bajo la siguiente sistemática según:^(42, 52)

Reino: Animal

Phyllum: Anthropoda

Subphyllum: Mandibulata

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Coccoidea

Familia: Dactyloppiidae

Género: *Dactylopius*

Especie: *Dactylopius coccus*

2.2.2.5. Distribución Geográfica.

A nivel mundial, Perú es el primer productor de cochinilla, abastece el 80% de las necesidades mundiales. El Perú produce todo el año Cochinilla, el cual contiene en promedio un 18 – 22% de ácido carmínico. Las principales regiones productoras de cochinilla son: Ayacucho, Apurímac, Huancavelica, Lima y Arequipa. La mayor producción de tuna en el país es silvestre. La región Arequipa se mantiene como el primer productor nacional y exportador de cochinilla a nivel mundial. En el 2016, el país exportó 4 mil toneladas por un valor de 117 millones 900 mil dólares y el 65% de esta producción salió desde las pampas de La Joya. ^(47, 48)

2.2.2.6. Descripción del Insecto.

El *Dactylopius coccus* es un insecto que se instala, como parásito, en las hojas de la tuna, su alimentación es de tipo fitófago, se nutre de la savia a través de un estilete bucal por medio de largas trompas, cuando son separadas de su huésped original, no vuelven jamás a adherirse, necesita un clima seco y cálido para desarrollarse, es explotado por su capacidad para producir colorantes naturales basados en el ácido carmínico. ^(55, 56)

La cochinilla hembra que mide aproximadamente 6mm. Es materia prima para la fabricación del colorante rojo natural que se encuentra como sustancia de reserva en su interior, llamado comercialmente Carmín, por contener el ácido carmínico en su cuerpo. Su reproducción se realiza en la misma tuna, donde se aloja formando colonias. Llega a poner de 400 a 600 huevos, tiene un tamaño variable en mm, al poner los huevos excreta una materia blanca cerosa que cubre a éstos y que constituye una placa protectora contra el sol y las lluvias y apenas se mueve en las hojas. Tiene forma de grano rojizo negro, de aspecto granular, de forma más o menos oval, arrugada, convexa y con algunas estrías, el color varía entre gris y negro cuando se ha eliminado la capa de cera que los recubre. Las hembras son la fuente de ácido carmínico, materia prima para la producción de carmín, colorante natural que al no ser tóxico, el tinte que de ella se extrae se usa en la industria como colorante (E-120) de una gran variedad de productos: cosmética, alimentación, textiles, farmacéutica, vinos, etc., ya que convenientemente procesado proporciona una variada gama de colores: violeta, naranja, rojo, gris y negro. El colorante natural que se extrae de la cochinilla, contiene dos sustancias: el carmín y el ácido carmínico, que son inocuos al hombre. ^(55, 56).

Huevos: Son ovalados de superficie lisa y lustrosa semitransparente al estado inicial, presenta un color rojo vivo a morado lila, su tamaño varía de acuerdo al piso ecológico de hábitat, siendo de 1mm de longitud por 0.5 mm de ancho.

Estados Ninfales:

Ninfa I: Es conocida como ninfa migrante y luego es fijada a la penca, es de forma oval con setas modificadas, presenta un color rojo, su tamaño varia en tunas bajo riesgo siendo e 0.8mm de longitud por 0.4mm de ancho. ^(55, 56).

Posee antenas, patas y ojos, se moviliza en este estadio buscando en la penca un lugar de fijación hasta ser adulto y morir. Es de forma ovoide de color rojo oscuro y luminoso, que es cubierto de una cera pulverulenta de color blanco.

En este estadio permanece fija, con pequeñas excepciones que tienden a desplazarse. Su tamaño varía según las condiciones de la planta de la tuna, siendo de 2.5 mm de longitud por 2 mm de ancho. Posee antenas y patas reducidas diferenciándose por estas características de la Ninfa I. ⁽⁵⁵⁾.

Ninfa II: Muda, para convertirse en hembra adulta.

Hembra adulta: Es de forma ensanchada en la parte vertebral (Ovoide), de color bruno, rojizo, lustrosa de consistencia blanda que cubre una sustancia pegajosa de color blanco.

Su tamaño varía según las condiciones de clima y del período de reproducción. No presentan alas, posee un aparato bucal que cumple el papel de chupador con el que se fijan en las partes verdes de la penca.

La vida de la cochinilla hembra está en un promedio de 130 días, realiza dos mudas antes de llegar a su madurez, la primera a los 25 días de nacida y la segunda a los 50 días. Su madurez sexual se produce a los 100 días de su nacimiento, siendo su postura promedio de 20 días dependiendo de la altitud ecológica de su hábitat y después lentamente muere. ⁽⁵⁶⁾.

Macho adulto: Es más pequeño que las hembras, presenta un par de alas, antenas bien desarrolladas y patas delgadas que vuelan de planta en planta. Su cuerpo es de color rojizo, con ligera pulverulencia cerosa.

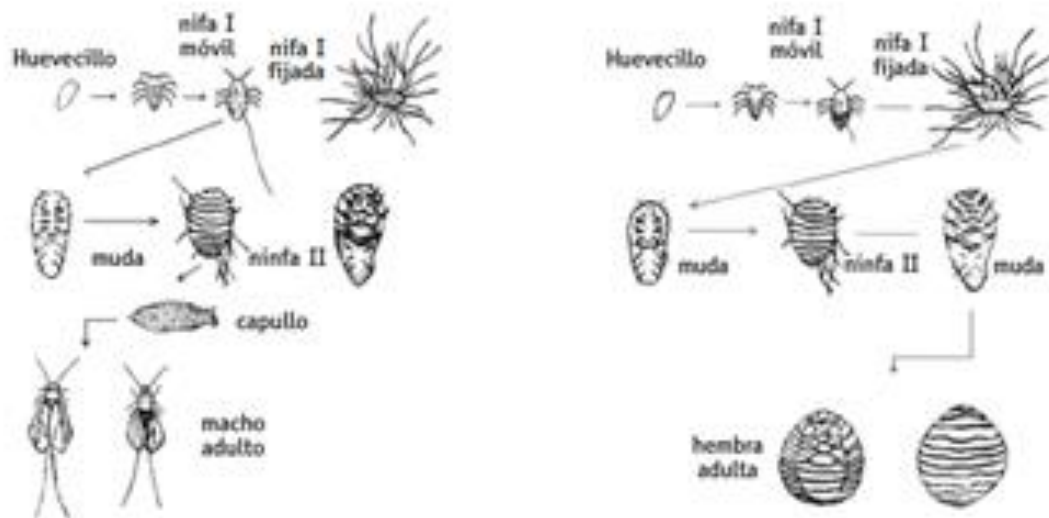


Figura N° 08: Ciclo del *Dactylopus coccus*
Fuente: Colla M. (2015) ⁽⁴⁶⁾



Figura N° 07: *Dactylopus coccus* en Nopal (*Opuntia*)
Fuente: Galicia M. (2014) ⁽⁴³⁾

2.2.2.7. Tipos.

Existen dos tipos de cochinilla, silvestre y fina. La silvestre es un complejo de ocho especies que crece como una plaga en las huertas de nopal. Su colorante es de mala calidad y de baja concentración. ⁽⁵⁷⁾

Se distingue de la fina porque su cuerpo está cubierto de una madeja de "Algodoncillo" blanco en vez del polvo de la cochinilla fina. La cochinilla fina se distingue porque su colorante es de calidad. ⁽⁵⁷⁾

2.2.2.8. Composición Química.

La composición química de la cochinilla está definida por las grasas, las ceras, el agua, las cenizas, las sustancias nitrogenadas y el agente colorante, el ácido carmínico. Una cochinilla de calidad aceptable para el proceso de elaboración del carmín, debe contener entre 18 y 25% de ácido carmínico. En Perú la cochinilla presenta entre 18 – 22% de ácido carmínico. ^(38, 48, 88).

2.2.3. Colorantes.

2.2.3.1. Color.

Es una sensación producida en el ojo humano, según las condiciones de la luz reflejada por esas sustancias. El color propio de un cuerpo es la capacidad que éste posee de absorber una parte de la luz que recibe y refleja el resto, por lo tanto, la luz posibilita el acto de ver, se desarrolla por ondas de distintas longitudes de onda (350 nm y 780 nm) y a diferentes velocidades, que son las que producen la sensación que denominamos color. El color depende en gran parte de la naturaleza de la luz que ilumina a la sustancia y varía con la misma, si se mira una sustancia blanca iluminada con la luz de un solo color, refleja este color solamente, es decir, si se habla de tono verde la sustancia refleja el color verde y así sucesivamente. Hay factores que intervienen y condicionan el color de los cuerpos, éstos son: ^(38, 40, 43).

- a) Color local: Es el color propio de los cuerpos, en aquellas partes en que no es modificado por efectos de la luz y sombra o por colores reflejados.

- b) Color tonal: Es una variante en más o menos del color local, influido generalmente por el reflejo de otros colores. Es, por tanto, un color complejo con muchas variantes en sí mismo. Es color más claro de las partes iluminadas, el más oscuro de las partes en sombra.
- c) Color ambiente (reflejado): Es el factor constante, teniendo en cuenta, por un lado, el color ambiental y por otro lado, el reflejo concreto de uno o más cuerpos determinados. ⁽⁴³⁾

La luz visible está formada por vibraciones electromagnéticas cuyas longitudes de onda van de unos 350 a unos 760 nanómetros (milmillonésimas de metro). Las ondas electromagnéticas que el ojo humano percibe son: ^(43, 51)

- Violeta: Longitud de onda entre 380-450 nm.
- Azul: Longitud de onda entre 450-500 nm.
- Verde: Longitud de onda entre 500-570 nm.
- Amarillo: Longitud de onda entre 570-590 nm.
- Naranja: Longitud de onda entre 590-610 nm.
- Rojo: Longitud de onda entre 610-750 nm.

2.2.3.2. Radicales Existentes en los Colorantes.






El colorante es una sustancia que se aplica a cualquier cuerpo para efectuar una modificación persistente del color original y que en varias formas de su aplicación, puede ser disuelto o dispersado en un fluido, difundiéndose de este modo dentro del cuerpo a colorear. ^(43, 45)

Los colorantes son compuestos químicos de estructura compleja que, según la teoría de Witt pueden tener en su fórmula estructural determinados grupos químicos funcionales, los cuales reaccionará con grupos de la fórmula química de la fibra. ^(43, 45)

Estos grupos químicos funcionales son:

- **Grupos cromóforos:** Según la teoría de Witt, se define llevar un color a la fibra, Witt observó que todos los cromóforos tienen un grupo saturado responsable fundamental del color y por regla general se necesita más de un grupo cromóforo para que aparezca el color. Las moléculas que contienen el grupo cromóforo se les conoce como cromógeno. ^(43, 45)

TABLA N° 05: CROMÓFOROS TÍPICOS PRESENTES EN LOS COLORANTES

El grupo nitro	
El grupo nitroso	
El grupo azo	
El grupo carbonilo	
El doble enlace carbono - carbono	

Fuente: (Paredes Benigna, 2002). ⁽²⁴⁾

Los cromóforos son sustancias que absorben la luz a una longitud de onda, entre los 350 y 760 nm se visualizan coloreadas. Originalmente, el término cromóforo se aplica al sistema responsable de la impartición de coloración, pero actualmente implica cualquier grupo funcional que absorbe radiación electromagnética, aunque no produzca coloración. Ejemplo: el grupo carbonilo. ^(43, 45, 58)

Cuando un cromóforo absorbe a cierta longitud de onda y al sustituir un grupo por otro se causa absorción a una longitud mayor, se dice que ha ocurrido un desplazamiento batocrómico. Va cambiando la absorción desde el violeta hasta el rojo pasando por el azul, verde, amarillo y anaranjado; el color que percibimos es completamente del absorbido. El desplazamiento en sentido contrario se denomina hipsocrómico. Cuando en una molécula están presentes dos o más grupos cromóforos separados por dos o más enlaces simples, el efecto en el espectro es aditivo debido a una pequeña interacción electrónica entre tales grupos. (43, 45, 55).

- **Grupos auxóchromos.**

La palabra auxóchromo significa aumentar el color. Según UIT, los grupos auxóchromos son agrupaciones atómicas que intensifican la acción de los cromóforos y hacen que la sustancia presente propiedades tintóreas. (53, 56).

TABLA N° 06: AUXÓCROMOS PRESENTES EN LOS COLORANTES

El grupo amino	-NH ₂
Los grupos Amino sustituidos	-NHR y -NHR ₂
El grupo carboxílico	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \backslash \\ \text{O} - \text{H} \end{array} $
El grupo hidroxilo	-OH

Fuente: (Paredes Benigna, 2002). (56)

La influencia de los auxóchromos en el desarrollo de un color, está demostrada por los compuestos: fenol, anilina, nitrofenol, nitroanilina. El fenol y la anilina contienen grupos hidroxilos y amino, respectivamente, pero son incoloros. ⁽⁵⁶⁾.

FIGURA N° 08: FENOL Y ANILINA



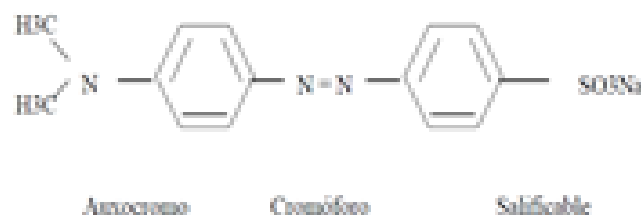
Fuente: (Paredes Benigna, 2002). ⁽⁵⁶⁾.

Todos los grupos auxóchromos son dadores de electrones. Estos grupos son responsables de la formación de sales débiles y fácilmente solubles con el fin de que el colorante pueda pasar a la materia textil y sea susceptible de convertir una sustancia coloreada en un colorante. ⁽⁵⁸⁾.

- **Grupos salificables.**

Estos grupos salificables le dan al colorante la propiedad de actuar, convirtiendo al colorante insoluble en agua. Ejemplo: anaranjado de metileno o dimetil amino azo bencen sulfonato de sodio. ⁽⁵⁶⁾.

FIGURA N° 09: AUXOCROMO – CROMÓFORO - SALIFICABLE



Fuente: (Paredes Benigna, 2002). ⁽⁵⁶⁾.

Las moléculas que contienen a los grupos auxóchromos pueden ser salificables, es decir, transformadas en sales por tratamiento con un ácido (para los derivados aminados) o con una base (para los derivados hidroxilados). Se debe hacer mención para los grupos sulfónico y carboxílico que tienen por objeto solubilizar los colorantes y permitir su transformación en sales. Estos grupos se llaman "logenos". (36, 58).

2.2.3.3. Clasificación.

Los colorantes se dividen en dos grandes grupos:

- **Colorantes Artificiales.**

El origen de estos colorantes es de síntesis química, su composición es menos compleja que la de los colorantes naturales, son hidrosolubles, se presentan generalmente en forma de polvo y tienen normas específicas de pureza. Dentro de los efectos nocivos a la salud tenemos: alergias tipo asma, posible efecto cancerígeno, enfermedad de la tiroides, lesiones en el hígado, hipercidez, rinitis, urticaria, etc. (59, 60).

- **Colorantes Naturales.**

- El término colorantes naturales se aplica a aquellos productos alimenticios de origen animal, vegetal o incluso mineral en los cuales se encuentra de forma también natural. A la vez se consideran naturales los colorantes obtenidos de materiales biológicos, como algunos insectos e incluso los que se forman al calentar un alimento, como el caramelo. Por tanto, un colorante natural son pigmentos coloreados obtenidos de materia prima principalmente de origen animal y vegetal, aunque también puede ser de origen mineral. (59, 60).

- **Colorantes Según su Composición Química**

TABLA N° 07: CLASIFICACIÓN DE COLORANTES NATURALES

Naturaleza Química	Ejemplos	Color Predominante
Tetrapirroleo	Ficobilinas	Azul-Verde
	Clorofila	Verde
Carotenoides	Carotenoides	Amarillo-Anaranjado
Flavonoides	Flavonas	Blanco-Crema
	Flavonoles	Amarillo-Blanco
	Chalconas	Amarillo
	Auronas	Amarillo
	Antocianinas	Rojo-Azul
Xantonas	Xantonas	Amarillo
Quinonas	Naftoquinonas	Rojo-Azul-Verde
Derivados Indigoides e Indoles	Indigo	Azul-Rosado
	Betataínas	Amarillo-Rojo
Pirimidinas Sustituidas	Pterinas	Blanco-Amarillo
	Flavinas	Amarillo
	Fenoxanizinas	Amarillo-Rojo
	Fenazinas	Amarillo-Púrpura

Fuente: (Castillo S, Ramírez I, Paredes Benigna, 2002).^{(56), (61)}

2.2.3.4. Colorantes Naturales.

Los colorantes naturales son pigmentos coloreados obtenidos de materia prima principalmente de origen animal y vegetal, aunque también puede ser de origen mineral. Asimismo se consideran naturales los colorantes obtenidos de algunos insectos e incluso los que se forman al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo.^{(60), (61)}

Hasta mediados del siglo pasado, mayoritariamente los colorantes eran de origen natural por ejemplo: Azafrán (Obtenido de la planta del azafrán), Orceína (Extraído de ciertos líquenes), Cochinilla (Obtenido de ciertos insectos de la familia Coccidae, Caramelo (Pasta de azúcar hecho almíbar), Cúrcuma (Extraído de un Rizoma), Rojo de Remolacha (Extracto acuoso de la raíz de la remolacha roja), la Alizarina (Obtenida a partir de maderas) y el Índigo (De la planta del índigo). Los colorantes naturales son inofensivos e histológicos, encontrándose entre los empleados con mayor frecuencia, los siguientes: ^(60, 61).

- a) **Índigo:** Se obtiene de diversas especie de plantas del genero indigófera que contiene indican, el cual se fermenta para producir el colorante.
- b) **Carmin:** Se produce, mediante el tratamiento con alumbre y otras sales metálicas a hembras del insecto cochinilla "*Coccus castis*".
- c) **Orceína y Tornasol:** Se obtiene mediante el procesamiento industrial de líquenes de los géneros: *Le canora tinctoria* y *Rosella tinctoria*.
- d) **Hematoxilina:** Este colorante se extrae con éter de la madera de un árbol oriundo de México y de algunos países sudamericanos denominados *Hematoxillum campechianum*.

Los colorantes vegetales conocidos también como pigmentos se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal a excepción de los hongos. Se hallan en la naturaleza asociados con ciertas sustancias que intensifican o modifican su color, éstas tienen el nombre de copigmentos y pueden ser flavonas, flavonoles, taninos, ácidos y otros compuestos que no han podido ser identificados. También son causas de su modificación la quelación con iones de metales pesados como hierro, aluminio, el hierro (⁺³) que produce coloración roja y molibdeno azul púrpura. ^(60, 61)

La mayoría de los colorantes vegetales naturales, en especial las antocianinas son anfóteros, sus sales ácidas son rojas, por lo general, sus sales metálicas azules y sus soluciones neutras violetas. ^(60, 61)

Las Antocianinas

Son pigmentos naturales propios de todas las coloraciones de las plantas en el reino vegetal. Son pigmentos rojos y azules. Generalmente con este vocablo designa tanto a las antocianinas, como a las antocianidinas o sea, al glicósidos como al glicol. ⁽⁶²⁾

Las Quinonas

Sólidos cristalinos, amarillos, anaranjados o rojos, son poco solubles en agua y solubles en solventes orgánicos. ⁽⁶³⁾

Colorantes Minerales ⁽⁶⁴⁾

Denominados también colorantes inorgánicos, diferenciándose así de los de origen vegetal y animal considerándose como colores orgánicos.

Colorantes de Origen Animal

Son colorantes naturales de procedencia animal. Ejemplo: la cochinilla. La cochinilla está compuesta por: ^(45, 59, 60)

- | | |
|-------------------|----------|
| - Ácido carmínico | 9-10% |
| - Grasa | 6 a 8 % |
| - Ceras | 5 a 12% |
| - Agua | 10 a 11% |
| - Sust. Minerales | 15 a 30% |
| - Sust. Nitrógeno | 15 a 30% |

2.2.3.5. Mecanismos Generales de la Coloración.

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Ejemplos de colorantes catiónicos son el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina. Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, tales como muchas proteínas. Esos colorantes incluyen la eosina, la fucsina ácida y el rojo Congo. ^{(45, 58, 59, 60).}

Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de los depósitos de grasa. Un ejemplo de colorante liposoluble es el negro Sudán. Algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con otra sustancia química, que no es un colorante por sí mismo. Esta sustancia se denomina mordiente; un mordiente habitual es el ácido tánico. ^{(45, 58, 59, 60).}

El mordiente se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora sí podrá atacar el colorante. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse muchas precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente. ^{(45, 58, 59, 60).}

2.2.3.6. Metabolitos Secundarios.

Llamados también productos naturales, no son iguales para todas las plantas, cada planta en sus distintos órganos tienen diferentes tipos de componentes químicos con efectos terapéuticos diversos. Los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos. Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas. Existen tres intermedios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de productos naturales como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etc. Algunos esqueletos de productos naturales se biosintetizan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica tal es el caso de los flavonoides que se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico. ^(34, 35)

Tipo de Metabolito Secundario. ^(34, 35)

Los metabolitos secundarios de acuerdo a sus grupos funcionales se clasifican en tres partes los cuales son: terpenoides y esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides.

a. Compuestos terpenoides y esteroides:

Se refiere a un grupo de sustancias que tienen un origen biosintético común y que siguen la llamada regla de isopreno esbozada por Wallach en 1886.

La unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono múltiplo; (hidroxilos, cetonas, etc.) y se la conoce como isopreno.

b. Compuestos fenólicos.

Comprenden los fenilpropanos y los flavonoides. Estos últimos se clasifican a su vez en flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, chalconas y auronas.

c. Alcaloides.

Se dividen en alcaloides verdaderos protoalcaloides pseudo alcaloides y alcaloides imperfectos.

2.2.3.7. Registro de Campo (Ubicación geográfica).

El Tubérculo *Tropaeolum tuberosum*. Fue procedente de las alturas del Distrito de Yanacancha, en la Provincia de Chupaca, Región Junín en enero del 2018. Fue identificado en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El *Dactylopius coccus*. Se recolecto en el mes de febrero en el Distrito de San Bartolomé, Provincia de Huarochirí en el Departamento de Lima.

Ambas muestras fueron estudiadas y procesadas en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

a) Método de extracción.

Los tubérculos fueron cosechados a los 6 meses de siembra, los cuales fueron lavados, limpiados y cortados en fragmentos pequeños, posteriormente se sometieron en extractor Thomas TH-2880i / TH-2880iR y posterior filtración. (10, 17, 22).

La Cochinilla seleccionada, fueron aquellos parásitos adultos que llegaron a medir más de 7 mm de longitud por 6 mm de ancho, medidas que nos indican que el parásito ha llegado a su madurez. Se recolectó 500 gramos, se los colocó en bandejas de acero quirúrgico, fueron sometidos a deshidratación y secado a una temperatura de 40°C por 150 horas. Al finalizar el procedimiento, se obtuvo un producto plateado de buena calidad. (50, 51).

Luego se procedió a trozar y molienda en mortero hasta obtener un polvo fino homogéneo bien triturado, luego se pesaron 100g, se realizó el tamizado en mallas metálicas de 1/16", hasta obtener una uniformidad del producto. Se procedió a pesar 20 gramos de polvo de cochinilla, se depositó en un beaker, para luego agregarle 130 mL de agua destilada estéril, se mezcló hasta disolución ayudada con mechero de bunsen hasta que quedó 100 mL de solución final. Ambas muestras se almacenaron en envases de vidrio color ámbar con tapa hermética y se colocaron en refrigeración (04±2°C). Hasta su posterior uso. (50, 51).

2.2.3.8. Tamizaje Fitoquímico

Una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, es el tamizaje Fitoquímico, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje Fitoquímico es una técnica analítica sobre el extracto de la planta a estudiar, consiste en una serie de reacciones químicas de coloración y precipitación para la detección de componentes químicos de determinada estructura y se confirman con la cromatografía. (33, 34).

Los resultados del tamizaje Fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del "Screening" farmacológico. (33, 34, 35).

a) Metodología en el análisis Fitoquímico. (33, 34, 35).

Un análisis Fitoquímico debe de comprender cuatro etapas bien definidas:

- Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio.
- Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos.
- Determinación estructural.
- Ensayos farmacológicos o toxicológicos.

b) Reacciones de identificación. (33, 34, 35).

Consiste en realizar una serie de reactivos, que identificar cada metabolito secundario que esté presente en el extracto a investigar.

2.2.4. Morfología y Estructura Bacteriana.

2.2.4.1. Morfología.

Las bacterias poseen célula procariota, conforman un grupo muy heterogéneo de organismos unicelulares sumamente pequeños. Su tamaño puede variar entre 0,2 y 5 μm . En general, la mayoría de las bacterias tiene una envoltura rígida denominada pared bacteriana, la misma que determina su forma. En consecuencia se asocian con un espectro reducido de configuraciones o morfologías, las cuales pueden ser: cocos (Que significa bayas) esféricos, bacilos (Que significan pequeños bastones) bastoniformes y bacterias espirilares. (69, 72, 73).

Los cocos que después de la división permanecen unidos en pares se denominan diplococos y los que después de la división permanecen unidos en forma de cadenas se denominan estreptococos. Los cocos que se dividen en dos planos y permanecen unidos en grupos de cuatro se conocen con el nombre de tétradas, los que se dividen en tres planos y permanecen unidos en grupos de configuración cubica se llaman sarcinas y los que se dividen en planos múltiples y forman grupos similares a racimos de uvas o laminas amplias se denominan estafilococos. ⁽⁷³⁾

Los bacilos, por su parte, se dividen exclusivamente a través de sus ejes menores, de manera que la cantidad de grupos de bacilos es menor que la de cocos. La mayoría de los bacilos se observan como bastones aislados. Los diplococos permanecen unidos en pares después de la división, mientras que los estreptobacilos forman cadenas. Algunos bacilos presentan el aspecto de hebras de paja y otros presentan extremos afinados y se asemejan a cigarrillos. Otros bacilos son ovalados y se parecen mucho a los cocos, por lo que reciben el nombre de cocobacilos. ⁽⁷⁸⁾

Las bacterias espirilares presentan una o más curvaturas y nunca son rectas. Las bacterias que presentan el aspecto de bacilos curvos se llaman vibriones. Otras bacterias, llamadas espirilos, poseen una configuración helicoidal semejante a la de un tirabuzón y cuerpo relativamente rígidos. Otro grupo de bacterias espirilares está compuesto por microorganismos helicoidales y flexibles llamados espiroquetas. ⁽⁷²⁾

A diferencia de los espirilos, que se desplazan con ayuda de apéndices externos similares a un látigo llamados flagelos, las espiroquetas se desplazan mediante filamentos axiales que se asemejan a flagelos, pero están rodeados por una vaina externa flexible. ⁽⁷³⁾

2.2.4.2. Estructura Bacteriana.

a. Estructura Interna.

Membrana Plasmática Bacteriana

Es una estructura delgada interna que rodea el citoplasma de la célula, está compuesta principalmente por fosfolípidos, que representan los compuestos químicos predominantes, y proteínas. Hay ausencia de esteroides, por lo que su membrana es más flexible. Sin embargo, hay una excepción a la regla en las bacterias, este caso se da en el género *Mycoplasma*, que son bacterias sin pared celular, y que contienen esteroides en sus membranas. Con ayuda de un microscopio electrónico, en la membrana plasmática bacteriana se puede observar uno o más pliegues irregulares de gran tamaño llamados mesosomas. Las funciones atribuidas a los mesosomas han sido muchas, pero en la actualidad se sabe que son artefactos y no representan estructuras celulares verdaderas. ⁽⁷⁷⁾

Citoplasma Bacteriano

Se refiere a la sustancia limitada por la membrana plasmática, está compuesto por alrededor de un 80% de agua y contiene sobre todo proteínas (enzimas), hidratos de carbono, lípidos, iones inorgánicos y numerosos compuestos de bajo peso molecular. Los iones inorgánicos se encuentran presentes en concentraciones mucho más elevadas en el citoplasma que en la mayoría de los otros medios. El citoplasma es espeso, acuoso, semitransparente y elástico. Las estructuras principales comprenden una zona nuclear (o procarión), que contiene ADN, partículas llamadas ribosomas y depósitos de reserva llamados inclusiones. ⁽⁷⁷⁾

Es muy probable que los filamentos proteicos presentes en el citoplasma sean responsables de las configuraciones bacilar y helicoidal de las bacterias. Asimismo carece de citoesqueleto y el flujo citoplasmático. ⁽⁷⁷⁾

Procarión o Nucleoide

En la célula bacteriana, por lo general, contiene una única hebra continua y a menudo de disposición circular de ADN bicatenario que se conoce con el nombre de cromosoma bacteriano. Esta estructura es responsable de la información genética necesaria para todas las estructuras y las funciones de la célula bacteriana. En las bacterias de desarrollo activo el ADN representa hasta un 20% del volumen celular, dado que estas células presintetizan material nuclear para las células futuras. ⁽⁸⁰⁾

Además del cromosoma las bacterias a menudo contienen pequeñas moléculas de ADN monocatenario, por lo general circular, llamadas plásmidos. Estas moléculas con elementos genéticos extra cromosómicos, es decir que no están conectados con el cromosoma bacteriano principal, y se replican independientemente del ADN cromosómico. Suelen contener entre 5 y 100 genes que, en condiciones ambientales normales, en general, no son indispensables para la supervivencia de la bacteria. Sin embargo, en ciertas condiciones los plásmidos representan una ventaja para la célula porque pueden aportar información genética relacionada con diversas actividades celulares, como la resistencia a los antibióticos, la tolerancia a los metales tóxicos, la reproducción de toxinas y la síntesis de enzimas. Los plásmidos pueden pasar de una bacteria a otra. En la actualidad, el ADN de los plásmidos se utiliza para manipular genes en el terreno de la biotecnología. ⁽⁸⁰⁾

Ribosomas

Son organelos que actúan como sitios donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Para el caso de las células procariontes, los ribosomas están distribuidos por decenas de millares en todo el citoplasma, lo que le confiere un aspecto granular. Además, los ribosomas están constituidos por dos subunidades, cada una de estas subunidades están compuestas por proteína y un tipo de ARN llamado ARN ribosomal (ARNr). Los ribosomas de las células bacterianas difieren de las células eucariontes por la cantidad de proteínas y moléculas de ARNr que contienen; además, son algo más pequeños y menos densos que los ribosomas de las células eucariontes. ⁽⁸⁰⁾

Por este motivo, los ribosomas bacterianos se denominan ribosomas 70S y los ribosomas de organismos eucariontes se conocen como ribosomas 80S. La letra "S" se refiere a las unidades Svedberg, que indican la velocidad de sedimentación relativa durante la centrifugación ultrarrápida. ⁽⁸⁰⁾

Inclusiones

En el interior del citoplasma existen diversos tipos de depósitos de reserva denominados inclusiones. Las células pueden acumular ciertos nutrientes en condiciones favorables para luego utilizarlos en condiciones adversas. Los datos obtenidos sugieren que las concentraciones de las macromoléculas en las inclusiones evitan el aumento de la presión osmótica que tendría lugar si las moléculas se encontraran dispersas en el citoplasma. Algunas inclusiones son comunes a una amplia diversidad de bacterias mientras que otras solo se encuentran en una pequeña cantidad de especies y en consecuencia facilitan su identificación. ⁽⁸⁰⁾

Gránulos Metacromáticos

Son inclusiones de gran tamaño que se llaman así porque a veces se tiñen de rojo con ciertos colorantes azules, como el azul de metileno. Globalmente estas inclusiones se conocen con el nombre de volutina. La volutina representa una reserva de fosfato inorgánico (Polifosfato) que la célula puede utilizar para sintetizar ATP. ⁽⁸⁴⁾

Gránulos de Polisacáridos

Son estructuras que contienen en su interior glucógeno y almidón, y su presencia se puede demostrar mediante el tratamiento de las células bacterianas con yodo. Cuando hay yodo presente, los gránulos de glucógeno adquieren un color rojo pardusco y los gránulos de almidón devienen azules. ⁽⁸⁴⁾

Inclusiones Lipídicas

Son muy notorias en varias especies del género *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Spirillum* y otros géneros. Un lípido de reserva que se ve con frecuencia y es específico de las bacterias es el polímero ácido polibetahidroxibutírico. Las inclusiones se detectan mediante la tinción de las células con colorantes liposolubles, como los colorantes Sudán. ⁽⁸⁴⁾

Gránulos de Azufre

Muy común en "Bacterias sulfurosas" pertenecientes al género *Thiobacillus*, obtienen energía mediante la oxidación del azufre y de compuestos relacionados. Estas bacterias pueden acumular gránulos de azufre que utilizan como reserva de energía. ⁽⁸⁴⁾

Carboxisomas

Son inclusiones que contienen la enzima ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa. Las bacterias fotosintéticas utilizan dióxido de carbono como única fuente de carbono y necesitan esta enzima para la fijación del dióxido de carbono. ⁽⁸⁴⁾

Vacuolas Gaseosas

Representados por numerosos espacios vacíos presentes en bacterias acuáticas que incluyen a las cianobacterias, las bacterias fotosintéticas anoxygenicas y las halobacterias. Cada vacuola está compuesta de hileras de vesículas gaseosas individuales que consisten en estructuras cilíndricas huecas recubiertas por proteína. Las vacuolas gaseosas da flotabilidad y permiten que las células permanezcan en el nivel de profundidad acuosa apropiado para recibir una cantidad suficiente de oxígeno, luz y nutrientes. ⁽⁸⁰⁾

Magnetosomas

Son inclusiones de óxido de hierro (Fe_3O_4) producidas por varias bacterias gramnegativas, como *Magnetospirillum magnetotacticum*, que actúan como imanes. Las bacterias pueden utilizar los Magnetosomas para desplazarse hacia abajo hasta encontrar un sitio de fijación apropiado. ⁽⁷²⁾

b. Estructura Externa

Pared Celular

Es una estructura compleja y semirrígida responsable de la configuración de la célula bacteriana.

La pared celular rodea a la frágil membrana plasmática (Citoplasmática) subyacente y protege a esta membrana y al interior de la célula de los cambios adversos del medio externo. Como todas las células bacterianas poseen pared celular. Su función principal consiste en evitar la ruptura de la célula bacteriana cuando la presión hidrostática intracelular es mayor que la presión hidrostática extracelular. La pared celular también contribuye al mantenimiento de la forma de una bacteria y sirve como sitio de anclaje para los flagelos. A medida que aumenta el volumen de la célula bacteriana, la membrana plasmática y la pared celular se expanden según necesidad. Desde una perspectiva clínica la pared celular recibe importancia porque contribuye a la virulencia de algunas especies de bacterias y es el sitio de acción de algunos antibióticos. (89, 72).

Además, la composición química de la pared celular permite establecer diferencia entre los principales tipos de bacterias. La pared celular de las bacterias está compuesta por una red macromolecular denominada péptidoglicano (también conocida como mureína), que puede ser una estructura solitaria o estar combinada con otras sustancias. El péptidoglicano a su vez está compuesto por un disacárido repetitivo unido por polipéptidos que conforman un losange que rodea y protege a la totalidad de la célula. El disacárido está formado por monosacáridos denominados N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmuránico (NAM) y emparentado con la glucosa. (72, 73).

El montaje de los diversos componentes del péptidoglicano no tiene lugar en la pared celular. Las moléculas alternas de NAM y NAG se unen para formar hileras de 10 a 65 azúcares que constituyen un "esqueleto" de hidrato de carbono (La fracción glucano del péptidoglicano). (80).

Las hileras vecinas están unidas por polipéptidos (la fracción peptídica del péptidoglicano). Aunque la estructura de las uniones peptídicas es variable, en todos los casos existen cadenas laterales tetra peptídicas, las cuales están formadas por cuatro aminoácidos unidos a NAM en el esqueleto. Los aminoácidos están dispuestos en un patrón alterno de formas D y L. Esta disposición es específica del péptidoglicano porque todos los aminoácidos presentes en otras proteínas corresponden a la forma L. ^{(72, 73).}

Glucocálix

El Glucocálix bacteriano es un polímero viscoso (adherente) y gelatinoso que se encuentra localizado por fuera de la pared celular y esta compuesto por polisacáridos, polipéptidos o ambas sustancias. Su composición química varía en las distintas especies. En la mayoría de los casos se fabrica en el interior de las células y se secreta en la superficie celular. Si la sustancia que lo compone está organizada y se adhiere firmemente a la pared celular el Glucocálix recibe el nombre de cápsula. Si la sustancia que lo formó no está organizada y se une a la célula en forma laxa, el Glucocálix recibe el nombre de capa mucilaginosa. ^{(76, 77).}

Flagelos

Algunas bacterias poseen flagelos, que consisten en apéndices filamentosos largos que las propulsan. Las bacterias desprovistas de flagelos se conocen como bacterias atricas. Los flagelos pueden adoptar cuatro disposiciones distintas, lo que determina que las bacterias se clasifiquen en monotricas (Un flagelo polar), anfitricas (Un ovillo de flagelos en cada extremo de la célula), lofotricas (Dos o más flagelos en uno o ambos extremos de la célula) y peritricas (flagelos distribuidos en toda la extensión de la célula). ^{(76, 77).}

Un flagelo está compuesto por tres elementos fundamentales. La porción larga más extrema o filamento, posee un diámetro constante y contiene la proteína globular (Más o menos esférica) flagelina, que consiste en varias cadenas entrelazadas que forman una hélice alrededor de un núcleo hueco. A diferencia de lo que ocurre en las células eucariontes, en la mayoría de las bacterias los filamentos no están recubiertos por una membrana. El filamento está unido a un gancho ligeramente más ancho compuesto por una proteína diferente. La tercera porción del flagelo es el cuerpo basal, que fija el flagelo a la pared celular y la membrana plasmática. ⁽⁸⁰⁾

El cuerpo basal está compuesto por un pequeño bastón central insertado en una serie de anillos. Las bacterias gramnegativas contienen dos pares de anillos; el par de anillos externo está anclado a diversas porciones de la pared celular, mientras que el par interno está anclado a la membrana plasmática. Las bacterias Gram positivas contienen exclusivamente el par de anillos interno. Cada flagelo bacteriano es una estructura helicoidal semirrígida que propulsa la célula mediante la rotación del cuerpo basal. El sentido de la rotación de un flagelo es horario o anti horario alrededor de su eje mayor. El movimiento de los flagelos de las bacterias se produce por rotación del cuerpo basal y se asemeja al movimiento del eje de un motor eléctrico. La proteína de los flagelos se denominada antígeno H, es útil para diferenciar las distintas serovariedades. ^(80, 84)

Filamentos Axiales

Las espiroquetas representan un grupo de bacterias con una estructura y una motilidad características. Una de las espiroquetas mejor estudiadas es el *Treponema pallidum*, el agente causal de la sífilis. ⁽⁸⁴⁾

Otra espiroqueta conocida es la *Borrelia burgdorferi*, el microorganismo que causa la enfermedad de Lym. Las espiroquetas se desplazan mediante filamentos axiales o endoflagelos, que consisten en fascículos de fibrillas que nacen en los extremos de la célula debajo de la vaina externa y siguen un trayecto helicoidal alrededor de la bacteria. Los filamentos axiales están anclados a un extremo de las espiroquetas y poseen una estructura similar a la de los flagelos. ^(84, 91)

Fimbrias y Pili

Muchas bacterias gramnegativas contienen apéndices pilosos que son más cortos, más rectos y más delgados que los flagelos y que cumplen funciones de fijación y transferencia de ADN más que una función de motilidad. Estas estructuras, compuestas por una proteína llamada pilina que describe un trayecto helicoidal alrededor de un núcleo central, se dividen en dos tipos que cumplen funciones muy distintas: Las Fimbrias, pueden nacer en forma regular en toda su superficie. Al igual que el Glucocáliz, las fimbrias permiten que la célula se adhiera a distintas superficies, incluidas las de otras células. Las Pilis son más largas que las fimbrias y su cantidad es solo una o dos por células. Se unen a la pared celular bacteriana como paso previo a la transferencia intercelular del ADN, proceso conocido como conjugación. ^(84, 91)

2.2.5. Tinciones Bacterianas.

2.2.5.1. Tinción In Vivo e In Vitro.

Una tinción in vivo (tinción vital) es el proceso de teñir tejidos vivos. Al provocar que determinadas células o estructuras adquieran los colores de contraste, se puede estudiar su ubicación y morfología mientras están desempeñando su función. ^(78, 81, 90)

El propósito más común es revelar detalles de la cito estructura que de otra manera no resultarían evidentes, sin embargo, la tinción vital puede revelar además donde aparece un determinado producto químico dentro de las células o tejidos. A menudo estas tinciones son llamadas tinciones vitales. Se introducen en el organismo mientras las células aún se encuentran vivas. Para conseguir el efecto deseado, el colorante usualmente se utiliza en soluciones muy diluidas que van entre 1:5.000 a 1:50.000. A pesar de esto las tinciones son eventualmente tóxicas para los organismos, algunas más que otras. Una tinción in vitro o "supra vital" involucra el coloreo de células o estructuras que han sido removidas de su contexto biológico. Se utiliza a menudo una combinación de varios colorantes para revelar más detalles y características de las que se obtendrían con la utilización de uno solo. Combinados con protocolos específicos de fijación y de preparación de muestras. Una contra tinción es una tinción que consigue que las células o estructuras sean más visibles, cuando no se consigue que sean totalmente visibles con la tinción principal. Por ejemplo, el cristal violeta tiñe únicamente a las bacterias Gram positivas en la tinción de Gram. Se utiliza una contra tinción de safranina (que colorea todas las células), para permitir también la identificación de bacterias Gram negativas. ^{(78, 81, 90).}

2.2.5.2. Método de Tinción In Vitro.

Las etapas preparatorias involucradas en una tinción in vitro son:

Fijación: De por sí, esta etapa puede consistir en varios pasos. La fijación es una modificación de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que forman una célula o tejido y que tiene por finalidad preservar las formas de las células o tejidos tanto como sea posible. A veces se puede utilizar una fijación por calor para matar, adherir y alterar un espécimen de modo que acepte la tinción. ^{(78).}

La mayor parte de las veces se utiliza un fijador químico. Los fijadores químicos en general causan la formación de enlaces cruzados entre proteínas, o entre proteínas y otras sustancias presentes en la muestra, incrementando su resistencia mecánica. Entre los fijadores químicos más comunes se encuentran el formaldehído, etanol, metanol, etc. ⁽⁸¹⁾.

Permeabilización: Este paso implica el tratamiento de las células con un surfactante suave. Este tipo de tratamiento tiene como finalidad disolver la membrana celular para permitir que las grandes moléculas de colorante puedan acceder a las estructuras del interior celular. ⁽⁸¹⁾.

Montaje: Frecuentemente implica adherir los cortes histológicos a un portaobjetos de vidrio para su observación al microscopio o análisis. El montaje tiene por finalidad aumentar la resistencia mecánica de una muestra que de otra manera sería muy frágil, para que soporte el proceso de tñido conservando lo más posible su estructura original. ^(78, 81, 90).

Tinción Adecuada: En su forma más simple, el verdadero proceso de tinción puede implicar la inmersión de la muestra en la solución colorante, seguido del aclarado que es un lavado para eliminar el exceso de colorante y la observación. Muchos tintes, sin embargo, requieren del uso de un mordiente, esto es, un compuesto químico que reacciona con el colorante para formar un precipitado coloreado insoluble. Cuando la solución de colorante en exceso se elimina durante el aclarado, la tinción mordentada permanece. ⁽⁹⁰⁾.

2.2.5.3. Tinción Directa e Indirecta.

- Hablamos de tinción directa cuando el colorante interacciona directamente con el sustrato, sin otro tratamiento previo.
- Se denomina de tinción indirecta a las tinciones que hacen uso de un mordiente. ^(72, 81, 91).

2.2.5.4. Tipo de Tinciones.

Tinciones Simples

El propósito principal de una tinción simple es destacar el microorganismo completo para que se vean las formas y las estructuras celulares básicas. El colorante se aplica al extendido fijado durante un tiempo determinado y luego se lava; a continuación, el portaobjetos se seca y se examina. En ocasiones se agrega una sustancia química a la solución para intensificar la coloración; este aditivo se denomina mordiente. Una de las funciones de un mordiente es aumentar la afinidad de una muestra biológica por un colorante; otra es cubrir una estructura (como un flagelo) para darle mayor espesor y facilitar la observación después del teñido. Algunas de las tinciones simples utilizadas con frecuencia en el laboratorio son por ejemplo el azul de metileno. ^{(72, 81, 87, 91).}

Tinciones Diferenciales

Reaccionan de modo diferente con las distintas clases de bacterias y por lo tanto pueden ser empleadas para establecer una distinción entre ellas. Las tinciones diferenciales utilizadas con más frecuencia para las bacterias son la tinción de Gram y la tinción de ácido-alcohol resistencia. ^{(72, 81, 91).}

Tinción de Gram

Es la más importante, es una prueba rápida y sencilla, y la que más se emplea para observar las bacterias; utiliza un colorante (violeta), un mordiente o fijador del colorante (yodo), un decolorante (alcohol - acetona) y otro colorante (normalmente rojo, como safranina) para teñir de diferente color las bacterias que se decoloraron en la primera fase de tinción. ^{(71).}

La tinción de Gram permite clasificar las bacterias en gramnegativas (se decoloran con el alcohol y vuelven a colorearse con el segundo colorante, por lo que se ven rojas) y Gram positivas (no se decoloran con alcohol y siguen de color violeta).⁽⁷¹⁾

Tinción de Ácido - Alcohol Resistente

Es otro tipo de tinción diferencial, se utiliza para identificar a todas las bacterias del género *Mycobacterium*, que comprende dos patógenos importantes: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*.⁽⁷²⁾

Tinciones Especiales

Se utilizan para colorear y aislar partes específicas de microorganismos, como endosporas y flagelos, y para detectar la presencia de cápsulas.⁽⁷³⁾

Tinción Negativa para Cápsula

Es una tinción difícil debido a que los materiales capsulares son hidrosolubles y pueden desprenderse durante los lavados rigurosos. Para demostrar su presencia se puede mezclar las bacterias en una solución que contenga una suspensión coloidal fina de partículas coloreadas (por lo general tinta china o nigrosina) que proporcione un fondo que contraste y luego teñir las bacterias con un colorante simple, como la safranina.⁽⁸¹⁾

Tinción para Endosporas (Esporas)

La más utilizada para este fin es la tinción de Schaeffer–Fulton para endosporas. Se aplica el colorante primario verde de malaquita a un extendido fijado con calor y se lo calienta hasta la emisión de vapores durante alrededor de 5 minutos.^(90, 91)

El calor ayuda a que el colorante atraviese la pared de la endosporas. Luego se lava el preparado con agua durante cerca de 30 segundos para eliminar el colorante de todas las partes de las células salvo las endosporas. A continuación, se aplica sobre el extendido, safranina, un colorante de contraste, para teñir las porciones de la célula distintas de las endosporas. En un extendido preparado de modo adecuado las endosporas aparecen verdes dentro de células rojas o rosadas. ^{(90, 91).}

Tinción de Flagelos

Procedimiento tedioso y delicado que se basa en el empleo de un mordiente y el colorante carbol fucsina para aumentar los diámetros de los flagelos hasta que se tornen visibles con el microscopio óptico. ^{(81).}

2.2.6. Tinción Gram.

Es el método de tinción más importante en bacteriología. Se utiliza para la identificación diagnóstica de una amplia variedad de organismos. El mecanismo de la tinción de Gram no se entiende completamente más allá de las diferencias identificables en las características de la pared celular entre los organismos clasificados como "Gram positivos" y "Gram negativos". Los organismos Gram positivos se ve que son capaces de retener tintes básicos a una concentración mayor que la especie Gram negativa. Probablemente, la diferencia más importante está en la permeabilidad de la pared celular durante el proceso de tinción. ^{(71, 74, 85-87).}

2.2.6.1. Procedimiento.

El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera: una vez que la preparación ha sido fijada a la lámina portaobjeto, se añade el colorante cristal violeta, el cual se deja en contacto por 1 minuto y las células se tiñen de color violeta, posteriormente se lava el exceso de colorante con agua destilada, luego se añade la solución de lugol, que actúa como mordiente, y se deja en contacto por un 1 minuto. ^{(71, 74).}

El yodo se combina con el cristal violeta y forma un compuesto que precipita en el interior de la célula; este complejo puede extraerse fácilmente con alcohol etílico – acetona de las gram negativas, pero no se remueve fácilmente de las gram positivas. Una vez realizada la decoloración se añade el colorante de contraste, la safranina, la cual se deja en contacto por 30 segundos; el exceso de colorante se elimina con agua destilada. Las láminas así preparadas se secan a temperatura ambiente. ^(71, 74).

2.2.6.2. Reactivos.

Los reactivos de tinción de Gram, enumerados como se usan en el procedimiento de tinción son: violeta cristal, yodo, etanol/acetona y safranina. La reacción inicial del procedimiento de tinción es con la adición de la tinción primaria, violeta de cristal, al frotis bacteriano. Los colores violeta cristalino de la célula bacteriana son purpura. La adición del reactivo de yodo que es un mordiente fija el cristal violeta a la pared celular. El complejo cristal violeta-yodo se adhiere más firmemente a la pared celular Gram positiva que a la pared celular Gram negativa. La solución de etanol/acetona decolora o elimina el complejo cristal violeta-yodo principalmente de la pared celular Gram negativa. La pared celular de Gram positiva retendrá el cristal violeta debido a la presencia de ácidos teicoicos en exceso y se mantendrá morado. La contra tinción o safranina es la tinción final en el procedimiento. La safranina tiñe la bacteria Gram negativa incolora rosa. ^(85, 87).

2.2.6.3. Utilidad.

La tinción de Gram es una técnica de laboratorio bacteriológico utilizada para diferenciar las especies bacterianas en dos grandes grupos (Gram positivos y Gram negativos) en función de las propiedades físicas de sus paredes celulares. ⁽⁸⁷⁾.

La tinción de Gram no es una herramienta infalible para el diagnóstico, la identificación, y su uso es extremadamente limitado en microbiología ambiental. Se usa principalmente para hacer una identificación morfológica preliminar o para establecer que hay un número significativo de bacterias en una muestra. No puede identificar bacterias a nivel de especie y no debe usarse como el único método de identificación bacteriana. ⁽⁸⁷⁾.

En los laboratorios de microbiología, se usa en combinación con otras técnicas tradicionales y moleculares para identificar bacterias. Algunos organismos son Gram positivos (lo que significa que pueden teñir negativos o positivos); algunos no están teñidos con tinte usado en la técnica de Gram y no se ven. En un moderno laboratorio de microbiología, la mayoría de las identificaciones se realizan utilizando secuencias genéticas y otras técnicas moleculares, que son mucho más específicas e informativas que las tinciones diferenciales. ⁽⁸⁷⁾.

2.2.6.4. Gram Positivos y Gram Negativos.

Las bacterias Gram positivas son bacterias que dan un resultado positivo en la prueba de tinción de Gram, que tradicionalmente se usa para clasificar rápidamente a las bacterias en dos amplias categorías según su pared celular. Las bacterias Gram positivas retoman la tinción de cristal violeta utilizada en la prueba, y luego parecen ser de color púrpura cuando se observan a través de un microscopio. Esto se debe a que la capa gruesa de péptidoglicano en la pared celular bacteriana retiene la mancha después de eliminarla del resto de la muestra, en la etapa de decoloración de la prueba. Las bacterias Gram negativas no pueden retener la mancha violeta después de la etapa de decoloración; el decolorante utilizado en esta etapa degrada la membrana externa de las células Gram negativas, haciendo que la pared celular sea más porosa e incapaz de retener la mancha de cristal violeta. ^(88, 88).

Su capa de péptidoglicano es mucho más delgada e intercalada entre una membrana celular interna y una membrana bacteriana externa, lo que provoca que tomen la contra tinción (safranina o fucsina) y que aparezcan rojos o rosados. A pesar de su capa de péptidoglicano más gruesa, las bacterias Gram positivas son más receptivas a los antibióticos que las Gram negativas, debido a la ausencia de la membrana externa. Por otro lado, las bacterias Gram negativas son un grupo de bacterias que no retienen la tinción de cristal violeta utilizada en el método de tinción de Gram de diferenciación bacteriana. Se caracterizan por sus envolturas celulares, que están compuestas de una delgada pared celular de péptidoglicano intercalada entre una membrana celular citoplasmática interna y una membrana externa bacteriana. (85, 88).

Las bacterias Gram negativas se encuentran en todas partes, en prácticamente todos los entornos de la Tierra que son compatibles con la vida. Las bacterias gram negativas son un desafío médico importante, ya que su membrana externa los protege de muchos antibióticos (incluida la penicilina); detergentes que normalmente dañarían los péptidoglicanos de la membrana celular (interna); y lisozima, una enzima antimicrobiana producida por animales que forma parte del sistema inmune innato. Además, la membrana externa comprende un complejo lipopolisacárido (LPS) cuyo componente de lípido A puede causar una reacción tóxica cuando estas células son lisadas por las células inmunes. Esta reacción tóxica puede incluir fiebre, aumento de la frecuencia respiratoria y presión arterial baja, una afección potencialmente mortal conocida como shock séptico. (85, 88).

2.2.6.5. Fundamento de la Diferenciación.

La técnica, se basa en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. (74, 75).

La pared celular de las bacterias Gram (+), tienen una gruesa capa de péptidoglicano, las cuales retienen el colorante cristal violeta. Además, contiene dos clases de ácidos teicoicos, anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el péptidoglicano (mureína). Algunas de estas bacterias se rodean además de una cápsula de polisacáridos, cuya función puede ser adherencia. Por el contrario, la capa de péptidoglicano de las Gram (-) es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (membrana externa, hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido) por medio de lipoproteínas, la cual no retiene el colorante cristal violeta. Tiene una capa delgada de péptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. ^{(74, 75).}

Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a su pared celular. Esta diferencia la hace el péptidoglicano, ya que es el material que le da rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas. Así que la diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, esto se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. ^{(74, 75).}

La capa de péptidoglicano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiendo la coloración azul-violeta. Pero, por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de péptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violeta. ^{(74, 75).}

2.2.6.6. Factores que Alteran la Tinción.

La decoloración es el paso más importante en el procedimiento de la Tinción Gram. La decoloración puede verse afectada cuando el exceso de lavado del portaobjetos después de la adición del cristal violeta cristalizada da como resultado que las bacterias Gram positivas se tiñen incorrectamente de rojo. El tiempo que se aplica una mancha antes de enjuagarla también afecta la decoloración. Aunque 10 segundos es el tiempo típico de decoloración, el tiempo puede variar según la fuente de la muestra, así como el grosor del frotis. La sobre decoloración es evidente cuando las bacterias Gram positivas aparecen rosadas; la decoloración insuficiente dará como resultado que las bacterias Gramnegativas aparezcan como púrpuras. ⁽³²⁾

2.3. Formulación de Hipótesis.

2.3.1. Hipótesis General.

1. La Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena.

2.3.2. Hipótesis Específicas.

1. *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) tienen metabolitos primarios y secundarios.
2. La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano.
3. La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano

2.4. Operacionalización de Variables e Indicadores.

TABLA N° 08: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

V1: INDEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADORES	
Aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopus coccus</i> (Cochinilla).	Fitoquímica.	Solubilidad	
		Compuestos Químicos.	
V2: DEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADORES	
Tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano.	Visualización de la Morfología Celular.	BUENA	80 – 100%
		REGULAR	60 – 79%
		MALA	50 – 59%
	Diferenciación de Pared Celular.	BUENA	80 – 100%
		REGULAR	60 – 79%
		MALA	50 – 59%

2.5. Definición de Términos Básicos.

- **Validación:** Acción y efecto de validar. Es el proceso para confirmar que el procedimiento analítico utilizado para una prueba en concreto es adecuado para su uso previsto.
- **Extracto:** Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.
- **Citoplasma:** Consiste en una dispersión coloidal muy fina de aspecto granuloso, el citosol o hialoplasma, y en una diversidad de orgánulos celulares que desempeñan diferentes funciones.
- **Pared Celular:** Es una capa rígida que se localiza en el exterior de la membrana plasmática en las células de bacterias, hongos, algas y plantas. La pared celular protege los contenidos de la célula, da rigidez a la estructura celular, funciona como mediadora en todas las relaciones de la célula con el entorno y actúa como compartimiento celular. En las bacterias, la pared celular se compone de péptidoglicanos.
- **Cristal Violeta:** El violeta de metilo, comúnmente denominado cristal violeta o violeta de genciana, es el nombre dado a un grupo de compuestos químicos empleados como indicadores de pH y colorantes.

- **Safranina:** Es un colorante biológico, de contraste que se utiliza en la Tinción de Gram, tiñe de rosa a las bacterias Gram negativas.
- **Solubilidad:** Es la capacidad de una sustancia de disolverse en otra llamada solvente.
- **Solvente:** Es la sustancia que forma parte en mayor cantidad de una solución.
- **Metabolitos Secundarios:** Son los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios.
- **Tubérculo:** Es un tallo subterráneo modificado y engrosado donde se acumulan los nutrientes de reserva para la planta. Posee una yema central de forma plana y circular.
- **Cepa Bacteriana:** población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.
- **Cepas ATCC:** son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como laboratorio clínico, industrias: Alimentaria, Farmacéutica, Cosmética entre otras. Sus características genotípicas y fenotípicas garantizan la identidad del microorganismo.
- **Asa de Siembra:** Es un instrumento de laboratorio que consta de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina o en un arito de 5 mm o en punta.
- **Mordiente:** No es un colorante, Su función es intensificar la tinción debido a que aumenta la afinidad de la célula por el colorante.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Tipo y Nivel de la Investigación.

Tipo

Investigación aplicada por que mediante el uso de los colorantes del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular se podrá visualizar la morfología celular y diferenciar la pared celular presente en un frotis bacteriano. ⁽⁹⁷⁾.

Nivel de Investigación

Experimental: Mediante la extracción de los colorantes del Tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) y de la recolección de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y en condiciones rigurosamente controladas se visualizará la morfología y diferenciación de pared celular en un frotis bacteriano. ⁽⁹⁷⁾.

3.2. Diseño de la Investigación.

En relación al diseño experimental, se desarrollará de la siguiente manera:

3.2.1. Material Biológico

Del Tubérculo *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), se obtendrá un colorante 100% puro y natural, de tonalidad azul - morada. Del insecto *Dactylopius coccus* (Cochinilla), se obtendrá un colorante al 20%, de tonalidad roja – rojiza.

3.2.2. Materiales e Instrumentos de Laboratorio

- | | |
|---------------------------|--------------|
| - Tubo de Ensayo 13 X 100 | 30 Unidades. |
| - Pipeta 1 ml | 04 Unidades. |

- Probeta de 100 ml	04 Unidades.
- Matraz 250, 500 ml	04 Unidades.
- Bagueta	02 Unidades.
- Beaker 250 ml	06 Unidades.
- Balón 250 ml	02 Unidades.
- Placa Petri 15 X 100 mm	90 Unidades.
- Lámina Portaobjeto	30 Unidades.
- Embudo Chico	02 Unidades.
- Frasco Ambar con Tapa esmerilada	04 Unidades.
- Pera de Bromo Chico	03 Unidades.
- Mechero Bunsen	02 Unidades.
- Trípode	02 Unidades.
- Rejilla de Asbesto	02 Unidades.
- Asa de Khole	03 Unidades.
- Gradilla	03 Unidades.
- Espátula	02 Unidades.
- Micropipeta 0,5 - 10ul; 50ul – 200 ul.	02 Unidades.
- Balanza Analítica OHAUS	02 Unidad.
- Baño María Memmert Mod Typ WB 10	01 Unidad.
- Horno Memmert Mod Typ Tv 200	01 Unidad.
- Autoclave Nacional de 801	01 Unidad.
- Refrigerador	01 Unidad.
- Incubadora Memmert Mod Typ BE 200	01 Unidad.
- Microscopio	01 Unidad.
- Termómetro	01 Unidad.
- Hot Plate Termolyne Nuova II	01 Unidad.
- Licuadora	01 Unidad.
- Alcoholímetro	01 Unidad.
- Rotavapor	01 Unidad.
- Estabilizador	01 Unidad.

3.2.3. Reactivos Químicos

- Alcohol 98°	01 Litro.
---------------	-----------

- Metanol	0.5 Litros.
- Agua destilada	01 Litros.
- Acido clorhídrico 10%	0.1 Litros.
- Ácido sulfúrico concentrado	0.1 Litros.
- Amoniaco	0.1 Litros.
- Cloroformo	0.2 Litros.
- Sulfato de sodio	20 Gramos.
- Suero Fisiológico Estéril	0.5 Litros.
- Tricloruro de fierro.	20 mL
- Dragendorff.	20 mL
- Shinoda.	20 mL
- Lieberman burchard.	20 mL
- Borntranger.	20 mL
- Ninhidrina.	20 mL
- Gelatina.	20 mL
- Molish.	20 mL
- Mayer.	20 mL
- Fehling.	20 mL
- Rosenheim.	20 mL
- Cristal Violeta.	100 mL
- Safranina.	100 mL
- Lugol.	100 mL
- Acetona.	100 mL
- Aceite de Inmersión.	10 mL
- Alcohol Isopropílico.	100 mL
- Yodo	100 mL
- Yoduro de Potasio	100 mL
- Mezcla Sulfocrómica	200 mL
- Alcohol Amílico	100 mL

3.2.4. Estudio Fitoquímico

Con respecto al estudio Fitoquímico se utilizará la información del Libro Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de Productos Naturales de OLGA LOCK DE UGAZ. (33, 34, 38)

3.2.5. Estudio Microscópico

El estudio microscópico se realiza mediante el uso del microscopio óptico, consta de varios pasos a seguir:

Extensión – Fijación de la Muestra

Previo a la tinción bacteriológica, se procederá sobre un portaobjetos limpio, seco y desengrasado agregar una pequeña cantidad de suspensión de bacterias con el asa de siembra donde se realizará una extensión, luego una fijación del material biológico mediante el uso de la llama de un mechero de alcohol y se flameará hasta que se seque la muestra.

Técnica de Gram

Mediante el uso de la Técnica de Gram y mediante el uso del microscopio óptico, se realizará la visualización de la morfología celular bacteriana y la diferenciación entre bacterias Gram positivas (Color Morado) y Gram Negativas (Color rojo). (71, 74, 75, 82, 85, 88, 87). (Ver anexo: 07)

Técnica *Tropaeolum tuberosum* – *Dactylopius coccus*.

- a) Agregar colorante de Mashua por 5 minutos. (Colorante Inicial).
- b) Lavar con agua destilada pH: 7.
- c) Agregar Solución de Lugol por 3 minutos. (Mordiente).
- d) Decolorar con alcohol – acetona máx. por 10 segundos.
- e) Lavar con agua destilada pH: 7.
- f) Agregar Colorante de Cochinilla al 20% por 3 minutos (Colorante de Contraste).
- g) Lavar con agua destilada pH: 7.
- h) Secar, poner gota de aceite de cedro y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

3.3. Población y Muestra de la Investigación.

Población:

Se basa en muestras clínicas patológicas de rutina que se analizaron durante los meses de octubre, noviembre y diciembre del 2017 y enero del 2018 en el Área de Microbiología del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L. de las cuales se aislaron cepas bacterianas identificadas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Muestra:

La muestra de estudio se basa en cepas bacterianas identificadas en el Área de Microbiología del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L. como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Asimismo para determinar el tamaño de la muestra se utilizó el muestreo proporcional cuya fórmula se precisa a continuación:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{e^2 \cdot (N - 1) + p \cdot q \cdot Z^2}$$

Donde Z^2 = intervalo de confianza (0.95) o 95% Valor tabular: $(1.96)^2 = 3.8416$

P = proporción de aciertos (0.50)

Q = proporción de desaciertos (1 - p)

N = población total: 5

e^2 = margen de error calculado (0.035) o $(3.5\%)^2 = 0.001225$

m = muestra: 4.97

Criterios de Inclusión

Todas las muestras clínicas patológicas de pacientes que fueron analizadas en el Área de Microbiología del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L durante los meses de octubre a diciembre del 2017 y enero del 2018 y de los cuales se aislaron cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Se consideran las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* tanto Intrahospitalario como el adquirido en la comunidad.

Criterios de Exclusión

Todas las muestras clínicas Patológicas de pacientes con previa administración de Antibióticos.

3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.

3.4.1. Descripción de los Instrumentos.

La técnica usada para la recolección de datos es Observacional. Mediante el cual se registró los datos obtenidos durante el proceso de la investigación en las tablas de recolección de datos, desde la obtención de los compuestos químicos hasta los resultados finales el cual nos ayudó a evidenciar el objetivo principal de nuestro proyecto. Asimismo los instrumentos (ad-hoc) fueron: Tabla N° 11: De Solubilidad, donde se evidenció la solubilidad en los diversos solventes. Tabla N° 12: De Identificación de Metabolitos, donde se evidenció la presencia de compuestos químicos y las Tabla N° 14 y 15: De Evaluación de las Láminas, donde se evidenció la visualización de la morfología celular bacteriana y diferenciación de pared celular entre Gram positivos y negativos. (Ver anexo: 02)

3.4.2. Validación de Instrumentos.

Los instrumentos (ad-hoc) de la presente investigación fueron elaborados por los autores de la tesis para la prueba de estudio y su validación se realizó a través de la técnica del juicio de expertos. Las tablas de evaluación se realizaron en base a los indicadores con sus respectivos criterios, dicho juicios de expertos tuvo una mínima y máxima calificación (Ver anexo: 06) Los expertos fueron tres Químicos Farmacéuticos, que ostentan grado académico de magister y cuentan con amplia experiencia en la investigación.

TABLA N° 09: RESUMEN DE RESULTADOS JUICIO DE EXPERTOS

JUEZ EXPERTO	RESULTADOS	CONDICION
Mg. John Ponce Pardo.	90 – 100%	Válido, Aplicar.
Q.F. Mario Neuman Pineda Pérez.	90 – 100%	Válido, Aplicar.
Q.F. Oscar Bernuy Flores López.	90 – 100%	Válido, Aplicar.

Dicha revisión dio como resultado que el instrumento fuese considerado valido y aplicable presentándose concordancia entre los tres expertos.

3.5. Técnicas Para el Procesamiento de Datos.

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Excel.

3.6. Procedimiento Experimental

3.6.1. Identificación de las Muestras en Estudio.

La identificación taxonómica del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), se realizó en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el sistema de clasificación de Cronquist (1988), obteniéndose el documento de Certificación de muestra. (Ver anexo: 03). Asimismo al solicitar la taxonomía del *Dactylopius coccus* (Cochinilla), el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, indicó que no realizaban mencionada taxonomía, solo le pudieron realizar al *Opuntia ficus-indica* L. Mill. (Penca de Tuna), donde la muestra de Cochinilla estaba alojada. (Ver anexo: 03).

3.6.2. Obtención de los Colorantes.

Se recolectaron 5 kilos del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* (Mashua). La muestra, se envolvió con papel kraft y se embolsó en cajas de cartón con su respectivo rótulo.

La muestra se transportó al laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, donde se eliminó las sustancias extrañas presentes en la muestra.

Se utilizaron 1600 gramos de tubérculo, los cuales se sometieron en extractor Thomas TH-2880i / TH-2880iR y posterior filtración utilizando papel Whatman N° 41 y N° 2. Se obtuvo 1230 mL de colorante, los cuales fueron sometidos a deshidratación y secado a una temperatura de 40°C por 10 horas, obteniéndose 1000 mL del colorante. (Ver anexo: 02). Asimismo, la extracción del ácido carmínico, se realizó en medio acuoso y se utilizó 20 gramos de cochinilla y posterior filtración utilizando papel Whatman N° 41 y N° 2, obteniendo una solución al 20%. (Ver anexo: 02).

3.6.3. Solubilidad y Análisis de Compuestos Químicos (Metabolitos).

Ambos colorantes, se sometieron a pruebas de solubilidad en solventes de polaridad creciente, con el fin de determinar el solvente más adecuado para la evaluación de las Tinciones bacterianas. (Ver anexo: 02). Las muestras obtenidas, fueron sometidas con reactivos de coloración y precipitación para lo cual agregamos a cada tubo de ensayo 4 gotas de las muestras y agregamos 2 – 3 gotas de reactivo. (Ver anexo: 02).

TABLA N° 10: DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	PROCEDIMIENTO
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo de Molish agitar + III gotas de H ₂ SO ₄ cc.
		Antrona.	Coloración verde.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo de Antrona.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.	X gotas de MP + III gotas de Fehling A+ III gotas de Fehling B + calentar en B.M.
2	Compuestos Feróricos	FaCb.	Coloración verde o azul.	X gotas de MP + III gotas de FaCb 10%
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.	X gotas de MP + III gotas de gelatina.
4	Antocianinas y Flavonoides Catóxicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo Rosenheim.

TABLA N° 10: DETERMINACIÓN DE METABOLITOS (Continuación)

N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	PROCEDIMIENTO
5	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, aurones, isoflavonoides: No hay coloración.	X gotas de MP + 1-2 virutas de Mg metálico + III gotas de HCl cc
			Isoflavonoides: Amarillo rojizo.	
			Flavanonoides: Rojo a magenta.	
			Flavonas y flavonoides: Amarillo a rojo.	
6	Aminoácidos Líbros y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violetea.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo Ninhidrina + calentar en B.M. 10 min.
7	Alcaloides	Dregendorff.	Precipitado naranja.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Dregendorff.
		Mayer.	Precipitado blanco.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Mayer.
		Bertrand.	Precipitado blanco.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Bertrand.
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Sonnenschein.
8	Nitroquinonas, Antraquinonas y Antrónonas	Bomtranger.	Coloración roja.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo de Bomtranger.
9	Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: Verde-azul.	X gotas de MP + llevar a sequedad en B.M. + X gotas de cloroformo+ III gotas de anhídrido acético+ H ₂ SO ₄ cc en zona (por las paredes de tubo) sin agitar.
			Triterpenoides: Rojo-naranja.	
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.	1 mL de MP + 5 mL de agua destilada = agitar fuertemente por 1 min.
11	Glicósidos	Baeyer.	Coloración anaranjada.	X gotas de MP + V gotas de Ácido pícrico 1% + V gotas de NaOH al 5 %.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.	X gotas de MP + V gotas de Nitroprusiato de sodio 0.5% + V gotas de KOH 2N.
13	Cumelinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.	X gotas de MP + papel humedecido con NH ₄ OH cc en boca de tubo + calentar por 5 a 10 min en B.M.
14	Ácido Camánico	BaCb 2%.	Violeta Mate	X gotas de MP + V gotas de Cloruro de bario 2%.

3.6.4. Reactivación de las Bacterias:

Para la reactivación de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y de *Escherichia coli* ATCC 8739, se procedió a descongelar los tubos que contienen las bacterias a temperatura ambiente durante 2 horas, con la ayuda de un par de hisopos transportamos parte de las cepas a los tubos de ensayo con caldo nutritivo para realizar la reactivación de las bacterias, para luego ponerlas a incubar a una temperatura de 37°C por 24 horas. (Ver anexo: 04).

**CAPITULO IV
PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

4.1. Presentación de Resultados

Prueba de Solubilidad.

Los resultados son los siguientes:

TABLA N° 11: PRUEBA DE SOLUBILIDAD

N°	Solventes	Nomenclatura	Interpretación	
			<i>Tropaeolum tuberosum</i>	<i>Dactylopius coccus</i>
1.	Acetato de etilo	EtOAc	-	-
2.	Acetona	Me ₂ CO	-	-
3.	Agua destilada	H ₂ O	+++	++++
4.	Cloroformo	CHCl ₃	-	-
5.	Etanol	Et(OH)	++	+
6.	Eter de petróleo	EP	-	-
7.	Eter etílico	Et ₂ O	-	-
8.	Metanol	MeOH	-	+
9.	n - butanol	n.buOH	-	-
10.	n - Hexano	Hex	+++	++

LEYENDA:

- Insoluble (-)
- Ligeramente Soluble (+)
- Soluble (+++)
- Muy Soluble (++++)

FUENTE: Elaboración propia.

Al realizar la prueba de solubilidad de ambas muestras, se trabajó con un grupo de solventes ordenados de acuerdo a su polaridad, asimismo se encontró que la mayor solubilidad fue con el solvente agua.

Identificación de Metabolitos.

TABLA N° 12: IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS



N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	Interpretación	
				<i>Tropaeolum tuberosum</i>	<i>Dactylopius coccus</i>
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.	++	-
		Antrona.	Coloración verde.	+	-
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.	++	-
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ .	Coloración verde o azul.	Verde +	-
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.	++	-

FUENTE: Elaboración propia.

TABLA N° 12: IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS (Continuación)

N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	Interpretación	
				<i>Tropaeolum tuberosum</i>	<i>Dactylopius coccus</i>
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.	-	-
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.	-	+
			Flavanonoles: Rojo a magenta.	+++	-
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.	-	-
5	Antocianinas y Flavonoides Catécolicos	Rosenhelm.	Coloración rojo oscuro.	+	+
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.	+++	-
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.	+	-
		Mayer.	Precipitado blanco.	-	-
		Bertrand.	Precipitado blanco.	-	+
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.	-	-
8	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Bontrager.	Coloración roja.	-	-
9	Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: verde-azul.	-	-
			Triterpenoides: rojo-naranja.	+	++
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.	-	-
11	Glicósidos	Baljet.	Coloración anaranjada.	-	+
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.	-	-
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.	-	-
14	Ácido Camínico	BaCl ₂ 2%.	Violeta Mate	0	+++

LEYENDA:

- No realizada (0)
- Ausente (-)
- Leve (+)
- Moderado (++)
- Abundante (+++)

FUENTE: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos durante la identificación de los metabolitos del *Tropaeolum tuberosum*, se obtuvo en mayor cantidad: Flavanonoles, Aminoácidos Libres y Grupos Amino y con respecto al *Dactylopius coccus*, se obtuvo: Triterpenoides, Esteroides y Ácido Camínico.

Tinciones Bacterianas.

Se realizó la extensión, fijación y tinción de 64 láminas, las cuales se reportan en la Tabla N° 13. Del total de láminas que fueron coloreadas, 16 corresponden a la Tinción Gram, 16 a la Tinción con *Tropaeolum tuberosum*, 16 a la Tinción con *Dactylopius coccus* y 16 a la Tinción con *Tropaeolum tuberosum* - *Dactylopius coccus*, las que se distribuyeron en 08 láminas por cada tipo de cepa y tipo de colorante.

TABLA N° 13: NÚMERO DE LÁMINAS OBTENIDAS SEGÚN TIPO DE CEPA Y TINCIÓN

N°	TIPO DE CEPA	TINCIÓN				TOTAL
		Gram	<i>Tropaeolum tuberosum</i>	<i>Dactylopius coccus</i>	<i>Tropaeolum tuberosum</i> - <i>Dactylopius coccus</i>	
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8	8	8	8	32
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	8	8	8	8	32
TOTAL		16	16	16	16	64

FUENTE: Elaboración propia.

El total de láminas coloreadas fueron 64, distribuyéndose según el tipo de cepa: 32 corresponden a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y 32 a *Escherichia coli* ATCC 8739.

Los resultados de la evaluación microscópica se presentan en las tablas N° 14 y N° 15, en las que se aprecian los dos criterios de evaluación que fueron: la visualización de la morfología celular bacteriana y la diferenciación de pared celular, dando como resultado para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 8739 Mala, lo que significa que la calidad de las tinciones registradas se encuentran en un intervalo de 50 a 59%.

En la tabla N° 14, se evaluó la tinción para mashua 100% - cochinilla 20%, obteniéndose para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 un 62.5% de láminas con el calificativo de Malo y 25% de láminas con calificativo de Regular.

TABLA N° 14: EVALUACIÓN DE LAS LÁMINAS *Staphylococcus aureus*
ATCC 6538.

VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.		TINCIÓN MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		TINCIÓN DE GRAM	
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	00	00%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	03	25%	00	00%
MALA	50 – 59%	05	62.5%	00	00%
TOTAL		08	100%	08	100%
DIFERENCIACIÓN PARED CELULAR ENTRE GRAM POSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS		TINCIÓN MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		TINCIÓN DE GRAM	
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	00	00%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	03	25%	00	00
MALA	50 – 59%	05	62.5%	00	00
TOTAL		08	100%	08	100%

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla N° 15, se evaluó la tinción para mashua 100% - cochinilla 20%, obteniéndose para *Escherichia coli* ATCC un 62.5% de láminas con el calificativo de Malo, 25% Regular y 12.5% Bueno. Asimismo, en el criterio diferenciación 62.5% de láminas con el calificativo de Malo y 37.5% Regular.

TABLA N° 15: EVALUACIÓN DE LAS LÁMINAS *Escherichia coli* ATCC
8739.

VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.		TINCIÓN MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		TINCIÓN DE GRAM	
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	01	12.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	02	25%	00	00%
MALA	50 – 59%	05	62.5%	00	00%
TOTAL		08	100%	08	100%
DIFERENCIACIÓN PARED CELULAR ENTRE GRAM POSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS		TINCIÓN MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		TINCIÓN DE GRAM	
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	00	00%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	03	37.5%	00	00
MALA	50 – 59%	05	62.5%	00	00
TOTAL		08	100%	08	100%

FUENTE: Elaboración propia.

Se realizó la extensión, fijación y tinción de 60 láminas las cuales se reportan en la Tabla N° 16. Del total de láminas que fueron coloreadas, 30 corresponden a la Tinción Gram y 30 a la Tinción con *Tropaeolum tuberosum* - *Dactylopius coccus*, las que se distribuyeron en 03 láminas por cada tipo de cepa de paciente y tipo de colorante.

TABLA N° 16: NÚMERO DE LÁMINAS OBTENIDAS SEGÚN TIPO DE CEPA DE PACIENTE Y TINCIÓN

N°	TIPO DE CEPA DE PACIENTE	TINCIÓN		TOTAL
		Gram	<i>Tropaeolum tuberosum</i> - <i>Dactylopius coccus</i>	
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	6
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	6
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	6
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	6
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	6
6	<i>Escherichia coli</i>	3	3	6
7	<i>Escherichia coli</i>	3	3	6
8	<i>Escherichia coli</i>	3	3	6
9	<i>Escherichia coli</i>	3	3	6
10	<i>Escherichia coli</i>	3	3	6
TOTAL		30	30	60

FUENTE: Elaboración propia.

El total de láminas coloreadas fueron 60, distribuyéndose según el tipo de cepa de paciente: 30 corresponden a *Staphylococcus aureus* y 30 a *Escherichia coli*.

Los resultados de la evaluación microscópica de las cepas de los pacientes se presentan en las tablas N° 17 y N° 18, en las que se aprecian los dos criterios de evaluación que fueron; la visualización de la morfología celular bacteriana y la diferenciación de pared celular, dando como resultado para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC Mala, lo que significa que la calidad de las tinciones registradas se encuentran en un intervalo de 50 a 59%.

En la tabla N° 17, se evaluó la tinción para mashua 100% - cochinilla 20%, obteniéndose para *Staphylococcus aureus* un 76.5% de láminas con el calificativo de Malo y 23.5% de láminas con calificativo de Regular.

TABLA N° 17: EVALUACIÓN DE LAS LÁMINAS *Staphylococcus aureus*.

VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.		TINCIÓN		TINCIÓN DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%			
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	00	00%	15	100%
REGULAR	60 – 79%	03	20%	00	00%
MALA	50 – 59%	12	80%	00	00%
TOTAL		15	100%	15	100%
DIFERENCIACIÓN PARED CELULAR ENTRE GRAM POSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS		TINCIÓN		TINCIÓN DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%			
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	00	00%	15	100%
REGULAR	60 – 79%	04	27%	00	00%
MALA	50 – 59%	11	73%	00	00%
TOTAL		15	100%	15	100%

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla N° 18, se evaluó la tinción para mashua 100% - cochinilla 20%, obteniéndose para *Escherichia coli* un 63.5% de láminas con el calificativo de Malo y 36.5% de láminas con calificativo de Regular.

TABLA N° 18: EVALUACIÓN DE LAS LÁMINAS *Escherichia coli*.

VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.		TINCIÓN		TINCIÓN DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%			
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	00	00%	15	100%
REGULAR	60 – 79%	05	33%	00	00%
MALA	50 – 59%	10	67%	00	00%
TOTAL		15	100%	15	100%
DIFERENCIACIÓN PARED CELULAR ENTRE GRAM POSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS		TINCIÓN		TINCIÓN DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%			
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	00	00%	15	100%
REGULAR	60 – 79%	06	40%	00	00%
MALA	50 – 59%	09	60%	00	00%
TOTAL		15	100%	15	100%

FUENTE: Elaboración propia.

1.1. Contrastación de la Hipótesis

Hipótesis Específica 1

- H_1 : La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano.
- H_0 : La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular no presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano.
- Mediante la técnica de tinción mashua 100% - cochinilla 20%, para las cepas de *Staphylococcus aureus* un 80% de láminas resultaron con el calificativo de Malo y 20% de láminas con calificativo de Regular y para las cepas de *Escherichia coli* un 67% de láminas resultaron con el calificativo de Malo y 33% de láminas con calificativo de Regular. En ambos caso se tuvo como referencia la tinción gram.
- **Decisión:** Por lo tanto se rechaza la hipótesis alterna (H_1).

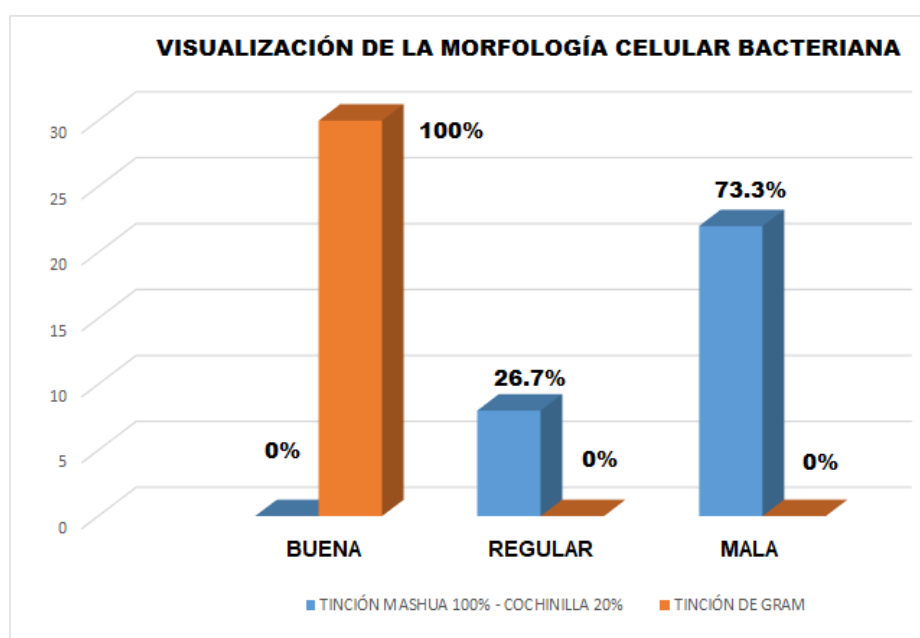
Hipótesis Específica 2

- H_2 : La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano.
- H_0 : La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular no presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano.
- Mediante la técnica de tinción mashua 100% - cochinilla 20%, para las cepas de *Staphylococcus aureus* un 73% de láminas resultaron con el calificativo de Malo y 27% de láminas con calificativo de Regular y para las cepas de *Escherichia coli* un 60% de láminas resultaron con el calificativo de Malo y 40% de láminas con calificativo de Regular. En ambos caso se tuvo como referencia la tinción gram.

- **Decisión:** Por lo tanto se rechaza la hipótesis alterna (H_2).

Hipótesis General

- H_G : La Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena.
- H_{G0} : La Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano no es buena.



- Figura N° 10: Visualización de la Morfología Celular Bacteriana

- Mediante la técnica de tinción mashua 100% - cochinilla 20%, para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* un 73.3% de láminas resultaron con el calificativo de Malo y 26.7% de láminas con calificativo de Regular con relación al criterio visualización de la morfología celular bacteriana y un 66.7% de láminas resultaron con el calificativo de Malo y 33.3% de láminas con calificativo de Regular con relación al criterio de diferenciación de pared celular entre gram positivos y gram negativos. En ambos caso se tuvo como referencia la tinción gram.

- **Decisión:** Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y habiéndose rechazado las hipótesis alternas H_1 y H_2 , se rechaza la hipótesis alterna de la hipótesis general de estudio.

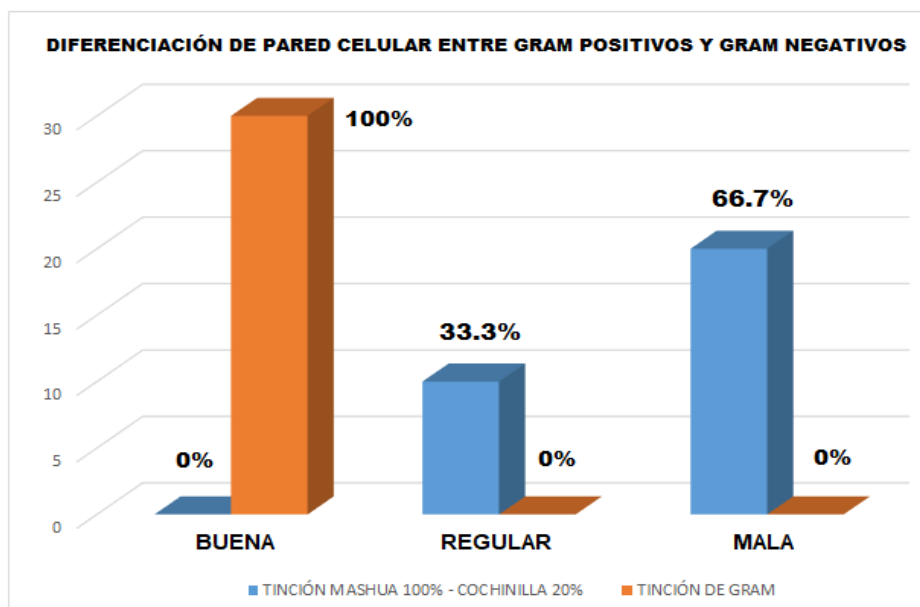


Figura N° 11: Diferenciación de Pared Celular entre Gram Positivos y Gram Negativos

1.1. Discusión de Resultados

En el presente estudio se evaluó, si la Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena.

La presunción exitosa de los metabolitos de la mashua y cochinilla depende de gran medida del tipo de solvente utilizado en el procedimiento de extracción, tradicionalmente los incas y otras culturas peruanas utilizaron agua como disolvente, en nuestro estudio al realizar la prueba de solubilidad se confirmó la amplia solubilidad de nuestras muestras en agua. (Suquilanda, 2018; Manrique, *et al.*, 2013; Jacobo, 2006).^{1, 13, 57}

Durante el estudio de los compuestos químicos del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla).

Se obtuvo como resultado la presencia de metabolitos primarios y secundarios. Para el *Tropaeolum tuberosum*, se obtuvo en mayor cantidad: Flavanonoles, Aminoácidos Libres y Grupos Amino y con respecto al *Dactylopius coccus*: Triterpenoides, Esteroides y Ácido Carmínico. Quienes en conjunto son los responsables de darles el color a las especies estudiadas, de esta forma podemos confirmar los resultados reportados por Bustincio, 2014; Samaniego, 2010; Pacheco, 2015; Agreda, 2009; Vera, 2014. ^{2, 9, 16, 36, 68.}

Los tubérculos del *Tropaeolum tuberosum*, fueron triturados y extraídos en extractor Thomas TH-2660i / TH-2660iR y posterior filtración, se creyó por conveniente trabajar sin utilizar solventes adicionales para la extracción del colorante, debido a que el uso de otras sustancias químicas podrían interferir en la visualización de la morfología y diferenciación de la pared celular bacteriana. (Castillo, *et al.*, 2006; Uriol, 2004; Morales, 2018; López *et al.*, 2018). ^{60, 66, 74, 75, 96.}

Al realizar la técnica de tinción mashua 100% - cochinilla 20%, para las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 8739 un 6.25% de láminas resultaron con el calificativo de Bueno y un 31.25% de Regular con relación al criterio visualización de la morfología celular bacteriana; asimismo un 0.0% de Bueno y 37.5% de Regular para la diferenciación de pared celular entre gram positivos y gram negativos.

La posible causa debe ser por la poca concentración e intensidad del colorante del *Tropaeolum tuberosum*, según Inostroza, *et al.*, 2015. En su investigación los tubérculos del *Tropaeolum tuberosum* fueron triturados y homogeneizados con una solución de extracción de ácido clorhídrico 1,5 N y etanol al 96%, siendo la proporción de sólido a disolvente de (1:2, p/v).

La mezcla obtenida se puso en maceración por 72 horas a 4°C, en un frasco de color ámbar, con agitación diaria, posterior filtración y concentración en un evaporador rotatorio a 40°C. Del mismo modo concluyó que posee actividad antioxidante y es una alternativa colorante de color morado. ^{29, 50, 51.}

Se preparó una solución al 20% p/v con el polvo del *Dactylopius coccus*, para obtener el ácido carmínico, se creyó por conveniente trabajar sin utilizar solventes adicionales para la extracción del colorante, debido a que el uso de otras sustancias químicas podrían interferir en la visualización de la morfología y diferenciación de la pared celular bacteriana. (Manosalva, 2017; Velásquez, 2015; Pazmiño, *et al.*, 2010; Sacsquispe, *et al.*, 2001; Santa Cruz, 2014).^{50, 51, 52, 90, 95.}

Del mismo modo, se decidió utilizar *Dactylopius coccus* al 20%, debido a los estudios realizados por Manosalva, 2017, donde utilizó el colorante al 10%.^{50.}

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. La Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano no es buena.
2. El *Tropaeolum tuberosum* y el *Dactylopius coccus*, poseen metabolitos primarios y secundarios, mayoritariamente Flavanonoles, Aminoácidos Libres y Grupos Amino y Triterpenoides, Esteroides y Ácido Carmínico respectivamente.
3. La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular no presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano.
4. La aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la tinción de pared celular no presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano.

5.2. Recomendaciones

1. Realizar estudios posteriores, teniendo en cuenta los lineamientos de Inostroza, *et al.*, 2015.
2. Realizar las tinciones bacterianas utilizando otras cepas bacterianas.
3. Trabajar con concentraciones de cochinilla mayores al 20%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suquilanda M. Producción Orgánica de Cultivos Andinos [sitio en internet]. Ecuador; [citado el 12 de junio 2018]. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/mountain_partnership/docs/1_produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf
2. Bustincio J. Evaluar el rendimiento de almidón, la capacidad de antioxidante en el proceso de tuberización en 10 accesiones de Isaño (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2014.
3. Cueva K, Groten U. Saberes y Prácticas Andinas. 1 ed. Ecuador: EcoCiencia; 2010.
4. Grau A, Ortega R, Nieto C, Hermann M. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 25. 1 ed. Italy: International Plant Genetic Resources Institute; 2003.
5. Espín C. Aporte al rescate de la Mashua aplicando técnicas de cocina de vanguardia [Tesis para optar el título de Licenciada en Gastronomía]. Cuenca: Universidad De Cuenca; 2013.
6. Almeida P. Estudio de la Mashua y propuesta de cocina de autor [Tesis para optar el título de Ingeniería en Gastronomía]. Quito: Universidad Internacional del Ecuador; 2014.
7. Lara M. Deshidratación de Mashua *Tropaeolum tuberosum* para la obtención de hojuelas [Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial]. Ibarra: Universidad Técnica del Norte; 2017.
8. Ramallo R. Análisis Exploratorio de los Ácidos Grasos del Isaño (*Tropaeolum tuberosum*). UPB-Inv. & Desa. 2004 Dic; 1 (4): 49 – 53.
9. Samaniego L. Caracterización de la Mashua (*Tropaeolum tuberosum* C.) [Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrialización de Alimentos]. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial; 2010.
10. Chan J. Eficacia Antioxidante de los Compuestos Fenólicos de la Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) en la Estabilidad del aceite de linaza (*Linum usitatissimum* L.) [Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2015.

11. Huamaní R. Caracterización Bromatológica, Microbiológica y Sensorial del Néctar de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) [Tesis para optar el título Profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Huancavelica: Universidad Nacional de Huancavelica; 2014.
12. Cruz J, Valverde M, Ybañez R. Efecto del extracto acuoso de *Tropaeolum tuberosum* "Mashua" sobre el deterioro de la memoria y lipoperoxidación inducida con fuoxetina en hígado en *Rattus rattus*. var. *Albinus* ooforectomizadas. *Rev. Perú Med. Integr.* 2017 Jul; 2 (2): 119 – 125.
13. Manrique I, Arbizu C, Vivanco F, Gonzales R, Ramírez C, Chávez O, et al. *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. 1 ed. Lima: Centro Internacional de la Papa; 2013.
14. Cruz A, Morillo Y, Tovar Y. Caracterización Molecular de Cubios (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) en el departamento de Boyacá. *Rev. De Cie. Agr.* 2016 Jun; 33 (2): 32 - 42.
15. Aire G, Charaja R, De La Cruz H, Guillermo B, Gutarra M, Huamaní P, et al. Efecto de *Tropaeolum tuberosum* frente a la Hiperplasia Prostática Benigna Inducida en Ratas Holtzman. *Rev. Cimel.* 2013 Set; 18 (1): 3 – 9.
16. Pacheco E. Caracterización Morfológica y Molecular de Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) de los Departamentos de Cusco y Cajamarca [Tesis para optar el Grado de Magister Scientiae]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2015.
17. Cuya R. Efecto de Secado en Bandeja y Atomización sobre la Actividad Antioxidante de la Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) [Tesis para optar el Grado de Magister Scientiae]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2009.
18. Urresta B. Evaluación del Valor Nutricional de la Harina de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) en Dietas para Pollos de engorde [Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial]. Quito: Escuela Politécnica Nacional; 2010.
19. Quispe C, Mansilla R, Chacón A, Blas R. Análisis de la Variabilidad Morfológica del "Añu" *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón procedente de nueve Distritos de la Región Cusco. *Rev. Ecol. Aplic.* 2015 Nov; 14 (2): 211-222.
20. Cahuana R. Colección y Caracterización Morfológica de Entradas de Mashua (*Tropaeolum tuberosum* L.) del Valle Del Mantaro [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo]. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2014.

21. Bulacio E, Ayarde H. Aspectos Ecológicos y Distribución de *Tropaeolum tuberosum* spp. silvestre (Tropaeolaceae) en Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 2012 Nov; 47 (1-2): 97 - 101.
22. Poma L, Paz C. Efecto Antimicrobiano del Extracto de Cubio (*Tropaeolum tuberosum*) frente a *Listeria monocytogenes* en Carne de Hamburguesa [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero de Alimentos]. Bogotá: Universidad de la Salle de Colombia; 2017.
23. Aruquipa R, Trigo R, Bosque H, Mercado G, Condori J. El Isaño (*Tropaeolum tuberosum*) un Cultivo de Consumo y Medicina Tradicional en Huatacana para el Beneficio de la Población Boliviana. Rev. Inv. Inn. Ag. Re. Nat. 2017 Jul; 3 (2): 146 - 151.
24. Flores C. Evaluación de la Aceptabilidad Organoléptica y Capacidad Antioxidante de una Bebida Alcohólica no Fermentada, Formulada con Extracto Fenólico de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) Púrpura [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2015.]
25. Pacco W. Evaluación del Efecto del Soleado y la Cocción en la Capacidad Antioxidante del Puré Deshidratado de Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2015.
26. García D. La Comparación de Espesante de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) y Oca (*Oxalis tuberosa*) en el Desarrollo de Tecnología de Gomitas [Tesis para optar el título profesional de Ingeniera en Alimentos]. Ambato: Universidad Técnica de Ambato; 2016.
27. Díaz L, Garzón D. Capacidad Antimicrobiana del Extracto de la parte aérea de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero de Alimentos]. Bogotá: Universidad de la Salle de Colombia; 2017.
28. Beltrán A, Mera J. Elaboración del Tubérculo Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) troceada en miel y Determinación de la capacidad antioxidante [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2014.

29. Inostroza L, Américo J, Hernández E, Carhuapoma M, Yuli R, Collado A, et al. Actividad Antioxidante de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (Mashua) y su Aplicación como Colorante para Yogur. Rev. Cien. E Invest. 2015 Nov; 18 (2): 83 - 89.
30. Arias M. Análisis y comparación de los Glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de Cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora subterranea* [Tesis para optar el Grado de Magister]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
31. Del Carpio J, Del Carpio P. Estudio de Pre Factibilidad para la Instalación de una Planta de Fabricación de Cápsulas Naturales de Mashua en la Ciudad de Puno, Arequipa [Tesis para optar el Título de Licenciado]. Arequipa: Universidad Católica San Pablo; 2016.
32. Rodríguez D. Elaboración de una Compota a Partir de Mashua Blanca (*Tropaeolum tuberosum*) y Camote Morado (*Ipomoea batatas*) utilizando dos tipos de endulzantes (Miel de abeja y Panela) a tres concentraciones [Tesis para optar el Título de Ingeniero Agroindustrial]. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; 2013.
33. Lock O. Investigación fitoquímica. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 1994.
34. Ganoza M. Fundamentación Química de las Reacciones de coloración y Precipitación en la identificación de Metabolitos Secundarios de Plantas Medicinales. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, 2001.
35. Kuklinski C. Farmacognosis: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1 ed. Omega S.A; Barcelona, 2000.
36. Agreda M. Evaluación de Seis Métodos para la Extracción de Acido Carmínico Obtenida a partir de Cochinilla (*Dactylopius coccus*) según condiciones de Laboratorio [Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2009.
37. Ortega V. Comparación del rendimiento del Acido Carmínico entre dos procesos de deshidratación de la Cochinilla de tunas cultivadas en Guano [Tesis para optar el Título de Bioquímico Farmacéutico]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.

38. Téllez A. Solubilización y Estabilidad de las Microemulsiones del Colorante Natural Neocandénatoná [Tesis para optar el Grado de Maestra]. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2010.
39. Pérez S, Cuen M, Becerra R. Nocheztli: El Insecto del Rojo Carmín. Bol. Conabio – Biod. 2001 May; 6 (36): 1 - 8.
40. De la Cruz F, García F, Del Río I, Lanz H. La Cochinilla fina del Nopal, Colorante Mexicano para el Mundo. Rev. Ciencias. 2005 Oct; 2 (12): 78 - 87.
41. Del Río I. Grana Fina Cochinilla. 1 ed. Provedora Gráfica de Oaxaca S.A; Oaxaca, 2006.
42. Colla M. Tres Colores de Malla y Tres Periodos de Sombreado en la Producción de cochinilla de Carmín (*Dactylopius coccus costa*) en el Cultivo de Tuna (*Opuntia ficus indica*) en zona Subtropical Arido [Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2015.
43. Galicia M. Estudio de la Compatibilidad de Colorantes derivados del Acido Carmínico en resina Poliéster Cristal y Poliuretano [Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico Industrial]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2014.
44. Arroyo G, Ruiz G, Vargas L, Gonzales G. Aplicación de Productos Derivados del Insecto *Dactylopius coccus Costa* (Homóptera, Dactylopiidae). Act. Univer. 2010 Dic; 20 (3): 51 - 55.
45. Sánchez R. La Química del Color en los Alimentos. Rev. Quí. Viv. 2013 Dic; 12 (3): 234 - 246.
46. Garzón G. Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos. Rev. Act. Biol. Colomb. 2008 May; 13 (3): 27 - 36.
47. Céspedes M. Optimización del Proceso de Obtención de Acido Carmínico a partir de Cochinilla (*Dactylopius coccus*) [Tesis para optar el Título de Licenciado en Ingeniería en Industria de Alimentos]. Cochabamba: Universidad Indígena Boliviana; 2016.
48. López M. Relación entre Métodos de Secado de Cochinilla Silvestre (*Dactylopius spp*) y el rendimiento de Acido Carmínico [Tesis para optar el Título de Licenciado Biología]. Guadalajara: Universidad de Guadalajara; 2005.

49. Torró E. Caracterización Química y Estudios Preliminares de las Propiedades Mecánicas del Efecto de los Procesos de Tinción con Cochinilla en Tejido de Algodón [Tesis para optar el Grado de Maestro]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2008.
50. Manosalva D. Uso del Colorante Natural Ácido Carmínico al 10% obtenido de *Dactylopius coccus* (Cochinilla), en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de Coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de riñón de ovinos, Cajamarca [Tesis para optar el Título profesional de Médico Veterinario]. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca; 2017.
51. Velásquez C. Uso del Colorante Natural Carmín - Ácido Carmínico, Obtenido de la Cochinilla (*Dactylopius coccus*), en la Técnica de Coloración Hematoxilina Eosina en Tejidos de Hígado de Ovino – Cajamarca [Tesis para optar el Título profesional de Médico Veterinario]. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca; 2015.
52. Pazmiño A, Abril R. Estudio y Diseño Experimental en la Determinación del Porcentaje de Ácido Carmínico en la Cochinilla (*Coccus cactus*) Provincia de Santa Elena [Tesis para optar el Título profesional de Ingeniero Químico]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2010.
53. Quelca E. Estudio de las Variables de Operación en el Teñido de Fibras mediante la Aplicación de Colorante a Base de la Cochinilla [Tesis para optar el Título de Licenciado en Química Industrial]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2012.
54. Ojeda G. Teñido de fibra de Abacá (*Musa textilis*) utilizando colorante extraído de la Cochinilla (*Dactylopius coccus Costa*) [Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico]. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja; 2012.
55. Centeno M. Extracción, Estabilización y Evaluaciones Analíticas del Carmín [Tesis para optar el Grado de Maestra]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2003.
56. Arroyave M, Gómez P. Elaboración de un Producto con Base en Colorantes Naturales para Teñir el Cabello [Tesis para optar el Título de Ingeniero de Procesos]. Medellín: Universidad EAFIT; 2006.

57. Jacobo F. Determinación de un Medio Acuoso Óptimo para la Extracción de Ácido Carmínico desde la Cochinilla en el Proceso de Elaboración de Carmín [Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2006.
58. Paredes B. Análisis y Obtención de Colorante Natural a partir de la *Baccharis latifolia* (Chilca) [Tesis para optar el Título de Ingeniero Textil]. Ibarra: Universidad Técnica del Norte; 2002.
59. Martín J, Pérez D, Orozco M. Evaluación de Colorantes de Origen Vegetal y su Aplicación en el Tinturado de Fibras Naturales. Rev. Fac. Cs. Agr. 2007 Agos; 5 (2): 90 - 102.
60. Castillo S, Ramírez I. Ensayo Preliminar para la Obtención de Colorantes Naturales a partir de Especies Vegetales comestibles [Tesis para optar el Título de Licenciada en Química y Farmacia]. San Salvador: Universidad De el Salvador; 2006.
61. Parra V. Estudio Comparativo en el Uso de Colorantes Naturales y sintéticos en Alimentos, desde el punto de Vista Funcional y toxicológico [Tesis para optar el Título de Licenciado en Ciencias de los Alimentos]. Chile: Universidad Austral de Chile; 2004.
62. Salvador D. Química de los Alimentos. 4 ed. México: Pearson Educación; 2008.
63. Timberlake K. Química General, Orgánica y Biológica. 4 ed. México: Pearson Educación; 2013.
64. Cano A. Extracción y Uso de Tres Pigmentos Naturales a partir de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum cav.*), Mortiño (*Vaccinium myrtillus L.*) y Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) como alternativa colorante natural para Alimentos [Tesis para optar el Título de Ingeniero Agropecuario]. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército; 2011.
65. Masias K. Caracterización de las propiedades tintóreas del extracto de Nogal (*Juglans neotropica Diels*) proveniente de la cuenca alta del río Zaña [Tesis para optar el Título de Ingeniero Forestal]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2007.
66. Uriol P. Aplicación del Colorante del Maíz Morado en la tinción Nuclear de Células presentes en un corte histológico [Tesis para optar el Título de Licenciado en Tecnología Médica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.

67. Calvo M. Bioquímica de los Alimentos. Otros Pigmentos. [Internet]. 2011. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/otroscolores.html>
68. Vera R, Herrera M. Estudio de la aplicación en alimentos de un colorante natural obtenido de la grana carmín. Memorias de los Veranos de Investigación Científica de la Universidad de Guanajuato. 2014.
69. Tortora F. Introducción a la Microbiología. 9 ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007.
70. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Microbiología Médica. 25 ed. México: Manual moderno; 2010.
71. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. 5 ed. Madrid: McGraw-Hill; 2004.
72. De la Rosa M, Prieto J, Navarro J. Microbiología en Ciencias de la Salud. 3 ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
73. Murray R, Patrick S. Microbiología Médica. 6 ed. Barcelona: Elsevier; 2006.
74. Morales G. La coloración de Gram y su importancia en el diagnóstico microbiológico [sitio en internet]. Colombia; [citado el 13 de junio 2018]. Disponible en: <https://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/coloracion-gram-diagnostico-microbiologico/>
75. López L, Hernández M, Colín C, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología [sitio en internet]. México; [citado el 14 de junio 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
76. Jiménez G, Vélez A. Tinción Gram de Tejido. Rev. Med. y Lab. 2012 Nov; 18 (11-12): 555 – 570.
77. Ryan K, Ray C. Sherris Microbiología Médica. 5 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
78. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Madrid: Médica Panamericana; 2003.
79. Calvo A, Esteban R, Montuenga F. Técnicas en Histología y Biología Celular. 2 ed. España: Elsevier; 2009.

80. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
81. Silverio C. Microbiología General para Investigaciones de Laboratorio. 1 ed. Ecuador: Utmach; 2015.
82. González M, Diamont D, Gutierrez B. Técnica de Tinción de estructuras Fúngicas con colorantes Vegetales como una Alternativa no Contaminante. Rev. Bioagro. 2011 Dic; 23 (1): 65 - 68.
83. Prieto L, Vela M, Del Valle V. Elaboración de extractos de *Hibiscos sabdariffa* (Rosa de Jamaica), *Rubus ulmifolius* (Mora) y *Beta vulgaris* (Remolacha) aplicados como colorantes naturales en la elaboración de productos cosméticos y evaluación de la estabilidad de los cosméticos fabricados [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala; 2015.
84. Lopardo H. Introducción a la Microbiología Clínica. 1 ed. Buenos Aires: Universidad de la Plata; 2016.
85. Salvador B, Vega L. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología. 1 ed. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México; 2013.
86. Covadonga A, Silóniz I. Técnicas Básicas de Microbiología - Observación de Bacterias. Red. (Biología). Serie Microbiología. 2010 May; 3 (5): 15 - 38.
87. Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M. Manual de Microbiología General. 1 ed. Argentina: UniRío; 2015.
88. Parés R, Juárez A. Bioquímica de los Microorganismos. 1 ed. Barcelona: Reverté S.A; 2012.
89. Lozano J, Galindo J, Martínez J, Peñafiel R, Solano F. Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud. 3 ed. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana; 2005.
90. Sacsquispe R, Ventura G. Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. 1ed. Lima: INS; 2001.
91. Granados R, Villaverde C. Microbiología tomo I. 1 ed. Madrid: Cengage; 2003.

92. Pratt C, Cornely K. Bioquímica. 2 ed. México: El Manual Moderno; 2012.
93. Nelson D, Cox M. Lehninger Principios de Bioquímica. 5 ed. Barcelona: Omega S.A; 2009.
94. Rojas D. Estandarización de un Medio de Cultivo Complejo para la Multiplicación de la Cepa C50 de *Rhizobium* spp [Tesis para optar el Título de Microbiólogo Industrial]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
95. Santa Cruz O. Validación del extracto del exocarpo de *Renealmia alpinia* (Kumpia) como colorante nuclear tisular [Tesis para optar el Título de Licenciado en Tecnología Médica]. Lima: Universidad Wiener; 2014.
96. Erazo R, Cárdenas J, Woolcott J, Caso M. Extracción de Acido Carmínico a Partir de Cochinilla Utilizando Tecnología más Limpia. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 2004 Set; 7 (1): 51-55.
97. Avila H. Introducción a la Metodología de la Investigación. 1 ed. Chihuahua: Cuauhtémoc; 2006.

ANEXOS

ANEXO N° 01: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Aplicación de los Colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) en la Tinción de Pared Celular Presente en un Frotis Bacteriano

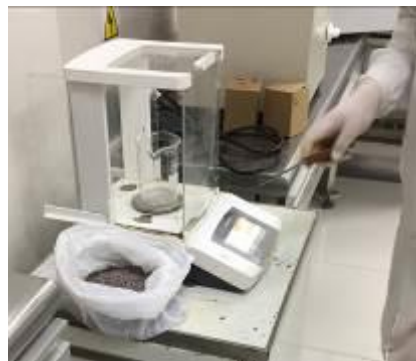
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVOS GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES			METODOLOGIA		
			V1.	DIMENSION	INDICADORES			
¿En qué medida la Aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena?	Determinar si la Aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena.	La Aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano es buena	Aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla)	Fitoquímica	Solubilidad		<ul style="list-style-type: none"> - Enfoque: Cuantitativo. - Tipo: Aplicado. - Nivel: Transversal. - Diseño: Experimental. - Población: 38. - Muestra: 20. 	
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPOTESIS ESPECÍFICAS			V2.	DIMENSION		INDICADORES
¿En qué medida la aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano?	Evaluar si la aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano.	La aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena visualización de la morfología celular en un frotis bacteriano.	Tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano.	Visualización de la Morfología Celular.	BUENA	80 – 100%	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica: Obtención de los Colorantes. Técnica de Tinción Gram. Técnica de Tinción Mashua. Técnica de Tinción Cochinilla. 	
¿En qué medida la aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano?	Evaluar si la aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano.	La aplicación de los colorantes <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Dactylopius coccus</i> (Cochinilla) en la tinción de pared celular presenta buena diferenciación en un frotis bacteriano.			Diferenciación de Pared Celular.	REGULAR		60 – 79%
						MALA		50 – 59%
					BUENA	80 – 100%	<ul style="list-style-type: none"> - Instrumento: Tabla de Solubilidad. Tabla de Estudio Fitoquímico. Tabla de Evaluación de Láminas Coloreadas. 	
					REGULAR	60 – 79%		
					MALA	50 – 59%		

ANEXO N° 02: TESTIMONIO FOTOGRÁFICO

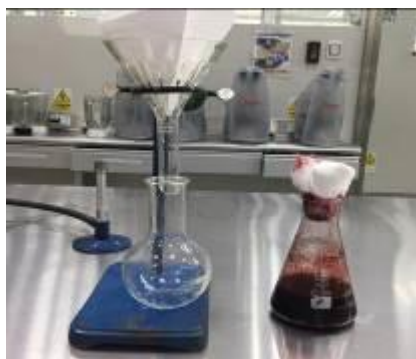
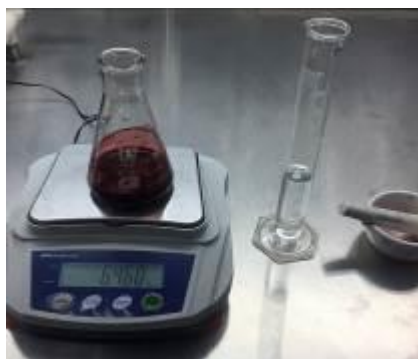
a) Tubérculo del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) (Recolección, Pesado y Cortado).



b) Insecto *Dactylopius coccus* (Cochinilla) (Recolección, Secado, Pesado y Triturado).



c) Extracción Acuosa *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (Cochinilla)



d) Reactivos para la Solubilidad y el Tamizaje Fitoquímico.



e) Resultados de la Solubilidad y del Tamizaje Fitoquímico.



Tropaeolum tuberosum (Mashua)



Dactylopius coccus (Cochinilla)



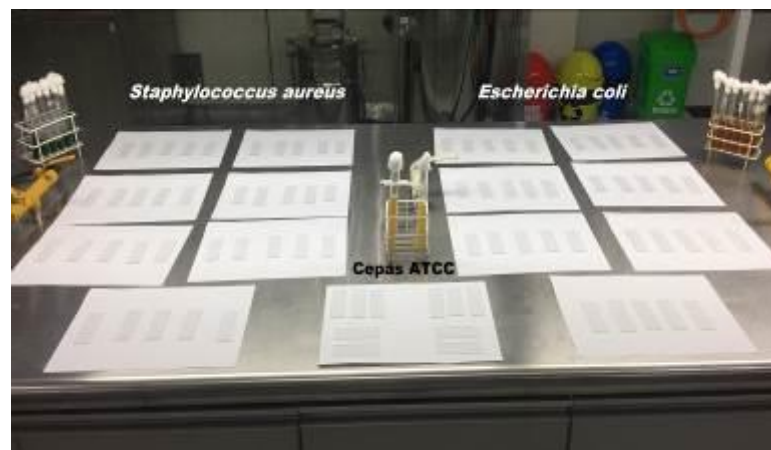
f) Tinciones de Gram.



Ingreso al Laboratorio



Set de Tinción Gram



Preparación de las Láminas



Preparación de la Muestra



Extensión y Fijación



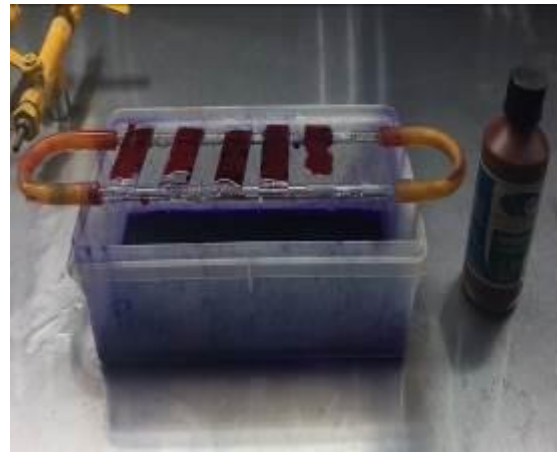
Cristal Violeta



Lugol



Decoloración Alcohol – Acetona



Safranina



Secado de Láminas



Observación al Microscopio X 100

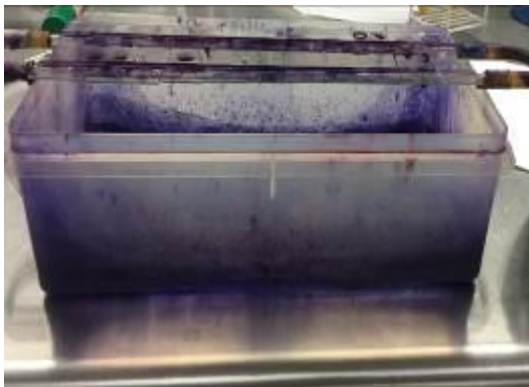
g) Tinciones de Mashua 100% - Cochinilla 20%.



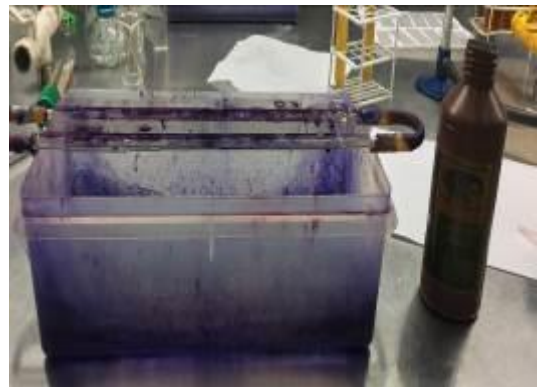
Set de Mashua – Cochinilla



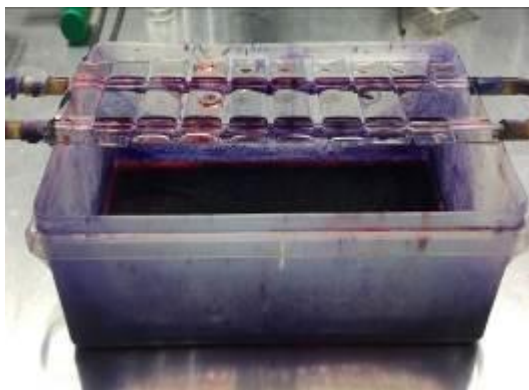
Tinción Mashua 100%



Lavar



Agregar Mordiente Lugol 1%



Decolorar

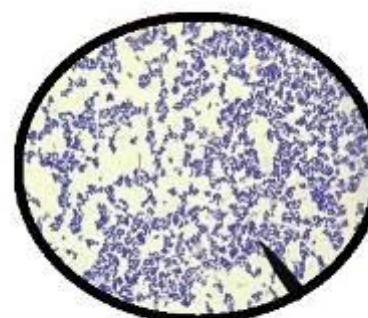
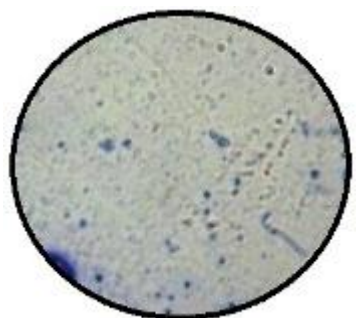


Tinción con Cochinilla 20%

h) Observación Microscópica: Microscopio X 100 aumentos: *Staphylococcus aureus*



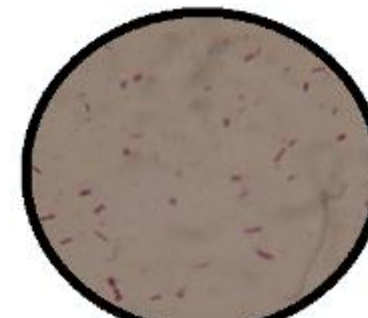
Tinción *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) 100%



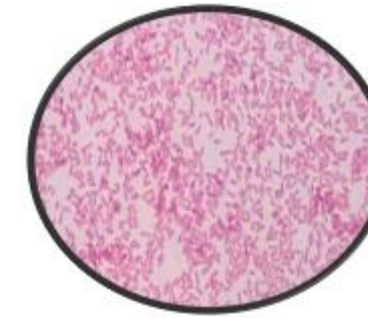
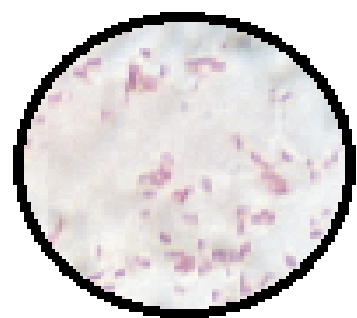
Tinción *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) 100% y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) 20%

Tinción Gram

i) Observación Microscópica: Microscopio X 100 aumentos: *Escherichia coli*






Tinción *Dactylopius coccus* (Cochinilla) 20%



Tinción *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) 100% y *Dactylopius coccus* (Cochinilla) 20%

Tinción Gram

ANEXO N° 03: TAXONOMÍA

  **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL 

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 53-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida de **Ketty Rojas Berastein**; de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: ***Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: GERANIALES

FAMILIA: TROPAEOLACEAE

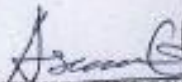

GENERO: *Tropaeolum*

ESPECIE: *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.

Nombre vulgar: "Mashua negra".
Determinado por: Bigo, Mario Julio Benavente Palacios

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 15 de febrero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS 

ACE/ylr.

An. Avenida 256, Jirón Monte -
Apdo. 18-0021, Lima 18, Perú

Teléfono:
619-7990 exts 5761, 5783, 5794

E-mail: museo@unsm.edu.pe
<http://museo.unsm.edu.pe>



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 35-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo), recibida de **Ketty Rojas Berastein**; de la Universidad Inca Garcilaso De La Vega; ha sido estudiada y clasificada como: ***Opuntia ficus-indica*** L. Mill.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: CARYOPHYLLALES

FAMILIA: CACTACEAE

GENERO: *Opuntia*

ESPECIE: *Opuntia ficus-indica* L. Mill.

Nombre vulgar: "penca de tuna".

Determinado por: Mag. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

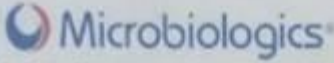
Lima, 31 de enero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
 JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS - USM

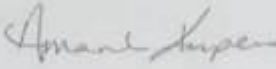
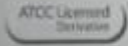



ACE/yrh. [Firma] [Firma]
 [Firma] [Firma]

ANEXO N° 04: CERTIFICADO DE LAS CEPAS ATCC



Certificate of Analysis, Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 6455 Lot Number: 485-481 Reference Number: ATCC® 6538™ Purity: Pure Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2019/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Keshia L. Negen Release Date: 2017/3/31
Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>Disclaimer: The lot (digit) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual lot of number.</small></p> <p><small>Note for Users: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Reference products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Manassas, VA. It is illegal to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p>	
<p></p> <p></p> <p>TESTING CERT #2635.01</p>	

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC 286



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-184** Reference Number: ATCC® 8739™ Purity: Pure Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2018/3/31 Release Information Quality Control Technologist: Tanner E. Rothstein Release Date: 2016/5/2
--	--

Performance	
Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough Microscopic Features: Gram negative straight rod	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document	Other Features/Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Eroth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm <div style="text-align: center;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>
--	---

*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note to User: Although the Yitaki panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by a slower method.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC logo are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. It is forbidden to use these trademarks and to sell products derived from ATCC's cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



ANEXO N° 05: CEPAS BACTERIANAS DE PACIENTES

LABORATORIO BIOLÓGICO Y ANÁLISIS CLÍNICO SANTA ROSA DE
PACHACAMAC E.I.R.L.

CONSTANCIA

Por medio de la presente hago constar que durante los meses de Octubre, Noviembre, Diciembre 2017 y Enero del 2018, se han aislado de las diversas muestras clínicas patológicas de rutina, analizadas en el Área de Microbiología del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L. los siguientes microorganismos:

- a) Escherichia coli: 05. Correspondientes a Urocultivo.
- b) Estafilococo aureus: 05. Correspondientes a Secreción Faringea.
- c) Salmonella typhi: 02. Correspondientes a Coprocultivo.

Asimismo, se hace entrega de las diversas muestras aisladas al T.M. Walter Siri Rodriguez, miembro del Equipo de Docentes Investigadores de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega para realizar Proyectos de Investigación y para los fines pertinentes.

Pachacamac. 12 de Febrero de 2018.


JACINTA A. ARIAS REYES
BIOLOGA-C.D.P. 3964
M. MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

ANEXO N° 06: VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO



NOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

FICHA DE OBSERVACIÓN ADHOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

APLICACIÓN DE LOS COLORANTES *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) Y *Dactyloctenium aegyptium* (COCHINILLA) EN LA TINCIÓN DE PARED CELULAR PRESENTE EN UN FROTIS BACTERIANO

Después de revisado el instrumento es valida su opinión acerca de lo siguiente:

	MENOS DE:
	50 60 70 80 90 100
1. ¿En qué porcentaje estima que con estos instrumentos se lograrán los objetivos propuestos?	() () () () () ()
2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están relacionadas a los conceptos del tema?	() () () () () ()
3. ¿En qué porcentaje cree que las tablas planteadas son suficientes para lograr los objetivos?	() () () () () ()
4. ¿En qué porcentaje estima que las tablas del instrumento son de ejecución viable?	() () () () () ()
5. ¿Qué porcentaje considera que las tablas siguen una secuencia lógica?	() () () () () ()
6. ¿En qué porcentaje cree usted que con los instrumentos, se obtendrán datos similares si se replicara con otras muestras?	() () () () () ()

SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítem considera usted que deben agregarse?
NINGUNO
2. ¿Qué ítem considera usted que deben eliminarse?
NINGUNO
3. ¿Qué ítem considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?
NINGUNO

FECHA: 16-07-2018

VALIDADO POR:

Mp. O.F. JOHN ELOY PONCE PARDO

[Handwritten Signature]
 7683-00649 CAFP



APLICACIÓN DE LOS COLORANTES *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) Y *Dactylopius coccus* (COCHINILLA) EN LA TINCIÓN DE PARED CELULAR PRESENTE EN UN FROTIS BACTERIANO.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
Nº	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H ₂ O	
2.	Etanol	EtOH	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtOAc	
6.	Clorofórmio	CHCl ₃	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me ₂ CO	
9.	Éter etílico	Et ₂ O	
10.	Éter de petróleo	EP	

LEYENDA:

- La Solubilidad no se visualiza. (-)
- La Solubilidad en menor grado. (+)
- La Solubilidad es moderada. (++)
- La Solubilidad es mayor. (+++)

MARCHA FITOQUÍMICA			
Nº	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ .	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado Jemá blanco.
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, acetonas, Isoflavononas: No hay coloración.
			Isoflavononas: Amarillo rojo.
			Flavonoides: Rojo a magenta.
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.
5	Antocianinas y Flavonoides Catequicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.
		Mayer.	Precipitado blanco.
		Bertrand.	Precipitado blanco.
		Sorbenstein.	Precipitado amarillo-verdoso.
8	Naftoquinonas, Antraquinonas, Antraones	Borntrager.	Coloración roja.

J. C. C. C.
2633-00649088



MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
9	Triterpenoides Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: verde-azul Triterpenoides: rojo-naranja.
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.
11	Glicósidos	Bajet.	Coloración anaranjada.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.
14	Ácido Camánico	BaCl ₂ 2%.	Violeta Mate

LEYENDA:

- No realizada (0)
- Ausente (-)
- Leve (+)
- Moderado (++)
- Abundante (+++)

EVALUACIÓN DE LAS LÁMINAS					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.		TINCION		TINCION DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					
DIFERENCIACIÓN PARED CELULAR ENTRE GRAM POSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS		TINCION		TINCION DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					

J. L. Ruf
7683-00649 CAFP



HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

FICHA DE OBSERVACIÓN ADHOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

APLICACIÓN DE LOS COLORANTES *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) Y *Dactylopius coccineus* (COCHINILLA) EN LA TINCIÓN DE PARED CELULAR PRESENTE EN UN FROTIS BACTERIANO

Después de revisado el Instrumento es válida su opinión acerca de lo siguiente:

	MENOS DE:
	60 60 70 80 90 100
1. ¿En qué porcentaje estima que con estos instrumentos se lograrán los objetivos propuestos?	() () () () () (x)
2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están referidas a los conceptos del tema?	() () () () (x) ()
3. ¿En qué porcentaje cree que las tablas planteadas son suficientes para lograr los objetivos?	() () () () () (x)
4. ¿En qué porcentaje estima que las tablas del instrumento son de ejecución viable?	() () () () (x) ()
5. ¿Qué porcentaje considera que las series siguen una secuencia lógica?	() () () () () (x)
6. ¿En qué porcentaje cree usted que con los instrumentos, se obtendrán datos similares si se replicará con otras muestras?	() () () () () (x)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deben agregarse?
NINGUNO
2. ¿Qué ítems considera usted que deben eliminarse?
NINGUNO
3. ¿Qué ítems considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?
NINGUNO

FECHA: 15-07-2018

VALIDADO POR:

DF. Neuman Mario Pérez

COFP 18130



APLICACIÓN DE LOS COLORANTES *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) Y *Dactylopus coccus* (COCHINILLA) EN LA TINCIÓN DE PARED CELULAR PRESENTE EN UN FROTIS BACTERIANO

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H ₂ O	
2.	Etanol	EtOH	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtOAc	
6.	Cloroformo	CHCl ₃	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me ₂ CO	
9.	Eter etílico	C ₂ H ₅ O	
10.	Eter de petróleo	EP	

LEYENDA:

- La Solubilidad no se visualiza (-)
- La Solubilidad en menor grado. (++)
- La Solubilidad es moderada. (+++)
- La Solubilidad es mayor. (++++)

MARCHA FITOQUÍMICA			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ .	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavononas: No hay coloración.
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.
			Flavanonoles: Rojo a magenta.
			Flavonas y flavonoles: Anillo a rojo.
5	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violeta.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.
		Mayer.	Precipitado blanco.
		Bortrand.	Precipitado blanco.
		Sonnenschein.	Precipitado amarilloverde.
8	Naftoquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntrager.	Coloración roja.

Theriot
CD FP 18130



MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
9	Triterpenoides Esteroides	Y Lieberman-Burchard.	Esteroides: verde-azul. Triterpenoides: rojo-naranja.
10	Saponinas	Espuma.	0,5 a 1 cm estable por 15 min.
11	Glicósidos	Baljet.	Coloración anaranjada.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.
14	Ácido Carminico	BaCl ₂ 2%.	Violeta Mate

LEYENDA:

- No realizada (0)
- Ausente (-)
- Leve (+)
- Moderado (++)
- Abundante (+++)

EVALUACIÓN DE LAS LÁMINAS					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.		TINCIÓN MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		TINCIÓN DE GRAM	
		N° LÁMINAS	RESULTADO (%)	N° LÁMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					
DIFERENCIACIÓN PARED CELULAR ENTRE GRAM POSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS		TINCIÓN MASHUA 100% - COCHINILLA 20%		TINCIÓN DE GRAM	
		N° LÁMINAS	RESULTADO (%)	N° LÁMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					

M. G. P.
COP 18130



HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

FICHA DE OBSERVACIÓN ADHOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

APLICACIÓN DE LOS COLORANTES *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) Y *Dactylopius coccus* (COCHINILLA) EN LA TINCIÓN DE PARED CELULAR PRESENTE EN UN FROTIS BACTERIANO

Después de revisar el instrumento es válida su opinión acerca de lo siguiente:

	MENOS DE:
	50 60 70 80 90 100
1. ¿En qué porcentaje estima que con estos instrumentos se lograrán los objetivos propuestos?	() () () () () ()
2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están relacionadas a los conceptos del tema?	() () () () () ()
3. ¿En qué porcentaje cree que las tablas planteadas son suficientes para lograr los objetivos?	() () () () () ()
4. ¿En qué porcentaje estima que las tablas del instrumento son de aplicación viable?	() () () () () ()
5. ¿Qué porcentaje considera que las tablas siguen una secuencia lógica?	() () () () () ()
6. ¿En qué porcentaje cree usted que con los instrumentos, se obtendrán datos similares si se replicará con otras muestras?	() () () () () ()

SUGERENCIAS

- ¿Qué ítem considera usted que deben agregarse?
_____ NINGUNO _____
- ¿Qué ítem considera usted que deben eliminarse?
_____ NINGUNO _____
- ¿Qué ítem considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?
_____ NINGUNO _____

FECHA: 16-07-2018

VALIDADO POR:

Q.F. OSCAR FLORES LÓPEZ

C.Q.F.P. 19190



APLICACIÓN DE LOS COLORANTES *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) Y *Dactylopus coccus* (COCHINILLA) EN LA TINCIÓN DE PARED CELULAR PRESENTE EN UN FROTIS BACTERIANO

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H ₂ O	
2.	Etanol	EtOH	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtoAc	
6.	Cloroformo	CHCl ₃	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me ₂ CO	
9.	Eter etílico	Et ₂ O	
10.	Eter de petróleo	EP	

LEYENDA:

- La Solubilidad no se visualiza. (-)
- La Solubilidad en menor grado. (+)
- La Solubilidad es moderada. (++)
- La Solubilidad es mayor. (+++)

MARCHA FITOQUÍMICA			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	Coloración verde o azul.
3	Tannos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.
			Flavonoles: Rojo a magenta.
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.
5	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.
		Meyer.	Precipitado blanco.
		Bertrand.	Precipitado blanco.
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.
8	Naftoquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Bornträger.	Coloración roja.

[Firma]
C. Q. F. P. 19190

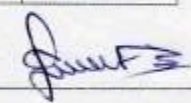


MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
9	Triterpenoides y Esteroides	Libermann-Burchard.	Esteroides: verde-azul Triterpenoides: rojo-naranja.
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.
11	Glicósidos	Bajet.	Coloración anaranjada.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia débil.
14	Ácido Cumarico	BaCl ₂ 2%.	Violata Mate

LEYENDA:

- No realizada (0)
- Ausente (-)
- Leve (+)
- Moderado (++)
- Abundante (+++)

EVALUACIÓN DE LAS LÁMINAS					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.		TINCION		TINCION DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%			
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					
DIFERENCIACIÓN PARED CELULAR ENTRE GRAM POSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS		TINCION		TINCION DE GRAM	
		MASHUA 100% - COCHINILLA 20%			
		N° LAMINAS	RESULTADO (%)	N° LAMINAS	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					


 C. Q. F. P. 19190

ANEXO N° 07: MÉTODO DE COLORACIÓN DE GRAM ⁽⁹⁰⁾

(Sacsquispe y Ventura, 2001)

a) FIJACION DE LA MUESTRA:

- Dejar secar el frotis en una superficie plana.
- Una vez seco pasarlo dos o tres veces por la llama del mechero. No sobrecalentar.
- Dejar enfriar la lámina antes de colorear.

b) PREPARACION DE COLORANTES

COLORACIÓN GRAM DE HUCKER

- Cristal violeta

- Cristal violeta: Solución stock

- Cristal violeta (90 a 95% contenido del colorante) 40 g
- Etanol 95% 400 mL

Disolver y mezclar.

Almacenar en un frasco oscuro.

Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de oxalato de amonio (1%)

- Oxalato de amonio (grado reactivo) 16 g
- Agua destilada 1600 mL

Disolver y mezclar en un frasco oscuro.

Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

- Cristal violeta: Solución de trabajo

- Solución stock de cristal violeta 40 mL
- Solución de oxalato de amonio (1%) 160 mL

Filtrar la solución stock de cristal violeta en una botella de vidrio. Una vez que ha filtrado completamente, filtrar a continuación la solución de oxalato de amonio. Rotular con la fecha de expiración más próxima de cualquiera de la soluciones stock.

- Lugol de Gram

- Cristal de yodo 1 gr
- Yoduro de potasio 2 gr
- Agua destilada 300 mL

Mezclar los cristales de yodo con el yoduro de potasio en un mortero.

Agregar el agua destilada en pequeñas cantidades.

Depositarlo en un frasco de vidrio oscuro.

Rotular con fecha de 6 meses de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

Precaución: El yodo y yoduro de potasio son corrosivos. Evitar la inhalación, ingestión o contacto con la piel.

- **Decolorante: alcohol – acetona (1:1)**

- | | |
|--------------|--------|
| - Etanol 95% | 500 mL |
| - Acetona | 500 mL |

Mezclar el Etanol con la acetona.

Depositarlo en un frasco de vidrio oscuro.

Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

- **Colorante de contraste: Safranina**

- | | |
|---------------------------|--------|
| - Safranina (certificada) | 2.5 gr |
| - Etanol (95%) | 100 mL |

En un mortero disolver 0,25 g de la safranina (certificada) en 10 mL de etanol (95%), seguidamente agregarle 90 mL de agua destilada.

Almacenar la solución preparada en un frasco oscuro.

- **Procedimiento**

- Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar al aire.
- Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando rápidamente el portaobjeto 3 o 4 veces por la llama del mechero o con metanol y dejar secar.
- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
- Colorear un minuto y lavar con agua de caño.
- Cubrir la lámina con lugol de Gram durante un minuto. Lavar nuevamente con agua.
- Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con unas gotas de alcohol acetona hasta no arrastrar más colorante violeta. Generalmente requiere de unos diez segundos o menos.
- Lavar con agua de caño y colocar nuevamente el portaobjeto sobre el soporte.
- Cubrir la superficie con safranina durante un minuto. Lavar con agua de caño.
- Dejar secar la lámina.
- Examinar la lámina coloreada al microscopio con objetivo 100 x de inmersión (aceite).