



Fig 1. Semilla de Nacascal

## Caracterización Biológica del hongo *Aspergillus subespecie salvadorensis* encontrada en las semillas de *Caesalpinia coriaria* (nacascal).

**Dr. Antonio Vásquez Hidalgo**

Departamento de Microbiología

Facultad de Medicina

Universidad de El Salvador



**Nº. 3 y 4, julio - diciembre 2022**

La Universidad segunda época, Nº 3 y 4, julio - diciembre 2022

**AGRADECIMIENTO A CENSALUD. DEPTO MICROBIOLOGIA. EDITORIAL UNIVERSITARIA.UNICA FM, PROYECCION SOCIAL, COMUNICACIONES UES. MEXICO .**

**Dra. Vianney de Abrego, PhD. CENSALUD/**

**Dra R S. Uiz, PhD (México) INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

# HISTORIA. ANTECEDENTES

- 1) .....12 años de estudio
- 2) Inicio estudios depto MICROBIOLOGIA 2006-2007-2008-2018
- 3) Escritura pública de tinción-descubrimiento 2007
- 4) REPOSITORIO/ Edit Univ publicación hallazgo rev 2008
- 5) CENSALUD feb micro elect 2008
- 6) MEXICO 2010 PCR
- 7) REPOSITORIO/Edit Universitaria publicación rev extracción colorante 2010
- 8) Edit Universitaria compendio 2022
- 9) .... REINICIO CONTACTOS X MEXICO: PAGO Y OTROS



Fig 1. *Scapha de Nacarat*

X Accidente spp  
Inicio colorante + PCR

**colorante - hallazgo**

**Nº 52**

**2007**

**LIBRO 1º**

**ESCRITURA PUBLICA DE:**

CONSTANCIA DE INVENCION

**OTORGADA POR:**

ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

**A FAVOR DE:**

**ANTE LOS OFICIOS DEL NOTARIO:**

**LIC. ANTONIO ALBERTO SÁNCHEZ RAUDA**

Urb. Santa Adela, 7ª Ave. Nte. Pje. 3, Edif. Quiñónez, 2ª Planta, S.S. TEL 2222-2003





aspergillum o aspersor

## Resumen. HISTORICO

Pier Antonio Micheli nació en **Florence, Italia**, en el año **1697**. Fue un destacado científico, botánico y se le considera el padre de la micología. Dedicó su vida a la taxonomía y al estudio de especies no conocidas de plantas, hongos y líquenes. En **1729** publicó el libro ***Nova Plantarum Genera***, donde describió 1900 plantas, entre las que se encontraban 900 hongos y líquenes. Aquí describió especies de hongos como ***Botrytis***, ***Mucor*** y ***Aspergillus***, las cuales tienen importancia en patología médica, animal y vegetal hasta el día de hoy. **Murió el 1 de enero de 1737**, en su natal Florencia, de una **enfermedad pulmonar cuya causa no está bien clara**. El legado de Micheli sigue presente y constituye un ejemplo para todos aquellos que se dedican al difícil arte de la taxonomía en sus distintas áreas y en especial a la micología. En el caso de ***Aspergillus*** decidió darle ese nombre debido a la semejanza morfológica con el aspergillum.

**Palabras clave:** Micheli; taxonomía; Aspergillus

[link](#)

# Introducción

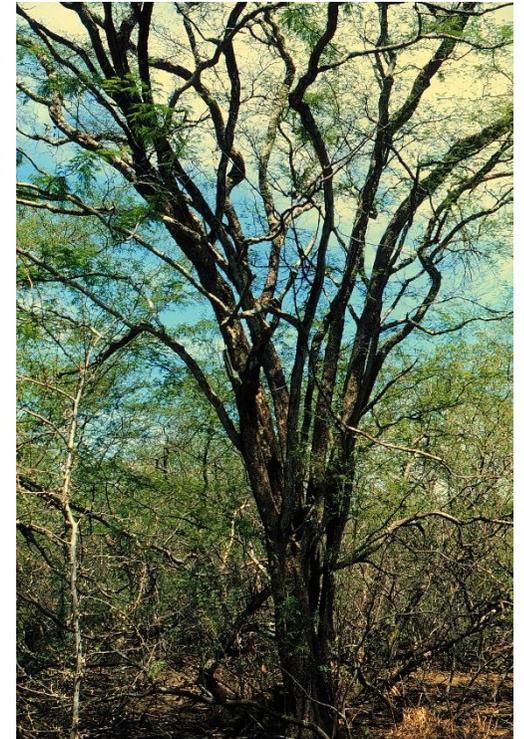
- En nuestro **medio ambiente** la Salud es un valor agregado al capital humano .
- **la semilla de Nacascal** o Nacascolo, utilizada ampliamente en la **alfarería y curtido de pieles** en la zona norte del país.
- Esta semilla tiene una particularidad inerte que **necesita la presencia de un hongo del genero *Aspergillus sp***, para que pueda teñir junto con las propiedades del **barro teñirse de color negro, las vasijas y de curtir la piel del ganado vacuno.**



# Semilla nacascol

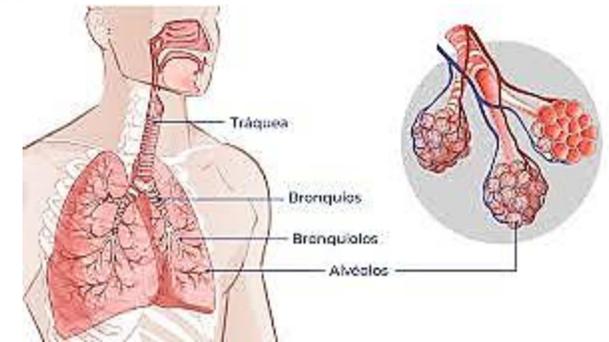
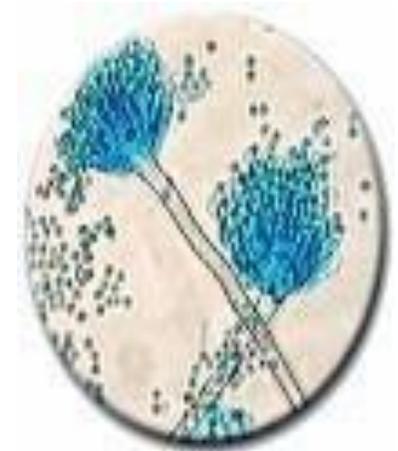
Del árbol denominado **NACASCOL** cuyo nombre científico es ***Caesalpinia coriaria***, de la familia *Caesalpinieaceae*, del genero *Caesalpinia*, planta leguminosa con tallo de de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo, cada una con mas de 10 foliolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, ápice redondeado, semillas de color café de aspecto negro .

Del **análisis fitoquímico** preliminar del árbol de ***Caesalpinia coriaria*** contiene taninos, triterpenos, glicosidos y flavonoides



## Generalidades del *Aspergillus sp*

- Hongo en naturaleza, vivienda, tierra, ventilación y agua y material orgánico en descomposición.
- Se reproducen a temperaturas altas. 15 a 53 °C
- Las esporas se diseminan por el aire y son inhaladas.
- Las **esporas** por miles de años. Ramses II.
- Tamaño esporas es **0,2 a 3.5 micras.**
- El **alvéolo pulmonar** es un saco de aproximadamente **0,2 a 0,5 mm de diámetro**
- Patógeno oportunista.



micra < mm

**1 Milímetros = 1000 Micrómetros**

Longitud

1

=

0.001

Micrómetro

Milímetro

Fórmula

divide el valor de longitud entre 1000

Longitud

0.2

=

200

Milímetro

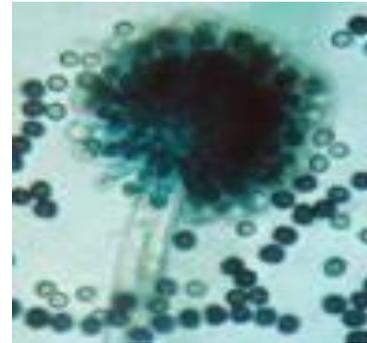
Micrómetro

Fórmula

Multiplicar el valor de longitud por 1000

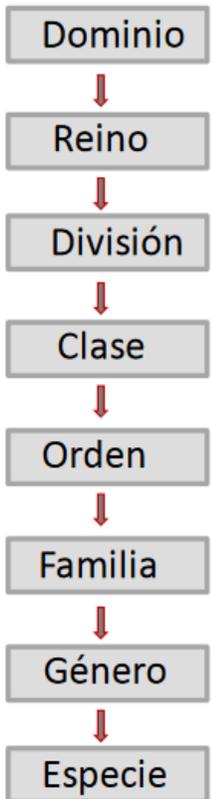
# Genero *Aspergillus spp*

- **Especies :**
- *A. fumigatus* (85%),
- *A. flavus* (5-10%),
- *A. niger* (2-3%),
- *A. terreus* (2-3%),
- *A. versicolor*,
- *A. nidulans*,
- *A. glaucus*,
- *A. clavatus*,
- *A. ustus*



**Genero especie subsp o var**

***Aspergillus niger subsp. uessalvadorensis***



*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

*Solanum tuberosum* Var. Hualash

*S. enterica* subespecie *enterica*

*Staphylococcus aureus*, también otras subespecies como *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. delphini*

La especie *Campylobacter jejuni* comprende dos subespecies (*C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. jejuni* subespecie *doylei*)

**Un género** un género es un grupo que reúne a varias especies emparentadas.

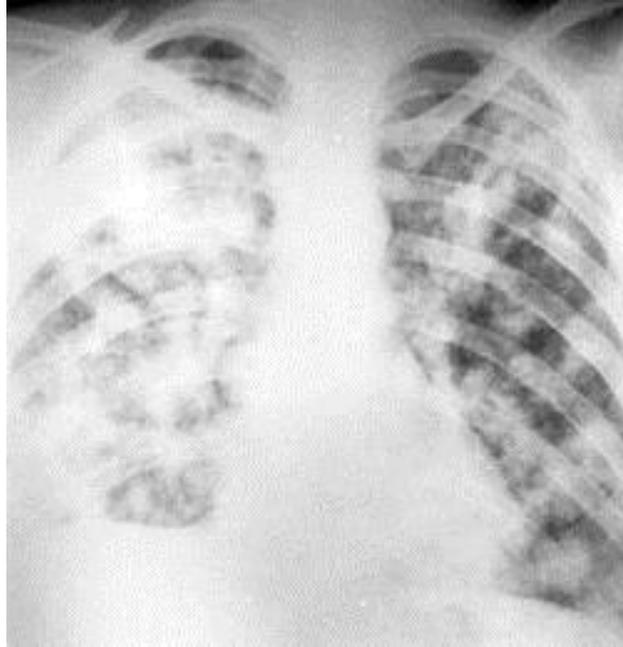
**Una especie** un género es un grupo que reúne a varias especies emparentadas, son similares en su forma y función .

**Una subespecie** es una categoría taxonómica que hace referencia a cada uno de los grupos en los que se encuentra una especie. Muy importantes las **mínimas variaciones o haber sutiles diferencias morfológicas. Subgrupos taxonómicos dentro de una especie, denominados subespecies.**

# Micosis

1. Hongo patógeno oportunista.  
**Aspergilosis invasivas o diseminadas**
2. **Aspergilosis pulmonar de tipo bronco pulmonar alérgica**
3. **Aspergiloma**
4. **Aspergilosis pulmonar invasiva**

SALUD Vrs ENFERMEDAD



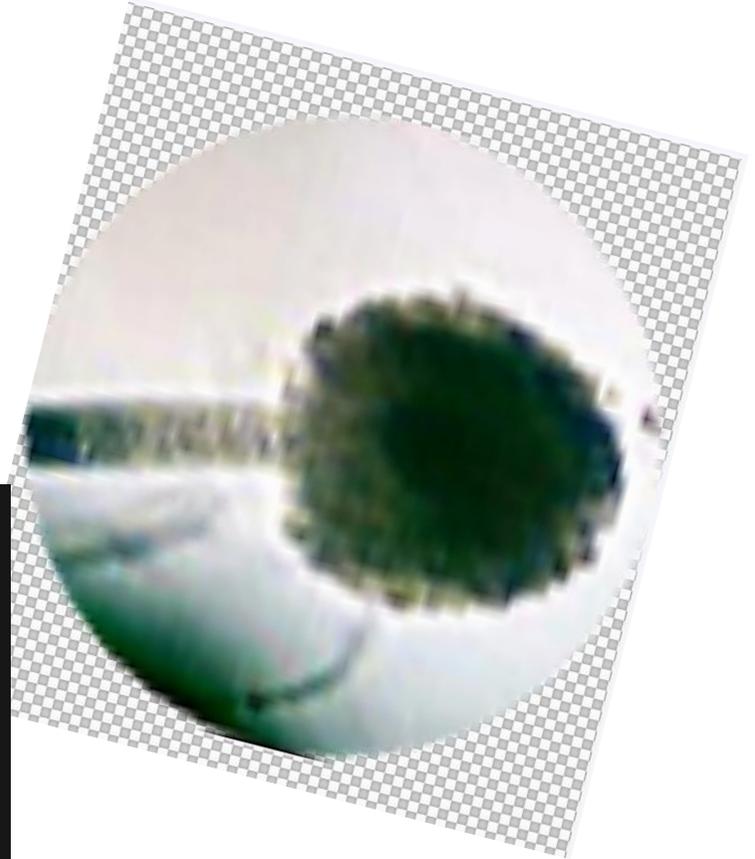
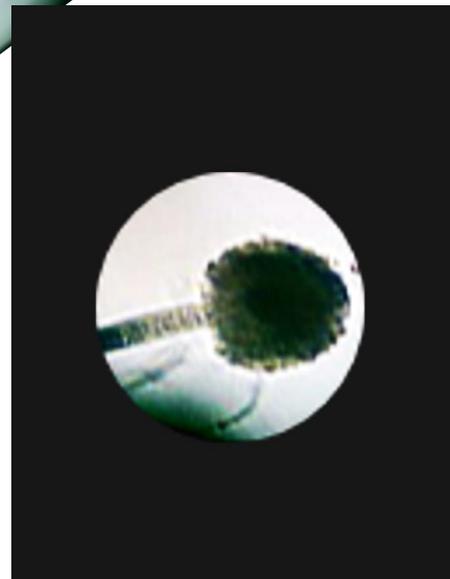
# Resultados

• I parte

• **CARACTERIZACION FENOTIPICA.**

Laboratorios:

1. LAB DEPTO MICROBIOLOGIA UES
2. CENSALUD



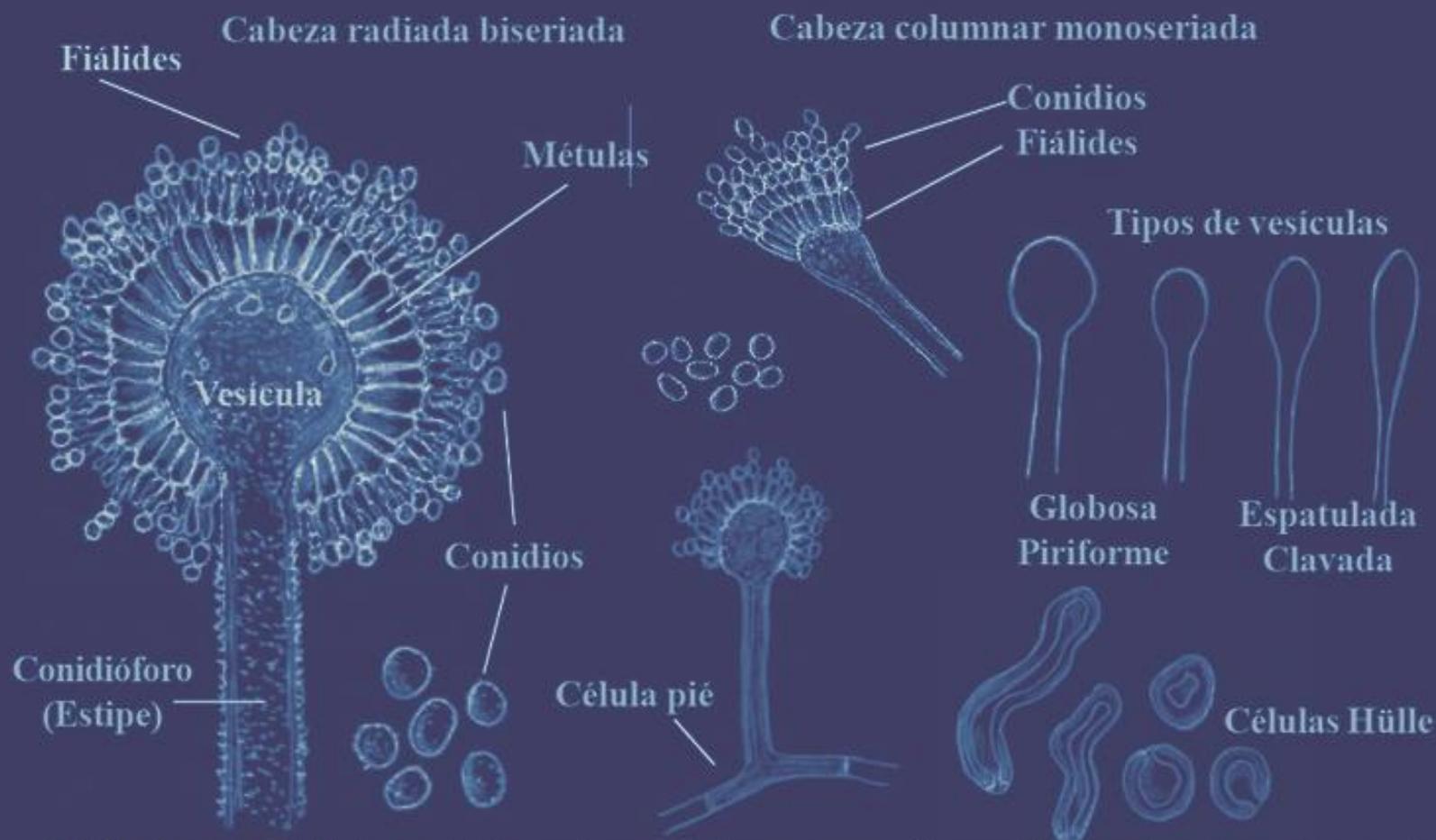
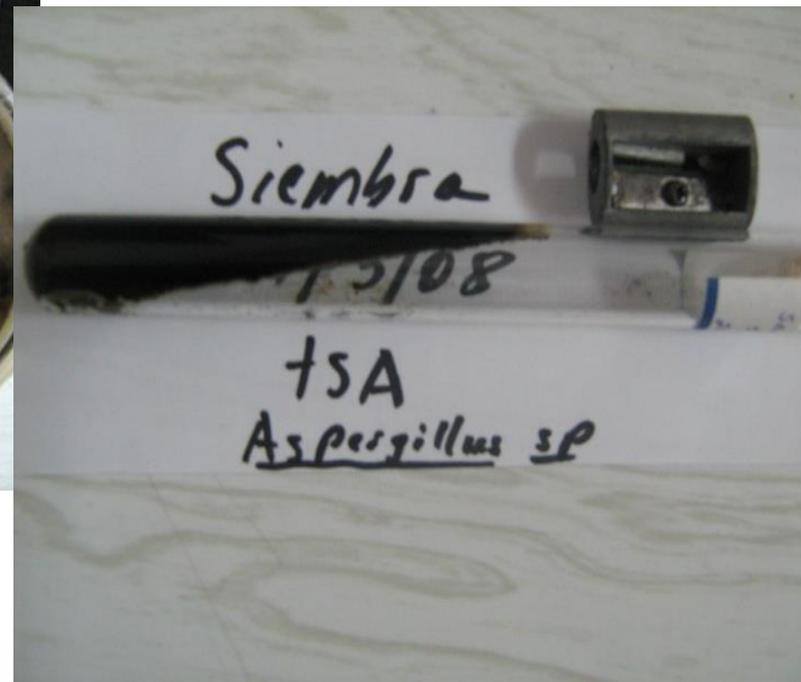


Figura 2. Estructuras morfológicas en el género *Aspergillus* (como anamorfo) a considerar en las observaciones: cabezas radiadas o columnares, célula pié, tipos de vesículas, fiálides métulas, conidios, y células de Hülle.

# Aspergillus var

- **Características Macroscópicas:** colonia en Agar saboraud es de color blanco luego cambia a verde de aspecto radiado y después se hace negro, el reverso es pigmentado de color negro, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvoriento de color negro.

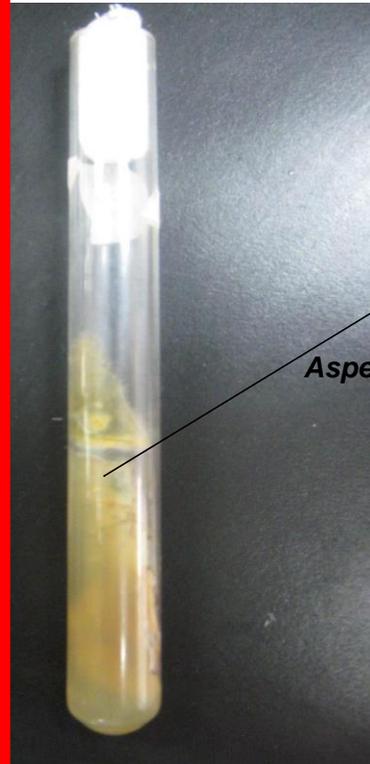
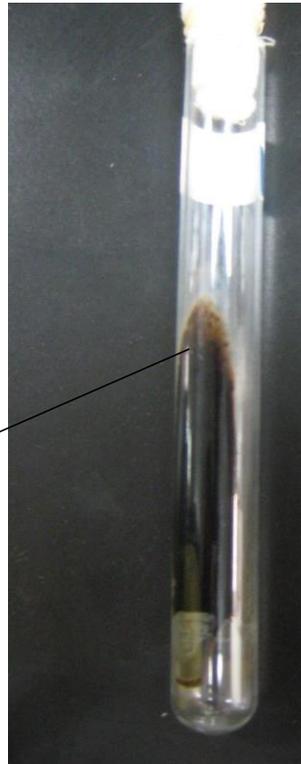


# Aspergillus var

# Aspergillus niger



*Aspergillus uessalvadorensis*



*Aspergillus niger*

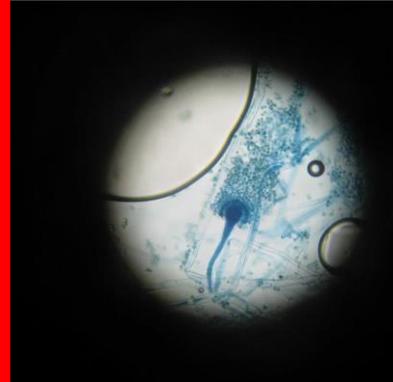
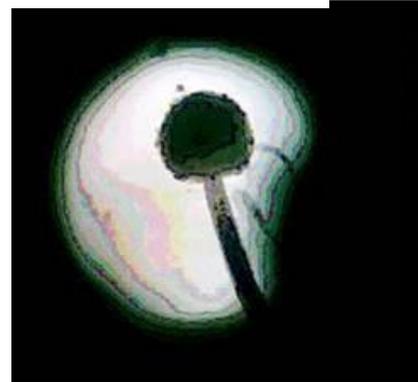
Five-day-old, black colony of *Aspergillus niger* on Sabouraud's dextrose agar. The colony showing typical "salt and pepper appearance", which results from darkly pigmented conidia borne in large numbers on conidiophores



The reverse of the colony appears yellowish to pale

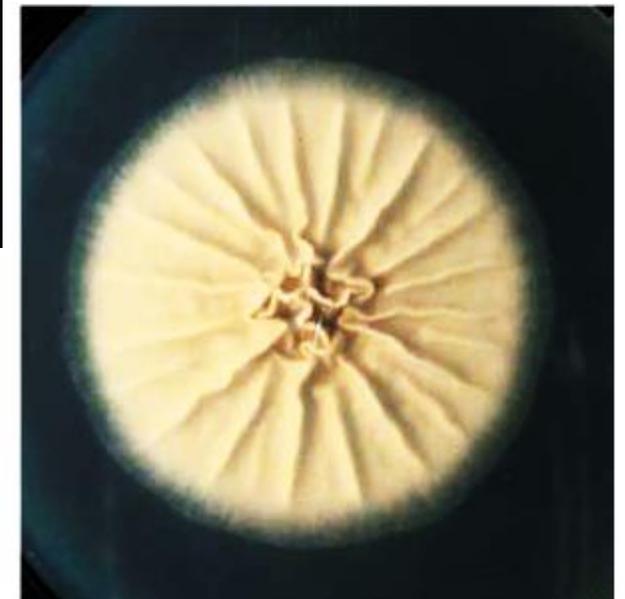


*Aspergillus uessalvadorensis*

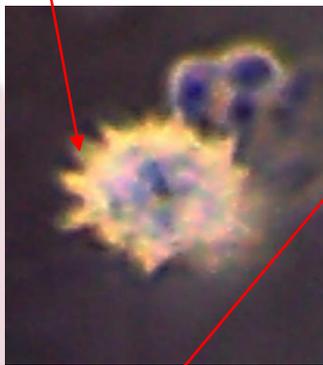
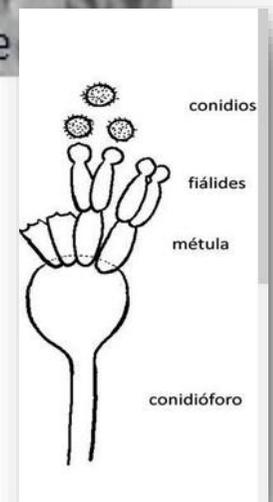
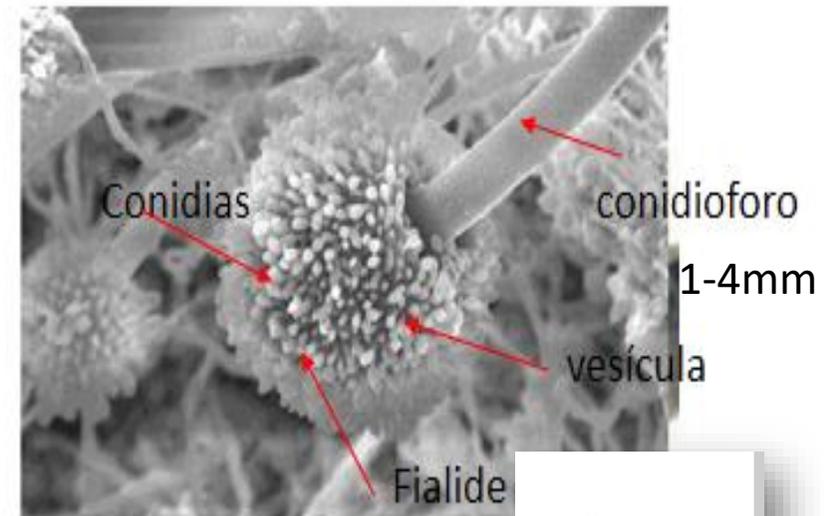
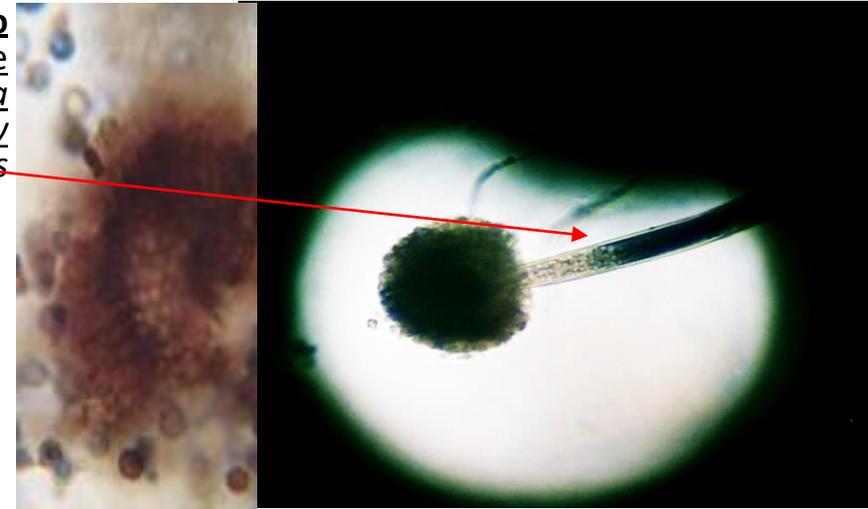


*Aspergillus niger*

( Color, forma, conidioforo (septos, liso o rugoso)



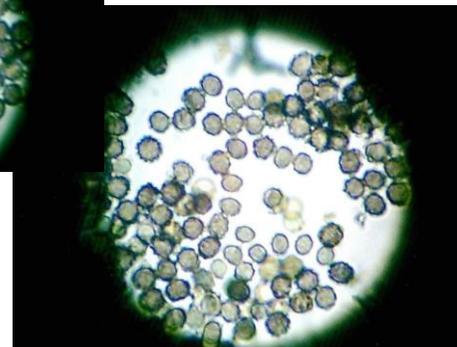
- **Características Microscópicas:** La **cabeza** de la conidia es negra, **conidioforo** liso/rugoso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas moderadas de **1 a 3 micras**, coloreadas de color café a negro. cabezas conidiales lisas de una pared redonda, dispuesta en forma radial, estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro, lisa sin septos, hay conidias abundantes desprendiéndose de la cabeza, tiene una hilera de fialides.
- El **esporangio** es una estructura globosa peridial simple, del esterigma es de color negro.
- **\*Las conidias maduras** de color café son esféricas con proyecciones en forma de picos triangulares en toda la periferia, en forma de mazo o de raqueta sin septos abundantes y las centrales son escasas formando **espículas en número mayor de 10**, la conidia tiene un aspecto esférico estrellado con espículas, que de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias, toda la estructura forma una coraza sólida.
- **\*Las conidias/esporas inmaduras** asexuales son irregulares de pared delgada incolora de tamaño grande, que luego se llenan formando masas internas de color café.
- El **conidioforo** es largo liso-rugoso con esporas abundantes. Crece a temperatura ambiente 20-25 - 37 o C



5 minutos



15 minutos



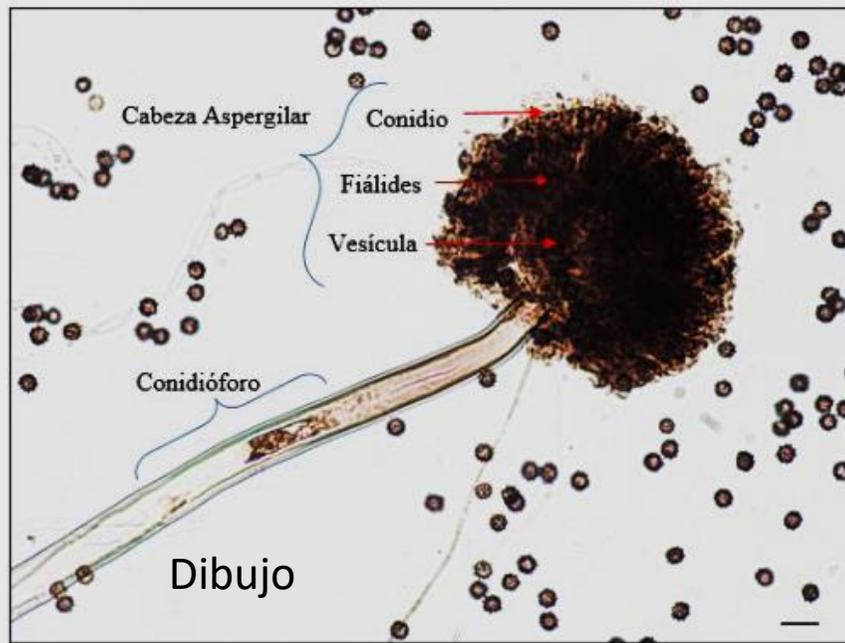
30 minutos

Crecimiento



100 x / 40 x  
1-3 micras  
espículas >10

# Comparación sp



100 x

Ilustración 2. *Aspergillus Niger*. Información tomada de (Québec, 2019)

*A. niger*



Biseriadas con métula y fiálides de color marrón oscuro que cubren toda la vesícula dando la forma radiada típica

Figura 3. Cabezuelas de *Aspergillus niger*.



Fotografía . *Aspergillus niger var*

Foto con tinción: lactofenol azul algodón

*A. niger* : se tiñe

*A. var* : no se tiñe

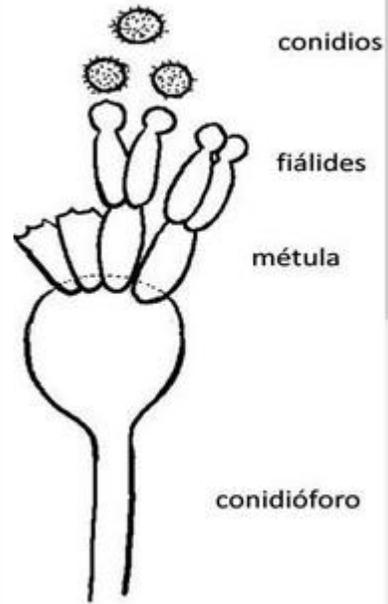
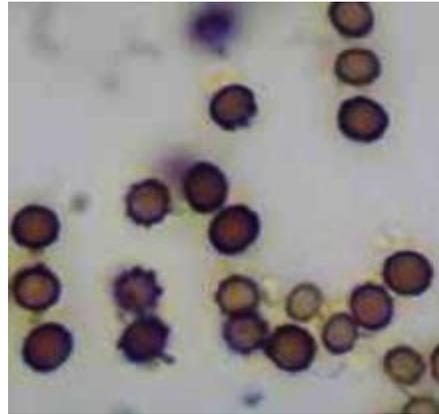
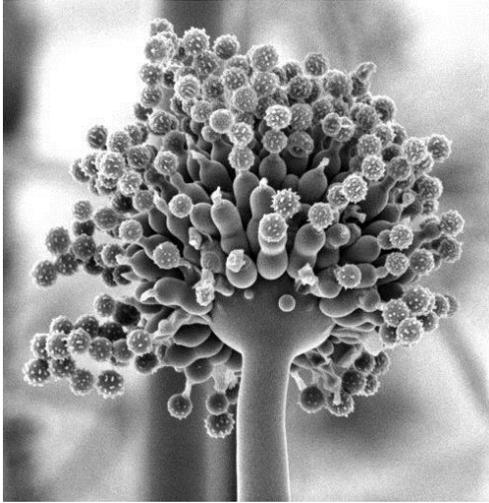
Uniseriadas sin métula y con fiálides de color marrón oscuro que cubren toda la vesícula **no dando la forma radiada típica**



# *Aspergillus niger*

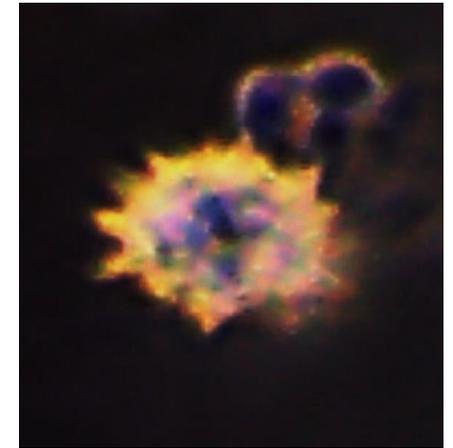
# *Aspergillus var uessalvadorensis*

Microfotografías electrónicas de barrido.

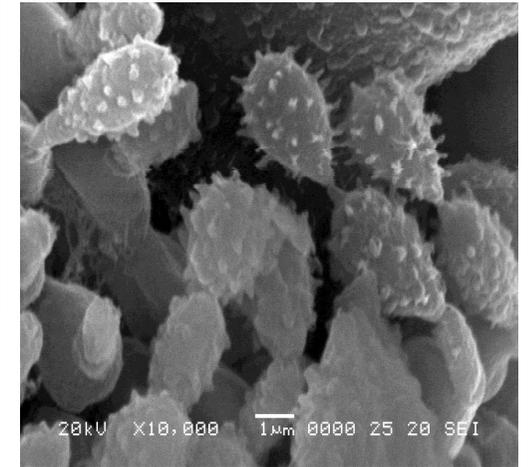


*Aspergillus niger*

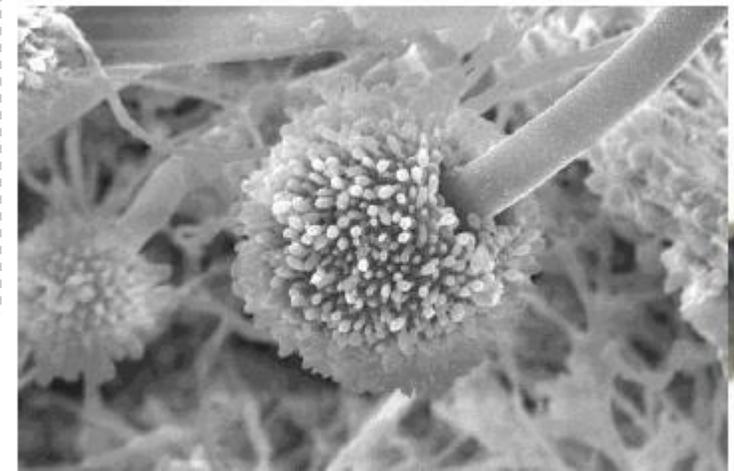
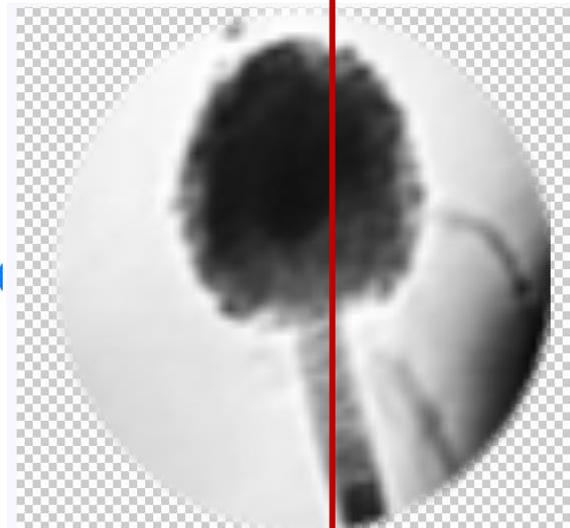
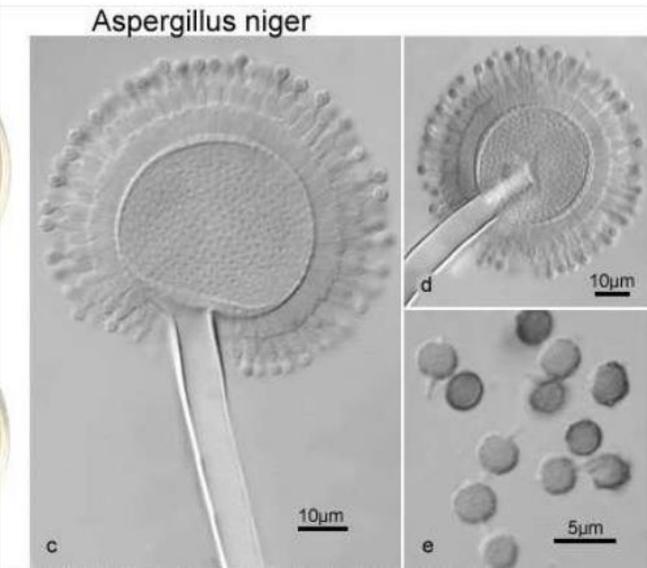
100 X



100 X

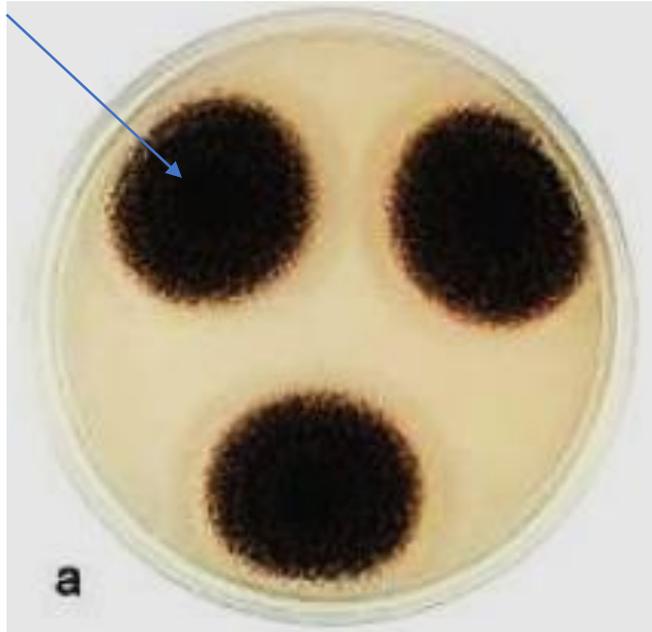


*Aspergillus var uessalvadorensis*





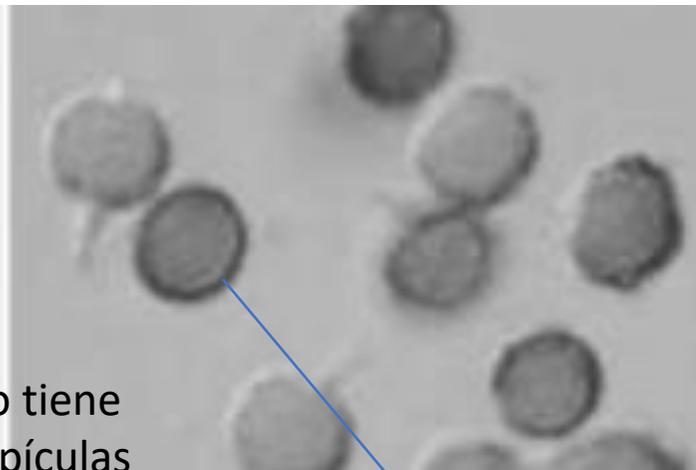
**Aspergillus niger**  
esclerotes



**Aspergillus niger var**



**Aspergillus niger** en cultivo

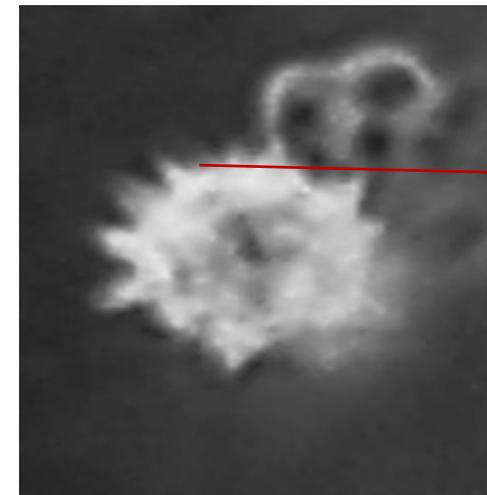


No tiene  
espículas

100 x

Pared gruesa

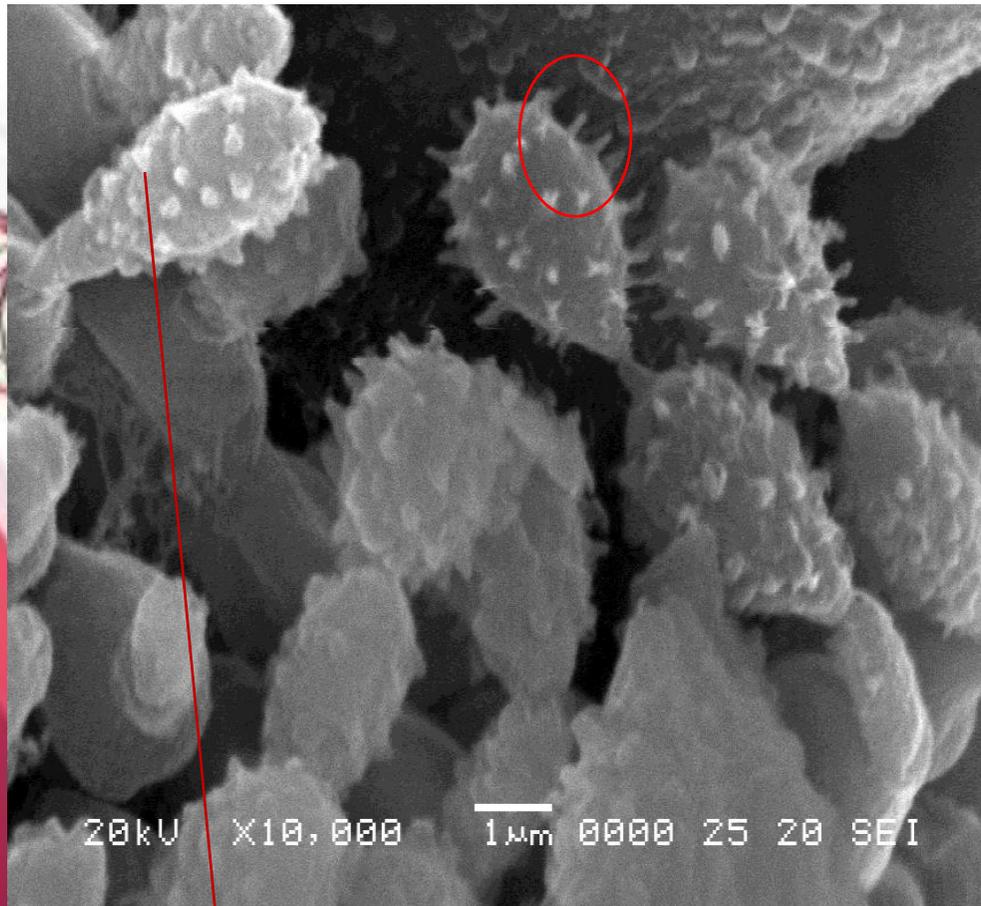
**Aspergillus niger var** en cultivo



Espículas

100 x

***Aspergillus var uessalvadorensis***



**Conidias *Aspergillus var* /1-3 micras**  
**Microscopia electrónica de barrido**

Sobreviven a altas temperaturas hasta o mas **57 °C** . Las **espículas** brindan humedad?

**Planta natural cactus**



**Hojas cactus familia *Cactaceae* / 10-15 cm**  
**Planta fotografía**

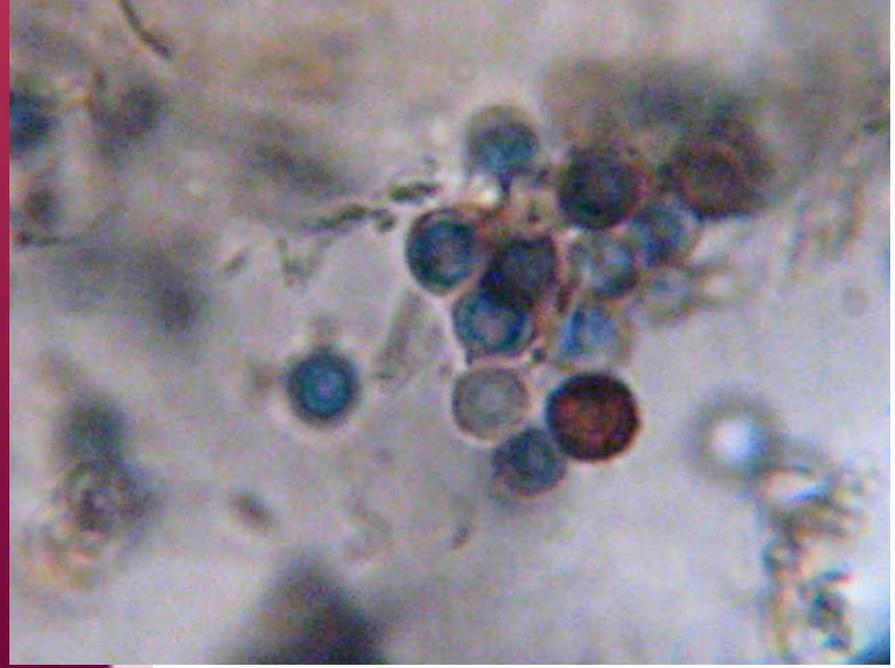
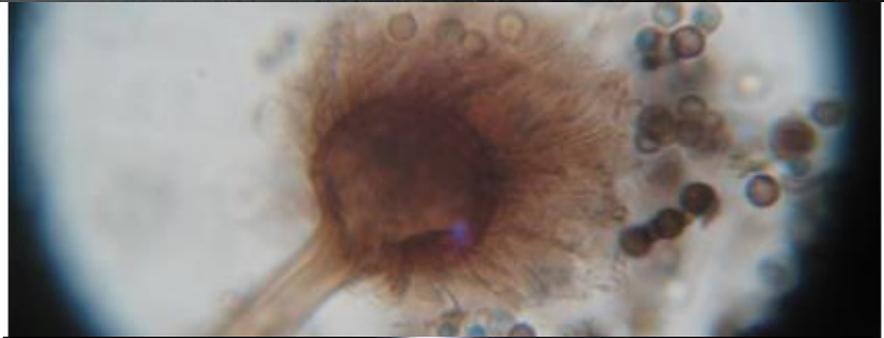
En su lucha contra las altas temperaturas de hasta **60 °C**. Las espinas también brindan humedad y acumular agua.

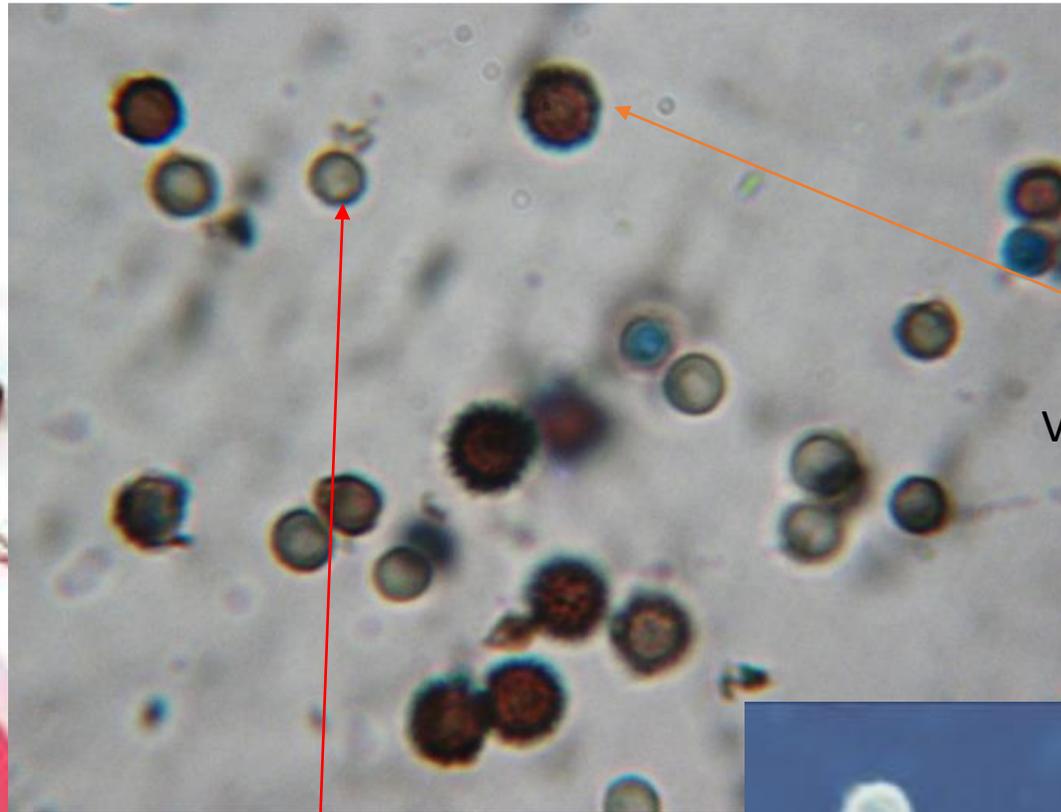


- ✓ Subcultivo
- ✓ Ambas especies y otras
- ✓ mezcla

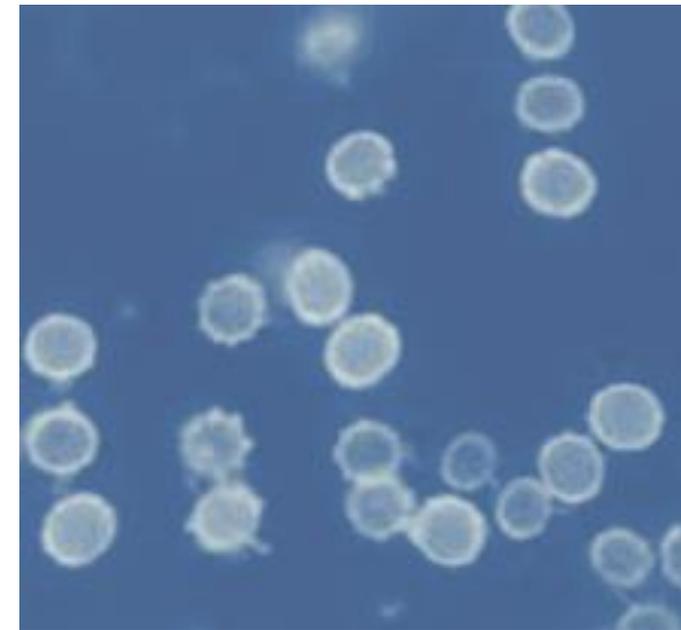


click

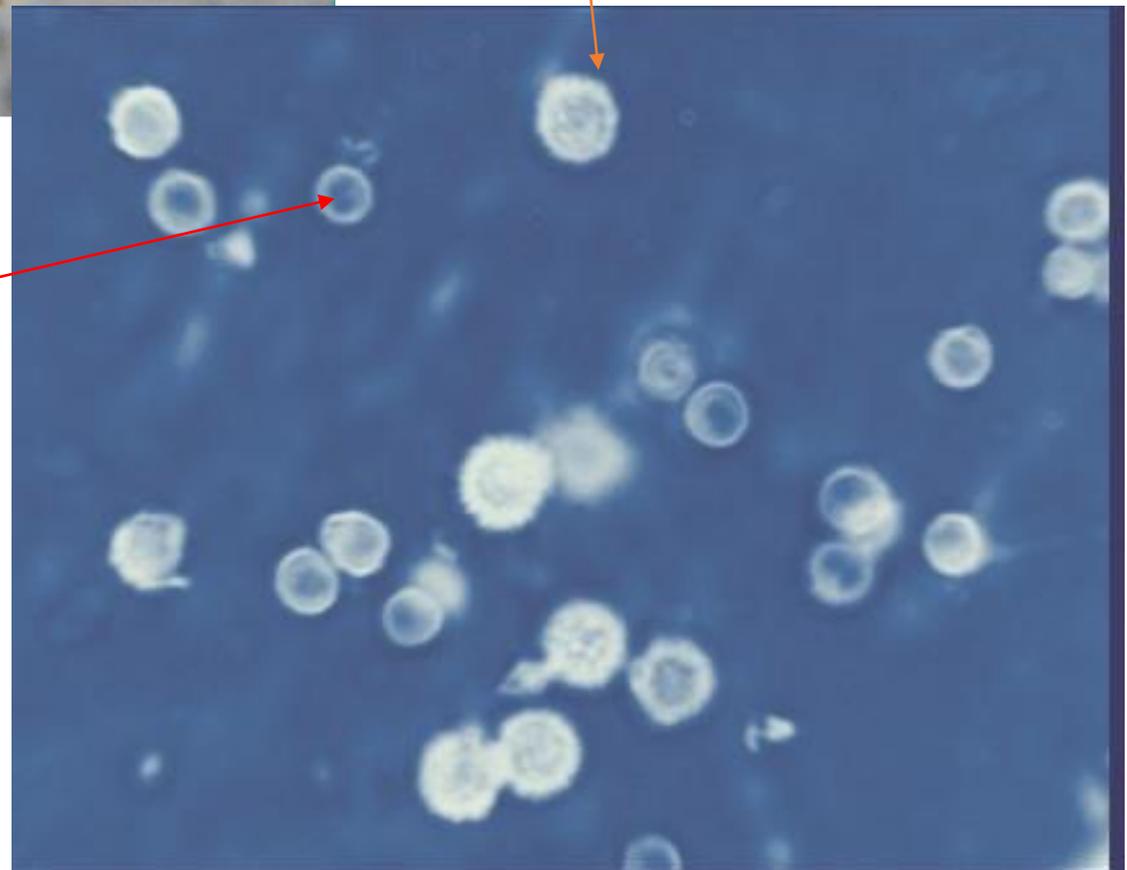




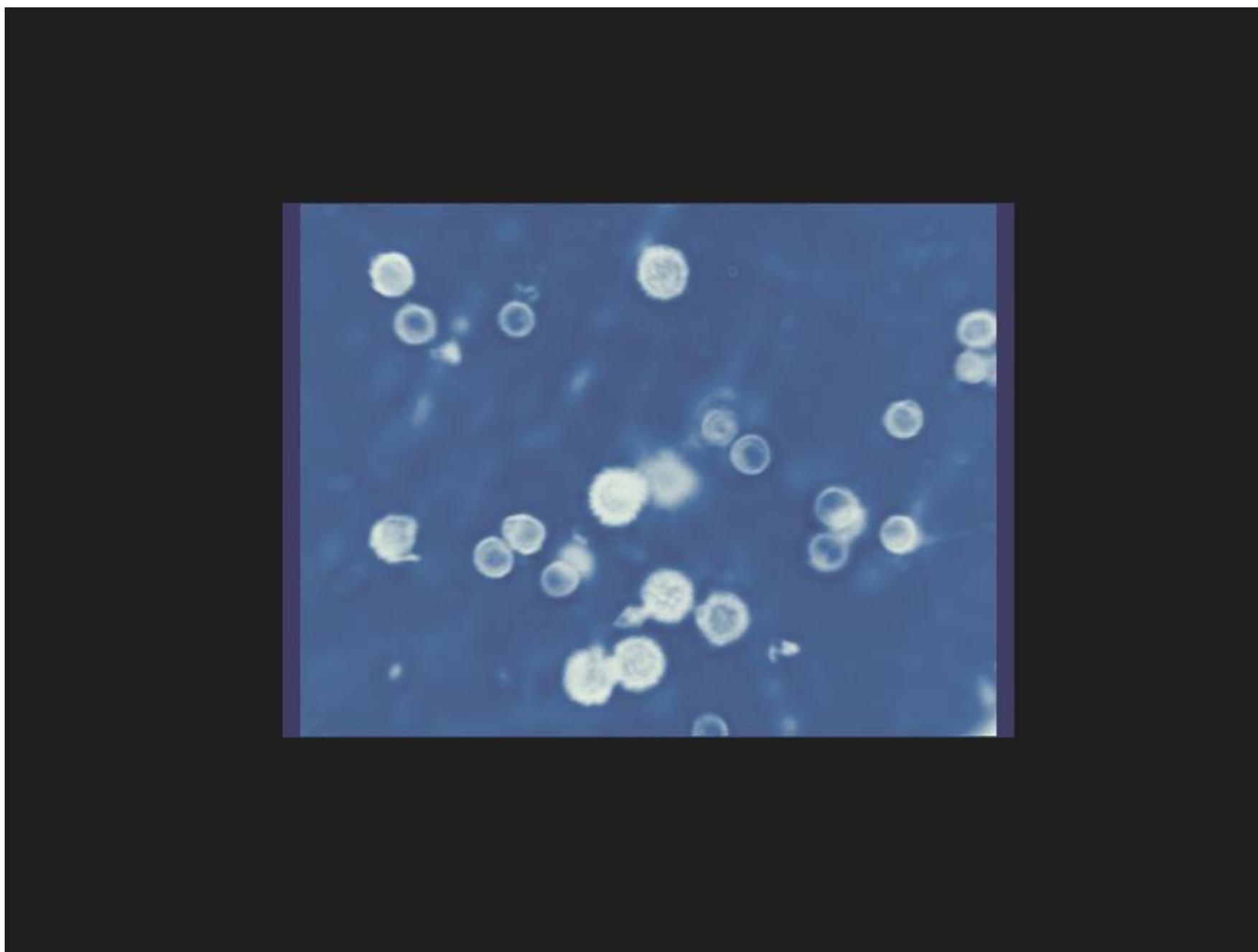
Variedad nueva



*A. niger*

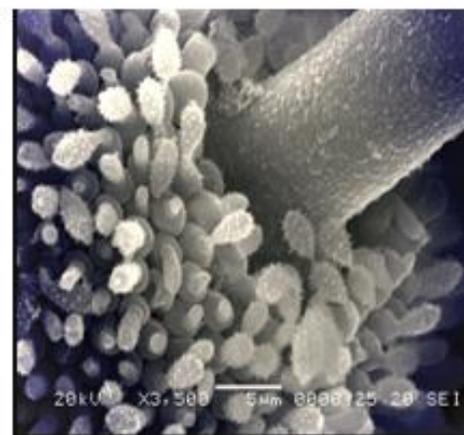
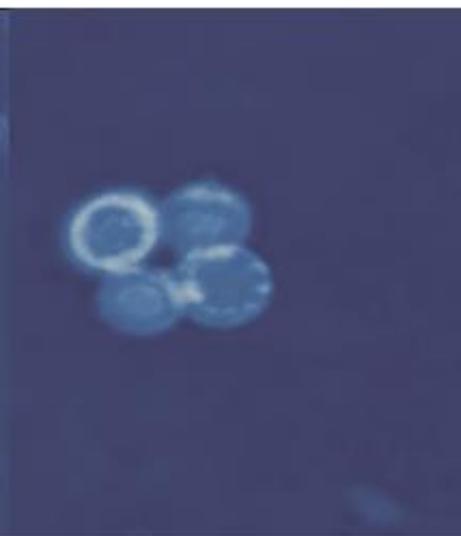
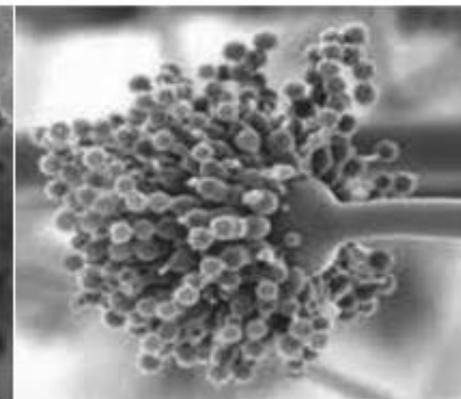
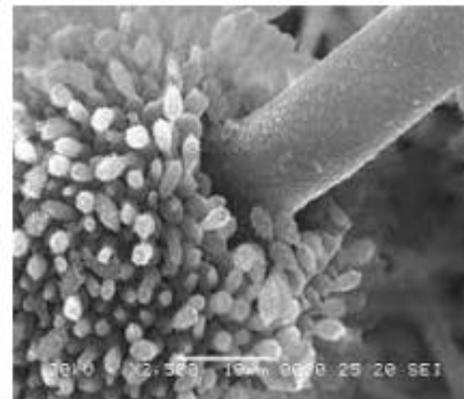


Efecto Rayos X

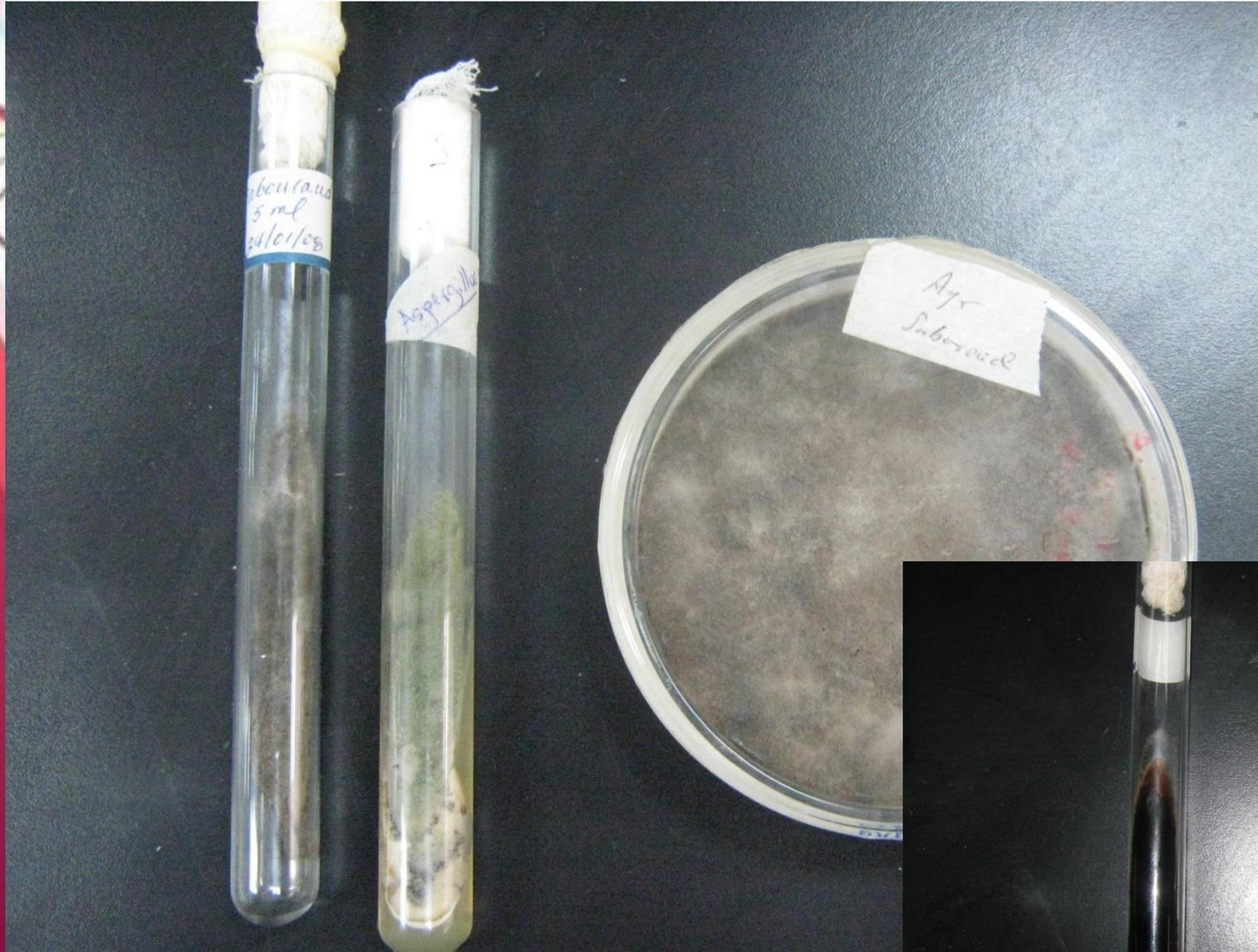




Conidias por Microfotografías  
electrónicas y a 100x





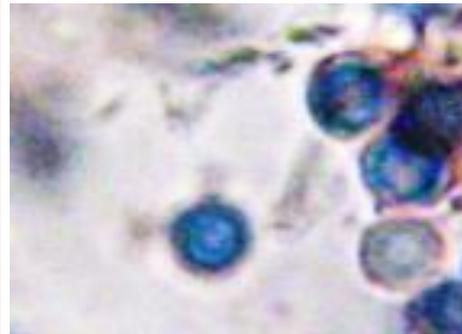
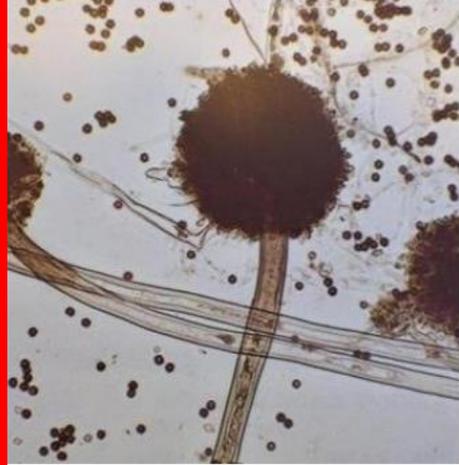




| CULTIVO | HONGO 100 X | CONIDIA 100x | ESPECIE |
|---------|-------------|--------------|---------|
|---------|-------------|--------------|---------|

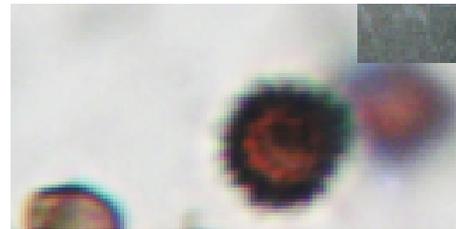


Aspergillus niger on PDA culture and slide.



100 X

*Aspergillus niger*

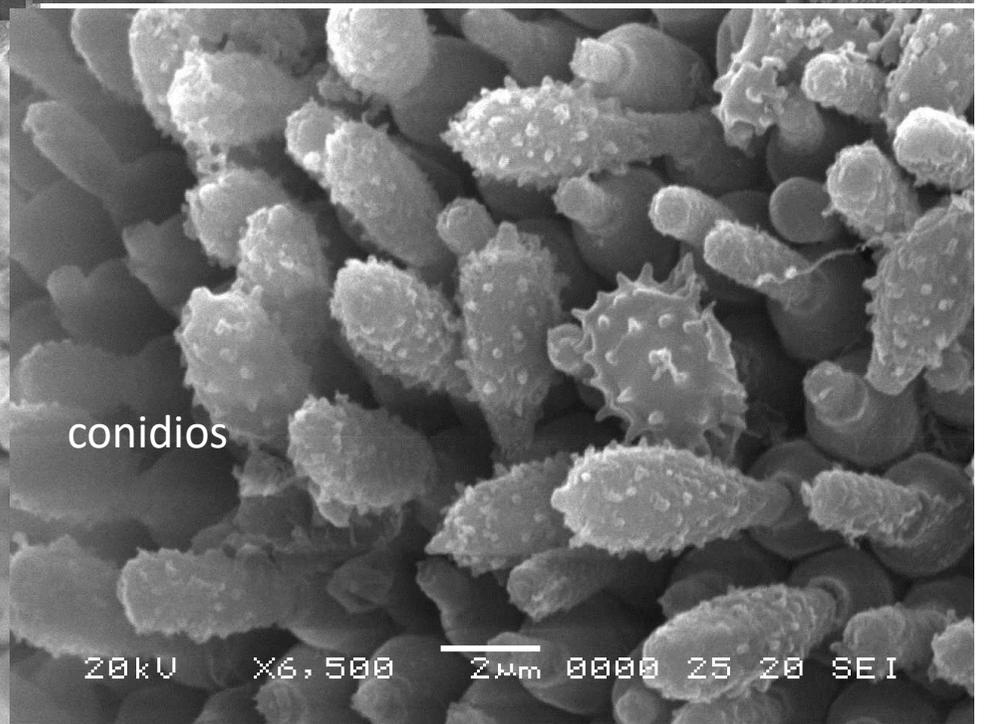
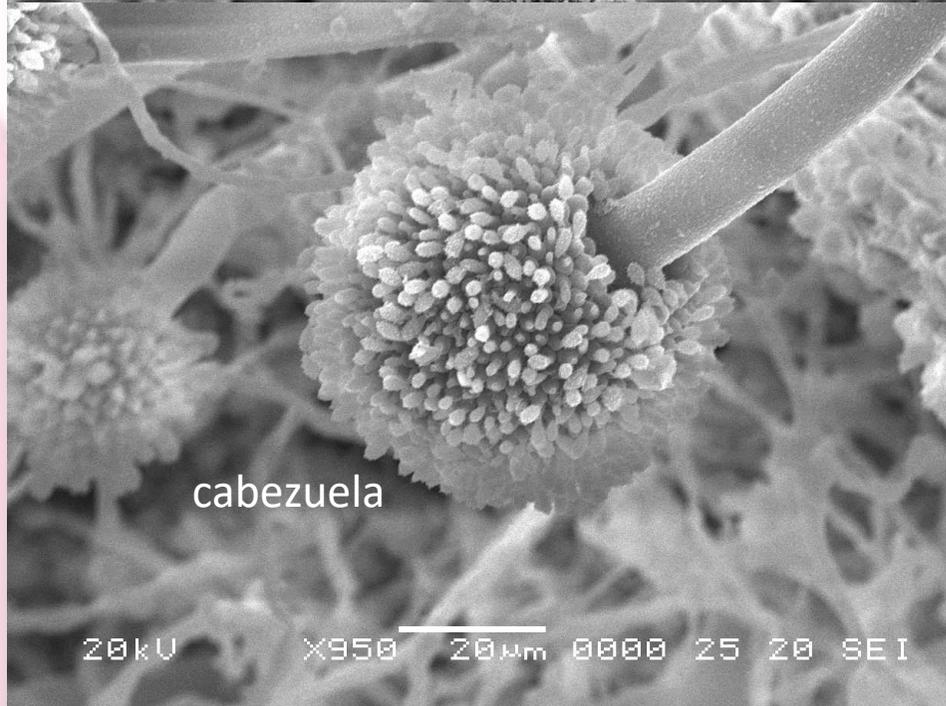
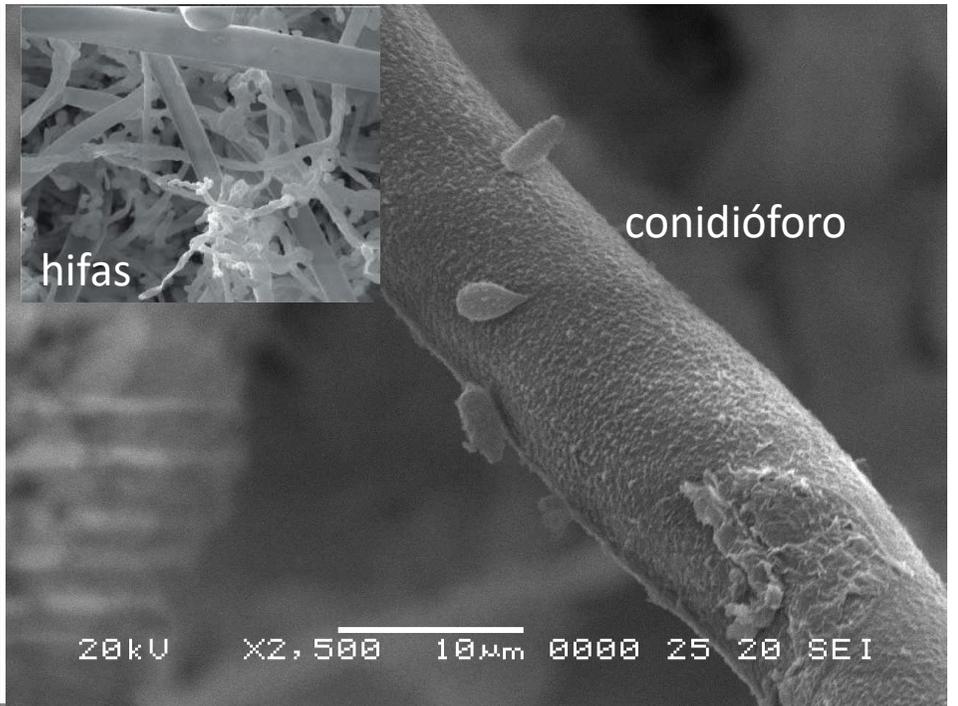
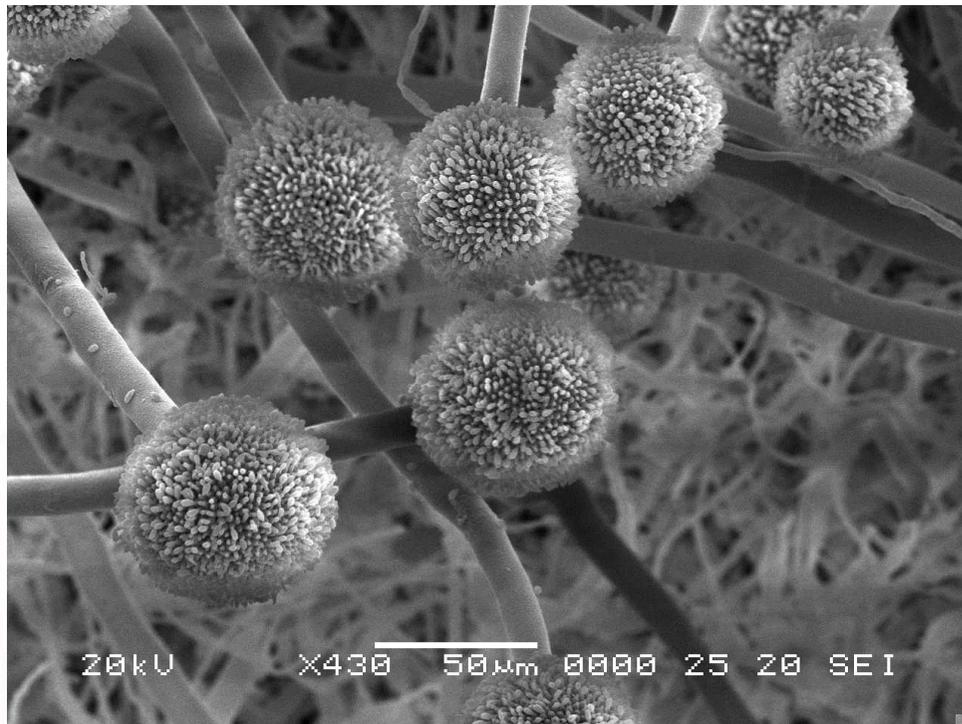


100 X

*Aspergillus niger var*

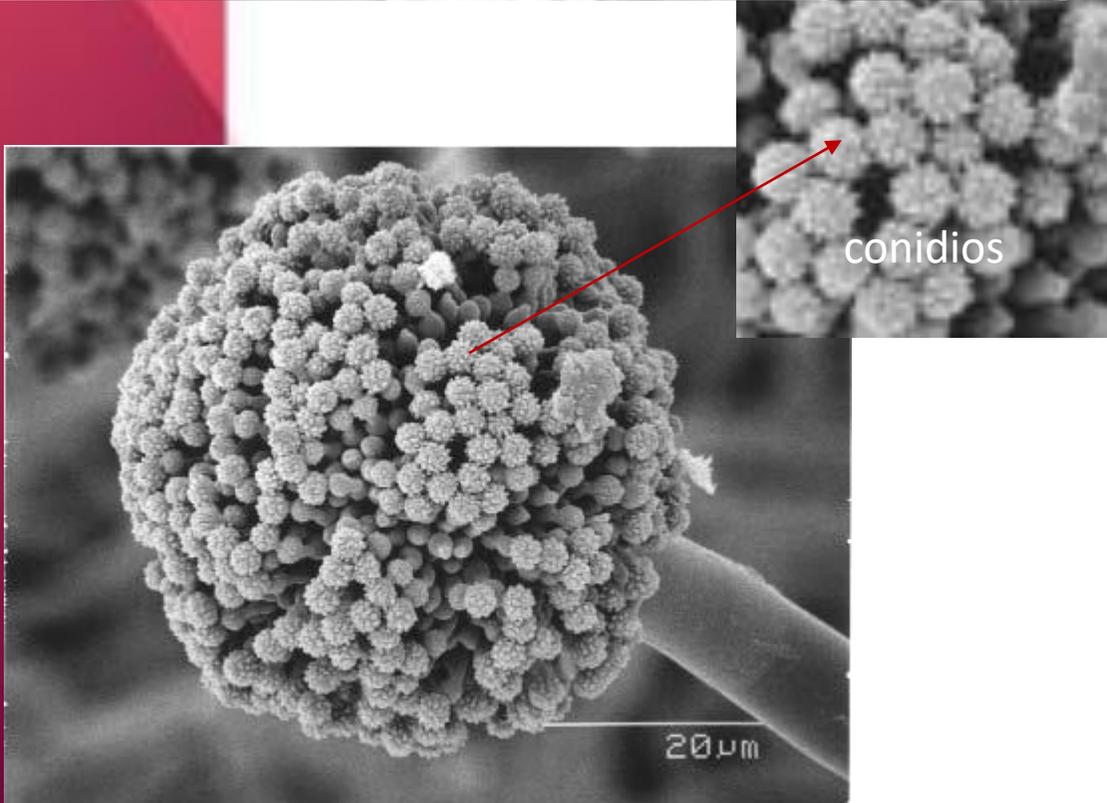
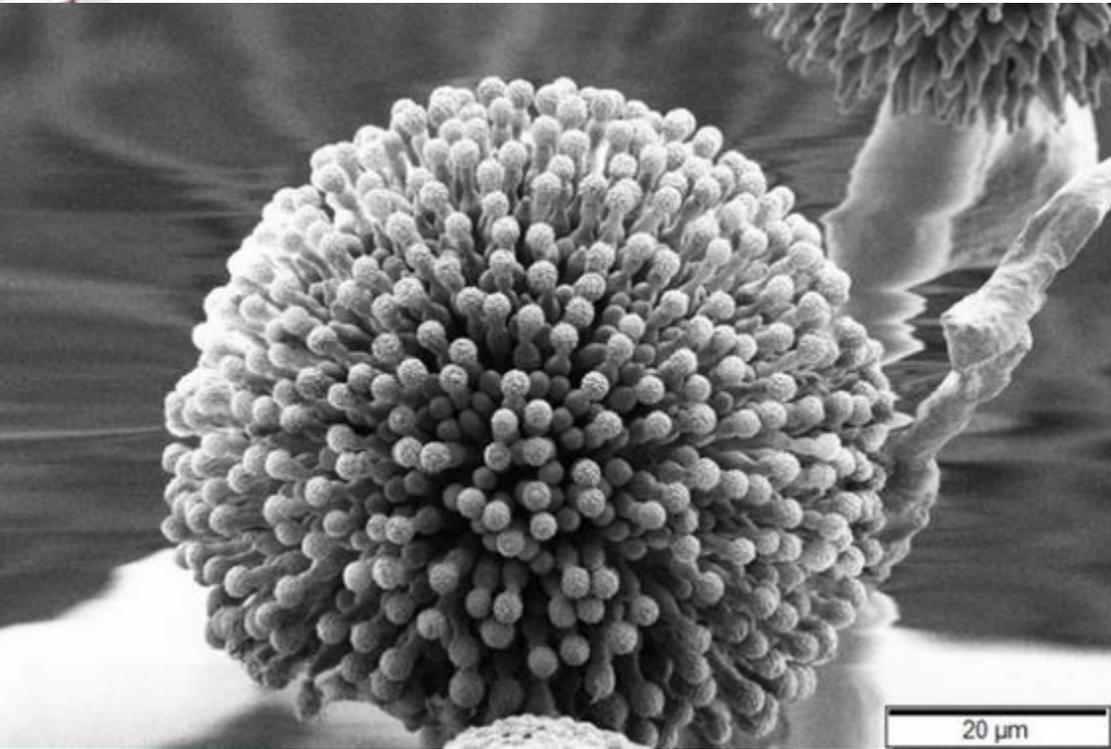


NO SE TIÑEN CON LACTOFENOL  
AZUL ALGODON la nueva variante

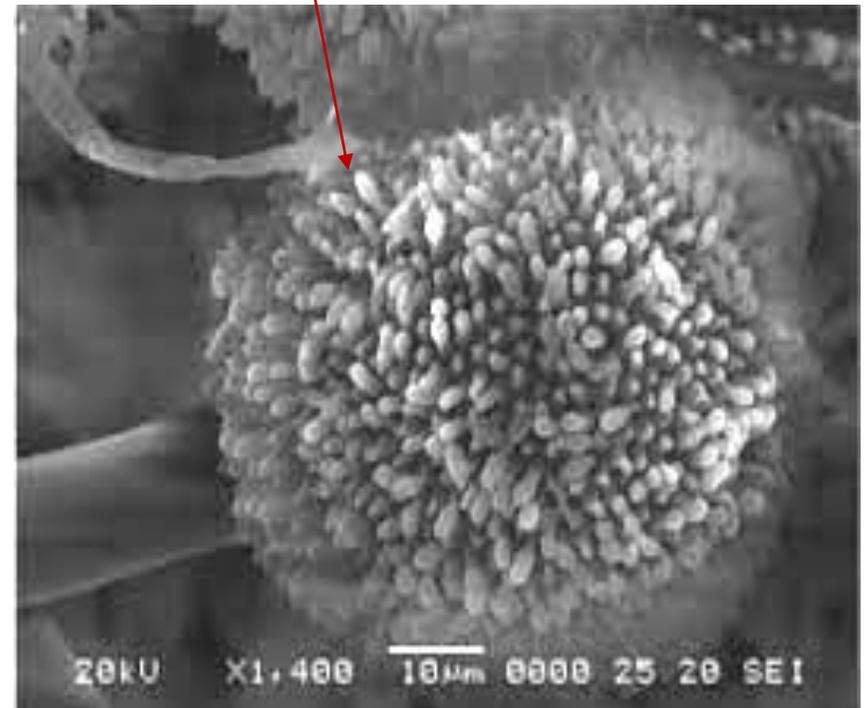
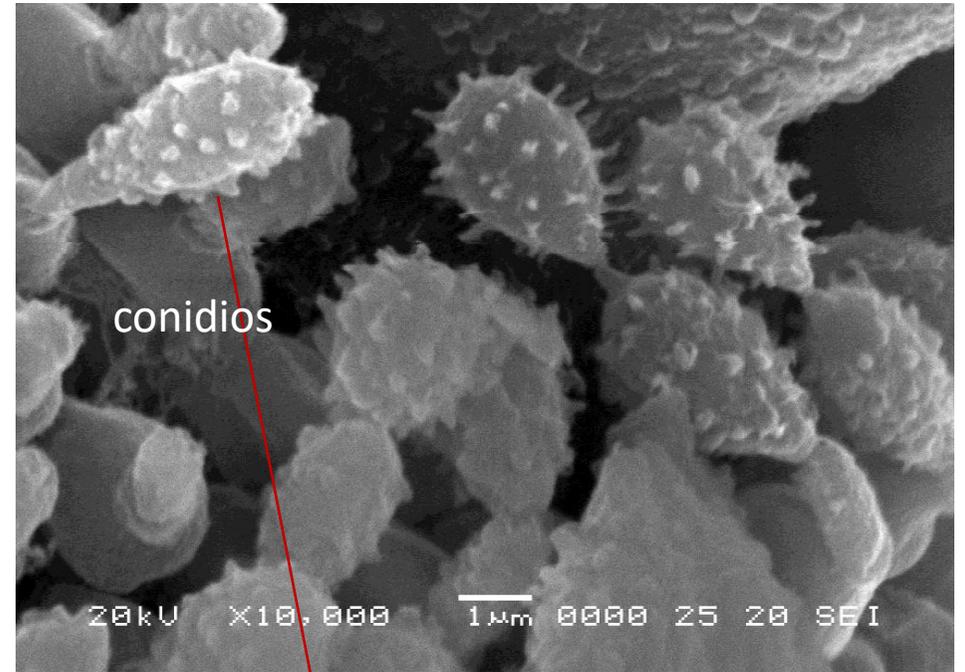


# conidias

*Aspergillus niger*

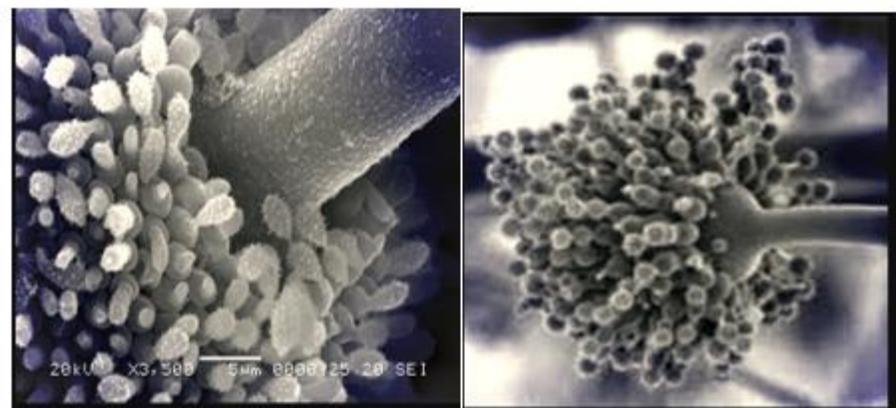
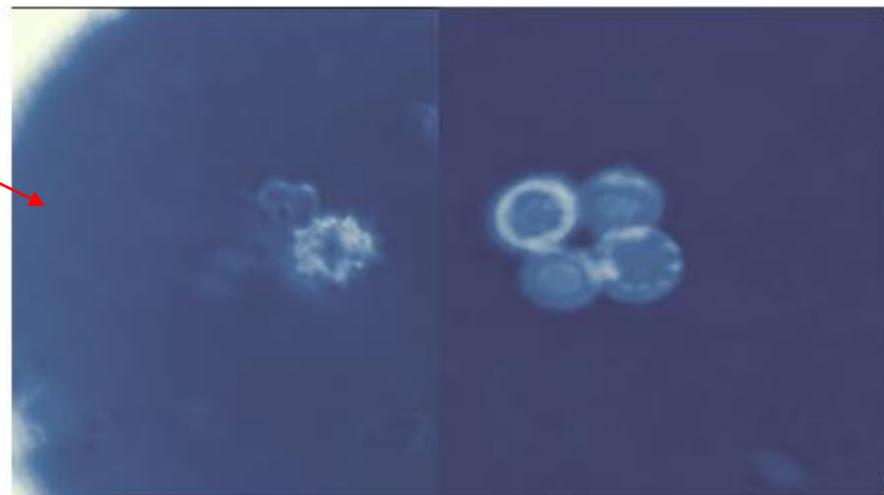
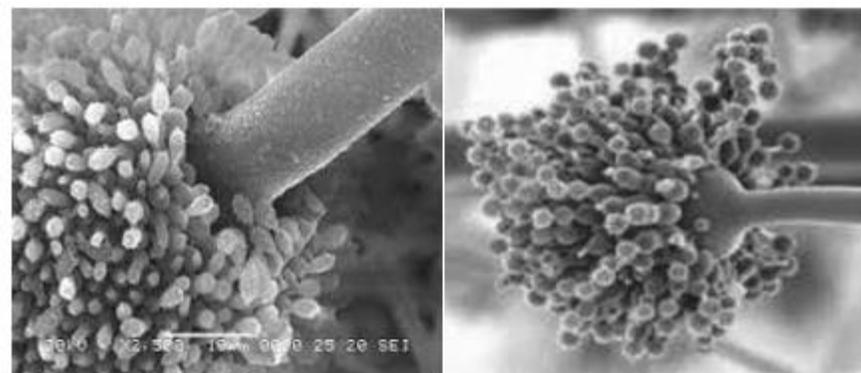


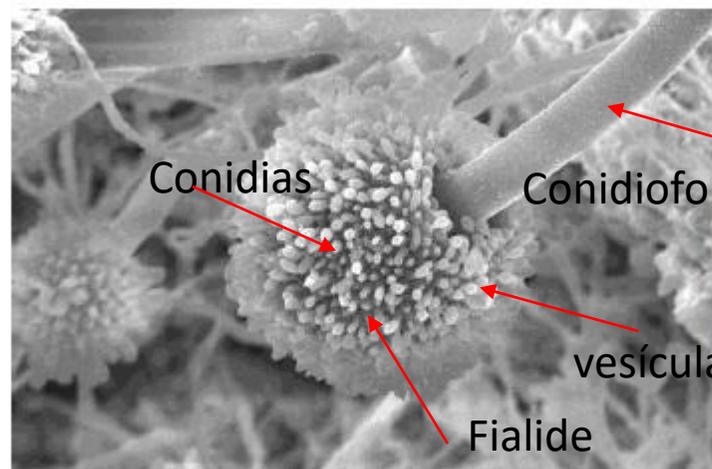
*Aspergillus niger* var *uessalvadorensis*





Conidias microfotografías electrónicas y  
100x



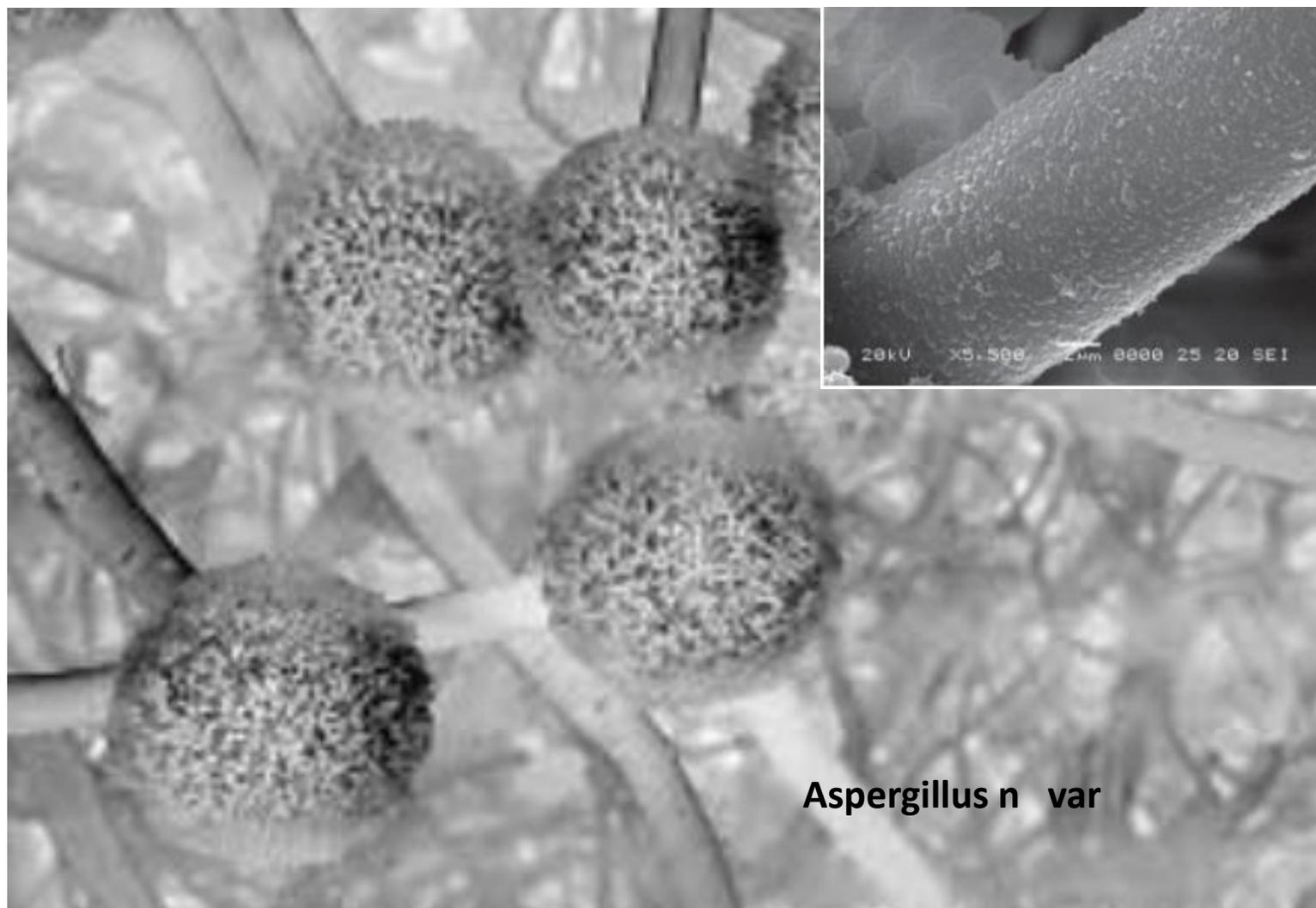


Conidias

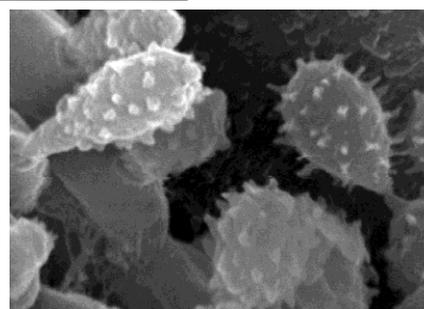
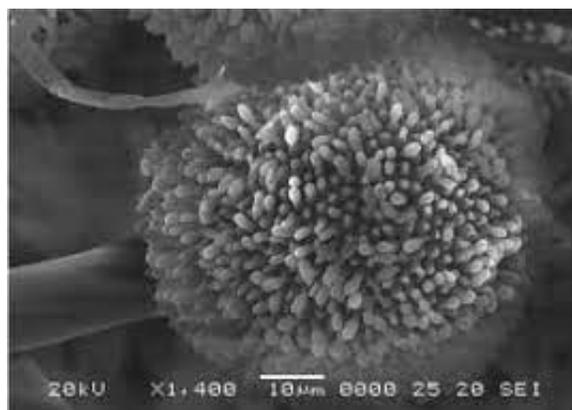
Conidioforo rugoso

vesícula

Fialide

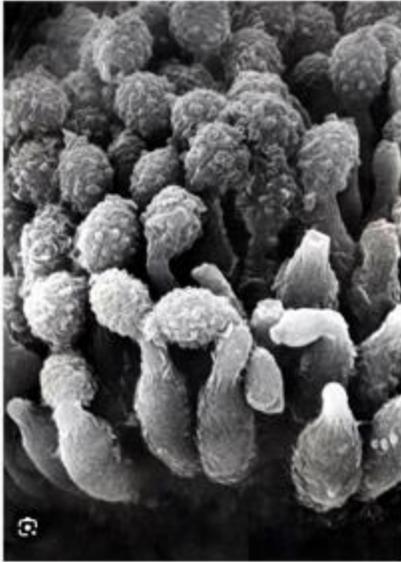


Aspergillus n var



*Aspergillus spp*





Electron Microscopy: Aspergillus fumigatus - Aspergillus and...

Visitar >



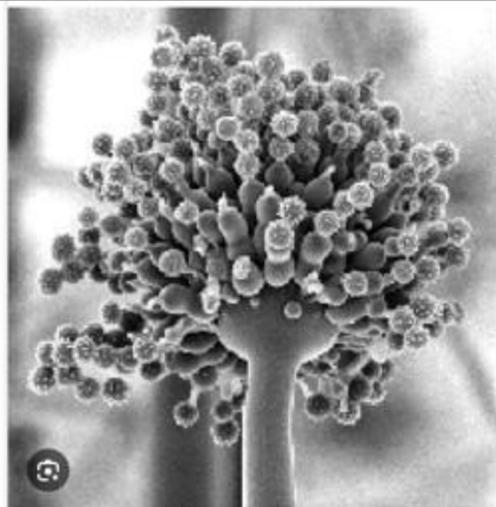
Electron Microscopy: Aspergillus fumigatus - Aspergillus and...

Visitar >



Mould Aspergillus Versicolor  
Photograph by Dennis Kunkel...

Visitar >



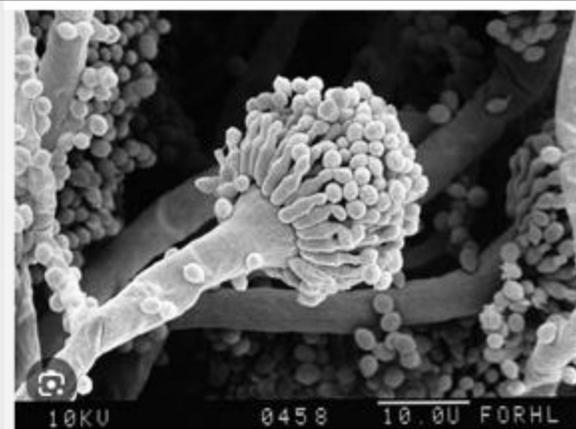
View of fungi Aspergillus flavus under electronic microscopy [...]

Visitar >



Green mould conidiophore (Aspergillus flavus), SEM - Stock...

Visitar >



Aspergillus fumigatus, conidia, close-up SEM | Europeana

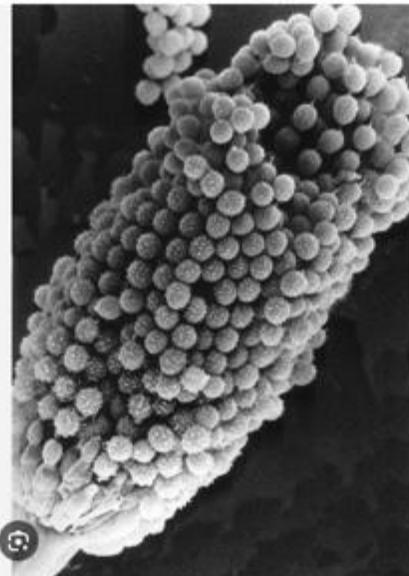
Visitar >

Las imágenes pueden estar protegidas por derechos de autor. Más...



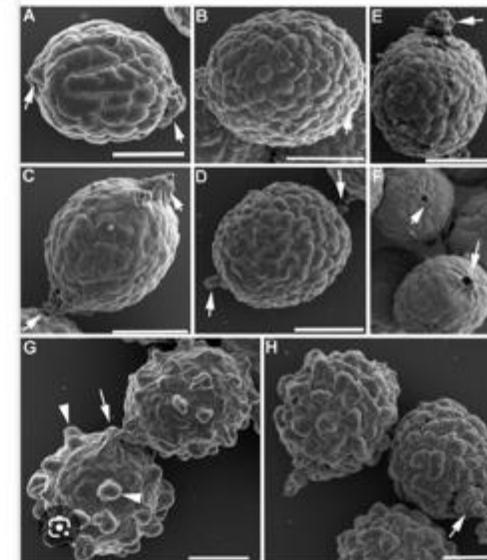
Aspergillus Fungus, Sem by Steve Gschmeissner

[Visitor >](#)



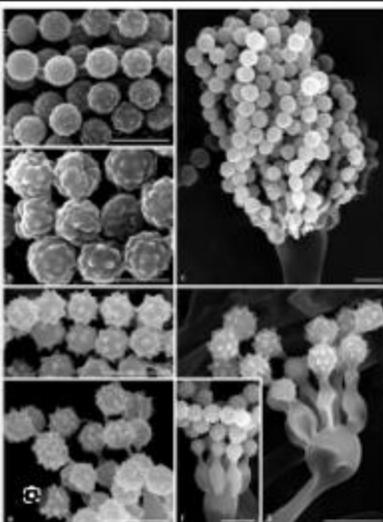
Sequencing the Aspergillus fumigatus genome - The Lancet...

[Visitor >](#)



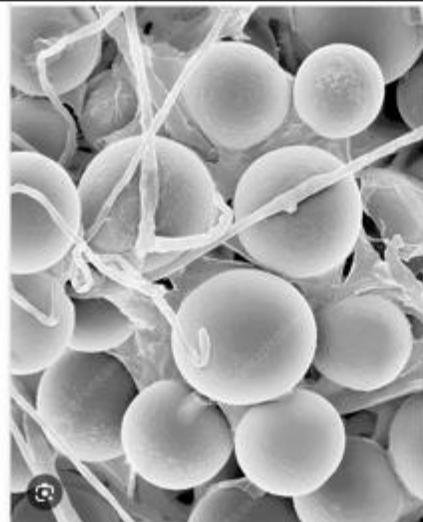
SEM of conidia. (A) Aspergillus felis ; (B, E, F) A. parafelis ; (C) A....

[Visitor >](#)



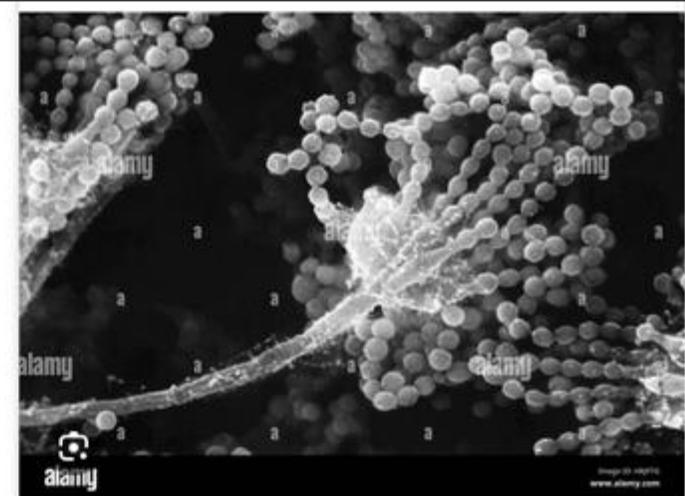
Scanning electron microscopy images of Aspergillus tasmanicus...

[Visitor >](#)



Aspergillus nidulans hyphae and sexual spores, SEM - Stock Imag...

[Visitor >](#)

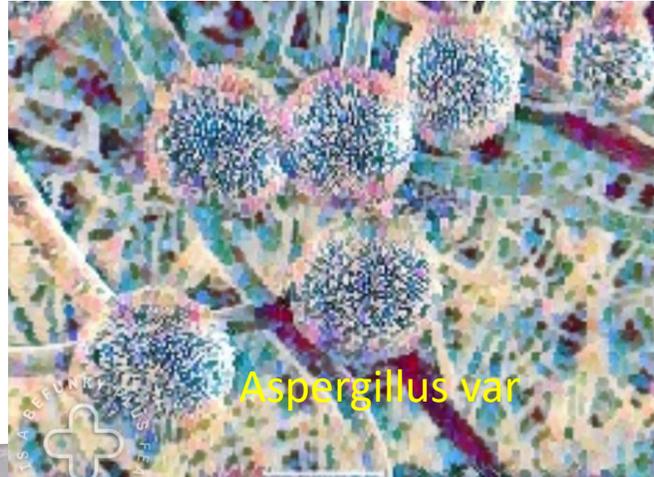


Aspergillus fungus sem hi-res stock photography and images - ...

[Visitor >](#)



# *Aspergillus spp*



*Aspergillus var*



Courtesy of Deanna A. Sutton  
Copyright © 2005 doctorfungus.org

*Aspergillus terreus*



*Aspergillus fumigatus*



*Aspergillus flavus*



*Aspergillus glaucus*

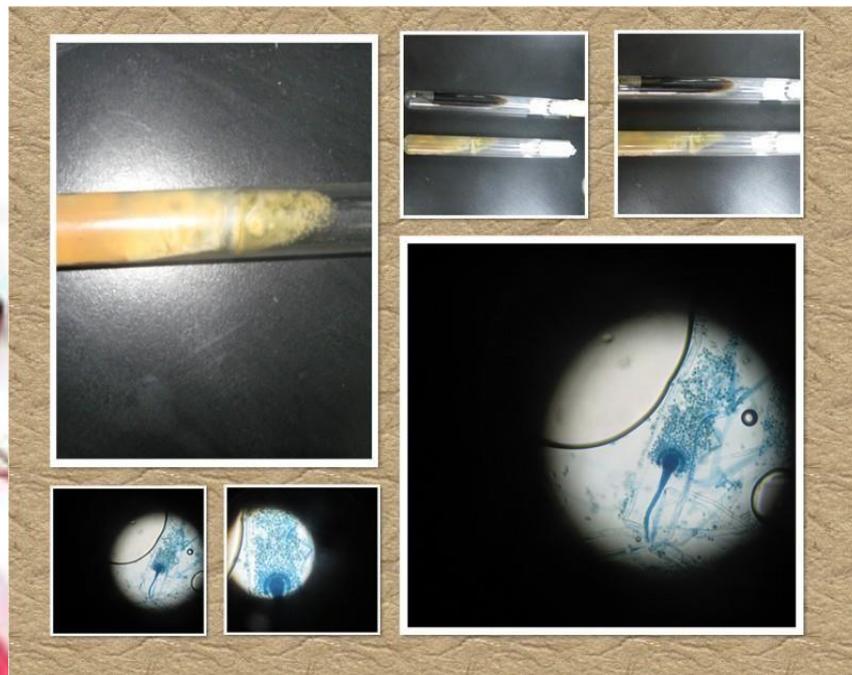
ton  
org

Courtesy of Deanna A. Sutton  
Copyright © 2005 doctorfungus.org



Courtesy of Deanna A. Sutton  
Copyright © 2005 doctorfungus.org

*Aspergillus nidulans*



### En Resumen

| Característica  | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus uessalvadorensis</i> |
|---|--------------------------|-------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• placa reverso</li><li>• Vesícula color</li><li>• Conidioforo</li><li>• septos</li><li>• Forma</li></ul> |                          |                                     |







---

## II parte

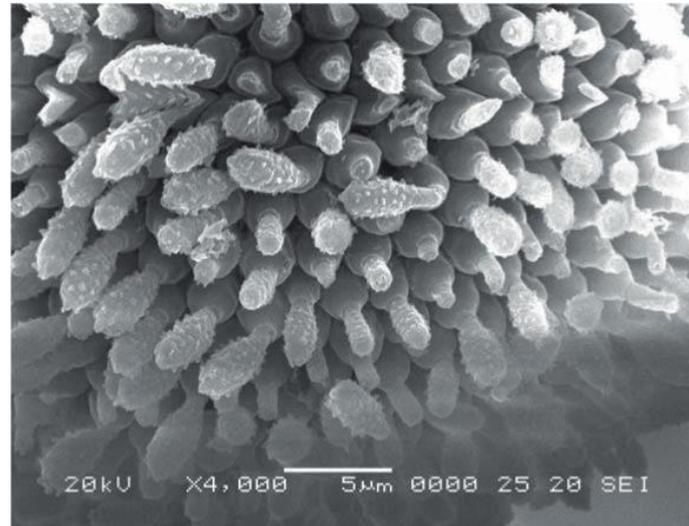
- **CARACTERIZACION GENOTIPICA.**
  - CARACTERIZACION GENOTIPICA

1. **Microfotografías electrónicas** en CENSALUD a solicitud 2008
2. **PCR Y PARTE SECUENCIACION** EN INSTITUTO BIOLOGIA MOLECULAR DE MEXICO.
3. PENDIENTE: **PRIMERS ESPECIFICO**
4. PENDIENTE: PAGO PENDIENTE POR SERVICIOS PROFESIONALES **MILES \$\$\$\$\$**

la siguiente: «el problema es viral». Esto revela que desconocen que los fenómenos alérgicos y respiratorios tienen otras causales.

**Figura 1-4.** Imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 X). Cortesía de la doctora Vianey de Ábrego (Tomada en CENSALUD, febrero de 2008)

1a microfotografía elect



En la Figura 1-4 se observa la imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 x). Puede notarse, según reporte de CENSALUD, que es un «hongo filamentos, donde sobresalen del micelio las cabezas conidiales, redondeadas. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fialides en forma de botella, en cuyo extremo se fijan las esporas, en este caso solo se aprecia uno no una cadena», el conidioforo no tiene septos y es liso, la vesícula es redonda de donde emergen múltiples de una a dos esporas en forma de mazo o cactus con espículas dispersas, en el cultivo dan un pigmento al reverso del tubo, las otras especies no. Fenotípicamente corresponde a otra especie del género *Aspergillus*.

A partir de estudios genotípicos se identificó su pertenencia al género *Aspergillus*, ya que presenta la siguiente secuenciación de ADN.



```

name:
- 37338396

(only applies to View Sequence)

[FeatureMap] [Argo Applet]

>A. niger Anig_scaffold_1(contig_1.1) [DNA] 1-3970925 +
TTTGAATGATTATAATCGATCCTTTTCGACTTGAGCGAGGCGATGGATTACCGGATTAGT
CAACTCCCGGGCCACACAGTTAACGGGACTCATGTAACCCGGTACGTCAGGTCCTTGA
CTCAGGGACCTAGCAGTGCACACGGACCCCTTTGCACTAGGTGAACTTGATTAAGACT
TTGGTCTCCAAATGATCAGAAAAATCGTGGATAACATTTGGTGGCTCATCGATTTGATG
GTGCTGGGAAAAACGAAGCCTGGTTTAGCTCTGCCAATCTCACAGTTCAGCAGTGGT
CCAACATATAATTTGCTATCAACTATGCCACCTCGAATGGTCATGTTGTTCCCTAGAAG
GACGTTAGGGGAAAGGTTATAGATGGTGAGATGGTGTTCCTCGTTGCACCCCTTGGAA
CTCGCTTCAGCAAGGTATACCCCAATAACTGCCAAGCCACCATCCATGCTGGTGCACCTT
GTCGCTGTGTGATAACAAAGGACTGGTCGGGCTTCAATTCCTCATTGAGACATTCCTCC
CCAACACAGTCTATAGTGGCTGTACGCCGTTTGGTCCCGGGCGAGAAATCGGCCGAC

```



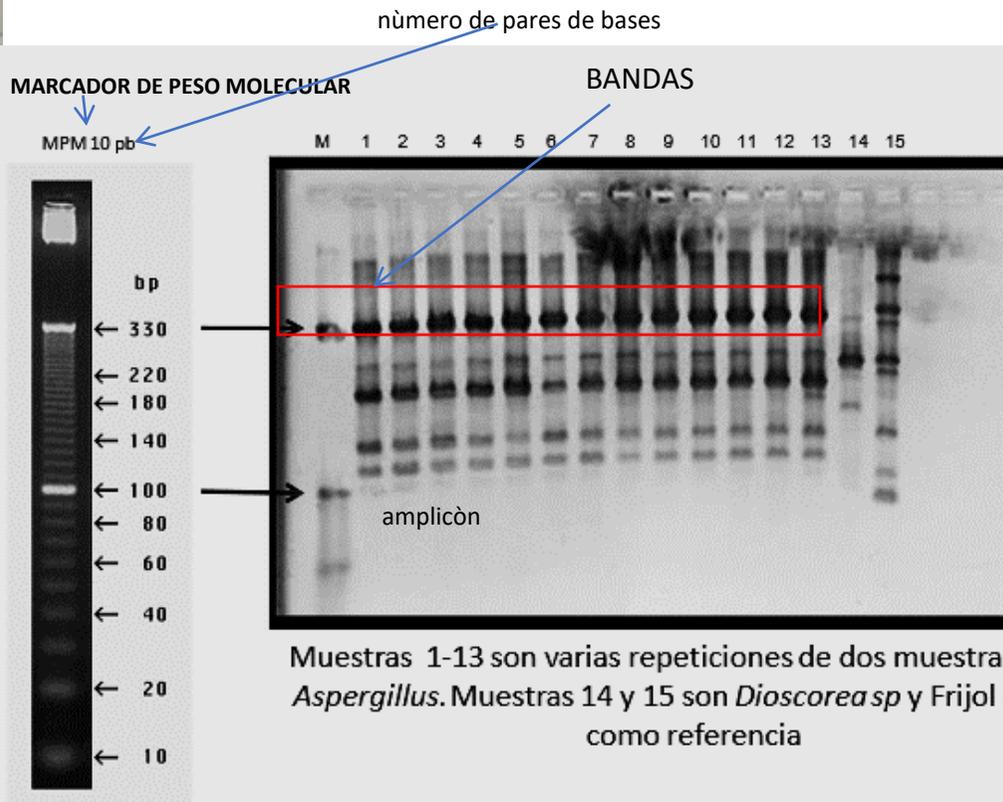
MEXICO: primeros reportes  
 Varias especies  
 -niger  
 -carbonarius  
 - desconocida? (subcultivo)

PCR en tiempo real x detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos.

PENDIENTE:  
 POR ELABORACION PRIMERS  
 específico para la variante Y  
 BIOMARCADOR específico ?  
 EJ

| Secuencia                                |
|--|
| 5'ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG 3'                |
| 5'CCGATCCCTAGTCGGCATAG 3'                |
| LC Red 640-5'TGGCGAACCAGGACTTTTACTTTG 3' |

RESULTADO + Presencia DNA +



PCR

Muestras 1-13 son varias repeticiones de dos muestras de los *Aspergillus*. Muestras 14 y 15 son *Dioscorea sp* y Frijol usadas como referencia

Gel de agarosa. Los **productos de la PCR o amplicones** están representados mediante **bandas de un tamaño específico** y se comparan con un **marcador de peso molecular conocido** para determinar la especificidad de la reacción. PB = número de pares de bases.

Los **primers** deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb.



“Se utilizaron semillas de Nacascal (*Caesalpinia coriaria*) para aislar el hongo reportado como endógeno en las mismas. Se probaron dos tratamientos de desinfección para las semillas. Se sembró en tres medios de cultivos selectivos para hongos MEA (Medios Agar-Malta), CYA (Medio Levadura-Agar) y Medio Saboraund, dos de ellos específicos para *Aspergillus*. Posteriormente se realizó la siembra monospórica para la caracterización de cepas. Se proliferó el micelio para ser utilizado en la extracción de ADN, para lo cual se utilizaron tres métodos de extracción de ADN (Vogel, 1956; Sagai-Marroof, 1984 y Denning et al 1990). Posteriormente se aplicará la técnica PCR para el marcador molecular ITS (Internal Transcript Sequence).”

#### Aislamiento de ADN

El método más eficiente para extraer ADN del micelio del hongo fue el reportado por Sagai-Marroof, (1984) con el que se obtuvo ADN de alto peso molecular (Figura 2).

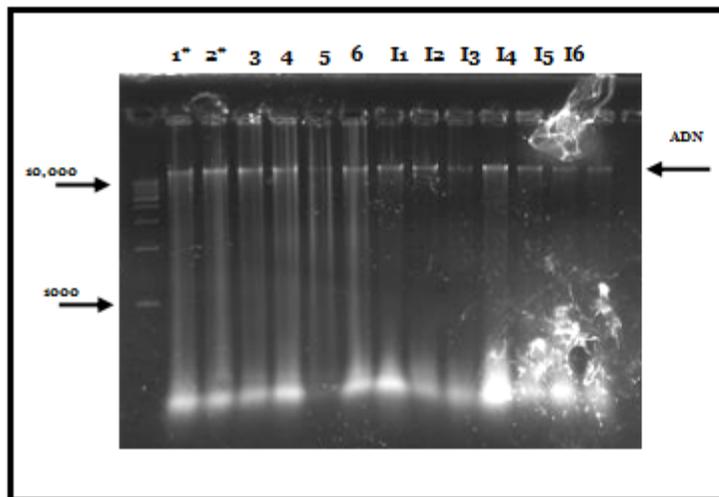


Fig.2. ADN genómico obtenido en trece muestras de *Aspergillus sp.*



---

# *Conclusiones*

- Se encontró una variedad de especie de hongo en las semillas de ***Caesalpinia coriaria*** el cual se denominó con nombre binomial:
- ***Aspergillus niger* var *uessalvadorensis*** A. Vásquez.(2006)

La **variedad** es un rango secundario entre subespecies y formas y se utiliza para las poblaciones que difieren solo ligeramente de la especie.

la **variabilidad morfológica del género** *Aspergillus*, en la especie *A. sp.* Existe **variabilidad** en cuanto a la capacidad de producción de aflatoxinas y en la patogenicidad, estas características han mostrado ser independientes.

## Caracterización biológica del hongo *Aspergillus sp* y su impacto en la salud

Antonio Vásquez Hidalgo

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascal y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus sp*, que incide en las infecciones respiratorias agudas. Se encontró una nueva especie de *Aspergillus sp* en El Salvador.

<https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/2168>

### Introducción

En nuestro medioambiente la salud es un valor agregado al capital humano. No solo es necesario identificar los riesgos ambientales, sino también contribuir a resolver la problemática encontrada. Es tarea de todos colaborar en la minimización del daño al medioambiente.

En esta ocasión se investiga sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio: **el árbol nacascal o nacasclo**. Esta semilla tiene una particularidad inerte, necesita la presencia de un hongo del género *Aspergillus sp*, para que, junto con las propiedades del barro, se puedan teñir de color negro las vasijas, lo que les otorga una particular belleza, quizás incluso un aspecto colonial. Asimismo, se puede curtir la piel del ganado vacuno.

Sin embargo, se ha encontrado que en los cinco lotes de semillas se alberga un hongo que infiere daño a la salud luego de exposiciones prolongadas y si la persona tiene las defensas inmunológicas bajas, tal como se demuestra en muchos estudios del género *Aspergillus*, y ya sea por negligencia o desconocimiento, se ignora el «peligro» que encierra la aspiración de las esporas.



Nº 3 y 4, julio - diciembre 2022

La Universidad segunda época, Nº 3 y 4, julio - diciembre 2022



En muchas ocasiones las afecciones pulmonares se diagnostican como Bronquitis Aguda o Asma Bronquial, cuando en realidad no se debe descartar una Micosis Pulmonar, y el tratamiento debería conformarse por antimicóticos y no antibióticos. Así también se reportan fenómenos alérgicos.

La investigación estuvo compuesta por tres fases:

- a) **Primera fase:** Recolección de las semillas de nacascol.
- b) **Segunda fase:** Extracción y preparación del tanino de la semilla y el hongo.
- c) **Tercera fase:** Pruebas de laboratorio, que consistieron en sembrar el inóculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud y examinar la muestra por microscopía simple y microscopía electrónica de barrido.



## El descubrimiento

El árbol conocido como nacascol tiene como nombre científico **Caesalpinia coriaria**. Pertenece a la familia Caesalpinieaceae, del género Caesalpinia. Es una planta leguminosa con tallo de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo (cada una con más de 10 folíolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, ápice redondeado) y semillas de color café de aspecto negro.

En estas semillas crece un hongo parecido al *Aspergillus niger*, considerado como patógeno oportunista para el ser humano; sin embargo, su morfología es diferente, sus esporas varían con el anterior. En este caso están dispuestas en forma de espículas separadas en toda la espora. Son múltiples, coalescentes, unas pigmentadas y otras claras, de diámetro pequeño, y de color negro a café según pigmentación, no son planas ni rugosas como la de especie niger. Al ser cultivadas en medio especial generan una coloración negra con producción de pigmento en la región posterior del tubo antes de las 24 horas al agregar al medio agar saboroud más sustancias oxidantes. Según el **análisis fitoquímico** preliminar del árbol de Caesalpinia



**coriaria**, contiene taninos, triterpenos, glicosidos y flavonoides. El hongo se reproduce en las semillas del árbol nacascol, luego se cultiva in vitro para la producción del colorante.

**Figura 1-1.** *Semilla de nacascol*

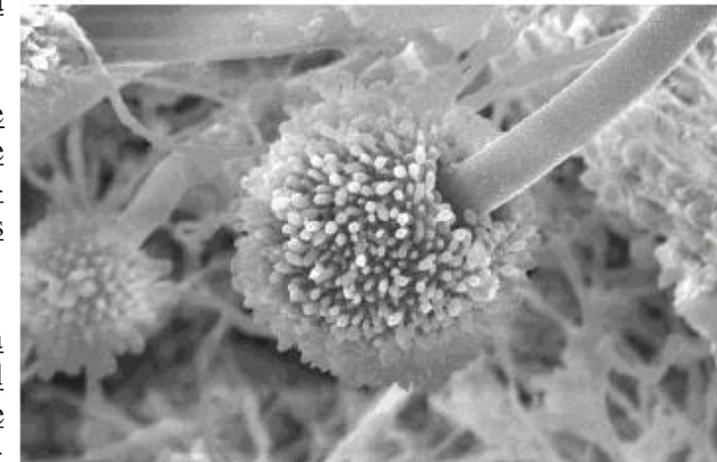


El hongo encontrado en las semillas se describe así:

**Esterigmas.** La cabeza de la conidia es negra, conidioforo liso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas moderadas de 1 a 3 micras, coloreadas de color café a negro.

**Características macroscópicas:** colonia en agar saboraud es de color blanco, luego cambia a verde de aspecto radiado y después se hace negro, el reverso es amarillo o pigmentado de color negro según agente oxidante, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvoriento de color negro. no forma esclerotes lo usual.

**Características Microscópicas:** cabezas conidiales lisas de una pared redonda e irregular, dispuesta en forma radial; estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro; no se observa vesícula o columella; hay conidias abundantes desprendiéndose de la cabeza; tiene una hilera de fialides. El esporangio es una estructura globosa peridial simple, del esterigma es de color negro. Las conidias maduras de color café son esféricas con proyecciones



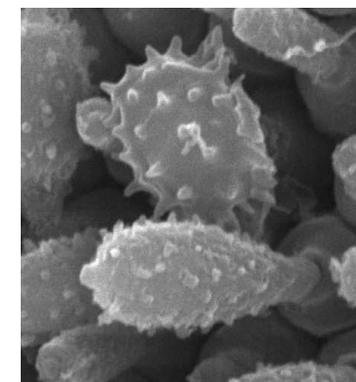
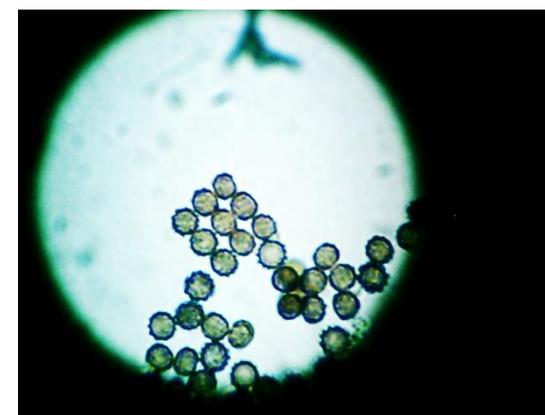
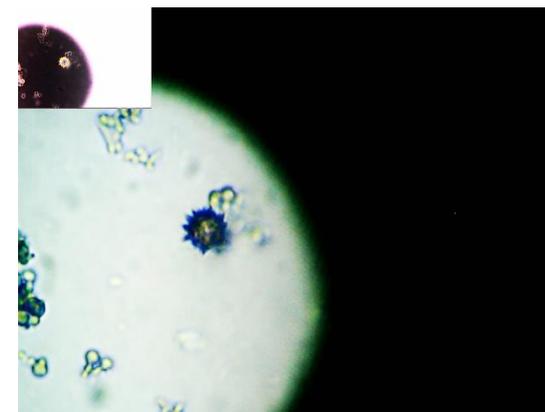
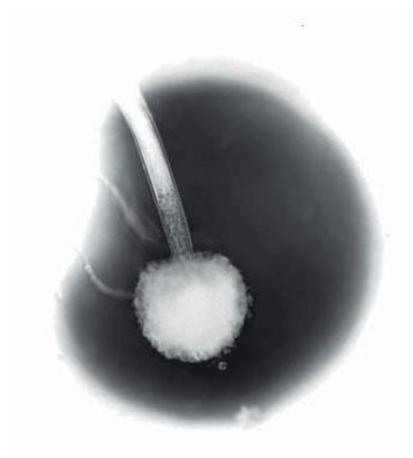
en forma de picos triangulares en toda la periferia, abundantes; y las centrales son escasas formando espículas en número mayor de diez. **La conidia** tiene un aspecto esférico estrellado con espículas, de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias. Toda la estructura forma una coraza sólida. **Las esporas inmaduras asexuales** son esféricas de pared delgada, incolora, de tamaño grande, que luego se llenan formando masas internas de color café. **El conioforo** es largo, liso, con esporas abundantes. Hay otras conidias que se diferencian de la anterior porque tienen una forma de núcleo al interior de tamaño regular a grande color celeste que adopta del colorante con borde hialino de pared simple más pequeñas que las anteriores, sin protuberancias de aspecto rugoso plano en número no mayor de diez, no forman espículas que corresponde al níger.

En general, **la espora** es de forma esférica e irregular, aseptada, ameropora, coloreada y oscura del tipo feospora, tamaño grande, cuyo diámetro es de 1 a 3 micras; las hifas no son septadas con micelio continuo. Crece a temperatura ambiente 37 oC.

**Figura 1-2.** Esporas *Aspergillus* sp.40X



**Figura 1-3.** Vesícula y esporangio del hongo



**En cultivo de agar saboraud de placa y tubo:** se observan colonias abundantes de color blanco a verde radiado que cambia a color negro, dispuestos en forma radial del centro hacia fuera, el reverso es color amarillo a pigmentado negro según uso de oxidantes.

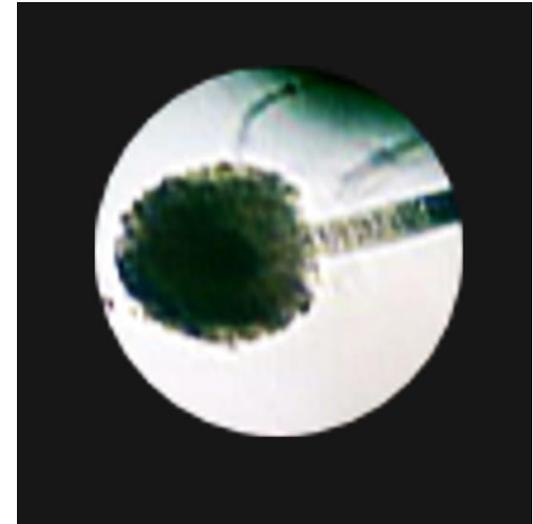
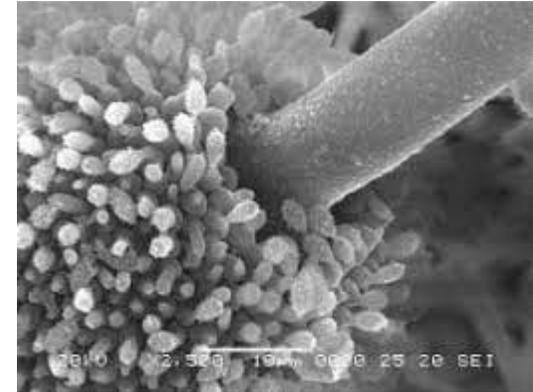
**En cuanto a esta variedad de *Aspergillus* encontrada,** se sugiere que, dada su caracterización morfológica, es otra especie y ha sido encontrada en El Salvador. Esto se ha deducido ya que por la clasificación taxonómica internacional no corresponde a la especie níger. **Entre sus diferencias importantes están:** conidioforo no es liso, no tiene septos, da pigmento al reverso anterior de los tubos, la espora es forma de cactus o mazo o de botella con prominencias triangulares que tienen proyecciones en forma difusa.

Se observa que, si la vasija se coloca, luego del quemado, en el suelo donde están tiradas las semillas de donde se extrajo el colorante, es evidente que se vuelve a contaminar. El contacto de la vasija al horno probablemente quema la espora, ya que la temperatura es de un horno artesanal aproximadamente es de más de 300°C.

También utilizan esta misma materia prima para las curtiembres de pieles, cuyo proceso es similar. Durante el preparado no usan mascarillas ni guantes de protección. La mayoría de personas que trabajan estas artesanías son humildes y andan descalzas. Además de estas condiciones, se debe agregar que todos somos susceptibles a la presencia del antígeno o alérgeno del hongo, incluso si se reporta la presencia y diseminación del hongo en el suelo.

Por método de laboratorio se encontró, por microscopia, que a las 24 horas del cultivo hubo crecimiento rápido de esporulación, a los cinco minutos. Luego de transcurrida una hora había millones de esporas en diez campos. Esto se puede observar más adelante en la secuencia fotográfica del cultivo y microcultivo del hongo *Aspergillus* sp.

Al revisar el reporte epidemiológico del Ministerio de Salud, se ha encontrado que en estas zonas existe una alta prevalencia de infecciones respiratorias agudas en niños y adultos. Su explicación es

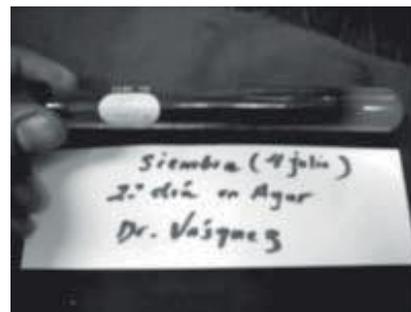


### Cultivo y microcultivo del hongo *Aspergillus* sp

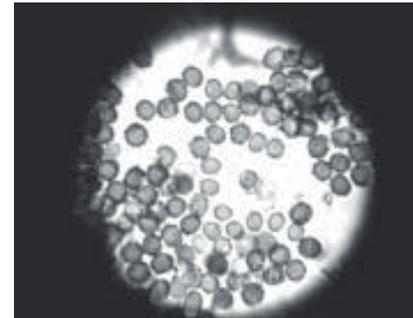
**Foto 1.** Semilla de nacascal. Obsérvese la pigmentación de color café a negro presente en la superficie de la semilla.



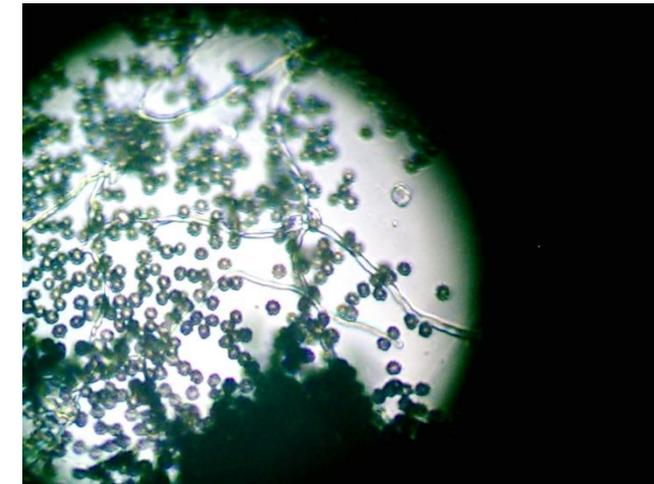
**Foto 2.** Tubo en agar saboraud con el hongo. Siembra de raspado de semilla nacascal que presenta pigmentación de color negro. Se observa que al segundo día el hongo *Aspergillus* sp ya está esporulando rápidamente. Al cuarto día está invadido todo el tubo en agar saboraud.



**Foto 3.** Crecimiento del hongo a las 24 horas, 10x. Se observa en el microscopio 10x que la esporulación a los cinco, quince y treinta minutos es alta, en cincuenta campos está completamente invadido.



**Foto 4.** Microcultivo del hongo. Se hizo microcultivo del hongo y hubo apareamiento de «mancha» en la placa a las 48 horas.



Microcultivo



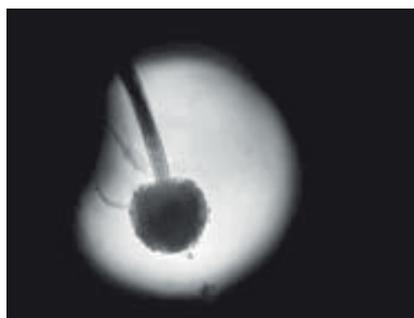


## Microcultivo

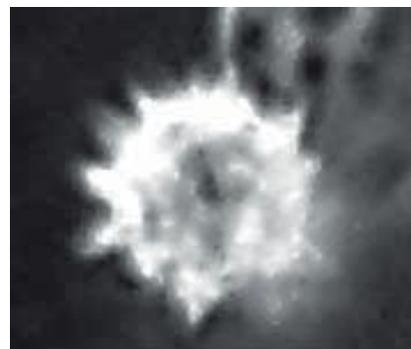
**Foto 5.** Observación del hongo a partir del microcultivo 10x. Se observa el conioforo más la vesícula adherida al medio.



**Foto 6.** Hongo *Aspergillus* sp 10x. Se observa el hongo encontrado en las semillas de nacascol con la vesícula y el conidioforo, presenta inicio de esporas en forma de cadena lineal.



**Foto 7.** Espora del hongo *Aspergillus* sp 40x. Ampliada 100 veces. Se observan esporas encontradas en el cultivo en todas las láminas que se desprenden de las vesículas.



## *Aspergillus* var

**Foto 8.** Espora del hongo *Aspergillus* Níger 40x. Se observa que la variedad níger es la que está asociada al género *Aspergillus*, pero en las semillas no se encontró esta variedad. La de la foto 7 es la más frecuente, con esporulación alta.

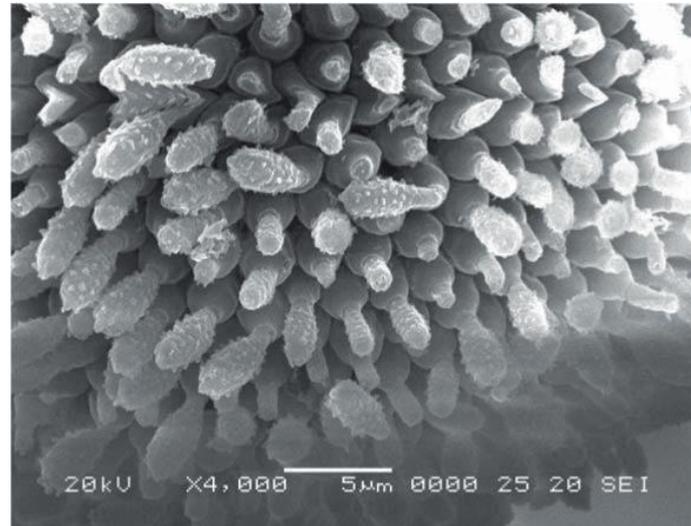


## *Aspergillus niger*

la siguiente: «el problema es viral». Esto revela que desconocen que los fenómenos alérgicos y respiratorios tienen otras causales.

**Figura 1-4.** Imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 X). Cortesía de la doctora Vianey de Ábrego (Tomada en CENSALUD, febrero de 2008)

1a microfotografía elect

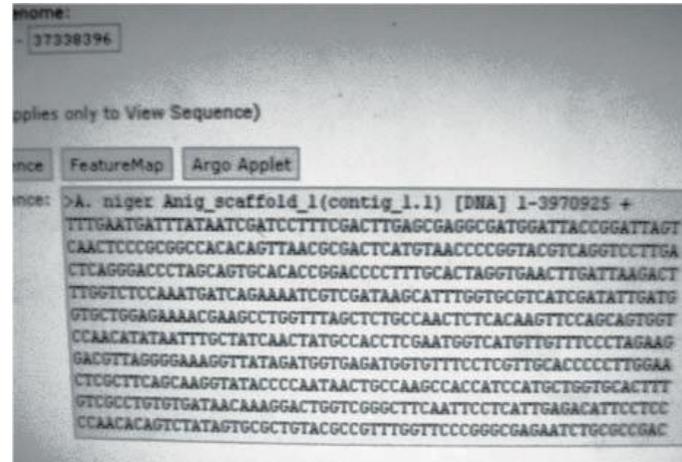


En la Figura 1-4 se observa la imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 x). Puede notarse, según reporte de **CENSALUD**, que es un «hongo filamentosos, donde sobresalen del micelio las cabezas conidiales, redondeadas. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fialides en forma de botella, en cuyo extremo se fijan las esporas, en este caso solo se aprecia uno no una cadenceta», el conidioforo no tiene septos y es liso, la vesícula es redonda de donde emergen múltiples de una a dos esporas en forma de mazo o cactus con espículas dispersas, en el cultivo dan un pigmento al reverso del tubo, las otras especies no. Fenotípicamente corresponde a otra especie del género *Aspergillus*.

A partir de estudios genotípicos se identificó su pertenencia al género *Aspergillus*, ya que presenta la siguiente secuenciación de ADN.

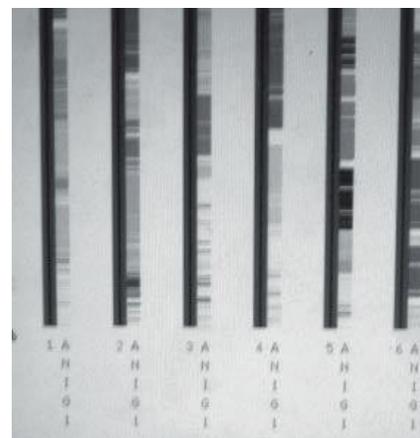
En la Figura 3 se observa la secuenciación del ADN del género *Aspergillus* sp, en la que genotípicamente las secuencias de bases púricas y pirimidínicas se diferencian entre las diversas especies del género, tal como se ve el mapa cromosómico en las Figuras 3 y 4.

**Figura 2.** Secuenciación del ADN del género *Aspergillus* sp.

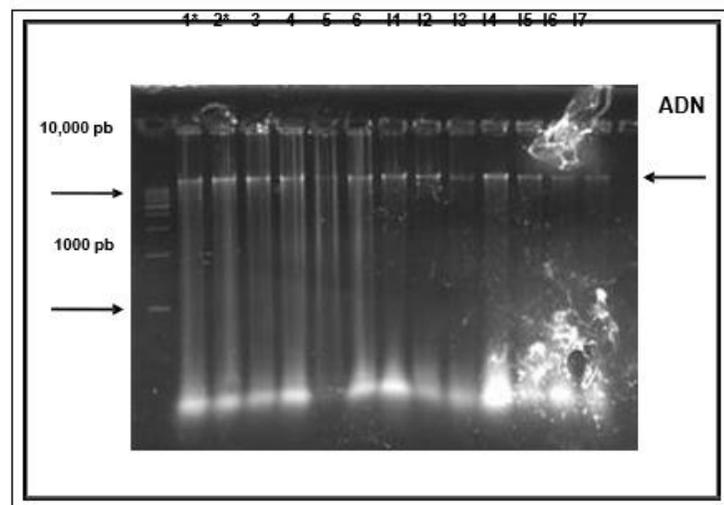
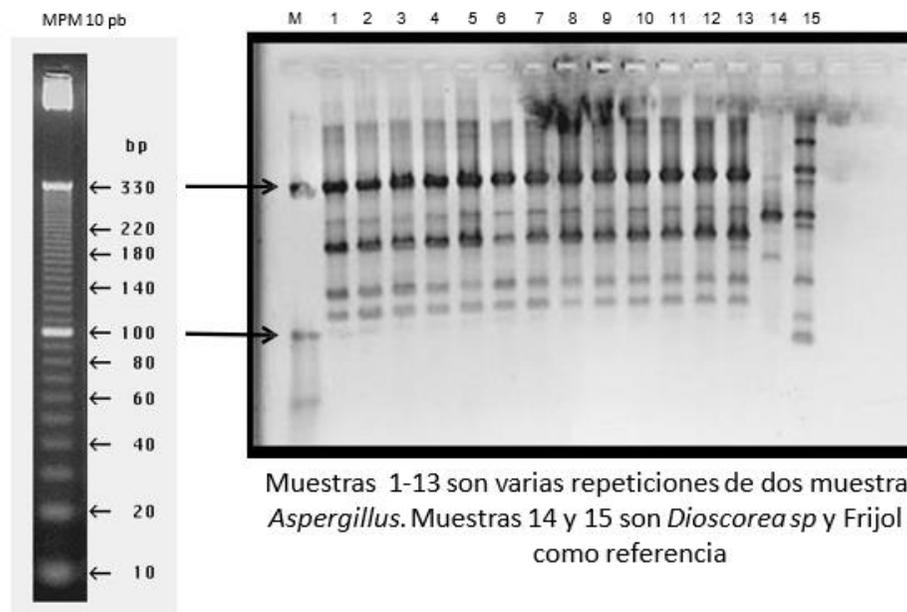


**Fuente:** Broad Institute, *Aspergillus Comparative Database* 2007.

**Figura 3.** ADN cromosomal del género *Aspergillus* sp.



**Fuente:** Broad Institute, *Aspergillus Comparative Database* 2007.



Fotografía 5. PCR de hongo del genero *Aspergillus* .Muestra de El Salvador.



- **GENOMA DNA DEL ASPERGILLUS NIGER. TIENE 143 CONFIGURACIONES, AQUI SOLO HAY DOS CONFIGURACIONES.**
- >A. niger Anig\_scaffold\_1(contig\_1.1) [DNA] 1-3970925 +
- TTTGAATGATTATAATCGATCCTTTTCGACTTGAGCGAGGCGATGGATTACCGGATTAGT
- CAACTCCCGCGGCCACACAGTTAACGCGACTCATGTAACCCCGGTACGTCAGGTCCTTG  
A
- CTCAGGGACCCTAGCAGTGCACACCGGACCCCTTTGCACTAGGTGAACTTGATTAAGA  
CT
- TTGGTCTCCAAATGATCAGAAAATCGTCGATAAGCATTGGTGCGTCATCGATATTGATG
- GTGCTGGAGAAAACGAAGCCTGGTTTAGCTCTGCCAACTCTCACAAGTTCCAGCAGTG  
GT
- CCAACATATAATTTGCTATCAACTATGCCACCTCGAATGGTCATGTTGTTTCCCTAGAAG
- GACGTTAGGGGAAAGGTTATAGATGGTGAGATGGTGTTTCCCTCGTTGCACCCCCTTGG  
AA
- CTCGCTTCAGCAAGGTATAACCCAATAACTGCCAAGCCACCATCCATGCTGGTGCACTTT
- GTCGCCTGTGTGATAACAAAGGACTGGTCGGGCTTCAATTCCTCATTGAGACATTCCTC  
C
- CCAACACAGTCTATAGTGCGCTGTACGCCGTTTGGTTCCCGGGCGAGAATCTGCGCCG  
AC
- GGTTACCCCTTCGTGAAGTCGATCGGAATGGCTCCAATGGAGGCCGCAAGTTCCAGTC  
GG

TEXTO SON MAS DE 500 PAGINAS

**Figura 4.** Comparación de especies de *Aspergillus* por secuenciación cromosomal de ADN.



## Impacto en la Salud

El contacto directo entre el humano y el hongo tiene como consecuencias el daño a la salud y la erogación del gasto público en la atención de Infecciones Respiratorias Agudas, en los niveles de atención I, II y III de la red del Ministerio de Salud. De tal forma que clasifican en forma general el diagnóstico de Infección Respiratoria Aguda sin explicar la causa de su origen.

Se ha determinado por amplia revisión bibliográfica que el agente causal de *Aspergillus* da **Aspergilosis Broncopulmonar o Alérgica, en otros casos cáncer pulmonar**. En esto se incluye, del género *Aspergillus*, las especies de *fumigatus*, *níger*, *terreus*, *flavus*, *nidulans* y *ochraceus*. En nuestro medio es más frecuente el género *Aspergillus* de la especie *níger*.(1)

Existen varias formas de aspergilosis que causan enfermedades en el ser humano, entre las más conocidas se encuentran:

- **Aspergilosis pulmonar de tipo bronco pulmonar alérgica:** se debe a una reacción alérgica al hongo por aspiración. Se desarrolla con asma bronquial.
- **Aspergiloma:** es un tumor que se desarrolla en un lóbulo pulmonar, como una tuberculosis o abscesopulmonar.
- **Aspergilosis pulmonar invasiva:** es una infección grave con neumonía que se disemina a otras partes del cuerpo. La infección ocurre en personas con sistemas inmunitarios debilitados debido al cáncer, SIDA, leucemia, trasplante de órganos, quimioterapia entre otros. (2,3,5)

Revisando la literatura, se ha encontrado que los aspergilomas se forman cuando el hongo *Aspergillus* crece como una masa en cavidades pulmonares (pulmón) o cuando el organismo invade tejido previamente sano, y causa un absceso. (4,6-9)

El *Aspergillus*, en altas concentraciones, puede producir aspergilosis. La especie invasora provoca alteraciones pulmonares. Esta enfermedad aparece con más frecuencia en agricultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad. (4)

La forma de reproducción del *Aspergillus* son sus esporas, que con un tamaño de 2 a 3.5  $\mu$ m entran fácilmente a las vías aéreas. Al germinar estas esporas, y ser introducidas en un individuo susceptible (asma atípico, fibrosis quística), forma hifas que colonizan los bronquios. Las hifas tienen de 3 a 7  $\mu$ m de diámetro, y se caracterizan por sus ramificaciones en ángulo de 45 grados. (10-13,1)

El tamaño del inóculo es variable, el número de esporas inhaladas es un factor importante en la producción de Aspergilosis. El asma (atopia), fibrosis quística y asma son de las más frecuentes de consulta externa. (14)

En general el *Aspergillus* es un hongo filamentoso del grupo Deuteromycetes u hongos imperfectos. Su aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas en forma lineal. (15,10)

Rapper y Fennell las clasifican en 18 grupos, basándose en su aspecto macroscópico y en las características morfológicas de los conidióforos y fiálides; de ellas, doce se relacionan con enfermedad humana. Las más importantes son: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* y *A. níger*. (16, 18,2)

Otros autores consideran que el *Aspergillus* es un género de alrededor de 200 hongos. Puede existir en dos formas básicas: levaduras e hifas. El *Aspergillus* es filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuesto a las levaduras, que se componen de una sola célula redonda). (18)

El *Aspergillus níger* tiene el micelio lanoso de color blanco amarillento que cambia a negro, el reverso es blanco amarillento, conidióforos largos y lisos y fiálides biseriadas que cubren completamente la vesícula. (10)

Los *Aspergillus* pueden ocasionar múltiples procesos patológicos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran: el pequeño tamaño de sus conidias permite que sean aspiradas y causen infección en el pulmón y en los senos paranasales; su capacidad de crecer rápidamente a 37°C lo hace idóneo para afectar al humano; así como su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos; y la producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células. (9)

El *Aspergillus* por su naturaleza es «patógeno oportunista», es decir, suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos, por lo que su lesión es muy grave.

Los síntomas principales al contraer *Aspergillus* pueden ser: dolor torácico, expectoración con sangre (se observa hasta en un 75% de los pacientes), fiebre, insuficiencia respiratoria, pérdida de peso, sibilancias, tos seca. (18)

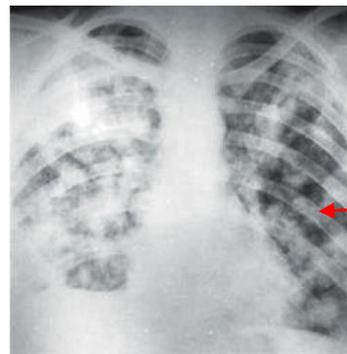
Entre las complicaciones más relacionadas están: dificultad respiratoria progresiva, hemorragia pulmonar, diseminación de la infección, entre otros. La aspergilosis constituye la infección micótica oportunista más frecuente del pulmón, (5) por lo que en pacientes con SIDA es fulminante. (19)

### Medioambiente

En la Figura 5 se observa por radiografía de tórax simple un paciente que presenta patrones nodulares característicos de personas que se han contaminado con el hongo *Aspergillus sp.*, y que presentan manifestaciones clínicas de una Aspergilosis Pulmonar, y en otros casos Aspergiloma Pulmonar.

Se aclara que este diagnóstico diferencial a priori tiene similitudes con una Bronquitis Aguda, y por desconocimiento los pacientes son tratados con antibióticos, cuando en realidad tendría que ser con un antimicótico.

**Figura 5.** Radiografía de tórax. Se observan opacidades bilaterales con patrón nodular características de aspergilosis pulmonar invasora.<sup>(20)</sup>



NODULOS

El *Aspergillus* es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, heno, tejidos de algodón, lana y plumas. Su medio ideal son los ambientes oscuros, húmedos y cerrados. Podemos encontrar esporas de *Aspergillus* en los depósitos de trigo, en los edificios en construcción, en los aparatos de aire acondicionado y en los alimentos enmohecidos.

El *Aspergillus* es un hongo filamentoso, ubicuo y cosmopolita que se encuentra en la naturaleza y en las viviendas. Se puede aislar de la tierra, de los sistemas de ventilación, del agua. (4)

Los aspergilos se reproducen con facilidad a temperaturas altas y se encuentran con frecuencia en cereales, forrajes, algodón y algunas aves como las palomas; abundan en materiales orgánicos en descomposición. Las esporas se diseminan por el aire (conidios) y son inhaladas. (5)

Las esporas pueden sobrevivir, en las condiciones adecuadas, durante miles de años. Estudios recientes han demostrado que las esporas de *Aspergillus* mantienen intacta su capacidad invasiva, e incluso parece aumentar su potencial alergénico después de miles de años. Se han encontrado esporas de *A. níger* y *flavus* en la comida, las ropas, las flores y otros objetos de las tumbas de los faraones del antiguo Egipto, en momias y en el sarcófago de Ramsés II.(13) La propagación rápida del *Aspergillus* en ambientes llenos de polvo y a través de los sistemas de aire acondicionado puede ser el origen de los brotes de aspergilosis que acontecen en hospitales y otros edificios después de obras de remodelación o construcción.(4)

Las especies de *Aspergillus* son termoestables y son capaces de crecer a temperatura entre 15 y 53 grados centígrados. Las esporas están presentes todo el año, pero predominan en otoño e invierno, recuperándose de paja, estiércol, madera, vegetales en descomposición, abono de tierra, alcantarillas, deposiciones de aves, heno enmohecido y aire atmosférico.(2-5)

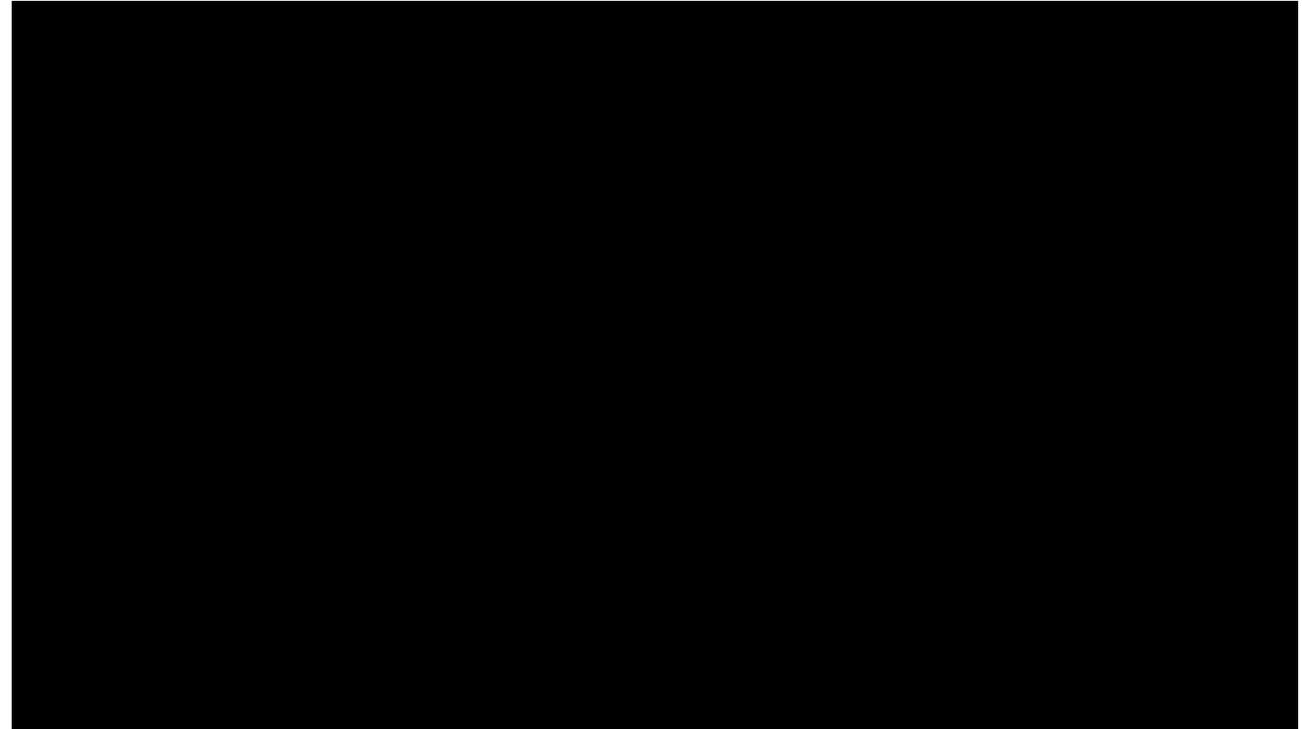
## Prevención en la salud para resolver el problema identificado

La investigación consiste en un nuevo aporte científico de conocimiento en el impacto ambiental en salud de nuestro país, en identificar no solamente el hongo y su localización, sino también en contribuir con la educación sanitaria y ambiental. Incluso en cuanto a capacitar el personal de salud sobre el descubrimiento y conocimiento de aspectos microbiológicos en la prevención de la enfermedad, optando la posibilidad de pensar en otros diagnósticos.

Se ha encontrado que, al utilizar un método sencillo de protección, como el uso de mascarilla y guantes, se reduce considerablemente la diseminación y contaminación de los susceptibles a contraer el hongo, así como otras medidas de eliminar o destruir el hongo durante el preparado. También es importante **proteger el producto luego del quemado en otras áreas estériles**. También a nivel de suelo se ha reportado la presencia de *Aspergillus*, por lo que es un antígeno o alérgeno susceptible al ser humano.

En conclusión, se encontró una nueva especie de hongo del género *Aspergillus* en las semillas de nacascol y en el suelo salvadoreño en la zona norte del país, el cual será denominado en el futuro con el nombre científico: *Aspergillus ues salvadoriensis*, del género *Aspergillus*; *ues*, porque se descubrió en la Universidad de El Salvador, y *salvadoriensis*, porque está en territorio de El Salvador; o es el caso nombre científico binomial: *Aspergillus v uessalvadorensis*. Se hizo búsqueda en base de datos de Atlanta CDC y sociedades de micología en donde no se reporta la especie encontrada en particular.

Se agradece a CENSALUD por su colaboración en la toma de microfotografías electrónicas de barrido y a la doctora Vianney Ábrego.



click

VIDEO . TEÑIDO VASIJAS



**Es termotolerante, pudiendo vivir entre los 12°C y los 57°C.**

**Horno a 600 °C**

**Semilla + nance hierven a 100 °C**



*Extracto acuoso de colorante negro natural, a partir de las semillas de nacazcol (Caesalpinia coriaria) en condiciones de laboratorio.*

ANTONIO VASQUEZHIDALGO

Docente Depto de Microbiología Facultad de Medicina Universidad de El Salvador

UFC/ML del preparado líquido. Se incuba y se mantiene a temperatura ambiente por varios días hasta que se produzca el color negro en la parte superior e inferior del tubo y caja de petri. Una vez producido el colorante se esteriliza en autoclave para evitar contaminación.

#### **OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA:**

Las semillas se obtienen de la zona norte del país, área específica Morazán, las semillas maduras que están entre las ramas de los árboles y las del suelo. La cantidad aproximada a tomar son en peso 20 a 50 g.

#### **VARIABLES DEL PROCESO**

Entre las variables del estudio se tiene. Variable independiente semillas, reactivos químicos como tipo de solvente, temperatura de extracción, tiempo de extracción, relación sólido/solvente, tamaño de partícula y pH y como variable dependiente se tiene el colorante negro.

#### **Resultados**

#### **TIPO DE SOLVENTE:**

Se hacen experimentos con dos solventes: agua y alcohol etílico, el colorante es soluble en ellos. El color obtenido es diferente en cada uno de los solventes; en etanol se observa un color pálido negro y en agua se obtiene un color negro oscuro. Teniendo mejor resultado el de agua.

Tabla 1 Resultados de la extracción con diferentes solventes

| Tipo de solvente | Color        | Cantidad g | absorbancia |
|------------------|--------------|------------|-------------|
| Agua + hierro    | Negro oscuro | 0.10       | 0.50        |
| Etanol           | Negro pálido | 0.30       | 0.30        |
| Agua-etanol      | negro        | 0.50       | 0.20        |
| Agua             | Ninguno      | 0.10       | -           |

### RELACIÓN SÓLIDO /SOLVENTE:

La mejor relación es entre el agua y el tanino de la semilla mezclado con oxidante como el hierro, para obtener mejores resultados, es decir entre mas hierro mejor colorante negro se obtiene.

### TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN

La temperatura ideal para la extracción del colorante es a medio ambiente entre 25 a 32 grados Celsius. Se sometió a temperaturas altas obteniendo similares resultados. Ver tabla 2 como resultado de la extracción a diferentes temperaturas.

Tabla 2 Resultado de la extracción a diferentes temperaturas

|              | Temperatura (°C) | Cantidad de colorante (g) | Absorbancia |
|--------------|------------------|---------------------------|-------------|
| Agua +hierro | 30               | 0.10                      | 0.50        |
| Etanol       | 40               | 0.30                      | 0.30        |
| Agua-etanol  | 50               | 0.50                      | 0.20        |
| Agua         | 30               | 0.10                      | -           |

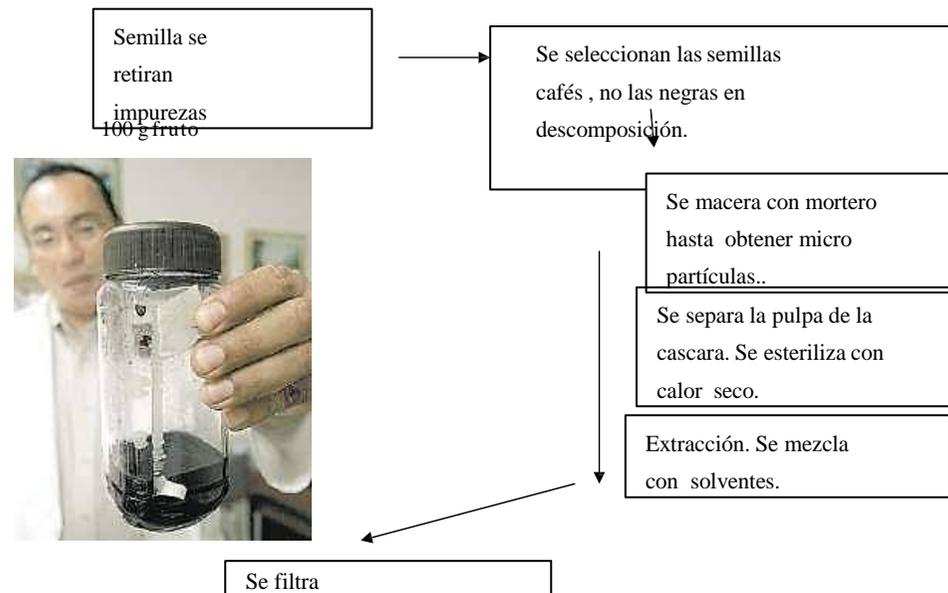
### TIEMPO DE EXTRACCIÓN

El tiempo de extracción depende de la cantidad de colorante que se obtiene; a medida que aumenta es mayor el rendimiento. ver Tabla 3.. En los ensayos preliminares se busca seleccionar el límite superior por encima del cual ya no se obtiene mayor cantidad de colorante y lo que puede ocasionar es aumento de costos y disolución de la semilla en el solvente.

Tabla 3. Resultados de la extracción a diferente tiempo

| Tiempo ( minutos) | Cantidad coloranteg | Absorbancia |
|-------------------|---------------------|-------------|
| 1                 | 0.10                | 0.50        |
| 5                 | 0.30                | 0.30        |
| 15                | 0.50                | 0.20        |
| 30                | 0.10                | -           |

Figura 1 Diagrama de bloques del proceso extracción colorante a escala de laboratorio.



### CONDICIONES DEL PROCESO

Una condición ideal del proceso es la adecuada mezcla entre los solventes y oxidante, ya que esto proporciona una mejor calidad del producto. No se necesitan condiciones de temperatura ideal ya que a temperaturas ambiente y extremos de calor no influye en la obtención del colorante, sin embargo a mayores temperaturas el resultado no es muy favorable ya que puede precipitar el hierro.

**Temperatura:** Es necesario tener cuidado con las temperaturas extremas ya que en condiciones de laboratorio se puede variar la tonalidad de negro, en condiciones artesanales no importa ya que el barro puede soportar extremos de temperatura mayores de 300 grados Celsius.

**Solventes.** Se utilizaron varios solventes entre ellos el agua de grifo, destilada, teniendo mejores resultados el agua de grifo. Otros solventes como el alcohol se presentaron con diversas tonalidades.

**Tamaño de partícula.** No es necesario el tamaño, pero si entre más macerado este el producto los resultados son mejores. Debe separarse de la cascara.

---

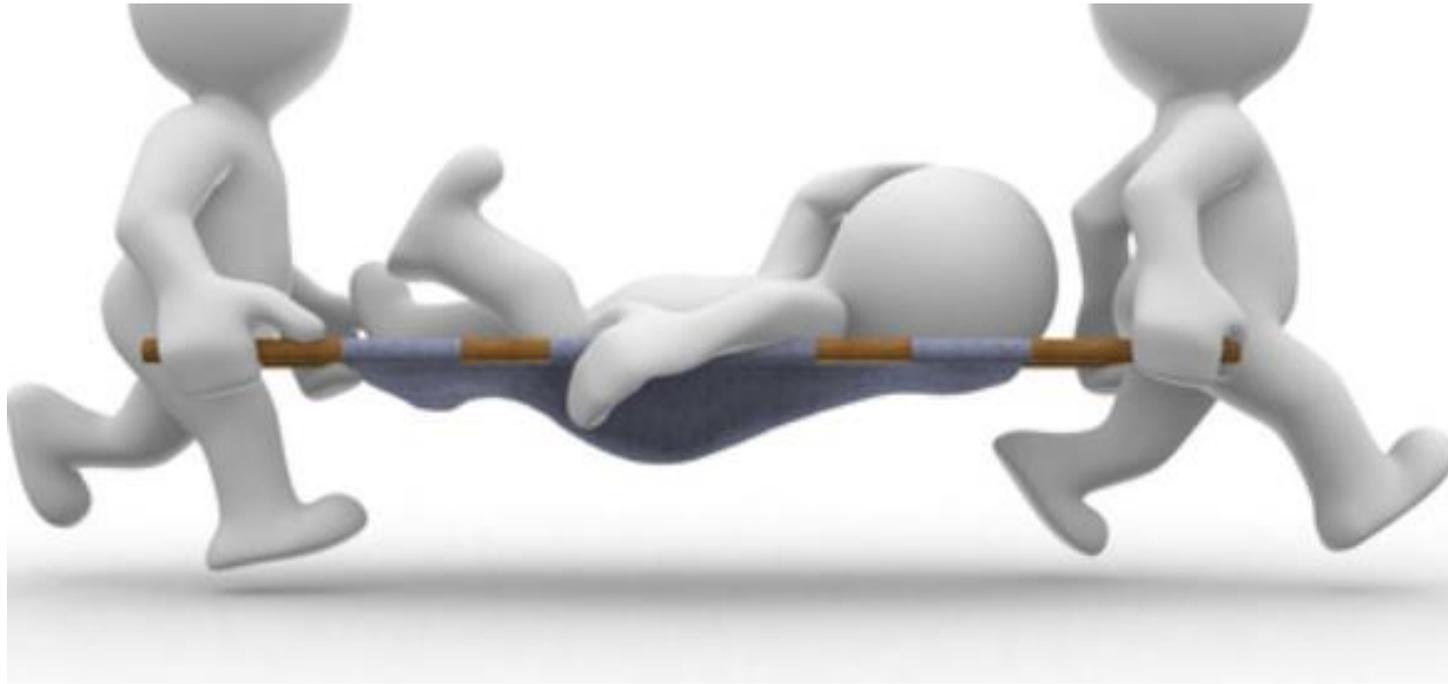
**NOMENCLATURA TRINOMIAL.**

usada en biología para identificar a cada especie de ser vivo conocida, con el fin de referirse específicamente a subdivisiones menores de una especie determinada.

***Aspergillus niger var uessalvadorensis***

***Aspergillus niger subsp. uessalvadorensis***





- .... Gracias