

UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICASp



“Extracción del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo*, determinación de los ácidos grasos insaturados libres (ácido oleico, ácido linoleico y ácido α -linolénico) y de su efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*”

TESIS

TESIS PRESENTADA POR:

CHOQUENAIRA FLOREZ, ROSARIO

RIVAS ZEGARRA, SOLANGE MARLENE

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

ASESOR:

ING. ARMANDO SALINAS SÁNCHEZ

AREQUIPA – PERU

2013



Dedicatoria

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar cada día más, a mi madre, la Sra. Juanita Florez Ccorimanya, por ser la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de vida, quien ha velado por mí durante este arduo camino para convertirme en una profesional. A mi padre, el Sr. Valentín Choquenaira Bombilla, quien con sus consejos ha sabido guiarme para culminar mi carrera profesional.

Rosario Choquenaira Florez

Agradecimientos

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino y mostrarme día a día que con humildad, paciencia y perseverancia todo es posible.

A mi estimada madre Juanita, por ser el pilar más importante y demostrarme siempre su cariño, consejos, comprensión, y su apoyo incondicional.

A mi distinguido padre Valentín, que con sabiduría y fortaleza siempre tuvo una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido incentivo para mi vida.

Mis padres me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi hermano David por sus consejos y comprensión, lo considero un hermanito ideal a quien quiero mucho.

Y a Luis Enrique por ser alguien muy especial en mi vida y brindarme fortaleza y amor en todo momento.

Agradezco a mis profesores, compañeros y amigos por haber llegado a mi vida y compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen prosperar y apreciar a las personas que nos rodean.

Rosario Choquenaira Flores

Dedicatoria

A lo largo de mi vida, una persona siempre ha estado allí durante los días difíciles. Me gustaría dedicar esta tesis a mi madre, por su infinito amor. Yo no sería quien soy sin el amor y apoyo de mi padre, sus contribuciones a la vida se sentirán por siempre y a mi hermana por llenarme de alegría.

Solange

Agradecimientos

En primer lugar quisiera que mis palabras de agradecimiento fuesen al Divino Dios, porque cuando todas las esperanzas parecen haber fracasado, su mano siempre está para apoyarte, escondido detrás de la escena, divinamente toma el control.

Siempre voy a deber una gratitud hacia estos profesores: PhD. Jaime Cárdenas García, PhD. José Villanueva Salas y a la Ing. Cinthia Córdova Barrios por su guía y corrección en el desarrollo del presente trabajo.

Un agradecimiento especial a nuestro asesor: Ing. Armando Salinas Sánchez por su orientación y su tiempo invertido.

Quiero agradecer también a mis amigos: Estefanía, Diana y Julio, por su influencia en mi vida, en especial a Daphne, por su presencia, consejos y apoyo emocional y a todos los que directa e indirectamente ayudaron a la realización de esta tesis.

También me gustaría expresar mi gratitud al personal del Laboratorio de Control de Calidad, por sus diversas formas de apoyo, en especial a Elvis.

... Esto solo es el comienzo de un largo trayecto.

Solange

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I: GENERALIDADES	
1.1 Introducción	5
1.2 Planteamiento del problema	6
1.3 Justificación	7
1.4 Objetivos	8
1.5 Hipótesis	10
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1 <i>Cucurbita máxima Dutch</i>	11
2.1.1 Definición	11
2.1.1 División taxonómica	12
2.1.2 Variedades	12
2.1.3 Usos del zapallo	13
2.1.4 Propiedades organolépticas	14
2.1.5 Composición química	14
2.1.6 Propiedades del zapallo	15
2.2 Semillas de zapallo	15
2.2.1 Definición	15
2.2.2 Propiedades organolépticas	15
2.2.3 Composición fisicoquímica	15
2.2.4 Usos y propiedades	17
2.3 Grasas de origen vegetal	17
2.3.1 Mantecas	17
2.3.2 Aceites vegetales comestibles	18
2.4 Ácidos grasos esenciales	18

2.4.1	Definición	18
2.4.2	Clasificación	18
2.4.3	Propiedades	18
2.4.4	Ácido α -linolénico(omega-3)	19
2.4.5	Ácido linoleico (omega-6)	19
2.4.6	Ácido oleico (omega-9)	20
2.5	Cucurbitacina	20
2.5.1	Definición	20
2.5.2	Clasificación	21
2.5.3	Propiedades	21
2.6	Métodos de extracción de aceites	22
2.6.1	Método de Soxhlet	22
2.6.2	Extracción mediante ultrasonido	22
2.6.3	Extracción por maceración	23
2.7	Métodos de caracterización de los ácidos grasos esenciales	24
2.7.1	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	24
2.7.2	Componentes	25
2.7.3	Cromatografía de Gases (GC)	26
2.7.4	Componentes	26
2.8	Métodos de caracterización de la cucurbitacinas	29
2.8.1	Cromatografía en Capa Fina (TLC)	29
2.9	Bacterias	31
2.9.1	Definición	31
2.9.2	Clasificación bacteriana	31
2.9.3	<i>Escherichia coli</i>	32
2.9.4	<i>Shigella flexneri</i>	32
2.9.5	Tratamiento	32
2.10	Evaluación del efecto antibacteriano	32
2.10.1	Método de disolución en caldo	32
2.10.2	Método hoyo-placa	33
2.10.3	Método de susceptibilidad de difusión en discos (Kirby- Bauer)	33

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Campo de investigación	34
3.2	Materiales	34
3.2.1	Unidad de estudio	34
3.2.2	Material de vidrio	35
3.2.3	Equipos de laboratorio	36
3.2.4	Otros materiales	36
3.2.5	Medios de cultivo	37
3.2.6	Reactivos	37
3.3	Metodología	38
3.3.1	Procesamiento del Material Vegetal	38
3.3.1.1	Determinación del porcentaje de humedad	39
3.3.2	Obtención del aceite	40
3.3.3	Determinación de las propiedades organolépticas	42
3.3.4	Determinación de las propiedades Fisicoquímicas	42
3.3.4.1	Densidad	42
3.3.4.2	Índice de refracción	43
3.3.4.3	Determinación del índice de saponificación	44
3.3.4.4	Determinación del índice de yodo	45
3.3.4.5	Determinación del índice de acidez	48
3.3.4.6	Determinación del índice de peróxidos	50
3.3.5	Determinación de ácidos grasos libres por HPLC	52
3.3.5.1	Preparación de las soluciones estándar	53
3.3.5.2	Preparación de la curva de calibración	53
3.3.5.3	Preparación de las muestras	53
3.3.5.4	Cuantificación de los ácidos grasos libres	54
3.3.6	Determinación de cucurbitacinas por Cromatografía en Capa Fina	55
3.3.7	Determinación del efecto antibacteriano	57
3.3.8	Obtención de las cepas	57
3.3.7.1	Identificación de las bacterias	57
3.3.7.1.1	Prueba de TSI	57

3.3.7.1.2 Prueba de LIA	59
3.3.7.1.3 Prueba de Indol	60
3.3.8.1 Método de dilución en caldo	60
3.3.8.2 Método hoyo – placa	61
3.3.8.3 Método de susceptibilidad de difusión en disco (Kirby-Bauer)	62

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Porcentaje de humedad	65
4.2 Extracción de aceite	67
4.3 Ensayos organolépticas	70
4.4 Propiedades fisicoquímicos	71
4.4.1 Densidad	71
4.4.1 Índice de refracción	73
4.4.2 Índice de saponificación	75
4.4.3 Índice de yodo	77
4.4.4 Índice de acidez	78
4.4.5 Índice de peróxidos	80
4.5 Determinación de los ácidos grasos libres	82
4.5.1 Curva de calibración	82
4.5.2 Identificación y cuantificación de los ácidos grasos libres	84
4.6 Evaluación de la presencia de la cucurbitacina	85
4.7 Evaluación del efecto antibacteriano	87
4.7.1 Identificación de las cepas en estudio	87
4.7.2 Evaluación del método de dilución en caldo	87
4.7.3 Evaluación del Método Hoyo Placa	88
4.7.4 Evaluación del método de susceptibilidad de difusión en discos. (Kirby – Bauer)	90
V.- Conclusiones	93
VI.- Recomendaciones	95
VII.- Bibliografía	96

VIII.- Anexos

102



INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Determinación del porcentaje de Rendimiento	42
Ecuación 2: Determinación de la densidad	43
Ecuación 3: Reacción química del índice de saponificación	44
Ecuación 4: Determinación del índice de saponificación	45
Ecuación 5: Reacción química del índice de yodo	46
Ecuación 6: Determinación del índice de yodo	47
Ecuación 7: Reacción química del índice de acidez	49
Ecuación 8: Determinación del índice de acidez	49
Ecuación 9: Reacción química del índice de peróxidos	51
Ecuación 10: Determinación del índice de peróxidos	52
Ecuación 11: Cálculo del factor de retención	57

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Ácido α - linolénico	19
Figura N° 2: Ácido linoleico	20
Figura N° 3: Ácido oleico	20
Figura N° 4: Estructura general de las cucurbitacinas con numeración de carbonos	21
Figura N° 5: Equipo de extracción Soxhlet	22
Figura N° 6: Partes de un Equipo de HPLC	25
Figura N° 7: Esquematación del proceso de TLC	29
Figura N° 8: Secado de las semillas en la estufa a 40°C	39
Figura N° 9: Proceso de molienda de las semillas	40
Figura N° 10: Extracción del aceite con el Equipo Soxhlet	41
Figura N° 11: Concentrado de la muestra por medio del Rotavapor	42
Figura N° 12: Determinación del índice de refracción a través del refractómetro	44
Figura N° 13: Preparación de los estándares y la fase móvil	54
Figura N° 14: Corrida cromatográfica de las 3 concentraciones de aceites	56
Figura N° 15: Proceso del método de hoyo-placa	61
Figura N° 16: Método de estrías para la aplicación de los discos de susceptibilidad	62
Figura N° 17: Aplicación de los discos de susceptibilidad.	64
Figura N° 18: Placa cromatográfica revelada con VP del extracto del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i>	85

Figura N° 19: Placa cromatográfica revelada con VP del extracto del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* 86

Figura N° 20: Resultados de las pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* y para *Shigella flexneri* 88

Figura N° 21. Resultados después de la incubación de 24 horas del aceite de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo (Zapallo)* contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*. 89

Figura N° 22 Resultados de susceptibilidad para *Escherichia Coli* 90

Figura N°23.- Resultados de susceptibilidad para *Shigella flexneri* 91



INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Porcentaje de humedad de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	67
Gráfico N° 2: Porcentaje de rendimiento del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	69
Gráfico N° 3: Densidad del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	72
Gráfico N° 4: Índice de refracción del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	74
Gráfico N° 5: Índice de saponificación del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	76
Gráfico N° 6: Índice de yodo del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	77
Gráfico N° 7: Índice de acidez del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	79
Gráfico N° 8: Índice de peróxidos del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch</i> var. <i>Zambo</i> y var. <i>Macre</i> (Zapallo)	81
Gráfico N° 9: Curva de calibración del Ácido α -linolénico	83
Gráfico N° 10: Curva de calibración del Ácido linoleico	83
Gráfico N° 11: Curva de calibración del Ácido oleico	83

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: Composición de la pulpa de <i>Cucurbita máxima</i> fresca	14
TABLA N° 2: Composición de la semilla de <i>Cucurbita máxima</i> fresca	16
TABLA N° 3: Ventajas y desventajas del HPLC	24
TABLA N° 4: Ventajas y desventajas del CG	27
TABLA N° 5: Ventajas y desventajas del TLC	30
TABLA N° 6: Peso de la muestra e índice de yodo previsto	47
TABLA N° 7: Peso de la muestra e índice de acidez previsto	49
TABLA N° 8: Peso de la muestra e índice de peróxido previsto	52
TABLA N° 9: Descripción del Equipo de HPLC	53
TABLA N° 10.- Características del HPLC	54
TABLA N° 11: Determinación de humedad de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	66
TABLA N° 12: Determinación de humedad de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	66
TABLA N° 13: Tratamiento estadístico del porcentaje de humedad de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	66
TABLA N° 14: Determinación del rendimiento del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	68
TABLA N° 15: Determinación del rendimiento de las semilla del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	68
TABLA N° 16: Tratamiento estadístico del rendimiento de extracción del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	69

TABLA N° 17: Determinación organoléptica del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	70
TABLA N° 18: Determinación organoléptica del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	70
TABLA N° 19: Determinación de la densidad de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	71
TABLA N° 20: Determinación de la densidad de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	71
TABLA N° 21: Tratamiento estadístico de la densidad del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	72
TABLA N° 22: Determinación del índice de refracción del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	73
TABLA N° 23: Determinación del índice de refracción del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	73
TABLA N° 24: Tratamiento estadístico del índice de refracción del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	74
TABLA N° 25: Determinación del índice de saponificación del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	75
TABLA N° 26: Determinación del índice de saponificación del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	75
TABLA N° 27: Tratamiento estadístico del índice de saponificación del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	76
TABLA N° 28: Determinación del índice de acidez del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	78
TABLA N° 29: Determinación del índice de acidez del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	78

TABLA N° 30: Tratamiento estadístico del índice de acidez del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	79
TABLA N° 31: Determinación del índice de peróxidos del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> (Zapallo)	80
TABLA N° 32: Determinación del índice de peróxidos del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Macre</i> (Zapallo)	80
TABLA N° 33: Tratamiento estadístico del índice de peróxidos del aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	81
TABLA N° 34: Datos del área de los ácidos grasos y la concentración para la curva de calibración	82
TABLA N° 35: Tiempo de retención para la identificación de los ácidos grasos por HPLC	84
TABLA N° 36: Relación del promedio de las áreas obtenidas y la concentración de los aceites de semilla de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	85
TABLA N° 37: Factor de retención de las Cucurbitacinas L, I, E y B.	86
TABLA N° 38: Determinación del Factor de Retención (Rf) de los extractos de aceite de las semillas de <i>Cucurbita máxima Dutch var. Zambo</i> y <i>var. Macre</i> (Zapallo)	87
TABLA N° 39: Evaluación del efecto antibacteriano del aceite <i>contra Escherichia coli</i> por el método de dilución en caldo	88
TABLA N° 40: Evaluación del efecto antibacteriano del aceite <i>contra la Shigella flexneri</i> por el método de dilución en caldo	89
TABLA N° 41 Prueba con aceite puro a diferentes cantidades para <i>Escherichia coli</i> y <i>Shigella flexneri</i> con el método del hoyo-placa.	89

TABLA N° 42: Resultado de las pruebas de susceptibilidad frente a *Escherichia coli*
91

TABLA N° 43: Resultado de las pruebas de susceptibilidad frente a *Shigella flexneri*
92





RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinaron los ácidos grasos insaturados libres (ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico) en el aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre*; y se evaluó su efecto antibacteriano contra las bacterias *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*, previamente se realizaron determinaciones fisicoquímicas y organolépticas del aceite.

Primero se obtuvo el aceite a partir de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo) mediante extracción Soxhlet usando diclorometano, luego se procedió a determinar las propiedades organolépticas como olor: sui géneris, sabor: característico y consistencia: densa, resultando similares en la *var. Zambo* y *var. Macre*; el color de la *var. Zambo* fue verde-ladrillo y de la *var. Macre* verde-rojizo. Además las características fisicoquímicas de la *var. Zambo* y *var. Macre* fueron: densidad 0,933 g/mL y 0,941 g/mL; índice de refracción 1,468 y 1,471; índice de saponificación 192,46 mg KOH/g aceite y 166,63 mg KOH/g aceite; índice de yodo 51,053 g I₂/100 g aceite y 49,520 g I₂/100 g aceite; índice de acidez

0,19 % y 0,17 %; índice de peróxidos 10,90 meq peróxido/Kg aceite y 5,77 meq peróxido/Kg aceite, respectivamente de cada una.

Los ácidos grasos insaturados libres de la *var. Zambo* y *var. Macre* se encontraron en concentraciones de 0,34 mg/mL y 0,28 g/mL de ácido α - linolénico; 1,08 mg/mL y 1,28 mg/mL de ácido linoleico, respectivamente de cada una, el ácido oleico se encontró en concentraciones < a 0,1 mg/mL en las dos variedades.

Además se realizó un estudio sobre la actividad antibacteriana, para ello primero se identificó cualitativamente la cucurbitacina, esta sustancia tiene propiedades antiinflamatorias, antifebriles, antihelmínticas y antimicrobianas. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de dilución en caldo y el método de hoyo-placa obteniendo resultados negativos contra las bacterias *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

Palabras clave: ácidos grasos insaturados, cucurbitacina y *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre*.



ABSTRACT

In the present investigation we determined the free fatty unsaturated acids (α -linolenic acid, linoleic acid and oleic acid) in the oil seed *Cucurbita maxima* Dutch var. *Macre* and var. *Zambo*; and we evaluated their antibacterial effect against *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*, we determinate previously the physicochemical and organoleptic properties oil.

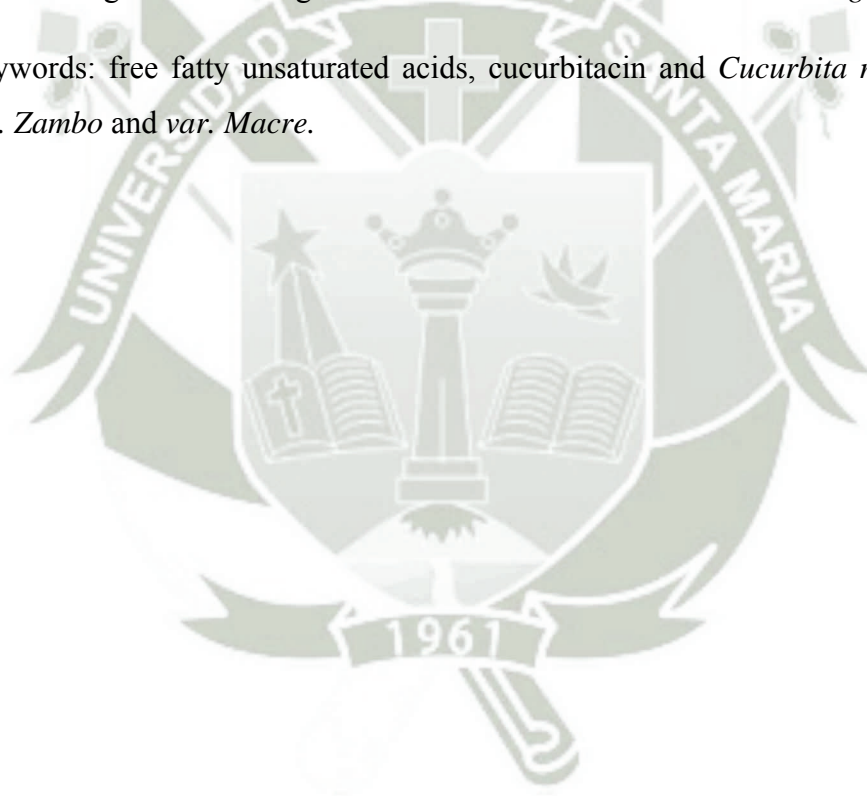
First we obtained oil from the seeds of *Cucurbita maxima* Dutch var. *Macre* and var. *Zambo* (Pumpkin) by Soxhlet extraction using dichloromethane, then we proceeded to determine the organoleptic properties like smell: sui generis, taste: characteristic and consistency: dense, similar resulting in variety var. *Zambo* and var. *Macre*. The var. *Zambo* was green-brick color and var. *Macre* was green-red color. Besides the physicochemical characteristics were: density 0,933 g/mL and 0,941 g/mL, refractive index 1,468 and 1,471, saponification value 192,46 mg KOH/g oil and 166,63 mg KOH/g oil, iodine value 51,053 g I₂/100 g oil and 49,520 g I₂/100 g oil, acid value

0,19 % and 0,17 %; peroxide value 10,90 meq peroxide/Kg oil y 5,77 meq peroxide/Kg oil, respectively of each one.

Free fatty unsaturated acids of the *var. Zambo* and *var. Macre* were found in concentrations of 0,34 g /mL and 0,28 mg/mL of α -linolenic acid, 1,08 g/mL and 1,28 mg/mL of linoleic acid , respectively, the oleic acid was present in concentrations <0,1 g/ mL in the two varieties

We also carried out a study on the antibacterial activity, for that we first cucurbitacina qualitatively identified; this substance has anti-inflammatory, fever-reducing, anthelmintic and antimicrobial properties. The antibacterial activity was performed using the broth dilution method and the method of hole-plate of which we obtained negative results against the bacteria *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*

Keywords: free fatty unsaturated acids, cucurbitacin and *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* and *var. Macre*.





CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1 Introducción

Los aceites vegetales son esenciales para alcanzar demandas globales nutricionales y se utilizan para muchos alimentos y otros fines industriales.⁶

Estos recursos convencionales de aceite vegetal ya no cumplen con la creciente demanda del sector doméstico e industrial.⁶

Por lo tanto, existe la necesidad de buscar otras fuentes para complementar los suministros. El zapallo pertenece a la familia Cucurbitáceas, la mayoría de estas especies se utilizan como alimento y se encuentran en cinco géneros: *Citrullus* (melones de agua), *Cucumis* (pepinos, pepinillos y melones), *Lagenaria* (calabazas), *Sechium* (chayote) y Cucurbita.

Varios estudios han reportado la composición química y las características de la semilla de zapallo de distintos orígenes y variedades.⁷ Los cuatro ácidos grasos presentes en cantidades significativas son los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico.⁸ La semilla de zapallo es una buena fuente de potasio, fósforo y magnesio, y también contiene cantidades moderadamente de minerales (calcio, sodio, manganeso, hierro, zinc, y cobre) y estos elementos hacen que la semilla de zapallo sea valioso para los complementos alimenticios.⁷

Las semillas de zapallo crudas o tostadas se usan como un alimento de bocado para el consumo humano en muchas culturas en todo el mundo. La granos de semillas de zapallo se han utilizado como potenciadores de sabor en salsas y sopas, y utilizados en la cocina, para hornear y como suplemento nutricional y un agente funcional.⁹

La medicina tradicional tiene muchas contribuciones para la salud humana y proveen agentes anti-infectivos contra las infecciones microbiales. Las propiedades medicinales de aceite zapallo incluyen antidiabético, antioxidante, anticarcinógeno, antiinflamatorio y antimicrobiano.¹⁰

Muchas investigaciones evaluaron el contenido bioactivo de las *Cucurbitáceas* que es la cucurbitacina.

En este trabajo se pretende evaluar el efecto antibacteriano con *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*, obteniendo el aceite de la semilla de zapallo, evaluando sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas previamente.

1.2 Planteamiento del problema

Dentro del aceite de las semillas del zapallo están presentes los ácidos grasos y también hay componente llamado cucurbitacina, que se encuentra en todas las familias de las cucurbitáceas y localizado en varios órganos de la planta. Estas cucurbitacinas son responsables de la actividad antihelmíntica, antifungal y antimicrobiana.

El presente trabajo está orientado a la extracción del aceite presente en las semillas de dos variedades de zapallo, como *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* de la localidad de Arequipa, dentro de ello la caracterización de los ácidos

grasos insaturados libres (ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico) y evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano contra las bacterias *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

1.3 Justificación

a) JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

El presente trabajo es importante para los tesisistas porque se pretende cumplir con los reglamentos de la universidad para acceder a la obtención de nuestro título profesional.

b) JUSTIFICACIÓN SOCIAL.

Los resultados de la investigación tendrán gran aporte en el campo de la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos que serán beneficiosos para población que lo necesite.

c) JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA.

El presente trabajo pretende el aprovechamiento de residuos generados en los mercados para la obtención de productos con valor agregado importantes en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

d) JUSTIFICACIÓN AMBIENTAL.

Al aprovechar los aceites de la semilla de zapallo se reducirán los desechos que son generados diariamente en los mercados buscando una disminución de la contaminación ambiental.

e) JUSTIFICACION MEDICA

Por revisión bibliográfica se conoce que las semillas de zapallo tienen efectos antimicrobianos, por tanto es posible utilizar el aceite de las semillas para combatir diferentes microbios como *Escherichia coli* y *Shigella*.



OBJETIVOS

Objetivo general:

Extraer el aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo*, determinar los ácidos grasos insaturados libres (ácido oleico, ácido linoleico y ácido α -linolénico) y de su efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

Objetivos específicos:

- Extraer el aceite mediante el método de Soxhlet utilizando las semillas *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo).
- Evaluar sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo).
- Identificar y cuantificar los ácidos grasos insaturados libres del aceite de la semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

- Evaluar la presencia de cucurbitacina en el aceite de la semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo) por Cromatografía en Capa Fina.
- Evaluar el efecto antibacteriano del aceite de la semilla *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo) contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.





HIPÓTESIS

Dado que las investigaciones bibliográficas y la tradición popular se señala que las semillas de zapallo, constituyen una fuente importante de aceites y dentro ellas su principio activo las cucurbitacinas que presentan ciertos efectos medicinales, es posible extraer el aceite de las dos variedades de semilla *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo), para determinar la composición de ácidos grasos libres y evaluar su posible acción antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 *Cucurbita máxima Dutch*

2.1.1 Definición

El zapallo pertenece a la familia de las cucurbitáceas, son plantas rastreras de tallos suculentos y grandes hojas que cubren el suelo, cuyo cultivo se remonta a los inicios de nuestra agricultura en el antiguo imperio inca.¹¹

Es una planta anual, herbácea, vivaz y rozagante de tallos flexibles y trepadores. Tiene hojas cordiformes, pentalobuladas, de gran tamaño y nervaduras bien marcadas; presenta abundante pilosidad en hojas y tallo. Las flores son amarillas o anaranjadas, de pétalos carnosos, monoicas. El fruto es un tipo de baya llamada pepónide; presenta gran variación (polimorfismo); puede ser elongado o esférico, de color verde opalescente a naranja intenso, pasando por un crisol del ámbito de los colores amarillentos. La pulpa es de color amarillo-anaranjado, densa, de textura

firme y de sabor dulce. Su aroma es característico a su fruto, particularmente llamativo por lo cual se lo utiliza culinariamente en gran medida.

Contiene en su interior numerosas semillas ovales, convexas, lisas, de 2 a 3 cm de largo, las cuales a su vez contienen una pulpa blanca y comestible; con las cuales se elaboran las tradicionales pepitas o pipas.

La producción de zapallo en la Región Arequipa, es variable en sus distintas localidades, principalmente, por las variedades climáticas o la falta de nuevas técnicas de cultivo. Según informaciones estadísticas, en el periodo de Enero del 2011 la producción de Zapallo fue de 9 245 Tm. ¹²

2.1.2 División taxonómica

Según Huanca, el zapallo está clasificado botánicamente de la siguiente forma. ¹³

Reino: Vegetal

División: Angiospermas

Clase: Dicotiledónea

Sub clase : Sympetalas

Orden: Cucurbitales

Familia: Cucurbitáceas

Genero: Cucurbita

Especie: máxima

Nombre científico: *Cucurbita máxima Dutch.*

Nombre común: Zapallo

2.1.3 Variedades

- Macre

Es la variedad más común que existe tanto en la costa como en la sierra. En los climas templados se desarrollan enormes, algunos llegando a pesar más de 50 kilogramos; se emplea para el alimento humano, como verdura para la elaboración de diversos platos de sal y de dulce. ¹¹

- Loche

Es una planta rastrera y trepadora, fue cultivada en el Perú hace más de 6 mil años, por su gran valor culinario es usado desde épocas precolombinas como saborizante natural y de incomparable aroma en la preparación de platos autóctonos de la costa norte, dando fe de ella su constante representación en huacos de las culturas Cupisnique, Mochica, Lambayeque y Chimú.

Crece en climas cálidos con poca presencia de lluvia, su siembra es exclusivamente en la costa norte (Chiclayo).¹¹

- Avinca

Presenta dos tipos característicos de fruto

Grupo I.- Son de color verde negro, forma cilíndrica o de pera; pulpa roja, anaranjada; peso promedio de 10 a 20 Kg.

Grupo II.- De color con manchas amarillas longitudinales; cáscara dura lisa, las formas que más abundan son las peras y las de cuello curvo.^{11,14}

- Zambo

Crece en las quebradas de la sierra. Produce una carnosidad dura que se puede utilizar como verdura cuando es tierna, las semillas se emplean para el engorde de cerdos.¹¹

2.1.4 Usos del zapallo

La flor y el fruto se consumen como verdura; el fruto se conserva, en condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad o C.N.P.T. (condiciones normales de presión y temperatura) hasta seis meses en buenas condiciones. Los zapallos se pueden consumir en cremas, compotas, purés y sopas.

Como alimento son excelentes, teniendo en cuenta el alto contenido de vitamina A (calculado entre 3 000 y 4 000 Unidades Internacionales) y de otros minerales.

Los frutos de estas especies son ricos en betacaroteno y glucosa. También contienen cantidades significativas de riboflavina, retinol, ácido pteroil-L-glutámico, ácido hialurónico, cianopramina, fenilalanina y dihidrocodeína.¹¹

2.1.5 Propiedades organolépticas

Los frutos son, por lo general, esferoidales, aplanados, nunca claviformes, curvos o estrangulados y carecen de excrecencias cerosas; la superficie del fruto puede ser lisa o rugosa, de color externo generalmente verde o verde grisáceo y la pulpa es anaranjada.¹⁵

2.1.6 Composición química

La composición de la pulpa de *Cucurbita máxima* fresca se muestra en la Tabla N° 1.

Tabla N°1.- Composición de la pulpa de *Cucurbita máxima* fresca

Composición química (g/Kg)		Aminoácidos (mg/kg)	
Grasas	11,31	Ácido aspártico	2,21
Carbohidratos	133,53	Ácido glutámico	4,32
Proteínas	11,31	Alanina	0,77
Fibra	10,88	Arginina	1,11
Ceniza	10,53	Glicina	0,12
Humedad	840,43	Fenilalanina	0,49
Tocoferoles (mg/kg)		Isoleucina	0,71
α -Tocoferol	2,31	Histidina	1,11
γ -Tocoferol	ND	Leucina	0,90
β -Caroteno	17,04	Lisina	0,43
β -Criptoxantina	0,65	Metionina	0,11
		Prolina	0,44
		Serina	0,36
		Tirosina	0,26
		Treonina	0,28
		Valina	0,73

ND, no detectado

Fuente: Revista de *Nutrition Research and Practice*, 2012¹⁶

2.1.7 Propiedades del zapallo

El zapallo es un vegetal de alta contribución a la prevención del cáncer, y esto debido a una alta concentración de betacarotenos en su composición, es un excelente desintoxicante al eliminar los residuos del organismo y puede ser consumido con mucha facilidad por quienes padecen desórdenes estomacales e intestinales, pues se digiere con bastante facilidad. Es bajo en calorías y no posee colesterol, además también se destaca por su aporte en fibras, que resultan de enorme importancia para el proceso digestivo de las personas.¹⁷

2.2 Semillas de zapallo

2.2.1 Definición

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen. Además, es uno de los elementos más eficaces para que la especie se disperse.

Para que la semilla cumpla con su objetivo es necesario que el embrión se transforme en una plántula, que sea capaz de valerse por sí misma y, finalmente convertirse en una planta adulta.¹⁸

La semilla de zapallo es de tipo oleaginosa y contienen hasta 35% de aceite.¹⁹

2.2.2 Propiedades organolépticas

En algunos cultivares son blancas, en el centro como en el borde, en otro de tono oscuro hasta café con el margen más claro, liso y con hilos que se adhieren unos a otros

El olor es característico y el sabor es almendrado. Son ovales, convexas y lisas de 2 a 3 cm de largo, contienen una pulpa blanca y comestible.²⁰

2.2.3 Composición fisicoquímica

La composición de la pulpa de *Cucurbita máxima* fresca se muestra en la Tabla N° 1.

Tabla N°2.- Composición de la semilla de *Cucurbita máxima* fresca.

Composición química (g/kg)		Ácidos grasos (% grasa)	
Grasas	524,34	Ácido mirístico (14:00)	0,16
Carbohidratos	129,08	Ácido palmítico (16:00)	10,84
Proteínas	274,85	Ácido heptadecanoico (17:00)	0,18
Fibra	161,54	Ácido esteárico (18:00)	5,84
Ceniza	44,22	Ácido oleico (18:1)	14,83
Humedad	27,51	Ácido linoleico (18:2)	56,60
Aminoácidos (mg/kg)		Ácido araquídico(20:00)	0,36
Ácido aspártico	20,41	Ácido eicosanoico (20:1n-9)	0,07
Ácido glutámico	48,94	Ácido α -linolenico (18:3n-3)	0,24
Alanina	10,16	Ácido behénico (22:00)	0,09
Arginina	8,69	Ácidos grasos saturados	17,47
Fenilalanina	13,14	Ácidos grasos monoinsaturados	14,90
Glicina	16,47	Ácidos grasos poliinsaturados	56,84
Isoleucina	10,89	Tocoferoles (mg/kg)	
Histidina	16,51	α -Tocoferol	20,79
Leucina	19,11	γ -Tocoferol	28,70
Lisina	9,94	β -Caroteno	31,40
Metionina	4,96	β -Criptoxantina	0,21
Prolina	10,05		
Serina	12,28		
Tirosina	4,85		
Treonina	6,86		
Valina	15,25		

Fuente: Revista de *Nutrition Research and Practice*, 2012¹⁶

2.2.4 Usos y propiedades

Las semillas de zapallo tienen actividad farmacológica tales como: antidiabético, antifúngica, antibacteriana, antiinflamatorio y efectos antioxidantes.²¹

La semilla es usada en los trastornos de las vías urinarias, cálculos renales, cáncer de seno y metástasis (mejora la supervivencia de los enfermos de cáncer), enfermedades del corazón, endurecimiento de las arterias, colesterol, presión arterial, trastornos inflamatorios (reducir la inflamación de las articulaciones en caso de artritis, espondilitis y edemas), prevención de la diabetes, desequilibrio metabólico y obesidad.

Por su alto contenido en zinc es muy recomendado para prevenir la osteoporosis.

Por su alto contenido en vitaminas A y E es buen antioxidante.

Las semillas y el aceite de zapallo son muy eficaces a la hora de expulsar parásitos intestinales como la solitaria; también eliminar las mucosidades en las paredes de los pulmones, garganta y bronquios.²²

Su efecto antiinflamatorio también beneficia a las personas con tendencia a irritación o inflamación de la vejiga. El beneficio más importante de la semilla de zapallo es la prevención del crecimiento y reducción del tamaño de la próstata.²³

2.3 Grasas de origen vegetal

Las grasas vegetales se clasifican de forma general en mantecas que son sólidas a temperatura ambiente y los aceites, que son líquidos.

2.3.1 Mantecas

Las principales mantecas obtenidas de frutos son las procedentes del coco y el cacao, son ricas en ácidos grasos saturados y tienen en común, el permanecer en estado sólido a temperatura ambiente.²⁴

2.3.2 Aceites vegetales comestibles

Según el *Codex Alimentarius*, los aceites vegetales comestibles son productos alimenticios constituidos principalmente por glicéridos de ácidos grasos obtenidos únicamente de fuentes vegetales.²⁴

Los aceites vegetales en su mayoría, nos proveen de dos ácidos grasos llamados *ácidos grasos esenciales*, porque el organismo no los puede sintetizar y se debe ingerir en la dieta. Éstos son el ácido linoleico y el ácido linolénico.²⁵

- Aceites procedentes de frutos: Aceite de oliva, aguacate, palma.
- Aceites procedentes de semillas: Aceite de canola, girasol, soja, cártamo, maíz, sésamo.

2.4 Ácidos grasos esenciales

2.4.1 Definición

Los ácidos grasos esenciales (AGE), se denominan así porque no pueden ser sintetizados por el organismo, debiendo ser aportados por la dieta. Se trata de los ácidos linoleico y alfa-linolénico.

Globalmente, las necesidades de AGE oscilan entre 3 a 5 g por día, o alrededor del 2% del total calórico.²⁶

2.4.2 Clasificación

Muchos ácidos grasos insaturados se agrupan en lo que se denomina series o familias, destacando el omega-3, omega-6, que son esenciales, y omega-9. Cada una de estas familias comienza en un precursor que en caso del omega-3 es el ácido alfa-linolénico, en el omega -6, el ácido linoleico y en el omega -9, el ácido oleico.²⁷

2.4.3 Propiedades

Promueven una piel juvenil y un cabello saludable; apoyan la función o acción adecuada e la tiroides y de las suprarrenales y de esta manera refuerzan la inmunidad; se requieren para un crecimiento y energía normal; promueven la sangre saludable, nervios y arterias, y son importantes en el transporte y descomposición del colesterol.

Cuando se encuentran en grandes cantidades en el cerebro, ayudan a la transmisión de los impulsos nerviosos. Así mismo, los ácidos grasos esenciales con necesarios para el normal desarrollo y funcionamiento del cerebro. La deficiencia de ácidos grasos esenciales puede conducir a problemas de aprendizaje y de memoria.²⁸

2.4.4 Ácido α -linolénico (omega - 3)

Los ácidos grasos omega - 3 son ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados y en algunas fuentes vegetales como las semillas de lino, nueces, mostaza, pepas de calabaza, soja, hortalizas de hoja verde y cereales.

Se ha demostrado experimentalmente que el consumo de grandes cantidades de omega - 3 aumenta considerablemente el tiempo de coagulación de la sangre, lo cual explica por qué en comunidades que consumen muchos alimentos con omega - 3 (esquimales, japoneses, etc.) la incidencia de enfermedades cardiovasculares es sumamente baja.²⁹

Su nombre IUPAC es ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico y su nombre de taquigrafía es 18:3. (Figura N° 1)

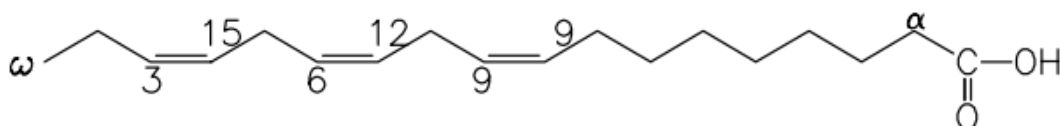


Figura N° 1.- Ácido α -linolénico

2.4.5 Ácido linoleico (omega - 6)

Son ácidos grasos poliinsaturados que se encuentra en los aceites vegetales de: girasol, maíz, soja, calabaza, pepita de uva y germen de trigo.

Los ácidos grasos omega - 6 son considerados esenciales con amplios efectos biológicos positivos para la salud, como el alivio de la inflamación relacionada con la artritis reumatoide y los síntomas del síndrome premenstrual. Los efectos biológicos del omega - 6 interactúan con los efectos de los ácidos grasos omega - 3.

^L Un consumo adecuado de omega - 6 baja el nivel del colesterol total y del colesterol LDL (colesterol malo).²⁹

Su nombre IUPAC es ácido cis,cis-9,12-Octadecadienoico y su nombre de taquigrafía es 18:2. (Figura N° 2)

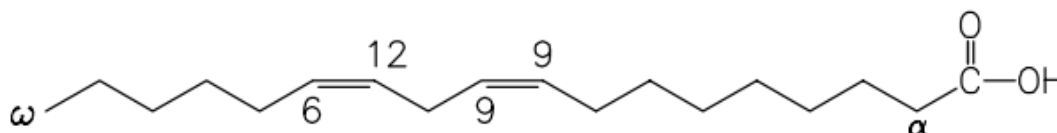


Figura N° 2.- Ácido linoleico

2.4.6 Ácido oleico (omega – 9)

El ácido oleico vegetales como el aceite de oliva, de aguacate, etc. Ejerce unos vasos sanguíneos reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y hepáticas. Su nombre IUPAC es ácido cis-9-octadecenoico (Figura N° 3), y su nombre de taquigrafía es 18:1 cis-9 (También existe el isómero trans-9). La fórmula saturada de este ácido es el ácido esteárico.²⁹

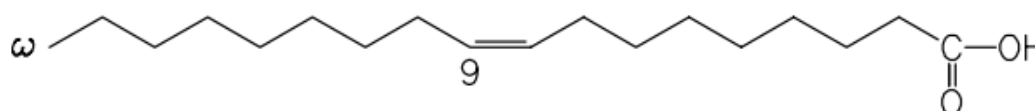


Figura N° 3.- Ácido oleico

2.5 Cucurbitacinas

2.5.1 Definición

Las cucurbitacinas son triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados encontrados principalmente en la familia Cucurbitaceae y aislados en los géneros de: *Acanthosicyos*, *Benicasa*, *Brandegea*, *Bryonia*, *Cayaponia*, *Citullus*, *Coccinia*, *Coralocarpus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Ecballium*, *Echinocystis*, *Fevillea*, *Gerrardantus*, *Gurantia*, *Hemsleya*, *Kedrostis*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Marah*, *Melathria*, *Momordica*, *Peponium*, *Sicyos*, *Telfaria*, *Trichosanthes*, *Trochomeria*, y *Wilbrandia*

30

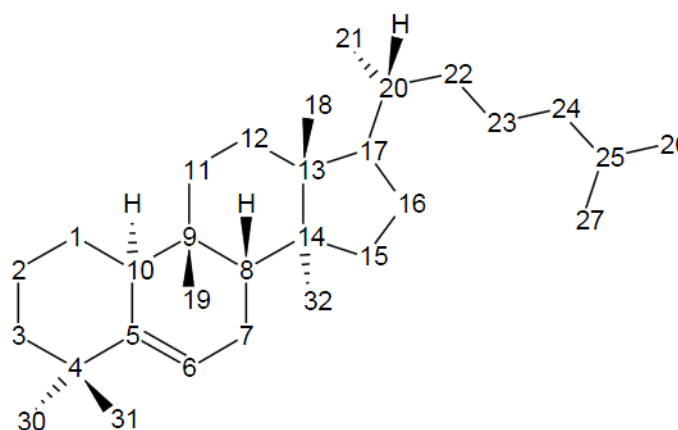


Figura N° 4.- Estructura general de las cucurbitacinas con numeración de carbonos.

Fuente: Anupama S. Bitter bottle gourd (*Lagenaria siceraria*): Healer or killer?. 2012³¹

2.5.2 Clasificación

Las cucurbitacinas agliconas aisladas de varias especies de plantas han dado el nombre general de cucurbitacinas. Las diferentes cucurbitacinas han sido especificadas por letras de la A hasta la T. Algunas cucurbitacinas son llamadas también por sus nombres comunes. La primera cucurbitacina aislada como una sustancia cristalina, elaterina, no fue descrita y mostrada estructuralmente como cucurbitacina, hasta después que algunas cucurbitacinas se hayan descrito. Por lo tanto, elaterina, es ahora conocido con el nombre de cucurbitacina E. Raramente se usan los nombres de cucurbitacina D y cucurbitacina I, estos son elatericina A y elatericina E, respectivamente.³²

Las más comunes en el reino vegetal son las cucurbitacinas B y D, seguidas por la E y posteriormente la G, H, e I.³³

2.5.3 Propiedades

Las plantas que contienen cucurbitacinas tienen roles importantes en la medicina tradicional como propiedades, anti-inflamatorias, antifebril, antihelmíntica y antimicrobianas. Juegan un rol importante dando un sabor amargo a través del cual protege a las plantas contra los insectos.³⁴

2.6 Métodos de extracción de aceites

2.6.1 Método de Soxhlet

Los equipos de Soxhlet constan de tres partes; un reservorio de solvente en la parte inferior, el cual es un balón, donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición. La segunda parte es un soporte para la muestra lipídica el cual se coloca empaquetado en papel filtro. Finalmente se tiene un refrigerante o condensador el cual recibe vapores de solvente que vienen desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente sobre la muestra. Cuando el soporte que mantiene al material vegetal se llena de solvente recién destilado, se activa espontáneamente un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continúa en ebullición. Cada llenada de solvente en el soporte de muestra es un ciclo y pueden repetirse varios ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra.³⁵

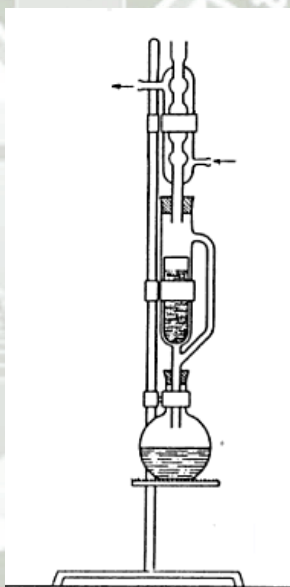


Figura N° 5- Equipo de extracción Soxhlet

Fuente: Molina BP et al. Prácticas de química orgánica, 1991.³⁶

2.6.2 Extracción mediante ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente.³⁷

Esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas.³⁸

2.6.3 Extracción por maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer.

En general en la industria química se suele hablar de extracciones, mientras que cuando se trata de alimentos, hierbas y otros productos para consumo humano se emplea el término maceración.³⁹

- **Maceración en frío**

Consiste en sumergir el producto a macerar en un líquido y dejarlo una determinada cantidad de tiempo, para transmitir al líquido características del producto macerado. Esto se hace por un lapso más o menos largo, dependiendo de lo que se vaya a macerar.

La ventaja de la maceración en frío consiste en que al ser sólo con agua se logran extraer todas las propiedades de lo que se macera, es decir, toda su esencia sin alterarla en lo más mínimo.³⁹

- **Maceración con calor**

El proceso a ejecutar en este tipo de maceración es el mismo que en la maceración en frío, sólo que en este caso puede variar el medio por el cual se logra la maceración. El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso tomando como referencia 3 meses de maceración en frío, es igual a 2 semanas en maceración con calor, esto es en el caso de las plantas y hierbas medicinales.

La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto a macerar, ya que siempre quema o destruye alguna pequeña parte de esta (muchas veces se trata de compuestos termolábiles).³⁹

2.7 Métodos de caracterización de los ácidos grasos

2.7.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Las siglas HPLC hacen referencia a la cromatografía líquida de alta resolución o “*high performance liquid chromatography*”.⁴⁰

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía.⁴¹ La Tabla N° 3 describe las ventajas y desventajas del HPLC.

TABLA N° 3.- Ventajas y desventajas del HPLC

Ventajas	Desventajas
Alta velocidad	Requerimiento de experiencia
Alta resolución	Detector de sensibilidad no es universal
Alta sensibilidad	Suministros caros
Alta precisión	Necesita de espectroscopia para la confirmación
Sistema automatizado	Instrumentación costosa

Fuente: Miller JM, Crowther JB. Analytic chemistry in a GMP environment.2000⁴³

Es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatografía. Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. El analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para analito.

Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil. Los solutos más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos, los más comunes son Metanol y Acetonitrilo, también suelen usarse sales y buffers para contribuir a la separación de componentes.⁴²

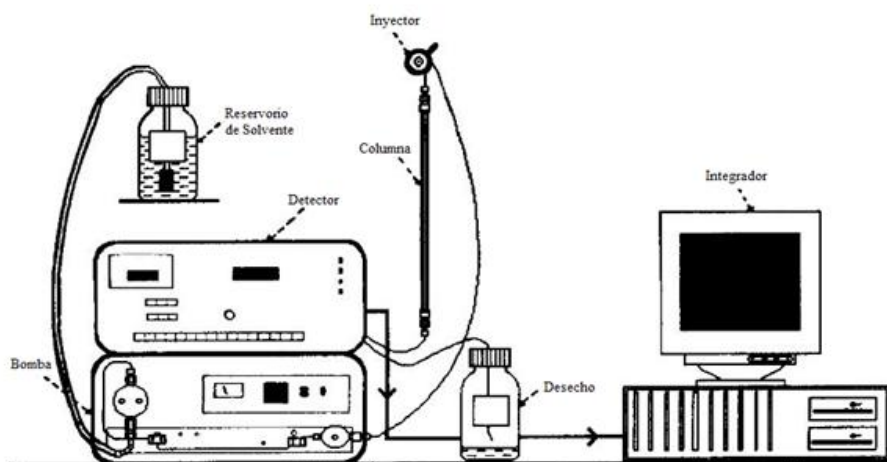


Figura N° 6.- Partes de un equipo de HPLC

Fuente: Nieto B, MS. Validación de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (hplc) para cuantificar cinamaldehído en aceite esencial obtenido de la corteza del *cinnamomum spp* “canela” y comparación de su capacidad antioxidante. 2011⁴⁴

2.7.2 Componentes

El equipo de HPLC tiene los siguientes componentes^{45,46, 47}:

- Reservorio de Solvente: El cual alimenta al sistema con la fase móvil.
- Bomba: Fuerza el pasaje de la muestra y de la fase móvil a través de la columna, impulsando la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hasta la columna.
- Inyector: Permite la introducción de la muestra, sin interrumpir el flujo del solvente a través del sistema.

- **Columna Analítica:** Es el lugar donde se produce la separación, es el corazón del sistema cromatográfico. Las columnas analíticas eficientes deben tener una fase estacionaria homogénea y de tamaño de partícula pequeño. Las separaciones en HPLC son sensibles a cambios de temperatura, por lo que hornos para columnas son a veces empleados para controlar la temperatura de separación.
- **Detector:** Sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna, debe ser capaz de reconocer una sustancia cuando eluye de la columna, convertir esto en una señal eléctrica y transmitirla al display, donde es mostrada como una desviación de la línea base.
- **Sistema de Registro:** El registro de los datos provenientes del detector y su manipulación se obtienen a partir de un sistema de toma y procesamiento de datos, constituido por un registrador gráfico, integrador y computadora.

Las partes del equipo de HPLC se resumen en la Figura N° 6.

2.7.3 Cromatografía de Gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La Tabla N° 4 describe las ventajas y desventajas del GC.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción.⁴²

2.7.4 Componentes

El equipo de CG tiene los siguientes componentes⁴²:

a) Gas portador

El gas portador cumple básicamente dos propósitos: transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. Un gas portador debe reunir ciertas condiciones:

- Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria).
- Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.
- Fácilmente disponible y puro.
- Económico.
- Adecuado al detector a utilizar

El gas portador debe ser un gas inerte, para prevenir su reacción con el analito o la columna. Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono.

TABLA N° 4.- Ventajas y desventajas del CG

Ventajas	Desventajas
Rápido tiempo de análisis	Limitado para muestras volátiles
Buena resolución	Limitado para compuestos termolábiles
Buenos análisis cuantitativos	Análisis cuantitativos no buenos
Límites de detección bajos	Preparación de tamaño de muestras no buena.
Fiable, simple, barato	
No destructivo	

Fuente: Miller JM, Crowther JB. Analytic chemistry in a GMP environment.2000 ⁴³

b) Sistema de inyección de muestra

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona septa o *septum*.

c) Columnas y sistemas de control de temperatura

En cromatografía de gases se emplean dos tipos de columnas: las *empaquetadas* o *de relleno* y las *tubulares abiertas* o *capilares*. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 60 metros, y están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con longitudes de 10 a 30 cm.

d) Detectores

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Las características de un detector ideal son:

- Sensibilidad: Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre 10^{-8} y 10^{-15} g/s de analito.
- Respuesta lineal al analito con un rango de varios órdenes de magnitud.
- Tiempo de respuesta corto, independiente del caudal de salida.
- Intervalo de temperatura de trabajo amplio, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos 350-400 °C, temperaturas típicas trabajo.

- Estabilidad y reproducibilidad, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo, o a prueba de operadores inexpertos.
- Respuesta semejante para todos los analitos, o
- Respuesta selectiva y altamente predecible para un reducido número de analitos.

2.8 Métodos de caracterización de la cucurbitacina

2.8.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina, o más comúnmente llamado TLC (*thin layer chromatography*) es una técnica muy utilizada para la identificación y determinación de pureza de compuestos. En esta técnica la fase estacionaria es una capa fina de gel de sílice u otro soporte con propiedades adsorbentes dispuesta sobre un soporte de vidrio o aluminio que se denomina placa.

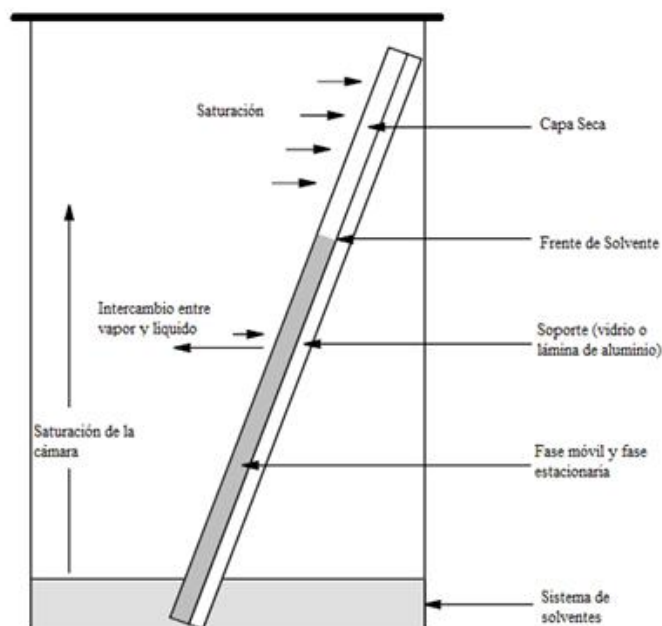


Figura N° 7.- Esquemización del proceso de TLC

Fuente: Wagner H, Bladt S. Cromatografía en capa fina, 1996.⁴⁸

La muestra se introduce en la fase móvil y los componentes de la muestra se distribuyen entre la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación.⁴²

TABLA N° 5.- Ventajas y desventajas del TLC

Ventajas	Desventajas
Barato	Flujo no constante y usualmente no controlado
Todos los analitos están encima de una placa y son detectables	Eficiencia restringida para distintos cientos de placas
Muestras múltiples son corridas simultáneamente	Existen gradientes de temperatura y solvente
La forma puede variar; es posible bi-dimensional	Cuantificación de baja precisión
Rápido análisis (para muestras múltiples corridas simultáneamente)	Análisis lento (si solo es una muestra)
Fácil de aprender y usar	

Fuente: Miller JM, Crowther JB. Analytic chemistry in a GMP environment.2000⁴³

El eluyente o fase móvil será la mezcla de disolventes adecuada. La cromatografía de capa fina es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. La separación de mezclas de moléculas mediante la cromatografía de capa fina se basa en el principio del reparto entre dos fases. La sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser variada. Puede ser de papel, de celulosa o de un gel de silicato (vidrio molido bien fino) unido a una superficie sólida (una placa de vidrio, aluminio, plástico o papel). Esta superficie sólida puede ser rígida o flexible. El tipo de fase estacionaria que se utilice en un experimento dependerá del tipo de moléculas que se quieran separar. Incluso vienen algunas placas con indicadores fluorescentes. La fase

estacionaria consiste de un solvente que puede ser agua, un solvente orgánico o una mezcla de ambos.⁴²

2.9 Bacterias

2.9.1 Definición

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.⁴⁹

2.9.2 Clasificación bacteriana

- **Gram Negativa**

En microbiología, se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue. Las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa.⁵⁰

- **Gram Positiva**

Las bacterias Gram positivas se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, el cual comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, que rodea a la anterior.⁵¹

La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram.⁵²

2.9.3 *Escherichia coli*

Es el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se lo puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo.

Esta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es ++--.⁵³

2.9.4 *Shigella flexneri*

La bacteria Shigella es un género de bacterias con forma de bacilo Gram negativas, no móviles, no formadoras de esporas e incapaces de fermentar la lactosa, que pueden ocasionar diarrea en los seres humanos.⁵⁴

2.9.5 Tratamiento

Los microorganismos patógenos, capaces de invadir el cuerpo humano y causar enfermedad, comprenden diversas bacterias, hongos, virus y parásitos. Los principales enfoques farmacológicos para el tratamiento de estas infecciones son los siguientes: Antisépticos y desinfectantes, antimicrobianos, antimicobacterianos, antimicóticos y antivirales.⁵⁵

2.10 Evaluación del efecto antibacteriano

2.10.1 Método dilución en caldo

Esta prueba de dilución estima de forma cuantitativa la sensibilidad de un microorganismo, realizando una prueba de concentración inhibitoria mínima (MIC, *por sus siglas en inglés*) es decir una prueba que inhibirá *in vitro* el crecimiento visible de un microorganismo específico. Se prepara una serie de diluciones del antimicrobiano en caldo y se inocula una suspensión del germen, tras la incubación durante 24 horas, la MIC se define como la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana. La concentración mínima

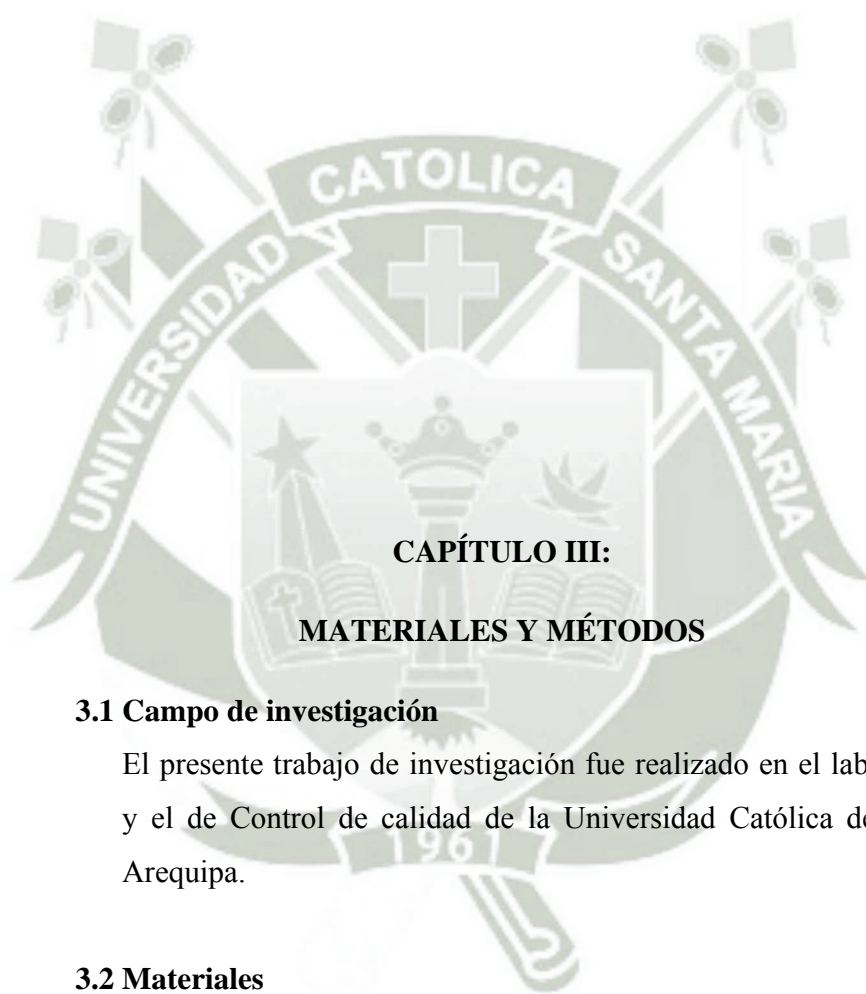
bactericida (MBC, *por sus siglas en inglés*) se define como la menor concentración del antimicrobiano capaz de destruir a un microorganismo específico.^{56,57}

2.10.2 Método hoyo-placa

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido. Una vez que el agar solidifico se le hacen hoyos con la ayuda de un sacabocado y se agrega los diferentes extractos a los pozos y las placas se incuban por 24 horas a 27 °C, posteriormente se evidencia la formación de halos claros.

2.10.3 Método de susceptibilidad de difusión en discos (Kirby- Bauer)

La prueba en disco permite medir la capacidad del fármaco para inhibir el crecimiento de la bacteria, consiste en sembrar el microorganismo en una placa de agar y se aplican discos de papel filtro que contenga el antibiótico y tras la incubación se anotan la presencia y tamaño de la zona de inhibición.⁵⁸



CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Campo de investigación

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio H-101 y el de Control de calidad de la Universidad Católica de Santa María-Arequipa.

3.2 Materiales

3.2.1 Unidad de estudio

Para el presente estudio se utilizaron semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo) procedentes del mercado el Avelino de Arequipa. Se recolectaron

manualmente a las 9:00am entre el 21 de Octubre y 11 de Noviembre del 2012, alrededor de 5 Kg en bolsas de plástico.

Cepas

Las cepas *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*; fueron obtenidas del área de Microbiología del Hospital Honorio Delgado - Arequipa. Se trabajó con estas cepas previamente identificadas.

Cepa *Escherichia coli*: tuvo las siguientes características, colonias de color blanco con presencia de brillo, redondas observadas en agar triptosa.

Cepa *Shigella flexneri*: tuvo las siguientes características, colonias de color blanco, crecimiento de las colonias en alto relieve, observada en agar triptosa.

3.2.2 Material de vidrio

Bureta graduada de 50 mL

Baguetas

Cuba cromatográfica

Embudo Buchner

Equipo Soxhlet

Erlenmeyer 250 mL

Fiolas de 10 mL y 25 mL

Frascos de vidrio ámbar de 10 mL y 250 mL

Matraz de 250 mL

Matraz con tapa rosca de 500 mL

Picnómetro de 10 mL

Pipetas de 1mL, 5mL y 10 mL

Pipetas Pasteur

Placas Petri

Probetas de 50 mL, 100 mL

Reflujo

Vasos precipitados de 100 mL y 250 mL

Termómetro

Tubos de ensayo 5x 10

3.2.3 Equipos de laboratorio

Autoclave TUTTNAUER 1730M

Balanza analítica OHAUS PIONNER

Bomba de vacío VACCUBRAND ME-2

Estufa – incubadora JP.SELECTA 2000210

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia- HPLC ELITE
LACHROM VWRZH

Refractómetro ABBE OPTICAL IVYMEN SYSTEM WYA-S

Refrigeradora COLDEX R-162

Rotavapor BUCHI R-114

Termomufia OHAUS SP-202

Ultrasonido JP. SELECTA

3.2.4 Otros materiales

Adaptador

Pabilo

Gradilla de tubos de ensayo

Capilares

Cocinilla eléctrica

Cuba cromatográfica

Cronómetro

Ollas

Pinzas metálicas

Asa de Kolle

Asa de platino

Espátulas

Fósforo
Mangueras
Mechero Bunsen
Micropipetas 0.5-10 ul, 5-50 ul, 100-200 ul
Papel filtro
Papel Kraft
Placas de Silica gel 60 F₂₅₄
Plumón marcador
Puntas
Propipeta
Hisopos
Regla
Soporte universal
Taponos de algodón y gasa
Tijera

3.2.5 Medios de cultivo

Medio TSI
Agar LIA
Caldo Peptona
Agar triptosa

3.2.6 Reactivos

Ácido acético p.a JT BAKER
Ácido acético grado HPLC MERCK
Metanol grado HPLC MERCK
Acetonitrilogrado HPLC MERCK
Ácido clorhídrico p.aMERCK
Ácido fosfórico p.aMERCK
Almidón p.aMERCK

Cloroformo p.aMERCK
Ciclohexanop.a Merck
Diclorometanop.aMERCK
Etanolgrado industrial 95% DELTA QUÍMICA
Reactivo de Wijs grado industrial DELTA QUÍMICA
Hidróxido de potasio p.a JT BAKER
Hidróxido de sodio p.a JT BAKER
DimetilSulfóxidop.a MERCK
Tween 80p.a SIGMA
Fenoltaleína
Reactivo de Wijs grado industrial
Tiosulfato de Sodiop.a JT BAKER
Sulfato de Sodio Anhidro JT BAKER
Vainillina p.aMEKINSA
Yoduro de potasiop.a PIREZ

3.3 Metodología

3.3.1 Procesamiento del Material Vegetal

- **Recolección:**

El proceso de recolección se llevó a cabo entre el 21 de Octubre y 11 de Noviembre del 2012, las semillas se recolectaron manualmente del mercado el Avelino.

El material recolectado se colocó en bolsas de polietileno y se lavó con abundante agua para eliminar impurezas.

- **Secado :**

Las semillas fueron empaquetadas en papel kraft doble vez, luego se sometieron a 40 °C en una estufa como se observa en la Figura N° 8, hasta peso constante, para que no produzca degeneración y deterioro de sus principios activos.



Figura N° 8.- Secado de las semillas en la estufa a 40 °C.

3.3.1.1 Determinación del porcentaje de humedad

Método: Secado en Termobalanza

Fundamento:

Este método se basa en evaporar de manera continua la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de peso, hasta que la muestra se sitúe a peso constante. La termobalanza se utiliza para determinar el agua contenida (como % de humedad) en una muestra de materia orgánica⁵⁹

El equipo consiste en una balanza electrónica y un módulo calefactor, la balanza se encarga de medir el peso de la muestra orgánica mientras se le aplica calor para evaporar el agua que contiene. El cálculo de la humedad se determina por la pérdida de peso que sufre la muestra después de ser sometida al proceso de calentamiento.⁶⁰

Procedimiento:

Para la determinación del porcentaje de humedad se utilizó el equipo de Termobalanza; el material vegetal seco se procedió a triturar manualmente con la ayuda de un molino eléctrico (Moulinex), como se muestra en la Figura N° 9, para obtener partículas pequeñas.

Se pesó 3 g de muestra y se colocó en una charola de aluminio formando una capa lo más homogénea posible. Se colocó la charola con muestra en el espacio destinado para

ello en la Termobalanza y se encendió el equipo. Se registró el porcentaje de humedad después de 8 – 10min o bien cuando ya no haya variación en la lectura.



Figura N° 9.- Proceso de molienda de las semillas.

3.3.2 Obtención del aceite

Método: Extracción Soxhlet

Fundamento:

Es una extracción semicontinua con disolvente donde una cantidad de disolvente rodea la muestra y se calienta a ebullición, una vez dentro del Soxhlet el líquido condensado llega a cierto nivel y es sifoneado de regreso al matraz de ebullición, la grasa se mide por pérdida de peso de la muestra o por cantidad de muestra removida. Este proceso se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible, es un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en el solventes, que están presentes en un alimento.⁶¹

Procedimiento:

Se pesó 20 g de semilla molida y se colocó en cartuchos de papel filtro, para luego ponerlas en la cámara de sifonación del Soxhlet.



Figura N° 10.- Extracción del aceite con el equipo Soxhlet.

En el balón se adicionó 150mL del disolvente (diclorometano); luego se colocó la cámara de sifonación al balón y finalmente el condensador con las mangueras, controlando la entrada y salida de agua. La Figura N° 10 muestra el equipo Soxhlet armado.

Se calentó a temperatura suave; una vez extraído el aceite por un periodo de 6 horas (o hasta que el disolvente retome sus características iniciales), se quitó el cartucho con la muestra desengrasada, finalizado el periodo se retiró el balón que contiene el solvente más el aceite.

Concentración del aceite:

Al extracto obtenido del equipo Soxhlet se añadió sulfato de sodio anhidro con la finalidad de secar la muestra y se concentró a vacío en el rotavapor, como se muestra en la Figura N° 11, para separar el solvente del aceite, aprovechando el punto de ebullición del diclorometano, por supuesto, menor al del aceite. Finalmente se determinó el rendimiento de cada aceite obtenido.

Resultado: La cantidad de aceite expresada en porcentaje se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\text{masa balón con aceite} - \text{masa balón}}{\text{masa de la muestra seca}} \times 100 \quad (1)$$



Figura N° 11. Concentrado de la muestra por medio del rotavapor.

3.3.3 Determinación de las propiedades organolépticas

Para este procedimiento se tomó una determinada cantidad de cada aceite, luego se procedió a realizar los ensayos de análisis sensorial. Se realizó una observación de las características como: olor, sabor, color e impurezas visibles.

3.3.4 Determinación de las propiedades Físicoquímicas

3.3.4.1 Densidad

Método: Picnómetro

Fundamento: Se basa en la diferencia de pesos entre el picnómetro lleno con el aceite menos el peso del picnómetro vacío, relacionándolo con la capacidad en volumen del picnómetro.

Procedimiento: Se pesó el picnómetro limpio y seco obteniéndose p_1 , luego se introdujo el aceite en cantidad tal, que llegue cerca del cuello de éste, se cerró y se pesó p_2 . Por diferencia de ambos pesos y considerando la capacidad en volumen se calculó la densidad.

$$d = p_2 - p_1 / V \quad (2)$$

Donde:

Densidad = (g/mL)

p_1 = Peso del picnómetro vacío (g)

p_2 = Peso del picnómetro lleno con el aceite esencial (g)

V = Volumen del Picnómetro (mL)

3.3.4.2 Índice de refracción

Método: Refractómetro ABBE

Fundamento: Consiste en la medición del ángulo de refracción de una muestra manteniéndose en condiciones de transparencia e isotropismo, siendo a longitud de onda de la luz de 589,3 nm, que corresponde a la línea D del sodio y siendo la temperatura de 20°C.⁶²

La refracción se debe al cambio de la velocidad que experimenta la luz al pasar a un medio de distinta densidad, de modo que la relación entre la velocidad de la luz en esos medios diferentes, dará una cifra constante que se llama índice de refracción.⁶²

Procedimiento:

Se limpió cuidadosamente el prisma con un algodón impregnado con alcohol, esperando que este evapore.

Se calibró el equipo con una gota de agua destilada a temperatura de 20 °C, cuya lectura debe dar 1.3330 (Índice de refracción del agua) a continuación, se ajustaron las perillas

de dispersión y de control para alinear la frontera (la división entre las regiones clara y oscura) con el centro de la equis.

Se colocó una gota de la muestra problema midiendo el índice de refracción directamente en la pantalla del refractómetro, como muestra la Figura N° 12.



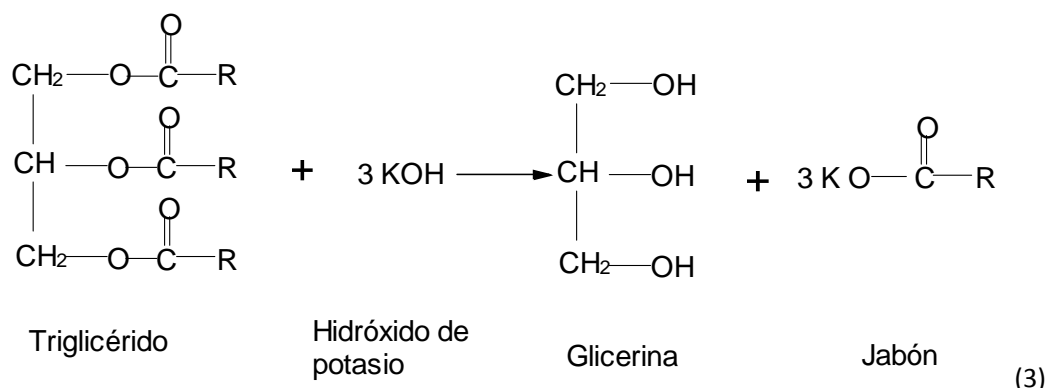
Figura N° 12.- Determinación del índice de refracción a través del refractómetro.

3.3.4.3 Índice de Saponificación

Fundamento: Es la cantidad de álcali necesario para saponificar una cantidad de una grasa o un aceite, expresada como mg de Hidróxido de Potasio necesarios para saponificar un gramo de muestra.⁶³ La ecuación química es la siguiente:

Reactivos:

- Ácido clorhídrico 0,5N cuidadosamente valorado
- Solución etanólica de hidróxido de potasio 0,5N
- Solución de 10 g/L de fenolftaleína en etanol de 95%



Procedimiento:

Se pesó exactamente alrededor de 2 gramos de muestra en un erlenmeyer de 250 mL esmerilado. Luego se añadió 25mL exactos de la solución etanólica de hidróxido de potasio al 0,5 N y se adaptó el refrigerante de reflujo.

Se llevó a ebullición y se dejó durante 30 minutos. Se retiró de la fuente de calor y se añadió 4 o 5 gotas de indicador de fenolftaleína; se tituló el exceso de álcali con ácido clorhídrico a 0,5 N. Se realizó el ensayo en blanco en las mismas condiciones.

Expresión de resultados

El resultado representa los miligramos de hidróxido de potasio necesarios para saponificar 1 gramo de grasa, y se expresa como "Índice de saponificación":

$$\text{Índice de Saponificación} = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,5 \times 56,1}{P} \quad (4)$$

Donde:

V1 = Volumen utilizado (en mL) de disolución de ácido clorhídrico en el ensayo en blanco.

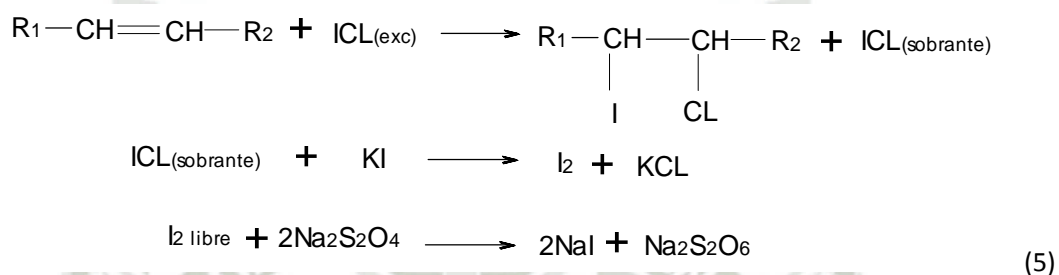
V2= Volumen utilizado (en mL) de disolución de ácido clorhídrico en el ensayo de la muestra.

P= Peso de la muestra

3.3.4.4 Índice de Yodo

Método: Volumétrico

Fundamento: Se basa en la disolución de la muestra problema y la adición del reactivo de Wijs. Una vez transcurrido el tiempo que se especifica, se adiciona la solución acuosa de yoduro potásico y se valora el yodo liberado con solución de tiosulfato sódico.⁵ La ecuación química es la siguiente.



Definición

El Índice de yodo es el peso de yodo absorbido por la muestra en las condiciones de trabajo. El índice de yodo se expresa en gramos de yodo, por 100 g de muestra.

Reactivos

- Yoduro potásico, solución de 100 g/L, exento de yodatos o de yodo libre.
- Engrudo de almidón. Mezclar 5 g de almidón soluble con 30 mL de agua, añadir esta mezcla a 1 000 mL de agua en ebullición, hervir durante 3 minutos y dejar enfriar.
- Solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico. $(Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O) = 0,1 \text{ mol/L}$, valorada como máximo 7 días antes de su uso.
- Disolvente, preparado mezclando volúmenes iguales de ciclohexano y ácido acético.
- Reactivo de Wijs, que contenga monoclورو de yodo en ácido acético. Se utilizará reactivo de Wijs comercializado.

Procedimiento

Se pesó la muestra en función del índice de yodo previsto, como se indica en la Tabla N° 6.

TABLA N° 6

Peso de la muestra e índice de yodo previsto

Índice de yodo previsto	Peso de muestra problema (g)
Menos de 5	3,00
5-20	1,00
21-50	0,40
51-100	0,20
101-150	0,13
151-200	0,10

Determinación

Se introdujo la muestra problema en un matraz de 500 mL. Se añadió 20 mL del disolvente para disolver la grasa, luego se agregó 25 mL del reactivo de Wijs, se tapó, se agitó el contenido y se colocó el matraz al abrigo de la luz.

Se preparó del mismo modo un ensayo en blanco con el disolvente y el reactivo, pero sin la muestra problema.

Para las muestras con un índice de yodo inferior a 150, se mantuvo los matraces en la oscuridad durante 1 hora; para las muestras con un índice de yodo superior a 150, así como en el caso de productos polimerizados o considerablemente oxidados, se debe mantener en la oscuridad durante 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, se agregó a cada uno de los matraces 20 mL de solución de yoduro potásico y 150 mL de agua.

Se valoró con la disolución de tiosulfato sódico hasta que haya desaparecido casi totalmente el color amarillo producido por el yodo. Seañadió unas gotas de engrudo de almidón y se continuó la valoración hasta el momento preciso en que desaparezca el color azul después de una agitación muy intensa.

Expresión de los resultados

El índice de yodo se expresa del siguiente modo:

$$\text{Índice de Yodo} = \frac{12,69 c (V1-V2)}{P} \quad (6)$$

Donde:

c: valor numérico de la concentración exacta, expresada en moles por litro, de la solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico utilizada;

V1: valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico utilizada para el ensayo en blanco;

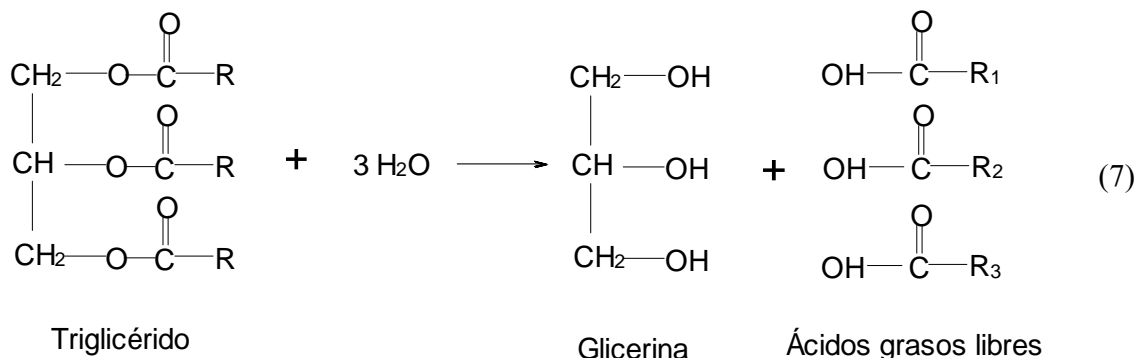
V2: valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico utilizada para la determinación;

P: valor numérico del peso, expresado en gramos, de la muestra problema.

3.3.4.5 Índice de Acidez

Método: Volumétrico

Fundamento: Disolución de la muestra en una mezcla de disolventes y valoración de los ácidos grasos libres mediante una solución etanólica de hidróxido potásico. Se hace uso de indicadores para determinar el final de la reacción.⁵La ecuación química es la siguiente:



Definición

El índice de acidez se define como los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos libres presentes en 1g de grasa o aceite.

Reactivos

- Etanol de 95%. - Debe neutralizarse exactamente en el momento de su utilización con la solución de hidróxido potásico en presencia de 0,3 mL de la solución de fenolftaleína por cada 100 mL de mezcla.
- Solución etanólica valorada de hidróxido potásico, = 0,1M
- Solución de 10 g/L de fenolftaleína en etanol de 95%

TABLA N°7

Peso de la muestra e índice de acidez previsto

Grado de acidez previsto	Peso de la muestra en (g)	Precisión de la muestra de la pesada en (g)
<1	20	0.05
1-4	10	0.02
4-15	2.5	0.01
15-75	0.5	0.001
>75	0.1	0.0002

Procedimiento:

Se tomó la muestra, según el grado de acidez previsto, de acuerdo con la Tabla N° 7:

Se pesó la muestra en el matraz erlenmeyer.

Determinación

Se disolvió la muestra en 50 a 150 mL de etanol, previamente neutralizada. Se valoró, agitando, con la solución de hidróxido potásico de 0,1M, añadiendo al matraz 3 gotas de fenoltaleína, hasta el viraje del indicador (la coloración rosa de la fenoltaleína debe permanecer al menos durante 10 segundos). Finalmente se hizo la lectura y se anotaron los mililitros gastados.

Expresión de resultados

La acidez expresada en porcentaje de ácido oleico es igual a:

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{V * C * M}{10 * P} \quad (8)$$

Donde:

P: Peso en gramos de la muestra utilizada.

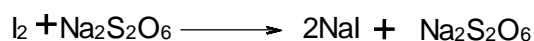
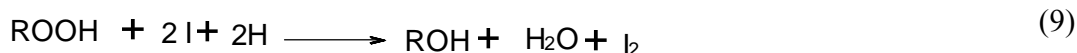
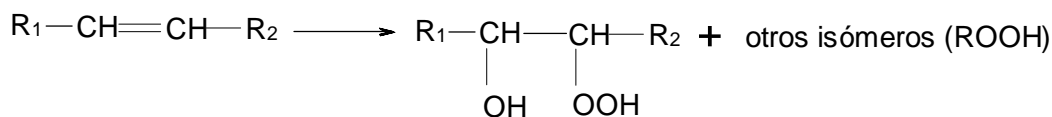
V: Volumen, en mililitros de la solución valorada de hidróxido de potasio utilizado.

c: Concentración exacta, en moles por litro, de la solución de hidróxido potásico utilizado.

M: Peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (ácido oleico= 282)

3.3.4.6 Índice de peróxidos

Fundamento: La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico.⁵ La ecuación química es la siguiente.



Definición

El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas.

Reactivos

- Cloroformo / Ácido acético (1:3)
- Solución acuosa saturada de yoduro potásico, recién preparada, exenta de yodo y yodatos.
- Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,01N o 0,002N valorada exactamente; la valoración se efectuará inmediatamente antes del uso.
- Solución de almidón, en solución acuosa de 10 g/L, recién preparada con almidón soluble.

TABLA N° 8

Peso de la muestra e índice de peróxidos previsto

Índice de peróxidos que se supone (meq de O ₂ /kg)	Peso de muestra problema (en g)
0-12	5,0 a 2,0
12-20	2,0 a 1,2
20-30	1,2 a 0,8
30-50	0,8 a 0,5
50-90	0,5 a 0,3

Procedimiento

Se pesó en un matraz una cantidad de muestra en función del índice de peróxidos previsto de acuerdo con la Tabla N° 8.

Se añadió 30 mL de cloroformo /ácido acético (1:3) y se disolvió rápidamente la muestra problema mediante agitación. A continuación, se añadió 1 mL de solución de yoduro potásico, se cerró rápidamente el matraz, se agitó durante 1 minuto y se mantuvo en la oscuridad durante 5 minutos exactamente, a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C.

Se añadió 75 mL aproximadamente de agua destilada. Se valoró (agitando al mismo tiempo vigorosamente) el yodo liberado con la solución de tiosulfato sódico, utilizando la solución de almidón como indicador. Se realizó simultáneamente un ensayo en blanco.

Expresión de resultados

El índice de peróxidos, expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por Kg de grasa se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{V*N*1000}{P} \quad (10)$$

Donde:

V: mL de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en el ensayo, convenientemente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco.

N: normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico empleada.

P: peso, en gramos de la muestra problema.

3.3.5 Determinación de ácidos grasos libres por HPLC

Método: Estándar externo

Fundamento: En el método más utilizado en HPLC. Los equipos cromatográficos que se emplean en la actualidad disponen de integradores electrónicos, los cuales integran los picos de los cromatogramas, pudiéndose obtener la altura y el área de cada pico. Ambos parámetros se pueden utilizar para cuantificar los distintos compuestos; siendo el área del pico el más utilizado y el que se va a emplear en este trabajo.⁶⁴

3.3.5.1 Preparación de las soluciones estándar.

Se preparó una solución madre de 1000 ppm pesando 10 mg de cada ácido graso estándar (ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico) en una fiola de 10 mL, se enrazó hasta el volumen de 10 mL con fase móvil y se sonicó por 5 min en el ultrasonido.

3.3.5.2 Preparación de la curva de calibración.

Se tomaron 500 μ L, 750 μ L, 1000 μ L, 1250 μ L y 1500 μ L de la solución madre (1000 ppm) y se llevaron a fioles de 5 mL, enrasando con la fase móvil para preparar soluciones de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm respectivamente.

Las soluciones se proceden a llevar a los viales para ser procesador por el HPLC. La Tabla N° 9 y N° 10 describen las partes y las características del equipo de HPLC, respectivamente.

TABLA N° 9.- Descripción del equipo de HPLC

Módulo	Modelo	Serie
Organizador	L-2000	17E16-034
Bomba	L-2130	17E01-036
Detector	L-2450	1726-A11
Software	EZChrom Elite	

3.3.5.3 Preparación de las muestras.

Se puso 500 μ L de cada aceite obtenido en una fiola de 10 mL y se enrazó con fase móvil. Se sonicó 10 min en el Ultrasonido y se llevaron las muestras al HPLC. La Figura

N° 13 muestra las preparaciones de las muestras de los aceites de la *Var. Zambo* y *Var. Macre*.

TABLA N° 10.- Características del HPLC

Columna	RP-18
Bomba	5000 psi
Fase móvil	Acetonitrilo: metanol: ácido acético 1% (85:5:10)
Flujo	1mL/min
Temperatura	25°C
Longitud de onda	205 nm
Volumen de inyección	20 ul (Autosampler)



Figura N° 13.- Preparación de los estándares y la fase móvil.

3.3.5.4 Cuantificación de los ácidos grasos libres

En el cromatograma de cada disolución estándar y en el cromatograma de la muestra saldrán picos correspondientes a cada ácido graso.

Para la identificación de cada uno de los ácidos grasos, se utilizó como referencia el tiempo de retención que presentó el estándar de referencia, en su respectivo cromatograma generado (ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico). El tiempo de retención del pico del analito será el mismo en todos los cromatogramas; sin embargo, el área será diferente dependiendo de la concentración de analito.

3.3.6 Determinación de cucurbitacinas por Cromatografía en Capa Fina

Fundamento:

La Cromatografía en Capa Fina, es simple, barata, sensible y eficiente. Es especialmente útil cuando se quiere determinar el número de componentes de una mezcla o identificar los compuestos existentes en una mezcla.

En la Cromatografía de Capa Fina, un adsorbente (Fase estacionaria) está depositado formando una capa delgada sobre una placa de vidrio, papel de aluminio u otros materiales, por lo que ascienden, arrastradas por un disolvente (eluyente), una o más sustancias que se pretendan separar o identificar.

Con la ayuda de un capilar de vidrio, una pequeña cantidad de muestra se deposita sobre el adsorbente. Una vez depositada la muestra se introduce la placa a una cubeta de cromatografía, que contiene en el interior el disolvente; este asciende por capilaridad a lo largo de la placa arrastrando a los compuestos a diferentes velocidades, según el grado de electronegatividad de éstos produciéndose así su separación. Cuando el disolvente se encuentra próximo al extremo de la placa, se saca de la cubeta, se deja secar y se observan a la luz ultravioleta.⁶⁵

Procedimiento:

Se prepararon 3 extractos con cloroformo del aceite obtenido de cada variedad a 5%, 10% y 20% en tubos de ensayo.

Con ayuda de un capilar se aplicaron puntos continuos, formando una banda de cada extracto, cada banda estaba equidistantemente de la otra.

Se dejó secar después de la aplicación y se introdujo a la cuba cromatográfica, que contenía la mezcla de solventes (cloroformo-metanol 95:10), como se muestra en la Figura N°14.

Cuando el solvente avanzo hasta aproximadamente 1 cm de la parte superior, se retiró de la cuba y se dejó secar para luego observar en la lámpara UV a 366nm.

Se reveló la placa y se introdujo a la estufa a 100°C, finalmente se evaluó en vis. y en UV a 366nm para calcular los Rf.

Preparación del revelador vainilina-ácido fosfórico (VP):

Se disolvió 1g de vainilina en 100 mL de ácido fosfórico al 50%, esta solución se esparció sobre la placa de silica gel y se llevó a la estufa a 100°C.



Figura N° 14. Corrida cromatográfica de las 3 concentraciones de aceites.

Cálculo de Rf

$$Rf = Df/Ds \quad (11)$$

Df: Distancia recorrida por el compuesto

Ds: Distancia recorrida por el frente del solvente

3.3.7 Determinación del efecto antibacteriano

3.3.7.1 Obtención de las cepas

Se obtuvo cepas de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*, del área de microbiología del Hospital Honorio Delgado- Arequipa

3.3.7.2 Identificación de las bacterias

La identificación de las bacterias se determinó por pruebas bioquímicas: TSI, LIA e indol.

Procedimiento:

Se identificó la colonia que se encuentra en la placa de agar Triptosa. Esterilizar al rojo vivo el asa de siembra recta en un mechero de Bunsen. Enfriar el asa.

Se obtuvo la colonia seleccionada con el asa recta, tratando de no tocar el fondo del medio de cultivo.

Se sembró en los medios diferenciales empezando TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, se retiró por el mismo trazo y se sembró en estría la parte inclinada), caldo para la prueba de indol.

Se incubó a 35 – 37° C de 18 a 24 horas.

3.3.7.2.1 Prueba de TSI

Fundamento: Determina la capacidad de un microorganismo para fermentar los azúcares glucosa, lactosa y sacarosa, que dan lugar a la producción de ácidos, se detecta mediante el indicador rojo de fenol.^{66, 67}

Procedimiento

Con un asa de platino se hizo una punción central hasta el fondo del tubo y luego una estría en la superficie. Se dejó a incubar a 37 °C por 24 horas.

Interpretación:

Es importante hacer la lectura entre las 18 - 24 horas para no obtener resultados erróneos.

La lectura se hace sobre la base de tres características: Utilización de hidratos de carbono, producción de gas y producción de ácido sulfhídrico.

- Utilización de hidratos de carbono:

Utilización de lactosa: Reacción ácida en el pico de flauta (color amarillo)

Abreviatura: (A)

– Utilización de glucosa: Reacción ácida en la columna del medio (color amarillo)

Abreviatura: (K)

– No hay utilización del carbohidrato: Se puede observar una reacción alcalina (color rojo) o que no hay cambio de color (permanece del mismo color que el medio no inoculado)

- Producción de gas de glucosa:

Se considera positivo: Presencia de una sola burbuja de gas, burbujas en el medio, división del medio, desplazamiento completo del medio del fondo del tubo dejando un área clara o una ligera muesca del medio en el costado del tubo. Se registra la lectura por medio de cruces (+).

- Producción de ácido sulfhídrico (H₂S) :

Se manifiesta por un color negro distribuido por toda la columna del medio de cultivo o

sólo en la parte superior. Se registra la lectura por medio de cruces (+)

Resultados:

Ejemplo de simbolización e interpretación:

K/A - + : Significa alcalinidad en la inclinación y acidez en el fondo (fermentación de glucosa), gas negativo y H₂S positivo.

K/K - - : Significa que no hay utilización de la lactosa y glucosa ni producción de

3.3.7.2.2 Prueba de LIA

Fundamento: Permite evidenciar la descarboxilación o desaminación de la lisina y también la producción de ácido sulfhídrico. La descarboxilasa es una enzima que es capaz de actuar sobre la porción carboxilo (COOH) de los aminoácidos (LISINA) con formación de aminas de reacción alcalina, esta reacción conocida como descarboxilación produce dióxido de carbono como producto secundario, la lisina al descarboxilarse produce cadaverina.^{66,67}

Procedimiento

Con un asa de platino se sembró en posición recta, por doble picadura hasta el fondo del tubo y en la superficie. Se dejó incubar a 37 °C por 24 horas.

Interpretación:

K/K: Descarboxilación de lisina

El retorno de un color azul púrpura del tubo indica que contiene el aminoácido y es una reacción positiva debido a la liberación de aminas por descarboxilación (se ha formado cadaverina) y es lisina positiva

K/A: Descarboxilación negativa

El desarrollo de color amarillo en el fondo del tubo indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha disminuido lo suficiente para activar la descarboxilasa.

R/A: Desaminación positiva

La parte inclinada se torna a rojo-vino. El fondo se torna amarillo, es lisina negativa

3.3.7.2.3 Prueba de Indol

Fundamento: Es útil para determinar la capacidad de un microorganismo de producir indol a partir del amino-ácido triptófano. ^{66,67}

Procedimiento

Se retiró asépticamente 2 mL de caldo de cultivo con 24 horas de incubación. Se agregó 5 gotas de reactivo de Kovacs, se movió suavemente el tubo y se realizó la lectura.

Interpretación:

Prueba positiva: Formación de un anillo rojo en la superficie del medio (la capa alcohólica)

Prueba negativa: No se produce color en la capa alcohólica, y toma el color del reactivo empleado.

3.3.8 Evaluación de la actividad antibacteriana

3.3.8.1 Método de dilución en caldo

Fundamento:

La determinación de la actividad antimicrobiana mediante la técnica de dilución se realiza utilizando una prueba de concentración inhibitoria mínima (MIC) es decir una prueba que inhibirá *in vitro* el crecimiento visible del aislado bacteriano. Luego se determinará la concentración mínima bactericida (MBC), que se define como la menor concentración del antimicrobiano capaz de destruir una cepa bacteriana dada. ⁶⁸

Preparación del inóculo

En un tubo conteniendo caldopeptonadose colocó una cantidad de bacterias con la ayuda de un asa siembra, se incubo a 37°C hasta que la turbidez coincida con la del Standar de 0.5 de McFarlandya preparado.

Preparación de las diluciones

En cuatro tubos se colocó 100, 200, 400 y 800 ul respectivamente del aceite de zapallo *var. Macre* y *var. Zambo* por separados, 0.5 ml de Tween 80 y 20 ul del inóculo. Los tubos se homogenizaron con ayuda de un vortex y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Siembra en placa

Finalizado este periodo los tubos fueron examinados visualmente para comprobar la presencia de turbidez indicando el desarrollo bacteriano, sin embargo se mostraba el aceite de zapallo pero su densidad y color impedía ver los resultados, por lo cual se sembró las mismas concentraciones. Se sembraron en placas petri conteniendo agar triptosa, incubándolos posteriormente a 37°C por 24 horas, para observar el desarrollo bacteriano.

3.3.8.2 Método hoyo-placa

Fundamento: Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido como es el agar, después de su incubación se observa la presencia de halos claros alrededor de los hoyos en la placa indicando que este tiene efecto antibacteriano.

Procedimiento:

Una vez que el medio haya solidificado, se realizaron hoyos haciendo uso de una pipeta pasteur estéril de 5mm de diámetro, seguidamente se procedió a inocular la bacteria en estudio con ayuda de un hisopo estéril, se dejó secar y finalmente se depositó los diferentes volúmenes del aceite en los hoyos. (Figura N° 15)



Figura N° 15.- Proceso del método de hoyo – placa

3.3.8.3 Método de susceptibilidad de difusión en discos (Kirby- Bauer)

Fundamento:

En este método se emplean discos de papel absorbente, impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano. Estos discos se colocan en la superficie de una placa de agar, en la que se acaba de inocular una suspensión de la cepa a probar, con una turbidez equivalente al tubo 0,5 del nefelómetro de McFarland. Cuando el disco se humedece, el antimicrobiano difunde radialmente hacia afuera y crea un gradiente de concentración por disco; así, el antimicrobiano está en alta concentración cerca del disco y va disminuyendo a medida que se aleja del disco.

El diámetro del anillo de inhibición dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo por probar.⁶⁹

Preparación del inóculo:

De una placa de cultivo con agar triptosa incubada por 18 - 24 h, se seleccionó

colonias aisladas (*Escherichia coli* y *Shigella flexneri*) y se preparó una suspensión directa en solución salina ó caldo.

La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de McFarland.

Inoculación de las placas:

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie seca de la placa de Agar triptosa, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo, como se observa en la Figura N° 16. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido

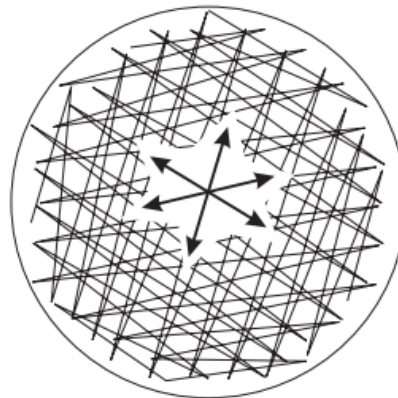


Figura N° 16.-Método de estrías para la aplicación de los discos de susceptibilidad.

Aplicación de los discos:

Se colocó los discos individuales o multidiscos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco

para asegurar un contacto completo con la superficie del agar, como se observa en la Figura N° 17.



Figura N° 17.- Aplicación de los discos de susceptibilidad.

Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente

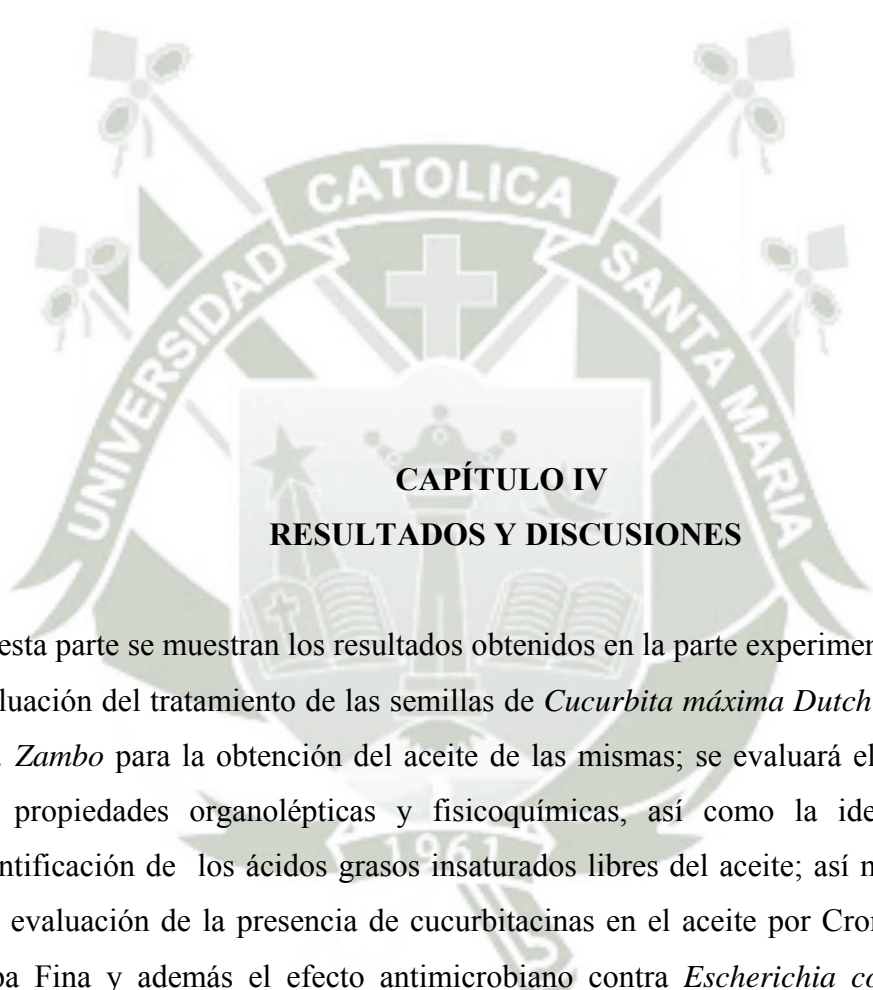
Incubación:

Las placas se incubaron en posición invertida a 37°C dentro 15 -18 h de los minutos posteriores a la aplicación de los discos. Después del tiempo recomendado de incubación se examinaron cada una de las placas.

Discos de sensibilidad:

Escherichiacoli.- Ácido nalidixico, Amikacina, Gentamicina, Trimetropina, Norfloxacin, Nitrofurantoina, Aztreonam, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Ceftriaxona.

Shigella flexneri.- Amikacina, Trimetropina, Ácido nalidixico, Furoxona, Norfloxacin, Ciprofloxacino, Amoxicilina, Ácido clavulánico, Levafloxacino, Cefotaxima.



CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta parte se muestran los resultados obtenidos en la parte experimental, se hará la evaluación del tratamiento de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* para la obtención del aceite de las mismas; se evaluará el rendimiento, sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas, así como la identificación y cuantificación de los ácidos grasos insaturados libres del aceite; así mismo se hará una evaluación de la presencia de cucurbitacinas en el aceite por Cromatografía en Capa Fina y además el efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

4.1 Porcentaje de humedad

Para la extracción de aceite es muy importante que la muestra se encuentre sin moléculas de agua para una conservación adecuada, es decir evitar la presencia de microorganismos que puedan interferir con la extracción y almacenar por más tiempo la muestra. El método que se empleó para determinar el porcentaje de

humedad se describe en el Capítulo 3.3.1.1, realizando tres ensayos por muestra como se muestra en la Tabla N° 11 y 12.

TABLA N° 11

Determinación de humedad de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var.*

Zambo (Zapallo)

N° de ensayo	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	Porcentaje (%)
1	3,01	2,83	5,85
2	3,02	2,84	5,93
3	3,02	2,89	5,77

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 12

Determinación de humedad de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var.*

Macre (Zapallo)

N° de ensayo	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	Porcentaje (%)
1	3,00	2,85	4,99
2	3,01	2,86	4,92
3	3,01	2,85	5,09

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados se sometieron a pruebas estadísticas que concluyeron en la Tabla N° 13.

TABLA N° 13

Tratamiento estadístico del porcentaje de humedad de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre (Zapallo)*

Estadísticos	ZAMBO	MACRE
Media	5,85	5,00
Desviación estándar	0,08	0,09
Mínimo	5,77	4,92
Máximo	5,93	5,09
Tamaño	3	3

P<0,05

La Tabla N° 13, según la prueba de t student para muestras independientes se concluye que el porcentaje de humedad en la semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

La humedad de las semillas oleaginosas debe ser por debajo del 10% , para asegurar su almacenamiento, evitar el desarrollo de mohos y minimizar el proceso de degradación biológica que conduce a la aparición de ácidos grasos libres, en el Gráfico N° 1 se muestra que el porcentaje de humedad en la semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* es de 5,85 % y de la semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* fue de 5,00 %, estos dos valores se encuentran por debajo del 10%.

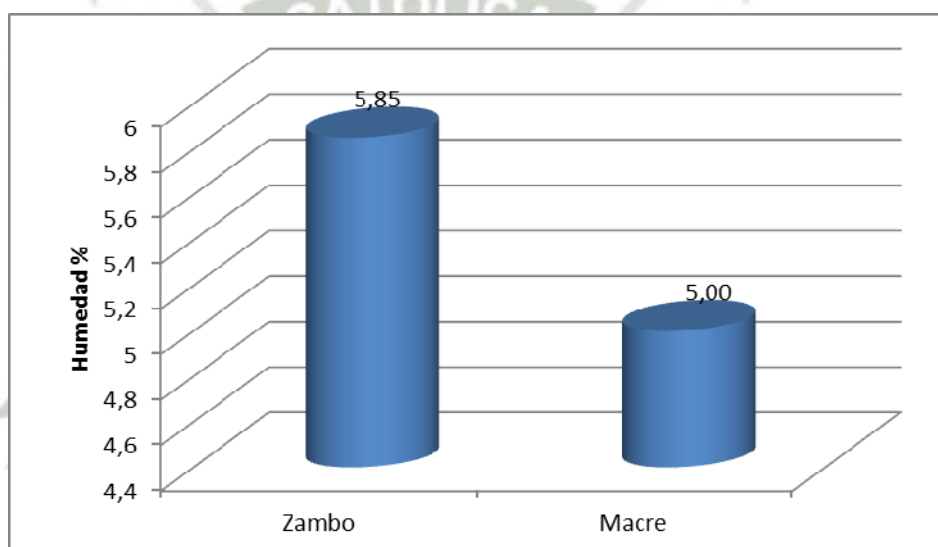


Gráfico N° 1.- Porcentaje de humedad de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

4.2 Extracción del aceite

Se eligió el método de extracción Soxhlet como se describe en el Capítulo 3.2.2; el aceite que se obtuvo en promedio fue de 5,44 mL a partir de 20g de semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y 5,02 mL de aceite a partir de 20g de semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre*, en los dos casos se utilizó 150 mL de diclorometano como solvente. La desecación de partículas de agua del aceite se realizó con sulfato de sodio anhidro utilizando 3 g por cada 5mL de aceite por el tiempo de 12 horas, transcurrido ese tiempo se filtraron las muestras para eliminar el

sulfato de sodio anhidro. El aceite se colocó en frascos de color ámbar cerrado herméticamente para que no haya interferencia con la luz, no se oxide y no se produzca alteración. En la Tabla N° 14 y 15 se observan los ensayos realizados en la *var. Zambo* y *var. Macre*.

TABLA N° 14

Determinación del rendimiento del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* (Zapallo)

N° de Ensayos	Muestra (g)	Cantidad de aceite (g)	Rendimiento (%)
1	20,00	5,49	27,30
2	20,00	5,40	27,00
3	20,00	5,45	27,25

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 15

Determinación de humedad de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* (Zapallo)

N° de Ensayos	Muestra (g)	Cantidad de aceite (g)	Rendimiento (%)
1	20,00	4,99	24,95
2	20,00	5,04	25,20
3	20,00	5,02	25,10

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados se sometieron a pruebas estadísticas que concluyeron en la Tabla N°16.

La Tabla N° 16 según la prueba de t student para muestras independientes se concluye que el rendimiento de extracción de aceite en la semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre*, presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

El resumen del rendimiento obtenido de acuerdo a la metodología para la extracción de aceites es presentado gráficamente en el gráfico N°2 para una mejor apreciación,

el rendimiento de extracción de aceite en la semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* fue de 27,18% y en la *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* fue de 25,08%. En comparación con otros trabajos, Shobba B, especifica un rendimiento de 42,71% usando hexano y Grisales SO et al, hasta 43 % usando éter de petróleo; valores que son altos con respecto a los obtenidos debido a factores como, la procedencia de semillas, la temporada de cosecha o el tipo de suelo y el solvente.

TABLA N° 16

Tratamiento estadístico del rendimiento de extracción de aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

Estadísticos	ZAMBO	MACRE
Media	27,18	25,08
Desviación estándar	0,16	0,13
Mínimo	27,00	24,95
Máximo	27,30	25,20
Tamaño	3	3

P<0,05

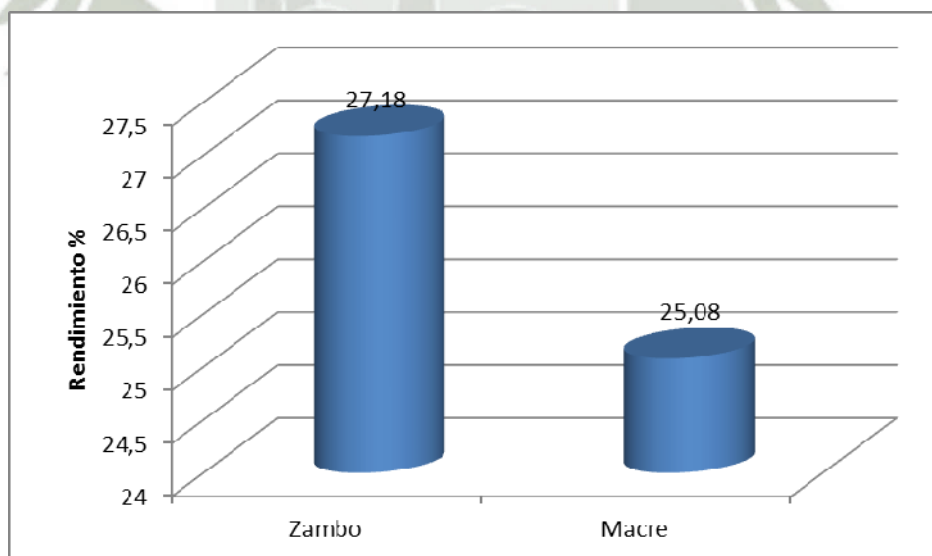


Gráfico N° 2.- Porcentaje de rendimiento del aceite de semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

4.3 Ensayos organolépticas

Después de los resultados de rendimiento se procede a realizar la determinación organoléptica del aceite obtenido, los cuales son presentados gráficamente en la Tabla N° 17 y 18 para una mejor apreciación.

TABLA N° 17

Determinación organoléptica del aceite de de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo (Zapallo)*

Características	Descripción
Consistencia	Densa
Olor	Sui géneris
Sabor	Característico
Color	Verde-ladrillo
Impurezas visibles	Ninguna

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 18

Determinación organoléptica de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre (Zapallo)*

Características	Descripción
Consistencia	Densa
Olor	Sui géneris
Sabor	Característico
Color	Verde-Rojizo
Impurezas visibles	Ninguno

Fuente: Elaboración propia.

El aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre*, tienen similares características organolépticas en consistencia, olor, sabor y no tienen presencia de impurezas visibles, el color de la *var. Zambo* fue verde-ladrillo y de la *var. Macre* el color fue verde-rojizo, ésta diferencia es debida a los pigmentos

naturales propios de la semilla como son α -Tocoferol, γ -Tocoferol, β -Caroteno, β -Criptoxantina.

4.4 Propiedades fisicoquímicas

Seguidamente se realiza un análisis fisicoquímico detallado a fin de determinar la densidad, índice de refracción, índice de saponificación, índice de yodo, índice de acidez y el índice de peróxidos del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

4.4.1 Densidad

Se determinó la densidad según indica el procedimiento 3.3.4.1. Realizando 3 ensayos por muestra como se observa en la Tabla N° 19 y 20.

TABLA N° 19

Determinación de la densidad del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* (Zapallo)

Picnómetro vacío (P1)	Volumen del picnómetro (mL)	Picnómetro + aceite (P2) (g)	Densidad (g/mL)
9,148	10	18,482	0,933
9,148	10	18,487	0,934
9,148	10	18,490	0,934

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 20

Determinación de la densidad del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* (Zapallo)

Picnómetro vacío (P1)	Volumen del picnómetro (mL)	Picnómetro + aceite (P2) (g)	Densidad (g/mL)
9,148	10	18,557	0,941
9,148	10	18,588	0,944
9,148	10	18,569	0,942

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados se sometieron a pruebas estadísticas que concluyeron en la Tabla N° 21.

TABLA N° 21

Tratamiento estadístico de la densidad del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

Estadísticos	ZAMBO	MACRE
Media	0,934	0,942
Desviación estándar	0,000	0,002
Mínimo	0,933	0,941
Máximo	0,934	0,944
Tamaño	3	3

P<0,05

La tabla N° 21, según la prueba de t student para muestras independientes se concluye que la densidad del aceite de semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* presentó diferencias estadísticas significativas (P<0,05).

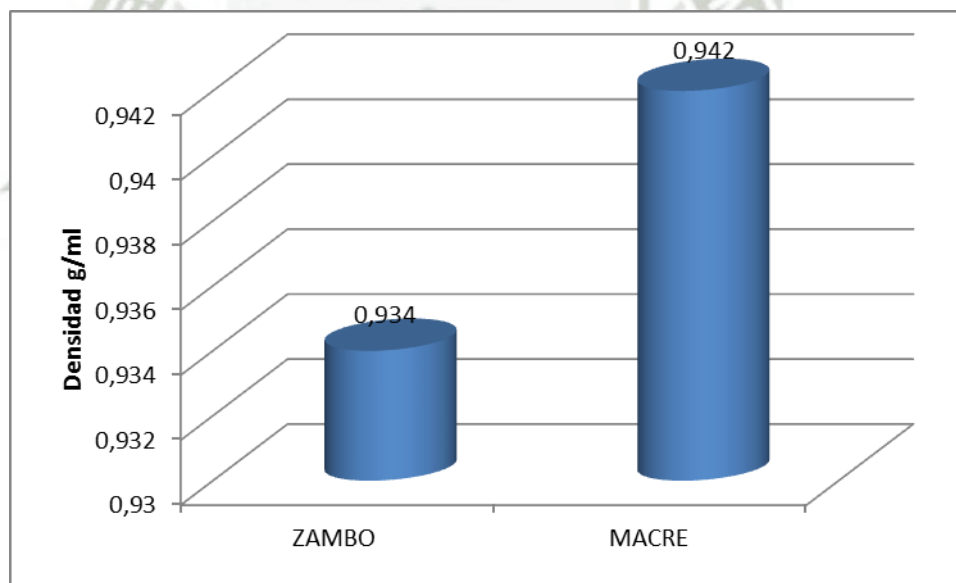


Gráfico N° 3.- Densidad del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

La densidad de los aceites es generalmente 0,910 - 0,920 a 25 °C; Mariano ha encontrado densidades de $0,9183 \pm 0,01$ a $0,9574 \pm 0,01$ en el aceite de semilla de *Cucurbita spp.* en el Gráfico N° 3 se observa que la densidad del aceite de la semilla

Cucurbita máxima Dutch var. Zambo fue de 0,934 g/mL y de la *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* fue de 0,942 g/mL.

4.4.2 Índice de refracción

La determinación del índice de refracción se realizó como se indica en 3.3.4.2. Realizando 3 ensayos por variedad como se observa en la Tabla N° 22 y 23.

TABLA N° 22

Determinación del índice de refracción del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* (Zapallo)

N° de ensayos	Índice de refracción
1	1,4685
2	1,4678
3	1,4691

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 23

Determinación del índice de refracción del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* (Zapallo)

N° de ensayos	Índice de refracción
1	1,4711
2	1,4709
3	1,4709

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados se sometieron a pruebas estadísticas que concluyeron en la Tabla N° 24.

La tabla N° 24, según la prueba de t student para muestras independientes se concluye el índice de refracción del aceite de semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

TABLA N° 24

Tratamiento estadístico del índice de refracción del aceite de las semillas de
Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre

Estadísticos	ZAMBO	MACRE
Media	1,4685	1,4710
Desviación estándar	0,0007	0,0001
Mínimo	1,4678	1,4709
Máximo	1,4691	1,4711
Tamaño	3	3

$P < 0,05$

El índice de refracción nos indica la pureza de un aceite y los índices de refracción de las grasas y aceites más importantes varían entre 1,466 y 1,484 a 20 °C.

Los índices de refracción del aceite de la semilla de la *var. Zambo* fue de 1,4685 y de la *var. Macre* fue de 1,4710, estos valores se encuentran dentro del rango, como muestra el gráfico N° 3.

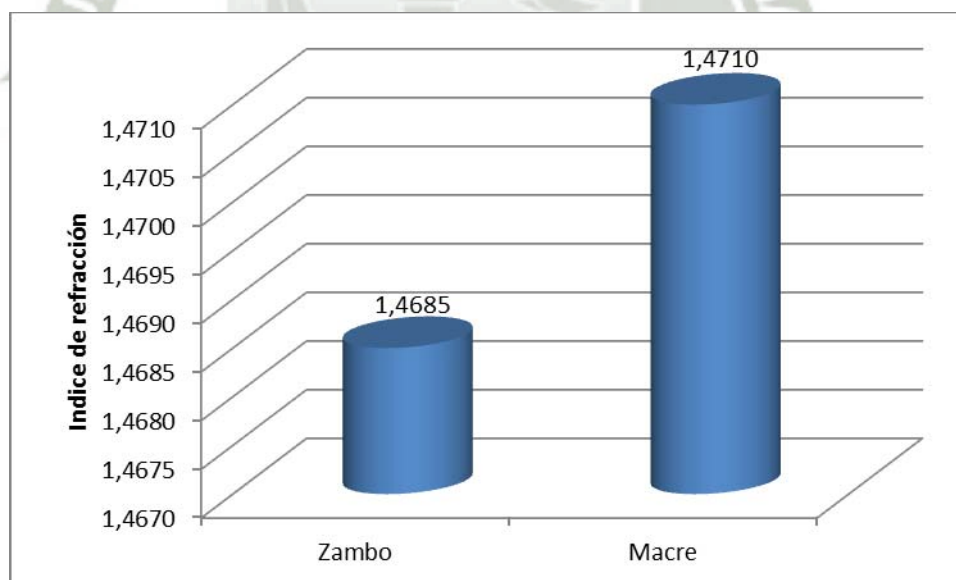


Gráfico N° 4.- Índice de refracción del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre*

4.4.3 Índice de saponificación

La determinación del índice de saponificación se realizó como se indica en 3.3.4.3. El índice de saponificación es el número de miligramos de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis completa de 1 g de grasa o aceite. Se realizó 3 ensayos por variedad como se observa en la Tabla N° 25 y 26.

TABLA N° 25

Determinación del índice de saponificación del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo (Zapallo)*

Peso de muestra (g)	Normalidad (meq/mL)	Título blanco (mL)	Título muestra (mL)	Índice (mg KOH/g aceite)
2	0,5211	15,6	4,2	166,63
2	0,5211	15,6	4,2	166,63
2	0,5211	15,6	4,2	166,63

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 26

Determinación del índice de saponificación del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre (Zapallo)*

Peso de muestra (g)	Normalidad (meq/mL)	Título blanco (mL)	Título muestra (mL)	Índice (mg KOH/g aceite)
2	0,5211	15,6	2,5	191,48
2	0,5211	15,6	2,5	191,48
2	0,5211	15,6	2,3	194,40

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados se sometieron a pruebas estadísticas que concluyeron en la Tabla N° 27.

La tabla N° 27, según la prueba de t student para muestras independientes se concluye que el índice de saponificación del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre (Zapallo)* presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

TABLA N° 27

Tratamiento estadístico del índice de saponificación del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

Estadísticos	ZAMBO	MACRE
Media	192,46	166,63
Desviación estándar	1,69	0,00
Mínimo	191,48	166,63
Máximo	194,40	166,63
Tamaño	3	3

$P < 0,05$

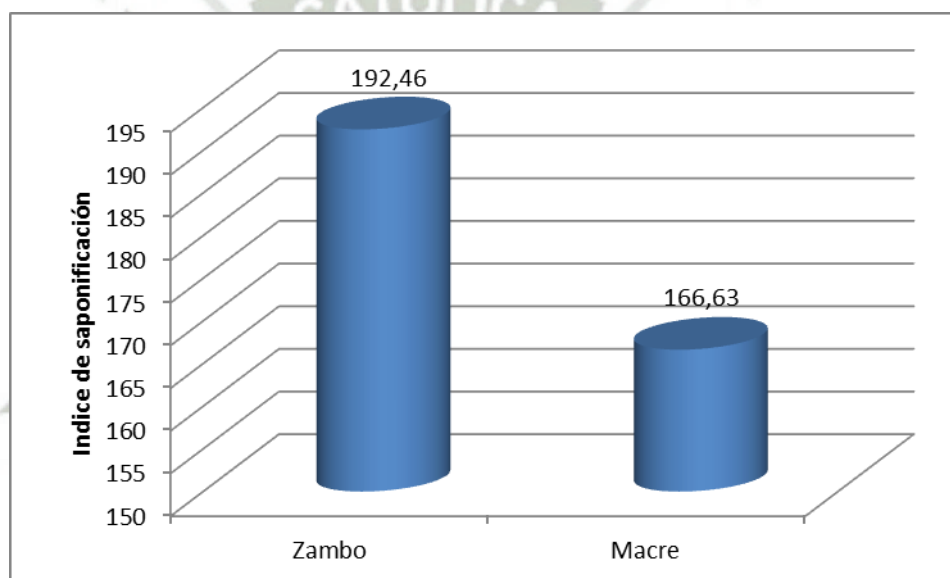


Gráfico N° 5,- Índice de saponificación del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre*

El índice de saponificación es un dato muy importante para la elaboración de jabones; este dato nos sirve para determinar la cantidad de hidróxido de potasio para producir jabón. En el gráfico N° 5 el índice de saponificación del aceite de la semilla de la *var. Zambo* fue de 192,46 mg KOH/g aceite; es decir, se necesita 192,46 miligramos de KOH para saponificar 1 gramo de aceite, y de la *var. Macre* fue de 166,63 mg KOH/g aceite; es decir, se necesita 166,63 miligramos de KOH para saponificar 1 gramo de aceite.

Esta determinación nos proporciona información del peso molecular aproximado de los triglicéridos que componen el aceite, el valor del índice de saponificación fue el esperado para aceites de cadena mediana. Estos valores son similares al encontrado por Shobba B que especifica un índice de saponificación de 195 mg KOH/g aceite.

4.4.4 Índice de yodo

La determinación del índice de yodo se realizó como se indica en 3.3.4.4. El índice de yodo es una medida del grado de insaturación, definido como los gramos de yodo absorbidos por cada 100 gramos de muestra.

El índice de yodo disminuye a medida que se oxidan las grasas ya que aumenta cuantos más dobles enlaces existen.

Debido a la carencia del reactivo de Wijs, las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, dando valores de 50,76 g I₂/100 g de aceite para la *var. Zambo* y de la *var. Macre* fue de 49,5 g I₂/100 g de aceite.

El índice de yodo representa el estado de insaturación de los ácidos grasos que componen el aceite, basándose en la adición de halógenos a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, denotando presencia de ácidos grasos insaturados.

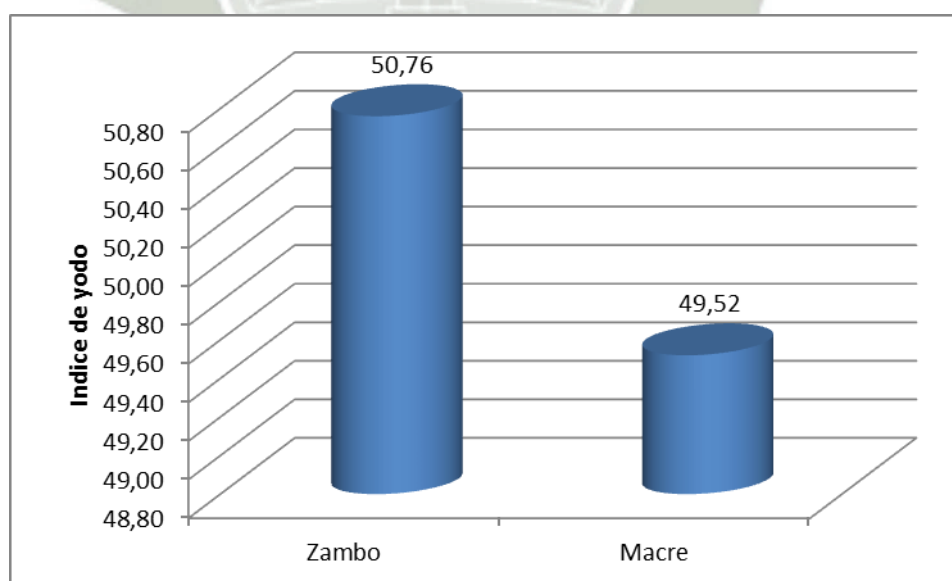


Gráfico N° 6.- Índice de yodo del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima* Dutch var. Zambo y var. Macre (Zapallo)

4.4.5 Índice de acidez

La determinación del índice de acidez se realizó como se indica en 3.3.4.5. El índice de acidez se define como los miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos libres presentes en un gramo de aceite. Se realizaron 3 ensayos por variedad como se observa en la Tabla N° 28 y 29.

TABLA N° 28

Determinación del índice de acidez de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo (Zapallo)*

Peso de muestra (g)	Normalidad (mol/L)	Título muestra (mL)	Índice (%)
20	0,1006	1,2	0,34
20	0,1006	1,4	0,40
20	0,1006	1,4	0,40

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 29

Determinación del índice de acidez de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre (Zapallo)*

Peso de muestra (g)	Normalidad (mol/L)	Título muestra (mL)	Índice (%)
10	0,1006	1,2	0,17
10	0,1006	1,3	0,20
10	0,1006	1,2	0,17

Fuente: Elaboración propia

Estos resultados se sometieron a pruebas estadísticas que concluyeron en la Tabla N° 30.

La tabla N° 30, según la prueba de t student para muestras independientes se concluye que el índice de acidez del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre (Zapallo)* presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

TABLA N° 30

**Tratamiento estadístico del índice de acidez del aceite de las semillas de
*Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre (Zapallo)***

Estadísticos	ZAMBO	MACRE
Media	0,19	0,17
Desviación estándar	0,02	0,01
Mínimo	0,17	0,17
Máximo	0,20	0,18
Tamaño	3	3

P<0,05

El índice de acidez del aceite de la semilla de la *var. Zambo* fue de 0,19 % y de la *var. Macre* fue de 0,17 %. El índice de acidez aumenta a medida que el aceite envejece, principalmente si éste es almacenado inadecuadamente, así mismo es una medida del grado de descomposición del aceite y aumenta por acción de las lipasas (no más de 0.5%). La descomposición se acelera por la luz y el calor. Como la rancidez se acompaña por la formación de ácidos grasos libres, la determinación es usada, con frecuencia, como indicación general de la condición y comestibilidad de los aceites y las grasas. Por lo cual los resultados indican un bajo índice de acidez, es decir, no hay rancidez.

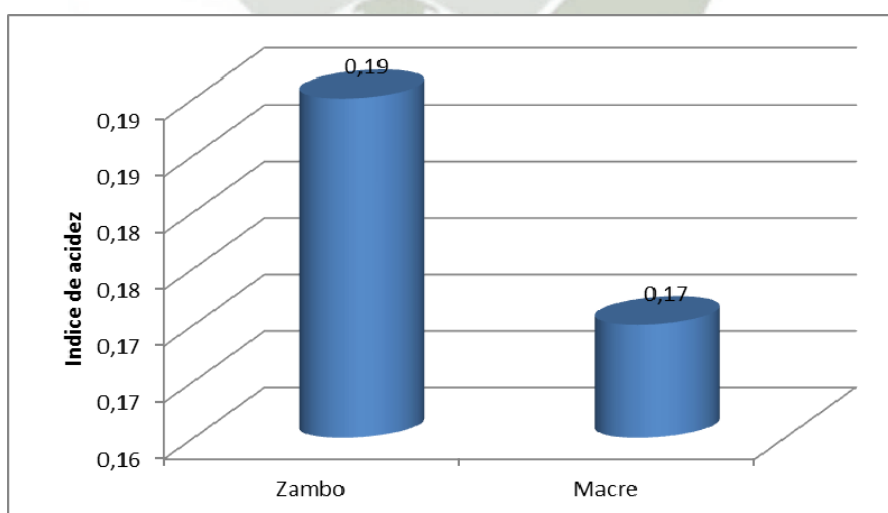


Gráfico N° 7.- Índice de acidez del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre (Zapallo)*

En el Gráfico N° 7 el índice de acidez del aceite de la semilla de la *var. Zambo* fue de 0,19 % siendo éste el que tiene un mayor índice de acidez y de la *var. Macre* fue de 0,17 %.

4.4.6 Índice de peróxidos

La determinación del índice de peróxidos se realizó como se indica en 3.3.4.6. El índice de peróxidos se define como los miliequivalentes de peróxidos (oxígeno activo) por kilogramo de aceite. Se realizó 3 ensayos por variedad como se observa en la Tabla N° 31 y 32.

TABLA N° 31

**Determinación del índice de peróxidos de las semillas de *Cucurbita máxima*
Dutch var. Zambo (Zapallo)**

Peso de muestra (g)	Normalidad (meq/mL)	Título de blanco (mL)	Título muestra (mL)	Índice (meq peróxido/Kg)
5	0,0962	0,2	0,8	11,54
5	0,0962	0,2	0,7	9,62
5	0,0962	0,2	0,8	11,54

Fuente: Elaboración propia.

TABLA N° 32

**Determinación del índice de peróxidos de las semillas de *Cucurbita máxima*
Dutch var. Macre (Zapallo)**

Peso de muestra (g)	Normalidad (meq/mL)	Título de blanco (mL)	Título muestra (mL)	Índice (meq peróxido/Kg)
5	0,0962	0,2	0,5	5,77
5	0,0962	0,2	0,5	5,77
5	0,0962	0,2	0,5	5,77

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados se sometieron a pruebas estadísticas que concluyeron en la Tabla N° 33.

TABLA N° 33

Tratamiento estadístico del índice de peróxidos del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre (Zapallo)*

Estadísticos	ZAMBO	MACRE
Media	10,90	5,77
Desviación estándar	1,11	0,00
Mínimo	9,62	5,77
Máximo	11,54	5,77
Tamaño	3	3

$P < 0,05$

La tabla N° 33, según la prueba de t student para muestras independientes se concluye que el índice de peróxidos del aceite de la semilla *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre (Zapallo)* presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

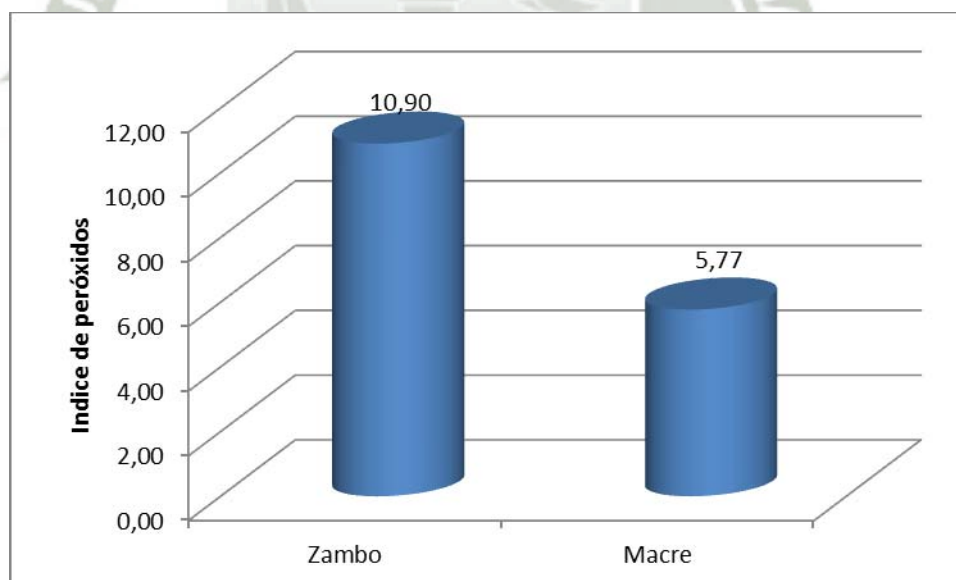


Gráfico N° 8.- Índice de peróxidos del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo y var. Macre (Zapallo)*

Asimismo el gráfico N°8 muestra que el índice de peróxidos del aceite de la semilla de la *var. Zambo* fue de 10,90 meq/Kg; y de la *var. Macre* fue de 5,77 meq/Kg; siendo este el valor mayor.

El índice de peróxidos es una medida del estado de oxidación de un aceite, se forman en los puntos de insaturación de las cadenas de carbonos de los ácidos grasos. Los resultados obtenidos son relativamente bajos en comparación con otros trabajos, Shobba B especifica un índice de peróxidos de 14 meq/Kg aceite y Mohammed, indicó 0,85 meq/Kg aceites.

4.5 Determinación de los ácidos grasos libres

Se realizó la identificación y cuantificación de los ácidos grasos insaturados libres presentes en el aceite de semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre*, como se describe en el Capítulo 3.3.5.

4.5.1 Curva de calibración de los estándares

Se elaboró una curva de calibración a partir de concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm de una solución Stock de 1000 ppm de los estándares de ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico, obteniéndose datos del área como se muestra en la tabla N° 34.

TABLA N° 34

Datos del área de los ácidos grasos y la concentración para la curva de calibración

CONCENTRACIÓN (ppm)	Ácido α -Linolenico (ω 3)	Ácido Linoleico (ω 6)	Ácido Oleico (ω 9)
100	24829400	11411360	522124
150	36253005	16347547	1442913
200	48223994	22289807	2138859
250	60440055	28607368	3000170
300	70861864	34980978	3947661

Con los datos de la Tabla N° 34 se elaboró la curva de calibración de los estándares de ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico.

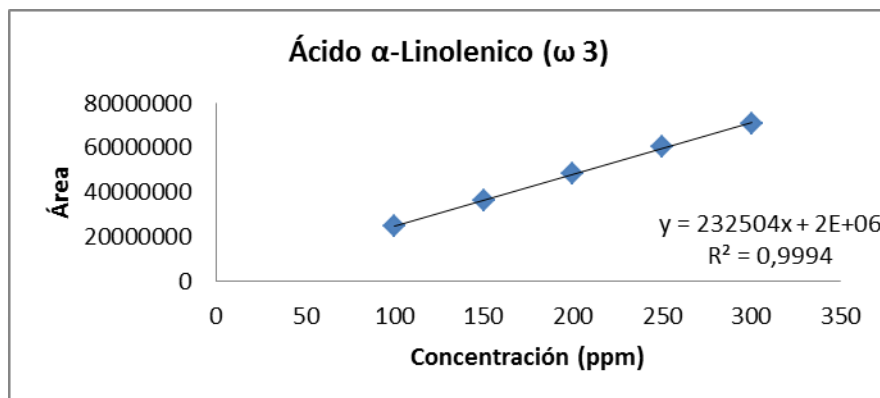


Gráfico N° 9.- Curva de calibración del Ácido α - linolénico

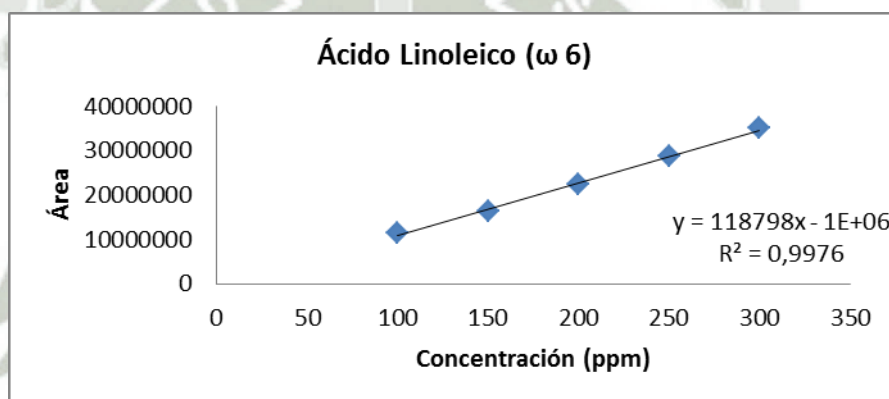


Gráfico N° 10.- Curva de calibración del Ácido linoleico

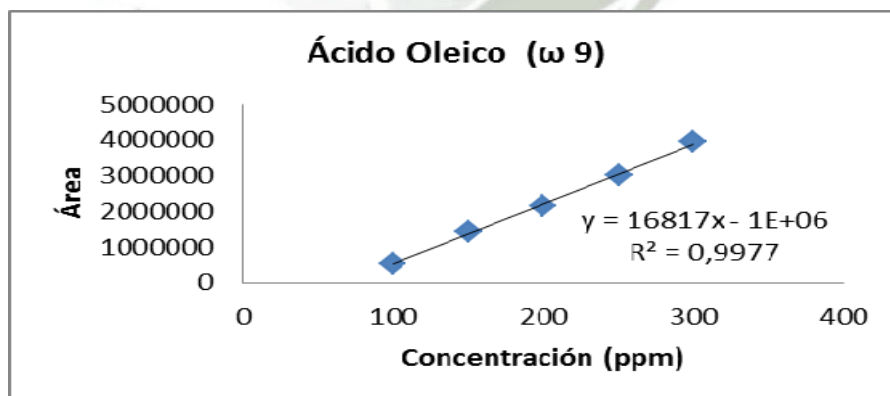


Gráfico N° 11.- Curva de calibración del Ácido oleico

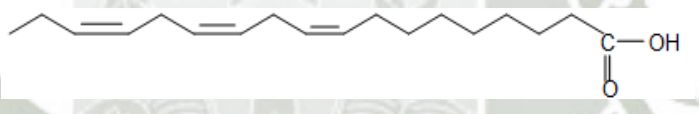
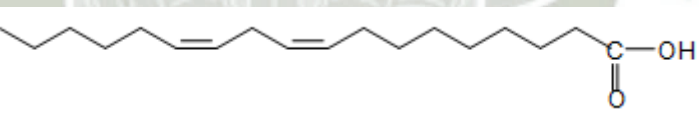
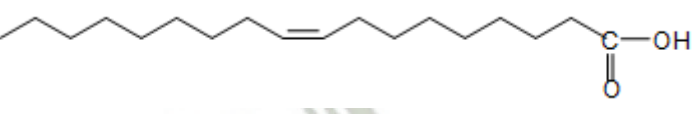
Por regresión lineal, se obtuvo el coeficiente de determinación , R^2 igual a 0,994 para el ácido α - linolénico (Gráfico N° 9) , 0,9976 para el ácido linoleico (Gráfico N° 10) y 0,9977 para el ácido oleico (Gráfico N° 11), es decir, que hay una buena asociación lineal entre las variables ya que es cercano a 1.

4.5.2 Identificación y cuantificación de los ácidos grasos libres

La identificación de los ácidos grasos insaturados libres (ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico), se realizó comparando el tiempo de retención del pico en el análisis cromatográfico de cada muestra, con el tiempo de retención del cada estándar, bajo las mismas condiciones cromatográficas. En la Tabla N° 35 se muestran los tiempos de retención de cada ácido graso insaturado.

TABLA N° 35

Tiempo de retención para la identificación de los ácidos grasos por HPLC

Compuesto	Fórmula	Tiempo de retención
Ácido α -linolénico (C18:3)		02 min 09
Ácido linoleico (C18:2)		04min 00
Ácido oleico (C18:1)		06 min 00

Con los datos de la tabla N° 37 se obtuvieron las concentraciones de 0,28 mg/mL de ácido α - linolénico, 1,28 mg/mL de ácido linoleico y < a 0,1 mg/mL de ácido oleico para la *var. Macre* y 0,34 mg/mL de ácido α - linolénico, 1,08 mg/mL de ácido linoleico y < a 0,1 mg/mL de ácido oleico para la *var. Zambo*.

TABLA N ° 36

Relación del promedio de las áreas obtenidas y la concentración de los aceites de semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

Ácidos Grasos	Var. Zambo		Var. Macre	
	Área \bar{X}	ppm	Área \bar{X}	ppm
Ácido α -Linolénico (ω 3)	5989658	17,16	5303421	14,21
Ácido Linoleico (ω 6)	5432910	54,15	6600662,5	63,98
Ácido Oleico (ω 9)	0	0	0	0

4.6 Evaluación de la presencia de cucurbitacina

Con el fin de identificar cualitativamente la cucurbitacina del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* *var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo), se procedió al análisis por cromatografía en capa fina a partir de los extractos obtenidos descritos en el Capítulo 3.3.

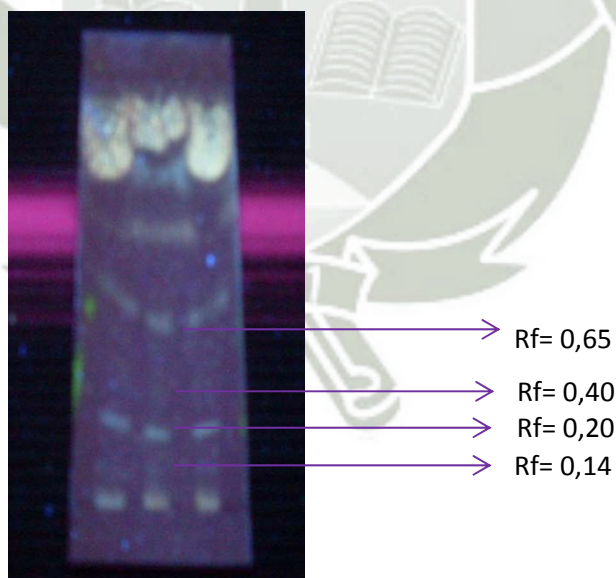


Figura N° 18.- Placa cromatográfica revelada con VP del extracto del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo*

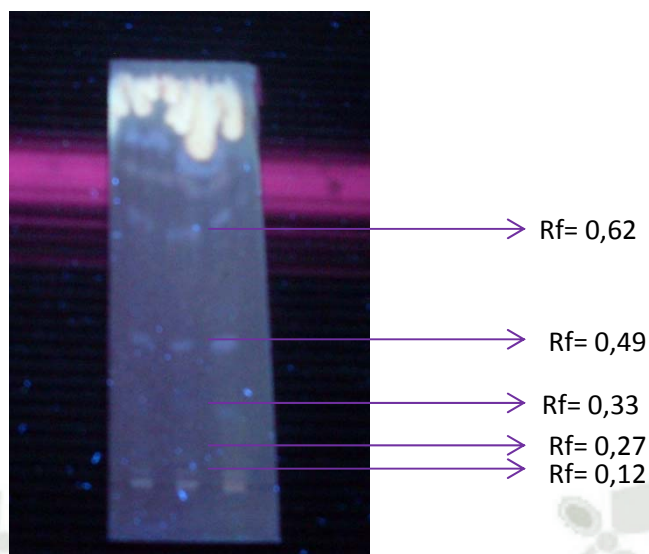


Figura N° 19.- Placa cromatográfica revelada con VP del extracto del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre*

La Figura N° 18 y 19 muestran la presencia diferentes cucurbitacinas en la placa cromatográfica observada a 366nm

El revelado cromatográfico indicó que todas las muestras contienen cucurbitacinas, vistas de color azul-violeta con reactivo VP; la identificación de éstas se realizaron con las referencias del factor de retención (Rf) mostrados en la Tabla N° 37.

TABLA N° 37

Factor de retención de las Cucurbitacinas L, I, E y B.

Tipo de cucurbitacina	Cucurbitacina glucosilada	Cucurbitacina agliconada
L	Rf ~ 0,14	Rf ~0,67
I	Rf ~0,16	Rf ~0,7
E	Rf ~0,29	Rf ~0,72
B	Rf ~0,29	Rf ~0,9

Los resultados expresados en el Tabla N° 38 nos indican los valores de los Rfs identificados en las placas cromatográficas, siendo sólo encontrada la Cucurbitacina L

en la *Var. Zambo* y *Var. Macre* en forma glucosilada (Rf ~0,14) y forma libre (Rf ~0,67).

TABLA N° 38

Determinación del Factor de Retención (Rf) de los extracto de aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo)

	Cálculos de Rf	Compuesto identificado	Color (vis)
Var.Zambo	0,14	Cucurbitacina L glucosilado	Azul violeta
	0,20	N.I	Azul violeta
	0,40	N.I	Azul violeta
	0.65	Cucurbitacina L libre	Azul violeta
Var.Macre	0,12	Cucurbitacina L glucosilado	Azul violeta
	0.27	N.I	Azul violeta
	0,33	N.I	Azul violeta
	0,49	N.I	Azul violeta
	0,62	Cucurbitacina L libre	Azul violeta

4.7 Evaluación del efecto antibacteriano

4.7.1 Identificación de las cepas en estudio

De acuerdo al procedimiento descrito en 3.3.7.2 se pudieron identificar las cepas en estudio los resultados para *Escherichia coli* fueron: TSI= A/A + - ; LIA: K/K ; INDOL:POSITIVO y para *Shigella flexneri*: TSI: K/A - -; LIA: K/A; INDOL: NEGATIVO como se ve en la Figura N° 20.

4.7.2 Evaluación del método de dilución en caldo

De acuerdo a la parte experimental por el método de dilución en caldo descrito en 3.3.8.1 no se observó efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* del aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo), por lo cual hubo crecimiento en toda la placa como se describe en la Tabla N° 39 y 40, denotando el signo positivo (+) como crecimiento bacteriano y negativo (-) como ausencia de crecimiento bacteriano frente a las diferentes cantidades de aceite de 100, 200, 400 y 800 ul.

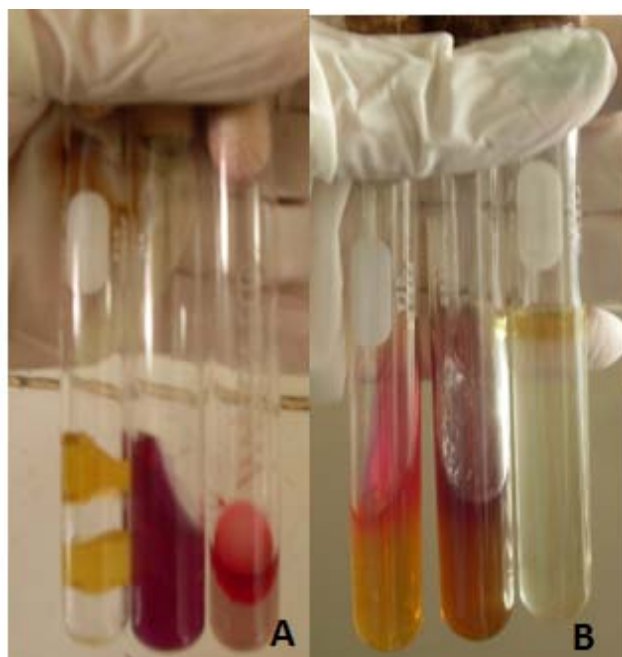


Figura N° 20.- Resultados de las pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* (A) y para *Shigella flexneri* (B)

4.7.3 Evaluación del método hoyo-placa

De acuerdo a la parte experimental por el método hoyo-placa descrita en 3.3.8.2 no se observó efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* del aceite puro de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo), después de las 24 horas de incubación. La tabla N° 41 y la Figura N° 21 resumen los resultados, denotando el signo positivo (+) como crecimiento bacteriano y negativo (-) como ausencia de crecimiento bacteriano frente a las diferentes cantidades de aceite de 10, 20, 30, 40 y 70 ul.

TABLA N° 39

Evaluación del efecto antibacteriano del aceite contra *Escherichia coli* por el método de dilución en caldo.

<i>Escherichia Coli</i>					
Cantidad de aceite (ul)		100	200	400	800
Crecimiento bacteriano	+ /-	+	+	+	+

TABLA N° 40

Evaluación del efecto antibacteriano del aceite contra *Shigella flexneri* por el método de dilución en caldo.

<i>Shigella flexneri</i>					
Cantidad del aceite (ul)		100	200	400	800
Crecimiento bacteriano	+ /-	+	+	+	+

TABLA N° 41

Prueba con aceite puro a diferentes cantidades para *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* con el método del hoyo-placa.

PRUEBA CON ACEITE PURO EN
HOYO PLACA

Aceite (ul)	10	20	30	40	70
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+



Figura N° 21. Resultados después de la incubación de 24 horas del aceite de *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* y *var. Zambo* (Zapallo) contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

4.7.4 Evaluación del método de susceptibilidad de difusión en discos. (Kirby – Bauer)

De acuerdo al procedimiento descrito en 3.3.8.2, luego de la incubación de las placas por 24 horas, en las Figuras N° 22 y 23 se observó los diferentes halos de susceptibilidad de las cepas de *Escherichia Coli* y *Shigella flexneri* a todos los fármacos.

La Tabla N° 42 y 43 resumen los resultados obtenidos, denotando la letra S como susceptible, es decir, se observó un efecto positivo de los fármacos con el fin de ratificar que las cepas bacterianas obtenidas del Hospital Honorio Delgado no son resistentes.

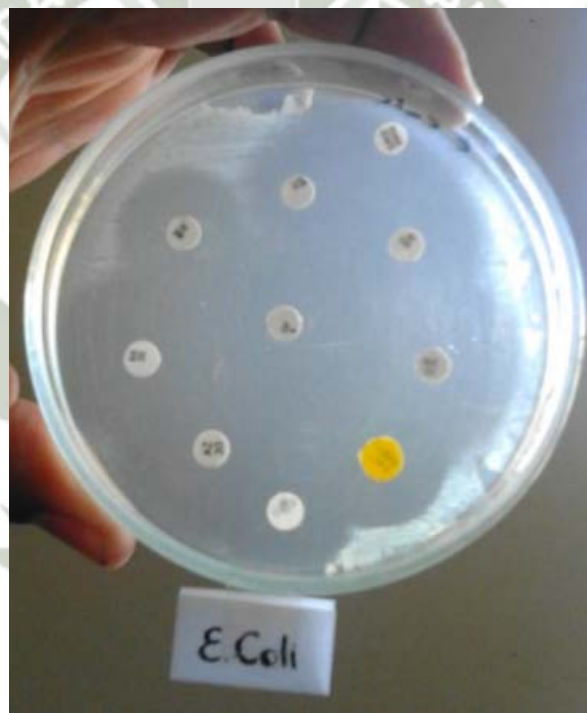


Figura N°22.- Resultados de susceptibilidad para *Escherichia Coli*



Figura N°23.- Resultados de susceptibilidad para *Shigella flexneri*

TABLA N° 42


Resultado de las pruebas de susceptibilidad frente a *Escherichia coli*

Prueba de susceptibilidad de difusión en discos	Susceptibilidad
Ácido nalidixico	S
Amikacina	S
Gentamicina	S
Trimetropina	S
Norfloxacino	S
Nitrofurantoina	S
Astreonianazeta	S
Ceftazidima	S
Ciprofloxacino	S
Ceftriaxona	S

TABLA N° 43

Resultado de las pruebas de susceptibilidad frente a *Shigella flexneri*

Prueba de susceptibilidad de difusión en discos	Susceptibilidad
Amikacina	S
Trimetropina	S
Acido Nalidixico	S
Furoxona	S
Norfloxacino	S
Ciprofloxacino	S
Amoxicilina	S
Ácido Clavulánico	S
Levofloxacino	S
Cefotaxima	S



CAPITULO V: CONCLUSIONES

PRIMERO.- Se extrajo el aceite de las semillas *Cucurbita máxima Dutch* obteniéndose un rendimiento de 27,18 % de la *var. Zambo* y 25,08% de la *var. Macre* por el método de extracción Soxhlet y utilizando diclorometano como solvente.

SEGUNDO.- Se evaluaron las propiedades organolépticas del aceite extraído de *Cucurbita máxima Dutch*, como olor: sui géneris, sabor: característico y consistencia: densa, resultando similares en la *var. Zambo* y *var. Macre*; el color de la *var. Zambo* fue verde-ladrillo y de la *var. Macre* verde-rojizo. Las características fisicoquímicas de la *var. Zambo* y *var. Macre* fueron: densidad 0,933 g/mL y 0,941 g/mL; índice de refracción 1,468 y 1,471; índice de saponificación 192,46 mg KOH/g y 166,63 mg KOH/g; índice de yodo 51,053 g I₂/100g aceite y 49,520 g I₂/100g aceite; índice de acidez 0,19 % y 0,17 %; índice de peróxidos 10,90 meq peróxido/Kg aceite y 5,77 meq peróxido/Kg aceite, respectivamente de cada una.

TERCERO.- Se identificó y cuantificó los ácidos grasos insaturados libres del aceite de semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, se obtuvieron las concentraciones de 0,34 mg/mL y 0,28 g/mL de ácido α - linolénico; 1,08 mg/mL y 1,28 mg/mL de ácido linoleico, respectivamente de cada una, el ácido oleico se encontró en concentraciones $< a 0,1$ mg/ml en las dos variedades.

CUARTO.- Se evaluó la presencia de cucurbitacina en el aceite de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo) por Cromatografía en Capa Fina, siendo el tipo Cucurbitacina L encontrada en las dos variedades *var. Zambo* y *var. Macre* en forma glucosilada ($R_f \sim 0,14$) y forma libre ($R_f \sim 0,67$).

QUINTO.- Se evaluó el efecto antibacteriano del aceite de semilla de *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* y *var. Macre* (Zapallo), dando resultados negativos para *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* utilizando el método de dilución en caldo denotando un 100% de crecimiento bacteriano en todas las concentraciones, al igual la prueba de aceite puro en el método de hoyo-placa.



**CAPITULO VI:
RECOMENDACIONES**

- Los resultados sobre la determinación cualitativa de las cucurbitacinas dan inicio a realizar más estudios sobre los tipos de cucurbitacinas y su relación con el efecto antibacteriano.
- Evaluar el rendimiento del aceite con diferentes solventes, que sean menos tóxicos y de fácil acceso.
- Utilizar otros métodos de extracción y escoger el más óptimo para evaluar la presencia de cucurbitacinas.
- Trabajar con otras bacterias del tipo Gram positivas y Gram negativas.

CAPITULO VI: BIBLIOGRAFÍA

1. Silva GC, García BJ, Silva GL, Navarro EJ, Carrillo PC, Agustín ML, et al. Técnico especialista en laboratorio. Vol 1. Madrid:España .2006 p.549
2. Panreac Química, S.A.. Analíticos en alimentaria. Métodos oficiales de análisis, Aceites y grasas. 1991.p.82.
3. León J. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial Agroamerica.San José. Costa rica . p 153
4. Ahmed HL, Mohd SH, Ahmed YS, Koko WS, Ibrahim AS. Actividad antimicrobial *In vitro* de extractos clorofórmicos, hexánicos y etanólicos de *Citrullus lanatus* var. *citroides*. Journal of Medicinal Plants Research. 2011; 5(8): p.1338-1344.
5. Marzouk B, Morzouk Z, Mastouri M, Fenina N, Aoni M. Evaluación comparativa de la actividad antimicrobial de extractos de frutos inmaduros y semillas de *Citrullus colocynthis*. African Journa of Biotechnology. 2011; Marzo; (10) :10 .p.2130-2134
6. Idouraine A, Kohlhepp EA, Weber CW. Nutrient Constituents from Eight Lines of Naked Seed Squash (*Cucurbita pepo* L.). J. Agric. Food Chem. 1996.44: 721–724.
7. Lazos ES. Nutritional, Fatty Acid, and Oil Characteristics of Pumpkin and Melon Seeds. J. Food Sci. 1986; 51: 1382–1383.
8. Stevenson DG, Eller FJ, Wang L, Jane JL, Wang T, Inglett GE. Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. J. Agric. Food Chem. 2007; 55: 4005– 4013.
9. Tsaknis J, Lalas S, Lazos ES. Characerization of Crude and Purified Pumpkin Seed Oil. Gras. Aceit. 1997; 48: 267– 272.
10. Wenzl T, Prettner E, Schweiger K, Wagner FS. An Improved Method to Discover Adulteration of Styrian Pumpkin Seed Oil. J. 2002.
11. Atta-Ur-Rahman. Studies in Natural Products Chemistry. Vol 32. Amsterdam: Elseiver; 1992. p 431.
12. Suquilanda VM. Producción orgánica de cultivos andinos. 2011; 180-184

13. Banco Central de Reserva. Síntesis económica de Arequipa. Arequipa; 2011.
14. HUANCA, W. 2012. Cultivo de zapallo - (Cucurbita máxima Dutch)
Disponible en Monografias.com, pp. 2
15. Villena PM. Estudio del efecto de la poda apical tardíade la rama principal y
poda de la ramas laterales, en el rendimiento y calidad del cultivo de zapallo.
p 3-8 (Tesis de título profesional). Perú: Universidad Católica De Santa
Maria, Facultad de ciencias e ingenierías biológicas y químicas.
16. Mi YK, Eaun JK, Young-Nam K, Chagsun C, Bog-Hieu L. Comparison of
the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*)
species and parts. *Nutr Res Pract* 2012;6(1):21-27
17. Programa Integral Metropolitano. Universidad de la Republica. Huertas en
Centros Educativos .Uruguay.2008;41
18. García Breijo F, Roselló Caselles J, Santamarina Siurana P. Introducción al
funcionamiento de las plantas. Valencia: Editorial de la Universidad
Politécnica de Valencia; 2006 .p. 163
19. Robles Sánchez R. Producción de oleaginosas y textiles. 3 ed. México:
Editorial Limusa; 1991.p.329
21. Ravishankar K,.Kiranmayi GVN, Appa GV, Sowjanya VVL, Baba SV,
Llakshmi VG, Siva PV, et al. Preliminary phytochemical Screening and in-
vitro antibacterial activity of cucurbita maxima seed extract . *IntJour Res
Phar Chem. India.*2012; 2(1): 2
23. Manal, K.A. Effect of Pumpkin Seed (*Cucurbita pepo* L.) Diets on Benign
Prostatic Hyperplasia (BPH): Chemical and Morphometric Evaluation in
Rats. *World Journal of Chemistry.* 2006;1 (1): 33-40.
24. Gil Fernandez A.Tratado de nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de
los Alimentos. 2da edición.Tomo II: Editorial panamericana; 2010.p.258
25. Vega Turizo A. Guía para la elaboración de aceites comestibles,
caracterización y procesamiento de nueces: Convenio Àndres Bello ;2004.p.7
26. Vásquez C, de Cos AI, López-nomdedeu C. Alimentación y nutrición:
Manual teórico y práctico. 2 ed. España. Ediciones Díaz de Santos;
2005.p.15

27. Mataix Verdú J. Nutrición para educadores. 2 ed .España. Ediciones Díaz de Santos; 2005. p.68
28. Balch PA. Recetas nutritivas que curan .2 ed. USA. Avery Publishing Group; 1997 .p.53
29. Pariona Mendoza N. Obtención de los ácidos grasos del aceite de la *Plukenetia volubilis* L. "Sacha Inchi" para la utilización en la industria y estudio fitoquímico cualitativo de la almendra. (Tesis) Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Química e Ingeniería Química. 2008
30. Rocha Machado V. Semi-síntese de derivados glicosilados de dihidrocucurbitacina B, aislada de *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Tesis de Maestría). Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Ciências Farmacéuticas.2011
31. Anupama S. Bitter bottle gourd (*Lagenaria siceraria*): Healer or killer?., Int Jou Nut Pharm Neur. 2012; 2:276-277
32. Gry J, Soborg I, Christer AH. Cucurbitacins in plant food. Nordic Council of Ministers, Copenhagen ;2006.p.18-19
33. Miró L. Phytotherapy .Research. v9.1995. p.195-168.
34. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas Mediciniais na Amazonia e na Mata Atlantica. 2 ed. Sao Paolo ; 2002.p.178
35. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. España: Ediciones Omega S.A.; 2003
36. Molina BP, et al. Prácticas de química orgánica. Murcia: P Molina Buendía; 1991.
37. Gao M, LIu C. Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim. World Journal of Microbiology & Biotechnology; 2005.p.1461-1463.
38. Rostagno M, Palma M, Barroso C. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatograph. 2003; 1012: 119-128
39. Gardner Dexter Hiscox, Albert Allis Hopkins. Recetas industriales y fórmulas domésticas. Vol4. México: Gili;1994

40. McMahon G. Analytic Instrumentation, A guide to laboratory portable and Miniaturized Instruments. First Edition. England: Wiley; 2007.
41. Skoog DA, Leary JJ. Análisis Instrumental. Madrid: McGraw-Hill ;1994
42. Mc Master MC. HPLC: A Practical User's Guide. Second edition. New jersey: Wiley-Interscience; 1994
43. Miller JM, Crowther JB. Analytic chemistry in a GMP environment .A practical guide. New york :John Willey & Sons; 2000
44. Nieto B, MS. Validación de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para cuantificar cinamaldehído en aceite esencial obtenido de la corteza del *cinnamomum* spp “canela” y comparación de su capacidad antioxidante. (Tesis de licenciatura). Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2011.
45. Quattrocchi, Abelaira, Laba. Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica, Buenos Aires: Artes Gráficas Farro; 1992.
46. Adamovics J. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Second Edition. USA: Marcel Dekker;1997.
47. Kromida S.HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization. Germany :Wiley-VCH; 2006.
48. Wagner H, Blatt S. Cromatografía en capa fina. 2 Ed. México: Spinger; 1996
49. Prescott LM. Microbiología. Ed 5. Mc Graw Hill 2002
50. Huamani Achata ME, Ruiz Quiroz JR. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de tres departamentos el Perú. (Tesis). Lima: Universidad Mayor de San Marcos; 2005
51. Jave Marquez M. Manual de microbiología I.Universidad Católica de Santa María.Arequipa; 2005
52. Madigan M, Martinko J. Brock Biology of Microorganisms, 10 Ed. Prince Hall; 2005
55. Bair JN..Remington Farmacia. 20 Ed. Filadelfia: Ed. Médica Panamericana; 2003 .p.1795
56. Miller K. Diccionario Enciclopédico de Enfermería. 5ta Edición. Buenos aires: Editorial Médica Panamericana;1996.p.263

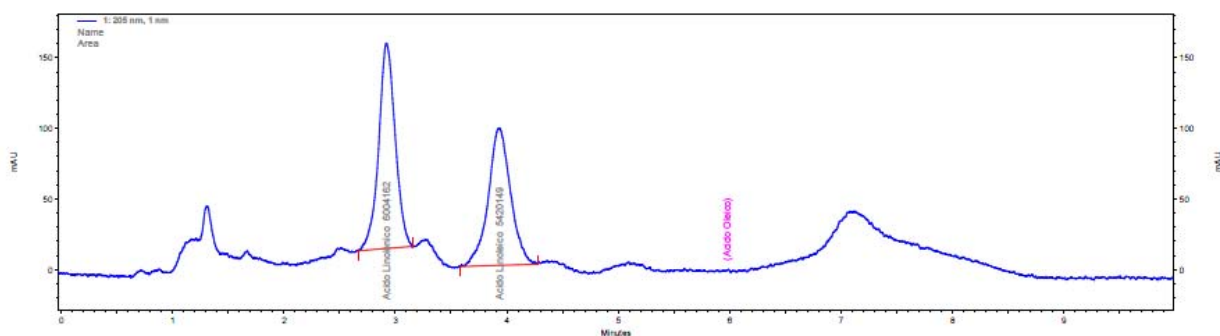
57. Mendoza Patiño N. Farmacología médica. México :Editorial Médica Panamerica;2008.p.577
58. Espinoza, A. M. K. 2011. Desparasitantes naturales para tratar endoparasitos en conejos de la fmvz de la umsnh. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; México.
59. Nollet, LM. Handbook of food analysis. New York: M. Dekker; 1996.
61. Nielsen S. Food Analysis Laboratory Manual. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.
62. Connors KA. Curso de análisis farmacéutico. 2 da Edicion. España: Editorial Reverte. p.271-272
63. Foods–vegetable and animal fats and oils– determination of the saponification index–test method pp 3-6
64. Fernández Segovia I. Martínez García E. Cuantificación de compuestos por cromatografía: Método del Patrón Externo. Universidad Politécnica de Valencia.p.4-5
65. Fried B. Sherma J. Thin- Layer Cromatograhly. 4ta Edition. Usa: Marcel Dekker Inc; 1999.
66. Forbes BA. Diagnóstico Microbiológico. 12ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana.; 2009. p. 245
67. Sacsquispe Contreras R. Ventura Egúsqiza G. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias Instituto Nacional de Salud. Lima; 2001.p. 44-45
68. Tortora GJ. Funke BR. Case CL. Introducción a la microbiología. 9ª Edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana;2007.p.602
69. Rodríguez Cavallini E. Gamboa Coronao MM. Hernández Chavarría Hernández F. Hidalgo García JD. Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.p.339

INTERNET

15. Orden: Cucurbitales. Disponible en:
www.taxateca.com/ordencucurbitales.html. Acceso el 17 de Febrero del 2013.
20. Cucurbita máxima Disponible en:
http://es.wikipedia.org/wiki/Cucurbita_maxima. Acceso el 17 de Febrero
22. Aceite de pepa de calabaza. Disponible en : <http://www.alimentacion-sana.com.ar>. Acceso el 19 de Febrero del 2013
53. *Escherichia coli* Disponible en :
<http://www.taxateca.com/ordenenterobacteriales.html> eso el 17 de Febrero del 2013
54. *Shigella*. Disponible en :
<http://www.taxateca.com/ordenenterobacteriales.html> eso el 17 de Febrero del 2013
60. Termobalanza. Disponible en:
<http://calibraciondeinstrumentosdejoclin.blogspot.com/2011/12/termobalanza.html>. Acceso el 20 de Febrero del 2013

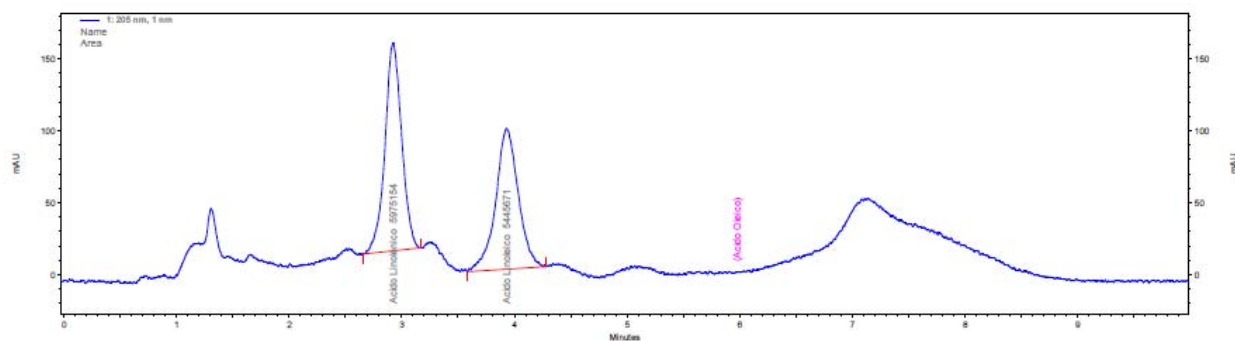
ANEXO 1

Corrida cromatográfica del aceite de la semilla *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* (Zapallo)



D:\PROYECTOS HPLC\Control de Calidad\Data\acidos omega\muestras\macre zambo AG 004 16-02-2013 12-14-48 p.m..dat, 1: 205 nm, 1 nm

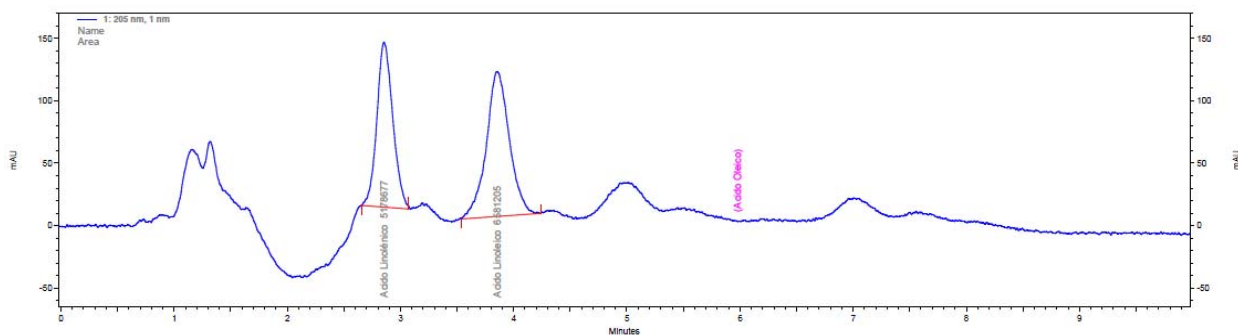
Corrida cromatográfica del aceite de la semilla *Cucurbita máxima Dutch var. Zambo* (Zapallo)



D:\PROYECTOS HPLC\Control de Calidad\Data\acidos omega\muestras\macre zambo AG 003 16-02-2013 12-03-19 p.m..dat, 1: 205 nm, 1 nm

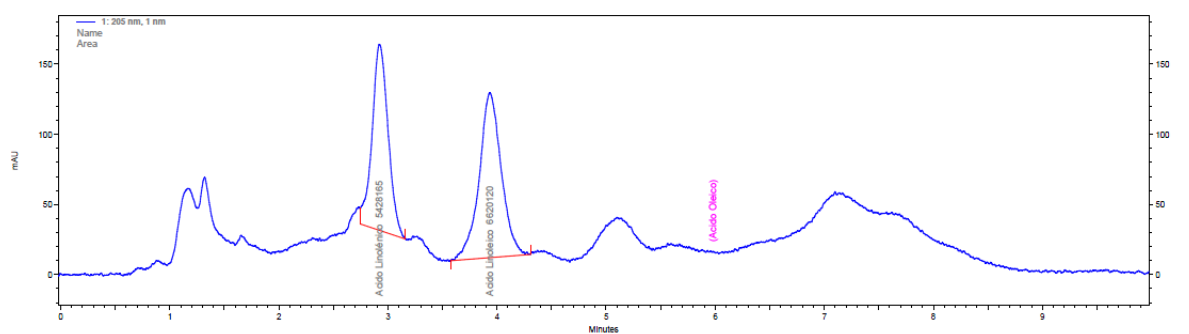
ANEXO 2

Corrida cromatográfica del aceite de la semilla *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* (Zapallo) por HPLC



D:\PROYECTOS HPLC\Control de Calidad\Data\acidos omega\muestras\macre zambo AG 001 16-02-2013 11-40-09 a.m..dat, 1: 205 nm, 1 nm

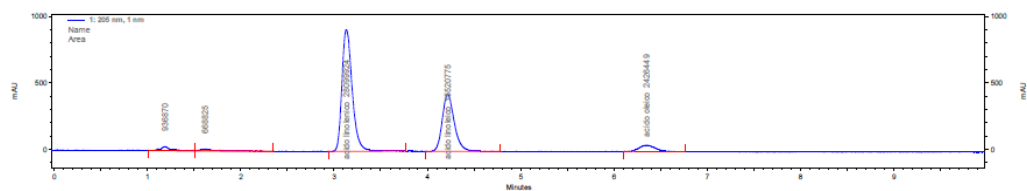
Corrida cromatográfica del aceite de la semilla *Cucurbita máxima Dutch var. Macre* (Zapallo) por HPLC



D:\PROYECTOS HPLC\Control de Calidad\Data\acidos omega\muestras\macre zambo AG 002 16-02-2013 11-51-49 a.m..dat, 1: 205 nm, 1 nm

ANEXO 3

Corrida cromatográfica de los estándares de ácido α -linolénico, ácido linoleico y ácido oleico por HPLC



D:\PROYECTOS HPLC\Control de Calidad\Data\ácidos omegas\tesis\pruebas\ESTANDARES AG NUEVA LINEALIDAD 001 04-03-2013 12-08-54 p.m.-Rep1.dat, 1: 205 nm, 1 nm



ANEXO 4

Fotografía: *Cucurbita máxima* Dutch var. Zambo (A) y var. Macre (B) (Zapallo)

