



***Cuantificación de lípidos en las
semillas de *Lupinus mutabilis*
por índice de peróxidos y
extracción de sus alcaloides
para el análisis de la actividad
antibacteriana***

Alumnas: Nicole Blanc y Romina Marichal

Período de realización: 29/10/2021 - 26/11/2021

3°BG Química Industrial - UTU Pando



Agradecimientos

- A los profesores Anarella Gatto y Raúl Britos, asesores por su constante apoyo durante la ejecución y redacción de la presente investigación.
- A la profesora Laura Da Silva, por las facilidades y apoyo para la realización de los análisis microbiológicos que se requerían para este proyecto.
- A los docentes de la UTU de Pando en el bachillerato de química, por sus consejos, tiempo y enseñanzas impartidas a lo largo del curso.
- A los compañeros de clase, que junto a bromas y momentos divertidos nos brindaron su apoyo frente a dudas presentadas.
- Un último agradecimiento mutuo entre las participantes de esta investigación, por los conocimientos compartidos y la unión para poder concluir este ciclo de la mejor manera, potenciándonos y haciendo de este trabajo un momento de aprendizaje.

Resumen

En la siguiente investigación se logró realizar la cuantificación de lípidos en las semillas de *Lupinus Mutabilis*, así como la extracción de sus alcaloides para el análisis de la actividad antibacteriana de los mismos. Para lograr estos objetivos, se tomó un período de tiempo desde el día 29 de octubre hasta el día 26 de noviembre del año 2021. Las muestras utilizadas presentaban como variable su punto de origen, lo que conlleva diferencias climáticas y de suelos, siendo la muestra 1 proveniente de Argentina, y la muestra 2 de Italia. El método empleado para la cuantificación de lípidos fue el índice de peróxidos, para la extracción de los alcaloides se utilizó un solvente orgánico en medio alcalino mientras que para su reconocimiento se utilizó el reactivo de Mayer. Por último, el análisis de la actividad antibacteriana de los alcaloides se realizó a través del método de difusión en agar, empleando como patrón al antibiótico Sefril; se estudió el efecto de ambas muestras en bacterias gram+ y gram-. Como resultados se determinó que el índice de peróxidos es bajo en ambas muestras. Siendo el de la muestra 1 de $(1,16 \pm 0,01)$ meq/kg y el de la muestra 2 de $(0,593 \pm 0,006)$ meq/kg. En cuanto a su actividad antibacteriana, pudo observarse que ambas muestras presentaron un mayor efecto y halo de inhibición sobre las bacterias gram- (*E. Coli*) en contraposición con las bacterias gram+ (*Listeria*). En comparación al antibiótico Sefril, la actividad antibacteriana fue similar. Se concluyó que ambos son aceites de buena calidad debido a su baja tendencia al enranciamiento, así como que la actividad antibacteriana de los alcaloides quinolizidínicos presentes en la semilla cambia a causa del ambiente en el crecimiento de la planta.

Abstract

In the following investigation, it was possible to perform the lipid quantification in the seeds of *Lupinus Mutabilis*, as well as the extraction of their alkaloids for the analysis of their antibacterial activity. To achieve these objectives, a time was taken from October 29th to November 26th, 2021. The samples used presented their point of origin as a variable, which entails climatic and soil differences, the sample 1 was from Argentina, and the sample 2 from Italy. The method used for the quantification of lipids was the peroxide index, for the extraction of alkaloids an organic solvent was used in an alkaline medium, while Mayer's



reagent was used for its recognition. Finally, the analysis of the antibacterial activity of the alkaloids was carried out through the agar diffusion method, using the antibiotic Sefril as a standard, the effect of both samples on gram + and gram- bacteria were studied. As result, it was determined that the peroxide index is low in both samples. Being that of sample 1 of $(1,16 \pm 0.01)$ meq/kg and that of sample 2 of (0.593 ± 0.006) meq/kg. Regarding their antibacterial activity, it was observed that both samples had a greater effect and inhibition halo on gram- bacteria (*E. Coli*) in contrast to gram + bacteria (*Listeria*). Compared to the antibiotic Sefril, the antibacterial activity was similar. It was concluded that both are good quality oils due to their low tendency to rancidity, as well as that the antibacterial activity of the quinolizidine alkaloids present in the seed changes due to the environment in the growth of the plant.

Introducción

En los años recientes, las plantaciones del género Lupino se han incrementado significativamente debido al interés en su perfil nutricional. Aun así la presencia de sustancias tóxicas ha limitado gran parte de su uso en la alimentación humana, por lo que la semilla se destina principalmente a la alimentación y engorde de animales de criadero. Si bien se ha logrado de manera exitosa modificar genéticamente algunas especies del Lupino, el *Lupinus Mutabilis* en particular pierde sus ventajas agronómicas al ser modificado. Por esta razón se propone el objetivo de realizar la extracción de sus alcaloides por medio alcalino posterior a su cosecha, así como también determinar la actividad antibacteriana de extractos alcaloidales contra bacterias Gram positivas y negativas y, al mismo tiempo, cuantificar los lípidos de las muestras mediante la determinación del índice de peróxidos.

Frente a esto se plantea la siguiente pregunta investigable: ¿Qué sucede con la cantidad de lípidos en las semillas de *Lupinus Mutabilis* y la actividad antibacteriana de sus alcaloides, si se modifica el lugar de origen de las muestras (lugar 1: cultivos argentinos; lugar 2: cultivos italianos)?

Hipótesis

Se espera que las cantidades de lípidos determinadas presenten notables diferencias en los distintos puntos de origen de las muestras, ya que las ubicaciones constan de diversos suelos, climas y métodos de plantaciones. En cuanto a los alcaloides, según investigaciones leídas, se espera que los mismos tengan una muy buena actividad antibacteriana frente a las bacterias empleadas.

Objetivos

- Cuantificar lípidos mediante la determinación del índice de peróxidos.
- Extraer los alcaloides por medio alcalino.
- Determinar la actividad antibacteriana de extractos alcaloidales contra bacterias Gram positivas y negativas.



Marco teórico

Lupinus mutabilis

Es una planta leguminosa de origen andino que se encuentra principalmente en los ecosistemas de alta montaña y páramos, entre 2000 - 4500 m.s.n.m. (Guerrero, 1990).

El género reúne alrededor de 300 especies de hierbas, arbustos y unos pocos árboles con un gran potencial agronómico, derivado del alto contenido proteico de sus semillas y el efecto positivo sobre la fertilidad de los suelos.

Respecto a la *L. mutabilis*, su comportamiento en suelos muestra características de alta importancia como la resistencia a enfermedades, plagas y condiciones climáticas adversas (Guerrero, 1990). A continuación, se muestra la descripción taxonómica de *L. mutabilis*:

Tabla n° 1: Descripción taxonómica de *L. mutabilis* (Guerrero, 1990).

Nombre científico	<i>Lupinus Mutabilis</i>
Reino	Plantae
Subreino	Plantas vasculares (traeochofhyta)
División	Plantas con flores (filo magnoliohyta)
Clase	Magnolias, margaritas y parientes
Género	Lupinus
Especie	Lupinus Mutabilis
Nombres comunes	Chocho, alverjilla (Colombia, Ecuador); altramuz (España), tarwi (Perú), lupino.

Descripción botánica

Lupinus mutabilis o Tarwi, es una especie generalmente anual, de crecimiento erecto, alcanzando alturas que van desde los 0,8 hasta más de 2 m (Rivera, 2001).

La flor mide alrededor de 1,2 cm de longitud con la forma típica de las papilionáceas (Frías, 2007). La pigmentación de la corola puede variar entre blanco, crema, amarillo, púrpura y/o azul-púrpura, debido a las antocianinas y flavonas de la planta (ver *Ilustración 1*).

El fruto se encuentra constituido por una vaina dehiscente de 5 a 12 cm de largo y de acuerdo a esto, es la cantidad de semilla que pueda albergar (ver *Ilustración 2*).

Su forma es de característica elipsoidal y lenticular, observándose algunas redondeadas y/o bordes definidos y semicuadrada (ver *Ilustración 3*) (Peralta, Caicedo y Rivera, 2001).

La semilla está conformada por dos cotiledones (parte interna de la semilla) y una radícula embrionaria equivalente al 88,97 % de la masa total. Estos son de color amarillo oscuro



debido al contenido de grasas y carotenoides. Su espesor promedio es de 2,41 mm con una desviación de $\pm 0,26$ mm. El 11,03 % de la semilla está compuesta por un tegumento blanco (que cubre el borde longitudinal de los cotiledones) de textura plástica y resistente. Se estima que su espesor es de 0,20 mm, no obstante varía de acuerdo con la zona cubierta.



Morfología de *Lupinus Mutabilis*: Ilustración 1: Hojas y flores / Ilustración 2: vainas / Ilustración 3: semillas (Peralta, Caicedo y Rivera, 2001).

Por otro lado, la semilla ha sido estudiada por su valor nutricional; sin embargo, presenta compuestos anti nutricionales como los alcaloides, los cuales pueden ser tóxicos para el consumo (Tapia y Anpe, 2016).

Algunas especies del género *Lupinus* como la *Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus* y *L. mutabilis*, se han cultivado en diferentes lugares alrededor del mundo, esto gracias a que su follaje y especialmente sus semillas presentan una importante concentración de proteínas (valores varían según la especie, variedad y condiciones ambientales) (Zamora y Natera, 2009).

En la *Tabla 2* se muestra la composición química del lupino sin desamargar y desamargado. El desamargado causa la pérdida de materia seca soluble. Esto resulta en un aparente aumento de la proteína cruda, debido a la lixiviación preferencial de glúcidos y minerales disueltos (Carbajal, 2016).

Tabla n° 2: Análisis bromatológico del lupino amargo y desamargado (Carbajal, 2016).

Componente	Lupino amargo (base seca)	Lupino desamargado (base seca)
Proteína (%)	47,80	54,05
Grasa (%)	18,90	21,22
Fibra (%)	11,07	10,37
Cenizas (%)	4,52	2,54
Humedad (%)	10,13	77,05
Glúcidos (%)	17,62	11,82
Alcaloides (%)	3,26	0,03



Azúcares totales (%)	1,95	0,73
Azúcares reductores (%)	0,42	0,61
Almidón total (%)	4,34	2,88
K (%)	1,22	0,02
Mg (%)	0,24	0,07
Ca (%)	0,12	0,48
P (%)	0,60	0,43
Fe (ppm)	78,45	74,25
Zn (ppm)	48,84	63,21
Mn (ppm)	36,72	18,47

Desde el punto de vista agronómico, el lupino es reconocido como una de las leguminosas más eficientes en la fijación del nitrógeno atmosférico y uno de los mejores abonos verdes; así como por su adaptación y tolerancia a suelos pobres, sequía y bajas temperaturas.

FAO, considera que las líneas de investigación que requieren ser completadas para este cultivo son la colección de germoplasma, mejoramiento genético, postcosecha e industrialización y promoción de su consumo (Barney, 2011).

Antecedentes de investigaciones con *Lupinus Mutabilis*

El mayor conocimiento de la fisiología del lupino, el desarrollo de métodos analíticos cada vez más precisos, la capacidad de síntesis química orgánica y los avances de los procedimientos de la química y biología experimental, han permitido realizar la extracción, el aislamiento y la caracterización de los alcaloides. También se ha comprobado la efectividad de estos compuestos mediante experimentos “in vitro” e “in situ” y se encuentra prometedor como agente de control. Los alcaloides del lupino muestran notable actividad biológica, misma que puede ser explotada en otros campos de la industria.

En una investigación de la INIAP, utilizando como indicadores biológicos a *Artemia salina* y alevines de trucha *Salmo gairdnerii*, se determinó una dosis letal media de 473,88 ppm y 589,54 ppm respectivamente. En los seres humanos y animales son tóxicos a dosis elevadas: 11 a 25 mg/kg de masa corporal en niños y 25 a 46 mg/kg en adultos, produciendo graves intoxicaciones, cuyos síntomas son midriasis, calambres, cianosis, parálisis respiratoria, dolor estomacal, vómito e incluso coma.

Entre las propiedades de los alcaloides adjudicadas gracias a las investigaciones realizadas se destacan: actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Actividad antifúngica, efectivo en el control de *Mycrosporium canis* y *Trichophytom rubrum*. Actividad fungistática, por ejemplo, retarda el desarrollo y multiplicación del *Penicillium digitatum* en ciertas frutas como el borojo. Actividad nematocida, los extractos de lupino con 2 % de alcaloides y los de mashua con 4,12 % de isotiocianatos, presentaron propiedades



nematicidas, provocando la mortalidad del 93,3 y 96,7 % de larvas expuestas, respectivamente (Cawley, 1985).

Selección del origen de las muestras y sus usos/ cultivos

El lupino, que tiene una calidad de grano similar a la de la soja, se produce en invierno, se siembra en abril-mayo y se cosecha en noviembre. Uno de los requisitos como especie es ser plantado en campos profundos y bien drenados, ya que es una especie muy susceptible al anegamiento y a las zonas bajas (García, 2020).

A lo largo del mundo, es una especie que está muy difundida en Australia (donde se utiliza como suplemento para las ovejas de cría y para los engordes de cordero), Europa y Chile (donde se implementa en el manejo alimenticio de los ovinos, pero sobre todo se prepara para las vacas lecheras y producción de pescado) (García, 2020).

En Uruguay está presente hace 4 años y tiene un uso múltiple, dado que se utiliza para el engorde de ganado de carne, tanto para la recria de terneros como para la terminación en los feedlots (Foderé, 2020). A su vez, tiene lugar en los engordes de corderos y es muy utilizado para las cabañas, que son las grandes demandantes de grano de lupino por su gran calidad. Un tercer destino es para los tambos, que también lo están comenzando a implementar en sus sistemas de suplementación (Foderé, 2020).

A la hora de la selección de los países de origen de las muestras a analizar, se tuvieron en cuenta las diferencias de los lugares de cultivo, teniendo ambos, climas y suelos diferentes lo que generaría una repercusión innegable en los resultados.

La muestra 1 es proveniente de Argentina, del límite con Chile donde se encuentra la Cordillera de los Andes; mientras que la muestra 2 es originaria de Italia.

Lípidos

Los lípidos son un grupo muy heterogéneo de compuestos orgánicos, constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno principalmente, y en ocasiones por azufre, nitrógeno y fósforo. En los alimentos existen fundamentalmente tres tipos de lípidos:

- Grasas o aceites (también llamados triglicéridos o triacilglicéridos). Se dividen en saturadas e insaturadas. Su estructura química varía y sus propiedades y funciones también, dependiendo de los ácidos que contienen. (García, s.f.).
- Fosfolípidos.
- Ésteres de colesterol, que muestran un componente común: los ácidos grasos. Los hay de tres tipos: ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGM), ácidos grasos poliinsaturados (AGP) (García, s.f.).

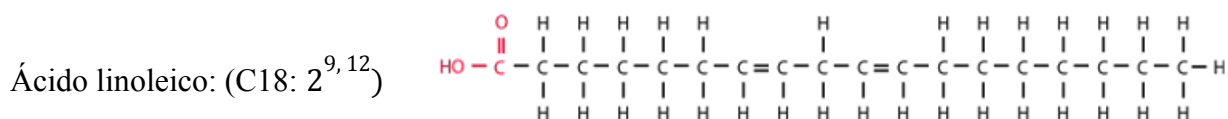
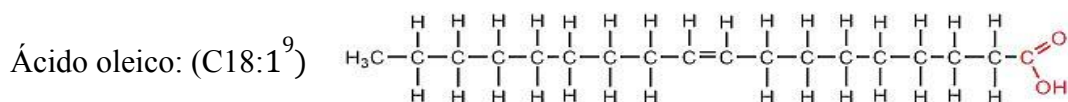


Tipos principales de lípidos que se encuentran en los organismos vivos

1. **Fosfolípidos:** consisten en dos cadenas de ácidos grasos, un grupo fosfato y un grupo glicerol, desempeñan un papel clave en la constitución de las membranas celulares (Muñoz, 2019).
2. **Glicolípidos:** son moléculas grasas que contienen una unidad de azúcar. Juegan un papel importante en el desarrollo del sistema inmune del cuerpo.
3. **Colesterol:** se encuentra en las células y el torrente sanguíneo de los seres humanos. Debido a que no es soluble en la sangre debe ser llevado a las células con la ayuda de lipoproteínas (Muñoz, 2019).
4. **Triglicéridos:** consisten en tres moléculas de ácidos grasos y una molécula de glicerol. Los ácidos grasos pueden ser insaturados o saturados. Un triglicérido se clasifica como grasa si se solidifica a una temperatura de 20 °C, de lo contrario se clasifican como aceites (Muñoz, 2019).
5. **Esteroides:** incluyen hormonas y colesterol. Este último es producido por el cuerpo y consumido a través de los alimentos, y desempeña un papel en la producción de hormonas.
6. **Lipoproteínas:** una lipoproteína es una combinación de proteínas y lípidos que se encuentran en la membrana de una célula (Muñoz, 2019). Esta ayuda a que la grasa se mueva alrededor del cuerpo en el torrente sanguíneo y existe en forma de lipoproteína de baja densidad (HDL) y lipoproteína de alta densidad (LDL).
7. **Cera:** se pueden encontrar en las plumas de los animales, en los oídos humanos e incluso en las hojas de las plantas. Su función principal es la de protección (Muñoz, 2019).

Ácidos grasos presentes en *Lupinus Mutabilis*

El aceite de lupino es de muy buena calidad, teniendo hasta un 12 % de ácidos grasos saturados, 50-70 % de ácido oleico y del 18 al 22 % de ácido linoleico (UBAagronomía, s.f.).



Índice de Peróxidos

El Índice de peróxidos es una estimación del contenido de sustancias que oxidan el yoduro potásico y se expresa en términos de miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa. Se asocia con la presencia de peróxidos derivados de los ácidos grasos presentes en la muestra (Anónimo, 2002).



El contenido de peróxidos, define su estado de oxidación primaria y nos da por tanto un parámetro de su tendencia al enranciamiento (Hanna Instruments, s.f.).

Los peróxidos o compuestos de oxidación inicial, se originan si la materia prima con la cual se fabrica el producto se maltrata, si el aceite no se protege de la luz y el calor, o no se guarda en envases adecuados, como consecuencia de ello, a mayor índice de peróxidos menor será la capacidad antioxidante de un aceite (Hanna Instruments, s.f.).

Según lo establecido por el Reglamento Bromatológico Nacional de la IMPO, el índice de peróxidos en aceites refinados debe tener un máximo de 10 miliequivalentes de oxígeno activo/kg, mientras que el valor máximo para los aceites vírgenes es de 15 miliequivalentes de oxígeno activo/kg (Capítulo 3, art. 17.3.7, 2019).

Alcaloides

No existe una definición clara de lo que constituye un alcaloide, pero estos compuestos comparten las siguientes características: son componentes básicos que contienen nitrógeno; son en su mayoría componentes complejos, derivados biosintéticamente de varios aminoácidos y muestran efectos farmacológicos pronunciados sobre diversos tejidos y órganos de seres humanos y otras especies animales.

Estos compuestos se pueden encontrar en productos naturales tales como plantas. El tipo y la cantidad de estos alcaloides varían mucho dependiendo de la porción de la planta analizada y la etapa de maduración (Cooke, Poole y Wilson, 2000).

Alcaloides del *Lupinus mutabilis*

El aprovechamiento de los lupinos en el mundo se ha limitado por la presencia de sustancias tóxicas (Jacobsen y Sherwood, 2006), debido principalmente a que las semillas poseen en su estructura alcaloides quinolizidínicos, que le confieren cierto grado de toxicidad y un sabor fuertemente amargo (Schöneberger e Ildefonso, 1981). Estas sustancias protegen a la planta en el medio e impiden que la semilla sin tratamiento pueda ser aprovechada para consumo (Butler, 1996).

Las investigaciones se han ocupado en eliminar dichas sustancias, esencialmente con un enfoque agronómico y en segundo plano con enfoque industrial (Gross et al, 1982). A través del primer enfoque se han desarrollado, entre otros, especies como el lupino blanco, (*L. Albus*) (Von Baer y Groos, 1983). En el caso del *L. mutabilis*, el mejoramiento agrícola no ha tenido grandes repercusiones ya que esto ha provocado la pérdida de sus características de resistencia. Actualmente el lupino andino se detoxifica mediante sucesivos lavados con agua que eliminan estas sustancias hasta niveles que permiten su consumo (Jacobsen y Mujica, 2006).

Se ha reportado que más de 450 alcaloides se producen en plantas de leguminosas. Los alcaloides de quinolizidina, contenidos en el lupino, son el mayor grupo de alcaloides de las leguminosas (Cooke, 2000).



Las propiedades alcalinas del lupino se manifiestan porque tiene en su estructura 2 átomos de nitrógeno. Los compuestos alcalinos de *lupinus mutabilis*, son altamente tóxicos en concentraciones altas, tanto en animales como en seres humanos (Baldeón, 2012).

Alcaloides quinolizidínicos (AQ)

Los alcaloides del género *Lupinus* son derivados de la quinolizidina de variable complejidad, donde la mayoría son bicíclicos o tetracíclicos. Estos se encuentran como bases terciarias y N-óxidos en concentraciones que varían desde niveles indetectables en variedades dulces genéticamente obtenidas, hasta 3,8 % en algunas especies amargas de *Lupinus albus* y *Lupinus mutabilis* (Muzquiz, 1993). Se han identificado la lupanina (ver *Ilustración 4*), a 1,3 hidroxilupanina, angustifolina, esparteína (ver *Ilustración 4*), y cistisina como las sustancias de mayor presencia (Hatzold, 1983). La lupanina es uno de los alcaloides que se ha encontrado como mayoritario en la especie *L. mutabilis* y en sus diferentes ecotipos (Olviera, 1993).

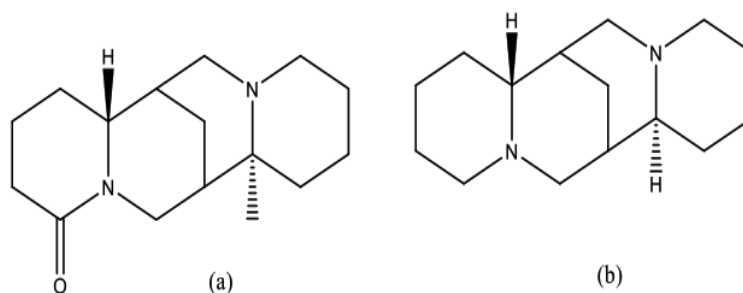


Ilustración 4: Estructuras químicas de la Lupanina (a) y Esparteína (b);(Olviera, 1993).

Actividad biológica de metabolitos secundarios en género *Lupinus*

Los metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides y fenilpropanoides actúan como defensa activa para el control de plagas e insectos, matando al microorganismo patógeno o inhibiendo su reproducción: estos compuestos son los responsables de sintetizar enzimas que degradan la pared celular de los microorganismos, brindándoles la capacidad de inactivar toxinas de origen microbiano (Sharapin, 2000).

A continuación, se presenta la actividad biológica relacionada de metabolitos secundarios de *L. mutabilis*, así como los metabolitos secundarios reportados en otras especies de *Lupinus*:

Tabla n° 3: Actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en el género *Lupinus* (Sharapin, 2000).

Metabolito secundario	Generalidades e importancia	Referencias
Flavonoides	Compuestos polifenólicos que comprenden quince átomos de carbono con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Estos compuestos juegan un papel importante como metabolitos secundarios presentando	(Villanueva, 2013)



	actividad antibacteriana en bacterias gram positivas como <i>S.aureus</i> .	
Saponinas y esteroides	Las saponinas y glicósidos son esteroides que se encuentran en el género <i>Lupinus</i> , tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar una espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas.	(Cano, Dewey y Xie, 2013)
Taninos	Su actividad antimetanogénica se atribuye principalmente a los taninos condensados los cuales disminuyen la producción de metano a través de una reducción digestiva de la fibra.	(Hagel y Facchini, 2013)
Alcaloides	Los alcaloides presentes en <i>lupinus</i> se evaluaron como control de plagas y enfermedades comprobando que la lupanina uno de los alcaloides principales logró inhibir al 100 % el crecimiento micelial de <i>R. Solani</i> . Otros alcaloides presentes en el género <i>lupinus</i> como la lupinina y esparteína han presentado efecto hipoglucemiante.	(Beaudoin, Facchini, Mustafa, Pan, Tang y Choi, 2016)

Resistencia bacteriana

En la actualidad, se han incrementado las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos, convirtiéndose en una problemática mundial, debido a que los tratamientos se encuentran limitados (Lourenco, Mximo, Ferreira y Pereira; 2002), las bacterias presentan una plasticidad genética que les permite responder a una amplia gama de amenazas ambientales, incluida la presencia de moléculas de antibióticos que pueden poner en peligro su existencia; estas bacterias han desarrollado mecanismos antiguos para resistir el efecto de la molécula antibiótica dañina (Jarrín, 2003).

Todas las estrategias de resistencia bacteriana son codificadas por uno o más genes, los cuales son compartidos con facilidad entre cepas de las mismas especies, especies de géneros diferentes e incluso entre bacterias emparentadas de manera más lejana (Arango, 2002). La resistencia bacteriana a los antibióticos corresponde a una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. La velocidad con la que surge y se extiende en poblaciones microbianas, está con frecuencia determinada por la cantidad de antibióticos concretos en un ambiente dado.

Múltiples investigaciones han demostrado que la *Lupinus mutabilis* presenta una amplia diversidad genética y adaptación a suelos, precipitación, temperatura, altitud y período vegetativo, lo que a su vez ocasiona que su actividad antibacteriana pueda variar de acuerdo a las condiciones de cultivo y suelos en los que la *Lupinus mutabilis* sea cultivada. Así mismo, varía en precocidad, contenido en proteínas, aceites, alcaloides, rendimiento y tolerancia a plagas y enfermedades (Crozier, 2015). Los alcaloides del género *lupinus* han presentado actividad antimicrobiana, según estudios previos (Santra, 2012), en donde dependiendo de las condiciones climáticas, es posible evidenciar el incremento en su contenido de alcaloides.



Bacterias Gram + y Gram -

En microbiología, se denominan bacterias gram positivas a aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. La envoltura celular de las bacterias gram positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior (Química.Es, s.f.).

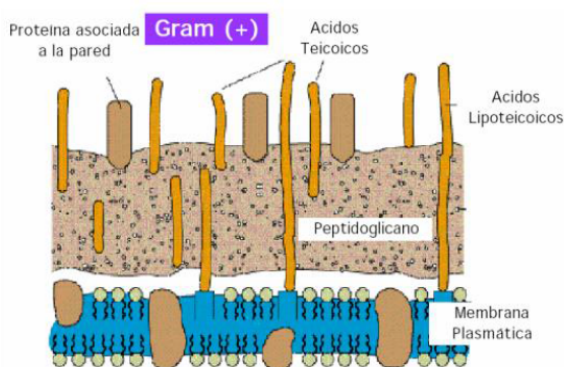


Ilustración 5: Pared celular Gram positivo (Da Silva, 2021).

Incluyen especies tanto móviles (vía flagelos) como inmóviles con forma de bacilo o coco; con gruesas paredes celulares o sin ellas.

La pared externa de la envoltura celular de una bacteria gram positiva tiene como base química fundamental el peptidoglucano, que es un polímero de N-acetil-2-D-glucosamina, unido en orientación β -1,4 con N-acetil murámico, a este se agregan por el grupo lactilo cuatro o más aminoácidos. Esta molécula se polimeriza gran cantidad de veces, de modo que

se forma una malla especial, llamada sáculo de mureína. Dicho compuesto es de vital importancia para conservar la forma y darle rigidez a la célula bacteriana (Química.Es, s.f.).

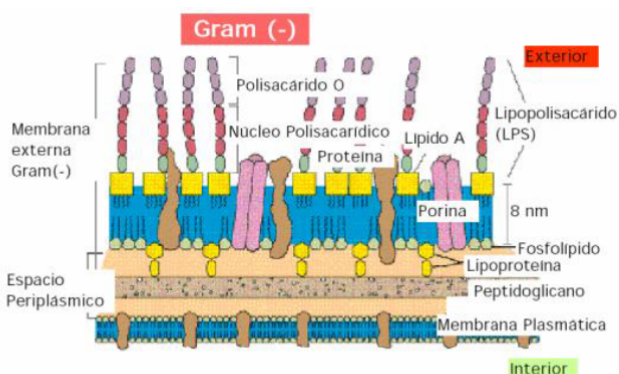


Ilustración 6: Esquema de la pared celular de bacterias Gram negativas (Da Silva, 2021).

Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Las bacterias gram negativas son menos susceptibles a los antibióticos debido a su membrana exterior. Esto es porque la membrana exterior ofrece la protección contra los tratamientos que dañarían ordinariamente la membrana interna. Las deformaciones resistentes a los antibióticos de bacterias se han observado para visualizar modificaciones en la composición del lípido o de la proteína de la membrana exterior (Química.Es, s.f.).

A aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram se les denomina bacterias gram negativas.



Materiales, sustancias y procedimientos:

Extracción del aceite de las semillas

Preparación del equipo Soxhlet:

Materiales	Muestras, sustancias y soluciones
Cápsulas de celulosa	Muestras molidas
Soportes y pinzas	Éter de petróleo
Tubos Soxhlet	Vaselina
Mantas calefactoras	
Condensadores	
Refrigerantes	
Balones de 250 mL	
Perlas de ebullición	

Procedimiento:

*Se molieron las muestras hasta conseguir un grano fino casi polvo.

1. Se colocó el tubo Soxhlet en un soporte con ayuda de pinzas.
2. Dentro del tubo Soxhlet se colocó la cápsula que contenía la muestra utilizada.
3. Después, se colocó la manta calefactora debajo del tubo Soxhlet.
4. Se colocó (sobre el tubo Soxhlet, pero sin tener contacto) en el soporte ya mencionado con ayuda de pinzas al condensador.
5. Se conectaron las mangueras que controlan el sistema de entrada y salida del refrigerante a una conexión de agua a temperatura ambiente.
6. Posteriormente se agregó un poco de vaselina entre las uniones del tubo Soxhlet y el condensador, para de esta forma facilitar la unión entre ambos, y disminuir la posibilidad de quebraduras.
7. En un balón, se colocó éter de petróleo de forma que el sistema generara 2 sifonadas.
8. Luego, se colocaron en el balón cuatro perlas de ebullición, para que la ebullición fuera más controlada, uniforme, evitando salpicaduras, disminuyendo la cantidad de burbujas, y favoreciendo el movimiento del líquido, el cual mejora la homogeneización (para que la temperatura sea más uniforme en todo el líquido).
9. Luego, se colocó nuevamente en la boca del balón un poco de vaselina, para facilitar la conexión con el tubo Soxhlet, y disminuir la probabilidad de quebraduras.
10. Se posicionó el balón sobre la manta calefactora y se conectó debajo del tubo Soxhlet.



Extracción sólido / líquido:

1. Se abrió el flujo de agua hacia el condensador, se comprobó que estuviera bien conectado y se llenó la sección refrigerante de éste.
2. Se encendió la manta calefactora para dar por iniciada la extracción.
3. Se observó hasta que ocurrió la primera sifonada, se observaron las características propias del aceite a extraer y del éter.
4. Luego de que se determinó el final de la extracción (proceso el cual duró 4 horas), se apagó la manta calefactora. Se dejó que se enfriara.
5. Se cerró el flujo de agua al condensador y, con cuidado, se desarmó el equipo.
6. Después, se separó el contenido del balón a un recipiente de un litro de volumen, se rotuló “aceite de lupinus + éter de petróleo”.

Recuperación de éter de petróleo y aceite de lupino:

Materiales	Soluciones
Roto-evaporador	Solución “aceite de lupinus + éter”
Matraz redondo de recolección	
Matraz redondo de evaporación	

Procedimiento:

1. Se armó el equipo, como se muestra en la ilustración 7, con la excepción de no colocar ambos matraces redondos (matraz redondo de recolección y matraz redondo de evaporación).

2. Se extrajo del recipiente de 1 L de la etapa anterior, el volumen total de la solución anterior contenida en él.

3. Se colocó el volumen de la solución extraída en el matraz redondo de evaporación.

4. Luego se conectó dicho matraz al tubo evaporador (el cual estaba conectado al motor rotatorio, y este al tubo de condensación en espiral).

5. Se aseguró que el matraz redondo de recolección estuviera limpio y listo para usar, luego, se lo conectó al refrigerante, (como se ve en la imagen).

6. Se abrió el flujo de agua al tubo de condensación en espiral, se observó que estuviera bien conectado y listo para usarse.

7. Se encendió la trompa de vacío, para reducir la presión interna del sistema.

8. Se encendió el baño termostático de agua a 70 °C.

9. Luego, se encendió el rotavapor para que el matraz redondo de evaporación empezara a girar.

10. Se esperó a que el rota-evaporador terminara de extraer el éter (sucedió cuando dejó de caer líquido en el matraz redondo de recolección).

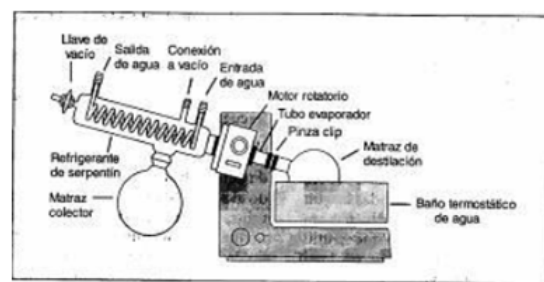


Ilustración 7: armado de rotaevaporador.



11. Se destrabó y quitó el matraz redondo de recuperación, se extrajo el contenido dentro de él y se lo colocó en un recipiente y se rotuló “éter extraído” con un marcador.

12. Posteriormente, se destrabó y quitó el matraz redondo de evaporación, se extrajo el contenido de él y se lo colocó en un vial, rotulando “Aceite de *Lupinus Mutabilis*”.

Determinación del índice de peróxidos

Materiales	Sustancias y soluciones
Pipetas graduadas de 5 mL y 10 mL	Semillas
Vasos de Bohemia de 50 mL y 100 mL	Cloroformo
Cuentagotas	Ácido acético glacial 100 %
Vidrios reloj	Cloruro de Bario dihidratado 0,01 eq/L
Papel de filtro	Ácido clorhídrico concentrado
Embudos de decantación de 100 mL	Hierro (III) Nitrato nonahidratado
Matraces aforados de 100,00 ± 0,16 mL, 50,00 ± 0,06 mL y 25,00 0,04 mL	Ácido clorhídrico al 1 %
Pipetas aforadas de 1,00 ± 0,008 mL, 5,00 0,010 mL y 10,00 ± 0,04 mL	Tiocianato de Potasio
Buretas de 10,00 mL	Agua destilada
Balanza analítica ± 0,0001 g	
Equipo de calefacción (plancha y baño de agua)	
Espectrofotómetro y celdas de vidrio	
Fotocolorímetro y celdas de vidrio/plástico	

Procedimiento:

Preparación de los reactivos:

Mezcla de cloroformo: ácido acético (2:3):

Se mezclaron 40 mL de cloroformo con 60 mL de ácido acético glacial. Se agitó bien.

Reactivo de Hierro (II):

Se preparó una solución en la que se disolvieron 0,4 g de cloruro de bario dihidratado en 50 mL de agua destilada y otra que contenía disueltos 0,5 g de sulfato de hierro (II) heptahidratado en 50 mL de agua destilada. Se combinaron ambas soluciones y se agregaron



2 mL de ácido clorhídrico concentrado. Finalmente se filtró para eliminar el sólido precipitado.

Ácido Clorhídrico al 1 %:

Se diluyeron 14 mL de ácido clorhídrico concentrado (36 %) en agua suficiente para obtener 500 mL de solución. Se tuvo la precaución de no agregar agua al ácido sino hasta que el mismo estuvo lo suficientemente diluido.

Solución de Hierro (III) 1 g/L:

Se disolvieron 0,36 g de nitrato de hierro (III) nonahidratado (se registró la masa real disuelta) en cantidad suficiente de ácido clorhídrico 1 %, de modo que se obtuvieron 50 mL de solución. Se preparó con material de la mayor precisión posible.

Solución de hierro (III) 100 mg/L:

Se diluyeron 10 mL de la solución de hierro (III) 1 g/L en ácido clorhídrico 1 % suficiente para obtener 100 mL de solución. Se preparó con material de la mayor precisión posible.

Solución de Tiocianato de Potasio 10 % m/V:

Se disolvieron 5 g de tiocianato de potasio en agua suficiente, de modo de obtener 50 mL de solución. Esta solución podía ser preparada alternativamente con tiocianato de sodio o de amonio.

Curva de calibración para Hierro (III):

1. Se transfirió la solución de hierro (III) de concentración 100 mg/L a una bureta de 10,00 mL limpia. Se enrasó la bureta en cero cuidando que no quedaran burbujas de aire en su pico.

2. Posteriormente, se transfirieron los siguientes volúmenes de solución a una serie de cinco matraces aforados de 50,00 mL:

Matraz	1	2	3	4	5
V _{Hierro (III)} 100 mg/L (mL)	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25

3. Se agregó a cada uno de ellos 1 mL de solución de tiocianato de potasio al 10 % y se enrasó con ácido clorhídrico al 1 %. Se preparó de la misma manera un blanco, en el que no se agregó hierro (solo el tiocianato y ácido clorhídrico al 1 %).

4. Luego se midió la absorbancia de cada una de las soluciones a 470 nm (por duplicado).

5. Previamente se ajustó el equipo con el blanco, de manera que su absorbancia fuese cero.

6. Se graficó la concentración de hierro (III) para cada solución (en mg/L) contra la absorbancia en un diagrama de dispersión (*ver Gráfica 1*) y se encontró la ecuación de la recta de mejor ajuste a la serie de datos experimentales mediante el método de mínimos cuadrados.

Determinación del índice de peróxidos:

1. Se midieron aproximadamente 0,5 g de aceite en un vaso de Bohemia de 50 mL (se utilizó una balanza analítica para que esta tenga la mayor precisión posible y se registró la masa real medida).



2. Se agregaron 10 mL de mezcla cloroformo: ácido acético 2:3 y 1 mL del reactivo de hierro (II). A continuación se agitó durante aproximadamente quince segundos, se cubrió el vaso con un vidrio reloj y se dejó en oscuridad por 10 minutos.
3. Pasados los 10 minutos, se transfirió cuantitativamente la mezcla a un embudo de decantación de 100 mL y se agregaron 20 mL de agua destilada, con lo que se diferenciaron claramente dos fases. Se tapó el embudo y se agitó por aproximadamente quince segundos.
4. Se dejó reposar el embudo hasta que las dos fases se diferenciaron nuevamente y se descartó la fase inferior de cloroformo. Se transfirió la fase superior a un vaso de Bohemia de 100 mL, se lavó el embudo con 5 mL de agua destilada y se combinó el agua de lavado con el resto de la fase acuosa.
5. Se calentó suavemente el vaso de Bohemia con la fase acuosa de manera que se eliminase completamente los restos de cloroformo y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 50,00 mL, que se enrasó con ácido clorhídrico al 1 %.
6. Se realizó una toma de 25,00 mL de la solución preparada anteriormente y se transfirió a un matraz aforado de 50,00 mL. Se agregó 1 mL de tiocianato de potasio al 10 % y se enrasó con ácido clorhídrico al 1 %.
7. La idea principal era que, luego de haber agregado el tiocianato y de haber enrasado a 50 mL, la intensidad del color obtenido no superase la intensidad del patrón más concentrado de la curva de calibración de hierro (III).
8. Se midió la absorbancia de la solución a 470 nm (por duplicado) contra un blanco preparado de la misma manera, pero sin la presencia de aceite.
9. A partir de la absorbancia obtenida se calculó la concentración de hierro de la solución y, a partir de ella, el valor del índice de peróxidos del aceite.

Extracción de alcaloides en medio alcalino

Materiales	Sustancias y soluciones
Balanza analítica ($\pm 0,0001$)	Cloruro de mercurio
Probeta 100 mL	Agua destilada
Matraz aforado ($100 \pm 0,16$) mL	Yoduro de potasio
Matraz Erlenmeyer	Amoníaco cc
Cuentagotas	Éter de petróleo
Probeta 10 mL	Ácido clorhídrico 1 eq/L
Papel de filtro	
Embudo de decantación	
Pipeta graduada de 5 mL	



Tubo de ensayo	
Vaso de descarte	

Procedimiento:

Preparación de reactivos:

Reactivo de Mayer:

Se disolvieron 1,3 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio y se aforó a 100,00 mL. Los alcaloides se detectaron como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol.

1. Se colocó en un pequeño Erlenmeyer 2 g de la muestra pulverizada y desengrasada.
2. Se humedeció con 20 gotas de amoníaco concentrado diluido al doble.
3. Luego se agregaron 10 mL de éter de petróleo.
4. Se dejó reposar 30 minutos agitando de vez en cuando y se filtró.
5. Se llevó el filtrado a embudo de decantación
6. Se agregaron 3 mL de una solución de HCl alrededor de 1 eq/L y se agitó.
7. Se retiró la fase inferior acuosa y se la filtró en un filtro previamente mojado.
8. Se recogió el filtrado en un tubo de ensayo.

Esterilización del material

Materiales	Soluciones
Autoclave	Medios (preparados posteriormente)
Placas de Petri	
Espátulas	

Procedimiento:

Fue crucial el autoclavado de todo el material para eliminar cualquier forma de vida que influyera a la hora de sembrar, en el crecimiento de las bacterias y su posterior análisis.

*Procedimiento de uso de autoclave en anexo n°2.

Preparación de medio sólido en placa (para identificación de bacterias):

Materiales	Soluciones
Matraz Erlenmeyer 250 mL	Agua destilada
Balanza auxiliar	Medio de cultivo (RS)
Agitador magnético	Agar



Plancha calefactora	
Mechero	
Varillas de vidrio	
Placas autoclavadas	
pHmetro	

Procedimiento:

1. Se midió la masa de la cantidad de medio de cultivo (RS) para preparar 200 mL del mismo.
2. Luego, se colocó el medio en el Erlenmeyer 250 mL y se disolvió en el agitador hasta que se completó el total de disolución, aplicando calor para facilitar el proceso.
3. Se retiró del medio agitador, se midió el pH. Se agregó agar.
4. Se acondicionaron los envases para esterilizar con tapones de algodón-gasa envueltos en papel poroso.
5. Se esterilizó en autoclave el material (placas de Petri, entre otros).
6. Se esterilizó la botella sin cerrar totalmente el tapón.
7. Se sacó del autoclave e introdujo la botella en un baño a 40 °C por aproximadamente 30 minutos.
8. Se distribuyó el medio en las placas de Petri previamente esterilizadas, en las proximidades del mechero, flameando bien la boca de la botella para evitar contaminaciones.
9. Se dejó que el medio solidifique y luego se conservaron de forma invertida.

Realización de la siembra:

Materiales	Muestras
Placas autoclavadas	Bacteria A
Micro pipetas	Bacteria B
Ansa	
Mecheros	

Procedimiento:

1. Se marcó el material con las iniciales y se rotuló la muestra.
2. Se realizó la siembra en placa.
3. La incubación de los medios de sembrado se realizó a 37 °C por 24 horas.



Tinción de Gram:

Materiales	Soluciones
Cristalizadores	Muestra de la colonia
Ansa	Cristal violeta
Cuentagotas	Reactivo de lugol
Portaobjetos	Etanol 96 %
Cubreobjetos	Agua destilada
Microscopio	Safranina
Mechero	Aceite de inmersión

Procedimiento:

1. Con un ansa de siembra se tomó una muestra de la colonia y se extendió en un portaobjetos con el fin de preparar un frotis bacteriano y fijar la preparación. Para ello se pasó dos o tres veces sobre la llama, con la preparación hacia arriba, para no quemarla. Se debió procurar que el calor nunca fuera excesivo, pues se alterarían las estructuras de la bacteria.

2. Se tiñó con cristal violeta durante 60 segundos.
3. Se tiró el exceso de colorante.
4. Luego se añadió lugol, y se esperaron 60 segundos.
5. Se decoloró con etanol al 95 % por 20 segundos.
6. Se lavó con agua.
7. Se añadió el colorante de contraste, safranina, esperar 1 minuto y medio.
8. Nuevamente se lavó con agua.
9. Se observó en el microscopio (x100, con aceite de inmersión).

Preparación de medio sólido en placa (para observación de actividad antibacteriana):

Procedimiento:

Se realizó el mismo procedimiento que a la hora de la preparación del medio para el cultivo de las bacterias, en cambio, se sustituyó el TSB por el medio de cultivo Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth (el cual también necesitó el agregado de agar).

Realización de la siembra:

Materiales	Soluciones
Placas autoclavadas	Solución de antibiótico Sefril



Micro pipetas	Bacteria Gram positiva (sólida)
Ansa	Bacteria Gram negativa (líquida)
Mecheros	Soluciones de alcaloides de muestra 1 y 2

Procedimiento:

1. Se marcó el material con las iniciales y se rotuló la muestra.
2. Se realizó la siembra colocando cada bacteria en una placa diferente. (La bacteria gram negativa se transfirió en una cantidad de 600 μ L; mientras que la gram positiva se colocó con el ansa en forma de puntos).
3. Sobre las bacterias se colocaron discos de papel filtro estériles (whatman), impregnados con: 1) Antibiótico Sefril, a modo de control; 2) Solución de alcaloides de la muestra 1, 3) Solución de alcaloides de la muestra 2.
4. La incubación de los medios de sembrado se realizó a 37 °C por 24 horas.
5. Posteriormente, se midió el halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos



Resultados:

Extracción del aceite de lupino:

Para realizar el procedimiento de índice de peróxidos, se requería únicamente el aceite de la muestra, por lo que para extraerlo se utilizó un embudo de Soxhlet. (Ilustración 8)



Ilustración 8: extracción de aceites mediante Soxhlet.

Se observó en este caso particular que ambos aceites presentaban una coloración amarilla (la muestra 1 con un color más intenso), mientras que el éter era incoloro; debido a esto se pudo identificar de manera más clara cuando había terminado de extraerse el aceite de las semillas de lupino. (ilustración 9 y 10)



Ilustración 9: Muestra 1.

Ilustración 10: Muestra 2.

A la hora de la separación del solvente (éter de petróleo) del aceite se empleó un rotaevaporador.

El procedimiento se realizó dos veces debido a que la cantidad de aceite obtenido no era la suficiente. Para presentar una comparación, con una masa aproximada de 34,5 g de muestra 1, se obtuvieron 0,3413 g de aceite. Con respecto a la muestra 2, con 28,2 g aprox. se obtuvieron 0,3217 g de aceite.

Esto nos daría una composición de 0,99 g de aceite por cada 100 g de semilla en la muestra 1, y 1,14 g de aceite en 100 g de semillas de la muestra 2

La muestra de semilla que se encontraba en cada cápsula, ya desengrasada, fue secada en la estufa para evaporar cualquier resto de éter de petróleo y se almacenó para utilizar en la extracción de los alcaloides.

Índice de peróxidos: Curva de calibración del Hierro (III):

Posteriormente, con las soluciones y reactivos respectivos de la parte de índice de peróxidos, se prepararon las soluciones con las que se armaría una curva de calibración.



Dicha determinación del índice de peróxidos se realizó de forma indirecta ya que se empleó el hierro para la construcción de la curva de calibración.

De esta forma, ocurrió una reacción redox, en la que los peróxidos que se encontraban en el aceite oxidaron al hierro. La cantidad de peróxidos que había en el aceite, es equivalente a la cantidad de hierro que se oxidó y que posteriormente se determinó con el espectrofotómetro. Es decir, el número de equivalentes de hierro que se oxidaron es igual al número de equivalentes de peróxidos que oxidan el hierro, por lo que podemos plantear esta relación y obtener los valores de índice de peróxidos en nuestras muestras.

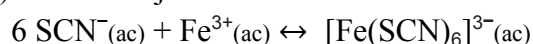
Las cantidades de solución de hierro (III) 100 mg/L fueron modificadas de la técnica original (las cuales eran 1, 2, 3, 4 y 5 mL en cada matraz aforado) ya que las soluciones que contenían los aceites de las muestras se encontraban por debajo de la menor absorbancia de la curva, es decir, estaban fuera del rango.



Por esto mismo se realizó una nueva curva con cantidades de 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 y 1,25 mL de solución de hierro a las cuales se les adicionó tiocianato de potasio (al 10 %) y ácido clorhídrico (al 1 %).

Ilustración 11: Desarrollo de color del hierro.

Los iones tiocianato, SCN^- , reaccionan con los iones hierro (III), dando lugar al ion hexatiocianato ferrato (III) de color rojo.



La intensidad del color rojo nos indica de manera cualitativa la cantidad del ion $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ en la mezcla en equilibrio, por lo tanto la cantidad de hierro.

Se procedió a medir las absorbancias de las soluciones y se elaboró la Tabla 4:

Tabla 4: Absorbancias de las soluciones de hierro

Solución	Blanco	1	2	3	4	5
Absorbancia 1	0	0,021	0,050	0,077	0,105	0,129
Absorbancia 2	0	0,023	0,049	0,074	0,103	0,130
Absorbancia promedio	0	0,022	0,0495	0,0755	0,104	0,1295

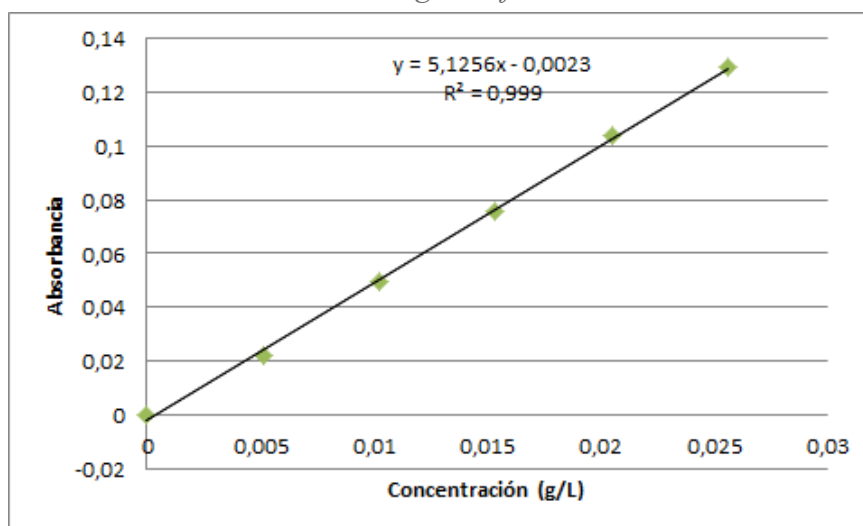


Tabla 5: Concentraciones

Solución	Blanco	1	2	3	4	5
Concentración (g/L)	0	0,00513 ±0,0007	0,0103 ± 0,0002	0,0154 ± 0,0002	0,0205± 0,0003	0,0256 ± 0,0004

*Cálculos de concentraciones en anexo n°: 1.1

Gráfica 1: Concentración en g/L en función de la absorbancia



Concentración de hierro en las muestras:

Con la curva de hierro construida, se procedió a medir las absorbancias de las soluciones que contenían los aceites de la muestra 1 y 2.

Cabe aclarar que en el paso 12 del procedimiento, el volumen de toma que se realizaba variaba dependiendo del valor del índice de peróxidos que se estimaba, siendo lo usual 25 mL para aceites sin uso (cantidad colocada), 10 mL para aceites de rancidez moderada, o hasta 1 mL para aceites de rancidez alta.

Luego, con las soluciones preparadas se midió la absorbancia de las mismas y se presentaron los siguientes valores:

Tabla 6: Absorbancia en la Muestra 1 y 2.

Solución	Muestra 1	Muestra 2
Absorbancia 1	0,058	0,020
Absorbancia 2	0,058	0,030
Absorbancia promedio	0,058	0,025

Se calculó la concentración de Fe^{3+} en las soluciones de las muestras 1 y 2 partiendo de la ecuación presentada en la gráfica y se realizaron los cálculos respectivos del índice de peróxidos.*Cálculos en anexo n°: 1.2



Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 7: Resultados de Índice de peróxidos

Muestra 1	Muestra 2
(1,16 ± 0,01) meq/kg	(0,593 ± 0,006) meq/kg

Los valores de miliequivalentes de oxígeno activo por kg de ambas muestras, fueron bajos dentro del rango presentado por el Reglamento Bromatológico Nacional en el art. 17.3.7. Estos aceites tienen una baja tendencia al enranciamiento, lo cual es uno de los factores que indican que el aceite es de buena calidad.

Observaciones: El índice de peróxidos de la muestra 1 (proveniente de argentina) era casi el doble que el de la muestra 2 (proveniente de italia); si bien se cree que uno de los factores provocantes de esto son las diferencias climáticas y de suelos, al extraer el aceite de la muestra de argentina se observó que el mismo era más denso que el segundo, esto mismo nos lleva a creer que esta muestra podría contener un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados en comparación a la muestra 2.

Alcaloides

La extracción de los alcaloides se realizó por un solvente orgánico en medio alcalino. La muestra que restó de la extracción del aceite, ya desengrasada, se pulverizó y se mezcló con una solución alcalina que desplazó los alcaloides de sus combinaciones salinas; las bases liberadas fueron en seguida solubilizadas en un solvente orgánico medianamente polar.



Ilustración 12: Muestra recién sacada del cartucho de celulosa / Ilustración 13: Muestra luego del desecador.

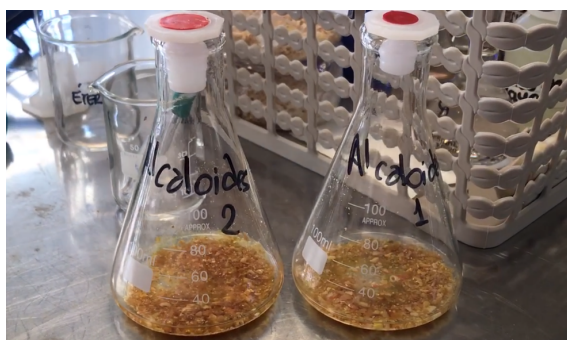


Ilustración 14: Muestra reposando con amoníaco y éter de petróleo / Ilustración 15: Filtración de la solución anterior.

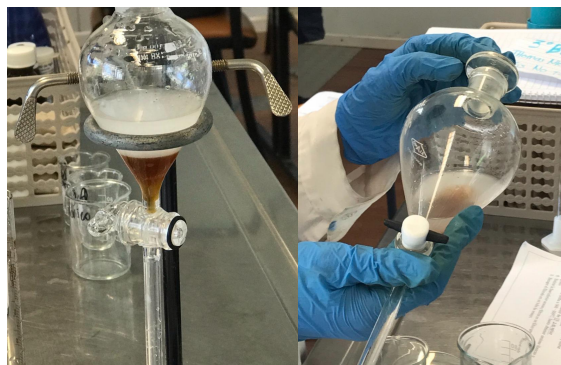


Ilustración 16: separación de alcaloides con embudo de decantación.

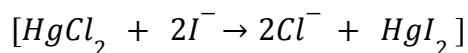
El solvente que contenía los alcaloides fue separado y concentrado a presión reducida, luego se agitó con una solución acuosa ácida, donde los alcaloides se solubilizan en su forma de sales, mientras que otras sustancias que se encontraban en el extracto como pigmentos, esteroides y de más impurezas restaban en la fase orgánica.

Las soluciones acuosas de las sales de alcaloides fueron alcalinizadas y extraídas con un solvente orgánico inmiscible; el solvente orgánico fue deshidratado sobre una sal anhidra, filtrado y concentrado a presión reducida. Siendo así, el residuo que queda, los alcaloides totales.

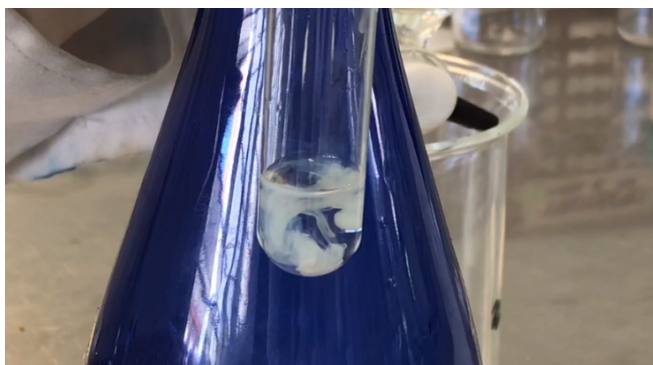
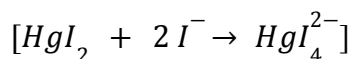
Reconocimiento de alcaloides con el reactivo de Mayer:

Esta técnica de reconocimiento se basa en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos, como el mercuriyoduro de potasio (reactivo de Mayer).

El yoduro de potásico cuando reacciona con cloruro mercúrico, forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico:



Este precipitado es soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro:



La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo, oxyoduro mercuriamoníaco, que es soluble en exceso de complejo $[HgI_4^{2-}]$, generando intenso color amarillo.

Ilustración 17: Reactivo de Mayer: positivo a la presencia de alcaloides.

Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco, ante este reactivo, por lo que también se genera una coloración pero en este caso más tenue (color crema).



Resistencia microbiana

Las bacterias “patrón” fueron entregadas sin identificar, por lo tanto, la parte inicial para comenzar el análisis microbiológico fue su cultivo para su posterior reconocimiento mediante la tinción de Gram, para diferenciar la bacteria gram positiva de la gram negativa. Hasta que se identificaran las mismas, las nombramos bacteria A y bacteria B.

La tinción requirió de cuatro soluciones, un colorante o tinte básico, un mordiente (sustancia que incrementa la afinidad entre la célula y el tinte), un decolorante (elimina el tinte de una célula teñida) y un segundo tinte o colorante de contraste (tinte de color diferente al inicial).

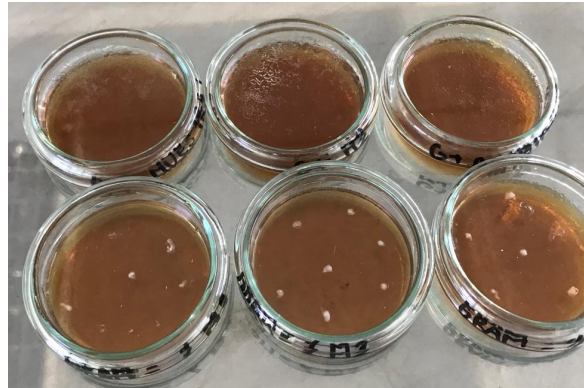


Ilustración 18: Cultivo de bacterias A y B.

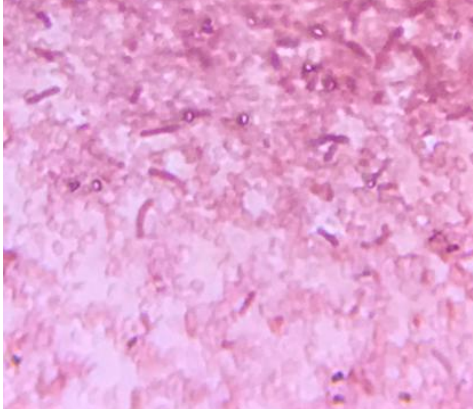
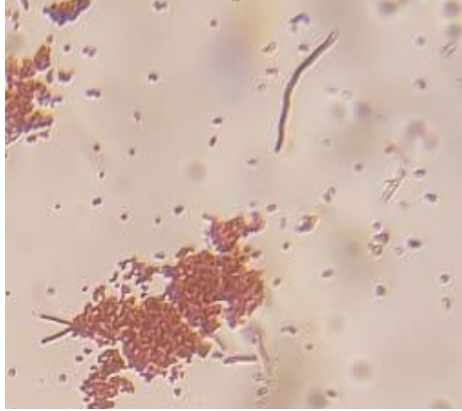
Tras la tinción con el primer colorante (cristal violeta) se efectuó una decoloración con etanol que arrastró al colorante sólo en las gram negativas, mientras que en las gram positivas el colorante quedó retenido y las células permanecieron azules. Las células gram negativas se tiñeron después con el colorante de contraste (safranina) para que pudiesen observarse.

Observaciones en el microscopio:

Tabla 8: Bacterias teñidas con método Gram en el microscopio.

Bacteria	Bacteria A	Bacteria B
Aumento: Lente ocular 10 x. Lente objetivo 100 x = 1000 x		



<p>Aumento: Lente ocular 10 x. Lente objetivo 100 x = 1000 x</p>		
	<p>Coloración violeta: bacteria gram positiva.</p>	<p>Coloración roja: bacteria gram negativa.</p>

La bacteria gram positiva era *Listeria* y la gram negativa *Escherichia coli*.

Acción antibiótica:

Una vez identificadas, se pudo sembrar cada bacteria en una placa en las que se colocaron los discos de papel estériles impregnados en las soluciones de alcaloides y en el antibiótico Sefril. Durante este procedimiento se trabajó sin guantes, dado que estos son una mayor fuente de contaminación que las manos. Luego de finalizado el procedimiento se realizó un minucioso lavado e higienización de manos.

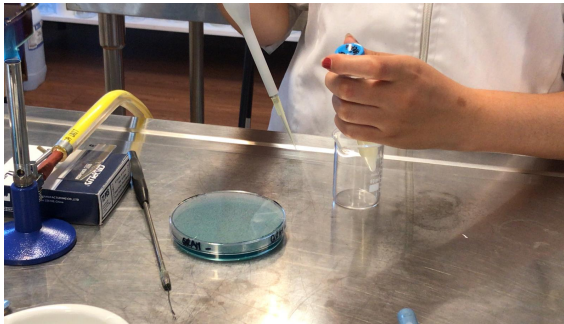


Ilustración 19: Inoculación de la bacteria gram negativa. / Ilustración 20: Colocación de discos estériles.

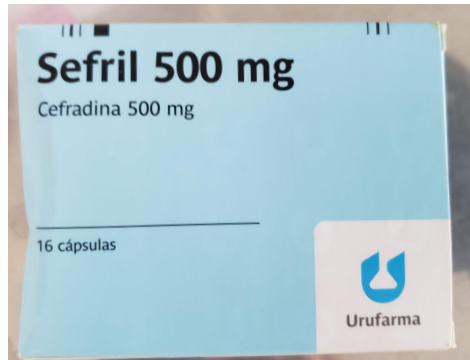
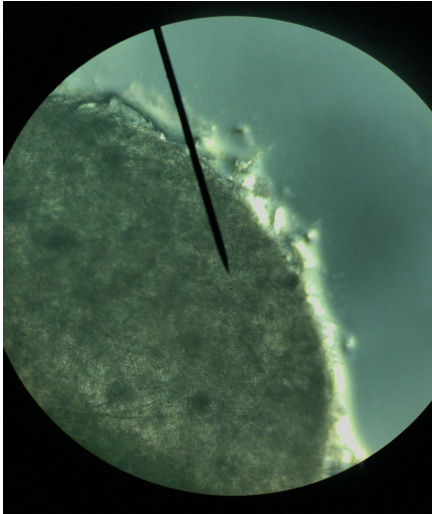
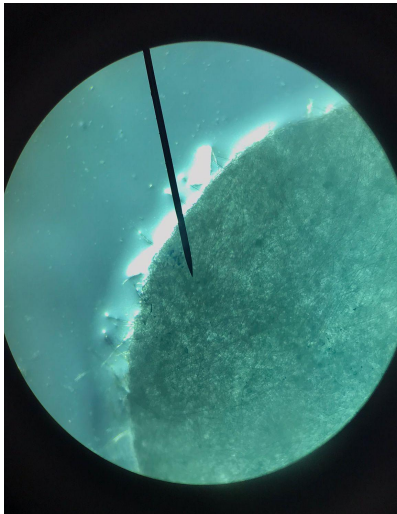
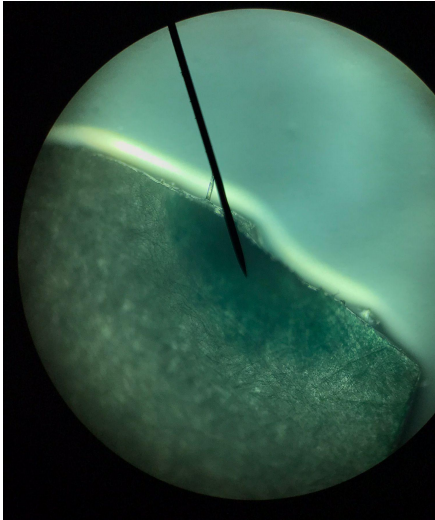
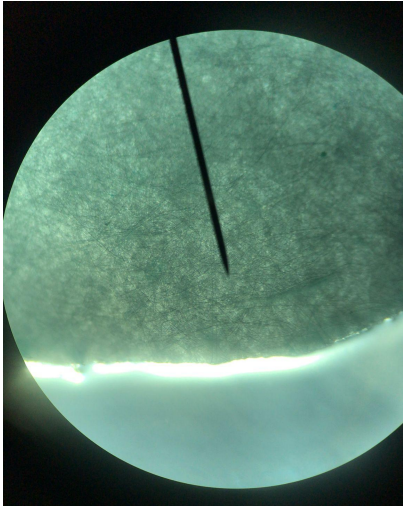
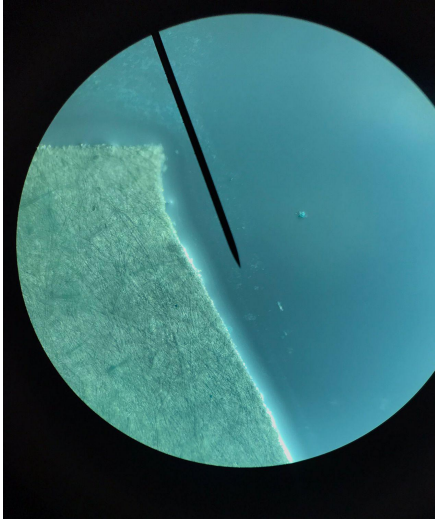
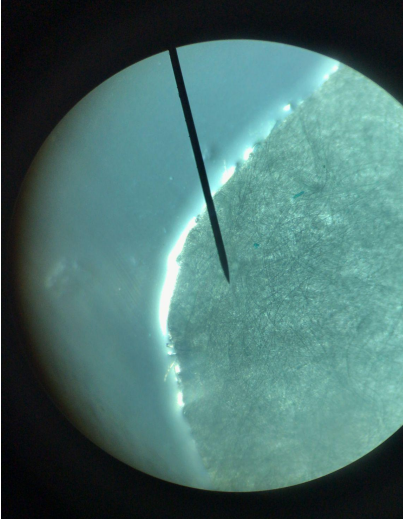


Ilustración 21: Sol. alcaloides muestra 1 / Ilustración 22: Antibiótico patrón / Ilustración 23: Sol. alcaloides muestra 2

Después de dos días se observó lo ocurrido en cada placa y se notaron pequeños halos de inhibición alrededor de los discos de papel.



Tabla 9: Halos de inhibición

	Placa con bacteria <i>Lisina</i>	Placa con bacteria <i>E. coli</i>
Antibiótico		
Alcaloides muestra 1		
Alcaloides muestra 2		



Observaciones: Las placas constaban de un halo de inhibición leve a simple vista por lo que se optó por fotografiar las mismas con un mayor aumento, aunque esto no permitiera ver correctamente los halos de inhibición.

Alrededor de los discos de papel se puede apreciar un mayor paso de la luz, si tenemos en cuenta la presencia de las bacterias en toda la placa, vemos que junto al papel no se encontraban tan presentes.

Estos resultados evidenciaron un halo bastante débil a simple vista en ambas placas. Aún así se pudieron observar las diferencias en los mismos, confirmando la presencia de una actividad antibacteriana mediante la comparación de la efectividad del antibiótico con la de los alcaloides de cada muestra.

De todas formas, por los antecedentes de investigaciones, se esperaba un mayor halo de inhibición en las sustancias de alcaloides. La hipótesis sobre la causa de lo sucedido, es que la concentración de estas soluciones (las cuales desconocemos, por falta de recursos para realizar el procedimiento) no fuera lo suficientemente alta como para tener una mayor efectividad.

Conclusión:

Ambas muestras dieron un valor de índice de peróxidos relativamente bajo. Siendo el de la muestra 1 de $(1,16 \pm 0,01)$ meq/kg mientras que el de la muestra 2 de $(0,593 \pm 0,006)$ meq/kg. Indicando así que el aceite tiene una baja tendencia al enranciamiento, por lo tanto que es un aceite de buena calidad.

En cuanto a su actividad antibacteriana, pudo observarse que ambas muestras presentaron un mayor efecto y halo de inhibición sobre las bacterias gram negativas (*E. Coli*), en contraposición con las bacterias gram positivas (*Listeria*).

De todas formas, en comparación al antibiótico Sefril, ambas muestras presentaron actividad antibacteriana similar.

Por último se concluyó que la actividad antibacteriana de los alcaloides quinolizidínicos presentes en la semilla cambia a causa del medio ambiente en el crecimiento de la planta.

Referencias Bibliográficas:

° Arango G. (2002). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Medellín: Universidad de Antioquia.

° Bacteria_Gram_negativa. (s. f.). Química.Es. Recuperado 17 de noviembre de 2021, de https://www.quimica.es/enciclopedia/Bacteria_Gram_negativa.html

° Bacteria_Gram_positiva. (s. f.). Química.Es. Recuperado 17 de noviembre de 2021, de https://www.quimica.es/enciclopedia/Bacteria_Gram_positiva.html#:~:text=Las%20siguientes%20caracter%C3%ADsticas%20son%20presentes,en%20ciertos%20tipos%20de%20adherencia.



- ° Beaudoin, G. y Facchini, P. (2014). *Biosíntesis de alcaloides de bencilisoquinolina en la adormidera*. Pubmed, Ed., Planta 240, 19–32. doi: 10.1007 / s00425-014-2056-8.
- ° Betancourt, Á. (2013). *Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de la hojas de la especie piperimperiali (piperaceae)*. Bogotá, Colombia. Universidad de Ciencias Aplicadas.
- ° Cano, B. (2016). *Extracción, aislamiento, elucidación y actividad biológica de metabolitos secundarios Psychotria longirostris (rusby) estadi*. Universidad del Valle pág 31.
- ° Comisión europea. (2019, 31 julio). Salud y seguridad: Frases H/P - SAMANCTA. Comisión Europea Fiscalidad y Unión Aduanera. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/ES/Safety/HP_ES.htm
- ° Crozier, A. (2015). *Plant Secondary Metabolites Occurrence Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, Chennai, India, pp. 1–24.
- ° Dewey R. E. y Xie J. (2013). *Genética molecular de la biosíntesis de alcaloides en Nicotiana tabacum*. Fitoquímica 94, 10–27. doi: 10.1016 / j.phytochem.2013.06.002.
- ° El Observador. (2020, 11 abril). *El lupino, un cultivo novedoso, ideal para el norte del país*. <https://www.elobservador.com.uy/nota/el-lupino-un-cultivo-novedoso-ideal-para-el-norte-del-pais-2020410225025>
- ° Facultad de Agronomía. (2021). *Galería de especies de uso industrial | Facultad de Agronomía*. UBA.Agronomía. Recuperado 19 de noviembre de 2021, de https://www.agro.uba.ar/catedras/cultivos_industriales/galeria/lupino
- ° Facultad de Química. (s. f.). *Frases H y P según Reglamento 1272/2008 “CLP”: Clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas*. Universidad de Valencia. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.uv.es/fqlabo/docs/seguridad/frases_h_p.pdf
- ° Fries, A. (2007). *Agronomía de los cultivos andinos*. T. o. L. Andino, Ed., 2007: Capítulo 4. Pág. 98-99.
- ° Ganzera A. (2010). Determination of quinolizidine alkaloids in different *Lupinus* species by NACE using UV and MS detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53:1231–1235p. [17] Muzquiz et al., *Determinación de factores antinutritivos termoresistentes en leguminosas. i:alcaloides (8 ed.)*, Madrid, 1993: Pág 352-354.
- ° García, D. (s. f.). *Qué son y dónde se encuentran los lípidos*. Corazón sano - Puleva. Recuperado 09 de octubre de 2021, de <https://www.lechepuleva.es/corazon-sano/lipidos#:~:text=Los%20%C3%ADpidos%20so>



[n%20un%20grupo%20muy%20heterog%C3%A9neo%20de%20compuestos%20org%C3%A1nicos.fundamentalmente%20tres%20tipos%20de%20l%C3%ADpidos%3A&text=Grasas%20o%20aceites%20\(tambi%C3%A9n%20llamados%20triglic%C3%A9ridos%20o%20triacilglic%C3%A9ridos\).](#)

° Guerrero, G. A. (1990). *Cultivos herbáceos extensivos*. (6ta edición ed.) ed., Madrid-España: Mundi-Prensa Libros S.A:Pág 643.

° Hagel J. y Facchini, P. (2013). *Metabolismo del alcaloide de bencilisoquinolina: un siglo de descubrimiento y un mundo nuevo y valiente*. *Plant Cell Physiol*. 54, 647–672. doi: 10.1093 / pcp / pct020.

° Jarrín H., P. (2003). *Tratamiento del agua de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. [Tesis de doctorado en Bioquímica y Farmacia]*. C. E. S. P. d. C. Riobamba, Ed., Quito: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

° Lourenco A., Máximo, Ferreira A., Pereira F. (2002). *Indolizidine and quinolizidine alkaloids structure and bio activity*. S, *Estudies in Natural Products Chemistry*, Vol. 2. 2002:233-219p.

°MERCK. (2021). *Aceite de inmersión*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Immersion-oil_MDA_CHEM-104699?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2018). *Ácido acético glacial 100%*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Acetic-acid-glacial-1000-0,MDA_CHEM-100063?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2016). *Ácido clorhídrico 1 mol/L*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Hydrochloric-acid-1-mol-L,MDA_CHEM-110165?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2021). *Ácido clorhídrico humeante 37%*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Hydrochloric-acid-fuming-370-0,MDA_CHEM-100317?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2019). *Agar agar*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Agar-agar,MDA_CHEM-101614?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F



°MERCK. (2019). *Cloroformo*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Chloroform,MDA_CHEM-102445?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2015). *Cloruro de bario dihidratado*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Barium-chloride-dihydrate,MDA_CHEM-101719?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2019). *Cloruro de mercurio (II)*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/MercuryII-chloride,MDA_CHEM-104419?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2018). *Cristal violeta*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Crystal-violet-C.I.-42555,MDA_CHEM-101408?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2016). *Etanol 96%*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ethanol-960-0,MDA_CHEM-159010?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2017). *Éter de petróleo*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Petroleum-ether,MDA_CHEM-101769?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2020). *Hierro (III) nitrato nonahidratado*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/IronIII-nitrate-nonahydrate,MDA_CHEM-103883?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2016). *Ioduro de potasio*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Potassium-iodide,MDA_CHEM-105043?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2018). *RV (RAPPAPORT-VASSILIADIS)*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/RVS-RAPPAPORT-VASSILIADIS-Soya,MDA_CHEM-107700?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2018). *Safranina O.* Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Safranine-O-C.I.-50240,MDA_CHEM-115948?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F



°MERCK. (2017). *Solución de amonio al 28-30 %*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ammonia-solution-28-300-0.MDA_CHEM-105423?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2016). *Solución de Lugol*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Lugols-solution.MDA_CHEM-100567?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

°MERCK. (2016). *Tiocianato de potasio*. Recuperado 23 de noviembre de 2021, de https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Potassium-thiocyanate.MDA_CHEM-105124?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

° Mc Cawley, E. 1985. Cardioactive Alkaloids, In. *The Alkaloids, Chemistry and Physiology*. Ed. Manske, R. Academic Press. New York, USA.

° *MODIFICACIÓN DEL REGLAMENTO BROMATOLÓGICO NACIONAL. CAPÍTULO 17. ALIMENTOS GRASOS*. (2019). IMPO Centro de Información Oficial. Recuperado 21 de noviembre de 2021, de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/80-2019>

° Muñoz, D. (2019). *Qué son los lípidos y para qué sirven*. Geosalud.com. Recuperado 17 de noviembre de 2021, de <https://www.geosalud.com/nutricion/tipos-de-lipidos.html>

° Muzquiz, D. (1993). Determinación de factores antinutritivos termoresistentes en leguminosas. i:alcaloides (8 ed.), Madrid: Pág 352-354.

° Olivera, M. (1993). *MANUAL DE TÉCNICAS PARA LABORATORIO DE NUTRICIÓN DE PECES Y CRUSTÁCEOS*. FAO. Recuperado 04 de septiembre de 2021, de <https://www.fao.org/3/AB489S/AB489S03.htm>

° Ortega, E., Rodríguez, A., & Zamora, Á. (2009, 6 julio). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. Asociación para la Investigación y el Desarrollo Tecnológico ASINDETEC, Universidad de Nariño, Pasto-Colombia. Recuperado 12 de septiembre de 2021, de <https://www.google.com/url?q=http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v59n1/v59n1a14.pdf&sa=D&source=docs&ust=1637178357995000&usg=AOvVaw1qRyW1KdOnlcKrkPmc6GjF>

° Pan Q., Mustafa N. R., Tang K., Choi Y. y Verpoorte R. (2016). *Biosíntesis de alcaloides indol monoterpénoides y su regulación en Catharanthus roseus: una revisión de la literatura de genes a metabolitos*. C. F. T. | G. Scholar, Ed., *Fitoquímica Rev.* 15, 221–250. doi: 10.1007.

° Peralta, E., Caicedo, C., Rivera, M. (2001). *Cultivo de Chocho. Capítulo I, cultivo de chocho, Lupinus mutabilis sweet, fitonutrición, enfermedades y plagas en Ecuador*. Quito-Ecuador: Fundacyt.:pág. 3.



- ° Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes", Firestone, D. (ed.), Champaign, IL, AOCS Press, 2006.
- ° Rainer G. (1882). *El cultivo y la utilización del tarwi: Lupinus mutabilis sweet*. Rome: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- ° R. S. Reinhard H. (2006). Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food. *Journal of Chromatography A*, 1112:353–360p.
- ° Santra, A. S. A. B. K. (2012). Scope of rumen manipulation using medicinal plants to mitigate methane production. *Journal of Pharmacognosy*, Vol 3, Issue 2, pp.-115-120.
- ° Sharapin, N. (2000). *Fundamento de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Editorial Cooperación Iberoamericana CYTED., p. 80.
- ° *Simposio Regional del chocho o tarwi (Lupinus mutabilis) | FAO*. (16–12-01). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <http://www.fao.org/americas/eventos/ver/es/c/451018/>
- ° Stoakes, S. M. F. (2018, 23 agosto). Bacterias gramnegativas. *News-Medical.Net*. [http://www.news-medical.net/life-sciences/Gram-Negative-Bacteria-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/life-sciences/Gram-Negative-Bacteria-(Spanish).aspx)
- ° Tapia M. y Anpe E. (2016). *UNALM. UGC Estado del arte en el Perú sobre el chocho, tarwi o tauri. (Lupinus mutabilis sweet)*. p. 7.
- ° Van den Brink, M. (s. f.). Peru, Northern part: Cordillera Blanca - Marijn van den Brink. Flora and Fauna from South America. Recuperado 07 de noviembre de 2021, de <http://photos.v-d-brink.eu/Flora-and-Fauna/South-America/Peru-Northern-part/i-kCfxpVN>
- ° Villanueva, B. (2013). Tamizaje fitoquímico preliminar de especie de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. *Cuba: Revista cubana de plantas medicinales*. p. 624.
- ° Zamora-Natera, F. (2009, septiembre). *Composición y concentración de alcaloides en Lupinus Exaltatus zucc. durante su crecimiento y desarrollo*. SciELO. Recuperado 29 de septiembre de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000900015



Anexo:

Anexo 1: Cálculos

1.1) Cálculo de las concentraciones

$$[\text{Fe}^{3+}] = \frac{0,3708 \text{ g Fe(NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}}{0,050\text{L}} \cdot \frac{1 \text{ mol Fe(NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}}{404 \text{ g/mol}} \cdot \frac{1 \text{ mol Fe}}{1 \text{ mol Fe(NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}} \cdot \frac{55,845 \text{ g/mol Fe}}{1 \text{ mol Fe}} =$$

$$[\text{Fe}^{3+}] = 1,025115149 \rightarrow [\text{Fe}^{3+}] = 1,0251 \pm 0,0001 \text{ g/L}$$

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} \quad \delta = C(\text{g/L}) \cdot \left(\frac{\delta_{\text{bureta}}}{V_{\text{bureta}}} + \frac{\delta_{\text{pipeta}}}{V_{\text{pipeta}}} + \frac{\delta_{\text{matraz}}}{V_{\text{matraz}}} + \frac{\delta_{\text{conc.}}}{C_{\text{conc.}}} \right)$$

SOLUCIÓN 1: $C_2 = \frac{1,025115149 \text{ g/L} \cdot 0,25\text{mL}}{50,0\text{mL}} = 0,005125575 \text{ g/L}$

$$\delta_1 = 0,005125575 \text{ g/L} \cdot \left(\frac{\pm 0,05}{10,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,008}{1,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,06}{50,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,0001}{1,0251 \text{ g/L}} \right) = 0,000073283$$

$$C(\text{g/L}) = (0,00513 \pm 0,00007) \text{ g/L}$$

SOLUCIÓN 2: $C_2 = \frac{1,025115149 \text{ g/L} \cdot 0,50\text{mL}}{50,0\text{mL}} = 0,010251151 \text{ g/L}$

$$\delta_2 = 0,010251151 \text{ g/L} \cdot \left(\frac{\pm 0,05}{10,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,008}{1,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,06}{50,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,0001}{1,0251 \text{ g/L}} \right) = 0,000146566$$

$$C(\text{g/L}) = (0,0103 \pm 0,0002) \text{ g/L}$$

SOLUCIÓN 3: $C_2 = \frac{1,025115149 \text{ g/L} \cdot 0,75\text{mL}}{50,0\text{mL}} = 0,015376727 \text{ g/L}$

$$\delta_3 = 0,015376727 \text{ g/L} \cdot \left(\frac{\pm 0,05}{10,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,008}{1,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,06}{50,0\text{mL}} + \frac{\pm 0,0001}{1,0251 \text{ g/L}} \right) = 0,000219849$$

$$C(\text{g/L}) = (0,0154 \pm 0,0002) \text{ g/L}$$



SOLUCIÓN 4: $C_2 = \frac{1,02515149 \text{ g/L} \cdot 1,0 \text{ mL}}{50,0 \text{ mL}} = 0,020502302 \text{ g/L}$

$$\delta_4 = 0,020502302 \text{ g/L} \cdot \left(\frac{\pm 0,05}{10,0 \text{ mL}} + \frac{\pm 0,008}{1,0 \text{ mL}} + \frac{\pm 0,06}{50,0 \text{ mL}} + \frac{\pm 0,0001}{1,0251 \text{ g/L}} \right) = 0,000293132$$

$$C(\text{g/L}) = (0,0205 \pm 0,0003) \text{ g/L}$$

SOLUCIÓN 5: $C_2 = \frac{1,02515149 \text{ g/L} \cdot 1,25 \text{ mL}}{50,0 \text{ mL}} = 0,025627878 \text{ g/L}$

$$\delta_5 = 0,025627878 \text{ g/L} \cdot \left(\frac{\pm 0,05}{10,0 \text{ mL}} + \frac{\pm 0,008}{1,0 \text{ mL}} + \frac{\pm 0,06}{50,0 \text{ mL}} + \frac{\pm 0,0001}{1,0251 \text{ g/L}} \right) = 0,000366415$$

$$C(\text{g/L}) = (0,0256 \pm 0,0004) \text{ g/L}$$

1.2) Cálculo de concentraciones de hierro en las muestras e índice de peróxidos

Concentración de Hierro en las muestras

$$y = 5,1256x - 0,0023 \rightarrow \text{Absorbancia} = 5,1256(\text{conc. Fe}^{3+}) - 0,0023$$

MUESTRA 1 $[\text{Fe}^{3+}] = \frac{0,058 + 0,0023}{5,1256} = 0,011764476 \text{ mg/L}$

VOLUMEN DE TOMA = 25,0 mL

VOLUMEN FINAL = 50,0 mL

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow C_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{V_1}$$

$$C_1 = \frac{0,011764476 \text{ mg/L} \cdot 0,050 \text{ L}}{0,025 \text{ L}} = 0,023528952 \text{ mg/L}$$

$$\frac{\text{meq Fe}^{3+}}{\text{(EN 1 LITRO)}} = \frac{0,023528952 \text{ mg}}{55,845 \text{ mg/meq}} = 0,000421326 \text{ meq}$$

► **INDICE DE PERÓXIDOS**

$$\text{IP} = \frac{0,000421326 \text{ meq}}{0,0003645 \text{ kg aceite}} = 1,155901235 \text{ meq/kg} \quad \delta = 1\%$$

$$\text{IP MUESTRA 1} = (1,16 \pm 0,01) \text{ meq/kg}$$



$$\text{MUESTRA 2} \quad [\text{Fe}^{3+}] = \frac{0,025 + 0,0023}{5,1256} = 0,005326205 \text{ mg/L}$$

$$C_1 = \frac{0,005326205 \text{ mg/L} \cdot 0,050 \text{ L}}{0,025 \text{ L}} = 0,01065241 \text{ mg/L}$$

$$\text{meq Fe}^{3+} \text{ (EN 1 LITRO)} = \frac{0,01065241 \text{ mg}}{55,845 \text{ mg/meq}} = 0,000190749 \text{ meq}$$

► INDICE DE PERÓXIDOS

$$f = 1\%$$

$$\text{IP} = \frac{0,000190749 \text{ meq}}{0,0003217 \text{ kg aceite}} = 0,592940627 \rightarrow \text{IP} = (0,593 \pm 0,000) \text{ meq/kg}$$

Anexo 2: procedimiento de autoclave

1. Se colocó el autoclave sobre una superficie estable, resistente al calor con acceso apropiado a un enchufe eléctrico.
2. Se retiró la tapa del esterilizador haciendo girar las tuercas de mariposa en el sentido contrario a las agujas del reloj. Se aflojaron al mismo tiempo las dos tuercas de mariposa opuestas. Se giró la cubierta y retiró la tapa de la parte inferior del esterilizador. A continuación, se retiró el recipiente interior y la rejilla del recipiente interior de la parte inferior del esterilizador
3. Se colocó agua destilada hasta la línea de agua pintada en la parte inferior del esterilizador. Luego, se colocó la rejilla del recipiente interior dentro del recipiente interior con el lado del labio hacia abajo.
4. Con el contenedor interior y la rejilla del contenedor interior fuera del esterilizador se colocaron los materiales para ser esterilizados dentro del contenedor interior encima de la rejilla del contenedor interior.
5. Se acomodaron los materiales de modo que el vapor pudiese circular libremente dentro de la cámara durante el ciclo de esterilización.
6. Se revisó si el nivel de agua dentro del esterilizador era correcto y luego se colocó el recipiente interior ya cargado dentro del esterilizador.
7. Se aseguró que el canal de escape de aire esté colocado al lado derecho del esterilizador.
8. Se colocó la tapadera del esterilizador asegurándose de que la flecha de alineación en la tapadera quedase alineada con la flecha de alineación al lado de la parte de abajo del



esterilizador, y que el tubo de escape de aire sea introducido en el canal del tubo de escape de aire en el recipiente interior.

9. Se apretaron las tuercas de mariposa de la cubierta asegurándose de que fuera de manera uniforme, y siempre apretando al mismo tiempo dos tuercas de mariposa opuestas.
10. Se conectó el cordón eléctrico en el enchufe eléctrico y se giró el interruptor de prender y apagar (ON / OFF) en posición de "prendido" (ON), la luz del piloto rojo se iluminó indicando que la corriente eléctrica estaba funcionando y el elemento calefactor estaba en operación.
11. Para aumentar el calor, se giró la perilla de control de temperatura en sentido de las agujas del reloj.
12. Se mantuvo siempre vigilando el manómetro y se ajustó el calor en consecuencia de este. Para abrir la válvula de control se movió la palanca a la posición vertical. El vapor generado por el esterilizador se extrajo de la parte inferior de la unidad hacia arriba a través del tubo de escape de aire y la válvula de control.
13. Se dejó que el vapor escape por 5 minutos y se cerró la válvula nuevamente hasta que el manómetro estuvo en la zona de esterilización verde.
14. Luego, se abrió la válvula de control por segunda vez y se ventiló la cámara otros 5 minutos.
15. Una vez que la cámara se ventiló, se cerró la válvula de control, y se comenzó con el ciclo de esterilización. Se comenzó a contar el ciclo de esterilización cuando la aguja del indicador se encontró en la zona de esterilización verde en la cara del manómetro de entre 17 a 21 PSI.
16. Los materiales y el medio de cultivo se dejaron esterilizar por 45 minutos a una temperatura de 121 °C.
17. Se mantuvo vigilado de cerca el manómetro durante el ciclo para asegurarse de que la presión se mantuviera en la zona de esterilización verde.
18. Al final del ciclo de esterilización se giró el interruptor de prender/apagar en la posición de "apagado" (OFF) y se abrió la válvula de control en la posición abierta para permitir que el vapor escape.
19. Para evitar lesiones debido a las altas temperaturas se utilizaron guantes resistentes al calor para abrir la válvula.
20. Se continuó vigilando el manómetro hasta que llegó a 0 PSI y no se escuchó ningún sonido de escape de vapor saliendo por la válvula de control.



21. Con el manómetro indicando 0 PSI se aflojaron las tuercas de mariposa uniformemente girando dos tuercas opuestas en sentido opuesto a las agujas del reloj.
22. Luego se quitó la tapa girándola en sentido contrario a las agujas del reloj.
23. Se sacaron los recipientes del interior.
24. Se vertió toda el agua de la unidad y se secó totalmente el interior.

Anexo 3: Primer cultivo (ensayo erróneo)

Antes de poder obtener cultivos exitosos con un halo de inhibición presente, y sin contaminación fúngica, se obtuvo una primer tanda de cultivos los cuales presentaban una contaminación casi total por hongos. Debido a que la contaminación fue general en este y los demás cultivos de otros proyectos realizados este día, y la mayoría de ellos presentaban el mismo hongo, se hipotetiza que el mismo estaba presente en el aire del espacio en el que se realizó la inoculación.

Se descarta una mala esterilización del material ya que la autoclave utilizada se encuentra en buenas condiciones desempeñando su función de manera correcta, y las cintas utilizadas tenían presentes su marca característica la cual indica que el proceso de esterilización ha sido completado correctamente.

Asimismo, se realizó el proceso de inoculación cerca de la llama de un mechero, flameando el ansa y la boca del matraz para evitar la contaminación, por lo que se descarta que el causante de la contaminación haya sido la falta de cuidados y flameo.

Dado que se descarta que la contaminación se haya producido de manera previa (por mala esterilización en la autoclave), así como por causa de falta de flameo al material durante la inoculación, y todos los cultivos presentaron el mismo hongo sin importar quien realizó la inoculación o si realmente tuvo los cuidados necesarios, la hipótesis más fuerte es que dicho hongo se encontraba en el aire, y se depositó en los cultivos en los entretiempos.

Esto pudo ser mientras la placa se mantenía destapada para inocular, o mientras se colocaba el agar en la misma.

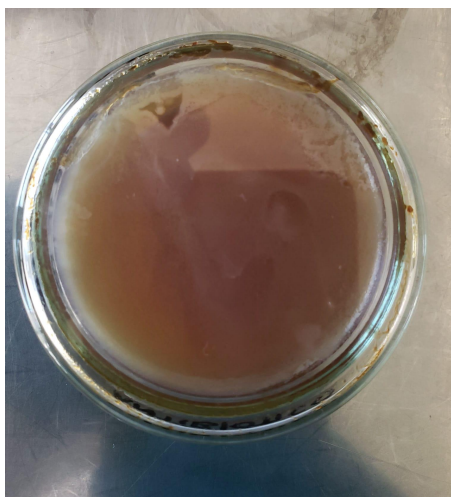


Ilustración 24: cultivo con antibiótico y bacteria A



Ilustración 25: cultivo con antibiótico y bacteria B



Ilustración 26: cultivo con muestra 1 bacteria A

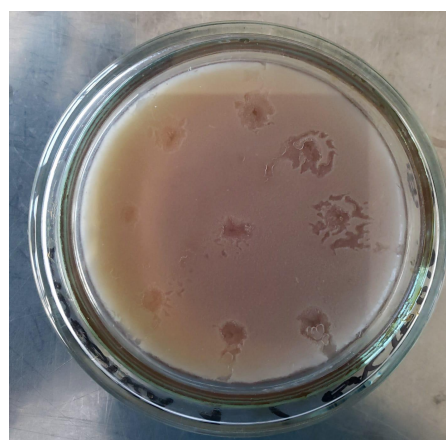


Ilustración 27: cultivo con muestra 1 bacteria B



Ilustración 28: cultivo con muestra 2 y bacteria A

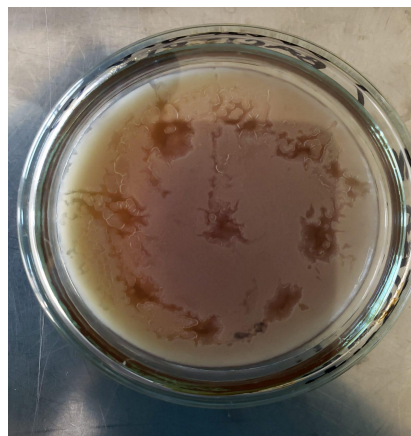


Ilustración 29: cultivo con muestra 2 bacteria B



Anexo 3: medidas de seguridad

° Semillas de *Lupinus mutabilis*:

- Frasas H y P: no presenta
- Pictogramas: no presenta

° Éter de petróleo 40-60 °C:

- Frasas H y P:
 - H225: Líquido y vapores muy inflamables.
 - P201: Obtenga instrucciones especiales antes de su uso.
 - P210: Mantener alejado del calor, superficies calientes, chispas, llamas abiertas y otras fuentes de ignición. No Fumar.
 - P273: Evítese su liberación al medio ambiente.
- Pictogramas:



° Vaselina:

- Frasas H y P: no presenta
- Pictogramas: no presenta

° Cloroformo:

- Frasas H y P:
 - P201: Obtenga instrucciones especiales antes de su uso.
- Pictogramas:



° Ácido acético glacial 100 %:

- Frasas H y P:
 - H226: Líquidos y vapores inflamables.
 - P210: Mantener alejado del calor, superficies calientes, chispas, llamas abiertas y otras fuentes de ignición. No Fumar.
 - P233: Manténgase el recipiente bien cerrado.
 - P240: Conecte a tierra y adhiera el contenedor y el equipo receptor.
 - P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos/ protección para la cara / protección para los oídos.
- Pictogramas:



° Cloruro de Bario dihidratado 0,1 eq/L:

• Frases H y P:

- P261: Evite respirar el polvo / humo / gas / niebla / vapores / aerosoles.
- P264: Lavarse la piel concienzudamente después de la manipulación.
- P270: No coma, beba ni fume cuando utilice este producto.

• Pictogramas:



° Ácido clorhídrico 97 %:

• Frases H y P:

- H290: Puede ser corrosivo para los metales
- P234: Consérvese únicamente en el embalaje original.
- P261: Evite respirar el polvo / humo / gas / niebla / vapores / aerosoles.
- P271: Úselo solo en exteriores o en un área bien ventilada.
- P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos.

• Pictogramas:



° Hierro (III) nonahidratado:

• Frases H y P:

- P260: No respire el polvo o la niebla.
- P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos.

• Pictogramas:



° Ácido Clorhídrico 1 %:

• Frases H y P:

- H290: Puede ser corrosivo para los metales.
- P234: Consérvese únicamente en el embalaje original.



•P390: Absorber los derrames para evitar daños materiales.

•Pictogramas:



° Tiocianato de potasio:

•Frases H y P:

•P273: Evítese su liberación al medio ambiente.

•P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos

•Pictogramas:



° Agua destilada:

•Frases H y P: no presenta

•Pictogramas: no presenta

°Cloruro de mercurio (II):

•Frases H y P:

•P260: No respirar el polvo / humo / gas / niebla / vapores / aerosoles.

• P273: Evítese su liberación al medio ambiente.

•P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos

•Pictogramas:



°Yoduro de potasio:

•Frases H y P:

•P260: No respirar el polvo / humo / gas / niebla / vapores / aerosoles.

•P264: Lavarse la piel concienzudamente después de la manipulación.

•P270: No coma, beba ni fume cuando utilice este producto.

•Pictogramas:



°Amoníaco 30 %:

•Frases H y P:

- P261: Evite respirar el polvo / humo / gas / niebla / vapores / aerosoles.
- P271: Úselo solo en exteriores o en un área bien ventilada.
- P273: Evítese su liberación al medio ambiente.
- P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos.

•Pictogramas:



° Agar agar:

- Frases H y P: no presenta
- Pictogramas: no presenta

°Medio rappaport-vassiliadis:

- Frases H y P: no presenta
- Pictogramas: no presenta

°Bacteria Listeria :

•Frases H y P:

- P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad
- P262 Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa
- P264: lavarse las manos tras su uso
- P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.
- P273: evitar su liberación al medio ambiente
- P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos.

•Pictogramas:



°Bacteria E. Coli:

•Frases H y P:



- P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad
- P264: lavarse las manos tras su uso
- P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.
- P273: evitar su liberación al medio ambiente
- P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos.

•Pictogramas:



°Cristal violeta:

•Frases H y P:

- P201: Obtenga instrucciones especiales antes de su uso.
- P273: Evítese su liberación al medio ambiente.
- P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos.

•Pictogramas:



°Reactivo de lugol:

•Frases H y P:

- P273: Evítese su liberación al medio ambiente.
- P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara / protección para los oídos.

•Pictogramas:



°Etanol 96 %:

•Frases H y P:

- H225: Líquido y vapores muy inflamables.
- P210: Mantener alejado del calor, superficies calientes, chispas, llamas abiertas y otras fuentes de ignición. No Fumar.



- P233: Manténgase el recipiente bien cerrado.
- P240: Conecte a tierra y adhiera el contenedor y el equipo receptor.
- P241: Utilice equipo eléctrico / de ventilación / iluminación a prueba de explosión.
- P242: Utilice herramientas que no produzcan chispas.

•Pictogramas:



°Safranina:

•Frases H y P:

- P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad
- P264: lavarse las manos tras su uso
- P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.
- P273: evitar su liberación al medio ambiente.

•Pictogramas:



°Aceite de inmersión:

•Frases H y P:

- P273: Evítese su liberación al medio ambiente.

•Pictogramas:



°Antibiótico Sefril:

- Frases H y P: no presenta
 - Pictogramas: no presenta
-