



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE CÁSCARA Y SEMILLA DEL FRUTO DE Cucurbita ficifolia BOUCHÉ

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología.

Autora:

Zavaleta Rengifo, Alejandrina

Asesor:

Gutiérrez Román, Ana

Código ORCID: 0000-0002-7020-7387

Jurado:

Sáez Flores, Gloria

Murrugarra Bringas, Victoria

Riveros Ramírez, Maribel

Lima - Perú

2023



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE CÁSCARA Y SEMILLA DEL FRUTO DE Cucurbita ficifolia BOUCHÉ

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
3	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	1%
4	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
5	1library.co Fuente de Internet	<1%
6	www.ups.edu.ec Fuente de Internet	<1%
7	docplayer.biz.tr Fuente de Internet	<1%
8	bioseguridad.minam.gob.pe Fuente de Internet	<1%
9	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE CÁSCARA Y SEMILLA

DEL FRUTO DE *Cucurbita ficifolia* BOUCHÉ

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología.

Autor(a):

Zavaleta Rengifo, Alejandrina M

Asesor(a):

Gutiérrez Román, Ana I. F

(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Jurado:

Sáez Flores, Gloria M.

Murrugarra Bringas, Victoria Y.

Riveros Ramírez, Maribel D.

Lima - Perú

2023

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Descripción y formulación del problema	6
1.1.1. <i>Problema general</i>	7
1.1.2. <i>Problema específico</i>	7
1.2. Antecedentes	8
1.3. Objetivos	10
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	10
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	10
1.4. Justificación.....	11
1.5. Hipótesis.....	12
II. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché.....	13
2.1.1. <i>Descripción taxonómica</i>	13
2.1.2. <i>Descripción botánica y variedades</i>	14
2.1.3. <i>Distribución geográfica</i>	14
2.1.4. <i>Cultivo</i>	15
2.1.5. <i>Propiedades medicinales</i>	16
2.2. Metabolitos secundarios	16
2.2.1. <i>Compuestos fenólicos</i>	17
2.2.2. <i>Antimicrobianos naturales</i>	17
2.2.3. <i>Antioxidantes naturales</i>	18
III. MÉTODO	19
3.1. Tipo de investigación	19
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	19

3.3. Variables.....	19
3.3.1. Variables independientes (x).....	19
3.3.2. Variables dependientes (y).....	19
3.4. Población y muestra	19
3.5. Instrumentos	20
3.5.1. Materiales	20
3.5.2. Reactivos.	21
3.6. Procedimientos	21
3.6.1. Preparación y caracterización física de las muestras	21
3.6.2. Preparación de los extractos	21
3.6.3. Fenoles totales	22
3.6.4. Actividad antioxidante	23
3.6.5. Actividad antimicrobiana.....	24
3.7. Análisis de datos.....	26
3.8. Consideraciones éticas	26
IV. RESULTADOS.....	27
4.1. Caracterización física del fruto	27
4.2. Fenoles totales	27
4.3. Actividad antioxidante	29
4.4. Actividad antimicrobiana	31
V. DISCUSIONES	42
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES.....	48
VIII. REFERENCIAS	49
IX. ANEXOS	58

RESUMEN

El presente estudio se centra en la evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos de semilla y cáscara de frutos de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza), planta con notables propiedades nutricionales y medicinales, pero poco reconocidas por la población peruana, por lo que presenta principalmente un cultivo incipiente. Las semillas y cáscaras utilizadas se obtuvieron de frutos maduros e inmaduros, estas se deshidrataron y maceraron en frío con agua y etanol al 70% por 15 días, obteniendo así ocho tipos de extractos que fueron evaluados. El protocolo experimental incluye la cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu, evaluación de actividad antioxidante por el método de inhibición de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), y evaluación de actividad antimicrobiana frente *Escherichia coli* (ATCC 35401), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 18824) y *Klebsiella variicola* (aislada de planta), por porcentaje de reducción de crecimiento microbiano en caldo, siendo estas variables cuantificadas por espectrofotometría. El estudio revela que los extractos de cáscaras de frutos inmaduros presentaron la mayor actividad antioxidante (56.58%) y mayor concentración de fenoles (8.26 mg GAE/g por muestra seca), sin diferencias significativas entre el tipo de solvente utilizado; siendo la principal actividad antioxidante en esta parte del fruto atribuida a compuestos diferentes a los fenoles. Por otro lado, los extractos acuosos de semillas de frutos maduros mostraron una fuerte actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos evaluados, alcanzando un porcentaje de reducción de hasta un 70.98% para *S. cerevisiae*, y una correlación directa y considerable con la actividad antioxidante.

Palabras clave. Conservante natural, antibacteriano, antifúngico, cucurbitácea, subproductos de calabaza.

ABSTRACT

The present study focuses on the evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of seed and peel extracts from fruits of *Cucurbita ficifolia* Bouché (pumpkin), a plant with notable nutritional and medicinal properties, but little recognized by the Peruvian population, which is why it presents mainly an incipient crop. The seeds and peels used were obtained from ripe and unripe fruits, these were dehydrated and cold macerated with water and 70% ethanol for 15 days, thus obtaining eight types of extracts that were evaluated. The experimental protocol includes the quantification of phenols by the Folin-Ciocalteu method, evaluation of antioxidant activity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) inhibition method, and evaluation of antimicrobial activity against *Escherichia coli* (ATCC 35401), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 18824) and *Klebsiella variicola* (isolated from plant), by percentage reduction of microbial growth in broth, these variables being quantified by spectrophotometry. The study reveals that the extracts from unripe fruit peels presented the highest antioxidant activity (56.58%) and the highest concentration of phenols (8.26 mg GAE/g per dry sample), without significant differences between the type of solvent used; The main antioxidant activity in this part of the fruit is attributed to compounds other than phenols. On the other hand, the aqueous extracts of ripe fruit seeds showed strong antimicrobial activity against all the microorganisms evaluated, reaching a reduction percentage of up to 70.98% for *S. cerevisiae*, and a direct and considerable correlation with antioxidant activity.

Keywords. Natural preservative, antibacterial, antifungal, cucurbit, pumpkin by-products

I. INTRODUCCIÓN

Los frutos del género *Cucurbita* son muy apreciados y consumidos en todo el mundo, esto se debe a su gran perfil nutricional y los valiosos compuestos bioactivos que contienen y que les otorgan propiedades biológicas y farmacológicas. Sin embargo, la exploración de las semillas, cáscaras y filamentos resultantes del procesamiento de algunas de sus especies, como la calabaza, por parte de la industria alimentaria aún es deficiente y requieren más estudios para determinar su potencial (Leichtweis et al., 2022). Asimismo, el comprender la composición química durante la maduración es crucial para determinar el momento óptimo de cosecha y maximizar las propiedades antibacterianas y antioxidantes para explorar los extractos de estas plantas como conservantes de alimentos (Mokhtar et al., 2021).

Teniendo en consideración lo anterior, es importante profundizar estudios en aspectos como la actividad antioxidante y antimicrobiana de especies de este género presentes en territorio peruano, entre las cuales se encuentra *Cucurbita ficifolia* Bouché, una especie representativa de este grupo en nuestro país, que, a pesar de ser poco estudiada, muestra indicios de su gran potencial en la industria alimentaria (Asto, 2019; Bautista, 2020).

1.1. Descripción y formulación del problema

Los conservantes de alimentos son aditivos que se utilizan para prevenir o inhibir la actividad microbiana o las reacciones químicas (oxidación) que causan daño a los alimentos (Olszewska et al., 2020). Ahora se sabe que los conservantes artificiales tienen efectos secundarios potenciales, como hipersensibilidad, asma y cáncer (Anand & Sati, 2013). Estos incluyen algunos conservantes, entre ellos los nitratos, que están asociados a enfermedades como Alzheimer, Parkinson y diabetes tipo II (Monte et al., 2009), y otros subgrupos a base de sulfato, asociados con la aparición de enfermedades como el asma y las alergias (Bondi et al., 2017). Asimismo, muchos estudios atribuyen genotoxicidad y potencial mutagénico al sorbato

de potasio, uno de los conservantes artificiales más utilizados (Mamur et al., 2012; Mohammadzadeh et al., 2018).

Los efectos negativos que producen algunos conservantes sintéticos en la salud del consumidor están dando paso a más investigaciones para evaluar antimicrobianos naturales como posibles alternativas para mantener la seguridad de los alimentos al extender la vida útil de estos productos sin comprometer la salud de quienes los consumen. (Gutiérrez et al., 2018; Quinto et al., 2019).

Por ello en el presente trabajo se evaluará la actividad antioxidante y antimicrobiana de *Cucurbita ficifolia* Bouché, fuente potencial de antimicrobianos y antioxidantes naturales, en estado maduro e inmaduro, en este caso teniendo como objeto de análisis la semilla y cascará del fruto, que previamente pasarán por un proceso de extracción, con agua y etanol como solventes.

1.1.1. Problema general

¿Los extractos etanólico y acuoso de semilla y cáscara del fruto de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presentan actividad antimicrobiana y antioxidante?

1.1.2. Problema específico

¿Los extractos etanólico y acuoso de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presentan actividad antimicrobiana y antioxidante?

¿Los extractos etanólico y acuoso de la cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presentan actividad antimicrobiana y antioxidante?

Al comparar los extractos ¿Cuál de ellos presentará mayor actividad antimicrobiana y antioxidante?

1.2. Antecedentes

Abdel-Rahim et al. (2015) evaluaron las actividades fisicoquímicas y biológicas del aceite de semilla de calabaza (*Cucurbita pepo*) extraído con diferentes solventes (hexano, etanol, metano y agua) y aplicados en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% contra *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se utilizó el método de la zona de inhibición para las pruebas en bacterias, siendo el extracto de hexano el que presentó la mayor inhibición (26,5 mm) a una concentración del 100%, mientras que el extracto de etanol tuvo la menor inhibición (14,2 mm) a la misma concentración. Para el estudio de los hongos, se utilizó el método del peso del micelio y se observó que los pesos (seco y fresco) de ambos hongos disminuyeron con el aumento de la concentración de aceite.

Aljuraifani (2017) estudió la actividad antibacteriana de cinco extractos de pulpa de calabaza (*Cucurbita pepo* L.); usando n-hexano (98%), cloroformo (65%), etanol (80%), acetona (100%) y agua (bidestilada) como solventes y aplicados a concentraciones de 20, 40 y 80 µg/ml del extracto frente a siete microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*. Los resultados mostraron que todos los extractos fueron muy efectivos contra *P. aeruginosa*. El extracto de n-hexano (80 µg/ml) tuvo el mayor efecto inhibitorio, con un halo de $39 \pm 0,4$ mm; seguido del extracto de cloroformo (80 µg/ml), con un diámetro de halo de $26,1 \pm 0,1$ mm. Sin embargo, estos extractos fueron menos efectivos frente a *S. aureus*, siendo el extracto de acetona el que no tuvo ningún efecto inhibitorio en sus tres concentraciones.

Silva et al. (2020) evaluaron el potencial antimicrobiano y antibiofilm de extractos acuosos de hojas y semillas de *Cucurbita pepo* L. Estos extractos se enfrentaron, in vitro, contra cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* y *Candida krusei*. La actividad antimicrobiana se realizó por el método de microtitulación, y la actividad antibiofilm por el método de cristal violeta. Los resultados demostraron que los extractos presentaban actividad

antibacteriana y antibiofilm contra *S. pyogenes*, pero no fue posible determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM). Los extractos inhibieron el crecimiento de *C. albicans* y *C. krusei* con CIM de 0,03 mg/ml; mientras que, la actividad antibiofilm de estas especies no presentó una relación de dependencia de la dosis ni un efecto sinérgico cuando se asociaron con el antifúngico Fluconazol®.

Hussain et al. (2021a) investigaron las actividades antioxidantes y antimicrobianas de la cáscara, pulpa y semilla de la calabaza (*Cucurbita maxima*). Estas partes se separaron, secaron, molieron en polvo y extrajeron con metanol al 80%. Los rendimientos porcentuales del peso del extracto seco de cáscara, pulpa y semilla de calabaza fueron 12.37, 8.84 y 3.53 %, respectivamente; mientras que, las actividades antioxidantes fueron 13.0, 10.58 y 16.53 mg Equivalente Ácido Ascórbico /100 g, respectivamente. Los tres tipos de extractos mostraron una actividad antimicrobiana significativa, siendo el extracto de semilla el de mayor inhibición contra las cepas de hongos (*Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor miehei* y *Trichoderma*) y el extracto de pulpa el de mayor inhibición frente a las cepas bacterianas (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus aureus*).

Mokhtar et al. (2021) realizaron un estudio en el que identificaron los ácidos fenólicos y los flavonoides de *Cucurbita moschata* Duchesne en tres diferentes estados de maduración del fruto; y determinaron sus actividades antioxidantes y antibacterianas. Se identificaron un total de 33 compuestos, de los cuales el ácido sirínico fue el metabolito de mayor concentración (37%), seguido del ácido cinámico (12%) y el ácido protocatequico (11%). En las pruebas antibacterianas se observó que la segunda etapa de maduración mostró la mayor actividad antibacteriana, siendo *Staphylococcus aureus* la cepa más sensible con un halo de inhibición de 12 mm y un CIM (concentración inhibitoria mínima) de 0,75 mg L⁻¹. Mientras que, *Salmonella typhimurium* presentó la mayor resistencia, con un halo de 5 mm, y un valor de CIM de 10 mg·L⁻¹.

Tadee et al. (2020) estudiaron la actividad antimicrobiana de los subproductos de *Cucurbita moschata* contra la bacteria responsable de mastitis bovina en el área de Chiang Mai- Tailandia. Se realizó la extracción de polisacáridos y carotenoides crudos de *C. moschata* y se enfrentaron a 8 bacterias de 50 aislamientos de muestras de leche de mastitis obtenidas de granjas lecheras en Chiang Mai entre agosto y octubre de 2018, evaluando la actividad antimicrobiana utilizando el método de difusión en disco, a concentraciones de 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.38 y 4.69 mg/ml. Se observó que el extracto crudo de polisacáridos a 300 mg/ml no pudo inhibir la mayoría de las bacterias. Por su parte, las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los extractos de carotenoides crudos oscilaron entre 75 y 300 mg/ml.

Estos estudios, en los cuales se evalúa y demuestra la actividad antioxidante y antimicrobiana de especies del género *Cucurbita*, refuerza la iniciativa de este trabajo y la posibilidad de que la especie *Cucurbita ficifolia* Bouché presente potencial como conservante de alimentos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico y acuoso de semilla y cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro.

1.3.2. Objetivos específicos

Cuantificar la concentración de fenoles totales del extracto etanólico y acuoso de semilla y cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro.

Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico y acuoso de semilla y cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro.

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y acuoso de semilla y cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro.

Comparar la actividad antimicrobiana, actividad antioxidante y concentración de fenoles entre las muestras de semilla y cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché.

1.4. Justificación

La composición química de las cucurbitáceas tiene interesantes implicaciones para la salud, varias especies de esta familia son fuentes naturales de compuestos potencialmente bioactivos como carotenoides, tocoferoles, fenoles, terpenoides, saponinas, esteroides, ácidos grasos, carbohidratos funcionales y polisacáridos (Dotto & Chacha, 2020; Leichtweis et al., 2022). Esto las convierte en fuentes potenciales para fines preventivos y terapéuticos, principalmente en aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (Abdullahi & Santhose, 2018).

En muchos estudios los extractos de *Cucurbita* han presentado actividad positiva contra infecciones bacterianas y fúngicas. Siendo estos efectivos contra bacterias Grampositivas: por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y contra bacterias Gram-negativas: por ejemplo, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* y especies de *Klebsiella* (Rezig et al., 2019). También muestran una amplia actividad antifúngica contra especies de *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Candida* y *Saccharomyces* (Salehi et al., 2019a).

Frente a este panorama tenemos a *Cucurbita ficifolia* Bouché, una especie de este género, que a pesar de encontrarse ampliamente distribuida en el Perú y con muchos beneficios sobre la salud, que son de conocimiento popular de la población, aún presenta un cultivo incipiente y escasos estudios sobre las diversas propiedades que le son atribuidas, como su potencial antioxidante y antimicrobiano (Ministerio del ambiente [MINAM], 2020).

Las semillas y cáscaras son partes de los frutos en general desechadas, que recientemente están siendo objeto de estudio de muchos investigadores en la industria alimentaria, esto dado a que han demostrado ser fuentes ricas en componentes bioactivos, que

con un debido procesamiento pueden llegar a convertirse en productos con un gran valor agregado (Abdullahi & Santhose, 2018).

Asimismo, se debe considerar que la presencia y concentración de fitoquímicos, entre ellos los polifenoles, ya sea en la semilla, cáscara u otra parte del fruto, podría variar dependiendo del estado de madurez de este, y con ello la actividad antioxidante o antimicrobiana que puedan presentar, por lo que se considera importante conocer el punto de maduración ideal para determinar su utilidad dentro de la industria alimentaria (Mokhtar et al., 2021; Moya et al., 2020).

1.5. Hipótesis

H₀: Los extractos etanólico y acuoso de semilla y cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro no presentan capacidad antimicrobiana y antioxidante.

H_i: Los extractos etanólico y acuoso de semilla y cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presentan capacidad antimicrobiana y antioxidante.

Ha₁: Sólo los extractos etanólico y acuoso de semilla de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presentan capacidad antimicrobiana y antioxidante.

Ha₂: Sólo los extractos etanólico y acuoso de cáscara de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presentan capacidad antimicrobiana y antioxidante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Cucurbita ficifolia* Bouché

Esta especie conocida en el Perú como “calabaza”, “Chiclayo” o “alcayote”, se encuentra presente también en países como Bolivia (“blanca”), Colombia (“Auyama”), Estados Unidos (“Fig leaf squash”) y México (“chilacayote”) (Rosario, 2019). Esta cucúrbita es originaria de América, aunque todavía hay controversia sobre su centro de origen y domesticación exacto, ya que algunos autores sugieren Centroamérica y México, mientras que otros lo ubican en los Andes de América del Sur (Asto, 2019). En Perú hay registros arqueológicos de *C. ficifolia* que datan de más de 5,000 años encontrados en el asentamiento prehistórico de Huaca Prieta (3000 a.C.), que apoyan la teoría del origen sudamericano de esta planta (Barrera et al., 2020).

2.1.1. Descripción taxonómica

El género *Cucurbita* presenta 15 especies aproximadamente, de las cuales en Perú existen 4 especies cultivadas, que incluyen a *C. maxima*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. ficifolia*, y una especie silvestre, *C. ecuadorensis* (MINAM, 2020).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Cucurbitales

Familia: Cucurbitaceae

Género: *Cucurbita* L.

Especie: *Cucurbita ficifolia* P.M. Bouché (1837)

2.1.2. Descripción botánica y variedades

C. ficifolia es una planta herbácea, rastrera-trepadora y anual, que presenta tallos angulosos, hojas con 3-5 lóbulos redondeados y zarcillos axilares. Sus flores son monoicas, amarillas claras y sin aroma. Mientras que el fruto es de forma globosa a elíptica, con cáscara gruesa y rígida, y pulpa blanca fibrosa con un sabor dulce, cuando está maduro (Asto, 2019; Barrera et al., 2020). El periodo de crecimiento desde la siembra de las semillas hasta la obtención de frutos maduros es de 6-7 meses (Rosario, 2019). La planta puede producir hasta 50 frutos con un peso promedio de 6 a 7 kg y existen diferentes tonalidades de color y forma en los frutos y semillas (Moreno et al., 2023).

En el Perú hay diversas variedades de esta especie distribuidas geográficamente. En un estudio realizado por Barrera et al. (2020) en la cuenca media de Warmiragra-Húanuco, se encontraron hasta 13 variedades distintas de *C. ficifolia*, las cuales se distribuyen hasta una altitud de 3,400 metros. Estas variedades se identificaron como la combinación de tres patrones de color del fruto maduro (verde claro u oscuro, con o sin franjas longitudinales blancas, manchada de blanco o verde, blanca o crema), tres formas distintas para el fruto maduro (redonda, ovalada y alargada o “puru”) y tres categorías de tamaño, incluyendo una variedad intermedia que es la más común, una variedad pequeña llamada “tullu” y una variedad grande conocida como “zapallo calabaza”.

2.1.3. Distribución geográfica

C. ficifolia Bouché es una especie que se encuentra distribuida en América Central y del Sur, en climas templados a húmedos en altitudes de 1000 a 3000 m.s.n.m. (Moreno et al., 2023). Según un informe realizado por la Dirección General de Diversidad Biológica- MINAM (2019), se encuentra distribuida en 17 de los 24 departamentos del Perú, con un 81.83 % de representatividad en la región Quechua, 17.12 % en la región Yunga, 0.87 % en la región Suni y 0.10 % tanto en la región Omagua como Rupa Rupa, siendo la baja prevalencia en las regiones

naturales de Suni, Omagua y Rupa Rupa, casos excepcionales donde el poblador rural inserto las semillas de manera intencional.

2.1.4. Cultivo

Muchas plantas comestibles son consideradas insuficientemente utilizadas, ya que presentan un valor nutricional significativo y metabolitos con un gran potencial, pero ello no es reconocido adecuadamente. Ejemplos de estas plantas incluyen a la especie *C. ficifolia* Bouché, que es alimenticia y medicinal, pero ignorada y subutilizada en nuestro país, a pesar de que el género *Cucurbita* en promedio es cultivado a escala mundial en torno a los 3 millones de hectáreas, con un rendimiento aproximado de 27.832 millones de toneladas, con China como responsable del 58% de la producción (Hosen et al., 2021).

En Perú, la especie *C. ficifolia* se utiliza principalmente para el autoconsumo y forraje de animales, su cultivo en su mayoría es de tipo espontáneo, por lo que se la encuentra en huertos familiares, bordes de las chacras, caminos, carreteras, y con menor representatividad, al borde de canales, parcelas, ríos y quebradas. Este tipo singular de agroecosistemas se deben a que las semillas no suelen ser adquiridas de tiendas especializadas o con premeditación, sino que suelen ser arrojadas en estos lugares luego del consumo del fruto, también se debe al abandono de frutos durante su maduración postcosecha (exposición al sol) y a los frutos no cosechados, que dan lugar a la propagación natural de las semillas (MINAM, 2019; Barrera et al., 2020).

Algunas creencias populares que relacionan las calabazas con la muerte contribuyen a esta propagación de tipo espontánea, además del hecho de que el agricultor depende de otras especies vegetales, más comerciales, a las que destina sus áreas de cultivo. Por lo mismo, el área destinada a *C. ficifolia* abarca desde 10m² a 300 m² como máximo, con un tiempo de siembra muy variable, entre los meses de septiembre a diciembre. Por su parte, la cosecha del fruto maduro se realiza entre los meses de junio y julio (MINAM, 2020).

2.1.5. Propiedades medicinales

Los frutos de *C. ficifolia*, tanto maduros como inmaduros, se utilizan en la cocina tradicional y como alimento para animales (Moreno et al., 2023). Sus semillas y pulpa son usadas crudas, tostadas o cocidas no solo para el consumo, sino también forman parte de la medicina tradicional, para una amplia gama de padecimientos como: degeneración ocular, diabetes, hipertensión, anticancerígeno, inmunomodulador, antibacteriano, hipocolesterolemizante, antiparasitario, antiinflamatorio, antiulceroso y analgésico, recibiendo la atención de varios estudios a la actualidad (Bautista, 2020; Hosen et al., 2021).

Esta especie está principalmente estudiada como una fuente natural de D-chiro-inositol (DCI), un mediador de insulina que actúa como un antihiper glucemiante para reducir los niveles de glucosa en la sangre en pacientes con diabetes tipo 2 (Moya et al., 2020). Esto se debe a la alta cantidad de proteínas, fitoesteroles, ácidos grasos insaturados, vitaminas (como carotenoides y tocoferoles) y microelementos como el zinc que se encuentran no solo en el fruto y las semillas, sino también en otras partes de las plantas del género *Cucurbita*, como hojas y flores (Salehi et al., 2019b)

2.2. Metabolitos secundarios

Son compuestos producidos por los organismos vivos, incluyendo plantas, hongos y bacterias, que no están directamente involucrados en los procesos biológicos esenciales, pero que pueden tener un papel importante en la defensa contra los patógenos, la competencia por recursos y la interacción con otros organismos (Campêlo et al., 2019).

Las plantas presentan diferentes compuestos químicos que pueden ser aislados como aceites esenciales, subproducto de la destilación que contienen compuestos volátiles y fragantes, o extractos de plantas, producto de la infusión o maceración que contienen una variedad de compuestos solubles en agua y alcohol. Estos presentan diferentes aplicaciones tanto en la industria farmacéutica como alimentaria, debido a su amplia variedad de

propiedades como las actividades antimicrobiana y antioxidante, considerando su baja propensión a generar resistencia antimicrobiana debido a la amplia variedad de compuestos activos que poseen (Olszewska et al.,2020).

2.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos polifenólicos son una de las familias más grandes de nutraceuticos vegetales, después de los terpenoides. Son un grupo de productos químicos que tienen una estructura similar, incluyendo al menos un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilo. Hay más de 10,000 compuestos de este tipo identificados en plantas vasculares, y algunos de ellos se encuentran en alimentos y bebidas como frutas, verduras, café, té, cerveza, vino y chocolate (Gutiérrez et al., 2018). Estos polifenoles se clasifican en subfamilias dependiendo de su estructura química, el número de anillos fenólicos y la forma en que estos anillos están conectados, incluyendo ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos, cumarinas y polímeros de tanino (Asto, 2019).

2.2.2. Antimicrobianos naturales

Son compuestos químicos obtenidos de fuentes naturales (animales, plantas, hongos, algas, bacterias y bacteriófagos) que tiene la capacidad de combatir microorganismos patógenos, como bacterias, hongos y virus. El uso alternativo de los antimicrobianos naturales en la industria alimentaria, ante los antimicrobianos sintéticos, responde a las tendencias actuales que consideran el uso de compuestos naturales como opciones más seguras y satisfacen las preferencias de los consumidores por más “alimentos verdes” (Bondi et al., 2017).

Diversos compuestos orgánicos estudiados presentan gran potencial antimicrobiano, como fenoles, terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, saponinas, tiosulfatos, glucosinolatos, entre otros; aislados de diferentes partes (flor, fruto, hojas,

semilla) de plantas, en especial hierbas (orégano, ajo, perejil, salvia, cilantro, romero y limoncillo) y especias (canela, clavo) (Bouarab et al., 2019; Novais et al., 2022).

2.2.3. Antioxidantes naturales

La oxidación durante el almacenamiento de un producto alimenticio produce la peroxidación lipídica y rancidificación de este, afectando su calidad, causando cambios en sus propiedades, destruyendo nutrientes y produciendo compuestos tóxicos, por lo que para impedirlo se aplican antioxidantes. Los antioxidantes naturales no solo ayudan a retrasar el proceso de oxidación de los alimentos y aumentar su vida útil, sino que también tienen propiedades beneficiosas para la salud del consumidor, como proteger el tracto gastrointestinal, prevenir eventos inflamatorios y cardíacos, y ayudar en complicaciones neurales y hepáticas (Novais et al., 2022).

Los compuestos fenólicos son un grupo de antioxidantes ampliamente estudiados y presentes en frutas y verduras. Algunos compuestos con alta capacidad antioxidante demostrada son los tocoferoles, el ácido ascórbico y los componentes del extracto de romero, la vitamina C, los flavonoides y los compuestos fenólicos de naranja, cáscara de plátano y manzana (Ueda et al., 2022).

III.MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación fue descriptivo y experimental, porque se cuantificó y describió las características de la unidad muestral, siendo esta evaluada mediante la manipulación de variables independientes, en este caso dadas en condiciones *in vitro*.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Las muestras fueron recolectadas entre los meses de enero y marzo del año 2023, de la chacra, propiedad de Daysi Cántaro García, en la provincia de Carhuaz, región de Ancash, ubicada a 9°17'6.6942"S 77°38'29.508"W. El trabajo experimental de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM) de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicado en Jr. Rio Chepén 290 en el distrito de El Agustino departamento de Lima (Perú). El tiempo de desarrollo del Plan en general abarcó desde enero hasta setiembre del año 2023.

3.3. Variables

3.3.1. Variables independientes (x)

Parte del fruto (semilla y cáscara), estado de maduración (maduro e inmaduro), tipo de extracción (acuosa y etanólica).

3.3.2. Variables dependientes (y)

Concentración de fenoles totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana.

3.4. Población y muestra

El presente trabajo tuvo como población a los frutos de *Cucurbita ficifolia* Bouché de la variedad verde con líneas y máculas blancas producidos en la provincia de Carhuaz, siendo las muestras colectadas: tres frutos maduros y tres frutos inmaduros, se tuvo como criterio de selección: color del fruto, tamaño del fruto, ausencia de magulladuras y ausencia de picaduras. La unidad experimental para la evaluación antioxidante estuvo conformada por los extractos

de semillas y cáscara del fruto, y para la evaluación antimicrobiana se consideraron a estos mismos extractos, pero enfrentados a las cepas bacterianas y fúngica.

3.5. Instrumentos

Las características físicas de las muestras se midieron en el laboratorio utilizando cinta métrica y balanza (Electronic SF400). Luego se separaron y procesaron las muestras, deshidratándolas en una incubadora (PSELECTA) a 40-80°C y triturándolas en una licuadora (Hamilton beach) a velocidad media, las muestras pulverizadas se pesaron en una balanza analítica (ADAM) y se mezclaron con los solventes en un agitador orbital (Scientific Industries) a 150 rpm, para finalmente dejarlas macerando en la refrigeradora (BOSCH) a 4°C. Para la preparación y conservación de medios y reactivos, se utilizó horno en seco, autoclave (GREETMED), plancha calefactora (LABNET), balanza analítica y refrigeradora a 4°C y -20°C.

Por su parte, para la reactivación y tratamiento de cepas se utilizó un vortex (LABNET) y agitador orbital (Scientific Industries) a 150 rpm e incubadora a 30-35°C. La concentración de fenoles totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de los diferentes extractos se prepararon utilizando micropipeta y cuantificaron con el lector de absorbancia de microplacas (ACCURIS) a 750 nm, 517 nm y 630 nm, respectivamente. El proceso de experimentación fue registrado con una cámara de celular de 48 MP (Xiaomi T9), mientras los datos experimentales y resultados fueron anotados en una libreta de trabajo y posteriormente llevados a Excel versión 2303, su procesamiento se realizó en una computadora (ADVANCE) con Windows 10.

3.5.1. Materiales

3.5.1.1. Biológicos. Cepas de *Escherichia coli* (ATCC 35401), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 18824) y *Klebsiella variicola* (Aislada de planta)

proporcionadas por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática-UNFV.

3.5.1.2. Vidrio. Placas Petri, tubos de ensayo, probeta, beakers, bagueta, pipetas, matraz de Erlenmeyer, fiola, luna de reloj, frascos ámbar y transparentes pequeños.

3.5.1.3. Plástico. Bolsas ziploc, tubos eppendorf, crioviales, tips (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), propipeta y microplacas estériles de 96 pocillos.

3.5.1.3. Otros. Pinzas, cuchillo, espátula, tijera, papel filtro, gasa y papel aluminio.

3.5.2. Reactivos. Caldo Tripticasa de soya (TSB) (LIOFILCHEM), Agar Tripticasa de soya (TSA) (LIOFILCHEM), Agar papa glucosa (PGA) (MERK), reactivo Folin-Ciocalteu (MERCK), cloruro de sodio, ácido gálico (SIGMA), solución DPPH, ácido ascórbico, trolox, benzoato sódico, etanol (QUIMEX), hipoclorito de sodio y agua estéril de inyección.

3.6. Procedimientos

3.6.1. Preparación y caracterización física de las muestras

Los frutos de calabaza maduros e inmaduros fueron lavados con agua destilada y desinfectados con hipoclorito de sodio al 1.5%. Luego con un cuchillo estéril se separó la cáscara y semillas del fruto. Una parte de las semillas y cáscaras fueron secadas a 40°C y 50°C, respectivamente, hasta obtener un peso constante, trituradas finamente y reservadas en un frasco estéril para la posterior extracción etanólica y acuosa del material seco (Hussain et al., 2021a). Mientras que la otra parte de las cáscaras y semillas fueron congeladas a -20°C como material de reserva.

Para la caracterización física, se midieron los diámetros polar y ecuatorial de cada fruto; y se pesaron el total del fruto, total de semillas y total de cáscaras, antes y después del secado.

3.6.2. Preparación de los extractos

Los extractos se obtuvieron a partir de la maceración etanólica y acuosa del material seco de cáscaras y semillas. Para ello, se mezcló 5 g de muestra seca en 50 ml del solvente, ya sea etanol 70 % (extracto etanólico) o agua para inyección (extracto acuoso), a temperatura ambiente, con agitación magnética, durante 4 horas. Luego estos se llevaron a maceración fría a 4°C por 15 días (Leichtweis et al., 2022). Posterior a la maceración, las muestras fueron centrifugadas en frío, filtradas y congeladas a -20°C para su conservación hasta la realización de los análisis.

3.6.3. Fenoles totales

Para determinar la concentración de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. Para esto previamente se preparó 10 ml de solución del reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu a 0.4 M y 10 ml de carbonato de sodio al 7.5%, además de 2 ml de ácido gálico (GAE) al 0.02 mg/ml (solución madre).

Primero se realizó la curva de calibración de ocho estándares de ácido gálico a concentraciones de 2.5, 5, 8, 10, 12, 14, 16, y 20 µg/ml a partir de la solución madre, siguiendo la Tabla 1, siendo este mismo protocolo el aplicado para la cuantificación de fenoles totales de los extractos etanólicos y acuosos de las muestras. Para ello se utilizaron microplacas de 96 pocillos, donde en cada pocillo se inocularon los reactivos preparados y los estándares, muestras o blancos con un volumen total de 200 µl, estos finalmente se dejaron reposar por 2 h a temperatura ambiente antes de medir su absorbancia en el lector de placa a 750 nm.

Tabla 1

Protocolo para la curva de calibración y cuantificación de fenoles.

Reactivos	Blanco	Curva de calibración								Muestra	
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8		
Folin-Ciocalteu	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Ácido gálico	-	2.5 µl	5 µl	8 µl	10 µl	12 µl	14 µl	16 µl	20 µl	-	-
Agua	20 µl	17.5 µl	15 µl	12 µl	10 µl	8 µl	6 µl	4 µl	-	-	-
Extracto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20 µl
Mezclar y esperar por 5 minutos											
Carbonato de sodio	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl

Nota. E= Estándar de ácido gálico, enumerados de menor a mayor concentración.

Cada estándar, blanco y muestra fue realizado por triplicado. Los resultados hallados fueron expresados en miligramo de equivalente ácido gálico (mg GAE) por gramo de muestra seca (g m.s.) (Asto, 2019). Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mg GAE/g m.s.} = \frac{C \cdot V \cdot D}{P \cdot 100}$$

Donde: C= Concentración calculada en base a la curva estándar de ácido gálico (µg/ml); D= dilución; V= volumen del extracto (ml); P= peso de la muestra seca (g).

3.6.4. Actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante se realizó utilizando el radical DPPH sintético (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acuerdo con el método de Brand-Williams et al. (1995). Se preparó una solución de 1 M de DPPH y una solución de Trolox a una concentración de 0.005 M (solución madre), ambas diluidas en alcohol de 96%. Para la curva estándar se prepararon previamente, a partir de la solución madre de Trolox, concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mM, Para la cuantificación de Trolox equivalente y actividad antioxidante de las muestras y los estándares de la curva se mezcló 192 µl de la solución de DPPH y 8 µl de cada extracto o estándar, evitando en lo posible la exposición a la luz durante

el proceso, e inmediatamente se realizaron las lecturas de las absorbancias a 0 y a 60 minutos a 517 nm de longitud de onda.

Cada estándar, blanco y muestra fue realizado por triplicado. La concentración de antioxidantes fue expresada en miligramo de equivalente de Trolox (mg TE) por gramo de muestra seca (g m.s.) (Asto, 2019). Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mg TE/g m.s.} = \frac{C * V * D}{P_m * P * 100}$$

Donde: C= Concentración calculada en base a la curva estándar de trolox (mM); D= dilución; V= volumen del extracto (ml); P_m= peso molecular de trolox (259.29); P= peso de la muestra seca (g).

El porcentaje de inhibición del DPPH que representaba la actividad antioxidante, para cada muestra, se calculó mediante la fórmula (Castillo, 2021):

$$\% I = \frac{\text{Absorbancia del DPPH} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia de DPPH}} \times 100$$

3.6.5. Actividad antimicrobiana

3.6.5.1 Acondicionamiento de cepas. Para la reactivación de las cepas bacterianas, estas fueron sembradas primero en caldo TSB (35°C por 24 h) y luego en medio TSA (35°C por 24 h). Mientras que la cepa de levadura fue sembrada en agar PGA (25°C por 72 h) (Mokhtar et al., 2021). Posteriormente, las colonias aisladas en agar se inocularon en 5 ml de caldo TSB y se incubaron a 35° C por 16h (cultivo overnight). A partir del cultivo obtenido se realizó la curva de crecimiento para cada cepa, para lo cual se inoculó y homogenizó 10 µl de la suspensión en tubos con 5 ml de caldo TSB, de esta nueva suspensión se mezcló 100 µl con 50 µl de agua destilada (utilizada en los extractos acuosos) en los pocillos de la microplaca. Se calculó el crecimiento microbiano midiendo la densidad óptica en el espectrofotómetro a 630 nm cada 30 minutos durante 8 horas.

Así se obtuvo una curva estandarizada para cada microorganismo que permitió determinar la variación de las absorbancias en relación de la cinética de crecimiento. Para poder

estimar una concentración aproximada de unidades formadores de colonia (UFC)/ml del cultivo durante su crecimiento, se midieron las soluciones de la curva de Mcfarland en las microplacas a 630 nm y se compararon las absorbancias. Con ello, se pudo estandarizar una suspensión del cultivo inicial a $\approx 1.5 \times 10^8$ UFC/ml, la cual fue enfrentada con los diferentes extractos.

3.6.5.2 Ensayo antimicrobiano. Para este ensayo se aplicó el método microdilución en caldo (El Zawane, 2014), tanto para las cepas bacterianas como fúngicas. Se añadió 100 μ l de la suspensión microbiana (TSB con bacterias o levaduras) estandarizada a $\approx 1.5 \times 10^8$ ufc/ml y 50 μ l de la solución del extracto en los pocillos de microplacas estériles (96 pocillos), se incubó por 5 h, a 35°C para bacterias y 30°C para levaduras. Se consideraron para la evaluación tres diferentes concentraciones de extractos: 250, 125 y 62.5 mg/ml, para lo cual previamente todos los extractos (acuosos y etanólicos) fueron deshidratados y rehidratados con agua estéril, hasta llegar a la concentración deseada. También se evaluaron controles como: agua para inyección (control negativo) y benzoato sódico E211 a 0.15 mg/ml (control positivo-conservante alimenticio) (Carmilema & Delgado, 2010).

El crecimiento microbiano fue indicado por la turbidez del caldo en los pocillos de la microplaca, leída a 630 nm, esta fue medida cada 30 minutos en un periodo de 5 horas, y comparada con la curva de crecimiento estándar del organismo analizado. Cada muestra de extracto evaluado presentó nueve repeticiones.

La reducción del crecimiento microbiano que representó la actividad antimicrobiana para cada muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de control}} \times 100$$

3.7. Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron procesados con software Statistical Package for the Social Science (SPSS) V.21.0, donde se realizó las pruebas de normalidad de datos, el análisis de varianza de medias con la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis ($p < 0.05$) y la prueba *post hoc* con el estadístico de Games Howell ($p < 0.05$) (Daka, 2019).

3.8. Consideraciones éticas

Las muestras fueron adquiridas de la chacra con previo permiso del propietario, constatado por un documento de consentimiento firmado (ANEXO A). La identificación de la especie fue certificada por un profesional del área (ANEXO B).

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización física del fruto

Para un mejor manejo de las muestras se registraron ciertos parámetros, medidos durante su acondicionamiento, como los diámetros y pesos de los frutos evaluados, siendo estos clasificados según su estado de maduración (Tabla 2).

Tabla 2

Características físicas de los frutos maduros e inmaduros

Fruto	Diámetro (cm)		Peso (g)				
	Polar	Ecuatorial	Fresco total	Fresco de cáscara	Fresco de semilla	Seco de cáscara	Seco de semilla
inmaduro	21±1	17±1	884±36	150±26	265±29	12±2	14±4
maduro	29±7.9	24 ± 5.0	2728±429.5	417±92.6	125±24.1	57±3.1	61±2.7

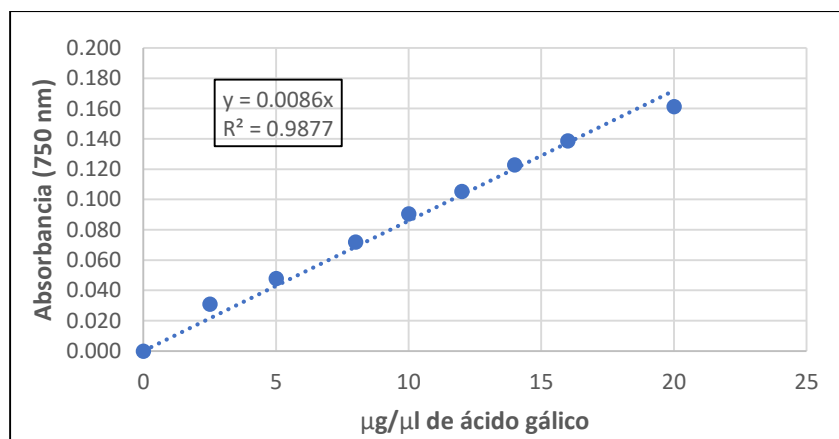
Nota. Valor promedio ± desviación estándar. Número de muestras (n) = 3.

4.2. Fenoles totales

La cuantificación de los fenoles totales de los extractos evaluados se calculó tomando como referencia la curva de calibración de ácido gálico presentada en la figura 1.

Figura 1

Curva de calibración de ácido gálico ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para la cuantificación de fenoles totales

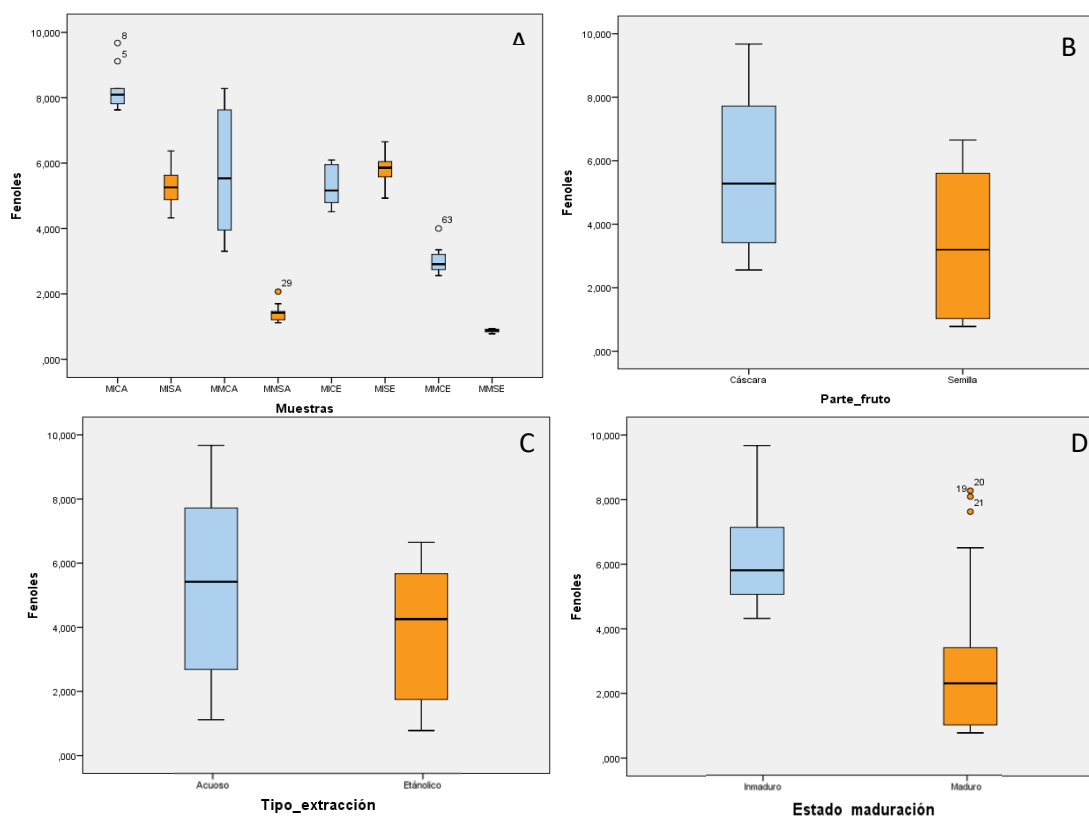


Nota. Elaboración propia.

Los resultados obtenidos de los fenoles totales presentes en los ocho extractos evaluados fueron comparados entre sí como se observa en la figura 2-A, presentando una variación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la mayoría de los grupos según la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis, de los cuales el extracto MICA (muestra inmadura-cáscara-acuosa), fue el que presentó una mayor concentración de fenoles totales con 8.26 mg GAE/g m.s., siendo esta diferencia significativa sobre todos los grupos a excepción del extracto MMCA (muestra madura-cáscara-acuosa), mientras que el extracto MMSE (muestra madura-semilla-etanólica) fue el que presentó la menor concentración de fenoles totales, con 0.87 mg GAE/g m.s., siendo esta diferencia significativa sobre todos los grupos, sin excepción.

Figura 2

Gráficos de cajas y bigotes de las concentraciones de fenoles totales de *C. ficifolia*



Nota. Las siglas presentes en el gráfico A corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara), A(acuoso) o E(etanólico). $n(A)=9$, $n(B)=36$, $n(C)=36$ y $n(D)=36$. Los grupos

enfrentados en los gráficos B, C y D presentaron diferencias significativas entre sus medianas, con un valor $p < 0.05$ según la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis.

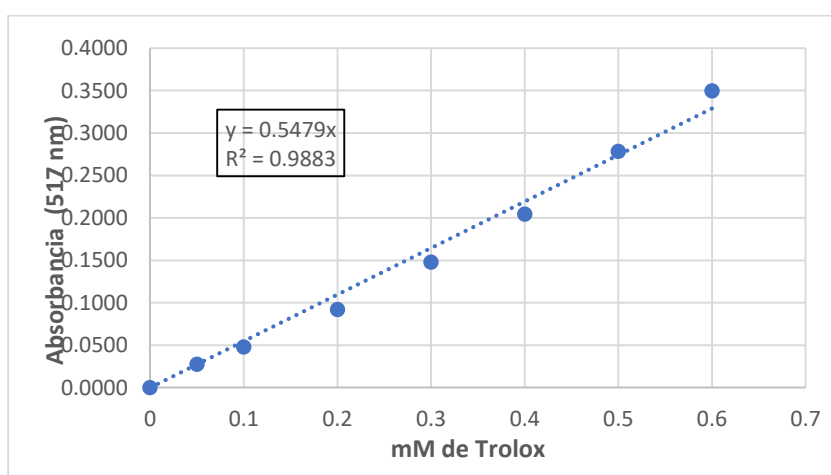
Además, se compararon las concentraciones de fenoles totales según las variables independientes evaluadas, entre ellas, la parte del fruto (figura 2-B), en la cual los extractos de cáscara (5.58 mg GAE/g m.s.) presentaron una mayor concentración que los de semilla (3.37 mg GAE/g m.s.); el tipo de extracción (figura 2-C), en la cual los extractos acuosos (5.19 mg GAE/g m.s.) presentaron una mayor concentración que los extractos etanólicos (3.75 mg GAE/g m.s.); y el estado de maduración del fruto (figura 2-D), en la cual los extractos de fruto inmaduro (6.17 mg GAE/g m.s.) presentaron una mayor concentración que los de fruto maduro (2.78 mg GAE/g m.s.),

4.3. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante y la concentración de antioxidantes de los extractos evaluados se calculó tomando como referencia la curva de calibración de Trolox presentada en la figura 3.

Figura 3

Curva de calibración de Trolox (mM) para la cuantificación de antioxidantes

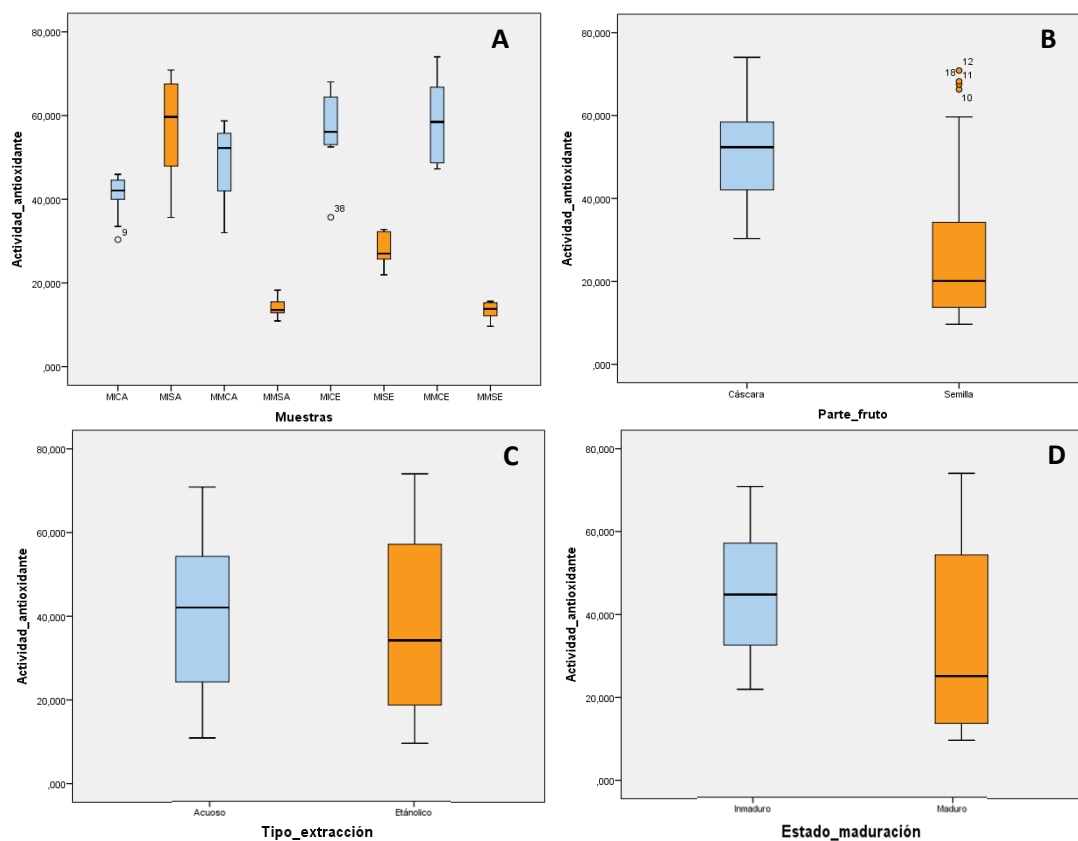


Nota. Elaboración propia.

La actividad antioxidante o porcentaje (%) de inhibición de DPPH presente en los extractos evaluados observados en la figura 4-A, mantuvo una variación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre varios de sus grupos según la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis, de los cuales el extracto MMCE (muestra madura-cáscara-etanólica), fue el que presentó una mayor actividad antioxidante, con 1.61 mgTE/g m.s. y un valor de 59.15%, siendo esta diferencia significativa sobre los otros grupos, a excepción del extracto MISA (muestra inmadura-semilla-acuosa), MICE (muestra inmadura-cáscara-etanólica) y MMCA (muestra madura-cáscara-acuosa), mientras que el extracto MMSE (muestra madura-semilla-etanólica) fue el que presentó la menor concentración de fenoles totales, con 0.41 mgTE/g m.s. y 13.50%, siendo esta diferencia significativa sobre los grupos, a excepción de MMSA (muestra madura-semilla-acuosa).

Figura 4

Gráfico de cajas y bigotes de los porcentajes de actividad antioxidante *C. ficifolia*



Nota. Las siglas presentes en el gráfico A corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara), A(acuoso) o E(etanólico). $n(A)=9$, $n(B)=36$, $n(C)=36$ y $n(D)=36$. Los grupos enfrentados en los gráficos B y D presentaron diferencias significativas entre sus medianas, con un valor $p < 0.05$, a diferencia del gráfico C, el cual presentó un $p=0.937$, esto según la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis.

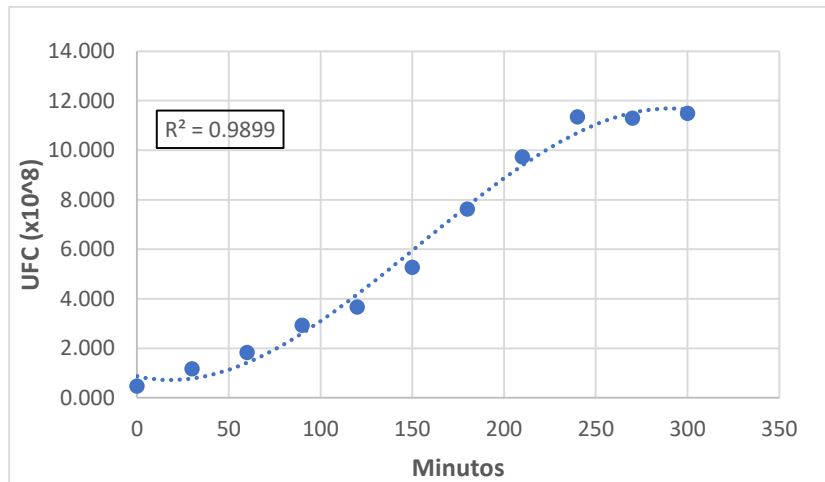
La actividad antioxidante también fue comparada según las variables independientes, entre ellas, la parte del fruto (figura 4-B), en la cual los extractos de cáscara (51.29%) presentaron un mayor porcentaje que los de semilla (28.29%), el estado de maduración del fruto (figura 4-D), en la cual los extractos de fruto inmaduro (45.72%) presentaron un mayor porcentaje que los de fruto maduro (33.85%), y el tipo de extracción (figura 4-C), en la cual los extractos acuosos (40.24%) presentaron un mayor porcentaje que los extractos etanólicos (39.33%), siendo esta última variable la que no presentó una diferencia estadística significativa.

4.4. Actividad antimicrobiana

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de *Cucurbita ficifolia*, se realizó previamente la curva de crecimiento de cada microorganismo, sirviendo estas como referencia para los diferentes ensayos (figura 5, 8, 11 y 14).

Figura 5

Curva de crecimiento de Escherichia coli (ATCC 35401)

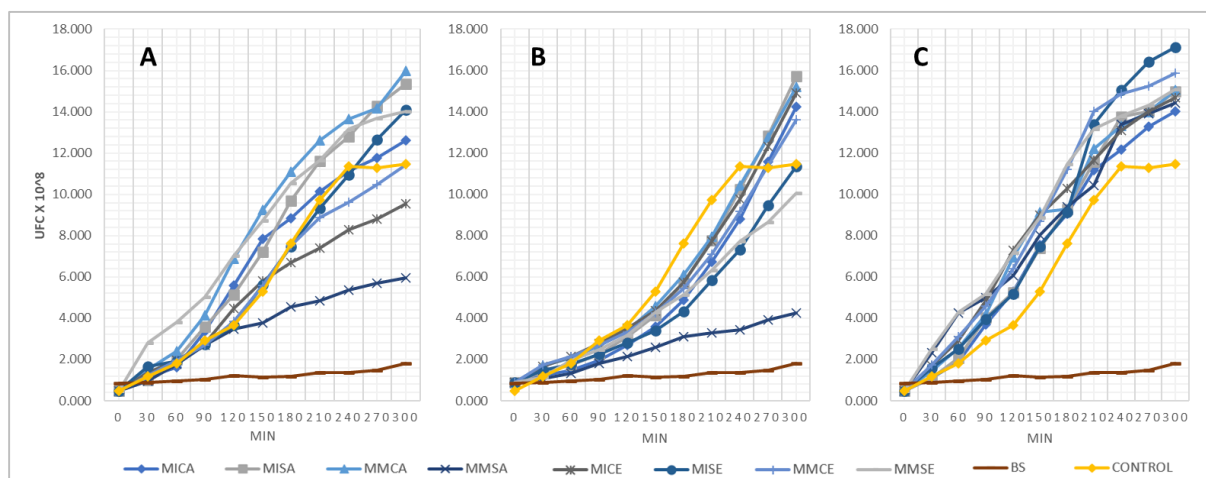


Nota. Elaboración propia.

Para la evaluación de los extractos se consideraron tres diferentes concentraciones, en el caso de *Escherichia coli*. Podemos observar en la figura 6 como estas variaciones influyen sobre el efecto de los extractos, siendo la muestra MMSA (muestra madura-semilla-acuosa), la cual produce una inhibición parcial tanto a 250 mg/ml como a 125 mg/ml de concentración. Mientras que para la menor concentración evaluada (62.5 mg/ml), ningún extracto redujo el crecimiento microbiano por debajo del control.

Figura 6

Crecimiento de E. coli (UFCx10⁸) frente a diferentes concentraciones de los extractos

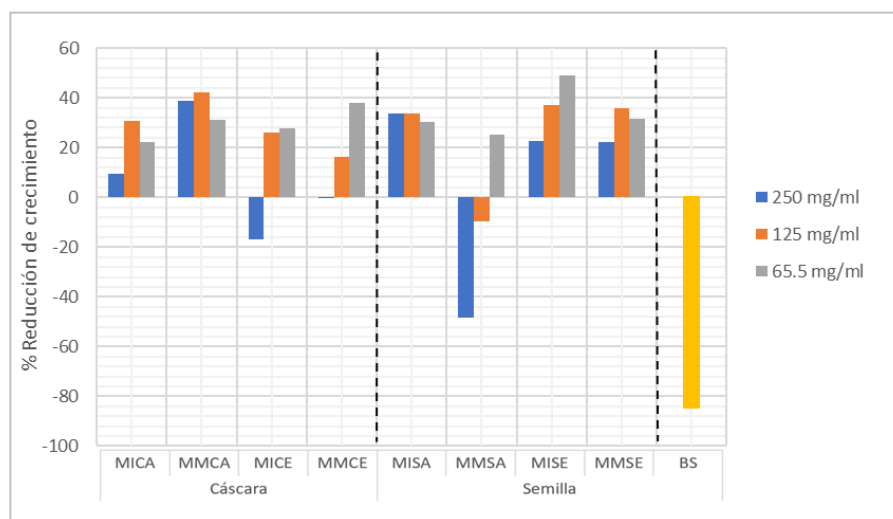


Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara), A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial). Los grupos del gráfico A = 250 mg/ml del extracto, B= 125 mg/ml del extracto y C= 62.5 mg/ml del extracto.

Los resultados de la actividad antimicrobiana se expresaron en porcentajes (Figura 7), resaltando como variable principal la parte del fruto, siendo el extracto MMSA el cual presentó una mayor inhibición sobre el crecimiento de la bacteria con un 48.16% de reducción frente al 84.36% producido por el conservante artificial Benzoato de sodio, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en base al análisis post hoc de Games Howell ($p < 0.05$).

Figura 7

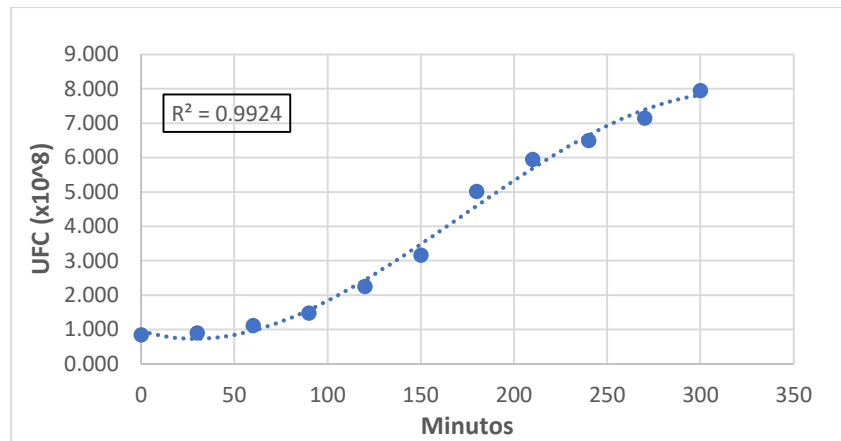
Porcentaje de reducción del crecimiento de Escherichia coli (ATCC 35401) frente a los extractos



Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara), A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial).

Figura 8

Curva de crecimiento de Bacillus subtilis (ATCC 6633)

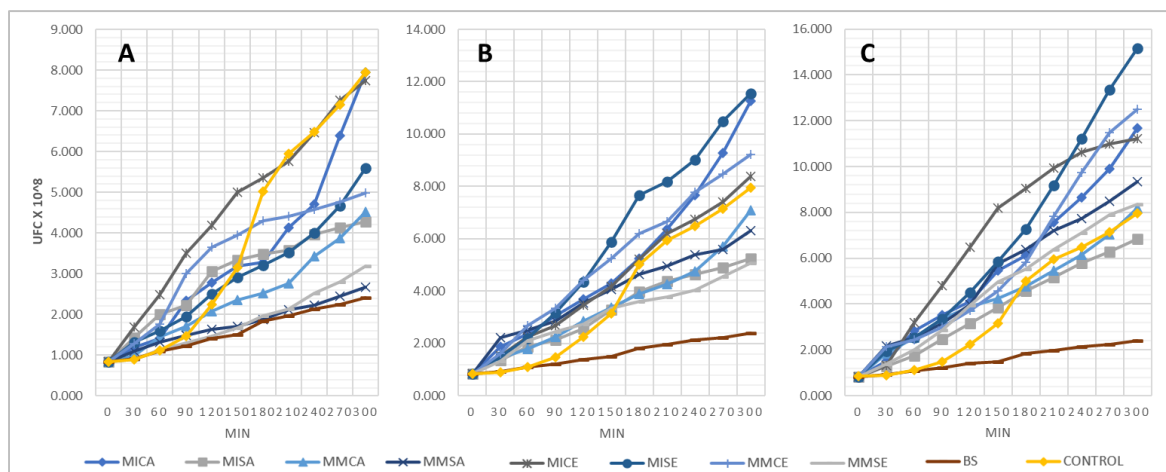


Nota. Elaboración propia.

Los extractos frente a *Bacillus subtilis* presentan un efecto inhibitorio parcial pero notorio a los 250 mg/ml de concentración, en contraste con el grupo control. Podemos observar en la figura 9 como estas variaciones influyen en sobre el efecto de los extractos, siendo la muestra MMSA (muestra madura-semilla-acuosa), la cual produce la mayor inhibición parcial a 250 mg/ml de concentración. Mientras que para la menor concentración 125 mg/ml y 62.5 mg/ml fue el MISA (muestra inmadura-semilla-acuosa), el cual presentó la mayor inhibición.

Figura 9

Crecimiento de *B. subtilis* (UFCx10⁸) frente a diferentes concentraciones de los extractos



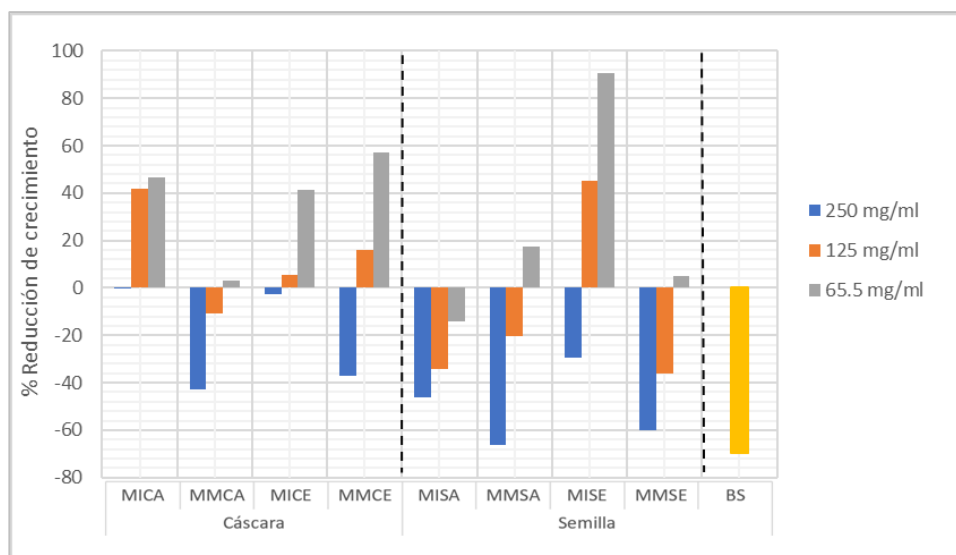
Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara),

A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial). Los grupos del gráfico A = 250 mg/ml del extracto, B= 125 mg/ml del extracto y C= 62.5 mg/ml del extracto.

El análisis post hoc llevado a cabo con el estadístico de Games Howell ($p < 0.05$) demostró que para la actividad antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis* en porcentajes (Figura 10) fue el extracto MMSA el que presentó una mayor inhibición sobre el crecimiento de la bacteria con un 66.32% de reducción frente al 69.61% producido por el conservante artificial.

Figura 10

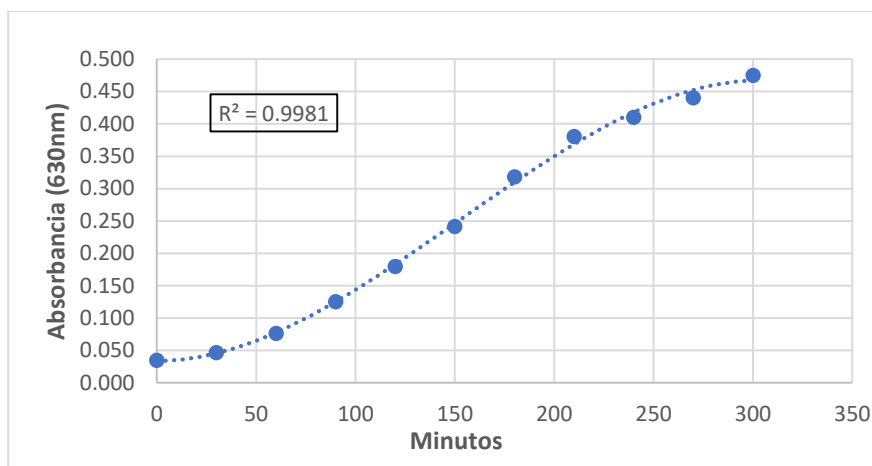
Porcentaje de reducción del crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) frente a los extractos



Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara), A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial).

Figura 11

Curva de crecimiento de *Klebsiella variicola* (Aislada de planta)

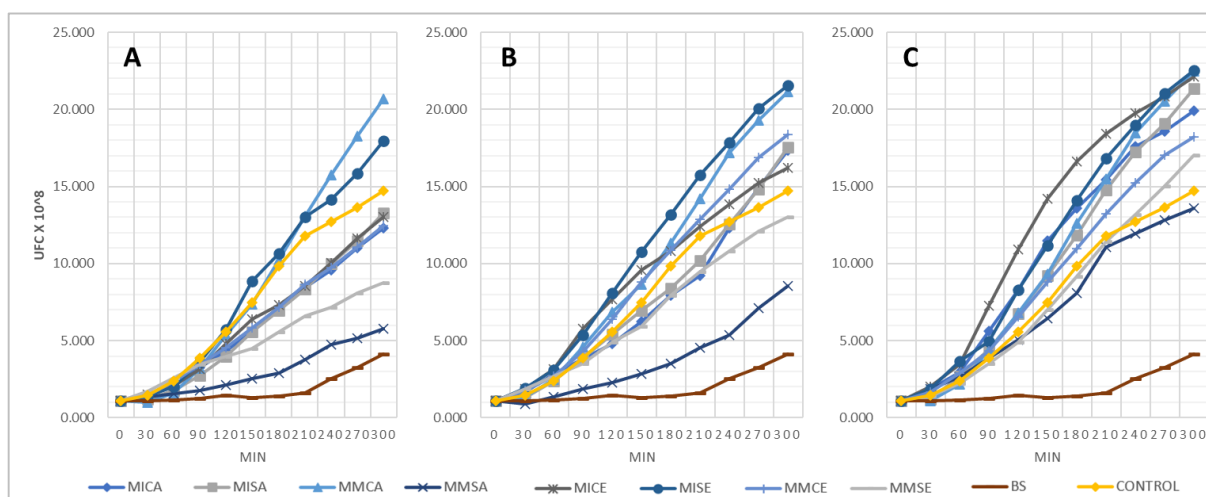


Nota. Elaboración propia.

Los extractos frente a *Klebsiella variicola* presentan un efecto inhibitorio parcial pero notorio a los 250 mg/ml de concentración, en contraste con el grupo control. Podemos observar en la figura 12, que fue la muestra MMSA (muestra madura-semilla-acuosa), la cual presentó la mayor inhibición parcial a 250 mg/ml, 125 mg/ml y 62.5 mg/ml de concentración, siendo el único extracto con efecto inhibitorio para la menor concentración.

Figura 12

Crecimiento de *K. variicola* (UFCx10⁸) frente a diferentes concentraciones de los extractos

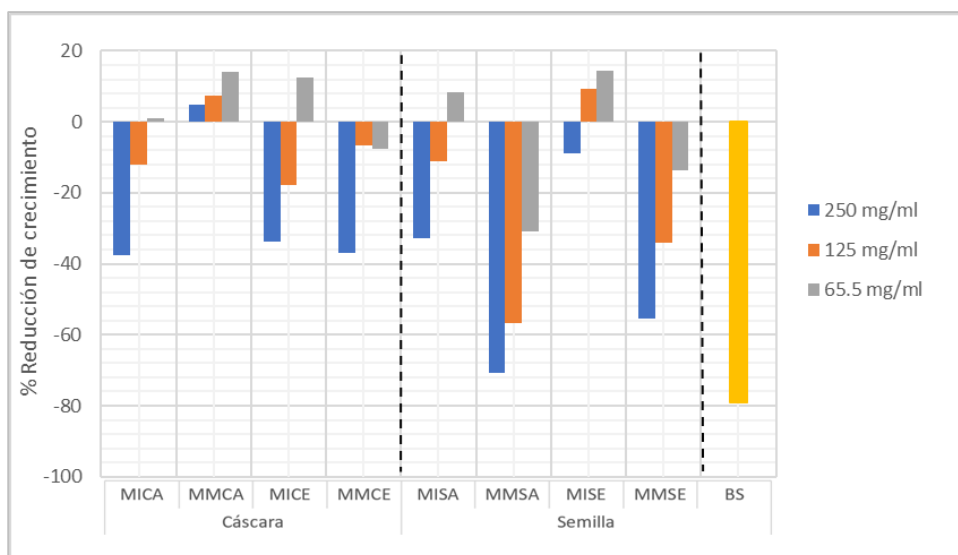


Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara),

A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial). Los grupos del gráfico A = 250 mg/ml del extracto, B= 125 mg/ml del extracto y C= 65.5 mg/ml del extracto. El análisis post hoc llevado a cabo con el estadístico de Games Howell ($p < 0.05$) demostró que para la actividad antimicrobiana sobre *Klebsiella variicola* en porcentajes (Figura 13) fue el extracto MMSA el que presentó una mayor inhibición sobre el crecimiento de la bacteria con un 70.78% de reducción frente al 79.1% producido por el conservante artificial.

Figura 13

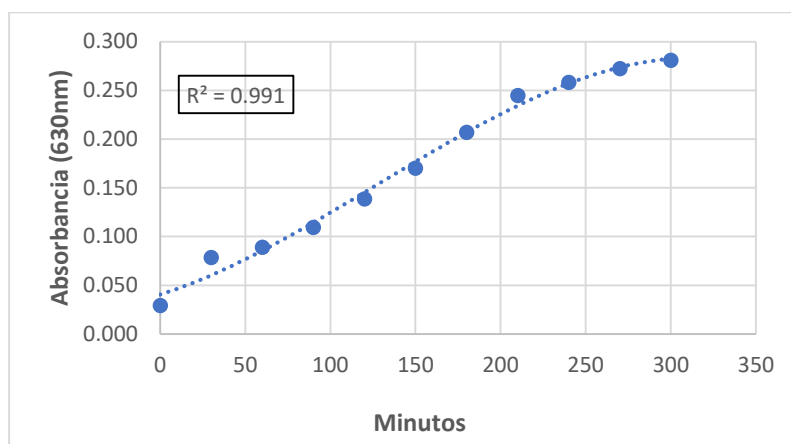
Porcentaje de reducción del crecimiento de Klebsiella variicola (Aislada de planta) frente a los extractos



Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara), A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial).

Figura 14

Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 18824)

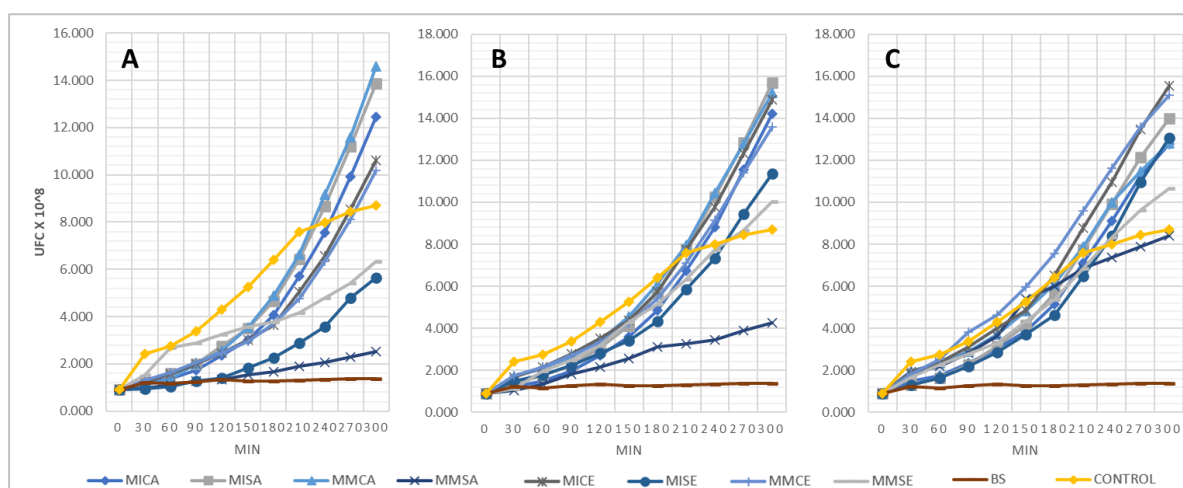


Nota. Elaboración propia.

Los extractos frente a *Saccharomyces cerevisiae* presentan un efecto inhibitorio parcial pero notorio a los 250 mg/ml de concentración, en contraste con el grupo control. Podemos observar en la figura 15, que fue la muestra MMSA (muestra madura-semilla-acuosa), la cual presentó la mayor inhibición parcial a 250 mg/ml, 125 mg/ml y 62.5 mg/ml de concentración, siendo el único extracto con efecto inhibitorio para la menor concentración.

Figura 15

Crecimiento de *S. cerevisiae* (UFCx10⁸) frente a diferentes concentraciones de los extractos



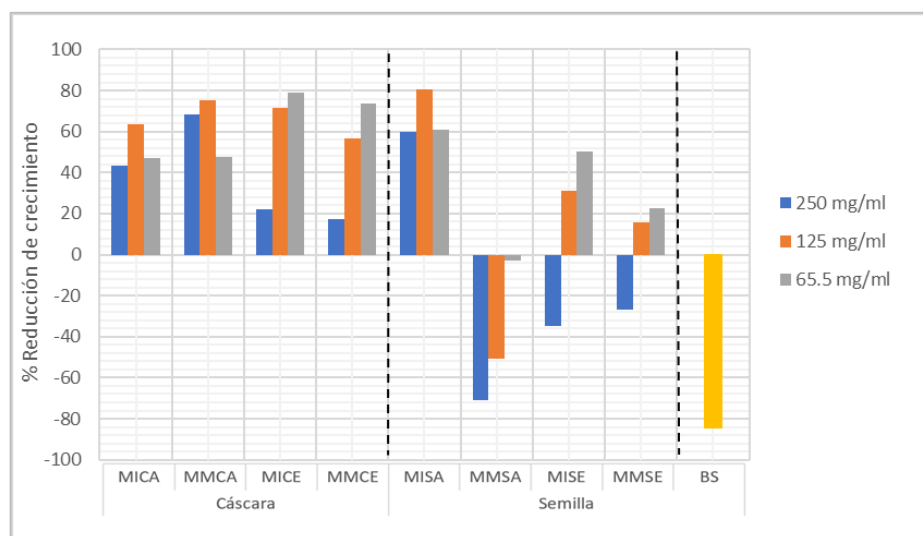
Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara),

A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial). Los grupos del gráfico A = 250 mg/ml del extracto, B= 125 mg/ml del extracto y C= 65.5 mg/ml del extracto.

El análisis post hoc llevado a cabo con el estadístico de Games Howell ($p < 0.05$) demostró que para la actividad antimicrobiana sobre *Saccharomyces cerevisiae* en porcentajes (Figura 16) fue el extracto MMSA el que presentó una mayor inhibición sobre el crecimiento de la levadura con un 70.98% de reducción de frente al 83.97% producido por el conservante artificial.

Figura 16

Porcentaje de reducción del crecimiento de Saccharomyces cerevisiae (ATCC 18824) frente a los extractos



Nota. Las siglas presentes corresponden al estado de maduración-parte del fruto-tipo de extracción: MI (muestra inmadura) o MM (muestra madura), S(semilla) o C(cáscara), A(acuoso) o E(etanólico). BS: Benzoato de sodio (conservante artificial).

Se correlacionaron los datos de concentración de fenoles, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de las muestras de cáscara y de las muestras de semilla, por el estadístico de Rho de Spearman, esto dado a que los datos presentaban distribución no paramétrica

En base a los datos de las muestras de cáscara (tabla 3), se observó que entre concentración de fenoles y actividad antioxidante existió una correlación de tipo negativa alta (-0.677), y que entre concentración de fenoles y actividad antimicrobiana de *S. cerevisiae* (0.455) y *B. subtilis* (0.349), la correlación fue de tipo positiva media y baja, respectivamente; mientras que entre concentración de fenoles y actividad antimicrobiana de *E. coli* y *K. variicola* no existió una correlación estadísticamente significativa. Por su parte, la correlación entre actividad antioxidante y actividad antimicrobiana solo fue significativa para *E. coli* (-0.341), siendo esta de tipo negativa baja.

Tabla 3

Correlación de variables para las muestras de cáscara según el estadístico Rho de Spearman

	Fenoles	Actividad antioxidante	Actividad antimicrobiana				
			EC	SC	BS	KV	
Fenoles	1	-0.677**	0.125	0.455**	0.349*	-0.022	
Actividad antioxidante	-0.677**	1	-0.341*	-0.146	-0.065	0.135	
Actividad antimicrobiana	EC	0.125	-0.341*	1	0.536**	-0.539**	0.678**
	SC	0.455**	-0.146	0.536**	1	-0.226	0.528**
	BS	0.349*	-0.065	-0.539**	-0.226	1	-0.615**
	KV	-0.022	0.135	0.678**	0.528**	-0.615**	1

Nota. (**): la correlación es significativa al nivel 0.01. (*): la correlación es significativa a nivel 0.05. Número de muestras (n) = 36. EC: *E. coli*, SC: *S. cerevisiae*, BS: *B. subtilis* y KV: *K. variicola*.

En base a los datos de las muestras de semilla (tabla 4), se observó que entre concentración de fenoles y actividad antioxidante existió una correlación de tipo positiva alta (0.684), y que entre concentración de fenoles y actividad antimicrobiana de *B. subtilis* (0.722) y *K. variicola* (0.679), la correlación fue de tipo positiva alta; mientras que entre concentración de fenoles y actividad antimicrobiana de *E. coli* y *S. cerevisiae*, no existió una correlación estadísticamente significativa. Por su parte, la correlación entre actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de *E. coli* (0.441) fue de tipo positiva media; mientras que la

correlación entre actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de *S. cerevisiae* (0.620), *B. subtilis* (0.611) y *K. variicola* (0.641), fue de tipo positiva alta.

Tabla 4

Correlación de variables para las muestras de semilla según el estadístico Rho de Spearman

	Fenoles	Actividad antioxidante	Actividad antimicrobiana				
			EC	SC	BS	KV	
Fenoles	1	0.684**	0.232	0.207	0.722**	0.679**	
Actividad antioxidante	0.684**	1	0.441**	0.620**	0.611**	0.641**	
Actividad antimicrobiana	EC	0.232	0.441**	1	0.627**	0.548**	0.525**
	SC	0.207	0.620**	0.627**	1	0.517**	0.510**
	BS	0.722**	0.611**	0.548**	0.517**	1	0.896**
	KV	0.679**	0.641**	0.525**	0.510**	0.896**	1

Nota. (**):la correlación es significativa al nivel 0.01. Número de muestras (n) = 36. EC: *E. coli*, SC: *S. cerevisiae*, BS: *B. subtilis* y KV: *K. variicola*.

V. DISCUSIONES

La concentración de fenoles totales promedio presente en las muestras de cáscara (5.58 mg GAE/g m.s.) del fruto de *Cucurbita ficifolia* Bouché fue mayor de manera significativa a la presente en las semillas (3.37 mg GAE/g m.s). Esto guarda relación con lo mencionado en los estudios de Leichtweis et al. (2022) y Ali & Naz (2017). En estos estudios se investigó *Cucurbita maxima* y *Cucurbita pepo*, respectivamente. En ambos casos, se encontró que las muestras de cáscara del fruto contenían una concentración significativamente mayor de fenoles en comparación con otras partes del fruto, como la fibra, la pulpa y las semillas.

Este hecho podría deberse a que los fenoles totales son modulados en gran parte por situaciones de estrés ambiental (Šamec et al., 2021). En el caso de los frutos, las altas dosis de radiación (factor abiótico) o el daño provocado por los insectos plaga o microorganismos patógenos (factor biótico) inducen un incremento de estos compuestos, mayor en la cáscara que en otras partes del fruto, dado que esta es la capa más externa y de mayor exposición ambiental (Faller & Fialho, 2010). También debemos considerar que estas plantas crecen generalmente de manera espontánea en las chacras por lo que no cuentan con los cuidados propios de un cultivo y son más propensas a un mayor estrés ambiental durante su desarrollo.

Sin embargo, es importante señalar que existen estudios contradictorios con relación a este tema. Por ejemplo, Mala & Kurian (2016) no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de fenoles totales entre la cáscara y la pulpa de ciertas especies de cucúrbitas de la India. Por otro lado, Hussain et al. (2021b) observaron que otras partes del fruto de *C. maxima*, como las semillas y la pulpa, tenían concentraciones de fenoles totales más altas en comparación con la cáscara.

Por su parte, también se encontró que las muestras de extracción acuosa y de frutos inmaduros tenían una mayor concentración de fenoles en comparación con las extraídas en solvente etanólico y de frutos maduros. El extracto MICA (muestra inmadura-cáscara-acuosa)

presentó la concentración promedio más alta de fenoles totales, con 8.26 mg GAE/g m.s. Este resultado coincide con lo observado por Oloyede et al. (2012) y Kubola & Siriamornpun (2011), quienes encontraron que los frutos inmaduros de *C. pepo* y *Momordica cochinchinensis* (cucurbitácea), respectivamente, tenían una mayor concentración de fenoles totales en comparación con los frutos maduros. Esto también se alinea con el estudio de Akhter et al. (2022), que observó una mayor concentración de fenoles totales en el extracto acuoso de cáscara en comparación con las semillas y la pulpa de *Cucurbita moschata*.

En cuanto a la actividad antioxidante, se observó que la cáscara del fruto de *C. ficifolia* (51.29%) exhibió una actividad antioxidante promedio más alta que las semillas (28.29%). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Abdullahi & Santhose (2018), quienes encontraron que la cáscara de frutos de *C. pepo*, originarios de la India, tenía una mayor actividad antioxidante, en comparación con la pulpa y las semillas. Saavedra et al. (2015) también obtuvieron un alto porcentaje de inhibición de DPPH en la cáscara de frutos de *C. pepo* originarios Portugal, en contraste con lo observado en las semillas.

Estas diferencias en la actividad antioxidante entre las partes de las cucúrbitas pueden atribuirse al papel de los antioxidantes en la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS), también conocidas como radicales libres, generadas debido al estrés oxidativo en las plantas (Martínez et al., 2021). En el género *Cucurbita*, los antioxidantes no enzimáticos, como los polifenoles, carotenoides y fitoesteroles, son los principales responsables de esta actividad, y al igual que estos, el incremento en la concentración de antioxidantes y su actividad en la cáscara en comparación con las semillas puede explicarse por un mayor daño oxidativo experimentado en la cáscara (Salehi et al., 2021).

Además, se observó que las muestras de frutos inmaduros presentaron una mayor actividad antioxidante en comparación con las muestras de frutos maduros, mientras que la diferencia de esta actividad entre las muestras acuosas y etanólicas no fue estadísticamente

significativa. El extracto MMCE (muestra inmadura-cáscara-etanólica) presentó el porcentaje promedio más alto de actividad antioxidante, con un 56.58% de inhibición de DPPH. Esta reducción en la actividad antioxidante asociada con la maduración del fruto podría explicarse por el hecho de que *C. ficifolia* es un fruto de tipo no climatérico (Moya-Hernández et al., 2020). Esto significa que produce etileno en baja concentración, una hormona de maduración que reduce la respiración celular durante la maduración y, como resultado, la síntesis de antioxidantes se reduce (Mejía-Reyes et al., 2022).

En relación a la actividad antimicrobiana, las muestras de cáscara, y en mayor medida las de semilla, mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias evaluadas, siendo la muestra MMSA (muestra madura-semilla-acuosa), la que produjo una mayor respuesta de inhibición frente a *E.coli* (48.16%), *B. subtilis* (66.32%) y *K. variicola* (70.78%). Es muy común que, en este tipo de estudios, la actividad antimicrobiana sea mayor en bacterias Gram positivas, siendo esta susceptibilidad atribuida a la falta de una membrana fosfolipídica externa, que, en el caso de las Gram negativas, representa una barrera eficaz contra los antimicrobianos (El Zawane et al., 2014). Sin embargo, en el presente estudio la actividad antibacteriana se da independiente a esta clasificación, ya que fue *K. variicola*, una Gram negativa, la que presentó la mayor reducción de crecimiento.

Para el caso de la levadura *S. cerevisiae*, el efecto inhibitorio de crecimiento solo se dio por las muestras de semilla, siendo la muestra MMSA (muestra madura-semilla-acuosa), la cual produjo el mayor efecto con un 70.98%, siendo este incluso mayor a lo observado en las bacterias evaluadas. Esto guarda relación con lo descrito por Silva et al. (2020), quienes mencionan que los extractos acuosos tanto de hojas como de semillas si presentan actividad antifúngica considerable contra levaduras, incluyendo especies como *Candida albicans* y *Candida krusei*.

Es importante destacar que, aunque la inhibición observada en la cinética de crecimiento puede ser parcial, muchos de los extractos evaluados lograron reducir la velocidad de crecimiento de los microorganismos a niveles comparables a los del conservante artificial. Esto se evidenció claramente en el caso de *B. subtilis*, donde la actividad antimicrobiana alcanzó un 66.32% de reducción de crecimiento, frente al 69.61% producido por el Benzoato de sodio.

Por otro lado, es interesante observar que algunos extractos parecieron tener un efecto estimulante en el crecimiento de los microorganismos. Estas variaciones coinciden con un estudio realizado por Hussain et al. (2022), en el que se sugiere que ciertos componentes de la muestra, como los polisacáridos pécticos presentes en la cáscara, podrían promover el crecimiento de ciertas bacterias, especialmente las Gram positivas, en lugar de inhibirlas.

Respecto a la correlación entre la concentración de fenoles y la actividad antioxidante, se observa una relación inversa en las muestras de cáscara y una relación directa en el caso de las semillas. Esto se debe a que los fenoles son solo una parte de los componentes presentes en las muestras, y varios compuestos no considerados en este estudio podrían contribuir a la actividad antioxidante. Además de los antioxidantes enzimáticos, estudios anteriores han demostrado que metabolitos primarios y secundarios como proteínas, azúcares reductores, carotenoides, carbohidratos y vitaminas C y E también pueden influir significativamente en la actividad antioxidante (Salehi et al., 2021; Gawel-Bęben et al., 2022).

En cuanto a la correlación de la actividad antimicrobiana en las muestras de cáscara, con la concentración de fenoles y la actividad antioxidante, esta fue de tipo muy débil en los casos en que se encontró significativa. Por otro lado, en las muestras de semilla frente a la concentración de fenoles presentó una correlación positiva y alta solo para *B. subtilis* y *K. variicola*, mientras que, frente a la actividad antioxidante, presentó una correlación positiva y alta para todos los microorganismos, excepto en *E. coli*, donde la correlación fue moderada.

Numerosos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos y los flavonoides, en conjunto y de manera específica, presentes en subproductos de la calabaza como las semillas y la cáscara, pueden inducir la presencia de radicales libres dentro de los microorganismos, lo que lleva al daño oxidativo y la posterior reducción de su crecimiento (Mansour et al., 2023).

VI. CONCLUSIONES

La concentración de fenoles totales fue mayor en las muestras de extracto acuoso de cáscara de frutos en estado inmaduro con un promedio de 8.26 mg GAE/g m.s.

La actividad antioxidante fue mayor en las muestras de cáscara de frutos en estado inmaduro con un promedio de 56.58% de inhibición de DPPH, sin diferencia significativa entre el extracto acuoso y el etanólico.

La actividad antimicrobiana fue mayor en las muestras de extracto acuoso de semilla de frutos en estado maduro para todos los microorganismos, con el mayor promedio de 70.98% de reducción para *S. cerevisiae*.

La actividad antioxidante y la concentración de fenoles presentan una correlación de tipo inversa para las muestras de cáscara, y una de tipo directa para las muestras de semilla.

La actividad antimicrobiana y la concentración de fenoles presentan una correlación estadísticamente significativa solo para las muestras de semilla, siendo de tipo alta positiva frente a *B. subtilis* y *K. variicola*.

La actividad antimicrobiana y la actividad antioxidante presentan una correlación estadísticamente significativa solo para las muestras de semilla, siendo de tipo alta positiva para *B. subtilis*, *K. variicola* y *S. crevisiae*, y de tipo moderada positiva para *E. coli*.

VII. RECOMENDACIONES

Complementar las cuantificaciones de concentraciones de microorganismos con métodos de medición directos, como el recuento en placas con agar, para evaluar la viabilidad de microorganismos.

Realizar un perfil químico completo de las muestras, utilizando técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para poder correlacionar la actividad antimicrobiana a una mayor cantidad de compuestos como proteínas y azúcares reductores, incluidos antioxidantes y fenoles específicos.

Mantener un control y seguimiento sobre el tiempo de desarrollo de cada fruto, desde el inicio de la fructificación en la planta, para evaluar de manera más precisa el estado de maduración como variable.

VIII. REFERENCIAS

- Abdel-Rahim, A. A., Osman, S. A., Yasin, A. A., & Abdelraheem, Y. M. (2015). Antimicrobial Activity and Some Physiochemical Properties of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Gezira Journal of Engineering and Applied Sciences*, 10(1). <http://journals.uofg.edu.sd/index.php/gjeas/article/view/497>
- Abdullahi, I. I., & Santhosé, I. (2018). Comparative Analysis on Antioxidant and Antibacterial Activity of Pumpkin Wastes. *Journal of Antimicrobial Agents*, 04(03), 2–7. <https://doi.org/10.4172/2472-1212.1000180>
- Akhter, K., Bibi, A., Rasheed, A., Rehman, S., Shafique, U., & Habib, T. (2022) Indigenous vegetables of family Cucurbitaceae of Azad Kashmir: A key emphasis on their pharmacological potential. *PLoS ONE* 17(6): e0269444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269444>
- Ali, H., & Naz, N. (2017). Free radical scavenging activity of pulps and peels of some selected vegetables commonly used in Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 30(1). <https://www.cabi.org/gara/FullTextPDF/2017/20173377105.pdf>
- Aljuraifani, A. (2017). Impact of solvent types on antimicrobial activities of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) pulp extracts. *Asia Life Sciences*, 26(2), 229–235. https://www.researchgate.net/publication/315114430_Impact_of_solvent_types_on_antimicrobial_activities_of_pumpkin_Cucurbita_pepo_L_pulp_extracts
- Anand, S. P., & Sati, N. (2013). Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 4(7), 2496. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(7\).24960-01](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(7).24960-01)
- Asto, L. (2019). *Evaluación del contenido de fitoesteroles, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en la harina de semilla de calabaza (Cucurbita ficifolia)*. [Tesis de

- licenciatura, Universidad Nacional del Centro del Perú]. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional del Centro del Perú. <http://hdl.handle.net/20.500.12894/5177>
- Barrera, J., Hernández, H. S., Cañedo, V., Aréstegui, K., Torres, J., Parra, F., Torres, I., & Casas, A. (2020). Landrace diversity and local selection criteria of domesticated squashes and gourds (*Cucurbita*) in the Central Andean Mountain range of Peru: Tomayquichua, Huánuco. *Botanical Sciences*, 98(1), 101–116. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.2239>
- Bautista, R. (2020). *Análisis físico-químico y evaluación de compuestos bioactivos en extractos de chilacayote (Cucurbita ficifolia Bouché)*. [Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio]. Repositorio Institucional del Tecnológico Nacional de México. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/3680>
- Bondi, M., Lauková, A., de Niederhausern, S., Messi, P., & Papadopoulou, C. (2017). Natural preservatives to improve food quality and safety. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1090932>
- Bouarab, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457–1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Campêlo, M. C. S., Medeiros, J. M. S., & Silva, J. B. A. (2019). Natural products in food preservation. *International Food Research Journal*, 26(1), 41–46. [http://www.ifrj.upm.edu.my/26\(01\)2019/\(4\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/26(01)2019/(4).pdf)
- Carmilema, C., & Delgado, R. (2010). *Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajeno, malva olorosa)*. [Tesis de licenciatura, Universidad de Cuenca. Ecuador]. Repositorio institucional de la Universidad de Cuenca. Ecuador. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2421>

- Castillo, J. (2021). *Actividad biológica y composición química en extractos de Cucurbita ecuadorensis H.C. Cutler & Whitaker*. [Tesis de licenciatura, Universidad de Guayaquil]. Repositorio Institucional de la Universidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/44748>
- Daka, A. (2019). *A comparative phytochemical analysis and antimicrobial activity of three pumpkin species*. [Tesis de licenciatura, University Makerere]. Makerere University Institutional Repository. <http://hdl.handle.net/20.500.12281/7025>
- Dotto, J. M., & Chacha, J. S. (2020). The potential of pumpkin seeds as a functional food ingredient: A review: Biofunctional ingredients of pumpkin seeds. *Scientific African*, 10, e00575. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00575>
- El Zawane, Q., Helaluddin, A., Sirajudin, Z., & Chowdhury, A. (2014). Studies on bactericidal efficacy of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) peel. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(2), 146-153. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.201414J7>
- Faller, A. L. K., & Fialho, E. F. N. U. (2010). Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 561-568. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.01.003>
- Gawel-Beben, K., Czech, K., Strzpek-Gomółka, M., Czop, M., Szczepanik, M., Lichtarska, A., & Kukula-Koch, W. (2022). Assessment of *Cucurbita spp.* Peel Extracts as Potential Sources of Active Substances for Skin Care and Dermatology. *Molecules*, 27(21), 7618. <https://doi.org/10.3390/molecules27217618>
- Gutiérrez-del-Río, I., Fernández, J., & Lombó, F. (2018). Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(3), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.024>

- Hussain, A., Kausar, T., Din, A., Murtaza, A., Jamil, M. A., Noreen, S., & Iqbal, M. A. (2021a). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Peel, Flesh, and Seeds Powders. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 11(6), 42–51. <https://doi.org/10.7176/jbah/11-6-05>
- Hussain, A., Kausar, T., Din, A., Murtaza, M. A., Jamil, M. A., Noreen, S., Rehman, H., Shabbir, H., & Ramzan, M. A. (2021b). Determination of total phenolic, flavonoid, carotenoid, and mineral contents in peel, flesh, and seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(6), e15542. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15542>
- Hussain, A., Kausar, T., Sehar, S., Sarwar, A., Ashraf, A. H., Jamil, M. A., Noreen, S., Rafique, A., Iftikhar, K., Quddoos, M. Y., Aslam, J., & Majeed, M. A. (2022). A Comprehensive review of functional ingredients, especially bioactive compounds present in pumpkin peel, flesh and seeds, and their health benefits. *Food Chemistry Advances*, 1(July), 100067. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100067>
- Hosen, M., Rafii, M. Y., Mazlan, N., Jusoh, M., Oladosu, Y., Chowdhury, M. F. N., Muhammad, I., & Khan, M. M. H. (2021). Review pumpkin (*Cucurbita spp.*): A crop to mitigate food and nutritional challenges. *Horticulturae*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100352>
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127 (3), 1138–1145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.115>
- Leichtweis, M. G., Molina, A. K., Pires, T. C. S., Dias, M. I., Calhelha, R., Bachari, K., Ziani, B. E. C., Oliveira, M. B. P. P., Pereira, C., & Barros, L. (2022). Biological Activity of

- Pumpkin Byproducts: Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Molecules*, 27(23), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules27238366>
- Mala, K. S., & Kurian, A. E. (2016). Nutritional composition and antioxidant activity of pumpkin wastes. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 6(3), 336–344. <https://www.ijpcbs.com/articles/nutritional-composition-and-antioxidantactivity-of-pumpkin-wastes.pdf>
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., & Aksoy, H. (2012). Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes in vitro.-*Cytotechnology*,-64(5), 553-562 <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9434-5>
- Mansour, R. B., Falleh, H., Hammami, M., Barros, L., Petropoulos, S. A., Tarchoun, N., & Ksouri, R. (2023). The Use of Response Surface Methodology to Optimize Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Cucurbita maxima* Fruit By-Products. *Processes*, 11(6), 1726. <https://doi.org/10.3390/pr11061726>
- Martínez, C., Valenzuela, J. L., & Jamilena, M. (2021). Genetic and pre-and postharvest factors influencing the content of antioxidants in cucurbit crops. *Antioxidants*, 10(6), 894. <https://doi.org/10.3390/antiox10060894>
- Mejía-Reyes, J. D., García-Cabrera, K. E., Velázquez-Ovalle, G. & Vázquez-Ovando, A., (2022). Antioxidant capacity: concepts, quantification methods and use for tropical fruits and derived products characterization. *Revista Colombiana De Investigaciones Agroindustriales*, 9(1), 9–33. <https://doi.org/10.23850/24220582.4023>
- Ministerio del ambiente (MINAM). (2019). *Servicio de consultoría para la elaboración de la línea de base de la diversidad genética de la calabaza / zapallo: prospección de la diversidad, estudio socioeconómico, ecológico de organismos y microorganismos, flujo de genes y sistematización*. https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2020/02/ldb_calazap_5informe.pdf

- Ministerio del ambiente (MINAM). (2020). *Línea de base de la diversidad de la calabaza y el zapallo peruano con fines de bioseguridad*. https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2021/03/ldb_calabaza_zapallo.pdf
- Mohammadzadeh-Aghdash, H., Sohrabi, Y., Mohammadi, A., Shanehbandi, D., Dehghan, P., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2018). Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. *Food Chemistry*, 257, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.020>
- Mokhtar, M., Bouamar, S., Di Lorenzo, A., Temporini, C., Daglia, M., & Riazi, A. (2021). The influence of ripeness on the phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activities of pumpkins (*Cucurbita moschata* duchesne). *Molecules*, 26(12). <https://doi.org/10.3390/molecules26123623>
- Monte, S. M., Neusner, A., Chu, J., & Lawton, M. (2009). Epidemiological trends strongly suggest exposures as etiologic agents in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease, diabetes mellitus, and non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(3), 519-529. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1070>
- Moreno, G., Alba, J. E., Aquino, E. N., & Chávez, J. L. (2023). Phenolic compounds and antioxidant activity in *Cucurbita ficifolia* fruits, an underrated fruit. *Frontiers in Nutrition*, January, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1029826>
- Moya-Hernández, A., Bosquez-Molina, E., Verde-Calvo, J. R., Blancas-Flores, G., & Trejo-Aguilar, G. M. (2020). Hypoglycemic effect and bioactive compounds associated with the ripening stages of the *Cucurbita ficifolia* Bouché fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(14), 5171–5181. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10566>
- Novais, C., Molina, A. K., Abreu, R. M. V., Santo-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., & Barros, L. (2022). Natural Food Colorants and Preservatives: A Review, a Demand,

- and a Challenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9), 2789–2805.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07533>
- Oloyede, F. M., Agbaje, G. O., Obuotor, E. M., & Obisesan, I. O. (2012). Nutritional and antioxidant profiles of pumpkin (*Cucurbita pepo* Linn.) immature and mature fruits as influenced by NPK fertilizer. *Food chemistry*, 135(2), 460-463.
<https://doi.org/10.2298/HEMIND150219049Z>
- Olszewska, M. A., Gędas, A., & Simões, M. (2020). Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Research International*, 134(April), 109214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109214>
- Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-silleras, B., & Redondo-Del-río, M. P. (2019). Food safety through natural antimicrobials. *Antibiotics*, 8(4), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>
- Rezig, L., Chouaibi, M., Meddeb, W., Msaada, K., & Hamdi, S. (2019). Chemical composition and bioactive compounds of Cucurbitaceae seeds: Potential sources for new trends of plant oils. *Process Safety and Environmental Protection*, 127, 73–81.
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.05.005>
- Rosario, P. (2019). *Efecto protector de la almendra de semillas de Cucurbita ficifolia Bouché (calabaza blanca) en el daño hepático inducido por paracetamol en ratones* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio institucional de tesis y trabajos de Titulación de la UNMSM.
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/11459>
- Saavedra, M. J., Aires, A., Dias, C., Almeida, J. A., De Vasconcelos, M. C. B. M., Santos, P., & Rosa, E. A. (2015). Evaluation of the potential of squash pumpkin by-products (seeds and shell) as sources of antioxidant and bioactive compounds. *J Food Sci Technol* 52: 1008-1015. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1089-5>

- Salehi, B., Sharifi-rad, J., Capanoglu, E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., Jaffer, M., Giri, L., Suyal, R., Jugran, A., Calina, D., Docea, A. O., Kamiloglu, S., Kregiel, D., Antolak, H., Pawlikowska, E., Sen, S., Acharya, K., Bashiry, M.,... Cho, W. (2019a). Cucurbita Plants: From Farm to Industry. *Applied Sciences*, 10(10)(August), 1-21. <https://doi.org/10.3390/app9163387>
- Salehi, B., Capanoglu, E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., Jaffer, M., Giri, L., Suyal, R., Jugran, A. K., Calina, D., Docea, A. O., Kamiloglu, S., Kregiel, D., Antolak, H., Pawlikowska, E., Sen, S., Acharya, K., Selamoglu, Z., Sharifi-Rad, J.,... Capasso, R. (2019b). Cucurbits plants: A key emphasis to its pharmacological potential. *Molecules*, 24(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules24101854>
- Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Giri, L., Suyal, R., Jugran, A. K., Zam, W. (2021). Antioxidant potential of family Cucurbitaceae with special emphasis on Cucurbita genus: A key to alleviate oxidative stress-mediated disorders. *Phytotherapy Research*, 35(7), 3533–3557. <https://doi.org/10.1002/ptr.7045>
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, 10(1), 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>
- Silva, I. B. da, Sá, R. D., Moura, M. C. de, Coelho, L. C. B. B., & Randau, K. P. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activities of aqueous extracts of *Cucurbita pepo* L. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 19(2), 270. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v19i2.32895>
- Tadee, P., Chukiatsiri, K., Amornlerdpisan, D., Paserakung, A., & Kittiwat, N. (2020). Antimicrobial effect of Japanese pumpkin (*Cucurbita maxima*) extract on local bovine mastitis pathogen. *Veterinary Integrative Sciences*, 19(2), 121–131. <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/vis/article/view/241209>

Ueda, J. M., Pedrosa, M. C., Heleno, S. A., Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2022). Food Additives from Fruit and Vegetable By-Products and Bio-Residues: A Comprehensive Review Focused on Sustainability. *Sustainability (Switzerland)*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/su14095212>

IX. ANEXOS**Anexo A**

Permiso del dueño de la chacra para el muestreo de los frutos de Cucurbita ficifolia.

PERMISO PARA EL MUESTREO DE FRUTOS DE *Cucurbita ficifolia*

Yo, Daysi Diana Cántaro García, identificada con DNI 73325048 propietaria de una chacra ubicada en el distrito de Carhuaz, provincia de Carhuaz, departamento de Ancash, mediante el presente documento autorizo la extracción de muestras de frutos de *Cucurbita ficifolia* presentes en el área de mi propiedad, a Alejandrina Mirella Zavaleta Rengifo con DNI 71267964, para la realización y desarrollo de su proyecto de investigación y tesis sobre esta planta, con el compromiso de informarnos acerca de los resultados obtenidos.

En señal de conformidad con lo anteriormente mencionado procedo a firmar la presente.



Firma del propietario
Daysi Diana Cántaro García
DNI 73325048

Carhuaz, 01 de febrero del 2023

Anexo B

Constancia de la identificación de la especie *Cucurbita ficifolia* Bouché.



CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN

HERBARIO UFV

Carta N° 016-2023-VIRTUAL HERBARIO UFV

El Agustino, 25 de febrero del 2023

Mg.
Ana Isabel Flor Gutierrez Roman

Con un atento saludo me dirijo a usted para comunicarle que el espécimen es una planta de tallo postrado, trepadora con zarcillos foliares, hojas palmatinervias, de limbo hendido sin bordes enteros. Flores amarillas ampliamente campanuladas y de fruto pepónide, superior a los 15cm de largo, de color verde con líneas y máculas blancas. Por lo que sus características corresponden con la especie *Cucurbita ficifolia* Bouché de la familia Cucurbitaceae.

Actualmente la distribución nativa de esta especie es de Perú a Bolivia. Es anual y crece principalmente en el bioma subtropical. Se utiliza como alimento para animales y como medicina.

Sin otro particular, se adjuntan las firmas y sellos correspondientes.

Atentamente,








Mg. María Isabel La Torre Acuy
Jefa del Herbario UFV
CPB05738

Lic. Juan Felipe Montenegro Vargas
Consultor voluntario del Herbario UFV

Jirón Río Chepén S/N - El Agustino | herbarioufv@gmail.com | 981 051 064-997 956 388

Anexo C

Muestras maduras e inmaduras del fruto de Cucurbita ficifolia Bouché y su procesamiento durante la etapa experimental.

