

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“MODIFICACIÓN DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA POR
INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ACEITE DE MARACUYÁ
(Passiflora edulis)”**

Presentada por:

YANET TTITO CHARA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Lima - Perú

2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“MODIFICACIÓN DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA POR
INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ACEITE DE MARACUYÁ**

***(Passiflora edulis)*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

YANET TTITO CHARA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:


Ph.D. Víctor Guevara Carrasco
PRESIDENTE

Dra. María Elena Villanueva Espinoza
ASESOR

Dra. Haydee Cárdenas de Jurado
MIEMBRO

Mg.Sc. Víctor Hidalgo Lozano
MIEMBRO

*A mis padres Edmundo y Brigida, por su apoyo y
amor incondicional.*

*A mis hermanos Marco y Mauro, por estar siempre
presentes.*

*A mis amigos, por apoyarme y
darme palabras de aliento
durante la realización de esta
tesis.*

AGRADECIMIENTOS

- Al programa de becas CIENCIACTIVA CONCYTEC - FONDECYT por brindarme la oportunidad de estudiar la maestría en nutrición y por el financiamiento del presente trabajo de investigación.
- A mi asesora, Dra. María Elena Villanueva; por su soporte, paciencia y orientación brindados durante todo el proceso de investigación.
- A mis amigos César Lume, Cecilia Torres e Izabó Guillén por apoyarme durante toda la etapa experimental.
- Al señor Mauro Ayala por su paciencia y orientación durante la fase experimental en el bioterio de la UNALM.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	SACIEDAD	3
2.2.	ESTIMULADORES Y SEÑALIZACIÓN DE LA SACIEDAD	3
2.3.	GRASAS Y SACIEDAD.....	4
2.4.	CONDUCTA ALIMENTARIA	5
2.4.1.	Regulación fisiológica	6
2.5.	COLECISTOQUININA	7
2.5.1.	Secreción y regulación.....	8
2.5.2.	Función biológica.....	8
2.6.	MARACUYÁ	9
2.6.1.	Producción de maracuyá en Perú	10
2.6.2.	Semillas de maracuyá.....	10
2.7.	ACEITE DE MARACUYÁ.....	11
2.7.1.	Composición de ácidos grasos	11
2.8.	ACEITE DE COCO.....	12
2.9.	FLAVONOIDES	13
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN Y DURACIÓN DEL ESTUDIO.....	14
3.2.	MATERIA PRIMA E INSUMOS	14
3.3.	SELECCIÓN DE TRATAMIENTOS	16
3.3.1.	Aceite de coco	16
3.3.2.	Ácido graso α -linolénico	16
3.3.3.	Agua	17
3.4.	CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE MARACUYÁ	17
3.4.1.	Extracción de aceite de maracuyá	17
3.4.2.	Composición de ácidos grasos del aceite de maracuyá.....	17
3.4.3.	Quercetina y flavonoides totales en el aceite de maracuyá.....	18
3.5.	ANIMALES EXPERIMENTALES	19
3.6.	CONSIDERACIONES ÉTICAS PARA EL MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	19
3.7.	FASE DE ACOSTUMBRAMIENTO	19

3.8.	EXPERIMENTO 1: CONDUCTA ALIMENTARIA	20
3.9.	EXPERIMENTO 2: ESTUDIO PRELIMINAR CCK	21
3.9.1.	Sacrificio de animales y separación de plasma	21
3.9.2.	Determinación de CCK	22
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1.	CONDUCTA ALIMENTARIA	24
4.2.1.	Consumo total diario	24
4.2.2.	Consumo por periodos de tiempo.....	25
4.2.	CCK	29
V.	CONCLUSIONES	34
VI.	RECOMENDACIONES	35
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
VIII.	ANEXOS	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de la maracuyá.....	9
Tabla 2: Composición de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de maracuyá	12
Tabla 3: Perfil de ácidos grasos del aceite de coco	15
Tabla 4: Composición y valor nutricional de la dieta estándar	16
Tabla 5: Rendimiento de la extracción de aceite de maracuyá.....	17
Tabla 6: Perfil de ácidos grasos de aceite de maracuyá	18
Tabla 7: Porcentajes de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados del aceite de maracuyá.....	18
Tabla 8: Tratamientos en la evaluación de la conducta alimentaria.....	20
Tabla 9: Tratamientos en la evaluación de CCK plasmática.....	21
Tabla 10: Distribución de los animales de experimentación a los diferentes tiempos postprandiales	22
Tabla 11: Consumo total de alimento diario durante seis días para cada tratamiento.....	25
Tabla 12: Consumo de alimento (g/100 g PV), promedio de los 6 días, por cada intervalo de tiempo para cada tratamiento	26
Tabla 13: Datos de la concentración de CCK plasmática (pg/ml) por tratamiento durante diferentes minutos	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción de maracuyá en el Perú del año 2013 al 2017	10
Figura 2: Consumo de alimento (g/100 g PV) en el periodo de 0 a 30 minutos	27
Figura 3: Consumo de alimento (g/100 g PV) en el periodo de 120 a 150 minutos	29
Figura 4: Concentración de CCK plasmática por tiempo recibiendo los tratamientos control negativo, control positivo, isocalórico y maracuyá	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Informe del perfil de ácidos grasos del aceite de coco	44
Anexo 2: Cuantificación de flavonoides totales y quercetina	47
Anexo 3: Perfil de ácidos grasos del aceite de maracuyá.....	52
Anexo 4: Manual del kit de CCK	56
Anexo 5: Prueba de Friedman para consumo total diario	61
Anexo 6: Prueba de Fisher para consumo total diario.....	61
Anexo 7: Prueba de Friedman para el periodo de 0 a 30 minutos de consumo de alimento	61
Anexo 8: Prueba de Friedman para el periodo de 120 a 150 minutos de consumo de alimento	62
Anexo 9: Prueba de Fisher para el periodo de 0 a 30 minutos de consumo de alimento...	62
Anexo 10: Prueba de Fisher para el periodo de 120 a 150 minutos de consumo de alimento	63

RESUMEN

Las distintas hormonas gastrointestinales, como la colecistoquinina (CCK), desempeñan un papel importante en la regulación de la saciedad en respuesta a la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico. Una fuente de ácido linoleico, es el aceite de maracuyá (*Passiflora edulis*). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del consumo de aceite de maracuyá en la conducta alimentaria y obtener información preliminar acerca de la concentración postprandial de la CCK plasmática en ratas Holtzman. Se establecieron dos experimentos, el primero para evaluar el consumo de alimentos durante 6 días y por periodos de tiempo, luego de la suplementación con el aceite en estudio y el segundo, de un día, para medir la variación de la CCK. Finalizada la fase experimental, los animales fueron sacrificados y los resultados obtenidos de consumo se analizaron bajo un diseño en bloque completamente al azar, seguidamente con las pruebas de Friedman y de Fisher. Los datos de CCK solo se describieron. La administración de aceite de maracuyá redujo significativamente ($p < 0,05$) el consumo de alimentos tanto en el acumulado diario y en los primeros 30 minutos. Sin embargo, en el periodo de 120 – 150 minutos las ratas del tratamiento maracuyá tuvieron un consumo de alimentos significativamente mayor ($p < 0,05$). En conclusión, la administración de aceite de maracuyá redujo el consumo de alimento diario y del primer periodo de tiempo. Aparentemente este efecto es mediado por la CCK.

Palabras claves: consumo de alimentos, *Passiflora edulis*, ácido linoleico.

ABSTRACT

Different gastrointestinal hormones, such as cholecystokinin (CCK), play an important role in regulating satiety in response to the intake of polyunsaturated fatty acids, such as linoleic acid. One source of linoleic acid is passion fruit (*Passiflora edulis*) oil. The objective of this research was to evaluate the effect of passion fruit oil consumption on eating behavior and to obtain preliminary information about the postprandial concentration of plasma CCK in Holtzman rats. Two experiments were established, the first one to evaluate food consumption during 6 days and for periods of time, after supplementation with the oil under study, and the second one, of one day, to measure the variation of CCK. At the end of the experimental phase, the animals were sacrificed and the results obtained were analyzed under a completely randomized block design, followed by Friedman's and Fisher's tests. CCK data only were described. Administration of passion fruit oil significantly ($p < 0,05$) reduced food consumption both in the daily cumulative and in the first 30 minutes. However, in the 120 - 150 min period the passion fruit treatment rats had significantly ($p < 0,05$) higher food consumption. In conclusion, the administration of passion fruit oil reduced the daily and the first time period food consumption. This effect is apparently mediated by CCK.

Keywords: food consumption, *Passiflora edulis*, linoleic acid.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial hay un crecimiento de las enfermedades no transmisibles y sus factores de riesgo, como el sobrepeso y la obesidad (Malo-Serrano *et al.* 2017). Todos los organismos de salud reconocen que el sobrepeso tiene su origen en los modernos y malos comportamientos alimentarios, en los que prevalece cantidad y no calidad, el abuso del azúcar y grasa saturada, entre otros componentes de los alimentos procesados y las bebidas gaseosas (Ministerio de Salud del Perú 2012). Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) (2020) en el Perú, en el año 2019, el 37,8 por ciento y el 22,3 por ciento de las personas de 15 años de edad a más, presentaron sobrepeso y obesidad respectivamente.

El exceso en el balance de energía que se acumula a largo plazo puede producir obesidad. El estado del balance de energía genera señales centrales y periféricas que actúan en regiones cerebrales como el hipotálamo (Badman 2005), donde se integra una compleja red de vías neuronales que regulan el hambre y la saciedad (González *et al.* 2006). Existen factores que inducen hambre y factores que dan lugar a la saciedad. La secuencia en la que intervienen depende de diferentes procesos, pero lo importante es haber llegado al conocimiento de una serie de sustancias hormonales y no hormonales, que consiguen no sólo modular el apetito sino también el balance energético y en definitiva el peso corporal (Tébar *et al.* 2003).

Se han identificado varias hormonas implicadas en la inducción de la saciedad, sus mecanismos de actuación van a resultar variables, pudiendo actuar localmente o ser liberadas al torrente sanguíneo (González y Schmidt Río 2012). Uno de estos péptidos es la colecistoquinina (CCK), su liberación se da por las células enteroendocrinas de la mucosa duodeno-yeyunal en respuesta a la ingesta de ácidos grasos insaturados (González y Schmidt Río 2012) y de más de 12 carbonos. Se ha observado que la CCK reduce el tamaño de la ingesta alimentaria, (González *et al.* 2006, Liou *et al.* 2011, Basain *et al.* 2017, Maher y Clegg 2018). Habiendo una mayor concentración en los primeros 30 minutos después del inicio de la comida (Gonzalez *et al.* 1998).

Al respecto, una fuente de ácidos grasos insaturados es el aceite de maracuyá principalmente fuente de ácido linoleico (18:2 ω) (Ferrari *et al.* 2004, Cerón *et al.* 2012, Malacrida y Jorge 2012, Pantoja *et al.* 2017), si bien este aceite no es de común comercio a nivel nacional, el estudio de sus efectos en la regulación del consumo alimentario y en la concentración de CCK podría ayudar a darle valor funcional nutricional y promover su consumo. Revalorizando así un subproducto de la industria alimentaria, como lo son las semillas de maracuyá de las cuales se extrae este aceite.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del consumo de aceite de maracuyá en la conducta alimentaria y obtener información preliminar acerca de la concentración postprandial de la CCK plasmática en ratas Holtzman.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SACIEDAD

La saciedad alude a la reducción del hambre y la terminación de la ingesta (Rolls 1995, Maher y Clegg 2018). Después que el alimento llega al estómago, los factores post-ingestivos comienzan a hacer efecto. Al inicio, la distensión del estómago envía señales al cerebro, iniciando la saciación (Benelam 2009). La digestión continúa en los intestinos, en donde diversas señales de regulación interna como las hormonas y los neuropéptidos que inducen la saciedad van a provocar la disminución de la ingesta (García- Flores *et al.* 2017).

2.2. ESTIMULADORES Y SEÑALIZACIÓN DE LA SACIEDAD

Al revisar el efecto de varios alimentos, componentes alimentarios y nutrientes en la saciedad, se infiere que los controles internos del apetito no son la única influencia en la ingesta de alimentos (Benelam 2009).

Wilkinson y Peele (1962) estudiaron en gatos el efecto modificador de la saciedad sobre la autoestimulación eléctrica intracraneal mediante electrodos implantados, cuyos resultados confirmaron la existencia de un centro de alimentación en el hipotálamo lateral. Así mismo, Morgane y Jacobs (1969) hacen una revisión de los diversos experimentos realizados con animales, caracterizando las zonas del cerebro implicadas en la saciedad mediante la observación de los efectos de los daños en lugares específicos del cerebro, en el comportamiento de la ingesta de alimentos.

Durante los últimos veinticinco años, las investigaciones realizadas sobre los mecanismos de regulación del apetito han podido identificar varias hormonas circulantes que influyen en el hambre y la saciedad (Kaviani y Cooper 2017).

2.3. GRASAS Y SACIEDAD

Benelam (2009) menciona que la grasa dietética tiene un efecto sobre la saciedad al ralentizar el vaciado gástrico, estimulando la liberación de hormonas intestinales que inducen la saciedad. Potenciando la liberación de insulina y retardando el vaciado gástrico (Shah *et al.* 2012). Del mismo modo, Kaviani y Cooper (2017) indican que existen muchas investigaciones que muestran que las grasas de la dieta influyen mucho en la señalización de la saciedad, ya que se ha descubierto que el tipo de ácido graso en una comida o dieta puede alterar las respuestas fisiológicas y metabólicas, aunque todavía se están explorando los mecanismos detrás de estos cambios.

La ingestión de lípidos está vinculada con la secreción de CCK, y esta depende de la longitud de la cadena de los ácidos grasos. Aunque haya algunos ácidos grasos con longitudes de cadena inferior a 12 carbonos que causan la secreción de CCK, es poco probable que esto afecte a la sensación de apetito (Maher y Clegg 2018). Así mismo Lal *et al.* (2001) indican que se requieren ácidos grasos con una longitud mínima de cadena de 12 átomos de carbono para inducir la liberación de CCK tanto en humanos como en estudios de cultivos celulares. Ellos llegan a la conclusión de que tras el reconocimiento por las células enteroendocrinas, los ácidos grasos de cadena más larga liberan CCK en la mucosa, donde el péptido es capaz de activar las fibras aferentes vagales de manera paracrina.

Hand *et al.* (2010) mencionan que se ha observado que las moléculas de lípidos causan liberación de CCK luego de su administración vía intraduodenal u oral en humanos de sexo masculino, en otro estudio, ellos indican que una comida rica en grasas insaturadas provocó una mayor respuesta secretora que una comida conteniendo grasas saturadas, del mismo modo mencionan que los triglicéridos de cadena larga causan la secreción de CCK, y un estudio adicional más observado fue que el consumo de ácidos grasos libres del aceite de piñón provocó una respuesta plasmática de CCK.

Sí se toman los controles adecuados sobre el contenido energético y la composición de la dieta, es posible modelar con éxito en ratas los beneficios para el metabolismo del peso

corporal, del consumo a largo plazo de dietas altamente enriquecidas con ácidos grasos de cadena larga (Alexandra 2012).

Segarra *et al.* (2010) investigaron el perfil lipídico y algunas actividades de la neuropeptidasa en la corteza frontal de ratas macho adultas después de un periodo en el que las dietas fueron complementadas con ácidos grasos diferentes en sus grados de saturación, como el aceite de pescado (rico en grasa poliinsaturada), aceite de oliva (rico en ácidos grasos monoinsaturados) y aceite de coco (rico en ácidos grasos saturados); ellos observaron que la composición de la dieta afecta la distribución de los ácidos grasos en el cerebro, formulando así la hipótesis de que los ácidos grasos de la dieta modifican la fluidez de la membrana, la estructura terciaria de las peptidasas y por lo tanto la disponibilidad y la función de los neuropéptidos. El resultado obtenido por ellos fue que las funciones cognitivas pueden ser moduladas dependiendo del tipo de grasa utilizada en la dieta.

Shah *et al.* (2012) mostraron que el estímulo del ácido graso linoleico (LA) induce la secreción de CCK de la línea celular tumoral de secretina intestinal (STC-1). Del mismo modo Costarelli y Sanders (2001) realizaron un estudio donde utilizaron aceite de girasol de alto contenido de ácido graso oleico, aceite de palma rico en ácido graso palmítico, una mezcla de aceite de girasol de alto contenido de ácido graso oleico y triglicéridos de cadena media, aceite de cártamo rico en ácido graso linoleico y una mezcla de aceite de girasol de alto contenido de ácido graso oleico y concentrado de aceite de pescado; ellos llegaron a la conclusión de que las comidas ricas en linoleato son un potente estímulo para la liberación de CCK disminuyendo la ingesta de alimentos y conducen a elevaciones prolongadas de los ácidos biliares plasmáticos y las comidas ricas en triglicéridos de cadena media inhiben la liberación de CCK.

2.4. CONDUCTA ALIMENTARIA

La conducta alimentaria es definida como el conjunto de actos relacionados con los hábitos de ingesta energética, selección de alimentos consumidos, preparaciones culinarias y cantidad de alimentos ingeridos. La cual responde a diferentes factores: necesidad biológica, sensación de placer, parámetros socioculturales, entre otros. Se ha fijado que el desarrollo

de la conducta alimentaria se establece por la disponibilidad de alimentos, preferencias alimentarias, tamaño de la porción, aspectos culturales, comportamientos familiares y estilo de vida (Basain *et al.* 2017). Del mismo modo se debe añadir que desde el punto de vista social y psicológico, dicha conducta va a ir cambiando con el correr del tiempo (Lourenço 2007). En general la conducta alimentaria desempeña un papel primordial en el procesamiento de los nutrientes y la homeostasis energética, influenciada por diversos factores (López-Islas *et al.* 2020). Sin embargo, su determinación depende de dos factores importantes, como: el hambre y el apetito (Lourenço 2007).

El apetito puede ser medido por la ingesta de alimentos. Sin embargo, hay varios factores que intervienen entre estos dos conceptos, tales como: los factores cognitivos, como la restricción de la dieta y factores externos, como la disponibilidad, las propiedades hedónicas de los alimentos y las circunstancias sociales. No obstante, cuando se mide en condiciones estandarizadas, la ingesta de los alimentos sirve como un indicador post hoc del apetito (De Graaf *et al.* 2004). Además, cada alimento tiene diferentes grados de alcance para suprimir el hambre e inhibir el inicio de una nueva ingesta. Por esta razón se consideran otros dos conceptos: saciedad y saciación. Así pues, el apetito define el inicio de la comida, y al ir consumiendo los alimentos, irá provocando una disminución paulatina del hambre. Al mismo tiempo, se va incrementar la saciación hasta alcanzar el punto de saciedad, determinando de esta manera la inhibición del hambre y el tiempo hasta la siguiente comida (Lourenço 2007).

2.4.1. Regulación fisiológica

Lourenço (2007) indica que la regulación de la conducta alimentaria tiene cuatro fases:

- Fase preingesta: se originan las señales psicológicas producidas por la visión y el olfato antes de la ingesta del alimento.
- Fase prandial: por influencia de los alimentos se generan señales que estimulan o inhiben la ingesta en diferentes grados.

- Fase postingestiva: se da por señales de saciedad, las que son enviadas al cerebro a través de los quimiorreceptores localizados en el tracto gastrointestinal.
- Fase postabsortiva: está definida por los nutrientes digeridos y absorbidos. Primero, los nutrientes llegan a la circulación sanguínea, generando una situación de hiperglucemia e hiperinsulinemia que favorece a la utilización de carbohidratos, mientras se va activando la lipogénesis e inhibiendo la lipólisis, lo que contribuye a la disminución de los niveles plasmáticos de los ácidos grasos, porque la insulina contribuye al almacenamiento de los lípidos en forma de triglicéridos en el tejido adiposo.

Pasando la fase postprandial, los niveles de glucosa en plasma y la insulina comienzan a reducirse, la lipólisis se restablece. Esto finaliza cuando la glucosa disponible se reduce y una nueva comida se inicia (Lourenço 2007). Cabe resaltar, que la medida en que se dé cada fase dependerá de diferentes factores, tales como, el tipo de alimento, la porción del alimento, factores patológicos, entre otros.

2.5. COLECISTOQUININA

La colecistoquinina (CCK) es una hormona del tipo anorexigénica (Basain *et al.* 2017). Es decir que es una sustancia supresora del apetito. Uno de los primeros estudios en este tema fue el realizado por Gibbs *et al.* (1973) el experimento consistió en la inyección vía intraperitoneal de CCK parcialmente purificada en ratas en ayunas antes de la ingesta de alimentos. Ellos demostraron que la CCK juega un papel inhibitorio en el control a corto plazo de la ingesta alimentaria.

La CCK se encuentra en diferentes formas moleculares, todas ellas derivadas del gen CCK mediante procesamiento postraducciona l o extracelular. Las estructuras de ADN complementarias para la preprocolecistoquinina se han determinado en varias especies: ratón, rata y humano, cuyas formas biológicamente activas de CCK son CCK-58, CCK-33 y CCK-8 principalmente (Moran y Kinzing 2004).

2.5.1. Secreción y regulación

La CCK es secretada por las células I presentes en alta concentración en la mucosa duodeno yeyunal (Alcalá-Bejarano 2014, Tinoco 2015). Estas células tienen una forma ligeramente triangular, con la superficie apical orientada hacia el lumen intestinal y los gránulos secretores que contienen CCK concentrados alrededor de la base; lo que permite que los nutrientes intestinales puedan estimular a las células I para luego liberar su contenido hacia la sangre y tejidos circundantes (Moran y Kinzing 2004).

La CCK ejerce sus efectos biológicos al unirse a receptores específicos en sus tejidos objetivos (Liddle 1997). Estos receptores son: colecistoquinina tipo 1 (CCK-1), anteriormente denominado CCK-A (alimentario), por su localización en el tracto alimentario, específicamente a nivel de las terminales aferentes vagales desde donde se estimula la transmisión nerviosa enviando un mensaje de saciedad al núcleo del tracto solitario, presente también en el páncreas, la vesícula biliar, el píloro y en el sistema nervioso central (SNC); y colecistoquinina tipo 2 (CCK-2) (cerebral), sobre estos receptores actúa la CCK liberada cerebralmente para poder alcanzar un efecto anorexígeno, a través del nervio vago y el SNC (Basain *et al.* 2017).

Muchos estudios han demostrado que los ácidos grasos con longitud de cadena de al menos 12 carbonos e insaturados, estimulan la secreción de CCK en la línea celular enteroendocrina y elevan la CCK plasmática (Liou *et al.* 2011, Basain *et al.* 2017, Maher y Clegg 2018). El principal mecanismo de detección mediante el cual la célula I detecta ácidos grasos y desencadena la secreción de CCK, es mediante la expresión de los receptores acoplados a la proteína G (GPR), como el receptor 40 acoplado a la proteína G (GPR40), que es altamente expresado en los islotes pancreáticos y ha sido ampliamente estudiado por su papel en la secreción de insulina en ratones (Liou *et al.* 2011).

2.5.2. Función biológica

La CCK tiene varias funciones importantes, entre las más destacables está su capacidad para inducir la saciedad y reducir la ingesta de alimentos en animales de experimentación y en

humanos (Liddle 1997). Esta hormona al estar unida al receptor CCK-1 retrasa el vaciado gástrico e inhibe la secreción de ácido gástrico, relaja el esfínter de Oddi, media la contracción de la vesícula biliar y estimula la secreción de las enzimas pancreáticas (Liddle 1997, Rehfeld 2004), las funciones fisiológicas anteriormente mencionadas, atribuidas a la CCK, surgen de la CCK endógena (Liddle 1997). Y al estar unida al receptor CCK-2, predominante en el cerebro, actúa como un neurotransmisor, interviniendo en la memoria y ansiedad, así como en la saciedad (Crawley y Corwin 1994).

2.6. MARACUYÁ

Passiflora edulis, o también llamada fruta de la pasión, es originaria de América del sur tropical (Malacrida y Jorge 2012). El procesamiento de esta fruta produce cantidades apreciables de semillas como subproductos de la industria alimentaria (Pantoja *et al.* 2017). En la tabla 1 se muestra la taxonomía de la maracuyá.

Tabla 1: Taxonomía de la maracuyá

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Violales
Familia	Passifloraceae
Género	Passiflora
Subgénero	Passiflora
Serie	Passiflora
Especie	<i>Passiflora edulis</i> Sims

Fuente: Feulliet y MacDougal citado por Ortiz (2010)

2.6.1. Producción de maracuyá en Perú

Según el Instituto Nacional de Estadística (INEI) (2018) la producción de maracuyá en el Perú entre el año 2013 al 2017 ha tenido una tendencia al incremento, tal como se puede observar en la Figura 1.

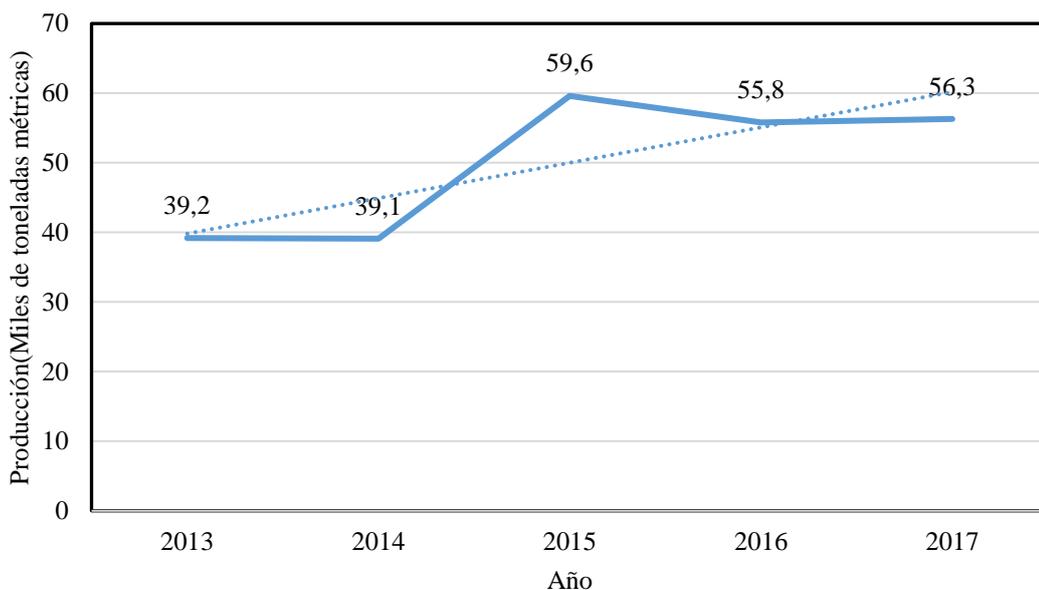


Figura 1: Producción de maracuyá en el Perú del año 2013 al 2017

Fuente: adaptado de INEI (2018)

2.6.2. Semillas de maracuyá

La producción de jugos y pulpas generan grandes cantidades de residuos agroindustriales, como semillas y cáscaras (Oliveira *et al.* 2016). Las semillas de maracuyá representan entre el 4 al 12 por ciento del peso total de esta fruta (De Araujo *et al.* 2019) y son utilizadas por los productores rurales en la suplementación animal (Ferrari *et al.* 2004), en otros casos, estos residuos son desechados. Sin embargo, como el volumen representa grandes toneladas, añadir valor a este subproducto es de interés económico, científico y tecnológico (Ferrari *et al.* 2004). Pudiéndose explotar como una fuente importante para el desarrollo de ingredientes alimentarios funcionales o para aplicaciones nutraceuticas (Pereira *et al.* 2018). La obtención de aceite a partir de estas semillas es una alternativa que agrega valor (Cerón *et al.* 2012).

2.7. ACEITE DE MARACUYÁ

Muchos estudios reportan que las semillas de maracuyá contienen elevado porcentaje de aceite, que oscila entre el 16,7 al 33,5 por ciento, esto, dependiendo de varios factores, como: la técnica de extracción, el tipo de solvente, las condiciones de operación y la zona geográfica donde se cultiva esta fruta (Pantoja *et al.* 2017). El contenido de aceite extraído muestra elevado potencial para su utilización industrial y contiene elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (Silva *et al.* 2015).

Los aceites de semillas han sido utilizados por siglos como fuente de alimento, energía, medicina y aplicaciones cosméticas (Pereira *et al.* 2018). Sin embargo, en la actualidad el mercado de aceite de maracuyá en el Perú está más dirigido al uso cosmético.

2.7.1. Composición de ácidos grasos

El aceite de maracuyá posee componentes de alto valor nutricional como ácidos grasos, principalmente linoleico, oleico y palmítico (Pantoja *et al.* 2017). En la Tabla 2 se observa la composición de los principales ácidos grasos del aceite de maracuyá según diferentes autores.

Tabla 2: Composición de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de maracuyá

Ácidos grasos	Ferrari <i>et al.</i> 2004	Cerón <i>et al.</i> 2012	Malacrida y Jorge 2012	Pantoja <i>et al.</i> 2017
C14: 0 (mirístico)	0,08	-	trazas	-
C16:0 (palmítico)	12,04	15,44	9,73 ± 0,01	14,16 ± 6,1
C18:0 (esteárico)	trazas	3,00	2,58 ± 0,01	1,29 ± 0,7
C18:1 (oleico)	18,06	15,47	13,83 ± 0,04	16,33 ± 4,8
C18:2 (Linoleico)	68,79	63,1	73,14 ± 0,05	67,53 ± 10,3
C18:3 (linolénico)	0,69	1,10	0,41 ± 0,00	0,46 ± 0,2
Método de extracción	Con solvente en soxhlet	Con solvente en soxhlet	Con solvente en soxhlet	Extracción con fluidos supercríticos utilizando CO ₂

Fuente: Adaptado de Ferrari *et al.* (2004), Cerón *et al.* (2012), Malacrida y Jorge (2012), Pantoja *et al.* (2017)

2.8. ACEITE DE COCO

El aceite de coco está compuesto predominantemente por ácidos grasos saturados, los principales ácidos grasos presentes en este aceite son ácido láurico (12:0), mirístico (14:0) y palmítico (16:0) (Restrepo et al. 2020). El ácido láurico constituye casi el 50 % de la grasa total presente en el aceite de coco, este ácido graso es de cadena media, teniendo una longitud de cadena de 12 carbonos (Kinsella *et al.* 2017). Clegg (2017) menciona que la investigación disponible sobre el uso de aceite de coco en la saciedad es limitada, ya que no se han realizado ensayos clínicos a largo plazo que analicen los efectos en la pérdida de peso. En el estudio realizado por Poppitt *et al.* (2010) no encontraron ninguna diferencia en los índices de saciedad o en la ingesta de alimentos en un almuerzo *ad libitum* después de comer aceite de coco. Así mismo Bellissimo y Anderson (2003) quienes utilizaron devazepida (un antagonista del receptor CCK-1) y aceite de coco, en su estudio en ratas, demostrando que no hubo un aumento significativo del consumo de alimentos, por lo que indicaron que este efecto no tendría que atribuirse a la participación de la CCK.

2.9. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos naturales importantes, que reciben una gran atención por sus efectos potenciales de promoción en la salud (Al Shukor *et al.* 2016). Según el estudio realizado por Al Shukor *et al.* (2016) sugieren que la actividad de los flavonoides contra la ingesta de alimentos y el peso podría estar mediada por la estimulación de la señal de CCK, que es responsable de la reducción de la ingesta de alimentos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN Y DURACIÓN DEL ESTUDIO

La fase experimental del trabajo se realizó en las instalaciones del Bioterio del Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). La extracción del aceite de maracuyá se realizó en la Planta Piloto de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNALM. El análisis de perfil de ácidos grasos del aceite de maracuyá se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Los Análisis de Inmunoensayo Enzimático (EIA) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Infecciosas de la UPCH.

La parte experimental comenzó con una fase de acostumbramiento de 7 días y luego se dividió en dos experimentos. El primer experimento la evaluación de la conducta alimentaria de seis días. El segundo experimento de 1 día para el análisis de CCK, el cual fue un estudio preliminar por las limitaciones logísticas en el momento del sacrificio de los animales.

3.2. MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Aceite de maracuyá: La maracuyá fue comprada en el mercado mayorista número 2, esta fruta fue procedente de la zona norte del Perú. El método para la extracción de aceite de maracuyá fue prensado hidráulico a una presión de 6000 lb/pulg² a temperatura ambiente.
- Aceite de coco fue adquirido de la empresa Naturally Divine Perú. El perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama o GC-FID en el laboratorio *Technological Services AGQ* (Anexo 1) en la tabla 3 se puede observar un resumen de dicho resultado. La determinación de quercetina fue mediante cromatografía de HPLC y la de flavonoides totales fue mediante el método espectrofotometría. Realizado en la Unidad de Investigación en Productos Naturales

de la UPCH (Anexo 2). El aceite de coco fue usado como control isocalórico al no afectar la concentración de CCK (Bellissimo y Anderson 2003).

- Ácido graso alfa-linolénico con más de 99 por ciento de pureza, fue adquirido de la empresa Merck Peruana S.A.
- Dieta estándar comercial para ratas, elaborada por la planta piloto de alimentos balanceados de la UNALM. Cuya composición y valor nutricional se observa en la tabla 4.

Tabla 3: Perfil de ácidos grasos del aceite de coco

Ácido graso	Porcentaje (%) del total de aceite
Ácidos grasos saturados:	
Ác. Caproico (C6:0)	0,55
Ác. Caprílico (C8:0)	7,07
Ác. Cáprico (C10:0)	5,87
Ác. Laurico (C12:0)	50
Ác. Mirístico (C14:0)	18
Ác. Palmítico (C16:0)	8,4
Ác. Esteárico (C18:0)	3,2
Ác. Aráquico (C20:0)	0,1
Ácidos grasos insaturados:	
Ác. Oleico (C18:1 n9c)	5,98
Ác. Linoleico (C18:2 n6c)	0,91
Ác. Alfa Linolénico (C18:3 n3)	< 0,05
Ác. Eicosapentaenoico (C20:5n5) EPA	< 0,05
Ác. Docosahexaenoico (C22:6n4c) DHA	< 0,05

Fuente: Adaptado del informe de ensayo AL-21/017087 del laboratorio Technological Services AGQ (Anexo 1)

Tabla 4: Composición y valor nutricional de la dieta estándar

Componente	Contenido
Energía Metabolizable, Kcal/Kg	2900
Proteína Digestible mín., %	17,00
Grasa máx., %	6,00
Fibra máx., %	4,00
Humedad máx., %	14,00
Lisina Digestible mín., %	0,92
Met +Cis Digestible mín., %	0,98
Fósforo Disponible mín., %	0,37
Calcio mín., %	0,63

Fuente: Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos-UNALM; compuesto por harina de maíz, torta de soya (48% de proteína), harina integral extruida de soya, subproductos de trigo, aceite de soya, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, cloruro de colina 60%, cloruro de sodio, aminoácidos sintéticos, premezcla Vit-Min., antioxidantes y antifúngicos.

3.3. SELECCIÓN DE TRATAMIENTOS

3.3.1. Aceite de coco

Se consideró relevante el uso de aceite de coco para fines comparativos, como tratamiento control isocalórico, para descartar que sean las calorías las causantes de la saciedad, ya que, según se ha indicado, por su composición de ácidos grasos es poco probable que tenga relación con la saciedad mediada por CCK (Bellissimo y Anderson 2003).

3.3.2. Ácido graso α -linolénico

Se consideró el uso de este ácido graso debido a que existen estudios comprobados que tiene relación con la disminución del apetito mediante la inducción de la secreción de CCK (Tanaka *et al.* 2008), se usó como control positivo.

3.3.3. Agua

Se usó agua, como control negativo, ya que no posee ningún componente que pueda alterar los resultados y para descartar que sea el volumen consumido de alimento lo que causa la saciedad.

3.4. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE MARACUYÁ

3.4.1. Extracción de aceite de maracuyá

El rendimiento de la extracción de semillas y de la extracción de aceite a partir de las semillas de maracuyá mediante prensado hidráulico se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Rendimiento de la extracción de aceite de maracuyá

Peso de fruta	Peso de las semillas	Rendimiento de semillas con respecto a la fruta	Peso de aceite extraído	Rendimiento del aceite con respecto a las semillas	Cantidad de aceite en (ml)
96 kg	4,163 kg	4,34 %	0,664 kg	15,95 %	735 ml

3.4.2. Composición de ácidos grasos del aceite de maracuyá

El método utilizado para la determinación de la composición de ácidos grasos del aceite de maracuyá fue por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Anexo 3).

En la Tabla 6 se observan los ácidos grasos presentes en el aceite de maracuyá, destacando que la concentración relativa de ácido graso linoleico (18:2) es 66,76 % \pm 0,04 puntos porcentuales. En la Tabla 7 se muestra el perfil de ácidos grasos (Anexo 3).

Tabla 6: Perfil de ácidos grasos de aceite de maracuyá

Ácido graso	t _R (min)	Concentración relativa (%)
Mirístico (14:0)	13,66	0,08 ± 0,00
Palmítico (16:0)	17,29	11,42 ± 0,05
Palmitoleico (16:1)	18,60	0,16 ± 0,00
Heptadecanoico (C17:0)	19,35	0,07 ± 0,00
Esteárico (18:0)	21,47	3,56 ± 0,02
Oleico (18:1)	22,59	16,42 ± 0,02
<i>Cis</i> -11-octadecenoico (18:1)	22,73	0,64 ± 0,00
Linoleico (18:2)	24,31	66,76 ± 0,04
Araquídico (20:0)	25,39	0,18 ± 0,00
α -Linolénico (18:3)	26,33	0,44 ± 0,05
<i>Cis</i> -11-Eicosenoico (C20:1)	26,47	0,14 ± 0,01
Docosanoico (C22:00)	29,83	0,14 ± 0,08

Tabla 7: Porcentajes de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados del aceite de maracuyá

Ácido graso	Concentración relativa (%)
Saturados	15,45
Monoinsaturados	17,36
Poliinsaturados	67,20

3.4.3. Quercetina y flavonoides totales en el aceite de maracuyá

La determinación de quercetina fue mediante cromatografía de HPLC y la de flavonoides totales fue mediante el método espectrofotometría (Anexo 2).

La cantidad de quercetina estuvo por debajo del límite de detección (2 ppm), lo que no permite confirmar su presencia (Anexo 2).

La cantidad de flavonoides totales fue $< 0,010$ mg catequina/g de aceite de maracuyá. Este valor sustenta el resultado obtenido en el análisis de quercetina. Ya que como se mencionó anteriormente el bajo contenido no permitió cuantificar por encima del límite de detección (Anexo 2).

3.5. ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas albinas machos de la raza Holtzman de aproximadamente dos meses de edad, procedentes del Laboratorio de Evaluación Biológico (Bioterio) de la Facultad de Zootecnia de la UNALM con un peso promedio de 232,2 g.

3.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS PARA EL MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El protocolo utilizado fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con registro Nro.007-CE-UDI-FFB-2020.

3.7. FASE DE ACOSTUMBRAMIENTO

La fase de acostumbramiento tuvo el objetivo de la adaptación de las ratas a las condiciones expuestas como; ambiente experimental, manipulación por parte del investigador, dieta estándar y al procedimiento de dosificación de los tratamientos. Se privó a las ratas del alimento por 12 horas, luego se suministró la dieta estándar y agua *ad libitum* por 7 días. En el cuarto día se procedió con el acostumbramiento a la dosificación oral mediante jeringa, para esto se le suministró agua a cada rata por medio de la jeringa. Adicional a esto se realizó el control del peso en la recepción, tercer, quinto y séptimo día, con una balanza Kitchenig

modelo CF400. Se realizó el acostumbramiento a 34 ratas, de las cuales 30 se utilizaron para el estudio del experimento 1 y el total de 34 para el experimento 2.

3.8. EXPERIMENTO 1: CONDUCTA ALIMENTARIA

Este experimento tuvo el objetivo de evaluar el efecto del suministro de aceite de maracuyá sobre el consumo de alimento, para lo cual se siguió la metodología de Gibbs *et al.* (1973) por seis días. Se trabajó con 30 ratas, las cuales fueron colocadas en jaulas individuales, el ambiente de experimentación tenía una temperatura controlada de 26 °C con constante renovación de aire. Todos los días se realizó el pesaje de los animales.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en los tres tratamientos. Cada día se les privó de alimentos por 12 horas a los animales, luego se suministró por medio de jeringas estériles los tratamientos según la distribución (Tabla 8). Consecutivamente se puso a la rata en su jaula y se proporcionó la dieta estándar. Desde ese momento hasta las dos horas y media se realizó el pesado de la comida cada 30 minutos, adicionalmente se realizó un último pesaje a las 12 horas. Los pesajes del alimento se realizaron con la balanza electrónica de alta precisión marca DAKOTA modelo ACS-03T.

Tabla 8: Tratamientos en la evaluación de la conducta alimentaria

Tratamiento	Aceite a evaluar	Isocalórico	Control
Producto a evaluar	Aceite de maracuyá	Aceite de coco	Agua
Número de unidades experimentales	10	10	10
Dosificación	2g/kg	2g/kg	2g/kg

El consumo de alimento fue expresado en gramos por cada 100 gramos de peso vivo, además se consideró como ingesta mínima requerida para definir el inicio de una comida la cantidad 0,05 g (Woltman y Reidelberger 1995).

3.9. EXPERIMENTO 2: ESTUDIO PRELIMINAR CCK

En este experimento 32 de las 34 ratas fueron distribuidas aleatoriamente en los diferentes tratamientos, ver tabla 9. El suministro de los tratamientos fue mediante jeringas estériles después de 12 horas de ayuno. Y las otras 2 ratas no se les suministro ningún tratamiento para la evaluación de la CCK plasmática en el tiempo cero. La dosificación del tratamiento control positivo (ácido graso alfa-linolénico) fue 920 $\mu\text{mol/kg}$ de peso vivo, se usó esta cantidad porque se tomó en cuenta la investigación realizada por Tanaka *et al.* (2008) cuya dosificación fue de 100 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, la dosificación del ácido alfa-linolénico utilizada en este estudio preliminar fue mayor porque se quería observar tiempos superiores a los investigados por dicho autor.

Tabla 9: Tratamientos en la evaluación de CCK plasmática

Tratamiento	Aceite a evaluar	Isocalórico	Control negativo	Control Positivo
Producto a evaluar	Aceite de maracuyá	Aceite de coco	Agua	Ácido alfa-linolénico
Número de unidades experimentales	10	8	8	6
Dosificación	2g/kg	2g/kg	2g/kg	251mg/Kg 920 $\mu\text{mol/Kg}$

3.9.1. Sacrificio de animales y separación de plasma

El sacrificio de los animales fue realizado con una dosis letal intraperitoneal de 150 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina según lo recomendado por Close *et al.* (1997). Se esperó a comprobar la inconsciencia del animal así como la ausencia de dolor (ausencia de reflejo podal y respiración localizada en la región abdominal). Mediante punción cardiaca se realizó la extracción de sangre, la cual fue depositada en tubos BD Vacutainer® con anticoagulante de 6 ml. Tanto la administración de los tratamientos, sacrificio y obtención de sangre fue coordinada para obtener las muestras en los tiempos postprandiales 90, 120, 150, 180, 210

y 240 minutos (Tabla 10). La separación del plasma fue realizada en una centrifuga de Hettich modelo universal 320R, con los siguientes parámetros 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C. El plasma fue almacenado a -80°C.

Tabla 10: Distribución de los animales de experimentación a los diferentes tiempos postprandiales

Tiempo postprandiales (minutos)	Sin tratamiento	Tratamientos			
		Aceite de maracuyá	Isocalórico (aceite de coco)	Control negativo (agua)	Control positivo (ácido α -linolénico)
0	2	-	-	-	-
90	-	2	1	1	1
120	-	2	1	1	1
150	-	2	1	1	1
180	-	2	1	1	1
210	-	1	2	1	1
240	-	1	2	3	1
N° de ratas	2	10	8	8	6

3.9.2. Determinación de CCK

Se utilizó el kit de inmunoensayo enzimático CCK (Sigma-Aldrich), para la detección plasmática de la CCK. Se siguió el procedimiento indicado en el manual del kit (N°. Catálogo RAB0039) (Anexo 4) para la dilución de los estándares y las muestras. Las muestras fueron leídas en una lectora de micro placas SpectraMax 190 (Molecular Devices) a 450 nm. Se usó el software SigmaPlot para la elaboración de la curva estándar y la obtención de las concentraciones de CCK.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico para los datos de consumo total diario y consumo por periodos de tiempo. Se utilizó el diseño de bloques completamente al azar (DBCA), tomando día como bloque, tratamiento como factor y con consumo (g/ 100 g PV) como variable dependiente. El nivel de diferencia estadística fue preestablecido en un valor $p < 0,05$. La

distribución normal de los datos se evaluó con la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Bartlett. Los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y varianza, por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas, la prueba de Friedman y la prueba de Fisher utilizándose para ello el software R versión 4.1.0.

Para los datos del estudio preliminar de CCK se realizó un análisis descriptivo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONDUCTA ALIMENTARIA

4.2.1. Consumo total diario

Al realizar la prueba de Friedman se observa que existe una diferencia entre tratamientos y al evaluar esta diferencia por la prueba de pares (prueba de Fisher) se obtuvo que hay una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) donde las ratas del tratamiento control consumieron más que el tratamiento isocalórico y el tratamiento maracuyá, y entre los tratamientos isocalórico y maracuyá el consumo es estadísticamente igual ($p < 0,05$), tal como se puede observar en la tabla 11 (Anexo 6).

Estos resultados se podrían deber a la secreción de CCK o también por la carga energética diaria para poder tener el inicio de una nueva comida (distensión gástrica) Schwartz *et al.* 1991, Raybould y Taché 1988. De acuerdo al contenido energético al consumir los aceites de coco y maracuyá, la rata estaría consumiendo calorías previas al consumo de la dieta estándar, es decir que cuando estas consumen el control tienen un consumo mayor de alimentos ya que no hubo un consumo previo de calorías.

Tabla 11: Consumo total de alimento diario durante seis días para cada tratamiento

Día	Consumo de alimentos (g/100g PV)		
	Tratamientos		
	Control	Isocalórico	Maracuyá
1	9,18	8,92	8,50
2	8,50	8,93	8,18
3	8,81	8,88	8,44
4	7,77	7,86	8,17
5	8,76	8,03	8,19
6	8,53	7,64	7,79
Media	8,64 ± 0,22* a	8,32 ± 0,17* b	8,10 ± 0,11* b
Mediana	8,53 (7,38 – 9,67)** a	8,09 (7,37 – 9,25)** b	8,24 (7,76 – 8,70)** b

Comparación entre tratamientos. En una fila, las medianas con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (prueba de Fisher).
 *Error estándar
 ** Q2 (Q1 – Q3)

4.2.2. Consumo por periodos de tiempo

Se realizó la prueba de Friedman donde en solo dos de los cinco periodos de tiempo los resultados del consumo de alimento de las ratas tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), estos periodos fueron de 0 a 30 minutos (Anexo 7) y de 120 a 150 minutos (Anexo 8), para los cuales luego se realizó la prueba de pares (prueba de Fisher) tal como se puede observar en la Tabla 12.

Tabla 12: Consumo de alimento (g/100 g PV), promedio de los 6 días, por cada intervalo de tiempo para cada tratamiento

Periodo de tiempo (minutos)	Consumo de alimento (g/100 g PV) *		
	Control	Isocalórico	Maracuyá
0 – 30	2,02 (1,72 – 2,52) a	1,93 (1,60 – 2,19) b	1,85 (1,61 – 2,06) b
30 – 60	0,69 (0,52 – 0,97) a	0,65 (0,38 – 0,90)a	0,75 (0,45 – 0,97) a
60 – 90	0,34 (0,04 – 0,60) a	0,40 (0,04 – 0,73) a	0,44 (0,03 – 0,81) a
90 – 120	0,32 (0,03 – 0,67) a	0,16 (0,00 – 0,76) a	0,39 (0,02 – 0,84) a
120 – 150	0,04 (0,00 – 0,62) c	0,14 (0,00 – 0,76) b	0,84 (0,02 – 1,14) a

Comparación entre tratamientos. En una fila, las medianas con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (prueba de Fisher).
* $Q_2(Q_1 - Q_3)$

En la Tabla 12 se observa que para el periodo de 0 a 30 minutos se obtuvo que hay una diferencia estadísticamente significativa donde las ratas del tratamiento control consumieron más que el tratamiento isocalórico y el tratamiento maracuyá, y entre los tratamientos isocalórico y maracuyá el consumo de las ratas fue estadísticamente igual ($p < 0,05$) según la prueba de Fisher. (Anexo 9).

Según el estudio de Lawton *et al.* (2000), compararon los efectos de 3 tratamientos, una mezcla oleica, alta en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), una mezcla linoleica, alta en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y una mezcla esteárico-oleica, alta en ácidos grasos saturados (AGS). Luego comparando los efectos de los 3 tratamientos con los de una mezcla linoleico-oleica. Ellos llegaron a la conclusión de que estos estudios realizados en humanos a corto plazo indican que los AGPI pueden ejercer un control relativamente más fuerte sobre el apetito que AGMI y AGS. En otro estudio Borsonelo *et al.* (2013) quienes trabajaron con ratas alimentadas con distintos aceites los cuales en su composición tenían distintas proporciones de omega-6 y omega-3. Llegaron a la conclusión de que estas ratas ingirieron menores cantidades de alimento en comparación con los que ingirieron la dieta de control. Lo que nos indicaría que la diferencia estadísticamente significativa que existe entre el consumo de alimentos de las ratas con control y el aceite de maracuyá, donde el consumo de las ratas del tratamiento control fue mayor en comparación con las del tratamiento maracuyá,

podría deberse a que hay un efecto del ácido graso linoleico presente en un 66,76 por ciento en el aceite de maracuyá sobre el consumo de alimentos en las ratas.

Para el experimento realizado por McMinn *et al.* (2000) con la ingesta de comida en ratas en diferentes tiempos después de haber sido inyectadas con 3,0 mg/kg de CCK, ellos observaron que la ingesta de alimentos a los 30 minutos se suprimió. Lo que nos indica que este consumo estadísticamente menor a los 30 minutos en las ratas del tratamiento maracuyá en comparación con las del tratamiento control, podría indicarnos que el ácido graso linoleico predominante en dicho aceite puede haber tenido un efecto sobre la CCK para la disminución del consumo. Ya que se ha visto en ratas y humanos concentraciones de CCK postprandial fluctuante a lo largo del tiempo, pero con una rápida elevación entre los 10 y 30 minutos postprandiales (Suzuki *et al.* 2005).

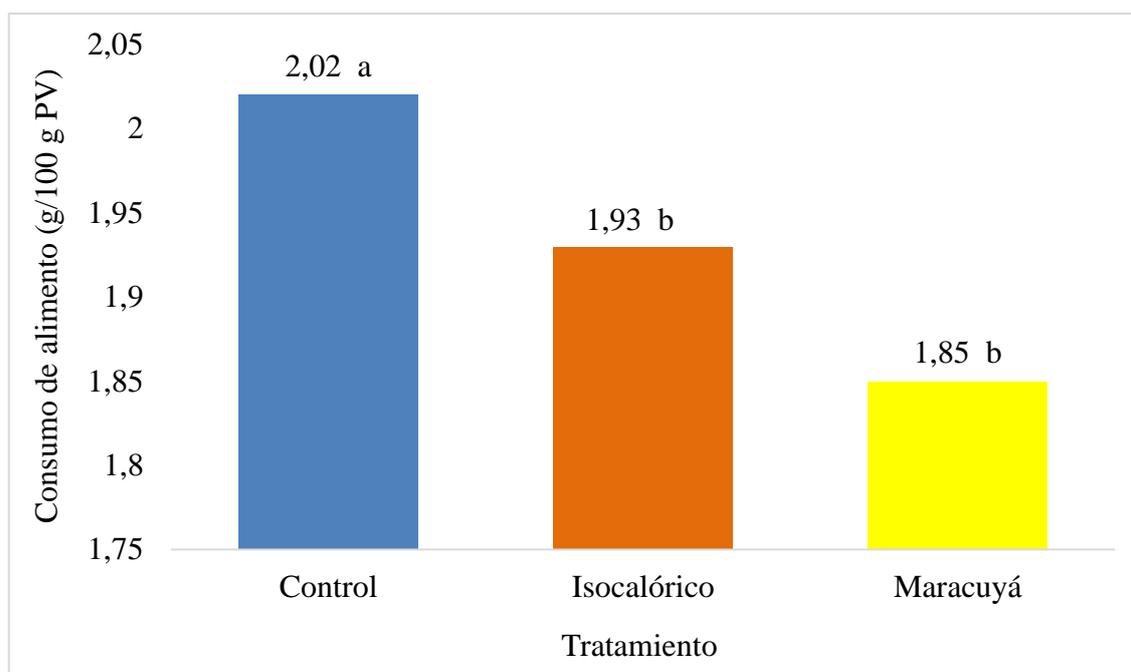


Figura 2: Consumo de alimento (g/100 g PV) en el periodo de 0 a 30 minutos

Se puede observar que para el periodo de 120 a 150 minutos se obtuvo que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tres tratamientos, donde tras la administración con aceite de maracuyá a las ratas, hubo un mayor consumo de alimentos en comparación con el tratamiento isocalórico y este más que el tratamiento control (Anexo 10). Parece ser que a partir de las 2 horas de alimentación hay un consumo compensatorio

al menor consumo en el primer periodo de tiempo en el tratamiento maracuyá. En la Figura 2 se puede visualizar mejor dicho resultado.

El resultado dado en este periodo de tiempo podría deberse a que hubo ratas q no consumieron alimento, esto se dio en todos los tratamientos. Debido a que el paquete estadístico consideró a cada valor como una unidad aunque este sea cero. El porcentaje de ratas que no consumieron alimento para el tratamiento control fue 41,67 por ciento, para el tratamiento isocalórico fue 35 por ciento y para el tratamiento maracuyá fue 25 por ciento. Por lo que los cálculos obtenidos podrían ser alterados por estos datos.

Por el efecto de la composición de ácidos grasos principalmente ácido linoleico del aceite de maracuyá debería haber un menor consumo en comparación con el control. Sin embargo, el resultado obtenido fue lo contrario, esto podría ser explicado por lo encontrado por Pastor y Viveros (2017), cuyos autores mencionan que el consumo de ácido linoleico provoca saciedad solo en los primeros minutos, debido a que este ácido graso se convierte en araquidónico, el cual es precursor del anandamida, este último tiene un efecto orexigénico, es decir, que estimula el apetito y la ingesta de mayor cantidad de alimento. Esto mismo se vio en el estudio de Alvheim *et al.* (2014) en ratones, alimentados con diferentes % de ácido linoleico, donde descubrieron que al aumentar el ácido linoleico dietético aumentó significativamente el ácido graso araquidónico y anandamida, elevados en el hígado. Sin embargo, no se menciona cuanto es el tiempo en que la anandamida pueda estar presente en el organismo luego del consumo de ácido linoleico.

Pero también podría deberse a otros componentes del aceite de maracuyá que podrían haber afectado este resultado como el ácido graso esteárico y el palmítico cuya composición dentro del aceite de maracuyá es 3,56 por ciento y 11,42 por ciento respectivamente; Pastor y Viveros (2017) mencionan que estos ácidos grasos tienden a aumentar las señales orexigénicas. Al comparar estas cantidades con las que se encuentran en el aceite de coco (tratamiento isocalórico) cuyos valores son 8,4 por ciento de palmítico y 3,2 por ciento de esteárico; podría indicar que este tiene menor efecto orexigénico por influencia de estos ácidos grasos en comparación con el aceite de maracuyá. Tal como se observa en la Figura 3.

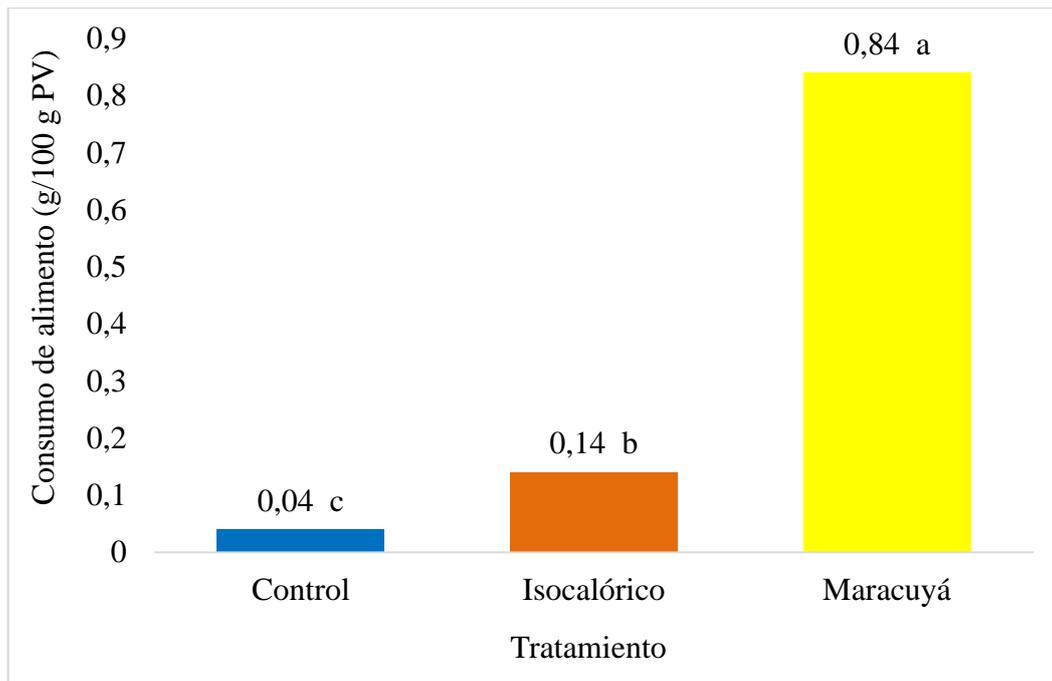


Figura 3: Consumo de alimento (g/100 g PV) en el periodo de 120 a 150 minutos

4.2. CCK

Durante el procesamiento para conocer las concentraciones de CCK hubo pérdidas de muestras, por lo que no se pudieron obtener datos para ciertos puntos de tiempo (ND). Los resultados de la concentración de CCK plasmática en ayunas para los cuatro tratamientos, control negativo, control positivo, isocalórico y maracuyá se presentan en la Tabla 6. Estos resultados también podemos verlos gráficamente en la Figura 1 donde observamos que al consumir el aceite de maracuyá hay una tendencia a la disminución en la concentración de CCK hasta las dos horas después del consumo. Además se puede observar que todos los tratamientos en los primeros 120 minutos estuvieron por encima del basal.

Tabla 13: Datos de la concentración de CCK plasmática (pg/ml) por tratamiento durante diferentes minutos

Tiempo (min)	Tratamientos			
	Control negativo (agua)	Control positivo (ácido α -linolénico)	Isocalórico (aceite de coco)	Aceite de maracuyá
0	69,487	69,487	69,487	69,487
90	21,190	ND	68,171	ND
120	26,495	68,562	59,422	36,631
150	125,557	73,304	ND	89,270
180	80,443	55,310	49,983	ND
210	ND	60,148	ND	ND
240	52,463	39,816	36,654	71,522

*ND = no determinado.

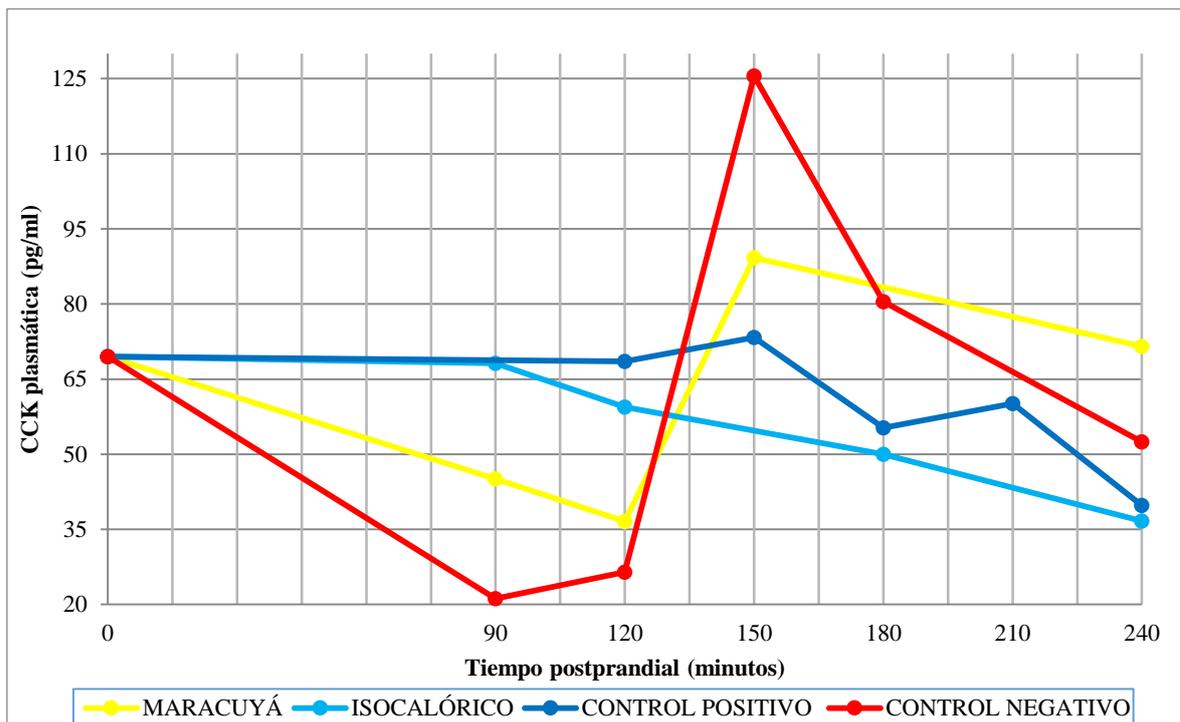


Figura 4: Concentración de CCK plasmática por tiempo recibiendo los tratamientos control negativo, control positivo, isocalórico y maracuyá

El ayuno de 12 horas al cual fueron sometidas las ratas es uno de los factores tomados en cuenta en este estudio preliminar. Koop *et al.* (1987) realizaron un trabajo con ratas,

afirmando que tras un periodo de ayuno de 12 horas y una realimentación con agua o triglicéridos no se observaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de CCK entre ambos grupos ni en comparación con los controles. Por lo tanto, este factor podría no estar teniendo un efecto significativo en los resultados de CCK plasmática en este estudio.

En la Figura 4 se puede observar que el control negativo (agua) tiene picos menores al basal y mayores al mismo, lo cual se puede deber a al ritmo circadiano que presentan las ratas, este tiene un periodo de aproximadamente 24 horas o un día completo. Estos ritmos, se han desarrollado a lo largo del tiempo evolutivo debido a que los constantes cambios ambientales predefinidos, proporcionan a todos los organismos biológicos conocidos la capacidad de anticiparse y responder adecuadamente a las señales externas, promoviendo así la aptitud del organismo. Dentro de los organismos, la ritmicidad circadiana es generada por los genes del reloj, que se ha demostrado que se expresan de forma autónoma en todas las células nucleadas del cuerpo (Martchenko *et al.* 2020). Schade *et al.* (1995) realizaron un estudio con ratas, ellos llegaron a la conclusión de que la CCK aumentó o disminuyó en función del horario circadiano. Así también Rehfeld *et al.* (2020) realizaron un estudio en humanos demostrando que la hormona CCK, al igual que la gastrina y otras hormonas peptídicas, muestra variaciones circadianas en el plasma. Una parte esencial de esta variación parece deberse a la secreción de células I enteroendocrinas en respuesta a los alimentos.

Según Yuan *et al.* (2014) quienes trabajaron con peces, afirmaron que la expresión del ARNm de la CCK en los peces alimentados era significativamente elevada en el hipotálamo después de una comida. En la primera y tercera hora después de la comida, el nivel de expresión de CCK en el hipotálamo de los peces alimentados se multiplicó por 1,5 y 3,4 veces con los grupos preprandiales respectivamente ($p < 0,01$). Algo similar a lo que ocurre con los resultados obtenidos en este estudio para el control negativo (agua), ya que en este caso la elevación de la CCK se dio a la hora y media, el pico más alto, tal vez si se realizaran más mediciones podríamos comprobar si se llegasen a dar otros picos parecidos al estudio mencionado por el autor.

En el caso del control isocalórico (aceite de coco), el cual tiene una tendencia a la disminución, se puede deber a que el aceite de coco en varios estudios como el de Rizzo *et*

al. (2016) y Poppitt *et al.* (2010) afirmaron que el aceite de coco en comparación con una mezcla de triglicéridos de cadena media no reportó ningún aumento de la saciedad y ningún efecto sobre la ingesta de alimentos. Las investigaciones disponibles sobre el uso de este aceite en saciedad y gasto energético son limitadas.

En el caso del control positivo (ácido graso α -linolénico) presenta un pico mayor que el basal pero menor que el aceite de maracuyá. Hand *et al.* (2010) demostraron que las respuestas provocadas por los ácidos grasos dietéticos dependen de sus diferencias estructurales extremadamente sutiles entre ellos, por ejemplo, la conformación o la posición de un doble enlace; son fundamentales para determinar la respuesta secretora de la CCK. Entonces esta diferencia que hay entre el ácido graso α -linolénico y el ácido graso linoleico presente en un 66,67 por ciento en el aceite de maracuyá es una de las posibles causas de que los resultados sean diferentes entre ellos. Sin embargo, al no tener datos en los primeros minutos de concentración de CCK plasmático podríamos estar omitiendo información relevante para el presente estudio y la explicación respectiva.

La encargada de gestionar la saciedad según Gibbs *et al.* (1973) es la CCK que se secreta en los primeros 30 minutos a partir del consumo de alimentos, los minutos posteriores de concentración de CCK estarían más relacionados con gestionar la regulación de la digestión, como la motilidad intestinal, secreción de los jugos pancreáticos y contracción de la vesícula biliar, como menciona Moran (2000), la CCK derivada del intestino está mediada por acciones endocrinas del péptido, mientras que otras parecen depender de modos de acción paracrinós o neurocrinos. El pico en los 150 minutos de la concentración de CCK plasmática de las ratas que consumieron aceite de maracuyá se podría deber a la CCK que se secreta para la regularización de la digestión. Porque si observamos los resultados del experimento 1 (conducta alimentaria) no solo evaluamos el aceite sino también el alimento que ha consumido la rata, entonces la elevación de la CCK en ese tiempo podría deberse a que estaría cumpliendo una función diferente en comparación con la secretada en los primeros minutos porque podría haber un efecto de la ingesta de alimentos sobre ella, ya que los resultados de consumo con el tratamiento aceite de maracuyá se vieron elevados en el periodo de 120 a 150 minutos. Tal como lo mencionan los siguiente autores Byrnes *et al.* (1981) y Reidelberger *et al.* (2018) que la ingesta de alimentos aumentó los niveles plasmáticos de CCK. Gibbons *et al.* (2015) realizaron un estudio en humanos, llegando a la

conclusión de que la respuesta postprandial de la CCK fue significativamente elevada con las comidas ricas en grasas. Sin embargo, el aumento adicional de la CCK en respuesta al desayuno rico en grasas no se tradujo en una mayor supresión del apetito después de las comidas, medida a través del hambre, la saciedad o la ingesta de energía *ad libitum*. Tal como lo mencionamos anteriormente.

Según Maljaars *et al.* 2009 al suministrar aceite de cártamo en ratas obtuvieron un aumento significativo en la saciedad y reducción del hambre al compararlas con el control. Ellos también obtuvieron aumentos significativos en las concentraciones plasmáticas de CCK en los tiempos de 150 y 165 minutos después de suministrar aceite de cártamo. Tal como lo que ocurre con las ratas que consumieron el aceite de maracuyá que se podría comparar con el aceite de cártamo que en su composición también tiene grandes cantidades de ácido linoleico, cuyos niveles de CCK también se ven elevados al tiempo de 150 minutos.

V. CONCLUSIONES

Según las condiciones en que se desarrolló la investigación se concluye que:

1. El consumo total diario de alimento de las ratas con el tratamiento aceite de maracuyá fue significativamente menor ($p < 0,05$) que con el tratamiento control.
2. Entre los 0 a 30 minutos de prueba, el consumo de alimento de las ratas con el tratamiento maracuyá fue significativamente menor ($p < 0,05$) al control, pero para el periodo de 120 a 150 minutos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a este.
3. Los animales que fueron administrados con los aceites de maracuyá y coco tuvieron un consumo de alimentos estadísticamente igual ($p < 0,05$) en el consumo total diario de alimentos y en el periodo de 0 a 30 minutos.
4. Se muestran indicios que al consumir el aceite de maracuyá habría una variación de la concentración de CCK plasmática.

VI. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos, se recomienda lo siguiente:

1. Evaluar el consumo de alimentos en ratas al consumir aceite de maracuyá con equipos automatizados de monitoreo de peso.
2. Evaluar a profundidad el efecto del aceite de maracuyá en la concentración plasmática de CCK considerando mayor número de repeticiones y puntos de tiempo menores a los 90 minutos.
3. Evaluar el efecto en el consumo de alimento y la concentración plasmática de CCK de otros aceites.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Shukor, NA; Ravallec, R; Camp, JV; Raes, K. y Smagghe, G. 2016. Flavonoids stimulate cholecystokinin peptide secretion from the enteroendocrine STC-1 cells. *Fitoterapia* 113: 128–131.

Alcalá-Bejarano, JM. 2014. Estudio experimental del efecto de ingredientes alimentarios funcionales sobre la ingesta de alimento, peso corporal y utilización digestiva y metabólica de nutrientes. Posible utilización en dietas para sobrepeso y obesidad. Tesis Doctoral. Granada, España, Universidad de Granada. 75 p.

Alexandra. M. 2012. Exploration of body weight regulation by polyunsaturated fatty acids in rat: potential association with hypothalamic neurogenesis. Tesis Doctoral. Liverpool, Reino Unido, Universidad de Liverpool.

Alvheim, AR; Torstensen, BE; Lin, YH; Lillefosse, HH; Lock, E; Madsen, L; Froyland, L; Hibbeln, J. y Malde, MK. 2014. Dietary Linoleic Acid Elevates the Endocannabinoids 2-AG and Anandamide and Promotes Weight Gain in Mice Fed a Low Fat Diet. *Lipids* 49: 59–69.

Badman, MK. 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*, 307(5717):1909-1914.

Basain, JM; Valdés, MC; Pérez, M; Marrero, RM; Matínez, A. y Mesa, I. 2017. Influencia en el balance energético de los factores que regulan el control del apetito y la saciedad a corto plazo. *Rev. Cubana Pediatr* 89(2): 187-202.

Bellissimo, N. y Anderson, GH. 2003. Cholecystokinin-A Receptors Are Involved in Food Intake Suppression in Rats after Intake of all Fats and Carbohydrates Tested. *Nutritional Neurosciences* 133: 2319-2325.

Benelam, B. 2009. Satiating, satiety and their effects on eating behavior. *British Nutrition Foundation* 34: 126-173.

Borsonelo, EC; Viera, L. y Fernandes Galduróz, JC. 2013. The influence of the polyunsaturated fatty acids on body weight and anxiolytic-like behavior in female rats. *Nutritional Neuroscience* 16(1): 2-5.

Byrnes, DJ; Henderson, L; Borodoy, T. y Rehdeldb, JF. 1981. Radioimmunoassay of cholecystokinin in human plasma. *Clinicu Chimicu A ctu* 111: 1-89.

Cerón, AF; Osorio, O. y Hurtado, A. 2012. Identificación de ácidos grasos contenidos en los aceites extraídos a partir de semillas de tres diferentes especies de frutas. *Acta Agronómica* 61(2):126-132.

Clegg, ME. 2017. They say coconut oil can aid weight loss, but can it really?. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1139-1143.

Close, M. B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J. y Morton, D. 1997. Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 2. *Laboratory Animals*, 31(1): 1-32.

Costarelli, V. y Sanders, TAB. 2001. Acute effects of dietary fat composition on postprandial plasma bile acid and cholecystokinin concentrations in healthy premenopausal women. *British Journal of Nutrition* 86: 471-477.

Crawley, JN y Corwin, RL. 1994. Biological Actions of Cholecystokinin. *Peptides* 15(4):731-755.

De Araujo, MEV; Barbosa, EG; De Oliveira, ACL; Milagres, RS; Pinto, FAC. y Corrêa, PC. 2019. Physical properties of yellow passion fruit seeds (*Passiflora edulis*) during the drying process. *Scientia Horticulturae*.

De Graaf, C.; Blom, WAM; Smeets, PAM; Stafleu, A. y Hendriks, HFJ. 2004. Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr* 79: 946-961.

Ferrari, RA; Colussi, F. y Ayub, RA. 2004. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. *Rev. Bras. Frutic* 26(1):101-102.

García-Flores, CL; Martínez, AG; Beltrán, CP; Zepeda-Salvador, AP. y Solano, LV. 2017. Saciación vs saciedad: reguladores del consumo alimentario. *Revista Médica de Chile* 145(9): 1172–1178.

Gibbons, C; Finlayson, G; Caudwell, P; Webb, DL; Hellström, M; Näslund, E. y Blundell, JE. 2015. Postprandial profiles of CCK after high fat and high carbohydrate meals and the relationship to satiety in humans. *Peptides*.

Gibbs, J; Young, RT. y Smith, GP. 1973. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 84(3):488-495.

Gonzalez, MV; Yago, MD; Mañas, M; Calpeña, R; Díaz, R; Martínez-Victoria, E. and Mataix, J. 1998. Role of the quality of dietary fat on the postprandial levels of secretin, cholecystokinin, and pancreatic polypeptide in humans. *Ars Pharmaceutica* 39: 165-173.

González, ME; Ambrosio, KG y Sánchez, S. 2006. Regulación neuroendócrina del hambre, la saciedad y mantenimiento del balance energético. *Investigación en salud* 8(3):191-200.

González, E. y Schmidt Río, J. 2012. Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Nutrición hospitalaria* 27 (6):1850-1859.

Hand, KV; Bruen, CM; O'Halloran, F; Giblin, L. y Green, BD. 2010. Acute and chronic effects of dietary fatty acids on cholecystokinin expression, storage and secretion in enteroendocrine STC-1 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54: S93–S103.

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2018. Compendio Estadístico Perú 2018. 956p.

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2020. Perú: Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles, 2019. Lima, Perú.

Kaviani, S. y Cooper, JA. 2017 Appetite responses to high-fat meals or diets of varying fatty acid composition: a comprehensive review. *Journal of Clinical Nutrition* 1–12.

Kinsella, R; Maher, T. y Clegg, ME. 2017. Coconut oil has less satiating properties than medium chain triglyceride oil. *Physiology & Behavior* 179:422-426.

Koop, I; Kimmich, T; Koop, H. y Arnold, R. 1987. Effect of Food Deprivation on the Function of the Intestinal Cholecystokinin-Producing Cell in the Rat. *Digestion* 38: 114-123.

Lal, S; Kirkup, AJ; Brunsdon, AM; Thompson, DG. y Grundy D. 2001. Vagal afferent responses to fatty acids of different chain length in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G907–G915.

Lawton, CL; Delargy, HJ; Brockman, J; Smith, FC. y Blundell, JE. 2000. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *Br J Nutr.* 83(5):473-82.

Liddle, RA. 1997. Cholecystokinin cells. *Annu. Rev. Physiol.* 59:221–42.

Liou, AP; Lu, X; Sei, Y; Zhao, X; Pechhold, S; Carrero, RJ; Raybould, HE. y Wank, S. 2011. The G-Protein–Coupled Receptor GPR40 Directly Mediates Long-Chain Fatty Acid–Induced Secretion of Cholecystokinin. *Gastroenterology* 140(3):903-912.

López-Islas, A; Gasca-Martínez, D. y Méndez I. 2020. Estado metabólico en ratas bajo protocolos de restricción temporal de alimento. *Publicación Semestral Páidi* 1-5.

Lourenço, T. 2007. Análisis de la implicación de diferentes factores reguladores del apetito y del estado nutricional en pacientes con Anorexia Nerviosa y en pacientes con bajo peso constitucional. Tesis Doctoral. Madrid, España, Universidad Autónoma de Madrid.

Maher, T. y Clegg, ME. 2018. Dietary lipids with potential to affect satiety: Mechanisms and evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Malacrida, CR. y Jorge, N. 2012. Yellow Passion Fruit Seed Oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. *Braz. Arch. Biol. Technol* 55(1):127-134.

Maljaars, J; Romeyn, EA; Haddeman, E; Peters, HPF. y Masclee, AAM. 2009. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr* 89:1019–1024.

Malo-Serrano, M; Castillo, N. y Pajita, D. 2017. La obesidad en el mundo. *An Fac med* 2:173-178.

Martchenko, A; Martchenko, SE; Biancolini, AD. y Brubaker, PL.2020. Circadian rhythms and the gastrointestinal tract: relationship to metabolism and gut hormones. *Endocrine Society*.

McMinn, JE; Sindelar, DK; Havel, PJ. y Schwartz, MW. 2000. Leptin Deficiency Induced by Fasting Impairs the Satiety Response to Cholecystokinin. *Endocrinology* 141 (12): 4442-4448.

Ministerio de Salud del Perú. 2012. Un gordo problema: sobrepeso y obesidad en el Perú. Imprenta Sanchez. Lima, Perú. 7p.

Moran, TH. 2000. Cholecystokinin and Satiety: Current Perspectives. *Nutrition* 16: 858–865.

Moran, TH. y Kinzig, KP. 2004. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286(2):G183–G188.

Morgane, PJ. y Jacobs, HL. 1969. Hunger and satiety. *World Review of Nutrition and Dietetics* 10:100-213.

Oliveira, A; Angonese, M; Gomes, C. y Ferreira, SRS. 2016. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. The Journal of Supercritical Fluids 111: 55-62.

Ortiz, DC. 2010. Estudio de la variabilidad genética en materiales comerciales de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) en Colombia. Tesis Mg. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia.

Overduin, J; Gibbs, J; Cummings, DE. y Reeve, JR. 2014. CCK-58 elicits both satiety and satiation in rats while CCK-8 elicits only satiation. Peptides 54:71-80.

Pantoja, AL; Hurtado, AM. y Martínez HA. 2017. Caracterización de aceite de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims.) procedentes de residuos agroindustriales obtenido con CO2 supercrítico. Acta Agronómica 66 (2): 178-185.

Pastor, A. y Viveros, JM. 2017. Fast food intake and its influence on the production of N-acylethanolamines involved in the hunger-satiety cycle. Revista Mexicana de Trastornos Alimentarios 8: 171 – 184.

Pereira, MG; Maciel, GM; Haminiuk, CWI; Bach, F; Hamerski, F; Sheer, AP. y Corazza, ML. 2018. Effect of Extraction Process on Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Oil from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa*) Seeds. Waste and Biomass Valorization.

Poppitt, SD; Strik, CM; Macgibbon, AKH; Mcardle, BH; Budgett, SC. y McGill, EN. 2010. Fatty acid chain length, postprandial satiety and food intake in lean men. Physiol Behav 101(1): 161–167.

Raybould, HE. and Taché, Y.1988. Cholecystokinin inhibits gastric motility and emptying via a capsaicin-sensitive vagal pathway in rats. Am. J. Physiol., 255(2): G242-6.

Rehfeld, JF. 2004. Cholecystokinin. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 18(4):569–586.

Rehfeld, JF; Sennels, HP; Jorgensen HL. y Fahrenkrug, J. 2020. Circadian variations in plasma concentrations of cholecystokinin and gastrin in man. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*.

Reidelberger, RD; Kalogeris, TJ. y Solomon, TE. 2018. Plasma CCK levels after food intake and infusion of CCK analogues that inhibit feeding in dogs. *American Physiological Society* R1148-R1154.

Rizzo, G; Masic, U; Harrold, JA; Norton, JE. y Halford, JCG. 2016. Coconut and sunflower oil ratios in ice cream influence subsequent food selection and intake. *Physiol Behav* 164(Pt A): 40–46.

Rolls, BJ. 1995 Carbohydrates, fats, and satiety. *Am J Clin Nutr* 61:960S-967S.

Sayegh, AI; Washington, MC; Raboin, SJ; Aglan, AH. y Reeve, JR. 2014. CCK-58 prolongs the intermeal interval, whereas CCK-8 reduces this interval: Not all forms of cholecystokinin have equal bioactivity. *Peptides* 55:120-125.

Schade, R; Vick, K; Ott, T; Sohr, R; Pfister, C; Bellach, TJ; Golor, G. y Lemmer, B. 1995. Circadian Rhythms of Dopamine and Cholecystokinin in Nucleus Accumbens and Striatum of Rats-Influence on Dopaminergic Stimulation. *Chronobiology international* 12(2): 87-99.

Schwartz, GJ.; McHugh, PR. and Moran, TH. 1991. Integration of vagal afferent responses to gastric loads and cholecystokinin in rats. *Am. J. Physiol.*, 261(1): R64-9.

Segarra, AB; Ruiz-Sanz, JI; Ruiz—Larrea, MB; Ramírez-Sánchez, M; DE Gasparo, M; Banegas, I; Martínez-Cañamero, M; Vives, F. y Prieto, I. 2010. The Profile of Fatty Acids in Frontal Cortex of Rats Depends on the Type of Fat Used in the Diet and Correlates with Neuropeptidase Activities. *Hormone and Metabolic Research* 42: 1 – 6.

Shah, BP; Liu, P; YU, T; Hansen, DR. y Gilbertson, TA. 2012. TRPM5 is critical for linoleic acid-induced CCK secretion from the enteroendocrine cell line, STC-1. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 302: C210–C219.

Silva, RM; Placido, GR; Silva, MAP; Castro, CFS; Lima, MS. y Caliari, M. 2015. Chemical characterization of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) seeds. African Journal of Biotechnology 14(14):1230-1233.

Suzuki, S; Ramos, EJB; Goncalves, CG; Chen, C. and Meguid, MM. (2005). Changes in GI hormones and their effect on gastric emptying and transit times after Roux-en-Y gastric bypass in rat model. Surgery, 138(2): 283-290.

Tanaka, T; Katsuma, S; Adachi, T; Koshimizu, T; Hirasawa, A. y Tsujimoto, G. 2008. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. Naunyn-Schmiedeberg_s Arch Pharmacol 377:523–527.

Tébar, FJ; Garaulet, M. y García, MD. 2003. Regulación del apetito: nuevos conceptos. Rev Esp Obes 1: 13-20.

Tinoco, AB. 2015. Implicación de los péptidos leptina, colecistocinina y ghrelina, y del derivado lipídico oleiletanolamida en la regulación del comportamiento alimentario en los teleósteos. Tesis Doctoral. Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. 33p.

Woltman, T. y Reidelberger, R. 1995. Effects of duodenal and distal ileal infusions of glucose and oleic acid on meal patterns in rats. Creighton University School of Medicine. R7-R14.

Wilkinson, HA. y Peele, TL. 1962. Modification of intracranial self-stimulation by hunger satiety. Am. J. Physiol. 203(3):537-540.

Yuan, D; Wang, TW; Zhou, C; Lin, F; Chen, H; Wu, H; Wei, R; Xin, Z. y Li, Z. 2014. Leptin and cholecystokinin in *Schizothorax prenanti*: Molecular cloning, tissue expression, and mRNA expression responses to periprandial changes and fasting. General and Comparative Endocrinology 204: 13-24.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Informe del perfil de ácidos grasos del aceite de coco



INFORME DE ENSAYO

Nº de Referencia:	AL-21/017087	Registrada en:	AGQ Perú	Cliente (*):	TTITO CHARA YANET
Análisis:	00023360-1	Centro Análisis:	Alkemi	Domicilio (*):	NO INDICA
Tipo Muestra:	Acéite de Coco	Fecha Recepción:	29/01/2021	Contrato:	QMT-PE210100690
Fecha Inicio:	25/02/2021	Fecha Fin:	26/02/2021	Cliente 3º(*):	---
Descripción(*):	Acéite de coco				

Fecha/Hora Muestreo:	29/01/2021	Muestreado por:	Janzen Trujillo
Lugar de Muestreo:	Lima		
Punto de Muestreo:	XXX1_Lima		

A continuación se exponen el Informe de Ensayo y Anexo Técnico asociados a la muestra, en los cuales se pueden consultar toda la información relacionada con los ensayos realizados.

Los Resultados emitidos en este informe, no han sido corregidos con factores de recuperación. Siguiendo el protocolo recogido en nuestro manual de calidad, AGQ guardará bajo condiciones controladas la muestra durante un periodo determinado después de la finalización del análisis. Una vez transcurrido este periodo, la muestra será eliminada. Si desea información adicional o cualquier aclaración, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Covadonga Alonso Alonso

FECHA EMISIÓN: 01/03/2021

OBSERVACIONES (*):

Nº de Referencia: AL-21/017087
 Aceite de coco

 Tipo Muestra: Aceite de Coco
 Fecha Fin: 26/02/2021

**RESULTADOS
ANALITICOS**

Parámetro	Resultado	Unidades	Incert
Ácidos Grasos			
Ác. Alfa Linolénico (C18:3n3)	< 0,05	%	-
Ác. Aráquico (C20:0)	0,10	%	-
Ác. Araquidónico (C20:4n5c)	< 0,05	%	-
Ác. Behénico (C22:0)	< 0,05	%	-
Ác. Butírico (C4:0)	< 0,05	%	-
Ác. Cáprico (C10:0)	5,87	%	-
Ác. Caprílico (C8:0)	7,07	%	-
Ác. Caproico (C6:0)	0,55	%	-
Ác. Dihommo-Gammalinolénico (C20:3n8c)	< 0,05	%	-
Ác. Docosadienoico (C22:2n13c)	< 0,05	%	-
Ác. Docosahexaenoico (C22:6n4c) DHA	< 0,05	%	-
Ác. Eicosadienoico (C20:2n11c)	< 0,05	%	-
Ác. Eicosapentaenoico (C20:5n5) EPA	< 0,05	%	-
Ác. Eicosatrienoico (C20:3n11c)	< 0,05	%	-
Ác. Elaídico (C18:1n9t)	< 0,05	%	-
Ác. Erucico (C22:1)	< 0,05	%	-
Ác. Esteárico (C18:0)	3,2	%	-
Ác. Gadoleico (C20:1n9c)	< 0,05	%	-
Ác. Gamma Linolénico (C18:3n6)	< 0,05	%	-
Ác. Heneicosanoico (C21:0)	< 0,05	%	-
Ác. Laurico (C12:0)	50	%	-
Ác. Lignocérico (C24:0)	< 0,05	%	-
Ác. Linoleico (C18:2n6c)	0,91	%	-
Ác. Linoleídico (C18:2n6t)	< 0,05	%	-
Ác. Margárico (C17:0)	< 0,05	%	-
Ác. Margaroleico (C17:1)	< 0,05	%	-
Ác. Mirístico (C14:0)	18	%	-
Ác. Miristoleico (C14:1)	< 0,05	%	-
Ác. Nervónico (C24:1)	< 0,05	%	-
Ác. Oleico (C18:1n9c)	5,98	%	-
Ác. Palmitelaidico (C16:1t)	< 0,05	%	-
Ác. Palmítico (C16:0)	8,4	%	-
Ác. Palmitoleico (C16:1c)	< 0,05	%	-
Ác. Pentadecanoico (C15:0)	< 0,05	%	-
Ác. Pentadecenoico (C15:1)	< 0,05	%	-
Ác. Tricosanoico (C23:0)	< 0,05	%	-
Ác. Tridecanoico (C13:0)	< 0,05	%	-
Ác. Undecanoico (C11:0)	< 0,05	%	-

Nº de Referencia: AL-21/017087
 Descripción (*): Aceite de coco

 Tipo Muestra: Aceite de Coco
 Fecha Fin: 26/02/2021

ANEXO TÉCNICO

Parámetro	PNT	Técnica	Ref. Norma.	Lim Cuantif/ Detec (1)
Ácidos Grasos				
Ác. Alfa Linolénico (C18:3n3)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Aráquico (C20:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Araquidónico (C20:4n5c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Behénico (C22:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Butírico (C4:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Cáprico (C10:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Caprílico (C8:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Caproico (C6:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Dihommo Gammalinolénico (C20:3n8c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Docosadienoico (C22:2n13c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Docosahexaenoico (C22:6n4c) DHA	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Eicosadienoico (C20:2n11c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Eicosapentaenoico (C20:5n5) EPA	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Eicosatrienoico (C20:3n11c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Eláidico (C18:1n9t)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Erucico (C22:1)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Esteárico (C18:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Gadoleico (C20:1n9c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Gamma Linolénico (C18:3n6)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Heneicosanoico (C21:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Laurico (C12:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Lignocerico (C24:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Linoleico (C18:2n6c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Linoléidico (C18:2n6t)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Margárico (C17:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Margaroleico (C17:1)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Mirístico (C14:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Miristoleico (C14:1)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Nervónico (C24:1)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Oleico (C18:1n9c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Palmitelaídico (C16:1t)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Palmítico (C16:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Palmítoleico (C16:1c)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Pentadecanoico (C15:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Pentadecenoico (C15:1)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Tricosanoico (C23:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Tridecanoico (C13:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %
Ác. Undecanoico (C11:0)	AQ-298	Cromat CG FID		0,05 %

(1) El Lim. Cuantif es el valor a partir del cual cuantificamos. El Lim. Detec es el valor a partir del cual detectamos (aplica a ensayos cualitativos) Para los parámetros de Radioactividad es el AND

Anexo 2: Cuantificación de flavonoides totales y quercetina



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

Informe de resultados

Solicitante:	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA (Ing. Yanet Ttito)
Muestra:	2 muestras de aceites vegetales: Aceite de maracuyá y aceite de coco
Análisis:	Servicio de cuantificación de flavonoides totales y quercetina en 02 muestras de aceites vegetales-Convenio de gestión No. 183-2015-FONDECYT
Fecha de entrega de Resultados:	25 noviembre 2020

RESULTADOS

En las páginas 2 a 6 del presente informe.
Atentamente,

Dra. Rosario Rojas Durán

Unidad de Investigación en Productos
Naturales LID-Laboratorio 209
e-mail: rosario.rojas@upch.pe
<https://investigacion.cayetano.edu.pe/catalogo/productosnaturales/uiipn>
Teléfono: 51-1-3190000 Anexo 233227

Página 1 de 5

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31 / Apartado Postal 4314
Central Telefónica: (511) 319-0000 2402 Secretaría Académica de
Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri

INFORME DE RESULTADOS

1. Información de la muestra

Tipo de muestra: Muestras de aceites vegetales de maracuyá y coco

Solicitante: Ing. Yanet Ttito, Universidad Nacional Agraria La Molina

Ensayos solicitados: Contenido de quercetina mediante cromatografía HPLC y determinación de flavonoides totales por método espectrofotométrico.

Fecha de recepción de muestras: 29 octubre 2020

2. Procedimiento

2.1 Determinación de contenido quercetina mediante cromatografía HPLC

Treinta gramos de aceite fueron disueltos en 50 ml de éter de petróleo. La solución fue extraída con 60x3 mL de MeOH-H₂O (6:4). Las soluciones hidroalcohólicas fueron reunidas y el solvente fue eliminado en un rotavapor. Se redisolvió el extracto en metanol y se lavó con éter de petróleo. El extracto metanólico fue concentrado y se llevó a 5 mL en un fiola. Este extracto fue empleado para los dos tipos de ensayos programados.

Condiciones: Columna: Kromasil Eternity XT-1.8-C18 (2.1 x 100 mm)

Temperatura: 30°C

Eluyente: **A:** H₂O-0.1%HCOOH **B:** ACN → 0-10min:30%B, 10-20 min: 60%B, 20-25:60%B, 25-26min: 30%B

2.2 Determinación de flavonoides totales mediante por espectrofotometría

Se preparó una curva de calibración de catequina entre 80 y 50 ppb. El extracto obtenido en el paso anterior se trató de forma similar y se midió en un espectrofotómetro UV a 510 nm.

3. Resultados

3.1 Determinación del contenido de quercetina mediante cromatografía HPLC

La concentración de quercetina en las muestras analizadas está por debajo del límite de detección del método (2 ppm), lo que no permite confirmar la presencia de quercetina. La concentración según el valor del límite de detección significaría que el contenido de quercetina, en caso la muestra contenga el compuesto, estaría por debajo de los 0.33 mg quercetina/g muestra. Los cromatogramas de algunas muestras (ver Anexo 1) exhiben señales que sugieren la presencia de otros compuestos diferentes de la quercetina, posiblemente otros compuestos fenólicos.

3.2 Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides se expresa en mg de catequina por gramo de muestra, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Muestra	mg catequina/g de muestra
Aceite de maracuyá	< 0.010
Aceite de coco	0.045 ± 0.02

Los valores de contenido total de flavonoides sustentan los resultados obtenidos en el análisis de quercetina mediante HPLC. El bajo contenido no permitió cuantificar por encima del límite de detección.

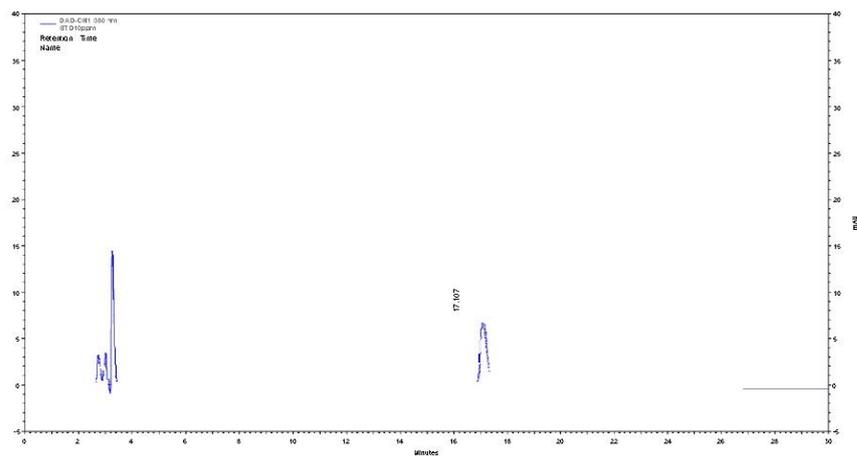
Atentamente,

Dra. Rosario Rojas Durán

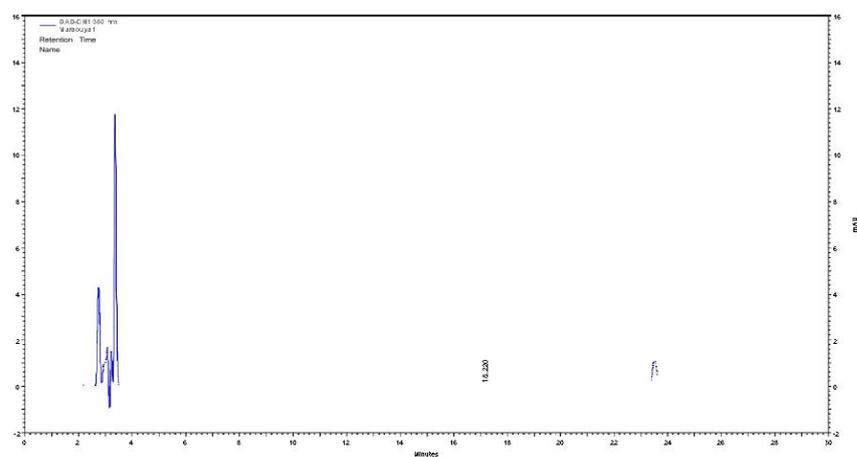
Unidad de Investigación en Productos
Naturales LID-Laboratorio 209
e-mail: rosario.rojas@upch.pe

Anexo 1. Cromatograma HPLC de aceites vegetales

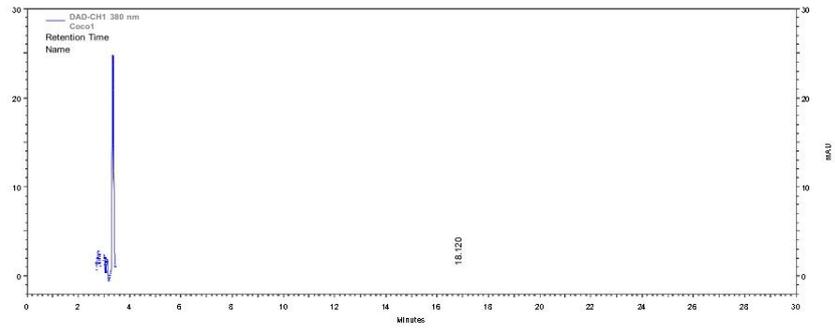
1. Estandar de quercetina (10 ppm)



2. Muestra de aceite de Maracuyá



3. Muestra de aceite de coco



Anexo 3: Perfil de ácidos grasos del aceite de maracuyá



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

Informe de resultados

Solicitante:	Yanet Ttito Chara
Muestra:	1 muestra de aceite vegetal con código: "Maracuyá".
Análisis:	Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Fecha de entrega de Resultados:	4 marzo 2020

RESULTADOS

En las páginas 2 a 4 del presente informe.

Atentamente,

Dra. Rosario Rojas Durán

Unidad de Investigación en Productos Naturales

LID-Laboratorio 209

e-mail: rosario.rojas@upch.pe

<https://investigacion.cayetano.edu.pe/catalogo/productosnaturales/uiipn>

Teléfono: 51-1-3190000 Anexo 233227

Página 1 de 4

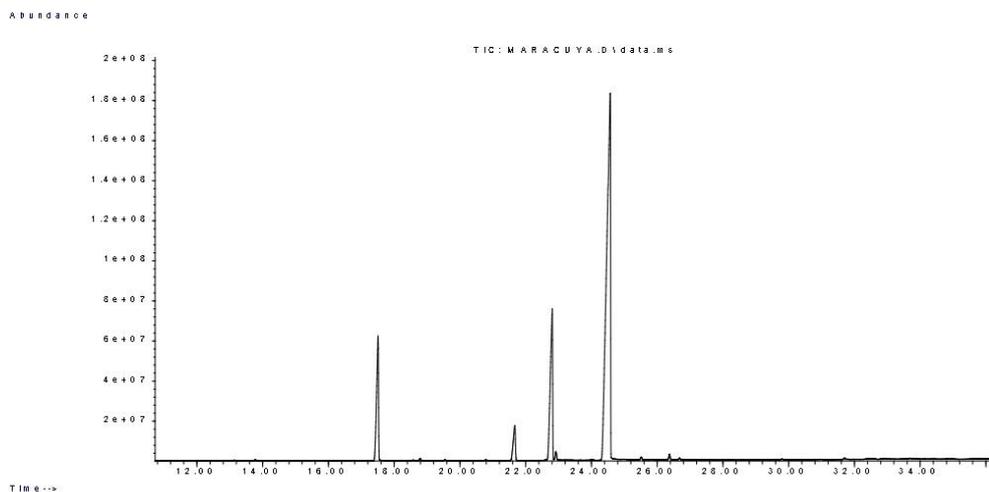
Av. Honorio Delgado 430, Lima 31 / Apartado Postal 4314
Central Telefónica: (511) 319-0000 2402 Secretaria Académica de
Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITE DE MARACUYÁ

ÁCIDO GRASO	t _R (min)	Concentración relativa (%)
Mirístico (14:0)	13.66	0.08 ± 0.00
Palmítico (16:0)	17.29	11.42 ± 0.05
Palmitoleico (16:1)	18.60	0.16 ± 0.00
Heptadecanoico (C17:0)	19.35	0.07 ± 0.00
Esteárico (18:0)	21.47	3.56 ± 0.02
Oleico (18:1)	22.59	16.42 ± 0.02
<i>Cis</i> -11-octadecenoico (18:1)	22.73	0.64 ± 0.00
Linoleico (18:2)	24.31	66.76 ± 0.04
Araquídico (20:0)	25.39	0.18 ± 0.00
α-Linolénico (18:3)	26.33	0.44 ± 0.05
<i>Cis</i> -11-Eicosenoico (C20:1)	26.47	0.14 ± 0.01
Docosanoico (C22:0)	29.83	0.14 ± 0.08

ÁCIDO GRASO	Concentración relativa (%)
Saturados	15.45
Monoinsaturados	17.36
Poliinsaturados	67.20

Cromatograma de gases de Aceite de Maracuyá



Condiciones cromatográficas:

Equipo: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C.

Columna: Zebron 810021zb/7MG-G037-10, 250 °C: 100 m x 250 µm x 0.2 µm

Rampa de temperatura: Empieza en 120 °C por 1 min, sube a 10 °C/min hasta 175 °C por 10 min, luego a 5 °C/min hasta 210 °C por 5 min y finalmente 5 °C/min hasta 230 °C.

Tiempo de corrida: 37.5 min

Inyección: 1 µL

Split: 10: 1

Gas portador: He, 1ml/min

Muestra: 100 mg fue disuelto con 10 mL de pentano y se agregó 100 µL de KOH al 11.2 % en Metanol. Se agitó por 1 minuto y se centrifugó. El sobrenadante fue inyectado directamente al GC-MS.

Product Information

Cholecystokinin (CCK) EIA Kit

for serum, plasma, culture supernatant, and cell lysates

Catalog Number **RAB0039**

Storage Temperature $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

The Cholecystokinin (CCK) Enzyme Immunoassay (EIA) Kit is an *in vitro* quantitative assay for detecting CCK peptide based on the principle of competitive enzyme immunoassay. In this assay, a biotinylated CCK peptide is spiked into the samples and standards. The samples and standards are then added to the plate, where the biotinylated CCK peptide competes with endogenous (unlabelled) CCK for binding to the anti-CCK antibody. After a wash step, any bound biotinylated CCK then interacts with horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin, which catalyzes a color development reaction. The intensity of the colorimetric signal is directly proportional to the amount of captured biotinylated CCK peptide and inversely proportional to the amount of endogenous CCK in the standard or samples. A standard curve of known concentration of CCK peptide can be established and the concentration of CCK peptide in the samples can be calculated accordingly.

Components

1. 96 well plate coated with secondary antibody (Item A) - RAB0039A: 96 wells (12 strips \times 8 wells) coated with secondary antibody.
2. 20x Wash Buffer (Item B) - RABWASH3: 25 mL
3. EIA Cholecystokinin Peptide standard, Lyophilized (Item C) - RAB0039C: 2 vials
4. Anti-CCK Detection Antibody, Lyophilized (Item N) - RAB0039F: 2 vials
5. EIA CCK 5x Assay Diluent B (Item E) - RABDIL10: 15 mL of 5x concentrated buffer. Diluent for both standards and samples, including serum or plasma, cell culture media, or other sample types.
6. Biotinylated CCK Peptide, Lyophilized (Item F) - RAB0039G: 2 vials
7. HRP-streptavidin (Item G) - RABHRP3: 600 μL of 40x concentrated HRP-conjugated Streptavidin.
8. CCK Positive Control Sample, Lyophilized (Item M) - RAB0039K: 1 vial

9. TMB One-Step Substrate Reagent (Item H): 12 mL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in buffered solution.
10. Stop Solution (Item I): 8 mL of 0.2 M sulfuric acid.

Reagents and Equipment Required but Not Provided.

1. Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm
2. Precision pipettes to deliver 2 μL to 1 mL volumes
3. Adjustable 1-25 mL pipettes for reagent preparation
4. 100 mL and 1 liter graduated cylinders
5. Absorbent paper
6. Ultrapure water
7. SigmaPlot software (or other software which can perform four-parameter logistic regression models)
8. Tubes to prepare standard or sample dilutions
9. Orbital shaker
10. Aluminium foil
11. Plastic wrap

Precautions and Disclaimer

For R&D use only. Not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

For sample and positive control dilutions, refer to Preparation, steps 6, 7, and 8.

1. Keep kit reagents on ice during reagent preparation steps. Equilibrate plate to room temperature before opening the sealed pouch.
2. 5x Assay Diluent B (Item E) should be diluted 5-fold with ultrapure water.
3. Briefly centrifuge the anti-CCK Antibody vial (Item N) and reconstitute with 55 μL of 1x Assay Diluent B to prepare the antibody concentrate. Pipette up and down to mix gently.

4. The antibody concentrate should then be diluted 100-fold with 1x Assay Diluent B (Item E). This is the anti-CCK antibody working solution, which will be used in Assay Procedure, step 2.

Note: The following steps may be done during the antibody incubation procedure (Procedure, step 2).

5. Briefly centrifuge the vial of biotinylated CCK peptide (Item F) and reconstitute with 20 μL of ultrapure water before use. Transfer the entire contents of the Item F vial into a tube containing 5 mL of 1x Assay Diluent B. This is the Working Stock of Item F. Pipette up and down to mix gently. The final concentration of biotinylated CCK will be 40 pg/mL. This solution will be used as the diluent in Preparation, steps 6, 7, and 9.

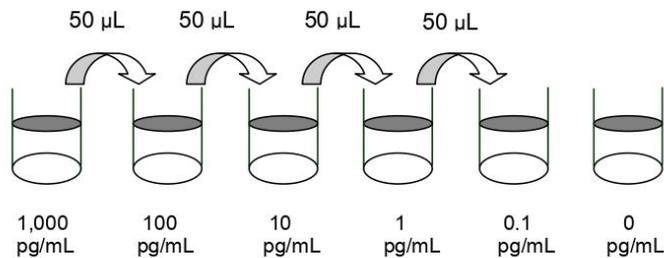
6. **Preparation of Standards:** Label 6 microtubes with the following concentrations: 1,000 pg/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1 pg/mL, 0.1 pg/mL, and 0 pg/mL. Pipette 450 μL of biotinylated CCK Item F working solution (prepared in Step 5) into each tube, except for the 1,000 pg/mL (leave this one empty).

Prepare a 2-fold dilution of Item F. To do this, add 2 mL of Working Stock Item F (see Preparation, step 5) to 2 mL of 1x Assay Diluent B. The final concentration of biotinylated CCK will be **20 pg/mL**.

Note: It is very important to make sure the concentration of biotinylated CCK is 20 pg/mL in all standards.

- Briefly centrifuge the vial of standard CCK peptide (Item C) and reconstitute with 10 μL of ultrapure water. In the tube labeled 1,000 pg/mL, pipette 8 μL of Item C and 792 μL of 20 pg/mL biotinylated CCK solution prepared above. This is the CCK stock solution (1,000 pg/mL CCK and 20 pg/mL biotinylated CCK). Mix thoroughly. This solution serves as the first standard.
- To make the 100 pg/mL standard, pipette 50 μL of 1,000 pg/mL CCK stock solution into the tube labeled 100 pg/mL. Mix thoroughly.
- Repeat this step with each successive concentration, preparing a dilution series as shown in Figure 1. Each time, use 450 μL of biotinylated CCK and 50 μL of the prior concentration until 0.1 pg/mL is reached. Mix each tube thoroughly before the next transfer.
- The final tube (0 pg/mL CCK and 20 pg/mL biotinylated CCK) serves as the zero standard (or total binding).

Figure 1.
Dilution Series for Standards



7. **Positive Control Preparation:** Briefly centrifuge the positive control vial (Item M) and reconstitute with

100 μ L of ultrapure water before use. Add 100 μ L of Working Stock Item F (see Preparation, step 5) to 100 μ L of the prepared Positive Control (Item M). Mix thoroughly. This is a 2-fold dilution of the Positive Control. The positive control is a cell culture medium sample with an expected signal between 10–30% of total binding (70–90% competition) if diluted as described above. It may be diluted further if desired, but be sure the final concentration of biotinylated CCK is 20 pg/mL.

8. **Sample Preparation:** Use 1x Assay Diluent E plus biotinylated CCK to dilute samples, including serum/plasma, cell culture medium, and other sample types.

Note: It is very important to make sure the final concentration of the biotinylated CCK is 20 pg/mL in every sample. To perform a 2-fold dilution of the sample, add 125 μ L of Working Stock Item F (see Preparation, step 5) to 125 μ L of prepared sample. The final concentration of biotinylated CCK will be **20 pg/mL**. For a higher dilution of the sample, dilute the sample with the appropriate Assay Diluent before performing above step.

For example: to make a 4-fold dilution of sample, dilute sample 2-fold (62.5 μ L of sample plus 62.5 μ L of 1x Assay Diluent B). Mix together 125 μ L of 2-fold diluted Item F (Preparation, step 6), 125 μ L of the prepared sample; mix gently. The total volume is 250 μ L, enough for duplicate wells on the microplate.

Do not use Item F diluent from Preparation, step 6 for sample preparation.

9. If Item B (20x Wash Concentrate) contains visible crystals, warm to room temperature and mix gently until dissolved. Dilute 20 mL of Wash Buffer Concentrate into ultrapure water to yield 400 mL of 1x Wash Buffer.
10. Briefly centrifuge the HRP-Streptavidin vial (Item G) before use. The HRP-Streptavidin concentrate should be diluted 40-fold with 1x Assay Diluent B.

Storage/Stability

The Standard, Biotinylated CCK peptide, and Positive Control should be stored at -20°C . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

The remaining kit components may be stored at $2-8^{\circ}\text{C}$.

Opened microplate strips and antibody (Item N) may be store for up to 1 month at $2-8^{\circ}\text{C}$. Return unused wells to the pouch containing desiccant pack and reseal along entire edge.

The kit remains active for up to 6 months.

Procedure

1. Keep kit reagents on ice during reagent preparation steps. It is recommended that all standards and samples be run at least in duplicate.
2. Add 100 μ L of anti-CCK antibody (Item N) (see Preparation, step 4) to each well. Incubate for 1.5 hours at room temperature with gentle shaking (1–2 cycles/sec) or incubate overnight at 4°C .
3. Discard the solution and wash wells 4 times with 1x Wash Buffer (200–300 μ L each). Washing may be done with a multichannel pipette or an automated plate washer. Complete removal of liquid at each step is essential to good assay performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
4. Add 100 μ L of each standard (see Preparation, step 6), positive control (see Preparation, step 7) and sample (see Preparation, step 8) into appropriate wells. Be sure to include a blank well (Assay Diluent only). Cover wells and incubate for 2.5 hours at room temperature with gentle shaking (1–2 cycles/sec) overnight or at 4°C .
5. Discard the solution and wash 4 times as directed in step 3.
6. Add 100 μ L of prepared HRP-Streptavidin solution (see Preparation, step 10) to each well. Incubate for 45 minutes with gentle shaking at room temperature. It is recommended that incubation time should not be shorter or longer than 45 minutes.
7. Discard the solution and wash 4 times as directed in step 3.

8. Add 100 μ L of TMB One-Step Substrate Reagent (Item H) to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature in the dark with gentle shaking (1–2 cycles/sec).
9. Add 50 μ L of Stop Solution (Item I) to each well. Read absorbance at 450 nm immediately.

Results

Calculations

Calculate the mean absorbance for each set of duplicate standards, controls and samples, and subtract the blank optical density. Plot the standard curve using SigmaPlot software (or other software which can perform four-parameter logistic regression models), with standard concentration on the x-axis and percentage of absorbance (see calculation below) on the y-axis. Draw the best-fit curve through the standard points.

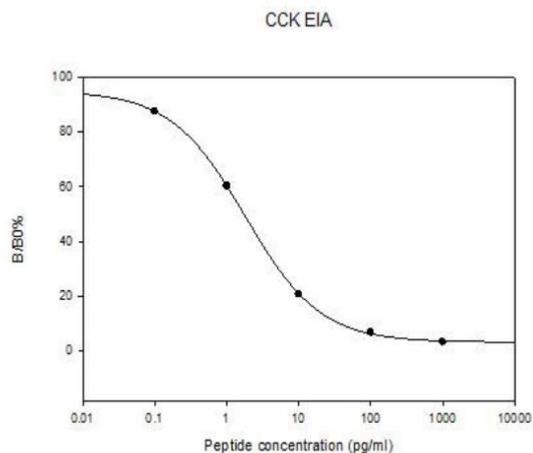
$$\text{Percentage absorbance} = \frac{(B - \text{blank OD})}{(B_0 - \text{blank OD})}$$

B = OD of sample or standard

B₀ = OD of zero standard (total binding)

Typical Data

Standard curve is for demonstration only. Standard curve(s) must be run with each assay.



Product Profile

Sensitivity: The minimum detectable concentration of CCK is 0.2 pg/mL.

Reproducibility:

Intra-Assay: CV <10%

Inter-Assay: CV <15%

Detection Range: 0.1–1,000 pg/mL

Specificity

Cross-Reactivity: This kit shows no cross-reactivity with any of the cytokines tested: Ghrelin, Nesfatin, NPY, and APC.

References

1. Greenough, A. et al., Untangling the effects of hunger, anxiety, and nausea on energy intake during intravenous cholecystokinin octapeptide (CCK-8) infusion. *Physiol. Behav.*, **65**(2), 303–310 (1998).
2. Fink, H. et al., Major biological actions of CCK—a critical evaluation of research findings. *Exp. Brain Res.*, **123**(1-2), 77–83 (1998).
3. Galés, C. et al., Identification of tyrosine 189 and asparagine 358 of the cholecystokinin 2 receptor in direct interaction with the crucial C-terminal amide of cholecystokinin by molecular modeling, site-directed mutagenesis, and structure/affinity studies. *Mol. Pharmacol. (United States)*, **63**(5), 973–982 (2003).
4. Gurda, G.T. et al., Cholecystokinin Activates Pancreatic Calcineurin-NFAT Signaling *In Vitro* and *In Vivo*. *Mol. Biol. Cell (United States)*, **19**(1), 198–206 (2008).

Appendix
Troubleshooting Guide

Problem	Cause	Solution
Poor standard curve	Inaccurate pipetting	Check pipettes
	Improper standard dilution	Ensure a brief spin of Item C and dissolve the powder thoroughly with gentle mixing.
Low signal	Too brief incubation times	Ensure sufficient incubation time; Procedure, step 2 may change to overnight
	Inadequate reagent volumes or improper dilution	Check pipettes and ensure correct preparation
Large CV	Inaccurate pipetting	Check pipettes
High background	Plate is insufficiently washed	Review the manual for proper wash. If using a plate washer, check that all ports are unobstructed.
	Contaminated wash buffer	Make fresh wash buffer
Low sensitivity	Improper storage of the ELISA kit	Store the standard at <-20 °C after reconstitution, others at 4 °C. Keep substrate solution protected from light
	Stop solution	Stop solution should be added to each well before measurement.

AI,SM,SA,ANK,KCP,TD,KJ,MAM 08/20-1

Anexo 5: Prueba de Friedman para consumo total diario

Chisq	Df	p.chisq	F	DFerror	p.F
6.333333	2	0.0421438	5.588235	10	0.0047997

Anexo 6: Prueba de Fisher para consumo total diario

Means:

	MEDIDA.indi	rankSum	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
	_cdrpar								
CONTROL	8.641667	17	1.7061436	60	5.67	12.37	7.3800	8.535	9.6750
ISOCALÓRICO	8.321500	10	1.3542561	60	6.00	11.19	7.3700	8.095	9.2475
MARACUYÁ	8.103667	9	0.8412218	60	5.46	9.86	7.7575	8.240	8.7000

Groups:

	Sum of ranks	groups
CONTROL	17	a
ISOCALÓRICO	10	b
MARACUYÁ	9	b

Anexo 7: Prueba de Friedman para el periodo de 0 a 30 minutos de consumo de alimento

Chisq	Df	p.chisq	F	DFerror	p.F
9.333333	2	0.0094036	17.5	10	2e-07

Anexo 8: Prueba de Friedman para el periodo de 120 a 150 minutos de consumo de alimento

Chisq	Df	p.chisq	F	DFerror	p.F
8.333333	2	0.0155039	11.36364	10	3.07e-05

Anexo 9: Prueba de Frisher para el periodo de 0 a 30 minutos de consumo de alimento

Means:

	MEDIDA.indi_ cmrpar	rankSum	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
CONTROL	2.093000	18	0.4886623	60	1.27	3.11	1.7225	2.02	2.5200
ISOCALÓRICO	1.896667	10	0.3992734	60	1.08	2.98	1.6025	1.93	2.1950
MARACUYÁ	1.809000	8	0.4001639	60	0.84	2.55	1.6125	1.85	2.0625

Groups:

	Sum of ranks	groups
CONTROL	18	a
ISOCALÓRICO	10	b
MARACUYÁ	8	b

Anexo 10: Prueba de Fisher para el periodo de 120 a 150 minutos de consumo de alimento

Means:

	MEDIDA.indi_ cmrpar	rankSum	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
CONTROL	0.2838333	7	0.3826141	60	0	1.69	0.0000	0.040	0.6225
ISOCALÓRICO	0.4248333	12	0.5885100	60	0	3.41	0.0000	0.145	0.7550
MARACUYÁ	0.7250000	17	0.5546582	60	0	1.77	0.0225	0.835	1.1450

Groups:

	Sum of ranks	groups
MARACUYÁ	17	a
ISOCALÓRICO	12	b
CONTROL	7	c