

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**

**“Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas”**

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**



**PREPARACIÓN DEL AGAR LITME A PARTIR DE *Lepidium meyenii* W. (MACA) y *Prosopis pallida* (ALGARROBO) PARA  
DETECTAR CONTAMINANTES BACTERIANOS**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico  
Farmacéutico y Bioquímico**

**TESISTAS:**

**BACHILLER JOSÉ LUIS LITUMA QUIROZ**

**BACHILLER LIZBETH MELGAREJO CRIOLLO**

**ASESOR: Dr. Q.F. HÉCTOR VILCHEZ CÁCEDA**

**LIMA –PERÚ**

**2018**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por fortalecer e iluminar mi mente y mi corazón, por hacer posible la realización de este proyecto de investigación y cumplir mis anhelos y la de mí amada familia.

A mis padres, por todo el amor, consejo, apoyo incondicional y todos sus consejos para ser cada día una mejor persona

**José Luis Lituma Quiroz**

A Dios, el arquitecto del Universo, por estar conmigo todo este tiempo y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mí familia, por su constante apoyo, consejo y ser estímulo para seguir adelante.

A todas las personas que estuvieron a mi lado durante mi formación profesional y contribuyeron para lograr esta meta

**Lizbeth Melgarejo Criollo**

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Q.F. Héctor Vílchez Cáceda, nuestro asesor de tesis. Para nosotros es un honor haber realizado este trabajo de investigación bajo su dirección y le estaremos siempre muy agradecidos por sus enseñanzas y orientación recibidas.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega y a todos nuestros profesores que nos brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante cada día.

## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice de anexos	
Índice de figuras	
Índice de tablas	
Resumen	
Abstract	
Introducción.....	01
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>02</b>
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
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>05</b>
2.1. Antecedentes de la Investigación. ....	05
2.1.1. Nacionales.....	05
2.1.2. Internacionales.....	09
2.2. Bases teóricas.....	14

2.2.1. Aspectos botánicos de <i>Prosopis pallida</i> .....	14
2.2.1.1. Historia.....	14
2.2.1.2. Etnobotánica.....	14
2.2.1.3. Sinonimia.....	15
2.2.1.4. Taxonomía.....	16
2.2.1.5. Distribución geográfica.....	16
2.2.1.6. Descripción de la planta. ....	17
2.2.1.7. Variedades nativas.....	17
2.2.1.8. Composición química.....	21
2.2.2. Aspectos botánicos de <i>Lepidium meyenii</i> W.....	24
2.2.2.1. Historia.....	24
2.2.2.2. Etnobotánica.....	25
2.2.2.3. Sinonimia.....	27
2.2.2.4. Taxonomía.....	28
2.2.2.5. Distribución geográfica.....	28
2.2.2.6. Descripción de la planta.....	29
2.2.2.7. Variedades nativas.....	29
2.2.2.8. Composición química.....	31
2.2.2.8. Metabolitos secundarios.....	35
2.2.2.8. Registro de campo (ubicación geográfica).....	36
2.2.2.8. Tamizaje fitoquímico.....	37
2.3. Bases microbiológicas.....	38
2.3.1. Nutrición bacteriana.....	38
2.3.2. Factores ambientales que afectan el crecimiento.....	42
2.3.2.1. Concentración iónica y presión osmótica.....	44
2.3.3. Metabolismo bacteriano.....	45
2.3.3.1. Fermentación.....	46
2.3.3.2. Oxidación.....	48
2.3.4. Medios de cultivo.....	50
2.3.4.1. Clasificación.....	50

2.3.4.2. Preparación.....	55
2.3.4.3. Esterilización.....	55
2.3.4.4. Siembra y aislamiento bacteriano.....	58
2.3.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
2.3.5.1. Generalidades.....	60
2.3.5.2. Aislamiento e identificación.....	61
2.3.6. <i>Escherichia coli</i> .....	62
2.3.6.1. Generalidades.....	62
2.3.6.2. Aislamiento e identificación.....	63
2.4. Formulación de hipótesis.....	64
2.4.1. Hipótesis general.....	64
2.4.2. Hipótesis específicas.....	64
2.5. Operacionalización de variables e indicadores. ....	64
2.6. Definición de términos básicos.....	65
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....</b>	<b>67</b>
3.1. Tipo y nivel de investigación.....	67
3.2. Diseño de la investigación.....	67
3.2.1. Material biológico.....	67
3.2.2. Materiales e instrumentos de laboratorio.....	67
3.2.3. Reactivos químicos.....	68
3.2.4. Estudio fitoquímico.....	69
3.2.5. Estudio macroscópico.....	69
3.3. Población y muestra de la investigación.....	70
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	71
3.4.1. Descripción de los instrumentos.....	71
3.4.2. Validación de instrumentos.....	72
3.5. Técnicas para el procesamiento de datos.....	72
3.6. Procedimiento experimental.....	72
3.6.1. Identificación de las muestras en estudio.....	72
3.6.2. Obtención de los nutrientes.....	73

3.6.3. Solubilidad y análisis de compuestos químicos (metabolitos).....	73
3.6.4. Reactivación de las bacterias.....	74
3.6.5. Siembra y aislamiento.....	75
<b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
4.1 Presentación de resultados.....	76
4.2 Contrastación de hipótesis.....	82
4.3 Discusión de resultados.....	84
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>87</b>
5.1 Conclusiones.....	87
5.2 Recomendaciones.....	88
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 01: Matriz de consistencia.....	97
Anexo N° 02: Testimonio fotográfico.....	98
Anexo N° 03: Taxonomía.....	105
Anexo N° 04: Certificado Cepas N° ATCC.....	107
Anexo N° 05: Cepas bacterianas aisladas de pacientes.....	109
Anexo N° 06: Validación del instrumento.....	110
Anexo N° 07: Esterilización y preparación de medios de cultivo.....	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Planta <i>Prosopis pallida</i> .....	18
Figura N° 02: Espinas y hojas.....	18
Figura N° 03: Inflorescencia.....	18
Figura N° 04: Vaina.....	18
Figura N° 05: Vaina seca.....	18
Figura N° 06: Roseta basal (Hojas).....	30
Figura N° 07: Raíces tuberosas.....	30
Figura N° 08: Variedad amarilla.....	30
Figura N° 09: Ecotipo negra.....	30
Figura N° 10: Cultivo.....	30
Figura N° 11: Aislamiento.....	83
Figura N° 12: Visualización de la morfología de la colonia bacteriana.....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Valor nutricional del fruto del algarrobo.....	21
Tabla N° 02: Composición de la pulpa de <i>Prosopis pallida</i> .....	23
Tabla N° 03: Oligoelementos.....	32
Tabla N° 04: Análisis proximal.....	32
Tabla N° 05: Aminoácidos.....	33
Tabla N° 06: Esteroides.....	34
Tabla N° 08: Operacionalización de variables.....	64
Tabla N° 09: Resumen de resultados. Juicio de Expertos.....	72
Tabla N° 10: Determinación de metabolitos.....	73
Tabla N° 10: Determinación de metabolitos (Continuación).....	74
Tabla N° 11: Prueba de solubilidad.....	76
Tabla N° 12: Identificación de metabolitos.....	76
Tabla N° 12: Identificación de metabolitos (Continuación).....	77
Tabla N° 13: Número de placas Petri obtenidas según tipo de cepa y medio.....	78
Tabla N° 14: Evaluación de los agares <i>Staphylococcus aureus</i> N° ATCC 25923....	79
Tabla N° 15: Evaluación de los agares <i>Escherichia coli</i> N° ATCC 8739.....	79
Tabla N° 16: Número de agares obtenidas según tipo de cepa de paciente y medio.....	80
Tabla N° 17: Evaluación de los agares <i>Staphylococcus aureus</i> .....	81
Tabla N° 18: Evaluación de los agares <i>Escherichia coli</i> .....	81

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar si el uso del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos es buena. El tubérculo Maca Ecotipo Negra, se obtuvo de las alturas del distrito de Huayucachi, en la provincia de Huancayo, Junín. Las Vainas de Algarroba se recolectaron del Parque Ecológico Kurt – Beer, ubicado en el sector sur oeste de la ciudad de Piura. Mediante lavado, trozado, secado y posterior molienda, se obtuvieron los nutrientes del tubérculo de la Maca Negra y de la vaina de Algarrobo. Ambas muestras presentaron mayor solubilidad en agua y se encontraron metabolitos como flavonoides, aminoácidos libres y grupos amino en la vaina de Algarrobo y flavonoides, antocianinas, aminoácidos libres y grupos amino, alcaloides y esteroides en la Maca Negra.

Se realizaron 64 cultivos, 32 con *Staphylococcus aureus* ATCC N° 25923 y 32 con *Escherichia coli* ATCC 8739, de las cuales se cultivaron 16 con vaina de Algarrobo (5%), 16 con tubérculo de Maca Negra (5%), 16 con vaina de Algarroba (5%) más Maca Negra (5%) del Agar Litme y 16 con Agar nutritivo que fue tomada como medio de cultivo patrón o *gold standard*.

En la evaluación macroscópica con Maca Negra (5%) más vaina de Algarroba (5%) del Agar Litme se consideraron dos criterios de evaluación: aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana; para ambas cepas ATCC se obtuvo un calificativo de 87.5% (bueno) y 12.5% (regular) y para el Agar nutritivo 100% del calificativo (bueno).

Se arribó a la conclusión de que el uso del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos es buena.

**Palabras Claves:** Maca, Algarrobo, Agar, contaminantes bacterianos.

## ABSTRACT

The objective of the present work was to determine whether the use of *Lepidium meyenii* W. (Maca) and *Prosopis pallida* (Algarrobo) of the LITME Agar in the detection of bacterial contaminants is good. The Black Maca Ecotype Tuber was from the heights of the District of Huayucachi, in the Province of Huancayo, Junín Region. The Algarroba Pods were collected from the Kurt - Beer Ecological Park located in the South West Sector of the City, District, Province and Department of Piura. By washing, cutting, drying and subsequent grinding, nutrients were obtained from the black Maca tuber and Algarrobo pod. Both samples showed greater solubility in water and metabolites were found as flavonoids, free amino acids and amino groups in the carob pod and flavonoids, anthocyanins, free amino acids and amino groups, alkaloids and steroids in the Black Maca.

64 cultures were performed, 32 with *Staphylococcus aureus* ATCC N°. 25923 and 32 with *Escherichia coli* ATCC N° 8739; of which 16 were cultivated with 5% Algarrobo pod, 16 with Maca Negra tuber 5%, 16 with Algarroba pod 5% - Maca Negra 5% Litme agar and 16 with nutritious agar that was taken as culture medium pattern or gold standard.

In the macroscopic evaluation with Maca Negra 5% - Algarroba pod 5% of the Litme Agar, two evaluation criteria were considered: Isolation and Visualization of the morphology of the bacterial colony; for both ATCC strains a qualification of 87.5% (Good) and 12.5% (Regular) and for the Nutritive Agar 100% of the qualifier (Good) was obtained.

It was concluded that the use of *Lepidium meyenii* W. (Maca) and *Prosopis pallida* (Algarrobo) of LITME agar in the detection of bacterial contaminants is good.

**Key Words:** Maca, Algarrobo, Agar, Bacterial Contaminants.

## INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo son variados y presentan amplia utilidad, según requerimiento en los laboratorios de microbiología; estos se presentan en frascos liofilizados y para poder usarlos se deben hidratar y esterilizar en autoclave; se emplean, entre otros casos, para el aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana. (56, 58). En la actualidad, se buscan alternativas empleando productos naturales que puedan formar parte de la composición de los medios de cultivo tradicionales y que brinden los mismos o parecidos resultados en los laboratorios de microbiología. (13, 15).

El *Lepidium meyenii* W. (Maca) es un tubérculo de color negro que presenta una serie de metabolitos primarios y secundarios; asimismo, el *Prosopis pallida* (Algarrobo) es una vaina que posee una serie de nutrientes específicos entre carbohidratos, proteínas y aminoácidos, los cuales sirven de base para la preparación de un medio de cultivo para la detección de contaminantes bacterianos. (24, 25, 26, 37, 38, 44).

En este estudio, se pretende determinar si el uso del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos es buena; del mismo modo tiene el propósito de contribuir al conocimiento científico y servir de opción para el aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana.

La presente tesis que expone el proceso científico metodológico seguido está estructurada en cinco capítulos, a saber:

El primer capítulo aborda el planteamiento del problema, los objetivos, la justificación y las limitaciones de la investigación.

El segundo capítulo expone el marco teórico: los antecedentes y las bases teóricas, la formulación de las hipótesis, las variables y la definición de los términos básicos.

El tercer capítulo desarrolla la metodología que considera el tipo y diseño de la investigación, la población y la muestra, las técnicas de recolección y procesamiento de los datos, así como el procedimiento experimental.

El cuarto capítulo presenta el análisis y discusión de los resultados.

El quinto capítulo expone las conclusiones y recomendaciones.

Finalmente, se dan a conocer las referencias bibliográficas y los anexos.

## CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. Descripción de la realidad problemática

*Lepidium meyenii* W, conocido popularmente como Maca, es un hipocotilo que se cultiva casi exclusivamente en los Andes peruanos, a una altura entre 3700 a 4500 m.s.n.m. <sup>(36)</sup>. Se le atribuye una serie de bondades, tanto nutricionales como terapéuticas. <sup>(46)</sup>. La Maca posee 12 a 18% de Proteínas, con una alta concentración de todos los aminoácidos esenciales, un bajo nivel de grasas, principalmente constituido por ácidos grasos, insaturados y una alta concentración de ácidos grasos esenciales, presencia de varios tipos de vitaminas (como pro-vitamina A, B1, B2, B6, C) y minerales (como calcio, hierro, zinc, magnesio, cobre, entre otros). <sup>(48, 49)</sup>. Asimismo, el tubérculo contiene varios metabolitos secundarios, incluyendo los macaenos y macamidias, glucosinolatos, alcaloides, ésteres de ácidos grasos y fitoesteroles. <sup>(36, 38)</sup>.

*Prosopis pallida* (Algarrobo) es una leguminosa arbórea que se encuentra en zonas áridas y semiáridas del Perú, presentando gran resistencia a la sequía y a la salinidad. <sup>(23)</sup>. Su fruto, el Algarrobo, es una legumbre con altos contenidos de proteínas e hidratos de carbono. <sup>(27)</sup>. Es utilizada para combatir la tos, bronquitis, resfriado, artritis y reumatismo, siendo la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos los responsables de su uso medicinal. <sup>(28)</sup>. A los compuestos fenólicos se les atribuye propiedades antimicrobianas y antioxidantes. <sup>(35)</sup>. La vaina de algarrobo tiene la siguiente composición: fibra insoluble, soluble, azúcares solubles, almidón, polifenoles solubles, Catequina, taninos, proteínas, grasa, etc. <sup>(23)</sup>.

Teniendo en cuenta la sinergia entre los metabolitos primarios y secundarios de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo), surge la idea de utilizarlos como base para la preparación de un medio de cultivo denominado Agar LITME con la finalidad de utilizarlo para detectar contaminantes bacterianos, además de ser una alternativa natural y en relación al precio de los constituyentes es muy cómodo.

## **1.2. Identificación y formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general:**

1. ¿Cuál será el efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos?

### **1.2.2. Problemas específicos:**

1. ¿Cuál será la composición química del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo)?
2. ¿Cuál será el efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Staphylococcus aureus*?
3. ¿Cuál será el efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Escherichia coli*?

## **1.3. Objetivos de la investigación.**

### **1.3.1. Objetivo general:**

1. Determinar el efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos.

### **1.3.2. Objetivos específicos:**

1. Determinar la composición química del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo).
2. Evaluar el efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Staphylococcus aureus*.
3. Evaluar el efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Escherichia coli*.

#### 1.4. Justificación y viabilidad de la investigación

Existen medios de cultivo para la detección de bacterias contaminantes. Uno de estos medios es el Agar Nutritivo, el cual es utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. Su uso está descrito en procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria, asimismo en este medio el desarrollo bacteriano se realiza en la superficie, por lo que se distinguen mejor las colonias pequeñas; Este medio de cultivo nutritivo es no selectivo, en el cual la pluripectona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano. El agregado de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. En nuestro país, el Agar Nutritivo se encuentra comercializado bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar. Su fabricación se realiza en el extranjero debido al costo de los insumos utilizados. Por ello, se deben utilizar alternativas empleando materia prima natural de precio cómodo, fácil de conseguir y que puedan brindar resultados similares. En el presente estudio, se busca preparar un medio de cultivo denominado Agar LITME a base de *Lepidium meyenii* W. (Maca), Ecotipo negro y *Prosopis pallida* (Algarrobo) a fin de que la sinergia entre sus metabolitos primarios y secundarios, permita la detección de contaminantes bacterianos, además de ser una materia prima natural, fácil de conseguir y en relación al precio del insumo es muy cómodo. <sup>(54, 58, 59, 60).</sup>

#### 1.5. Delimitación de la investigación

##### **Ámbito geográfico:**

El presente estudio tuvo como escenario de trabajo los laboratorios de microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

##### **Ámbito temporal:**

El estudio fue realizado en el periodo de los años 2017 - 2018.

#### 1.6. Limitaciones de la investigación

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

**Ccolque K. et.al. (2007)** realizó el estudio titulado: “Determinación del recuento microbiano de productos derivados de La Maca (*Lepidium Meyenii* W.), utilizando placas Petrifilm y su comparación con el método convencional”. El objetivo de este trabajo fue determinar el recuento microbiano por el método convencional y el método de recuento en placas Petrifilm. Consistió en la comparación de dos metodologías de recuento microbiano en productos derivados de la Maca: el método de recuento en placa Petrifilm y método convencional descrito en la monografía oficial de la Farmacopea Europea 2005. El estudio concluyó en que los resultados obtenidos en el recuento microbiano demuestran que el método alternativo de placas Petrifilm puede reemplazar al método convencional. Además, el 85% de muestras analizadas presentan bacterias aerobias mesófilos viables, levaduras y mohos. <sup>(36)</sup>.

**Machado R. (2001)** desarrolló el estudio titulado: “Caracterización físico-química de 4 ecotipos de Maca (*Lepidium meyenii* W). Procesos de liofilización, atomización y pregelatinización en el Ecotipo seleccionado” El objetivo fue caracterizar cuatro ecotipos de maca considerando aspectos físicos, composición química proximal, nivel de minerales y nitritos. La materia prima fue recabada de la comunidad de Vinchos, departamento de Cerro de Pasco; las muestras fueron recogidas al azar de una parcela de 8 hectáreas, tomando un total de 10 Kg. de cada ecotipo. <sup>(37)</sup>.

El estudio arribó a la conclusión de que de los ecotipos de Maca evaluados negro, morado, rojo y amarillo, el ecotipo amarillo fue el que presentó las mejores características químicas proximales y contenidas de minerales. <sup>(37)</sup>.

**Reyes V. (2006)** realizó la investigación: “Determinación de la aflatoxinas y ocratoxinas en la Maca seca y harina de Maca (*Lepidium meyenii Walp*)”. El objetivo fue evaluar los factores fisicoquímicos y su implicancia en la producción de hongos y micotoxinas en la Maca seca y harina de Maca, procedentes de centros de producción y comercialización. A las muestras se les determinó aflatoxina total (ppb), ocratoxina A (partes por billón), humedad (%), isotermas de adsorción, azúcares reductores (mg/100g), acidez (%), pH, granulometría, numeración de hongos (ufc/g) e identificación de hongos. <sup>(43)</sup>.

La concentración promedio de aflatoxina total es 0,83 ppb en la maca seca y 12,45 ppb en la harina de maca, valores que no representan riesgo en la salud del consumidor. La harina a granel, tostada procedente del mercado Central de Lima es la que presenta mayor concentración de aflatoxina total, encontrándose, asimismo, los siguientes hongos en la Maca seca y harina de Maca: *Fusarium avenaceum*, *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus niger*, entre otros. <sup>(43)</sup>.

**Gonzales G. et.al. (2014)** realizaron el estudio: “Maca (*Lepidium meyenii Walp*), una revisión sobre sus propiedades biológicas”. El objetivo del trabajo fue presentar un resumen de los resultados de estudios sobre los efectos de la maca en la función sexual, la espermatogénesis, la función reproductiva femenina, la memoria, la depresión y la ansiedad, como energizante y contra la hiperplasia benigna de próstata, osteoporosis y síndrome metabólico. <sup>(61)</sup>.

En relación al extracto hidroalcohólico del *Lepidium meyenii Walp* (Maca negra) puede reducir en un 50% el valor de glucosa en sangre en ratas albinas machos, en las que se ha inducido la diabetes experimental por la administración de estreptozotocina. La maca amarilla disminuye la glicemia y aumenta los niveles de insulina en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. <sup>(61)</sup>.

El estudio concluye que se ha trabajado sobre las propiedades biológicas de la maca amarilla, la maca negra y la maca roja, y se ha mostrado diferencias entre ellas, pues la maca negra tiene mejores efectos en el conteo de espermatozoides, la memoria y el aprendizaje, el control de la glucosa y la resistencia física, en tanto que la maca roja tiene efectos sobre la hiperplasia benigna de próstata y en la osteoporosis; sin embargo, existen muchas otras variedades que aún requieren ser evaluadas. <sup>(61)</sup>.

**Salazar B. (2010)** presentó el estudio titulado: “Efecto del suplemento de harina de maca (*Lepidium meyenii Walp*) en el peso y talla de terneros de la raza Holstein (*Bos taurus*). El objetivo de este trabajo fue evaluar la ganancia de peso, el incremento de talla y, parámetros productivos. El suplemento de la harina de maca se efectuó desde el cuarto día de nacido en una cantidad de 10g, 20g y 30g, durante 30 días. Los terneros fueron alimentados con 6L/día de calostro durante 3 días, a partir del 4º día se le suministró 4L/día de leche entera a 38 °C y a la segunda semana de edad se le adicionó alimento balanceado comercial en una cantidad de 10g incrementándose según el consumo del ternero. <sup>(62)</sup>.

Al finalizar el experimento el grupo T2, con la adición de 20 g/día de la harina de maca fue el que respondió positivamente en el crecimiento rápido, mayor peso corporal, mejor tasa de crecimiento, siendo el peso promedio obtenido al final del trabajo experimental de 60,68 kg frente a otros grupos T0 (56,93 kg), T10 (58,30 kg), T30 (59,11 kg) de peso vivo. <sup>(62)</sup>.

**Castro E. (2017)** estudió el “Efecto antibacteriano de miel de *Apis mellífera* y algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado “La Unión”. <sup>(25)</sup>. El objetivo fue Identificar el efecto antibacteriano de la algarrobina de *Prosopis pallida* a concentraciones de 50, 100 y 150 µL/g sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente. <sup>(25)</sup>.

Se establecieron 3 grupos para miel de abejas y 3 para algarrobina. Se agregó 50µL, 100µL y 150µL de miel de abejas por cada gramo de queso, a cada uno de los tres grupos. De forma similar, se procedió para la algarrobina, además, se trabajó con un grupo testigo al cual no se le adicionó nada. Después de 20 minutos de acción de las dos sustancias, se realizó la detección de coliformes mediante el método del número más probable (NMP). Los resultados indican que la miel de abejas tiene actividad antibacteriana contra coliformes a 100µL/g y 150µL/g, mientras que la algarrobina lo hace en las 3 concentraciones, pero tiene efecto total a 100µL/g y 150µL/g. <sup>(25)</sup>.

Al finalizar el estudio, se arribó a la conclusión de que la algarrobina presenta efecto antibacteriano sobre los coliformes a concentraciones menores que la miel de abejas. <sup>(25)</sup>.

**Cárdenas C (2017)**, en su estudio “Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de (*Prosopis pallida*) “Algarrobo”, planteó como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* mediante el método de difusión en agar. <sup>(28)</sup>. Obtuvo el extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas, se determinó el contenido de polifenoles totales, mediante el método de Folin – Ciocalteu y la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853. <sup>(28)</sup>.

Al finalizar el estudio el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presentó actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* con una concentración mínima inhibitoria de =1000 µg/ml y frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con un CMI = 62,5 µg/ml. <sup>(28)</sup>.

**Peñaloza F. et.al. (2002)** realizaron el estudio titulado. “Valor nutricional de la Algarroba (*Prosopis pallida*) en la Alimentación del Caballo. El objetivo fue estimar el valor nutritivo de la algarroba (*Prosopis pallida*) en caballos. (63).

Se evaluaron cuatro raciones con niveles crecientes (0; 20; 46.7 y 66.7%) de algarroba, en una dieta base de cebada y heno de alfalfa. Se usaron cuatro caballos castrados de cruce anglo-argentino, que fueron sometidos a las cuatro raciones, en un diseño de sobre cambio simple con arreglo de Cuadrado Latino 4 x 4. (63).

El trabajo concluyó que la digestibilidad de la algarroba para caballos adultos es de 62%. Destaca la baja digestibilidad de la fibra cruda (6.9%). Asimismo, la ración tradicional (sin incluir algarroba) es la de mayor digestibilidad para todas las fracciones nutricionales, a excepción del extracto etéreo. (63).

### **2.1.2. Internacionales**

**Bermello S. et.al. (2015)** realizaron la investigación: “Métodos de extracción para los compuestos esenciales del algarrobo (*Prosopis Pallida*) y su posible aplicación a nivel industrial”. El objetivo fue describir diferentes métodos de extracción para los compuestos químicos provenientes de la especie vegetal “Algarrobo” (*Prosopis Pallida*) y su posible aplicación a nivel industrial. (64).

Se aplicaron técnicas como la colorimetría, espectrofotometría, titulación, lixiviación, destilación por arrastre de vapor y extracción por solventes fueron usadas en el transcurso de los procesos experimentales. Los principales compuestos que encontraron fueron taninos, fenoles, proteínas, carbohidratos y fibra. (64). Al finalizar el estudio se dio a conocer la composición, características y estructura del algarrobo. (64). Asimismo las utilidades que estas presentan y su participación destacada en en el campo de la medicina y en el sector de la industria. (64).

**Acosta E. (2015)**, en su estudio: “Desarrollo de un alimento complementario con harina de algarrobo (*Prosopis pallida*) fortificado con hierro”, plantea como objetivo determinar la aceptación de un alimento complementario, incorporando harina de algarrobo y fortificado con hierro. (65).

Utilizó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con tres repeticiones y ocho tratamientos donde se evaluaron dos porcentajes de harina de algarrobo, dos fuentes de hierro (sulfato y fumarato ferroso) y dos dosis de fortificación (45 y 60 mg). (65)

Se encontró, finalmente, que la formulación con la mayor aceptación fue la constituida por 20% de harina de algarrobo, fortificada con 45 mg de fumarato ferroso, aportando 4.36 mg de hierro por porción, cubriendo el 72.67% de los requerimientos nutricionales de los niños de seis a ocho meses de edad. Asimismo, el alimento complementario cumple con creces 140% el aporte de energía y proteína de alta calidad y constituye un buen vehículo para la fortificación con hierro. (65).

**Macías-Rodríguez E. et.al. (2017)**, en su estudio sobre “Utilización de la harina de algarrobo (*Prosopis pallida*) en la alimentación de conejos en crecimiento, engorde”, el objetivo fue evaluar la utilización de la harina de algarrobo, sustituyendo parcialmente al maíz en el balanceado con niveles de 7, 14 y 21%, para la alimentación de conejos en crecimiento y engorde. (66).

Se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado con 40 conejos neozelandés distribuido en los tres tratamientos a base de harina de *Prosopis pallida* (algarrobo) frente a un tratamiento control, con 5 repeticiones y el tamaño de la unidad experimental fue de un animal por jaula. (66).

Al término del proceso de la investigación se determinó que el mejor peso final y la mejor ganancia de peso lo registró el nivel de 14% de harina de algarrobo con 2,775 y 2,277 kg. En cuanto al consumo de alimento las mejores respuestas se registraron en los niveles 14 y 21% con 5,591 y 5,473 kg ms. <sup>(66)</sup>.

**Alcántara D. et.al. (2011)**, en la investigación “Efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* W. (Maca Negra) en la memoria espacial visual en ratones orquidectomizados”, el objetivo fue evaluar el efecto del extracto de Maca Negra en la memoria espacial visual (MEV) en ratones machos orquidectomizados. <sup>(67)</sup>. Para dicho efecto utilizaron 61 ratones machos de la cepa Swiss de 3 meses de edad, de los cuales 25 ratones fueron sometidos a orquidectomía. El tratamiento duró 55 días, en el que se administró extracto atomizado de *Lepidium meyenii* W. (Maca negra). El peso corporal del grupo de ratones castrados y tratados con el extracto atomizado de Maca Negra (CTX-MN) disminuyó significativamente al final del tratamiento ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control (CTX-MN). *Lepidium meyenii* W presenta compuestos fitoquímicos como glucosinolatos y polifenoles; así como también ácidos grasos saturados e insaturados, saponinas y fitoestrógenos. Estos últimos pueden revertir los efectos del envejecimiento y potenciar funciones cognitivas. Estos fitoestrógenos son esteroides como el betasitosterol, el campesterol y el estigmasterol. Al finalizar el estudio se concluyó que el extracto atomizado de Maca Negra mejora la Memoria Espacial Visual (MEV). <sup>(67)</sup>.

**Castañeda B. et.al. (2007)** presentaron el estudio titulado “Efectos metabólicos de *Lepidium meyenii* Walpers, “MACA” y *Lupinus mutabilis* Sweet, “CHOCHO” en ratas”. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de Maca y de Lupinus, en ratas hembras *Sprague Dawley*, con peso corporal entre 120 y 170g, sobre los valores de hematocrito, hemoglobina, glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, proteínas totales, albúmina, TGO, TGP y peso corporal, después de 15 y 30 días de tratamiento. <sup>(68)</sup>.

El extracto de la harina de Maca y Lupinus, que se les administró a los animales de experimentación, fue preparado al 10% p/v en agua destilada, sometándose a calentamiento hasta cocimiento por espacio de 10 minutos, después de los cuales se filtró, en caliente, utilizando papel de filtro rápido, preparándose, dos veces por semana y refrigerándose a menos de 4°C. <sup>(68)</sup>.

El *Lepidium meyenii* W y el *Lupinus mutabilis* S (Chocho), elevaron ligeramente las proteínas totales, la albúmina, la hemoglobina y el hematocrito, en relación al grupo control, aunque no estadísticamente significativa. Asimismo, el incremento del peso corporal, fue semejante en los tres grupos estudiados, los valores de Colesterol total, HDL, LDL y Triglicéridos, se elevaron, significativamente, en los tres grupos estudiados, en relación a sus controles basales, pero sin mostrar diferencia estadísticamente significativa, entre los diferentes grupos. <sup>(68)</sup>.

**Canales M. et.al. (2000)**, en su estudio sobre “Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* W (MACA) en ratones albinos y su descendencia”, se propusieron evaluar científicamente la propiedad nutricional de la Maca. <sup>(69)</sup>.

Fue un estudio controlado en dos generaciones de ratones Swiss (padres y crías). Los padres fueron aleatoriamente asignados a uno de tres esquemas alimenticios. El alimento de cada grupo fue preparado en base a polvo de un alimento balanceado comercial (ABC), al cual se le reemplazó un 30% (peso/peso) por Maca cruda o cocida según el grupo correspondiente o ABC puro en el grupo control. <sup>(69)</sup>.

Los resultados mostraron curvas de crecimiento similares y adecuadas para los tres grupos. Ninguno de los grupos mostró signos de desnutrición ni sobrepeso. Sin embargo, el grupo Maca cocida mostró mejores curvas de crecimiento incluso que el grupo ABC, mejor observable en la segunda generación de animales, con diferencias estadísticamente significativas. <sup>(69)</sup>.

El grupo control, tuvo un crecimiento superior al grupo Maca cruda. Los ratones del grupo Maca cocida tuvieron valores de proteínas totales y albúmina séricas superiores al de los grupos Maca cruda y grupo control. Este estudio demuestra en un modelo científico la propiedad nutricional de la Maca. <sup>(69)</sup>.

**Shimabuku N. (2017)**, en su trabajo sobre “Composición química de *Lepidium meyenii Walp.* (Maca): Comparando procedencias y colores del órgano de reserva”. realizó el análisis proximal y la determinación de metabolitos secundarios de hipocótilos amarillos, morados y negros de 3 zonas: Achipampa (4066 msnm), Junín y Ninacaca (zonas altas – 4507 msnm y 4495 msnm, respectivamente). <sup>(70)</sup>.

El estudio abarcó el análisis de humedad, proteínas, grasas, carbohidratos totales, fibra, cenizas; además de la cuantificación de hierro, fósforo y calcio. La determinación de metabolitos se realizó para compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides, quinonas, saponinas y alcaloides. <sup>(70)</sup>.

A nivel de procedencias, Ninacaca tuvo el porcentaje más alto de proteína y carbohidratos totales, pero más bajos de hierro y calcio, mientras que Achipampa mostró el mayor contenido de hierro, pero los menores contenidos de fósforo. En cuanto a los metabolitos secundarios, en todas las accesiones se determinó la presencia de compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides; así como la ausencia de: taninos, quinonas y saponinas. Asimismo, se encontraron flavonoides solo en hipocótilos morados y rojos. <sup>(70)</sup>.

En la cromatografía en papel de antocianinas se encontró que los pigmentos de hipocótilos morados y rojos no son los mismos y, finalmente, que existen indicios de que la pigmentación de hipocótilos morados es similar entre Junín y Ninacaca, pero difiere con Achipampa. <sup>(70)</sup>.

## **2.2. Bases Teóricas.**

### **2.2.1. Aspectos Botánicos de *Prosopis pallida***

#### **2.2.1.1. Historia**

Durante milenios el algarrobo ha sostenido al hombre, a través de su madera y sus frutos y al frágil ecosistema, dando nutrición al suelo y a los animales. Las distintas especies presentan características y propiedades similares. El algarrobo, viene aportando beneficios al hombre con los diversos usos que se le puede dar: el forraje que sirve como alimento para el ganado, la algarroba empleada para obtener la algarrobina, y sus ramas y troncos utilizados para obtener leña, carbón, usados como combustible. El algarrobo fue conocido desde tiempo pre-hispánicos, es así que los ídolos precolombinos fueron tallados en arboles del *Prosopis pallida*. Desde la época pre-inca los antiguos peruanos utilizaban la madera de algarrobo para la construcción de edificaciones y la elaboración de herramientas y utensilios, además de utilizarlo como combustible en las fundiciones de metales y en sus actividades domésticas. <sup>(23, 24)</sup>.

#### **2.2.1.2. Etnobotánica**

*Prosopis pallida* es un árbol multipropósito, pionero en la recuperación de la fertilidad de los suelos por su capacidad de fijación de nitrógeno desde la atmósfera y la adición de materia orgánica a partir de las hojas. Es una especie valiosa para la reforestación por su precocidad y su tolerancia a la sequía. Sus hojas acumuladas en el suelo forman un mantillo de capa gruesa que es apreciado como abono orgánico, siendo utilizado en la fertilización de campos cultivados y para acondicionar frutos. <sup>(25)</sup>.

Actualmente se ha incrementado el interés por el polen y néctar de las flores de algarrobo; en algunos lugares son preferidos por la miel transparente que producen. <sup>(25)</sup>.

Los frutos de *Prosopis pallida* por su composición tienen numerosas aplicaciones potenciales en la industria alimenticia. La harina tostada de algarroba puede reemplazar hasta un 50% el cacao utilizado en chocolates y en las recetas de pastelería y helados. Se caracteriza por tener un bajo contenido en grasas y ausencia de teobromina y cafeína. (26).

La harina de algarroba sin tratamiento presenta el 32,2% de fibra y con extracción previa de azúcares un 67,6% de fibra. Se usó su harina como ingrediente de panificación, encontrando aceptable hasta un 10% de la harina de trigo. La casi total ausencia de almidón en la harina de algarroba limita su uso en pan como levadura. La producción de proteína es un hecho, el problema principal de este proceso radica en la presencia de polifenoles, pero dada la mayor cantidad de azúcares y menor de polifenoles en la pulpa de *P. pallida*, el fruto de esta especie es excelente para este fin. (27).

La algarroba tiene muchas aplicaciones en la alimentación, tanto animal como humana. Por ello, fue ampliamente usada como complemento alimentario en periodos de escasez (durante la Guerra Civil Española). Actualmente se usa como forraje y en la Industria Farmacéutica. Las semillas de algarroba son muy ricas en mucílagos y tienen la facultad de ejercer una acción favorable contra las inflamaciones de las mucosas, reduciendo la irritación, tanto en vías respiratorias como digestivas y actuando adecuadamente contra las diarreas. También reducen el dolor de las contusiones. La algarroba ha sido reconocida como “alimento natural” y puede usarse molida como sustituto del chocolate y del cacao. (27).

### **2.2.1.3. Sinonimia**

El *Prosopis pallida* es un árbol conocido como algarrobo, perteneciente a la familia de las leguminosas, es originario de la zona mediterránea de Europa. (24).

El nombre “Algarrobo” proviene originalmente de los conquistadores españoles, que compararon este árbol, presumiblemente por sus vainas comestibles, con el algarrobo europeo (*Ceratonia Siliqua*), cuyas vainas también son comestibles. El *Prosopis pallida* se le conoce como Algarrobo Pálido (Costa Norte y Central del Perú), Kiawe (Hawai), Huarango (Departamento de Ica), Bayahonda y Algarrobo Americano (Puerto Rico).<sup>(24)</sup>.

#### **2.2.1.4. Taxonomía**

El *Prosopis pallida* fue descrita por August Heinrich Rudolf Grisebac y clasificada según Celis (1995) y Harris et.al. (2003):<sup>(63)</sup>.

Reino: Plantae

División: Fanerógama Magnoliophyta

Clase: Dicotiledónea Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Género: *Prosopis*

Especie: *Prosopis pallida*.

#### **2.2.1.5. Distribución geográfica**

El algarrobo es un árbol de zonas tropicales, crece en forma silvestre en zonas áridas, se encuentra distribuido a lo largo de la costa de océano pacífico, nativa de Perú, Colombia y Ecuador.<sup>(23, 64)</sup>.

Naturalizada en Hawái, Puerto Rico y cultivada en la India y Australia. También se encuentran en Bolivia, Chile y Brasil. En Perú, se encuentra en la parte norte de la costa, predominando en los departamentos de Piura, Tumbes y Lambayeque.<sup>(23, 64)</sup>.

Sin embargo, la especie *Prosopis pallida* está presente en los valles de Tacna, Arequipa, Nazca, Casma, Viru, Moche, Chicama, entre otros. (30).

#### **2.2.1.6. Descripción de la planta**

El algarrobo es un árbol que puede medir hasta 10 metros de altura, aunque su altura media es de 5 a 6 metros; es de follaje perenne. Tiene hojas pinnadas de color verde oscuro con una dimensión de entre 10 y 20 cm de largo y sus flores son pequeñas, rojas y sin pétalos. (65, 66).

El fruto, llamado algarroba, es una vaina coriácea de color castaño oscuro, son alargados y comprimidos, rectos o algo curvados, miden de 16 a 28 cm de largo por 14 a 18 mm de ancho y de 6 a 10 mm de espesor, terminando al extremo en una especie de pico. (65, 66).

El fruto, contiene una pulpa gomosa de sabor dulce y agradable que rodea las semillas. Las vainas son comestibles y se usan como forraje. (65, 66).

Los frutos son de color verde y posteriormente pasa a amarillo paja o amarillo marrón, Es multiseminada, encorvada e indehisciente, su forma, tamaño, espesor y peso es variado, se estima en tres meses el tiempo transcurrido entre la floración y el fructificación. La producción mayor de frutos corresponde a los meses de enero y febrero; hay un segundo fructificación de menor cantidad entre julio y agosto. La pulpa representa aproximadamente el 56% del peso total del fruto. (65, 66).

#### **2.2.1.7. Variedades nativas**

Las especies de algarrobo que habitan en la costa norte del Perú, presentan ramas de tipo ascendente y colgante o decumbente, que pueden llegar hasta el suelo. (33, 34).



**Figura N° 01:** Planta *Prosopis pallida*. <sup>(71)</sup>.



**Figura N° 02:** Espinas y Hojas. <sup>(71)</sup>.



**Figura N° 03:** Inflorescencia. <sup>(71)</sup>.



**Figura N° 04:** Vaina. <sup>(71)</sup>.



**Figura N° 05:** Vaina Seca. <sup>(71)</sup>.

***Prosopis pallida* variedad *pallida*:**

Árbol o arbolillo de 3 a 10 m de alto, por 30 a 65 cm de diámetro, erguido, ramoso, con las ramas ascendentes, inermes, las hojas de 6 a 12 cm de largo y con 2 a 3 por nudo. El pecíolo mide de 11–30 mm de longitud. Glándula interpeciolar pequeña, cupuliforme, sésil con poro apical, con pinnas de 3–6 cm de largo, y tienen 12–15 pares de folíolos. Los folíolos miden 7–12 mm de largo por 3–4 mm de ancho, son elípticos, reticulados, nervados. Las flores amarillas se disponen en racimos de 6–17 cm de largo, presentan cáliz de 1–1,2 mm de largo; corola de 3–3,2 mm de largo; estambres de 4–5,5 mm de largo; estilo de 2–2,5 mm de largo; ovario de 1,5–1,8 mm de largo. Pedicelo de 5–30 mm de longitud. <sup>(33, 34)</sup>.

En cada inflorescencia maduran 2–3 frutos. El fruto es muy dulce, de 16–25 cm de largo por 8–15 mm de ancho y 4–9 mm de grosor, recto o ligeramente falcado, semicomprimido, amarillo, con acúmen de 6–21 mm de largo, curvo, glabro. Con un pedúnculo de 8–20 mm de longitud, glabro. Las semillas son oblongas de hasta 6,5 mm de largo y 5 mm de ancho. <sup>(33, 34)</sup>.

En el norte del Perú la mayoría de los árboles tiene espinas. Los ejemplares de *Prosopis pallida* se pueden reconocer con cierta facilidad, por tener sus hojas apariencia encrespada, lo que ha determinado que los pobladores de algunos lugares le llamen “Algarrobo Sambito”. <sup>(33, 34)</sup>.

***Prosopis pallida* variedad *armata*:**

Es un árbol de 3 a 8 m de alto; con tronco erguido, de 20–60 cm de diámetro, ramoso, con ramas espinosas y espinas geminadas, divaricadas, de 5–30 mm de longitud. Las hojas de 4–14 cm de largo, en número de 2–4 por nudo. El pecíolo de 8–35 mm de longitud. <sup>(33, 34)</sup>.

Las pinnas de 3–6 cm de largo, con 10–15 pares de folíolos. Los folíolos de 6–12,5 mm de largo por 2–4 mm de ancho, elípticos con ápice obtuso, mucronados, cinéreo villosos, nervios prominentes abajo. (31, 32).

Flores amarillentas en racimos de 5–14 cm de largo. Con un pedicelo de 8–20 mm de ancho y 4–10 mm de grosor, comprimido, falcado, raramente recto, ligeramente submoniliforme, amarillo. Tiene frutos pequeños de 14–20 cm de longitud. Acumen de 8–25 mm de largo, curvo, glabro, amarillo. El pedúnculo de 4–22 mm de largo, glabro, con glándula interpeciolar cupuliforme, sésil, pardusca con poro apical. Típico del norte peruano; se caracteriza por sus ramas adornadas de espinas geminadas, que en realidad sirven de defensa contra la depredación de animales herbívoros. Produce muchos frutos grandes, que alcanzan hasta 30 cm de largo o más, con elevado contenido de azúcares. (31, 32).

***Prosopis pallida* variedad *decumbens*:**

Es un árbol o arbolillo de 3–5 m de alto, con tronco de 30–50 cm de diámetro, muy ramoso, con largas ramas, decumbentes, espinosas, las espinas son geminadas y divaricadas, de 15 –28 mm de longitud. Las hojas de 5–8 cm de largo, con 2–5 hojas por nudo. El pecíolo de 10–15 mm de longitud. Con glándula interpeciolar cupuliforme, pequeña, sésil con poro apical. (31, 32).

Cada pinna de 4–8 cm de largo tiene 11–12 pares de folíolos, éstos son de 7–10 mm de largo por 2–3 mm de ancho, elípticos, glabros, mucronados, el raquis es ligeramente piloso abajo. Las flores amarillas o amarillentas en racimos de 9–12 cm de largo. El pedicelo de 8–14 mm de largo, maduran entre 2 y 4 frutos por inflorescencia de 15,5–30 cm de largo por 10–17 mm de ancho y 4–7 mm de grosor, comprimidos, falcados, raras veces rectos, de color amarillo. Con acúmen de 8–20 mm de largo, ligeramente curvo, glabro. (31, 32).

### ***Prosopis pallida* variedad *annularis*:**

Es un árbol o arbolillo de 3–5 m de alto, tronco erguido, de 25–50 cm de diámetro, ramoso, con ramas espinosas y espinas geminadas, divaricadas de 5–12 mm de longitud. Las hojas de 4–8 cm de largo dispuestas de 2–5 por nudo. El pecíolo de 8–10 mm de longitud. Con glándula interpeciolar cupuliforme, sésil, pardusca con poro apical. Las pinnas de 3 a 5 cm de largo con 12 a 13 pares de folíolos. Los folíolos de 6–8 mm de largo por 2–3 mm de ancho, elípticos, con el ápice obtuso, mucronados, el raquis y venas laterales prominentes abajo. <sup>(27, 28)</sup>.

Glándula interfoliar pequeña, redondeada, sésil, parda con poro apical. Las flores amarillentas dispuestas en racimos de 6–10 cm de largo. El pedicelo de 10–15 mm de largo. La espiga con 2–5 frutos. Los frutos de 22–26 cm de largo por 15–18 mm de ancho y 4–5 mm de grosor, conspicuamente anillados o falcados, comprimidos o semicomprimido, de color amarillo. <sup>(27, 28)</sup>.

#### **2.2.1.8. Composición química**

Valor nutricional del fruto o vaina del algarrobo se detalla en la siguiente Tabla N° 01:

**Tabla 01: Valor nutricional del fruto del Algarrobo**

<b>ELEMENTO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
Humedad	10.4
Materia seca	89.6
Proteínas	9.8
Fibras	15.9
Extracto etéreo	1.1
Ext. Nitrogenado	59.4
Ceniza	3.3
Calcio	0.5
Fósforo	0.2

**Fuente:** (Perú Ecológico 2012). <sup>(64, 65, 66)</sup>.

La harina de algarrobo está compuesta principalmente de azúcares, aproximadamente entre un 40 y 50% está conformada fundamentalmente de fructosa, glucosa y sacarosa. <sup>(64, 65, 66).</sup>

También tiene un 5% de proteínas y muchos minerales: hierro, calcio, magnesio, zinc, silicio, fósforo y mucho potasio, lo que unido a su bajo contenido de sodio contribuye a balancear nuestra dieta tan rica en sodio. <sup>(64, 65, 66).</sup>

Además, al no poseer gluten como sucede con otras harinas, resulta apta para celíacos. <sup>(64, 65, 66).</sup>

Uno de los componentes más destacados en el algarrobo son las fibras, estas están conformadas fundamentalmente por pectina y lignina, son beneficiosas para la digestión por ello su utilización en tratamientos médicos que afectan a la flora intestinal. Las fibras además disminuyen la cantidad de bacterias e incrementan los lacto bacilos. <sup>(64, 65, 66).</sup>

Otra característica de la harina de algarrobo es que se puede obtener chocolate sin teobromina y cafeína, por esta razón es una alternativa más saludable y recomendable que el chocolate obtenido del cacao. <sup>(64, 65, 66).</sup>

El contenido de proteína cruda en la pulpa de *Prosopis pallida* es considerablemente alto (8,1%), asimismo la digestibilidad de la proteína es alta: 73%. <sup>(64, 65, 66).</sup> La fibra dietética representa aproximadamente el 32% de la pulpa y es en su mayor parte fibra insoluble; más de la mitad de la fibra está compuesta de polisacáridos neutros. <sup>(64, 65, 66).</sup>

Del mismo modo contiene altas cantidades de hierro y bajos niveles de calcio. <sup>(64, 65, 66).</sup>

**Tabla 02: Composición de la pulpa de *Prosopis pallida***

<b>COMPONENTES PRINCIPALES (g/100 base seca)</b>		<b>AMINOÁCIDOS (g/100 g proteína)</b>		
Azúcares solubles totales.	48.5	Hidroxiprolina.	2.13	WHO/FAO patrón
Sacarosa.	46.1	Acido aspártico.	8.51	
Fructosa.	1.26	Treonina.	4.68	4
Glucosa.	1.02	Serina.	4.96	
Xilosa.	0.27	Acido glutámico.	10.07	
Fibra dietética total.	32.2	Prolina.	23.40	
Fibra dietética insoluble.	30.6	Glicina.	4.68	
Fibra dietética soluble.	1.6	Alanina.	4.26	
Proteína (N x 6.25).	8.1	Cisteína.	0.43	
Suma de aminoácidos.	7.1	Metionina.	0.57	
Proteínas resistentes.	2.2	Met + Cis.	1.00	3.5
Grasa.	0.77	Valina.	7.80	
Cenizas.	3.6	Isoleucina.	3.26	4
Taninos condensados.	0.41	Leucina.	7.94	7
Polifenoles solubles totales.	0.81	Tirosina.	2.84	
		Fenilalanina.	2.98	
		Tir + Fen.	5.82	6
		Lisina.	4.26	5.5
		Histidina.	1.99	
		Arginina.	4.82	
		Triptófano.	0.89	1
<b>MINERALES (g/kg b.s.)</b>		<b>VITAMINAS (mg/kg muestra)</b>		
Potasio.	26.5	Vitamina A.	No detectada	
Sodio.	1.1	Vitamina E.	5	
Calcio.	0.76	Vitamina B1.	1.9	
Magnesio.	0.9	Vitamina B2.	0.6	
Cobre.	Trazas	Vitamina B6.	2.35	
Zinc.	Trazas	Ácido Nicotínico.	31	
Manganeso.	Trazas	Vitamina C.	60	
Hierro.	0.33	Ácido Fólico.	0.18	
		Pantotenato de Calcio.	10.5	

Prokopiuk D. 2004. (64, 65, 66).

## 2.2.2. Aspectos botánicos de *Lepidium meyenii* W

### 2.2.2.1. Historia

Se ha documentado evidencia antropológica del cultivo del *Lepidium meyenii* W en el Perú desde el año 1600 a.c. La Maca era considerada por los incas como un regalo de los dioses. Ellos, además de cultivarla como alimento, la utilizaban en ceremonias religiosas para danzas y rituales. <sup>(36, 37)</sup>.

Los relatos más antiguos dicen que el cultivo de la Maca se inició en la etapa tardía de la cultura Wanka y fue en la época de los Incas cuando se intensificó, especialmente en el altiplano habitado por los Collas, y con este producto (“Taky Oncoy”) alimentaban a sus tropas para potenciar su fortaleza física. También los conquistadores españoles impusieron la maca como tributo a los pueblos sometidos tras comprobar que, al alimentar con ella a sus animales traídos de Castilla, éstos recuperaban el nivel de reproducción que habían perdido en esas altitudes. <sup>(36, 37)</sup>.

Las primeras descripciones de la planta y sus usos, se deben a los españoles Vásquez Espinoza (alrededor de 1598) y Cobo (entre 1603-1629). Más tarde, Hipólito Ruíz, formando parte de la “Royal Spanish Botanical Expedition” (1777-1778), encontró la planta en cultivo cerca al lago de Junín y da una corta nota sobre su utilización. Fue en 1843 cuando Wilhelm Gerhard Walpers, la describe válidamente con el nombre de *Lepidium meyenii* W. <sup>(36, 37)</sup>.

En 1990, Gloria Chacón describe otra especie para la maca cultivada *Lepidium peruvianum* Chacón. Esta autora indica que la especie por ella descrita se corresponde con la maca cultivada tradicionalmente en los Andes peruanos y que *Lepidium meyenii* W. es la maca silvestre de estos mismos lugares. <sup>(36, 37)</sup>.

Pero en la mayoría de los catálogos y floras actuales esta segunda especie (*Lepidium peruvianum*) se considera sinónimo de la primera (*Lepidium meyenii* W.) y es con esta denominación como se conoce a la maca en la actualidad. <sup>(36, 37)</sup>.

### **2.2.2.2. Etnobotánica**

Es usada en la medicina natural como: alimento, reconstituyente físico y mental; es considerada como una raíz que tiene propiedades reguladoras de hormonas, es antianémico, restauradora de energías y como factor de crecimiento en la intervención de la formación ósea del cuerpo humano. <sup>(38)</sup>.

La propiedad más importante conocida en la tradición andina es su efecto sobre la fertilidad debido a la presencia de isocianatos aromáticos e isocianato de Pmetoxibencil; ésta es la cualidad principal atribuida a la maca desde el siglo XVI, y considerada como uno de los factores para el aumento de la población en las zonas más altas del Perú. También se le usa para tratar la frigidez, impotencia sexual y la debilidad mental. <sup>(38)</sup>.

Las propiedades beneficiosas que se le atribuyen a la raíz de maca son:

Afrodisíaca: aumenta el deseo sexual y mejora la disfunción sexual en ambos sexos, siendo responsables de estas acciones los macaenos, macamidas, prostaglandinas, esteroides, alcaloides, glucosinolatos e isotiocianatos. <sup>(39, 40)</sup>.

Fertilidad (espermatogénesis y función reproductiva femenina): mejora la fertilidad al aumentar la producción y la motilidad de los espermatozoides, siendo los esteroides, glucosinolatos e isotiocianatos los responsables de esta actividad. <sup>(39, 40)</sup>.

Menopausia: los esteroides son los responsables de la disminución de rubores, sofocos y síntomas psicológicos asociados, tales como ansiedad y depresión. <sup>(39, 40)</sup>.

Osteoporosis: se ha demostrado que consumidores de maca roja y negra presentan menos tasas de fracturas que aquellos que no la consumen. <sup>(39, 40)</sup>.

Energizante y antiestrés: debido a su alto contenido en proteínas, ácidos grasos insaturados y minerales, es considerada un gran adaptógeno (aumenta la energía y disminuye el estrés y la fatiga). <sup>(39, 40, 41)</sup>.

Regulación metabólica: la maca negra y amarilla presentan actividad hipoglucemiante (reduce hasta 50% el valor de glucosa en sangre), hipolipemiante (disminuye los niveles plasmáticos de LDL, VLDL, colesterol y TG, debido a su alto contenido en selenio y otros antioxidantes) e hipotensora por su alto contenido en potasio. <sup>(41, 42)</sup>.

Antioxidante: inhibe los radicales libres y protege las células del estrés oxidativo y de la apoptosis inducida. <sup>(41, 42)</sup>.

Citostática: la maca roja reduce el peso de la próstata, sin afectar al de las vesículas seminales, por disminución de los niveles de zinc intraprostático. Efecto probablemente debido a las propiedades antiproliferativas y pro-apoptóticas de los glucosinolatos aromáticos. <sup>(41, 42)</sup>.

Función cognitiva: la maca negra revierte el daño causado sobre la memoria y el aprendizaje espacial en ratas ovariectomizadas o tratadas con escopolamina, al parecer debido a la presencia de quercetina y antocianinas. <sup>(41, 42)</sup>.

Actividad inmunomoduladora: se debe a la presencia de alcaloides, macamidas, glucosinolatos e isotiocianatos. <sup>(67)</sup>.

El ecotipo morado, a diferencia de los ecotipos rojo, negro y blanco, estimula la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T humanos cultivados in-vitro. El incremento de esta citoquina podría emplearse en el tratamiento del Alzheimer ya que juega un papel importante en la producción de los péptidos  $\beta$ -amiloides. <sup>(67, 68)</sup>.

Antienvejecimiento: se ha visto que consumidores de maca presentan menor cantidad de interleukina 6 (glucoproteína asociada al envejecimiento y a la artritis reumatoide por su actividad inflamatoria). <sup>(67, 68)</sup>.

Actividad hematopoyética: el consumo de polvo de maca, en pacientes con anemia ferropénica, aumenta considerablemente los niveles de Fe, también se ha demostrado que la maca amarilla incrementa el número de glóbulos blancos, hemoglobina y células de médula ósea en animales inmunodeprimidos. <sup>(67, 68)</sup>.

La raíz es usada desde tiempos precolombinos por su gran valor nutricional. Tradicionalmente no se consume en fresco por considerarse dañina. Se hierven en agua o leche, al menos 2 horas, hasta alcanzar textura suave. También pueden consumirse recién cosechadas, horneadas o asadas en cenizas o piedras precalentadas ("pachamancas"), las cuales tienen sabor dulce. <sup>(67, 68)</sup>.

### **2.2.2.3. Sinonimia**

*Lepidium*: nombre genérico que deriva del griego, y significa "pequeña escama", en referencia al tamaño y forma de los frutos (Silicuas).

*Meyenii*: Epíteto otorgado en honor del Botánico Franz Julius Fernand Meyen. <sup>(46, 48)</sup>.

El *Lepidium meyenii walp* es conocido también como *Lepidium peruvianum*. <sup>(46, 48)</sup>.

De forma común se le conoce también como: maca, maka y viagra andino. Sus sinonimias son las siguientes: *Lepidium affine*, *Lepidium gelidum*, *Lepidium marginatum*, *Lepidium meyenii* var. *Affine*, *Lepidium meyenii* subsp. *Gelidum* y *Lepidium orbignyanum*.<sup>(46, 48)</sup>.

#### 2.2.2.4. Taxonomía

En 1990, la botánica Gloria Chacón de Popovici describió la maca domesticada y ampliamente cultivada como *Lepidium peruvianum* (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su Hábitat.<sup>(49, 50)</sup>.

Otros botánicos dudan hoy de esta distinción. El nombre latino reconocido actualmente sigue siendo únicamente *Lepidium meyenii* W. Hay un debate aún en curso acerca de la nomenclatura correcta, y sobre si la distinción entre *L. meyenii* y *L. peruvianum* botánicamente es correcta o si son la misma especie.<sup>(49, 50)</sup>.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnolipsida

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Género: *Lepidium*

Especie: *Lepidium meyenii* Walp.

#### 2.2.2.5. Distribución geográfica

La Maca (*Lepidium meyenii* Walpers) es una especie nativa de las altas mesetas andinas del Perú en altitudes hasta de 4.400 m.s.n.m. Se cultiva principalmente en la zona de la meseta de Bombón en el Departamento de Junín, entre los 3700 y 4500 m.s.n.m., región que presenta un clima agreste y temperaturas extremas de – 10° C.<sup>(49, 50)</sup>.

Asimismo, en Cerro de Pasco a una altitud superior a 3.500 m.s.n.m. y muchas veces llegando a los 4,450 msnm en los Andes Centrales del Perú. <sup>(49, 50)</sup>.

#### **2.2.2.6. Descripción de la planta**

La Maca (*Lepidium meyenii Walpers*) es una planta herbácea anual, de porte arrosetado, raíz napiforme, tuberosa, de consistencia dura que es la parte comestible, con gran contenido de féculas de forma redondeada, de 4 a 7 cm de longitud y de 3 a 5 cm de diámetro, en la parte más ensanchada. Los ecotipos más importantes son de color amarillo, negro, rojo y morado. <sup>(61, 62)</sup>.

Las semillas son ovoides, de color rojizo gris, de 2 a 2,5 mm, los hipocótilos que son la parte comestible de la planta varía de 2 y 5 cm. en tamaño. La pulpa es blanca – perla y tiene apariencia marmórea. <sup>(61, 62)</sup>.

Se compone de dos partes regulares bien definidas: una región exterior y una cilíndrica central. La sección exterior es rica en azúcares, la sección interior es firme y rica en almidones. Las hojas son arrosetadas y compuestas, presenta flores hermafroditas, actinoformas, muy pequeñas, de color verde claro. El fruto es silicua, con una sola semilla en cada celda. <sup>(61, 62)</sup>.

#### **2.2.2.7. Variedades nativas**

En relación a las variedades nativas en este caso hablaremos de Ecotipos los cuales son aquellas sub-especies especialmente adaptadas a un conjunto específico de condiciones ambientales. Ecotipo e Hipocotilo son las diferentes maneras de denominar a la parte subterránea y ensanchada del cultivo de la Maca y constituye la parte comestible. <sup>(39, 40)</sup>.



**Figura N° 06:** *Lepidium meyenii* Walp  
Roseta basal (Hojas). (37, 39, 40).



**Figura N° 07:** *Lepidium meyenii* Walp  
Raíces tuberosas. (37, 39, 40).



**Figura N° 08:** *Lepidium meyenii* Walp  
Variedad Amarilla. (37, 39, 40).



**Figura N° 09:** *Lepidium meyenii* Walp  
Ecotipo Negra. (37, 39, 40).



**Figura N° 10:** *Lepidium meyenii* Walp  
Cultivo. (37, 39, 40).

Se conocen diferentes ecotipos de maca, teniendo en cuenta el color externo de la raíz. Presentan principalmente colores amarillo, negro, rojo y morado, rojo-amarillo, rojo-blanco, blanco, morado blanco. <sup>(39, 40)</sup>.

También son blanco-morado, blanco-rojo, piorno, amarillo-rojo, plomo claro. Los colores amarillos, crema y morado son los más apreciados en el mercado, siendo el plomo el menos aceptado, debido a su dificultad en el proceso de cocción. <sup>(39, 40)</sup>.

La clasificación de los hipocótilos para su comercialización se realiza de acuerdo al diámetro, midiendo en zona suberificada de la raíz, se clasifican en las siguientes categorías. <sup>(39, 40)</sup>.

- a) Grandes, hipocótilos frescos mayores a 5 cm de diámetro.
- b) Medianos, hipocótilos frescos de 3 a 4,9 cm de diámetro.
- c) Pequeños, hipocótilos frescos menores a 2,9 cm de diámetro.

En la actualidad se han colectado hasta 13 Ecotipos, de acuerdo a la coloración de los hipocótilos, que varían de un color blanco hasta negros. <sup>(39, 40)</sup>.

#### **2.2.2.8. Composición química**

El valor nutricional de los hipocótilos del *Lepidium meyenii Walp* (Maca) es tan alto como el del maíz, del arroz y del trigo. Los hipocótilos deshidratados de la maca tienen aproximadamente 13 – 16% de proteína, y son ricos en aminoácidos esenciales. Los hipocótilos frescos contienen 80% de agua, y tiene altas concentraciones de hierro y calcio. <sup>(41, 42)</sup>.

En las tablas 03, 04 y 05 se muestran los metabolitos primarios de la maca. <sup>(41, 42)</sup>.

**Tabla 03: Oligoelementos**

Determinación	Amarillo	Rojo	Negro
Sales minerales (mg. %)			
Potasio	1130	1160	1000
Sodio	20	20	40
Magnesio	70	80	80
Calcio	190	200	240
Fosforo	320	290	280
Oligoelementos (p.p.m)			
Cobre	6	6	8
Zinc	32	30	30
Manganeso	22	20	22
Hierro	80	62	86
Boro	12	24	26

Fuente: Li *et al.* (2004).<sup>(43, 44).</sup>

**Tabla 04: Análisis proximal**

Determinación	Amarillo	Rojo	Negro
Análisis proximal.	Gramos	Gramos	Gramos
Humedad.	9.71	10.14	10.47
Proteínas totales.	17.99	17.22	16.31
Grasa.	0.82	0.91	0.82
Fibra.	5.30	5.45	4.95
Cenizas.	3.49	3.68	3.63
Carbohidratos.	62.69	62.60	63.82
Nitrógeno total.	2.87	2.76	2.42
Nitrógeno no proteico.	1.55	1.16	1.36
Proteína pura (NP x 6.25)	8.25	9.97	7.70
Almidón.	37.86	37.52	38.18
Azúcares solubles. Reductores directos.	6.17	6.03	7.02
Azúcares solubles. Reductores indirectos.	16.52	17.26	17.10
Vitaminas (mg. %)			
Niacina.	43.03	37.27	39.06
Ácido ascórbico.	3.52	3.01	2.05
Riboflavina.	0.61	0.50	0.76
Tiamina.	0.42	0.52	0.43

Fuente: Li *et al.* (2004).<sup>(43, 44).</sup>

**Tabla 05: Aminoácidos**

<b>Aminoácidos</b>	<b>(Mg. Concentración/gr. Proteína)</b>
Ácido Glutámico.	156.5
Arginina.	99.4
Ácido Aspártico.	91.7
Leucina.	91.0
Valina.	79.3
Glicina.	68.3
Alanina.	63.1
Fenilalanina.	55.3
Lisina.	54.5
Serina.	50.4
Isoleucina.	47.4
Treonina.	33.1
Tirosina.	30.6
Metionina.	28.0
HO-Prolina.	26.0
Histidina.	21.9
Sarcosina.	0.7
Prolina.	0.5
Cisteína.	Nd*
Triptófano.	Nd*
*Nd: No determinados.	

Fuente: Li *et al.* (2004). <sup>(43, 44)</sup>.

#### Metabolitos secundarios:

En la Maca se han reportado la presencia de alcaloides (hasta 4 fracciones), glucósidos, taninos y escasas saponinas. Estudios posteriores han demostrado la existencia de un número importante de metabolitos secundarios procedente de los hipocótilos. <sup>(45, 46)</sup>.

Entre los compuestos presentes en los hipocótilos se encuentran la uridina y el ácido málico. Igualmente, se ha descrito la presencia de prostaglandina, flavonoides y antocianinas. Entre los flavonoides se encuentran la flavonol y la quercetina. <sup>(45, 46)</sup>.

Las antocianinas son responsables del color externo de los hipocótilos. Otro alcaloide encontrado fue el isopteropodin, que también ha sido descrito en la uña de gato. <sup>(45, 46)</sup>.

En la Tabla N° 06, se muestra los metabolitos secundarios

**Tabla 06: Esteroides**

<b>Esterol</b>	<b>Porcentaje</b>
Sitosterol	45.50
Campesterol	27.30
Ergosterol	13.60
Brassicasterol	9.10
Ergostadienol	4.50
<b>Ácidos Grasos</b>	
Saturados	40.10
Insaturados	52.70
<b>Relación Saturados / Insaturados</b>	0.76
De los cuales: Linoleico: 32.6%, Palmítico: 23.8%, Oleico: 11.1%	
<b>Derivados Esterólicios</b>	
Acetato de Brasicasteril	9.1
Acetato de Ergosteril	13.6
Acetato de Campesteril	27.3
Acetato de Ergostadienil	4.5

Fuente: Piacente et al. (2002).<sup>(45, 46)</sup>.

Estudios sobre la composición del hipocótilo han demostrado que éste contiene macamidas y macaenos que son ácidos grasos insaturados oxidados, glucosinolatos, alcaloides, aminoácidos, isotiocianatos, aminas secundarias alifáticas y terciarias, antocianinas, saponinas, flavonoides, entre otros.<sup>(67, 68)</sup>.

Los glucosinolatos son los metabolitos secundarios más importantes en la maca. Son glucósidos que contienen azufre con cadenas alifáticas, aromáticas o indólicas que se encuentran en las plantas de la familia de las Brassicáceas. Los glucosinolatos varían su contenido y tipo según la edad de la planta y el color del hipocótilo.<sup>(67, 68)</sup>.

Macaenos y macamidas son ácidos grasos poliinsaturados oxidados y amidas presentes en maca, respectivamente. Son bencilalquilamidas; es decir, son amidas de ácido graso formadas por la condensación entre aminas benciladas y ácidos grasos libres provenientes de ruptura de membrana o hidrólisis lipídica.<sup>(67, 68)</sup>.

Por otro lado, los macaenos son ácidos grasos oxidados por lipoxigenasas (LOX) que reaccionan con aminas libres presentes en maca para formar macamidas oxidadas. Los macaenos son oxilipinas de maca que competirían con los ácidos grasos presentes para formar las respectivas amidas. Asimismo, otros estudios demuestran que la maca contiene flavonoides del tipo flavonol: catequinas, epicatequinas, galato epicatequina, epigalocatequina y galato epigalocatequin. También se ha reportado quercetina. <sup>(67, 68)</sup>.

### **2.2.2.9. Metabolitos secundarios**

Son compuestos químicos propios de la cada parte de cada planta, presentan diferentes componentes químicos con efectos terapéuticos variados. Los compuestos secundarios no presentan actividad en las plantas, pero los primarios sí tienen una implicación ecológica. Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo, 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, esteroides, alcaloides, etc. <sup>(1, 2, 3)</sup>.

#### **Tipo de metabolito secundario <sup>(1, 2, 3)</sup>.**

Teniendo en cuenta sus grupos funcionales, la clasificación se realiza en tres partes: terpenoides y esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides.

##### **a. Compuestos terpenoides y esteroides**

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

La unidad fundamental que define a estos compuestos que contienen 5 átomos de carbono múltiplo; (hidroxilos, cetonas, etc.) y se le conoce con el nombre de isopreno.

b. Compuestos fenólicos

Comprenden a los flavonoides y los fenilpropanos. Los flavonoides se clasifican en flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, auronas y chalconas.

c. Alcaloides

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

#### **2.2.2.10. Registro de campo (ubicación geográfica)**

El tubérculo *Lepidium meyenii Walp* procede de las alturas del Distrito de Huayucachi, en la provincia de Huancayo, Junín. En el mes de febrero del 2018, fue identificado en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El *Prosopis pallida*, se recolectó en el mes de marzo en el Parque Ecológico Kurt – Beer, ubicado en el sector sur oeste de la ciudad, distrito, provincia y departamento de Piura.

Ambas muestras fueron estudiadas y procesadas en los laboratorios de especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

a) Método de extracción

Los tubérculos de la Maca negra, fueron cosechados a los 6 meses de siembra, los cuales fueron seleccionados, lavados, limpiados y cortados en fragmentos muy pequeños.

Asimismo, las vainas de Algarroba, fueron seleccionadas, lavadas, limpiadas y cortadas en fragmentos. Ambas muestras se colocaron en bandejas de acero quirúrgico, las cuales posteriormente se sometieron a deshidratación y secado a una temperatura de 40°C por 90 horas. Al finalizar el proceso, se obtuvieron muestras secas de buena calidad. (33, 50). Posteriormente ambas muestras se terminaron de trozar y se les sometieron a molienda en mortero hasta obtener un polvo fino homogéneo, luego se pesaron 100g de cada muestra y se procedió al tamizado en mallas metálicas de 1/16", hasta obtener una uniformidad del producto. 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. (39, 42, 27, 64).

#### **2.2.2.11. Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico se efectuó mediante una serie de reacciones de coloración y precipitación que permitieron la detección de componentes químicos de determinada estructura y permitió también determinar cualitativamente los principales grupos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos. (1, 2, 3). Los resultados constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del "Screening" farmacológico. (1, 2, 3).

##### **a) Metodología para el análisis fitoquímico (1, 2, 3, 5).**

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

b) Reacciones de identificación <sup>(1, 2, 3)</sup>.

Consiste en una serie de reactivos, que identifica cada metabolito secundario que esté presente en el extracto de la planta a investigar.

## 2.3. Bases microbiológicas

### 2.3.1. Nutrición bacteriana

La nutrición es el proceso por el que los seres vivos toman del medio donde habitan las sustancias químicas que necesitan para crecer. Dichas sustancias se denominan nutrientes y se requieren para dos objetivos: <sup>(17)</sup> energéticos (reacciones de mantenimiento) y fines biosintético (reacciones plásticas o anabolismo). Las biosíntesis de nuevos componentes celulares son procesos que requieren energía procedente del medio ambiente. Asimismo, la nutrición presenta un aspecto de aprovisionamiento de energía y otro de suministro de materiales para la síntesis celular, podemos hablar de dos "clasificaciones" de tipos de nutrición: Desde el punto de vista de los fines de aprovisionamiento de energía, las bacterias se pueden dividir en <sup>(18)</sup>:

- Litótrofas: son aquellas que sólo requieren sustancias inorgánicas sencillas ( $\text{SH}_2$ ,  $\text{SO}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Fe}$ , etc.).
- Organótrofas: requieren compuestos orgánicos (Carbohidratos, hidrocarburos, lípidos, proteínas, alcoholes).

Desde el punto de vista biosintético, las bacterias se pueden dividir en <sup>(21)</sup>:

- Autótrofas: crecen sintetizando sus materiales a partir de sustancias inorgánicas sencillas. Utiliza una fuente inorgánica de carbono, el  $\text{CO}_2$ .
- Heterótrofas: su fuente de carbono es orgánica.

- Autótrofas estrictas: son aquellas bacterias incapaces de crecer usando materia orgánica como fuente de carbono.
- Mixótrofas: son aquellas bacterias con metabolismo energético Litótrofas: obtienen energía de compuestos inorgánicos, pero requieren sustancias orgánicas como nutrientes para su metabolismo biosintético.

Sean autótrofas o heterótrofas, todas las bacterias necesitan captar una serie de elementos químicos, que se pueden clasificar (según las cantidades en que son requeridos) como macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg), y micronutrientes o elementos traza (Co, Cu, Zn, Mo).<sup>(51)</sup>

Aunque dentro del mundo de los procariontes se encuentre tanta variedad de nutriciones, las bacterias que pueden nutrirse solamente de sustancias inorgánicas sencillas (H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, fosfatos, etc.) son minoría. Los microorganismos quimio autótrofos (o quimiolitóautótrofos)<sup>(51)</sup>:

Obtienen su energía de la oxidación de sustancias inorgánicas sencillas, el carbono procede del CO<sub>2</sub>, y el resto de elementos a partir de sales inorgánicas, por lo que pueden vivir en soluciones de sales minerales.<sup>(51)</sup>

Fuentes de carbono:

El constituyente principal que tienen los microorganismos es el carbono, debido a esto, estos seres no pueden tener la falta de dicho elemento; la forma más empleada por estos son los carbohidratos, que particularmente además de ser fuentes de carbono también son fuente de oxígeno, hidrógeno y energía metabólica también.<sup>(51)</sup> Estos hidratos de carbono suelen participar en la formación de metabolitos y la biosíntesis del material celular.<sup>(51)</sup>

Fuentes de nitrógeno:

El nitrógeno es un constituyente importante de las proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos, y constituye casi 5% del peso seco de una bacteria típica. El nitrógeno inorgánico molecular ( $N_2$ ), es muy prevalente pues constituye casi 80% de la atmósfera terrestre. Es un compuesto muy estable, principalmente porque se requieren altas cantidades de energía de activación para romper su triple enlace entre ambos átomos de nitrógeno. (4, 5).

El producto terminal de todas las vías para la asimilación de nitrógeno es la forma más reducida del elemento, el amoníaco ( $NH_3$ ). Cuando se cuenta con  $NH_3$ , se difunde hacia el interior de la mayor parte de las bacterias a través de conductos transmembrana como gas disuelto en lugar de forma de ion amonio ( $NH_4^+$ ). La capacidad de asimilar  $N_2$  en forma reducida como  $NH_3$ , proceso denominado fijación de nitrógeno, es una propiedad singular de las células procariotas y muy pocas bacterias son capaces de desdoblarse el triple enlace entre ambos átomos de nitrógeno. (4, 5).

La capacidad de fijación de nitrógeno se encuentra en bacterias muy divergentes que han evolucionado con estrategias bioquímicas bastante diferentes para proteger sus enzimas fijadoras de nitrógeno de la exposición con el oxígeno. La mayor parte de los microorganismos pueden utilizar  $NH_3$  como única fuente de nitrógeno y muchos microorganismos poseen la capacidad de producir  $NH_3$  a partir de aminas o a partir de aminoácidos, por lo común en el interior de la célula. (4, 5).

Muchos microorganismos poseen la capacidad de asimilar nitrato ( $NO_3^-$ ) y nitrito ( $NO_2^-$ ) mediante la conversión de estos iones en  $NH_3$ . Tales procesos se conocen como reducción de nitratos por asimilación y reducción de nitritos por asimilación, respectivamente. (4, 5).

Estas vías para la asimilación difieren de las vías utilizadas para catabolizar nitratos y nitritos. (4, 5).

Fuentes de azufre:

El azufre es un componente de muchas sustancias orgánicas de las células. Forma parte de la estructura de varias coenzimas y se encuentra en las cadenas laterales de cisteinil y metionil de las proteínas. El azufre en su forma elemental no puede utilizarse por plantas o animales. Sin embargo, algunas bacterias autótrofas pueden oxidarse a su forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). La mayor parte de los microorganismos pueden utilizar sulfato como fuente de azufre, al reducir el sulfato al nivel de ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Algunos microorganismos pueden asimilar  $\text{H}_2\text{S}$  directamente del medio de cultivo, pero este compuesto puede ser tóxico para muchos de ellos. <sup>(6, 7)</sup>.

Fuentes de fósforo:

El fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) es necesario como componente del ATP, ácidos nucleicos y coenzimas como NAD, NADP y FADP. Además, muchos metabolitos, lípidos (fosfolípidos, lípido A), componentes de las paredes celulares (ácido teicoico), algunos polisacáridos capsulares y algunas proteínas sufren Fosforilación. El fosfato siempre se asimila en forma de fosfato inorgánico libre (P). <sup>(6, 7)</sup>.

Fuentes de minerales:

Numerosos minerales son necesarios para la función de las enzimas. El magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), el magnesio, el hierro,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  entre otros que presentan notables funciones en la célula. <sup>(6, 7)</sup>.

Factores de crecimiento:

Es un compuesto orgánico que debe contener la célula para desarrollarse, pero que es incapaz de sintetizar. <sup>(6, 7)</sup>

Muchos microorganismos que reciben los nutrientes son capaces de sintetizar todos los bloques para la construcción de macromoléculas: aminoácidos, purinas, pirimidinas y pentosas, carbohidratos adicionales (precursores de polisacáridos) y ácidos grasos y compuestos isoprenoides. Asimismo, diferentes especies microbianas varían ampliamente en cuanto a sus necesidades de factores de crecimiento. Las diferencias en cuanto a necesidades reflejan las diferencias en sus capacidades de síntesis. Algunas especies no requieren factores de crecimiento, en tanto que otras (Los lactobacilos) perdieron durante su evolución la capacidad de sintetizar hasta 30 a 40 compuestos esenciales y por tanto necesitan obtenerlos de su medio ambiente. <sup>(6, 7)</sup>.

### **2.3.2. Factores ambientales que afectan el crecimiento**

Un medio de cultivo adecuado debe contener todos los nutrientes necesarios para el microorganismo a cultivar y tales factores incluyen pH, temperatura y aireación que deben ser controlados con gran cuidado. Se utiliza un medio de cultivo líquido; al medio de cultivo puede añadirse agar o gel de sílice para que adquiera consistencia de gel para situaciones especiales. El agar es un polisacárido extraído de algas marinas que es resistente a la acción microbiana y porque se disuelve a 100°C pero no forma placas de gel hasta que se encuentra por debajo de 45°C; las células pueden suspenderse en el medio a 45°C y enfriar con rapidez hasta que adquiera la consistencia de gel, sin lesionar a las bacterias. <sup>(8, 9)</sup>.

Nutrientes:

Para estudios del metabolismo microbiano, por lo general es necesario preparar un medio completamente sintético en el cual se conocen las características y concentración exactas de cada uno de los nutrientes. Es mucho menos costoso y más simple utilizar materiales naturales como extractos de levaduras, proteínas ingeridas o sustancias similares.

<sup>(20, 22)</sup>

Para muchos microorganismos, un compuesto simple (como un aminoácido) puede actuar como fuente de energía, de carbono y nitrógeno en tanto que otras requieren compuestos separados para cada uno de estos elementos. <sup>(20, 22)</sup>.

Concentración de iones hidrógeno (pH):

La mayor parte de los microorganismos tienen un pH óptimo muy estrecho. El pH óptimo debe determinarse empíricamente para cada especie. La mayor parte de los microorganismos proliferan mejor en un pH de 6.0 a 8.0, aunque algunas formas (microorganismos acidófilos) encuentran su cifra óptima con pH de 3.0 y otros tienen un pH óptimo de hasta 10.5. Los microorganismos regulan su pH interno. <sup>(20, 22)</sup>.

Temperatura:

Las diferentes especies microbianas varían ampliamente en cuanto a sus intervalos óptimos de temperatura para su proliferación. Los psicrófilos se desarrollan mejor en temperaturas bajas (15 a 20°C) los mesófilos a 30 a 37°C y los termófilos a temperaturas de 50 a 60°C. Algunos microorganismos son hipertermófilos y pueden desarrollarse a temperatura de ebullición, la cual existe en sitios con alta presión como en las profundidades del océano. La mayor parte de los microorganismos son mesófilos; 30°C es la temperatura óptima para muchas formas de vida libre y la temperatura corporal del hospedador es óptima para simbioses. <sup>(16, 19)</sup>.

Aireación:

Muchos microorganismos son aerobios obligados, es decir, de manera específica necesitan oxígeno como aceptor de hidrógeno; algunos anaerobios son facultativos, es decir, tienen la capacidad de vivir de forma aerobia o anaerobia. <sup>(16, 19)</sup>.

Asimismo, los anaerobios obligados, no requieren de oxígeno, requieren otra sustancia diferente. Los productos secundarios naturales del metabolismo aerobio son compuestos reactivos de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y superóxido ( $O_2^-$ ). Todos los anaerobios estrictos carecen de superóxido dismutasa y catalasa. Algunos microorganismos anaerobios (*Peptococcus anaerobius*) tienen tolerancia considerable al oxígeno. <sup>(16, 19)</sup>.

Por otra parte, los anaerobios obligados presentan el problema de la eliminación del oxígeno. Se dispone de muchos métodos para lograr esto: pueden añadirse agentes reductores como el tioglicolato de sodio a los cultivos líquidos; los tubos de agar pueden sellarse con una capa de vaselina y parafina; las placas de cultivo deben colocarse en un contenedor al cual se le retira el oxígeno por medio de vacío o por agentes químicos o bien el microorganismo puede manipularse en una caja cerrada en un medio anaerobio. <sup>(16, 19)</sup>.

### **2.3.2.1. Concentración iónica y presión osmótica**

En menor grado, deben controlarse factores como la presión osmótica y concentración de sales. Para la mayor parte de los microorganismos, las propiedades de los medios de cultivo ordinarios son satisfactorias; sin embargo, para formas marinas y microorganismos adaptados para crecer en soluciones hipertónicas de azúcar, por ejemplo, deben tomarse en consideración tales factores. <sup>(52, 53)</sup>.

Los microorganismos que requieren concentraciones elevadas de sales se denominan halófilos, otros requieren presiones osmóticas elevadas. La mayor parte de las bacterias son capaces de tolerar amplias variaciones de presión osmótica externa y de concentraciones iónicas. <sup>(52, 53)</sup>.

### 2.3.3. Metabolismo bacteriano

El crecimiento bacteriano requiere una fuente de energía y la materia prima necesaria para fabricar las proteínas, las estructuras y las membranas que conforman la maquinaria estructural y bioquímica de la célula. Las bacterias deben obtener o sintetizar los aminoácidos, los carbohidratos y los lípidos utilizados para fabricar las unidades («bloques») que constituyen las células. Las necesidades mínimas para el crecimiento son una fuente de carbono y nitrógeno, una fuente de energía, agua y diversos iones. <sup>(9, 18).</sup>

Las necesidades nutricionales y los metabolitos producidos pueden utilizarse también como método de clasificación de las diferentes bacterias. Algunas bacterias, como determinadas cepas de *Escherichia coli* (un elemento de la flora intestinal), pueden sintetizar todos los aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos necesarios para el crecimiento y la división, mientras que las necesidades para el crecimiento del germen responsable de la sífilis, *Treponema pallidum*, son tan complejas que todavía no se ha conseguido desarrollar un medio de cultivo para permitir su crecimiento en el laboratorio. <sup>(9, 18).</sup>

Para sobrevivir, todas las células precisan de un aporte constante de energía. Esta energía, habitualmente en forma de trifosfato de adenosina (ATP), se obtiene a partir de la degradación controlada de diversos sustratos orgánicos (carbohidratos, lípidos y proteínas). Este proceso de degradación de los sustratos y de su conversión en energía utilizable se conoce como catabolismo. <sup>(9, 18).</sup>

La energía así obtenida puede emplearse luego en la síntesis de los componentes celulares (paredes celulares, proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos), proceso que recibe el nombre de anabolismo. El conjunto de estos dos procesos, que están muy interrelacionados e integrados, se conoce como metabolismo intermedio. <sup>(9, 18).</sup>

Las moléculas de menor tamaño así obtenidas (monosacáridos, péptidos cortos y ácidos grasos) son transportadas luego a través de las membranas celulares hacia el interior del citoplasma por medio de unos mecanismos de transporte (activos o pasivos) específicos de cada metabolito. Estos mecanismos pueden utilizar un transportador (carrier) específico o bien proteínas de transporte de membrana con el fin de concentrar metabolitos a partir del medio extracelular. <sup>(9, 18).</sup>

Los metabolitos se transforman en un producto intermedio universal, el ácido pirúvico, a través de una o más rutas. A partir del ácido pirúvico, los carbonos se pueden destinar a la producción de energía o bien a la síntesis de nuevos carbohidratos, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos. <sup>(9, 18).</sup>

### **2.3.3.1. Fermentación**

Es el proceso en las que los electrones pasan del dador, a un intermediario formado durante la degradación del substrato, hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico también generado durante el catabolismo del substrato inicial. Por lo tanto, este proceso de oxidación reducción no requiere el aporte exógeno de un aceptor final de electrones. Aunque hay distintos tipos de fermentaciones, todas llevan a una oxidación parcial de los átomos de carbono del substrato inicial y liberan, por lo tanto, una pequeña parte de la energía potencial contenida. <sup>(16, 21).</sup>

El rendimiento energético de este proceso es menor que el de la respiración. En las bacterias se encuentran las tres vías centrales del metabolismo intermediario de los hidratos de carbono: La glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas, la de pentosa fosfato o shunt de las pentosas y la de Entner-Doudoroff. La vía glucolítica que degrada la glucosa se divide en tres etapas principales. La primera es preparativa, con reacciones que no son de oxidación reducción, sin liberación de energía y con formación de dos intermediarios de tres átomos de carbono cada uno. <sup>(16, 21).</sup>

Por cada molécula de glucosa que entra a esta vía, se forman cuatro moléculas de ATP y como se consumen dos en la primera etapa, el balance neto es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa fermentada. El destino final del metabolito clave, el piruvato, depende de los procesos empleados para la regeneración del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a partir del dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) y así mantener el equilibrio de oxidación reducción. Aunque la vía glucolítica es la más importante en las células eucariotas y procariotas, no es la única. La vía de las pentosas es una ruta multifuncional para la degradación de hexosas, pentosas y otros hidratos de carbono. Para los fermentadores heterolácticos es la principal fuente productora de energía, aunque la mayoría de las bacterias usan esta vía como fuente de dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido (NADPH) y de pentosas para la síntesis de nucleótidos. La vía de Entner-Doudoroff es la ruta principal para la degradación de la glucosa en las bacterias aerobias estrictas como *Neisseria* y *Pseudomonas*. Como sucede en la vía de las pentosas, aquí solo se produce una molécula de ATP por molécula de glucosa degradada. El ácido pirúvico derivado de la glucosa, es un compuesto clave en el metabolismo fermentador de los hidratos de carbono. En su formación, el NAD es reducido a NADH y éste debe oxidarse nuevamente a NAD para alcanzar el equilibrio final de oxidación reducción. Las bacterias se diferencian de las células eucariotas por la forma en que eliminan el piruvato; en las bacterias la oxidación incompleta es la regla y se acumula gran cantidad de metabolitos finales de la fermentación. <sup>(10, 16, 21, 61).</sup>

El estudio y el conocimiento de las fermentaciones bacterianas tienen importancia práctica, porque proporciona productos industriales que son útiles en el laboratorio para identificar las diferentes especies. Entonces, según los productos finales, tenemos diferentes tipos de fermentación: alcohólica, homoláctica, heteroláctica, del ácido propiónico, ácido mixto, de butanodiol y del ácido butírico. <sup>(16, 19, 52).</sup>

En la segunda etapa, sí ocurren reacciones de oxidación reducción con liberación de energía, formación de ATP por fosforilación a nivel del sustrato (el ATP se genera en un paso enzimático específico) y producción de dos moléculas de piruvato. En la tercera etapa, nuevamente ocurren reacciones de oxidación reducción y se generan los productos finales de la fermentación, que varían según la bacteria en cuestión. Solo una pequeña parte de la energía libre que potencialmente puede derivar de la degradación de una molécula de glucosa queda disponible por esta vía, dado que los productos finales son compuestos en los que el carbono se encuentra todavía en estado reducido. <sup>(16, 19, 52).</sup>

### **2.3.3.2. Oxidación**

Es el proceso por el cual un sustrato es oxidado completamente a CO<sub>2</sub> y agua, con participación de una cadena de electrones ubicada en la membrana plasmática, en la cual el aceptor final es el oxígeno molecular u otro compuesto inorgánico (nitratos, sulfatos, anhídrido carbónico, etc.). <sup>(10, 11, 18).</sup>

Los primeros pasos en la respiración de la glucosa son idénticos a los de glucólisis, pero mientras en esta última el piruvato es convertido en productos finales de la fermentación (ácido láctico, ácido propiónico, etc.), en la respiración es oxidado completamente a CO<sub>2</sub> mediante el ciclo de Krebs. Por cada molécula de piruvato oxidada en este ciclo, se generan tres moléculas de CO<sub>2</sub>. Al igual que en la fermentación, los electrones generados en el ciclo de Krebs, pasan a coenzimas que tienen NAD. Sin embargo, en la respiración aerobia, los electrones del NADH son transferidos al oxígeno para regenerar NAD a través de un sistema transportador, en lugar de cederlos al piruvato. Los sistemas transportadores de electrones y generación de trifosfato de adenosina Estos sistemas están compuestos por transportadores (carriers) de electrones, asociados a la membrana plasmática y tienen dos funciones básicas <sup>(10, 11, 18).</sup>

Aceptar electrones de un donador y cederlos a un aceptor y conservar energía liberada durante ese transporte en forma de ATP por fosforilación oxidativa. Existen varios tipos de enzimas de oxidación reducción y proteínas transportadoras de electrones, entre los que se destacan las NAD-deshidrogenasas, las flavoproteínas y los citocromos. Las flavoproteínas contienen un derivado de la riboflavina como grupo prostético que se reduce y se oxida alternativamente. La riboflavina, conocida como vitamina B2, es necesaria como factor de crecimiento por algunas bacterias. <sup>(10, 11, 18).</sup>

Los citocromos son proteínas que tienen anillos porfirínicos con hierro y también se oxidan y se reducen alternativamente. Hay diferentes tipos de citocromos que se distinguen por sus potenciales de reducción. Se los designa con letras a, b, c, etc. También están las quinonas, sustancias liposolubles relacionadas con la vitamina K, que participan en el transporte de electrones. Para entender cómo se genera el ATP durante el transporte de electrones, debemos recordar su orientación con respecto a la membrana plasmática de la célula bacteriana. <sup>(10, 11, 18).</sup>

La cadena está ubicada como ya dijimos en la membrana plasmática, de tal modo que durante el proceso de transporte hay una separación física entre protones y electrones. Los protones quedan fuera de la célula, mientras que los electrones quedan dentro de ésta; en consecuencia, se genera un gradiente de pH y un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, estando el lado externo ácido y cargado positivamente y el interno alcalino y cargado negativamente. <sup>(10, 11, 18).</sup>

A pesar de su tamaño pequeño, ni los hidrogeniones, ni los hidróxidos atraviesan libremente la membrana; por lo tanto, el equilibrio no puede establecerse espontáneamente. Dicho estado energético de la membrana plasmática, similar a una batería, puede ser usado por la célula para realizar un trabajo útil, por ejemplo, movilidad o síntesis de ATP. <sup>(10, 11, 18).</sup>

Operando en una dirección y usando el gradiente de protones generado durante el transporte, dicha enzima cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. <sup>(10, 11, 18).</sup>

## **2.3.4. Medios de cultivo**

### **2.3.4.1. Clasificación**

Los medios de cultivo bacteriano pueden clasificarse en al menos tres formas; Basado en la consistencia, basado en el componente nutricional y en función de su uso funcional. <sup>(13, 15).</sup>

#### **a) Clasificación basada en la consistencia**

##### **Medios líquidos:**

En el medio líquido, las bacterias crecen produciendo turbidez, una película superficial o formando depósitos granulares. Cultivar bacterias en medios líquidos tiene algunos inconvenientes, debido a que las propiedades de las bacterias no son visibles en los medios líquidos y no se puede detectar la presencia de más de un tipo de bacteria. <sup>(57, 58, 59).</sup>

##### **Medios sólidos:**

Cualquier medio líquido puede volverse sólido mediante la adición de ciertos agentes solidificantes. El agar - agar es el agente solidificante más comúnmente utilizado. Es un polisacárido no ramificado obtenido de las membranas celulares de algunas especies de algas rojas, como el género *Gelidium*. El agar se compone de dos polisacáridos de cadena larga (70% de agarosa y 30% de agar pectina). Se funde a 95 °C y se solidifica a 42 °C, no aporta ninguna propiedad nutritiva, no es hidrolizado por la mayoría de las bacterias y, por lo general, está libre de sustancias estimulantes del crecimiento. <sup>(57, 58, 59).</sup>

### **Medios semisólidos:**

La reducción de la cantidad de agar entre 0.2–0.5% rinde un medio semisólido. Dichos medios son bastante suaves y son útiles para demostrar la motilidad bacteriana. Ciertos medios de transporte como los medios Stuart y Amies son de consistencia semisólida. El medio de prueba de fermentación por oxidación de Hugh & Leifson, así como el medio de motilidad del manitol también son semisólidos. <sup>(57, 58, 59).</sup>

### **Medios bifásicos:**

A veces, un sistema de cultivo comprende tanto un medio líquido y sólido en el mismo recipiente. Esto se conoce como medio bifásico. El inóculo se agrega al medio líquido y, cuando se van a realizar subcultivos, la botella o recipiente, simplemente se inclina para permitir que el líquido fluya sobre el medio sólido. <sup>(57, 58, 59).</sup>

### **b) Clasificación basada en el componente nutricional**

Los medios se pueden clasificar como simples, complejos y sintéticos. Se dice que las bacterias que pueden crecer con requisitos mínimos no son exigentes y las que requieren nutrientes adicionales son exigentes.

Los medios complejos como el agar sangre tienen ingredientes cuyos componentes exactos son difíciles de estimar. Los medios sintéticos o definidos son medios preparados especialmente para fines de investigación donde la composición de cada componente es bien conocida. <sup>(57, 58, 59).</sup>

### **c) Clasificación basada en el uso o aplicación funcional**

Los medios basales son básicamente medios simples que admiten la mayoría de las bacterias no exigentes. El agua peptonada, el caldo nutriente y el agar nutritivo, son considerados medios basales. <sup>(57, 58, 59).</sup>

Los medios enriquecidos se utilizan para cultivar bacterias nutricias exigentes. La adición de nutrientes adicionales en forma de sangre, suero, yema de huevo, etc., al medio basal los convierte en medios enriquecidos. El agar sangre, el agar chocolate, el suero de Loeffler, etc., son algunos de los medios enriquecidos. (57, 58, 59).

El agar de sangre se prepara añadiendo 5-10% (en volumen) a un medio basal tal como agar nutriente u otras bases de agar sangre. Como la sangre no se puede esterilizar, debe recogerse asépticamente del animal. Los animales deben sangrarse y la sangre se recoge en recipientes estériles con anticoagulante o perlas de vidrio. Si bien se prefiere la sangre de oveja, también se puede recolectar sangre de conejo, caballo y buey. Debe evitarse la sangre humana, ya que puede contener sustancias inhibitoras, incluidos antibióticos. Después de que la base de agar sangre se esteriliza en autoclave, se agrega sangre al medio a una temperatura justo por encima del punto de solidificación del agar. La mezcla se vierte sobre las placas y se deja solidificar. El agar sangre es útil para demostrar las hemólisis. (57, 58, 59).

El agar chocolate también se conoce como agar sangre calentada o agar con sangre lisa. El procedimiento es similar al de la preparación con agar sangre, excepto que se agrega sangre mientras que la base de agar con sangre fundida aún está caliente. Esto lisa las células sanguíneas y libera sus contenidos en el medio. Este proceso convierte el marrón medio, de ahí el nombre. Este medio es especialmente útil en el cultivo de *Hemophilus sp* y *Neisseria sp*. El suero para el medio se puede obtener de la sangre de los animales, pero se debe filtrar a través de una membrana o un filtro Seitz antes de su uso. (57, 58, 59).

Los medios selectivos y de enriquecimiento están diseñados para inhibir las bacterias comensales o contaminantes no deseadas y ayudar a recuperar el patógeno de una mezcla de bacterias. (57, 58, 59).

Mientras que los medios selectivos se basan en agar, los medios de enriquecimiento son líquidos en consistencia. (57, 58, 59).

El agar Thayer Martin, es utilizado para reconocer *N. gonorrhoeae*; contiene vancomicina, colistina y nistatina. El agar de manitol salado y el agar de leche de sal, son utilizados para reconocer *S. aureus*; contienen 10% de NaCl. El medio de telurito de potasio, es utilizado para reconocer *Corynebacterium. diphtheriae*; El agar de Mc Conkey, es utilizado para reconocer enterobacterias. (57, 58, 59).

El agar ceftrimida, es utilizado para reconocer *P. aeruginosa*; contiene ceftrimida. El agar cristalino de sangre violeta, es utilizado para reconocer *S. pyogenes*; contiene 0,0002% de violeta cristal. El medio Lowenstein Jensen, es utilizado para reconocer *M. tuberculosis*; se hace selectivo mediante la incorporación de malaquita verde. El agar de Wilson & Blair, es usado para reconocer *S. typhi*; se vuelve selectivo mediante la adición de colorante verde brillante. El agar tiosulfato citrato bilis sacarosa, es utilizado para aislar *Vibrio cholerae* de muestras fecales; tienen pH elevado (8.5-5.6), que inhibe la mayoría de las otras bacterias. Los medios de enriquecimiento son medios líquidos que también sirven para inhibir los comensales en la muestra clínica. El caldo de selenito, el caldo de tetrionato y el agua de peptona alcalina se utilizan para recuperar patógenos de muestras fecales. (57, 58, 59).

### **Medios diferenciales / indicadores:**

Los medios diferenciales distinguen un tipo de microorganismo de otro que crece en el mismo medio. Este tipo de medio utiliza las características bioquímicas de un microorganismo que crece en presencia de nutrientes con indicadores (como rojo neutro) agregados al medio para indicar de forma visible las características definitorias de un microorganismo. (53, 56, 57).

Cuando se incorpora un sustrato particular en un medio y una mezcla de bacterias inoculadas en él, solo la bacteria que puede fermentar produce ácido. Este cambio en el pH se detecta mediante el uso de un indicador de pH incorporado y la bacteria que puede fermentar el azúcar aparece en un color diferente. Este enfoque se usa en el agar Mac Conkey, agar CLED, etc. La producción de H<sub>2</sub>S por *Salmonella typhi* da como resultado la producción de colonias de color negro en el medio de Wilson y Blair. <sup>(53, 56, 57)</sup>.

### **Medios de transporte:**

Las muestras deben ser transportadas al laboratorio inmediatamente después de la recolección para prevenir el crecimiento excesivo de microorganismos contaminantes. <sup>(53, 56, 57)</sup>.

Esto se puede lograr utilizando medios de transporte. Dichos medios previenen el secado (deseccación) de la muestra, mantienen la viabilidad de todos los organismos en la muestra sin alterar su concentración. Algunos de estos medios (de Stuart y Amie) son de consistencia semisólida. La adición de carbón sirve para neutralizar factores inhibidores. <sup>(53, 56, 57)</sup>.

### **Medios anaeróbicos:**

Las bacterias anaeróbicas necesitan una oxidación reducida, un potencial de reducción y nutrientes adicionales. Dichos medios pueden reducirse por medios físicos o químicos. Hervir el medio sirve para expulsar cualquier oxígeno disuelto. La adición de glucosa al 1%, tioglicolato al 0,1%, ácido ascórbico al 0,1%, cisteína al 0,05% o limaduras de hierro al rojo vivo puede reducir el medio. Robertson cocinó carne que se usa comúnmente para cultivar *Clostridium* spp medio. El caldo de tioglicolato contiene tioglicolato sódico, glucosa, cistina, extracto de levadura e hidrolizado de caseína. <sup>(53, 56, 57)</sup>.

El azul de metileno o resazurina es un indicador de potencial de oxidación-reducción que se incorpora en el medio. <sup>(53, 56, 57)</sup>.

En condiciones reducidas, el azul de metileno es incoloro.

#### **2.3.4.2. Preparación**

Se debe tener cuidado para ajustar el pH del medio antes del tratamiento en autoclave. Varios indicadores de pH que están en uso ejemplo: rojo fenol, rojo neutro, etc. <sup>(13, 15, 20)</sup>.

Los medios deshidratados están disponibles comercialmente y deben reconstituirse según las recomendaciones de los fabricantes. La mayoría de los medios de cultivo se esterilizan en autoclave. Ciertos medios que contienen componentes lábiles al calor como la glucosa, los antibióticos, la urea, el suero y la sangre no se esterilizan en autoclave. <sup>(13, 15, 20)</sup>.

Estos componentes se filtran y se pueden agregar por separado después de que el medio se esteriliza en autoclave es imperativo que una representación de cada lote se evalúe en cuanto a rendimiento y contaminación antes de su uso. Una vez preparados, los medios se pueden mantener a 4-5 ° C en el refrigerador durante 1-2 semanas. Ciertos medios líquidos en botellas con tapón de rosca se pueden mantener a temperatura ambiente durante semanas. <sup>(13, 15, 20)</sup>.

#### **2.3.4.3. Esterilización**

La mayoría de los medios de cultivo, especialmente los medios que deben usarse en entornos controlados (como placas de agar) y los medios que se utilizarán en las pruebas de liberación (como los medios embotellados para la prueba de esterilidad), requieren esterilización después de la preparación. <sup>(13, 15, 20)</sup>.

Para los medios utilizados para las pruebas en el laboratorio de microbiología, como las pruebas de biocarga, los medios no suelen ser irradiados. Con la esterilización de medios embotellados, esto se lleva a cabo típicamente en una autoclave de vapor a temperaturas entre 121-134 ° C. (13, 15, 20).

Sin embargo, el ciclo debe desarrollarse teniendo en cuenta no solo la esterilización sino también evitar daños al medio a través del proceso de calentamiento. El tratamiento térmico de los medios de cultivo, que contienen péptidos, azúcares, minerales y metales, puede provocar la destrucción de nutrientes si el calor es demasiado alto. Esto ocurre por degradación térmica directa o por reacción entre los componentes del medio. (13, 15, 20).

Por lo tanto, es importante optimizar el proceso de calentamiento para que un medio sea estéril después del calentamiento, pero se cause un daño mínimo a los ingredientes del medio. Para esto, el ciclo de autoclave ideal es un proceso de corta duración y alta temperatura diseñada para ser más letal para los microorganismos y menos dañino químicamente; esto en comparación con ciclos que son más largos y de procesos de temperatura más baja. (13, 15, 20).

Por lo tanto, un ciclo de tres minutos de duración a una temperatura de 134 ° C es preferible a uno que dura 20 minutos a 115 ° C. En ocasiones, los fabricantes de medios de cultivo proporcionan orientación sobre combinaciones adecuadas de tiempo y temperatura. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las autoclaves varían en rendimiento. (13, 15, 20).

Por esta razón, se deben realizar pruebas de termopar con diferentes volúmenes de medios para determinar los tiempos de "calentamiento y enfriamiento". Tal tarea también es necesaria cuando se preparan volúmenes mayores a los recomendados por el fabricante. (13, 15, 20).

En tales casos, para evitar el sobrecalentamiento de las unidades de gran volumen de los medios, los períodos de "calentamiento" y "enfriamiento" normalmente se integran en la temperatura recomendada por el fabricante. Después de la esterilización, los medios líquidos, esterilizados en su contenedor final, se deben enfriar a la temperatura ambiente lo más rápido posible, idealmente bajo un flujo de aire unidireccional. Las tapas de los tornillos se deben apretar y el medio debe mantenerse en la oscuridad. Los recipientes de medio de agar que han sido esterilizados deben mantenerse en la oscuridad para su posterior fusión o colocarse directamente en un baño de agua y el medio dispensado tan pronto como alcance una temperatura entre 42 y 48°C, o dentro de un período máximo de tiempo (esto se discute a continuación).<sup>(13, 15, 20).</sup>

Antes del uso, el medio debe mezclarse completamente, sin formación de burbujas antes de la dispensación aséptica. Con algunos medios de cultivo, los suplementos estériles lábiles al calor deben agregarse al medio después de que se haya enfriado a alrededor de 50 ° C. Para esto, se debe permitir que el suplemento alcance la temperatura ambiente y luego se agrega al medio de agar. La temperatura del suplemento es importante ya que los líquidos muy fríos pueden hacer que el agar gelifique o forme copos transparentes que se puedan ver fácilmente. Por ejemplo, en agar enriquecido con sangre. El mayor cuidado debe tomarse con sangre.<sup>(13, 15, 20).</sup>

La sangre (típicamente sangre desfibrinada de oveja o vaca) se mantiene a 2-8 ° C (la sangre no debe congelarse) y luego se calienta gradualmente a 35 ° C (normalmente a través de una incubadora). La mezcla adecuada es esencial para garantizar la aireación de la sangre, y como resultado, las placas de sangre pobremente oxigenadas aparecen de color morado (a diferencia del agar sangre aireado correctamente, que es de color rojo cereza).<sup>(13, 15, 20).</sup>

Los suplementos deben mezclarse en el medio de forma cuidadosa y minuciosa, y luego distribuirse en los contenedores finales lo más rápido posible. (13, 15, 20).

#### **2.3.4.4. Siembra y aislamiento bacteriano**

Para la detección efectiva del contenido bacteriano de las muestras, es importante lograr el crecimiento de las colonias individuales mediante el uso de una buena técnica para inocular en los medios de cultivo. Hay muchas variaciones y preferencias personales para "plaquear". Todos los medios de cultivo deben verificarse antes de su uso para determinar la fecha de contaminación y caducidad. Los medios de cultivo deben tener un lote identificable o un número de control de calidad y han pasado las pruebas de control de calidad antes de su uso. Las placas que están más allá de su fecha de caducidad, las placas contaminadas y los medios de caldo que aparecen inusualmente turbios deben descartarse. (22, 53, 54).

El área inicial inoculada debe cubrir entre un cuarto y un tercio del área total de agar utilizada. Se pueden usar placas enteras, medias placas o cuarterones dependiendo de las circunstancias. Las muestras se pueden colocar en placas para colonias individuales, o se pueden sembrar directamente sobre un segmento completo de una placa y se pueden incubar sin propagación adicional. Los aros de alambre se deben flamear sosteniéndolos con el extremo del lazo hacia abajo en una llama Bunsen hasta que el lazo y el cable entero alcancen el calor rojo. Coloque sobre una rejilla para que se enfríe antes de usar. Esto debe hacerse antes y después del uso y entre placas de agar. Se deben usar diferentes lazos desechables para cada plato. Para una muestra potencialmente muy contaminada, el ciclo debe ser flameado entre cada serie de rayas, o el ciclo puede rotarse para formar la siguiente serie de rayas con el lado no utilizado del ciclo. (22, 53, 54).

Para el análisis semicuantitativo de la orina, el ciclo no debe flamearse de esta manera. Todos los medios deben incubarse tan pronto como sea posible después de la inoculación. Las placas para la incubación anaeróbica se deben incubar lo antes posible para evitar la pérdida de viabilidad (<15 minutos). Después de la inoculación, la muestra, o una parte de ella, debe conservarse durante al menos 48 horas después de que el laboratorio haya emitido el informe final. La mayoría de las placas de cultivo positivas se pueden descartar dentro de las 24-48 horas posteriores a la emisión de un informe final autorizado. Las culturas de particular valor epidemiológico pueden conservarse durante más tiempo, ya que los organismos pueden necesitar más trabajo o derivarse a un laboratorio de referencia. Las láminas de microscopio de rutina teñidas deben conservarse durante siete días después de la publicación del informe final. Los portaobjetos para el examen de especies de *Mycobacterium* deben mantenerse encerrados en condiciones de nivel 3 hasta que se emita el informe final del espécimen. Los cultivos positivos de especies de *Mycobacterium* deben conservarse en un armario cerrado con llave en un laboratorio de Categoría 3 hasta que se reciba el informe final del Laboratorio de Referencia. <sup>(22, 53, 54).</sup>

Por su parte, el aislamiento se refiere a la separación de una cepa de una población natural mixta de microbios, presentes en el medio ambiente, por ejemplo, en agua o flora del suelo, o de seres vivos con flora cutánea, flora oral o flora intestinal, con el fin de identificar el microbio de interés. Históricamente, las técnicas de laboratorio de aislamiento se desarrollaron primero en el campo de la bacteriología y la parasitología (durante el siglo XIX), antes que en virología durante el siglo XX. Los métodos de aislamiento microbiano han cambiado drásticamente en los últimos 50 años, desde una perspectiva laboral con una mecanización cada vez mayor, y con respecto a la tecnología involucrada, y, por lo tanto, la velocidad y precisión. <sup>(22, 53, 54).</sup>

## 2.3.5. *Staphylococcus aureus*

### 2.3.5.1. Generalidades

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram (+), cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva, por la demanda de oxígeno es anaerobia facultativa y se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente, es patógeno para el ser humano, causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas; su principal impacto es ocasionado por las cepas meticilina resistentes; estas cepas presentan incidencia a nivel hospitalario y en la comunidad; a nivel hospitalario bacteriemias, septicemias, infecciones urinarias y en la comunidad amigdalitis, neumonía y endocarditis aguda. <sup>(4, 5, 6)</sup>.

La virulencia del *Staphylococcus aureus* se debe por una serie de toxinas y enzimas dentro de las que destacan la del síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada. <sup>(4, 5, 6)</sup>.

Desde el punto de vista estructural, comparte las características de las bacterias Gram positivas; es así que su pared celular está compuesta por una gruesa capa de péptidoglicano. Asimismo, el péptidoglicano tiene la función de mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. Del mismo modo la pared celular contiene ácidos teicoicos, que constituyen alrededor del 40% del peso de la pared. Estos ácidos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces, D-alanina. Están unidos en forma covalente al péptidoglicano. <sup>(4, 5, 6)</sup>.

El *Staphylococcus aureus*, tiene la facilidad de contar con la fibronectina, la cual es una glicoproteína que le sirve para adherirse a las válvulas cardíacas y producir endocarditis bacteriana. <sup>(4, 5, 6)</sup>.

### 2.3.5.2. Aislamiento e identificación

El aislamiento del *Staphylococcus aureus* se realiza en medios de cultivo tradicionales, se incuban a 37°C por 24 – 48 horas formando colonias de color que va del amarillo al dorado debido a la producción de carotenoides, de consistencia cremosa, lisas, elevadas y de borde entero; la mayoría de las cepas producen  $\beta$ -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en Agar Sangre. El *Staphylococcus aureus* se diferencia de las demás especies por producir la enzima coagulasa que se manifiesta por su propiedad para coagular el plasma, es resistente al calor, la desecación y puede desarrollarse medios de cultivo con elevadas cantidades de cloruro de sodio (7.5%).<sup>(4, 5, 6)</sup>.

El *Staphylococcus aureus* crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, agar cerebro corazón y caldos para hemocultivo donde se recupera fácilmente. Se debe usar un medio selectivo en muestras clínicas donde hay bacterias Gram negativas junto con *Staphylococcus aureus*. El medio recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios es el agar manitol salado.<sup>(4, 5, 6)</sup>. El *Staphylococcus aureus*, se desarrolla en este medio fermentando el manitol y presentado una colonia de color amarillo. Los *Staphylococcus coagulasa* negativos no fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado.<sup>(4, 5, 6)</sup>. Asimismo, la identificación del *Staphylococcus aureus*, se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de manitol, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta el manitol.

Otra prueba de confirmación es con la prueba de la DNAsa termoestable se identifica fácilmente en el medio que contiene DNA y verde de malaquita.<sup>(4, 5, 6)</sup>.

### 2.3.6. *Escherichia coli*

#### 2.3.6.1. Generalidades

*Escherichia coli* es una bacteria anaerobia facultativa que se caracteriza por ser bacilos Gram negativos; no produce esporas, si produce indol a partir del aminoácido triptófano, no utiliza citrato como única fuente de carbono y no produce acetoina. Además, fermenta la glucosa, sacarosa y lactosa con producción variable de gas. Como todas las bacterias Gram (-), la cubierta de *Escherichia coli* consta de tres elementos: La membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptidoglicano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas. <sup>(7, 8, 9).</sup>

*Escherichia coli* es una bacteria mesófila, su temperatura óptima de desarrollo se encuentra cercana a la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (35 - 43 °C). Asimismo, la temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C, lo que indica que un control eficaz de la cadena de frío en las industrias alimentarias es esencial para evitar su crecimiento en los alimentos. <sup>(7, 8, 9).</sup>

La congelación de los alimentos no garantiza la destrucción de un número suficiente de bacterias viables para asegurar su inocuidad. Sin embargo, *Escherichia coli* es sensible a temperaturas superiores a 70 °C, a partir de la cual son fácilmente eliminadas; por ello, es muy importante la pasteurización de alimentos como la leche, zumos, etc., para garantizar su eliminación. Además de la temperatura, el pH y la actividad de agua pueden influir en su proliferación. Las condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7,2 y 0,99 respectivamente. <sup>(7, 8, 9).</sup>

El desarrollo de *Escherichia coli* se ve disminuido a pH extremos (inferiores a 3,8, o superiores a 9,5), y valores de la actividad en agua inferiores a 0,94. Por ello, el grado de acidez de los alimentos puede constituirse un factor de protección y garantizar su seguridad. (7, 8, 9).

*Escherichia coli*, presenta múltiples características y constituye el taxón bacteriano mejor estudiado, aunque el conocimiento de las cepas salvajes es aún parcial. Parece, que las facultades de adaptación de esta bacteria son poco comunes, debido a la adquisición de nuevos genotipos a partir de plásmidos, bacteriófagos, y otros elementos que transmiten su material genético. Además, su conocida capacidad de ubicuidad favorece la aparición reiterada de cepas con nuevas propiedades, incluyendo capacidades patógenas no fácilmente reconocibles. (7, 8, 9).

#### **2.3.6.2. Aislamiento e identificación**

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de cepas de *Escherichia coli*, se aplican métodos tradicionales, métodos in vivo e in vitro y de biología molecular:

Tradicionalmente el aislamiento de la bacteria se realiza tomando mediante el uso de un hisopo del material fecal, luego se siembra en placas de agar Mac Conkey u otro medio selectivo y diferencial para enterobacterias. Del mismo modo, empleando un asa de siembra de nicrom, se continúa el aislamiento, sembrando por estrías múltiples; después se incuba a 37 °C durante 24-48 h. Posteriormente se seleccionan de 5 a 10 colonias típicas de *Escherichia coli*, para proceder a sembrar en medios de cultivo de diferenciación bioquímica. (11, 16, 19). La identificación se hace mediante pruebas de diferenciación bioquímicas en tubo como TSI (Triple Azúcar Hierro Agar), LIA (Lisina Hierro Agar), MIO, citrato, malonato, caldo manitol-rojo de fenol, etc. (7, 8, 9).

Estas pruebas se interpretan según el metabolismo bioquímico de las enterobacterias. <sup>(5)</sup>.

## 2.4. Formulación de hipótesis

### 2.4.1. Hipótesis general:

1. El efecto del *Lepidium meyenii* W (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos es Buena.

### 2.4.2. Hipótesis específicas:

1. *Lepidium meyenii* W (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) tienen metabolitos primarios y secundarios.
2. El efecto del *Lepidium meyenii* W (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del agar LITME en la detección de *Staphylococcus aureus* es Buena.
3. El efecto del *Lepidium meyenii* W (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Escherichia coli* es Buena.

## 2.5. Operacionalización de variables e indicadores

Tabla N° 08: Operacionalización de variables

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES			
V1: INDEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADORES	
Efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME	Fitoquímica	Solubilidad	
		Compuestos Químicos.	
V2: DEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADORES	
Detección de contaminantes bacterianos	Aislamiento.	BUENA	80 – 100%
		REGULAR	60 – 79%
		MALA	50 – 59%
	Visualización de la Morfología de la Colonia.	BUENA	80 – 100%
		REGULAR	60 – 79%
		MALA	50 – 59%

## 2.6. Definición de términos básicos

- **Actividad antibacteriana.** Es la capacidad que presentan ciertas sustancias para inhibir, suprimir y destruir a las bacterias Gram positivas o Gram negativas o a las dos.
- **Bacterias Gram positivas.** Las bacterias Gram positivas se tiñen de color púrpura con la tinción Gram ya que el colorante queda atrapado en la capa de péptidoglicano.
- **Agar-Agar.** Polímero sulfatado complejo de unidades de galactosa, extraído del *Gelidium cartilagineum*, *Gracilaria confervoides* y otras algas rojas asociadas. Se usa en forma de gel en la preparación de medios de cultivo sólidos para microorganismos.
- **pH.** Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidrógeno presentes en determinadas disoluciones.
- **Temperatura.** Es una magnitud referida a las nociones comunes de calor medible mediante un termómetro.
- **Cepa.** es un conjunto de células homogéneas o clones, que deriva de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias.
- **Bacterias Gram negativas.** las bacterias Gram negativas presentan una capa de péptidoglicano incapaz de retener el colorante cristal violeta, por lo que las células se tiñen con el colorante de contraste (safranina) y adquieren un color rojo.
- **Inoculación.** Es el proceso por el cual el material infeccioso se introduce en un cultivo o en un cuerpo por una herida en la piel o en una mucosa.

- **Siembras.** Procedimiento técnico que consiste en colocar una pequeña fracción o volumen de la muestra, sobre o dentro, de uno o varios medios de cultivo que contengan los nutrientes necesarios para las especies que presuntivamente contiene, con la finalidad de que puedan desarrollarse adecuadamente, para ayudar a su estudio y posterior identificación.
- **Inhibidor.** Sustancia que bloquea o retrasa una reacción o función.
- **Azul de Bromotimol.** Es un compuesto químico derivado del trifenilmetano. Se utiliza para detectar el pH. Puede adoptar diferentes colores. Amarillo o fucsia (sobre una solución ácida) y verde o azul (en una solución básica).
- **In vitro.** Se refiere a la técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
- **Sinergismo.** Se denomina al incremento del efecto causado por la combinación de dos o más fármacos. Esto en la terapéutica medicamentosa cada vez es más frecuente administrar dos fármacos cuyas acciones combinadas pueden producir efectos de mayor intensidad o duración que los causados por cada fármaco administrado por separado.

## CAPÍTULO III METODOLOGÍA

### 3.1. Tipo y nivel de la investigación

#### Tipo

Investigación aplicada, porque mediante la sinergia de los metabolitos primarios y secundarios del *Lepidium meyenii* W (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo), se preparó un medio de cultivo denominado Agar LITME para detectar contaminantes bacterianos.

#### Nivel de Investigación

**Experimental:** Mediante la sinergia de los metabolitos primarios y secundarios del *Lepidium meyenii* W (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME y de la recolección de las cepas, teniendo en cuenta condiciones rigurosamente controladas se aisló y se visualizó la morfología de las colonias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

### 3.2. Diseño de la investigación

Se asumió el diseño experimental en ambiente de laboratorio, utilizando los siguientes elementos:

#### 3.2.1. Material biológico

Del tubérculo del *Lepidium meyenii* W (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarroba), se obtendrán unos polvos 100% puro y natural

#### 3.2.2. Materiales e instrumentos de laboratorio

- |                           |              |
|---------------------------|--------------|
| - Tubo de Ensayo 13 X 100 | 25 Unidades. |
| - Pipeta 1 ml             | 06 Unidades. |
| - Probeta de 100 ml       | 06 Unidades. |
| - Matraz 250, 500 ml      | 07 Unidades. |

- Bagueta	05 Unidades.
- Beaker 250 ml	05 Unidades.
- Balón 250 ml	04 Unidades.
- Placa Petri 15 X 100 mm	95 Unidades.
- Frasco Ámbar con Tapa esmerilada	04 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.
- Hot Plate	01 Unidad.
- Licuadora	01 Unidad.
- Alcoholímetro	01 Unidad.
- Estabilizador	01 Unidad.

### 3.2.3. Reactivos químicos

- Alcohol 96°	01 Litro.
- Metanol	0.5 Litros.
- Agua destilada	01 Litros.
- Ácido clorhídrico 10%	0.1 Litros.
- Ácido sulfúrico concentrado	0.1 Litros.
- Amoniaco	0.1 Litros.
- Cloroformo	0.2 Litros.
- Sulfato de sodio	20 Gramos.

- 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
- Peptona de Caseína.	50 Gramos

#### **3.2.4. Estudio fitoquímico**

Para efectuar el estudio fitoquímico se utilizó la información del libro Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de Productos Naturales de Olga Lock de Ugaz. <sup>(33, 34, 35)</sup>.

#### **3.2.5. Estudio macroscópico**

El estudio macroscópico consta de varios pasos a seguir para la preparación de medios de cultivo elaborados con productos naturales los mismos que han sido formulados teniendo en cuenta estudios previos.

**Agar Litme:**

- Maca 05 Gramos.
- Algarroba 05 Gramos.
- Agar – Agar 1.2 Gramos.
- Cloruro de Sodio 0.5 Gramos.
- Azul de Bromotimol 0.01 Gramos.
- pH Final 7.2 +/- 0.2.

**Procedimiento:**

- Pesar todos los ingredientes a excepción del Agar – Agar y disolver en 100 mL de agua destilada.
- Homogenizar, Filtrar y Reposar 5 minutos.
- Adicionar el Agar – Agar y Homogenizar en Baño María a 50°C por 10 minutos.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Dispensar en placas petri estériles, enfriar.
- Llevar a refrigeradora para posterior uso.

**3.3. Población y muestra de la investigación****Población:**

Muestras clínicas patológicas que se analizaron durante los meses de octubre, noviembre y diciembre del año 2017 y enero del año 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 correspondió a cepas bacterianas identificadas en el Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* .Para la determinación del tamaño de muestra se utilizó el muestreo proporcional cuya fórmula es:

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

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 se atendieron en el Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L; durante Octubre, Noviembre, Diciembre 2017 y Enero del 2018 y de los cuales se aislaron en el Área de Microbiología cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

### **Criterios de exclusión**

Muestras clínicas de pacientes con previa administración de Antibióticos.

## **3.4. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos**

### **3.4.1. Descripción de los instrumentos**

Se utilizó la técnica de la observación para la recolección de los datos, mediante la cual se anotaron los datos de la investigación en tablas, desde la obtención de los metabolitos hasta los resultados finales, los que sirvieron para dilucidar el objetivo principal del estudio. Del mismo modo, los instrumentos (ad-hoc) fueron los siguientes: tabla N° 11: Solubilidad, donde se utilizó diversos solventes; tabla N° 12: Identificación de metabolitos, donde se demostró la presencia de compuestos químicos y las tablas 14 y 15: Evaluación de los medios, donde se demostró el aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana. (ver anexo 02)

### 3.4.2. Validación de instrumentos

Los instrumentos utilizados fueron elaborados por los bachilleres autores de la tesis. Para la prueba de estudio y su validación se utilizó la técnica del juicio de expertos. Las tablas se realizaron en base a los indicadores con sus respectivos criterios. La validación de juicio de expertos tuvo una mínima y máxima calificación (ver anexo 06).

Los expertos fueron tres químico farmacéuticos, con grado académico de magister y cuentan con amplia experiencia en la investigación.

**Tabla 09: Resumen de resultados de Juicio de Expertos**

JUEZ EXPERTO	RESULTADOS	CONDICIÓN
Mg. Pedro Jacinto Hervías.	90 – 100%	Válido, Aplicar.
Q.F. Luis Aranguren Belaunde.	90 – 100%	Válido, Aplicar.
Q.F. Oscar Bernuy Flores López.	90 – 100%	Válido, Aplicar.

Esta evaluación dio como resultado que el instrumento fuese considerado válido y aplicable.

### 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 *Lepidium meyenii* W (Maca Negra) y la vaina del *Prosopis pallida* (Algarroba), se realizaron 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).

### 3.6.2. Obtención de los nutrientes

Se recolectaron 6 kilos del tubérculo *Lepidium meyenii W* (Maca Negra) y 6 kilos de la vaina de *Prosopis pallida*. Las muestras, se envolvió en papel kraft y se colocaron en cajas de cartón con rótulo. Las muestras se llevaron al laboratorio de especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, donde se eliminaron las sustancias extrañas presentes en ambas muestras. Se utilizaron 3000 gramos del tubérculo Maca Negra y 2500 gramos de vaina de Algarroba, los cuales se cortaron en trozos pequeños y se rallaron; posteriormente se sometió a deshidratación y secado a una temperatura de 40°C por 90 horas, para luego, pasar por mortero, obteniéndose 1150 gramos de polvo de Maca y 860 gramos de vaina. (Ver anexo: 02).

### 3.6.3. Solubilidad y análisis de compuestos químicos (metabolitos)

Ambas muestras se sometieron a pruebas de solubilidad en solventes de diferentes polaridades, con el fin de determinar el solvente más adecuado para la evaluación de los medios de cultivo. (anexo 02). Luego, las muestras se sometieron con reactivos de coloración y precipitación para lo cual agregamos a cada tubo de ensayo 3 - 4 gotas de las mismas y agregamos 3 gotas de reactivo. (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 <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 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 Fenólicos	FeCl <sub>3</sub> .	Coloración verde o azul.	X gotas de MP + III gotas de FeCl <sub>3</sub> 10%
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.	X gotas de MP + III gotas de gelatina.
4	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	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, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.	X gotas de MP + 1-2 virutas de Mg metálico + III gotas de HCl cc
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.	
			Flavanonoles: Rojo a magenta.	
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.	
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo Ninhidrina + calentar en B.M. 10 min.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Dragendorff.
		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	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntranger.	Coloración roja.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo de Borntranger.
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 <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 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	Baljet.	Coloración anaranjada.	X gotas de MP + V gotas de Acido 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	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.	X gotas de MP + papel humedecido con NH <sub>4</sub> OH cc en boca de tubo + calentar por 5 a 10 min en B.M.

### 3.6.4. Reactivación de las bacterias

Para la reactivación de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC N° 25923 y de *Escherichia coli* ATCC N° 8739, se descongeló los tubos de ensayo que contienen las cepas bacterianas a temperatura ambiente durante 3 horas, con la ayuda de un asa de siembra transportamos parte de las cepas a los tubos de ensayo con caldo infusión cerebro corazón para realizar la reactivación de las bacterias, para luego proceder a la incubación respectiva a una temperatura de 37°C por 24 horas. (Ver anexo: 04).

### **3.6.5. Siembra y Aislamiento**

Luego de la preparación del Agar Nutritivo y del Agar Litme; se procedió a sembrar las bacterias en estudio, con el fin de, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Para la siembra y aislamiento fue necesario utilizar las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Se trabajó cerca de la llama de un mechero (no más de 15 cm. de distancia). <sup>(56, 58, 59, 60).</sup>

La siembra que se utilizó fue por estrías múltiples o estrías agotamiento, luego las placas se incuban invertidas, ya que la alta concentración de agua en el medio puede provocar condensación durante la incubación y si cae sobre la superficie del agar, se extiende dando un crecimiento confluyente. <sup>(56, 58, 59, 60).</sup>

En los medios de cultivo luego de la siembra cada célula bacteriana viable dará origen a una colonia. <sup>(56, 58, 59, 60).</sup>

## CAPÍTULO IV PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. Presentación de resultados

#### Prueba de solubilidad

Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla N° 11: Prueba de solubilidad**

N°	Solventes	Nomenclatura	Interpretación	
			<i>Lepidium meyenii W.</i>	<i>Prosopis pallida</i>
1.	Acetato de etilo	EtOAc	-	-
2.	Acetona	Me <sub>2</sub> CO	-	+
3.	Agua destilada	H <sub>2</sub> O	+++	++
4.	Cloroformo	CHCL <sub>3</sub>	+	+
5.	Etanol	Et(OH)	++	++
6.	Éter de petróleo	EP	-	-
7.	Éter etílico	Et <sub>2</sub> O	-	-
8.	Metanol	MeOH	-	+
9.	n - butanol	n.buOH	+	-
10.	n - Hexano	Hex	+	-

**LEYENDA:**

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

FUENTE: Elaboración propia.

Para la prueba de solubilidad de ambas muestras, se trabajó con un grupo de solventes ordenados de acuerdo a su polaridad y 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>Lepidium meyenii W.</i>	<i>Prosopis pallida</i>
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.	++	+++
		Antrona.	Coloración verde.	+	++
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.	+	++
2	Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub> .	Coloración verde o azul.	+	+
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.	+	+

FUENTE: Elaboración propia.

**Tabla N° 12: Identificación de metabolitos (continuación)**

N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	Interpretación	
				<i>Lepidium meyenii W.</i>	<i>Prosopis pallida</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 Catéquicos	Rosenheim.	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	Borntrager.	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.	-	-
<p><b>LEYENDA:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- No realizada (0)</li> <li>- Ausente (-)</li> <li>- Leve (+)</li> <li>- Moderado (++)</li> <li>- Abundante (+++)</li> </ul>					

FUENTE: Elaboración propia.

En cuanto a los resultados de la identificación de los metabolitos, se encontró flavonoides, aminoácidos libres y grupos amino en la vaina de Algarroba y flavonoides, antocianinas, aminoácidos libres, grupos amino, alcaloides y esteroides en la Maca Negra.

## Medios de cultivo

Se realizó la preparación, siembra y lectura de 64 placas petri, las cuales se reportan en la Tabla N° 13. Del total de placas petri que fueron sembrados, 16 corresponden a *Lepidium meyenii W* 5%, 16 a *Prosopis pallida* 5%, 16 a *Lepidium meyenii W* 5% - *Prosopis pallida* 5% y 16 al Agar Nutritivo (AN), las que se distribuyeron en 08 placas petri por cada tipo de cepa y medio.

**Tabla N° 13: Número de placas Petri obtenidas según tipo de cepa y medio**

N°	TIPO DE CEPA	AGARES				TOTAL
		AN	<i>Lepidium meyenii W</i>	<i>Prosopis pallida</i>	<i>Lepidium meyenii W - Prosopis pallida</i>	
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC N° 25923	8	8	8	8	32
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC N° 8739	8	8	8	8	32
<b>TOTAL</b>		16	16	16	16	64

FUENTE: Elaboración propia.

El total de placas petri preparadas fueron 64, distribuyéndose según el tipo de cepa: 32 corresponden a *Staphylococcus aureus* ATCC N° 25923 y 32 a *Escherichia coli* ATCC N° 8739.

Los resultados de la evaluación macroscópica se presentan en las tablas 14 y 15, en las que se aprecian los dos criterios de evaluación que fueron; aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana, dando como resultado para *Staphylococcus aureus* ATCC N° 25923 y *Escherichia coli* ATCC N° 8739 Buena, lo que significa que la calidad de los medios alternos registrados se encuentra en un intervalo de 80 a 100%.

En la tabla N° 14, se evaluó el agar *Lepidium meyenii W* 5% - *Prosopis pallida* 5%, obteniéndose para *Staphylococcus aureus* N° ATCC 25923 un 87.5% de agares con el calificativo de Bueno y 12.5% de agares con calificativo de Regular y para el Agar Nutritivo 100 % (Bueno).

**Tabla N° 14: Evaluación de los agares *Staphylococcus aureus* N° ATCC 25923.**

AISLAMIENTO		AGAR <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		08	100%	08	100%
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	00	00
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00
TOTAL		08	100%	08	100%

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla N° 15, se evaluó el agar *Lepidium meyenii* W. 5% - *Prosopis pallida* 5%, obteniéndose para *Escherichia coli* N° ATCC 8739 un 87.5% de agares con el calificativo de Bueno y 12.5% Regular para los dos criterios de evaluación y para el Agar Nutritivo 100 % (Bueno).

**TABLA N° 15: Evaluación de los agares *Escherichia coli* N° ATCC 8739.**

AISLAMIENTO		AGARES <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		08	100%	08	100%
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	00	00
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00
TOTAL		08	100%	08	100%

FUENTE: Elaboración propia.

Se realizó la preparación, dispensación y siembra de 64 agares los cuales se reportan en la Tabla N° 16. Del total de agares que fueron preparados, 32 corresponden al Agar Nutritivo y 32 al Agar *Lepidium meyenii* W 5% - *Prosopis pallida* 5%, las que se distribuyeron en 03 agares por cada tipo de cepa de paciente y medio de cultivo.

**Tabla N° 16: Número de agares obtenidos según tipo de cepa de paciente y medio**

N°	TIPO DE CEPA DE PACIENTE	AGARES		TOTAL
		Agar Nutritivo	<i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%	
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>	4	4	8
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>	4	4	8
<b>TOTAL</b>		32	32	64

FUENTE: Elaboración propia.

El total de agares fueron 64, distribuyéndose según el tipo de cepa de paciente: 32 corresponden a *Staphylococcus aureus* y 32 a *Escherichia coli*.

Los resultados de la evaluación macroscópica 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; aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana, dando como resultado para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* Bueno, lo que significa que la calidad de los medios registradas se encuentra en un intervalo de 80 a 100%.

En la tabla N° 17, se evaluó el agar *Lepidium meyenii* W 5% - *Prosopis pallida* 5%, obteniéndose para *Staphylococcus aureus* un 87.5% de agares con el calificativo de Bueno y 12.5% de agares con calificativo de Regular y para el Agar Nutritivo 100 % (Bueno).

**Tabla N° 17: Evaluación de los agares *Staphylococcus aureus***

AISLAMIENTO		AGAR <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		08	100%	08	100%
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	08	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	08	00%
TOTAL		08	100%	08	100%

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla N° 18, se evaluó el agar *Lepidium meyenii* W 5% - *Prosopis pallida* 5%, obteniéndose para *Escherichia coli* un 87.5% de agares con el calificativo de Bueno y 12.5% de agares con calificativo de Regular y para el Agar Nutritivo 100 % (Bueno).

**Tabla N° 18: Evaluación de los agares *Escherichia coli***

AISLAMIENTO		AGAR <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		08	100%		
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR <i>Lepidium meyenii</i> W 5% - <i>Prosopis pallida</i> 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	07	87.5%	08	100%
REGULAR	60 – 79%	01	12.5%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		08	100%	08	100%

FUENTE: Elaboración propia.

## 4.2. Contrastación de hipótesis

### Hipótesis específica 1:

- **H<sub>1</sub>:** El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Staphylococcus aureus* es Buena.
- **H<sub>0</sub>:** El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Staphylococcus aureus* no es Buena.
- Mediante el uso del agar *Lepidium meyenii* W 5% - *Prosopis pallida* 5% del Agar LITME para las cepas de *Staphylococcus aureus* un 87.5% de agares obtuvieron un calificativo de Bueno y 12.5% de agares con calificativo de Regular con relación al criterio aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana.

En ambos casos se tuvo como referencia el Agar Nutritivo.

- **Decisión:** Por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna (**H<sub>1</sub>**).

### Hipótesis específica 2:

- **H<sub>2</sub>:** El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Escherichia coli* es Buena.
- **H<sub>0</sub>:** El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Escherichia coli* no es Buena.
- Mediante el uso del agar *Lepidium meyenii* W 5% - *Prosopis pallida* 5% del Agar LITME para las cepas de *Escherichia coli* un 87.5% de agares obtuvieron un calificativo de Bueno y 12.5% de agares con calificativo de Regular con relación al criterio aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana.

En ambos casos se tuvo como referencia el Agar Nutritivo.

- **Decisión:** Por lo tanto, se rechaza la hipótesis alterna (**H<sub>2</sub>**).

### Hipótesis general:

- $H_G$ : El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos es Buena.
- $H_{G0}$ : El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos no es Buena.
- Mediante el uso del agar *Lepidium meyenii* W 5% - *Prosopis pallida* 5% del Agar LITME para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* un 87.5% de agares obtuvieron un calificativo de Bueno y 12.5% de agares con calificativo de Regular con relación al criterio aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana. En ambos casos se tuvo como referencia el Agar Nutritivo.
- **Decisión:** Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y habiéndose aceptado las hipótesis alternas  $H_1$  y  $H_2$ , se acepta la hipótesis alterna de la hipótesis general de estudio.

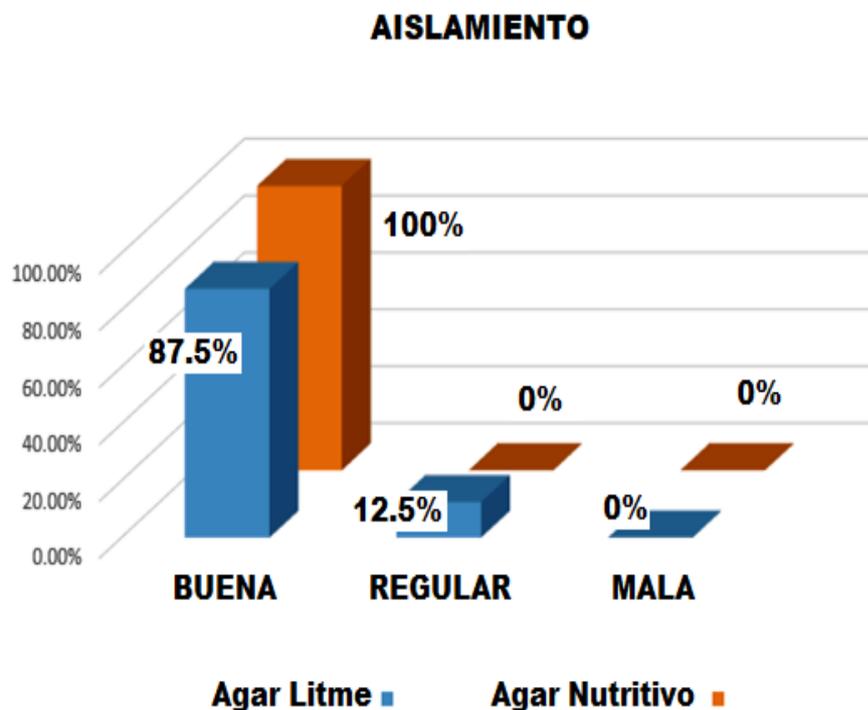


Figura N° 11: Aislamiento

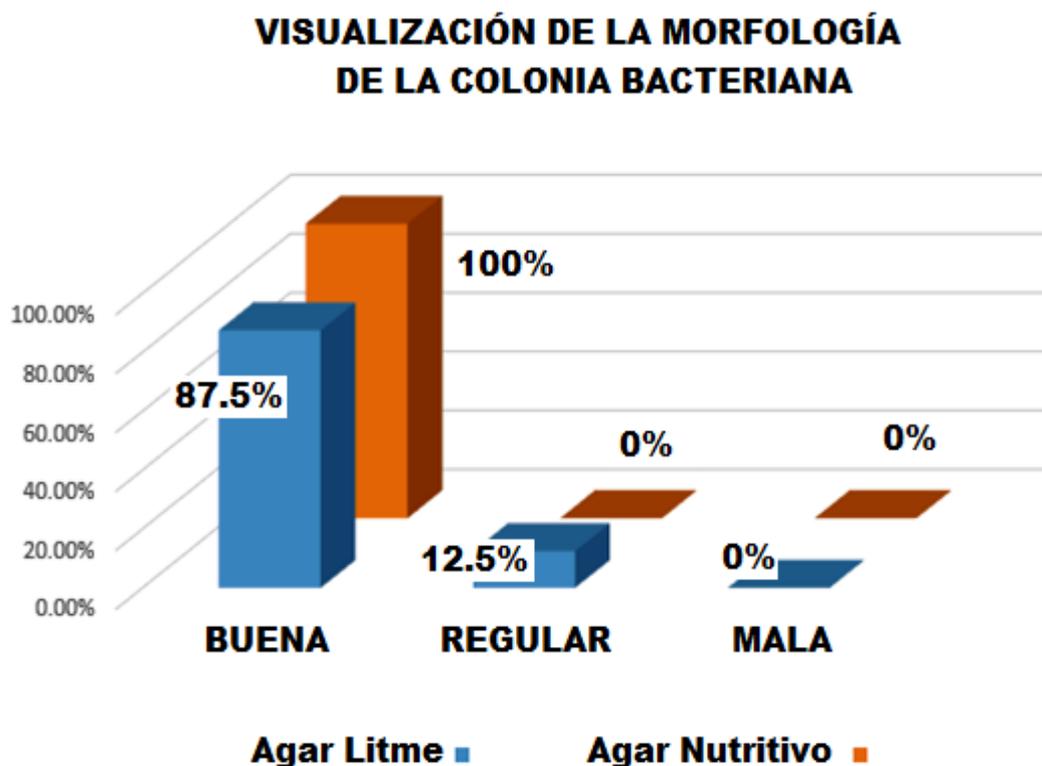


Figura N° 12: Visualización de la morfología de la colonia bacteriana

### 4.3. Discusión de resultados

En el presente estudio se evaluó, el efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos; para ello, se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Para la detección de los metabolitos primarios y secundarios de la Maca y Algarrobo, se pudo tener acceso a los diferentes solventes que se manejan en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Para el procedimiento de extracción, se tuvo en cuenta el uso tradicional de la Maca y el Algarrobo, en la cual se emplea agua como disolvente. En nuestro estudio, al realizar la prueba de solubilidad, se confirmó la amplia solubilidad de nuestras muestras en agua. (Arias, 2002, Cozar, 2011, Castro, 2017 y Torres, 2016).<sup>25, 29, 38, 40.</sup>

Durante la investigación de los compuestos químicos de la Maca y Algarrobo. Se utilizó una serie de reactivos químicos con la finalidad de detectar la presencia de metabolitos primarios y secundarios. Para el *Lepidium meyenii* W. (Maca), se obtuvo en mayor cantidad: Carbohidratos, Flavonoides, antocianinas, aminoácidos libres, grupos amino, alcaloides y esteroides y con respecto al *Prosopis pallida* (Algarrobo): carbohidratos, flavonoides, aminoácidos libres y grupos amino, los cuales, en conjunto, son los responsables de darles las propiedades a las especies estudiadas; de esta manera, se puede confirmar los resultados reportados por Castro, 2017; Vásquez, 2017; Cárdenas, 2017; Cevallos, 2015; Machado, 2001; Arias, 2002; Quispe, 2007; Hadzich, 2016.<sup>25, 27, 28, 35, 37, 38, 46, 51.</sup>

El tubérculo *Lepidium meyenii* W. (Maca) y la vaina del *Prosopis pallida* (Algarrobo) fueron pesados, lavados, cortados, triturados, secados y posterior molienda; no se trabajó con solventes o similares, debido a que el uso de otras sustancias químicas de naturaleza orgánica o inorgánica podrían interferir en el aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana. (Gonzales, 2014; Bermello, 2015; Castañeda, 2007; Shimabuku, 2015; Cárdenas, 2017; Quispe, 2007).<sup>28, 46, 61, 64, 68, 70.</sup>

Se realizó la siembra y aislamiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* N° ATCC 25923 y *Escherichia coli* N° ATCC 8739 en las placas del Agar Litme, que ha sido elaborado a base del 5% de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y el 5% de la vaina del *Prosopis pallida* (Algarrobo), dando como resultado un 87.5% con el calificativo de Bueno y un 12.5% de Regular, con relación a los criterios aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana; del mismo modo un 100% de Bueno para el Agar Nutritivo.

La posible causa de no alcanzar el 100% del calificativo Bueno, se debe a la presencia de los alcaloides en las muestras del tubérculo *Lepidium meyenii* W. (Maca) y la vaina del *Prosopis pallida* (Algarrobo), los cuales presentan actividad antibacteriana, teniendo en cuenta los estudios de Shimabuku, 2015; Machado, 2001; Gonzales, 2014 y Zamacona, 2010.<sup>61, 72, 37, 70.</sup>

Las muestras de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y de la vaina del *Prosopis pallida* (Algarrobo) se trabajaron al 5%, debido que a menores concentraciones no se apreciaban uniformemente el aislamiento y visualización de la morfología de las colonias bacterianas.

En relación a la visualización de las colonias del *Staphylococcus aureus*, las colonias presentaron el pigmento característico, el mismo que variaba de color crema al amarillo; asimismo, el color se favorecía por la incubación de los cultivos por 24 a 48 horas adicionales. Koneman, 2006; Silverio, 2015; Bello, 2014.<sup>7, 54, 60.</sup>

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones:

1. El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarroba) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos es Buena.
2. El *Lepidium meyenii* W. y *Prosopis pallida* poseen metabolitos primarios y secundarios; flavonoides, aminoácidos libres y grupos amino en la vaina de Algarroba y flavonoides, antocianinas, aminoácidos libres - grupos amino, alcaloides y esteroides en la Maca Negra.
3. El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Staphylococcus aureus* es Buena.
4. El efecto del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de *Escherichia coli* es Buena.

## **5.2. Recomendaciones:**

1. Continuar los estudios en estos medios de cultivo utilizando cepas aerobias y anaerobias estrictas.
2. Trabajar con concentraciones de Maca y Algarrobo mayores al 5%.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1 ed. Barcelona: Omega S.A; 2000.
2. Ganosa M. Fundamentación Química de las Reacciones de coloración y Precipitación en la identificación de Metabolitos Secundarios de Plantas Medicinales [Tesis Titulación]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2000.
3. Lock O. Investigación fitoquímica. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 1994.
4. Tortora F. Introducción a la Microbiología. 9 ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007.
5. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Microbiología Médica. 25 ed. México: Manual moderno; 2010.
6. Wiley J, Sherwood L, Woolverton C. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7 ed. Madrid: McGraw-Hill; 2008.
7. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
8. Ryan K, Ray C. Sherris Microbiología Médica. 5 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
9. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Madrid: Médica Panamericana; 2003.
10. Murray R, Patrick S. Microbiología Médica. 6 ed. Barcelona: Elsevier; 2006.
11. De la Rosa M, Prieto J, Navarro J. Microbiología en Ciencias de la Salud. 3 ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
12. Hernández R, Fernández C, Baptista L. Metodología de la Investigación. 5 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
13. Borges M, Vásquez J, Rodríguez A. Preparación de Agar a partir de mosto de destilería y harina de soya para detectar contaminantes microbianos en cultivo de tejidos vegetales. Rev. Bioagro 2003 Jul; 15(3): 217 – 220.
14. Ávila H. Introducción a la Metodología de la Investigación. 1 ed. Chihuahua: Cuauhtémoc; 2006.

15. Rojas D. Estandarización de un Medio de Cultivo Complejo para la Multiplicación de la Cepa C50 de *Rhizobium* spp [Tesis para optar el Título profesional de Microbiólogo Industrial]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
16. Granados R, Villaverde C. Microbiología tomo I. 1 ed. Madrid: Cengage; 2003.
17. Pratt C, Cornely K. Bioquímica. 2 ed. México: El Manual Moderno; 2012.
18. Nelson D, Cox M. Lehninger Principios de Bioquímica. 5 ed. Barcelona: Omega S.A; 2009.
19. Lopardo H. Introducción a la Microbiología Clínica. 1 ed. Buenos Aires: Universidad de la Plata; 2016.
20. Salvador B, Vega L. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología. 1 ed. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México; 2013.
21. Parés R, Juárez A. Bioquímica de los Microorganismos. 1 ed. Barcelona: Reverté S.A; 2012.
22. Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M. Manual de Microbiología General. 1 ed. Argentina: UniRío; 2015.
23. Loconi M, Silva E. Determinación de los parámetros de dilución y tiempo de fermentación para obtener una, bebida alcohólica utilizando harina de algarroba (*Prosopis pallida*) [Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2014.
24. Sánchez J. Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa procesadora y comercializadora de harina de algarrobo, en la ciudad de Loja. [Tesis para optar el Grado de Ingeniero en Administración de Empresas]. Loja: Universidad Nacional de Loja; 2016.
25. Castro E. Efecto antibacteriano de miel de *Apis mellífera* y algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado “La Unión”. [Tesis para optar el título profesional de licenciada en nutrición]. Trujillo: Universidad Cesar Vallejo; 2017.
26. Cortez C. Definición de parámetros de calidad del café de algarroba para la elaboración de una norma técnica. Piura: Universidad de Piura; 2010

27. Vázquez L. “Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de *Prosopis pallida* (algarrobo) sobre *Cándida Albicans* ATCC 90028”. [Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista]. Piura: Universidad Cesar Vallejo; 2017.
28. Cárdenas C. Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* “Algarrobo” [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
29. Torres L. Elaboración de una bebida carbonatada de Algarrobina [Tesis para optar el título de Ingeniero Industrial y de Sistemas]. Piura: Universidad de Piura; 2016.
30. Cañamero C, Arévalo M. Pitahaya (*Hylocereus undatus*), deshidratada por osmosis en Algarrobina. [Tesis para optar el título de Licenciado en Bromatología y Nutrición]. Huacho: Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión; 2014.
31. Sotomayor C. Evaluación financiera para la elaboración y comercialización de productos derivados del Algarrobo en las comunas de la Parroquia Colonche, Provincia de Santa Elena. [Tesis para optar el grado de Magister en Finanzas y Proyectos Corporativos]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2015.
32. Bigne F. “Aplicación de harina de fruto de Algarrobo en el desarrollo de productos panificados saludables”. [Tesis Doctoral]. Argentina: Universidad Nacional De La Plata; 2016.
33. Ortega A. Elaboración y aplicación gastronómica de la harina de Algarroba [Tesis para optar el título de Licenciada en Gastronomía]. Guayaquil: Universidad De Guayaquil; 2013.
34. Morales F. “Plan de exportación de harina de Algarrobo a Bolivia” [Tesis por el título de Tecnólogo en Exportaciones e Importaciones]. Bolivia: Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas; 2017.
35. Cevallos R. Métodos de extracción para los compuestos esenciales del Algarrobo (*Prosopis Pallida*) y su posible aplicación a nivel industrial. [Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico]. Portoviejo: Universidad Técnica de Manabí; 2015.

36. Ccolque K. Determinación Del Recuento Microbiano De Productos Derivados De La Maca (*Lepidium Meyenii W.*) Utilizando Placas Petrifilm y Su Comparación Con el método convencional [tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico.] Lima: Universidad Nacional Mayor de Santos Marcos; 2007.
37. Machado R. “Caracterización física-química de 4 ecotipos de Maca (*Lepidium meyenii W.*). Procesos de liofilización, atomización y pregelatinización en el ecotipo seleccionado” [Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Tingo María; 2001.
38. Arias A. “Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium Peruvianum* Chacón, “Maca”. [Tesis para optar el título profesional de Biólogo con mención en Genética]. Lima; 2002.
39. Guijarro D. Proyecto de factibilidad para la producción y exportación de raíz de maca al mercado chino. [Tesis para optar el título de Ingeniería en Comercio Exterior, Integración y Aduanas]. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial; 2011.
40. Cozar A, Mucha L. “Elaboración y caracterización química y organoléptica de un filtrante de maca (*Lepidium peruvianum chacón*) con cáscara de naranja (*Citrus aurantium*). [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Tarma; 2011.
41. Charaja E. Variación de N, P, K y cationes cambiabiles en tres suelos de puno, por efecto del cultivo de maca (*Lepidium meyenii walp.*). [Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Agricultura Andina]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2008.
42. Camavilca B, Camavilca L. Estudio de Factibilidad para la instalación de una planta procesadora de harina de maca (*Lepidium peruvianum Chacón*) gelatinizada para exportación a Estados Unidos. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Junín: Universidad Nacional Del Centro Del Perú; 2012.
43. Reyes V. Determinación de aflatoxinas y ocratoxinas en la maca seca y harina de maca (*Lepidium meyenii walp.*). [Tesis para optar el grado académico de Magister en Microbiología]. Lima: U.N.M.S.M; 2006.

44. Nobuyuki E. Efecto de la adición de harina de maca (*Lepidium meyenii* W) y del Tiempo de almacenamiento sobre la acidez, sinéresis, viscosidad aparente y aceptabilidad general de yogurt batido. [Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2014.
45. Payano N, Payano N. Determinación de aceptabilidad y digestibilidad de la galleta de trigo con sustitución parcial de harina sucedánea de maca (*Lepidium peruvianum chacón*) en la provincia de Junín. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Industrial]. Junín: Universidad Nacional Del Centro Del Perú; 2010.
46. Quispe S. Respuesta de tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* walp.) a cinco niveles de estiércol de ovino en la comunidad yampupata. [Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo] La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
47. Cuentas M. Estudio y análisis de la biodiversidad, distribución y conservación de los bosques secos en Lambayeque. [Tesis para optar el título de Licenciada en Geografía y Medio Ambiente]. San Miguel: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2015.
48. Prudencio J, Bustamante E. Determinación In Vitro De La Actividad Fotoprotectora Uva En Una Crema De Protección Solar Formulada Con Extracto Hidroglicólico De *Lepidium Meyenii* W (Maca). [Tesis Para Optar El Título Profesional De Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
49. Lobaton M. Micronutrientes en *Lepidium meyenii*. W (Maca - Maca) y actividad en sujetos con anemia ferropénica e hiperlipidemia. [Tesis para optar el grado académico de Magister en Bromatología]. Lima: Universidad Nacional De San Marcos; 1998.
50. Hadzich A. Metabolismo Post – Cosecha de maca (*Lepidium meyenii Walpers*) durante su secado tradicional e industrial con énfasis en la formación de amidas. [Tesis para optar el título de Licenciado en Química]. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2016.
51. Morrison R, Boyd R. Química Orgánica. 5 ed. México: Addison Wesley; 1998.

52. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. 5 ed. Madrid: McGraw-Hill; 2004.
53. Pérez B, Isabel de Silóniz M, Torralba B, Vásquez C. Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. Reduca (Biología) Ser. Microb. 2010 Mar; 3(5): 1 – 14.
54. Silverio C. Microbiología General para Investigaciones de Laboratorio. 1 ed. Ecuador: Utmach; 2015.
55. Parés R, Juárez A. Bioquímica de los Microorganismos. 1 ed. Barcelona: Reverté S.A; 2012.
56. Agar Nutritivo [Internet]. Argentina: Britania Lab; 2015 [citado el 25 septiembre 2018]. Disponible en: [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a28446b169d8.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28446b169d8.pdf).
57. Sacsquispe R, Ventura G. Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. 1 ed. Lima: INS; 2001.
58. Cultimed-Manual Básico de Microbiología [Internet]. España: Asenlab; c2009 [citado el 25 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.asenlab.com/downloads/microbiologia.pdf>
59. Merckmillipore [Internet]. Alemania: Merck KGaA; c2009 [citado el 25 septiembre 2018]. Disponible en: [http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-PE-Site/es\\_ES/-/PEN/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA\\_CHEM-110282&DocumentId=200705.002.ProNet&DocumentUID=13740&DocumentType=TI&Language=ES&Country=NF&Origin=SERP](http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-PE-Site/es_ES/-/PEN/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-110282&DocumentId=200705.002.ProNet&DocumentUID=13740&DocumentType=TI&Language=ES&Country=NF&Origin=SERP)
60. Bello A, Gonzales G. Manual de Prácticas de Bacteriología y Micología Veterinarias. 1 ed. Tuxpan: Universidad Veracruzana.
61. Gonzales G, Villaorduña L, Gasco M, Rubio J, Gonzales C. Maca (*Lepidium meyenii Walp*), una revisión sobre sus propiedades biológicas. Rev. Perú Med Exp Salud Pública. 2014 Ener; 31(1): 100-110.
62. Salazar B. Efecto del suplemento de harina de maca (*Lepidium meyenii Walp*. 1843) en el peso y talla de terneros de la raza Holstein (*Bos taurus*). [Tesis para optar el título de Biólogo con mención en Zoología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.

63. Peñaloza F, San Martín F, Ara M. Valor Nutricional de La Algarroba (*Prosopis Pallida*) en la Alimentación del caballo. Rev. Investig. Vet. Perú. 2002 Abr; 13 (1): 17-24.
64. Bermello S, García D. Métodos de extracción para los compuestos esenciales del algarrobo (*Prosopis Pallida*) y su posible aplicación a nivel industrial. [Tesis para optar el título de Ingeniero Químico]. Portoviejo: Universidad Técnica de Manabí; 2015.
65. Acosta E. Desarrollo de un alimento complementario con harina de algarrobo (*Prosopis pallida*) fortificado con hierro. [Tesis para optar el título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria]. Honduras: Universidad de Zamorano; 2015.
66. Macías-Rodríguez E, Usca-Méndez J. Utilización de la harina de algarrobo (*Prosopis pallida*) en la alimentación de conejos en crecimiento, engorde. Revista Ciencia UNEMI. 2017 Mar; 10 (22): 105 – 110.
67. Alcántara D, Marquina J, Yucra S, Tapia V, Gonzales G. Efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* W (Maca Negra) en la Memoria Espacial Visual en ratones orquidectomizados. Rev Acta Andina. 2011 Agost; 77 (7): 42 - 47
68. Castañeda B, Castro de la Mata R, Manrique R. Efectos metabólicos de *Lepidium meyenii* Walpers, “MACA” y *Lupinus mutabilis* Sweet, “CHOCHO” en ratas. Rev. Horiz. Méd. 2007 Jun; 7 (1): 32 – 38.
69. Canales M, Aguilar J, Prada A, Marcelo A, Huamán C, Carbajal L. Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* W (MACA) en ratones albinos y su descendencia. ALAN 2000 Jun; 50 (2): 2 - 15
70. Shimabuku N. “Composición Química de *Lepidium meyenii* walp. (Maca): comparando procedencias y colores del órgano de reserva”. [Tesis para optar el título de Licenciada en Química]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2015.
71. *Prosopis pallida*. (s.f.). En Wikipedia. Recuperado el 22 de Octubre 2018 de [https://es.wikipedia.org/wiki/Prosopis\\_pallida](https://es.wikipedia.org/wiki/Prosopis_pallida)
72. Zamacona X, Castro E. Identificación y obtención de alcaloides en variedades de mezquite *Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida*. [Internet]. México: UAQ; 2010. [citado el 25 septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2010/12%20Verano%20Ciencia%20Region%20Centro/UAQ%20Zamacona%20Montanez.pdf>

# **ANEXOS**

## ANEXO N° 01: MATRIZ DE CONSISTENCIA

### Preparación del Agar LITME a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) para Detectar Contaminantes Bacterianos

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVOS GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACION DE VARIABLES			METODOLOGIA	
			V1.	DIMENSION	INDICADORES		
¿Cuál será el efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos?	Determinar el efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos.	El efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de contaminantes bacterianos es Buena.	Efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME	Fitoquímica	Solubilidad		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfoque: Cuantitativo.</li> <li>- Tipo: Aplicado.</li> <li>- Nivel: Transversal.</li> <li>- Diseño: Experimental.</li> <li>- Población: 5.</li> <li>- Muestra: 5.</li> <li>- Técnica:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Técnica de Preparación de Medio de Cultivo.</li> <li>Técnica de Siembra y Aislamiento.</li> </ul> </li> <li>- Instrumento:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Tabla de Estudio Fitoquímico.</li> <li>Tabla de Solubilidad.</li> <li>Tabla de Evaluación de Medios de Cultivo.</li> </ul> </li> </ul>
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICAS			V2.	DIMENSION	
¿Cuál será la composición química del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo)?	Determinar la composición química del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo).	<i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) tienen metabolitos primarios y secundarios.	Detección de contaminantes bacterianos	Aislamiento.	BUENA	80 – 100%	
¿Cuál será el efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	Evaluar el efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> .	El efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> es Buena.			REGULAR	60 – 79%	
¿Cuál será el efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de <i>Escherichia coli</i> ?	Evaluar el efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de <i>Escherichia coli</i> .	El efecto del <i>Lepidium meyenii</i> W. (Maca) y <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) del Agar LITME en la detección de <i>Escherichia coli</i> es Buena.			Visualización de la Morfología de la Colonia.	BUENA	
					REGULAR	60 – 79%	
					MALA	50 – 59%	

## ANEXO N° 02: TESTIMONIO FOTOGRÁFICO

a) Tubérculo del *Lepidium meyenii* W. (Maca) (Recolección y Cortado).



b) Vaina de *Prosopis pallida* (Algarroba) (Recolección y Secado).



c) Procesamiento del *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarroba)



d) Reactivos para la Solubilidad y el Tamizaje Fitoquímico.



e) Resultados de la Solubilidad y del Tamizaje Fitoquímico.



*Lepidium meyenii* W. (Maca)



*Prosopis pallida* (Algarroba)



f) Acondicionamiento de Materiales.



g) Preparación de Medios de Cultivo.



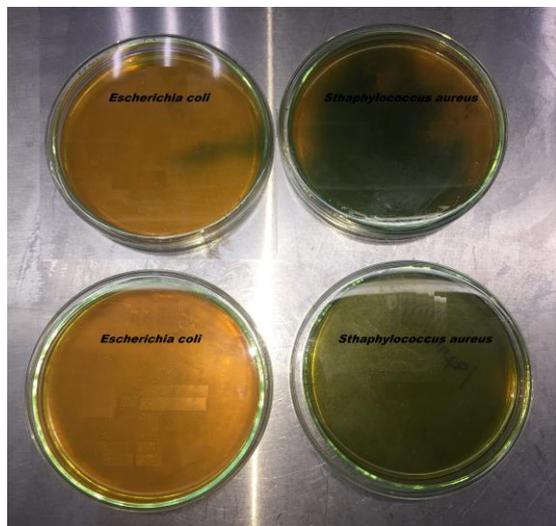
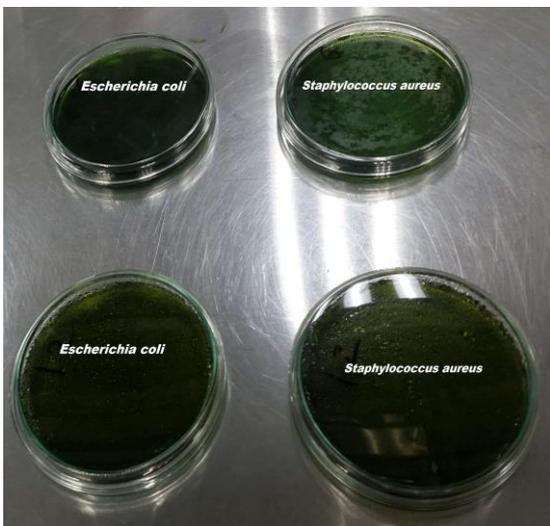


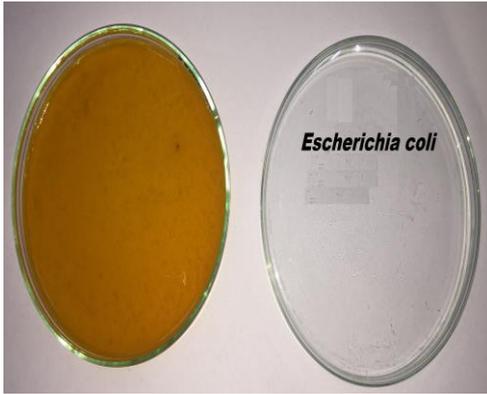
h) Siembra de Cepas Bacterianas.



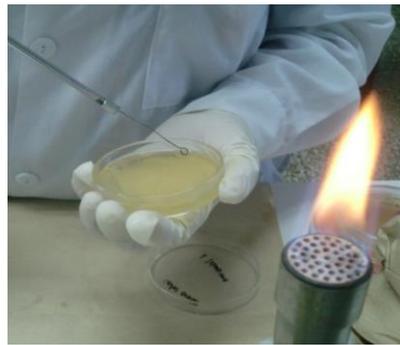
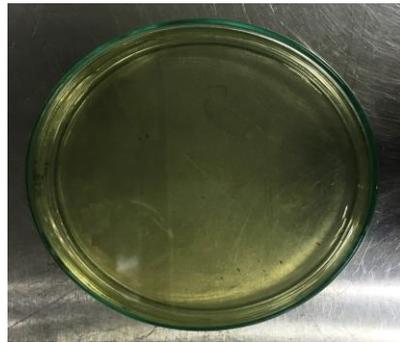


i) Lectura de Medios de Cultivo: Agar Litme.





j) Siembra y Aislamiento de las cepas en Agar Nutritivo.



*Escherichia coli*



*Staphylococcus aureus*

## ANEXO N° 03: TAXONOMÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 298-USM-2016

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

La muestral vegetal (hojas, flores y vaina) recibida de **José Luis LITUMA QUIROZ**, estudiante de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: *Prosopis pallida* (H. & K.) y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: FBALES

FAMILIA: FABACEAE

GENERO: *Prosopis*

ESPECIE: *Prosopis pallida* (H. & K.).

Nombre vulgar: "Algarrobo"  
Determinado por Blog. Mario Benavente Palacios.

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

Lima, 21 de noviembre de 2016



Dra. Haydee Montoya Terreros  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono: 619-7000 anexo: 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe  
<http://museohn.unmsm.edu.pe>



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 296-USM-2016

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

La muestral vegetal (hojas, flores y tuberculo) recibida de **José Luis LITUMA QUIROZ**, estudiante de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: *Lepidium meyenii Walp.* y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: BRASSICALES

FAMILIA: BRASSICACEAE

GENERO: *Lepidium*

ESPECIE: *Lepidium meyenii Walp.*

Nombre vulgar: "Maca"  
Determinado por Blog. Mario Benavente Palacios.

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

Lima, 17 de noviembre de 2016



**Dra. Haydee Montoya Terreros**  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

**ANEXO N° 04: CERTIFICADO CEPAS N° ATCC**



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-290 Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2016/9/14
---	---

<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic <b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	<b>Performance</b> Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
--	--

<b>ID System: MALDI-TOF</b> See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	---

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 for Vitek®: 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.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

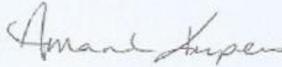


(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli <b>Catalog Number:</b> 0335 <b>Lot Number:</b> 335-211 <b>Reference Number:</b> ATCC® 8739™** <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2018/8/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Tracy A Blenker <b>Release Date:</b> 2016/10/13
--	---

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> 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 <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Medium:</b> SBAP  <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth 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   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

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 for Vitek®: 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.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



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

TESTING CERT #2655.01

## ANEXO N° 05: CEPAS BACTERIANAS AISLADAS 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 Faríngea.
- c) Salmonella typhi: 02. Correspondientes a Coprocultivo.

Asimismo, se hace entrega de las diversas muestras aisladas al T.M. Walter Siri Rodríguez, 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.B.P. 3964  
-SP. MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA-

## ANEXO N° 06: VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO



Universidad  
Inca Garcilaso de la Vega  
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

### HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

#### FICHA DE OBSERVACIÓN ADHOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Preparación del Agar LITME a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) para Detectar Contaminantes Bacterianos

Después de revisado el Instrumento es valiosa 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?                               | ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x) |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están referidos 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 tablas 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 Items considera usted que deben agregarse?

NINGUNO

2. ¿Qué Items considera usted que deben eliminarse?

NINGUNO

3. ¿Qué Items considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?

NINGUNO

FECHA: \_\_18-09-2018\_\_

VALIDADO POR:

Q.F. LUIS ANTONIO ARANGUREN BELAUNDE

CQFP06901



Universidad  
Inca Garcilaso de la Vega

Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

Preparación del Agar LITME a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) para Detectar Contaminantes Bacterianos

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H <sub>2</sub> O	
2.	Etanol	Et(OH)	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtoAc	
6.	Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me <sub>2</sub> CO	
9.	Éter etílico	Et <sub>2</sub> 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			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.
			Isoflavanonas: Amarillo rojizo.
			Flavanonoles: 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.
		Mayer.	Precipitado blanco.
		Bertrand.	Precipitado blanco.
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.
8	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntrager.	Coloración roja.

  
CQ-FP 06901



MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
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 Carminico	BaCl <sub>2</sub> 2%.	Violeta Mate

**LEYENDA:**

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

EVALUACIÓN DE LOS AGARES				
AISLAMIENTO	AGAR Lepidium meyenii 5% - Prosopis pallida 5%		AGAR NUTRITIVO	
	N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%			
REGULAR	60 – 79%			
MALA	50 – 59%			
TOTAL				

VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA	AGAR Lepidium meyenii 5% - Prosopis pallida 5%		AGAR NUTRITIVO	
	N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%			
REGULAR	60 – 79%			
MALA	50 – 59%			
TOTAL				

  
C9FP06901



**HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS**

**FICHA DE OBSERVACIÓN ADHOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**Preparación del Agar LITME a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) para Detectar Contaminantes Bacterianos**

Después de revisado el Instrumento es valiosa 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?	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x)
2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están referidos 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 tablas 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 Items considera usted que deben agregarse?  
NINGUNO
2. ¿Qué Items considera usted que deben eliminarse?  
NINGUNO
3. ¿Qué Items considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?  
NINGUNO

FECHA: \_\_18-09-2018\_\_

VALIDADO POR: Pedro Facinto Herrera

CQFP 17/197



Preparación del Agar LITME a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo)  
para Detectar Contaminantes Bacterianos

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H <sub>2</sub> O	
2.	Etanol	Et(OH)	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtoAc	
6.	Cloroformo	CHCL <sub>3</sub>	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me <sub>2</sub> CO	
9.	Éter etílico	Et <sub>2</sub> 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			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
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 Catéquicos	Rosenheim.	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	Borntrager.	Coloración roja.

CBFP. 17/97



MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
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 Carmínico	BaCl <sub>2</sub> 2%.	Violeta Mate
<b>LEYENDA:</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- No realizada (0)</li> <li>- Ausente (-)</li> <li>- Leve (+)</li> <li>- Moderado (++)</li> <li>- Abundante (+++)</li> </ul>			

EVALUACIÓN DE LOS AGARES					
AISLAMIENTO		AGAR Lepidium meyenii 5% - Prosopis pallida 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%				
REGULAR	60 – 79%				
MALA	50 – 59%				
TOTAL					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR Lepidium meyenii 5% - Prosopis pallida 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%				
REGULAR	60 – 79%				
MALA	50 – 59%				
TOTAL					

COFP 17/197



**HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS**

**FICHA DE OBSERVACIÓN ADHOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**Preparación del Agar LITME a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) para Detectar Contaminantes Bacterianos**

Después de revisado el Instrumento es valiosa 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?                               | ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (x) |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están referidos 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 tablas 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**

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

FECHA: \_\_18-09-2018\_\_

VALIDADO POR:

Mg. Q.F. Oscar Flores López  
C.Q.F.P. 19190



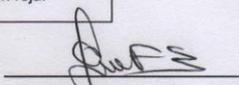
Preparación del Agar LITME a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo)  
para Detectar Contaminantes Bacterianos

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H <sub>2</sub> O	
2.	Etanol	Et(OH)	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtOAc	
6.	Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me <sub>2</sub> CO	
9.	Éter etílico	Et <sub>2</sub> 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			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
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 Catéquicos	Rosenheim.	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	Borntrager.	Coloración roja.

  
Mg. Q.F. Oscar Flores López  
C.Q.F.P. 19190



MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
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 Carmínico	BaCl <sub>2</sub> 2%.	Violeta Mate

**LEYENDA:**

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

EVALUACIÓN DE LOS AGARES					
AISLAMIENTO		AGAR Lepidium meyenii 5% - Prosopis pallida 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR Lepidium meyenii 5% - Prosopis pallida 5%		AGAR NUTRITIVO	
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					

*[Firma manuscrita]*

Mg. Q.F. Oscar Flores López  
C.Q.F.P. 19190

**ANEXO N° 07: ESTERILIZACIÓN y PREPARACIÓN de MEDIOS de CULTIVO** <sup>(22, 56)</sup>  
(Reynoso *et al*, 2015; Britania Lab, 2018)

**Consideraciones generales:**

- Leer atentamente la fórmula de los medios y calcular la cantidad de cada uno de los componentes químicos.
- Pesar en balanza digital sobre papel aluminio.
- Colocar los componentes en un frasco Erlenmeyer de volumen adecuado y agregar el agua destilada.
- Medir el pH.
- Agregar agar en caso de los medios sólidos.
- Acondicionar para su esterilización en autoclave.
- Conservar en heladera a 4° C hasta su fraccionamiento.

**Agar Nutritivo:**

- |                     |         |
|---------------------|---------|
| - Extracto de carne | 3 g     |
| - Peptona           | 5 g     |
| - NaCl              | 8 g     |
| - Agar              | 15 g    |
| - Agua destilada    | 1000 ml |
| - pH                | 7.3     |

Parte del medio de cultivo se esterilizará por autoclave para luego ser fraccionado en placas de Petri estériles y parte, se disolverá por calentamiento a baño de María, se distribuirá en tubos y se esterilizarán por autoclave. Luego del proceso de esterilización, los tubos se inclinarán a fin de obtener tubos en “agar pico de flauta” y tubos con “agar inclinado”.