



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES PRESENTES EN LA PULPA DE
Cucurbita ficifolia BOUCHÉ EN ESTADO MADURO E INMADURO

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para título profesional de Licenciado en Biología

Autora:

Palomino Reyes, Diana Yasmin

Asesora:

Gutiérrez Román, Ana Isabel
(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Jurado:

Saez Flores, Gloria María
Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio
Riveros Ramirez, Maribel Denise

Lima - Perú

2023



ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES PRESENTES EN LA PULPA DE Cucurbita ficifolia BOUCHÉ EN ESTADO MADURO E INMADURO

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
2	Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru Trabajo del estudiante	1%
3	es.scribd.com Fuente de Internet	1%
4	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
5	patents.google.com Fuente de Internet	1%
6	vdocumento.com Fuente de Internet	<1%
7	issuu.com Fuente de Internet	<1%
8	ri-ng.uaq.mx Fuente de Internet	<1%



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES PRESENTES EN LA PULPA DE

Cucurbita ficifolia BOUCHÉ EN ESTADO MADURO E INMADURO

Línea de investigación:

Genética, Bioquímica y Biotecnología

Tesis para título profesional de Licenciado en Biología.

Autor(a):

Palomino Reyes, Diana Y.

Asesor(a):

Gutiérrez Román, Ana I. F

ORCID: 0000-0002-7020-7387

Jurado:

Saez Flores, Gloria María

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

Riveros Ramirez, Maribel Denise

Lima – Perú

2023

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Descripción y formulación del problema.....	6
1.1.1. Pregunta de investigación general.....	7
1.1.2. Preguntas de investigación específicas	7
1.2. Antecedentes	7
1.3. Objetivos.....	9
1.3.1. Objetivo general.....	9
1.3.2. Objetivos específicos	10
1.4. Justificación	10
1.5. Hipótesis	11
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché.....	12
2.1.1. Clasificación taxonómica.....	12
2.1.2. Origen y distribución	13
2.2. Antioxidantes y su importancia.....	13
2.2.1. Especies reactivas de oxígeno (EROs).....	14
2.2.2. Antioxidantes enzimáticos	14
III. MÉTODO	15
3.1. Tipo de investigación.....	15
3.2. Ámbito temporal y espacial	15
3.3. Variables	15
3.3.1. Variables independientes	15
3.3.2. Variables dependientes	16
3.4. Población y muestra.....	16
3.5. Instrumentos.....	16
3.5.1. Equipos	17
3.5.2. Materiales.....	17
3.5.2.1. Biológicos.	17
3.5.2.2. Vidrio	17

3.5.2.3.	Plástico.....	17
3.5.3.	Reactivos.....	17
3.6.	Procedimientos.....	18
3.6.1.	Obtención de las muestras	18
3.6.2.	Identificación taxonómica.....	18
3.6.3.	Preparación de las muestras	18
3.6.3.1.	Extracto etanólico	19
3.6.3.2.	Extracto acuoso.....	19
3.6.4.	Cuantificación de polifenoles totales.....	19
3.6.5.	Actividad antioxidante por el método DPPH.....	19
3.6.6.	Cuantificación de proteínas totales	20
3.6.7.	Evaluación enzimática	20
3.6.7.1.	Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	20
3.6.7.2.	Actividad de catalasa (CAT).....	21
3.6.7.3.	Actividad de peroxidasa (POD)	22
3.6.7.4.	Glutación sulfhidril transferasa (GST)	23
3.7.	Análisis de datos	23
3.8.	Consideraciones éticas	23
IV.	RESULTADOS.....	24
4.1.	Parámetros físicos de <i>Cucurbita ficifolia</i>	24
4.2.	Polifenoles totales	24
4.3.	Actividad antioxidante por el método DPPH.....	25
4.4.	Concentración de proteínas.....	26
4.5.	Evaluación enzimática	27
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
VI.	CONCLUSIONES	38
VII.	RECOMENDACIONES	39
VIII.	REFERENCIAS.....	40
IX.	ANEXOS	48

RESUMEN

Las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y glutatión sulfhidril transferasa (GST) se encuentran formando parte de los alimentos y contrarrestan los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobre las funciones metabólicas normales de los seres vivos. **Objetivo:** Debido a su importancia, este trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad antioxidante enzimática que presenta la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* y la concentración de polifenoles totales. **Método:** La metodología utilizada para medir la actividad antioxidante enzimática fue distinta para cada enzima realizando una extracción en frío con diferentes buffers; y mezclas de reacción con diferentes sustratos, las unidades en las que se expresaron las actividades enzimáticas de SOD, CAT y POD fueron U/g PF mientras que GST se expresó en % y los polifenoles en mg GAE/g PS. **Resultados:** Obteniendo como resultado para SOD maduro 81.08 e inmaduro 170.51; para CAT maduro 32.2 e inmaduro 118.56, para POX maduro 6.92 e inmaduro 15.53, todas en U/g PF y para la GST se obtuvo 14.34% para maduro y 77.54% para el fruto inmaduro; para los polifenoles totales se obtuvo 25.88 para el fruto maduro y 11.48 mg GAE/g PS para el fruto inmaduro. **Conclusiones:** Concluyendo que la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* presentan actividad antioxidante enzimática; además, que la pulpa del fruto inmaduro presenta una mayor actividad antioxidante enzimática y menor concentración de polifenoles totales frente a la pulpa del fruto maduro.

Palabras clave: *Cucurbita ficifolia*, calabaza, antioxidantes enzimáticos, polifenoles totales, fruto maduro e inmaduro

ABSTRACT

Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and glutathione sulfhydryl transferase (GST) are found in foods and counteract the adverse effects of reactive oxygen species (ROS) on the normal metabolic functions of living beings. **Aim:** Due to its importance, this work aims to evaluate the enzymatic antioxidant activity of the pulp of ripe and unripe fruit of *Cucurbita ficifolia* and the concentration of total polyphenols. **Method:** The methodology used to measure the enzymatic antioxidant activity was different for each enzyme performing a cold extraction with different buffers and reaction mixtures with different substrates, the units in which the enzymatic activities of SOD, CAT and POD were expressed were U/g PF while GST was expressed in % and polyphenols in mg GAE/g PS. **Results:** The results for mature SOD were 81.08 and immature 170.51; for mature CAT 32.2 and immature 118.56, for mature POX 6.92 and immature 15.53, all in U/g PF and for GST 14.34% was obtained for mature and 77.54% for immature fruit; for total polyphenols 25.88 was obtained for mature fruit and 11.48 mg GAE/g PS for immature fruit. **Conclusions:** It is concluded that the pulp of ripe and unripe fruit of *Cucurbita ficifolia* have enzymatic antioxidant activity and that the pulp of the unripe fruit has a higher enzymatic antioxidant activity and a lower concentration of total polyphenols than the pulp of the ripe fruit.

Key words: *Cucurbita ficifolia*, pumpkin, enzymatic antioxidants, total polyphenols, ripe and unripe fruit.

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y vegetales tienen un rol fundamental en la salud de las personas, siendo beneficiosos por la presencia de sustancias antioxidantes, los cuales están asociados a la relación entre daño de los tejidos y liberación de radicales libres (Rodrigues *et al.*, 2003). Los antioxidantes, producidos naturalmente y absorbidos por la dieta, son los encargados de contrarrestar los radicales libres que se encuentran en exceso dentro del organismo, un desequilibrio de estos componentes puede causar enfermedades cardiovasculares, tumores, entre otros (De Araújo *et al.*, 2010). *Cucurbita ficifolia* comúnmente llamada calabaza es una planta que posee una alta capacidad antioxidante no enzimática en la pulpa del fruto (Asto y Yabar, 2019), además se les ha atribuido diferentes propiedades medicinales por parte de la población a distintas partes de la planta, lo que incentiva su investigación a nivel enzimático.

1.1. Descripción y formulación del problema

Cucurbita ficifolia es una planta que crece principalmente en las zonas interandinas del Perú, en la región de Ancash. Esta especie crece comúnmente en chacras o alrededor de diversos cultivos (Hidalgo *et al.*, 2013); cuyo fruto (pulpa y semillas) es consumido en postres, sopas y segundos (Lim, 2012). Al fruto de *C. ficifolia* se le confiere diferentes propiedades tales como efecto hipoglicémico (pulpa), antiparasitario (semillas), antioxidante (pulpa y semillas), entre otros (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2020), sin embargo, no se tiene respaldo científico para todas ellas por lo que, con el paso del tiempo se está dejando de consumir, lo que conlleva al desinterés en preservarla generando paulatinamente la pérdida de la planta en la región.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas que presentan mayor reactividad química que el oxígeno y se forman en todos los organismos aeróbicos desempeñando diversas funciones (Serra *et al.*, 2020). Las especies reactivas son formadas naturalmente durante los

procesos metabólicos o pueden provenir de fuentes físicas y químicas exógenas, estas especies actúan como mediadores eliminando agentes agresivos por oxidación, sin embargo, altas concentraciones de ROS pueden causar daño celular y activar vías de señalización específicas (De Oliveira *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que el uso de antioxidantes sintéticos puede tener propiedades tóxicas a altas concentraciones, siendo relacionadas con daño hepático y carcinogénico en animales de laboratorio e inducir daño en el ADN teniendo la capacidad de ser iniciadores de cáncer (Serra *et al.*, 2020).

Sabiendo que *C. ficifolia* empíricamente tiene estas propiedades medicinales se pretende revalorar la especie mediante la investigación sistematizada acerca de la actividad antioxidante enzimática que posee en la pulpa en dos diferentes estados de maduración del fruto, determinado en función al tiempo establecido por el consumo de la población, e incentivar su cultivo y consumo de forma segura, por lo tanto, nos planteamos las siguientes preguntas:

1.1.1. Pregunta de investigación general

¿La pulpa del fruto de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presenta enzimas con actividad antioxidante?

1.1.2. Preguntas de investigación específicas

¿En qué estado de maduración del fruto de *Cucurbita ficifolia* Bouché, la pulpa presenta enzimas con mayor actividad antioxidante?

¿Existirán diferencias significativas entre la actividad antioxidante enzimática y la capacidad antioxidante de polifenoles totales presente en la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* Bouché?

1.2. Antecedentes

Shirsat & Kadam (2015), analizaron enzimas digestivas y antioxidantes específicos de tejidos de *Cucurbita pepo* y *Langenaria siceraria*, para lo cual realizaron siete ensayos, los cuales fueron; catalasa, peroxidasa, eliminación de H_2O_2 , superóxido dismutasa, malondialdehído, carotenoides y eliminación de radicales libres en semilla, fibra, pulpa y cáscara del fruto maduro de cada especie, y obtuvieron como resultados que la actividad catalasa para *C. pepo* fue de $54.65 U g^{-1}$ y de $18.52 U g^{-1}$ para las semillas y cáscaras respectivamente; mientras que para *L. siceraria* fue de $18.83 U g^{-1}$ en la pulpa. La actividad peroxidasa en las semillas fue de $1,23 \Delta OD (delta de la densidad \acute{optica}) min^{-1} gm^{-1}$ para *C. pepo* y $1,02 \Delta OD min^{-1} gm^{-1}$ para *L. siceraria*. Además, la actividad de eliminación de H_2O_2 en la cáscara fue de $0.70 \Delta OD min^{-1} gm^{-1}$ para *C. pepo* y $0.93 min^{-1} gm^{-1}$ para *L. siceraria*. Por otro lado, la actividad de superóxido dismutasa fue alta para semillas y cáscaras de ambas plantas $74.95 U min^{-1} gm^{-1}$ y $66.64 U min^{-1} gm^{-1}$ respectivamente para *C. pepo* y $84.97 U min^{-1} gm^{-1}$ y $73.96 U min^{-1} gm^{-1}$ para *L. siceraria*. Por último, el efecto secuestrante de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) fue disminuyendo (72.32%, 57.93%, 55.83% y 32.42%) para la cáscara, fibra, pulpa y semilla para *C. pepo* respectivamente con una concentración inhibitoria de $30 \mu g mL^{-1}$.

Wyrwicka & Urbaniak (2016), evaluaron los cambios oxidativos de las respuestas antioxidantes de tres enzimas de las hojas del pepino perteneciente al género *Cucumis* y el calabacín perteneciente al género *Cucurbita*, cultivando las plántulas en suelos con lodos de depuración a tres diferentes concentraciones (1.8 g, 5.4 g y 10.8 g) y un control, las enzimas evaluadas fueron la ascorbato peroxidasa (APx), catalasa (CAT) y guayacol peroxidasa (POx), además de la enzima desintoxicante S-glutación transferasa (GST), obteniendo como resultados que, la actividad APx para el caso del calabacín fue de 178%, 270% y 217% del valor de control mientras que, para el pepino fue de 55%, 53% y 47% del valor de control para los tratamientos de

1.8 g, 5.4 g y 10.8 g respectivamente para ambos casos. Para la catalasa disminuyó al 89% y 79% de los valores de control para el caso del calabacín y aumentó al 116 % y 128 % en el pepino con los tratamientos de 5.4 g y 10.8 g respectivamente. La actividad POx para el calabacín aumentó presentando la máxima actividad para el tratamiento de 5.4 g con 265% de los valores de control, en contraste con el pepino que disminuyó para todos los tratamientos. La actividad de la GST para el caso del calabacín fue de 123%, 193% y 199% de los valores de control para los tratamientos de 1.8 g, 5.4 g y 10.8 g respectivamente, mientras que en el pepino fue de 124% y 175% para los tratamientos de 5.4 g y 10.8 g, llegando a la conclusión que el calabacín presentó una mayor actividad antioxidante frente a los sistemas de estrés.

Asto y Yabar (2019), en su tesis de pregrado evaluaron la capacidad antioxidante de la harina de semillas crudas, cocidas y tostadas de *Cucurbita ficifolia* mediante el método DPPH y el método ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), obteniendo mayor capacidad antioxidante en la almendra de la semilla cruda con ambos métodos siendo 2.906 ± 0.16^a μmol (TE)/g m.s (método DPPH) y 90.548 ± 1.86^a hidrofílico y $41.465 \pm 6,68^d$ lipofílico (método ABTS). Por otro lado, Castillo y Moncayo (2019) evaluaron la capacidad antioxidante de *Cucurbita ecuatoriensis* mediante el método DPPH; encontrando para los frutos y hojas en el extracto etanólico $86.32 \pm 1.49\%$ y $77.21 \pm 0.11\%$ de inhibición y en el clorofórmico $70.50 \pm 0.1\%$ $66.91 \pm 0.12\%$ de inhibición, respectivamente.

Estos datos nos indican que *C. ficifolia* presenta una alta capacidad antioxidante no enzimática, al igual que otras plantas pertenecientes al género *Cucurbita* que presentan alta actividad antioxidante enzimática y no enzimática.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante enzimática que presenta la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* Bouché.

1.3.2. Objetivos específicos

Determinar la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y glutatión sulfhidril transferasa (GST) en la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* Bouché.

Determinar la capacidad antioxidante de polifenoles totales (no enzimática) en la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* Bouché.

Comparar la actividad antioxidante enzimática de SOD, POX y CAT frente a la capacidad antioxidante no enzimática en la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* Bouché.

1.4. Justificación

Los antioxidantes son grupos de compuestos que se encargan de neutralizar a los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula (Abuajah *et al.*, 2015). Estos radicales libres son de importancia ya que pueden causar diversos trastornos como la artritis, la aterosclerosis, Alzheimer, Parkinson, gastritis, cáncer, diabetes entre otros; además, son responsables de la patología de diversos efectos tóxicos y la peroxidación lipídica dañando las membranas y provocando la muerte celular (Elanthendral *et al.*, 2020)

Los organismos poseen mecanismos antioxidantes dentro de los cuales se encuentran los no enzimáticos como los flavonoides, terpenos, fenoles entre otros y los enzimáticos como la enzima superóxido dismutasa (SOD) que junto a la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la peroxiredoxina actúan removiendo el peróxido de hidrógeno de las células.

Las semillas y la pulpa de *Cucurbita ficifolia* presentan una alta capacidad antioxidante no enzimática, siendo en el caso de las semillas aún mayor que *Cucurbita máxima* (Hidalgo y Nuñez, 2021; Yadav *et al.*, 2020)

En base a lo mencionado es importante evaluar en qué estado de maduración del fruto de *Cucurbita ficifolia* podemos encontrar mayor actividad antioxidante enzimática, en la pulpa ya que, este conocimiento incrementaría su valor científico para la seguridad alimentaria de los pobladores que aún la consumen y promover que otros puedan beneficiarse al promover su consumo responsable; además se pretende revalorar la planta, incentivando su cultivo y exportación.

1.5. Hipótesis

H_i: La pulpa de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro presentan actividad antioxidante enzimática de SOD, POX, CAT y GST.

H_o: La pulpa de *Cucurbita ficifolia* Bouché en estado maduro e inmaduro no presentan actividad antioxidante enzimática de SOD, POX, CAT y GST.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Cucurbita ficifolia* Bouché

C. ficifolia es una enredadera trepadora perenne monoica, de tallo espinoso, con nudos y zarcillos largos. Las hojas son simples, alternas, circulares u ovadas a reniformes en el contorno. Las flores son solitarias, axilares, de color amarillo a naranja pálido (Lim, 2012). El fruto presenta forma cilíndrica cuyo tamaño varía entre 21 a 40 cm con un patrón de crecimiento sigmoideal simple que mantiene su forma ovalada durante todo su crecimiento y desarrollo, el color principal de la cáscara varía desde crema y blanco hasta verde, algunos con jaspes sobre los verdes, son de textura suave o lisa de la cáscara. La semilla es piriforme de color negro cuyo tamaño varía entre 16 a 20 mm de largo y una media de 11.7 mm de ancho (Delgado *et al.*, 2014 y Moya *et al.*, 2019).

C. ficifolia crece mayormente en lugares de clima frío, es cultivado en altitudes superiores a los 1000 m.s.n.m., en las montañas de América Latina entre 1000 y 2800 m sobre el nivel del mar y en las tierras altas frías en otras partes de los trópicos. Es la especie de *Cucurbita* más resistente al frío, sin embargo, las heladas pueden resultar altamente perjudiciales para la planta. El fotoperíodo requerido para la floración es corto, entre 8 a 12 horas por día. (Andres, 2019).

2.1.1. Clasificación taxonómica

Según la base de datos del Servicio de Información sobre Biodiversidad Mundial [GBIF], (2014) adaptada a la Clasificación de Filogenia de Angiospermas de Plantas con Flores (APG IV), es la siguiente:

Reino: Plantae

Filo: Traqueofita

Clase: Magnoliopsida

Orden: Cucurbitales

Familia: Cucurbitáceae

Género: Cucurbita L.

Especie: *Cucurbita ficifolia* Bouché

2.1.2. Origen y distribución

El lugar de origen de *C. ficifolia* aún no es certero. Se sugiere América Central o el sur de México como puntos de origen, mientras que otros sugieren América del Sur (los Andes); restos arqueológicos indican un origen sudamericano, ya que los restos más antiguos son peruanos, sin embargo, la biosistemática aún no ha podido afirmar esta hipótesis. Se cultiva en los valles altos de los Andes desde México hasta Chile, además, se cultiva ampliamente en pequeña escala en otros lugares como en los lugares fríos del sudeste de Asia. (Lim, 2012 y Andrés, 2019)

2.2. Antioxidantes y su importancia

Un antioxidante es un componente que se encuentra formando parte de los alimentos y es capaz de contrarrestar los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno sobre las funciones metabólicas normales de los humanos. Estos compuestos se añaden a las grasas u otros productos en la industria alimentaria para retardar los procesos de oxidación, previniendo el inicio de la rancidez oxidativa (grasas); para evitar esto las células necesitan generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e ir aumentando según el daño generado. Cada mecanismo homeostático antioxidante es específico para poder enfrentar el daño oxidativo, lo cual refleja la necesidad de afrontar la multiplicidad de radicales libres y EROs (Coronado *et al.*, 2015 y Quintanar y Calderón, 2008). Existen antioxidantes no enzimáticos como los polifenoles, compuestos orgánicos que se caracterizan por tener anillos aromáticos, y enzimáticos como la SOD, POX, CAT, GST, entre otros (Guija-Guerra y Guija-Poma, 2023).

2.2.1. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Las EROs tienen la función de regular una variedad de procesos celulares importantes incluyendo la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas, la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, así como regulación de los transportadores y canales de iones, entre otros. No obstante, cuando son producidas en grandes cantidades, producen daño e inducen a la muerte (Macedo, 2012).

2.2.2. Antioxidantes enzimáticos

Dentro de las enzimas antioxidantes con alta afinidad para catalizar la reacción de reducción parcial de una especie reactiva se encuentran la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio que se encarga de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua o lipoperóxidos (L-OOH) a alcohol; la glutatión sulfhidril transferasa (GST) actúa facilitando la reacción nucleofílica del co-sustrato GSH (glutatión) sobre el centro electrófilo de numerosos oxidantes; además, interviene en la acción de la catalasa (CAT), que convierte el H_2O_2 en H_2O mediante un proceso de reducción. (Quintanar y Calderón, 2008 y Carbajal, 2019). Las enzimas peroxidases (POX) contienen hemo que utilizan H_2O_2 para oxidar sustratos orgánicos e inorgánicos, contribuyen a los procesos de desarrollo, lignificación, biosíntesis de etileno, defensa y cicatrización de heridas (Ara *et al.*, 2013). La enzima superóxido dismutasa (SOD) se encarga de catalizar la reacción de destrucción de los radicales superóxidos por medio de su transformación en oxígeno molecular y H_2O_2 (Gonzales *et al.*, 2017).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Se dividen en tres subtipos:

Según su propósito, es una investigación aplicada ya que se indagó de forma práctica los antioxidantes enzimáticos presentes en la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia*.

Según su nivel de conocimientos, es una investigación científica explicativa, ya que se demostró la actividad antioxidante enzimática de la pulpa de *Cucurbita ficifolia*, aplicando el método científico.

Según su estrategia, es una investigación experimental ya que se determinó la actividad antioxidante enzimática mediante el uso de reactivos e instrumentos dentro del laboratorio.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Las muestras fueron colectadas de la chacra de Cántaro García Daysi Diana; ubicada en la provincia de Carhuaz – Ancash – Perú (Lat: -9.28519306, Lng: -77.6415303), entre los meses de febrero y marzo del año 2023 (Autorización en Anexo A).

La parte experimental fue realizada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM) de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal ubicado en el Jr. Río Chepén 290 – El Agustino – Lima – Perú.

El tiempo de duración del proyecto fue de un año, iniciándose en diciembre del 2022 y culminando en diciembre del año 2023.

3.3. Variables

Este proyecto presenta tanto variables independientes como dependientes

3.3.1. Variables independientes

Las enzimas que fueron evaluadas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), glutatión sulfhidril transferasa (GST) y los polifenoles totales (antioxidantes no enzimáticos).

3.3.2. Variables dependientes

La actividad enzimática específica de SOD, CAT, POX presente en la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia*.

La concentración de polifenoles totales y la capacidad antioxidante no enzimática presente en la pulpa de los frutos inmaduros y maduros de *Cucurbita ficifolia*.

3.4. Población y muestra

La población estuvo conformada por frutos maduros e inmaduros de *Cucurbita ficifolia* presentes en la chacra de la Sra. Cántaro del distrito de Carhuaz, provincia de Carhuaz, región de Ancash y las muestras fueron representadas por 3 frutos maduros y 3 frutos inmaduros. La unidad muestral fue la pulpa de las calabazas.

3.5. Instrumentos

En la colecta de las muestras se tomó nota de los lugares de colección utilizando un GPS, Latitud Longitud para android, y se fotografió el proceso utilizando la cámara fotográfica de un dispositivo marca Xiaomi, modelo Redmi Note 11. Las muestras fueron seleccionadas según los siguientes criterios: estado de maduración (según tiempo establecido por los pobladores), tamaño del fruto, estado de conservación, color y dureza de la cáscara; luego fueron cosechadas y transportadas al laboratorio. Posteriormente se tomaron datos paramétricos tales como el peso utilizando una balanza (Marca: electronic SF-400) y tamaño de cada una de las muestras utilizando una cinta métrica. Todos estos datos fueron colocados en una hoja Excel para luego facilitar la entrada de los análisis estadísticos.

Para evaluar la actividad enzimática se utilizó el espectrofotómetro Shimatzu 1700 UV/Visible, así para la catalasa y glutatión sulfhidril transferasa se utilizó 240 nm y 340 nm respectivamente, mientras que para evaluar la actividad enzimática de peroxidasa y superóxido dismutasa se utilizó 470 nm y 560 nm, respectivamente. El lector de microplacas Accuris 96 se utilizó para medir la concentración de polifenoles a 750 nm y para medir la de polifenoles se utilizó una longitud de onda de 515 nm.

3.5.1. Equipos

Vortex (Marca: Labnet), refrigeradora (Marca: Boch), congeladora -20°C (Marca: Bosch), centrífuga refrigerada (Marca: Hermle), balanza analítica (Marca: Aeadam), potenciómetro (Marca: Hanna instruments), agitador orbital (Marca: Orbital genie TM) y agitador magnético (Marca: Accuplate-Labnet).

3.5.2. Materiales

3.5.2.1. Biológicos. Pulpa de frutos maduros e inmaduros de *Cucurbita ficifolia*.

3.5.2.2. Vidrio. Probeta, beakers, bagueta, mortero y pipetas (2 ml, 5ml, 10 ml), matraz Erlenmeyer, fiolas (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml).

3.5.2.3. Plástico. Microplacas de 96 pocillos, micropipetas (10 µl, 200 µl, 1000 µl), papel aluminio, papel kraf, bolsas ziploc, microtubos de 1.5 ml, tips, (10 µl, 200 µl, 1000 µl), estuche de disección, cámara fotográfica, tubos de centrifuga 15 ml, tubo led de 15 watts.

3.5.3. Reactivos

2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Thermo Fisher Scientific), fosfato de sodio monobásico (Merck), fosfato de sodio dibásico (Biopack), fosfato de potasio monobásico (Loba chemie), fosfato de potasio dibásico (Mallinckrodt), guayacol (Sigma-aldrich), agua destilada, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Farmacia universal), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

(Sigma-aldrich), etanol 96% (Quimex), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Carlo erba), folin ciocalteu (Merck), carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Sigma-aldrich), ácido gálico (Sigma-aldrich), albúmina de suero bovino (Sigma-aldrich), cloruro de sodio (NaCl) (Merck), ácido ascórbico (Hamex), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) (Sigma-aldrich), nitro azul de tetrazolio (NBT) (Sigma-aldrich), riboflavina (Sigma-aldrich), L-metionina (Merck), glutatión reducido (Sigma-aldrich), triton-x-100 (Loba-chemie), Tris-HCl (Sigma-aldrich), Bradford (Sigma-aldrich) catalasa (Sigma-aldrich), superóxido dismutasa (Sigma-aldrich), peroxidasa (Sigma-aldrich).

3.6. Procedimientos

3.6.1. *Obtención de las muestras*

Las muestras fueron colectadas de una chacra ubicada en el distrito de Carhuaz y se siguió el método de colecta descrito por Montávez (s.f.), para luego ser transportadas al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicado en la provincia de Lima.

3.6.2. *Identificación taxonómica*

Para la identificación taxonómica se realizaron tres exicatas con hoja, flor, tallo y zarcillo de la planta, además se tomaron fotografías de distintos frutos en diferentes estados de maduración, de un mismo cultivo, siendo todo esto enviado al Herbario de la Universidad Nacional Federico Villarreal para su debida identificación, obteniéndose un certificado que consta en el Anexo B.

3.6.3. *Preparación de las muestras*

Se tomaron las medidas morfoanatómicas de cada una de las muestras tales como el peso, diámetro polar y ecuatorial, luego se procedió al lavado de las muestras para eliminar las impurezas como tierra adherida a la superficie con lejía al 1.5%, luego fueron peladas en frío de forma manual

con cuchillo de acero inoxidable; con la finalidad de extraer solo la pulpa, la cual fue pesada e inmediatamente congelada, para su posterior análisis.

3.6.3.1. Extracto etanólico. Se pesó 10 g de pulpa, y se trituró en un mortero, luego se trasvasó a una probeta para ser aforado con etanol 70% hasta 50 ml; después este contenido fue vaciado a un Erlenmeyer. Posteriormente se colocó cada una de las muestras en un agitador orbital durante 4 horas. Finalmente, las muestras fueron puestas a macerar en refrigeración a 4°C durante 7 días. Aquí se obtiene el extracto etanólico.

3.6.3.2. Extracto acuoso. Se pesó 10 g de pulpa, y se trituró en un mortero, luego se trasvasó a una probeta para ser aforado con agua estéril para inyección hasta 50 ml; después este contenido fue vaciado a un Erlenmeyer. Posteriormente se colocó cada una de las muestras en un agitador orbital durante 4 horas. Finalmente, las muestras fueron puestas a macerar en refrigeración a 4°C durante 7 días. Aquí se obtiene el extracto acuoso.

3.6.4. Cuantificación de polifenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales (FT) se utilizó el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Barrientos *et al.*, (2018) con ciertas modificaciones. En una microplaca de 96 pocillos se agregó 20 µl de extracto (etanólico/acuosa), 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.4 M; se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente, luego se agregó 80 µl de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 7.5% (p/v) y se dejó reposar durante 2 h, se medirán las absorbancias en un espectrofotómetro a 750 nm. Se realizó una curva de calibrado con ácido gálico a las siguientes concentraciones: 0, 2.5, 5.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0 y 20.0 µg GAE (equivalente de ácido gálico)/ml. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.6.5. Actividad antioxidante por el método DPPH

Se empleó el método DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo), para el cual se preparó una solución de DPPH a una concentración de 0.1 mM. Esta solución fue utilizada para evaluar la actividad antioxidante de los extractos. Se utilizó Trolox como estándar en concentraciones de 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM y 0.6 mM para construir la curva de calibración. Para el análisis de la capacidad antioxidante, se tomó 192 μ l de la solución del reactivo DPPH y se agregó 8 μ l del extracto (etanólico/acuoso); se leyó a 515 nm en el espectrofotómetro y se tomó lectura al tiempo 0 min, 15 min y 30 min. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula (Bazalar, 2018):

$$\% \text{inhibición DPPH} = \frac{\text{abs } t_{0 \text{ min}} - \text{abs } t_{15 \text{ min}}}{\text{abs } t_{0 \text{ min}}} \times 100$$

3.6.6. *Cuantificación de proteínas totales*

La cuantificación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (1976). Para el cual se agregó en pocillos de 200 μ l, 10 μ l del extracto y 190 μ l del reactivo Bradford, se dejó reposar por dos minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas. Para la determinación de la concentración de proteína de cada muestra, se realizó una curva estándar con una muestra patrón de albúmina de suero bovino (ASB) (10 mg/ml), y realizando respectivas diluciones se obtuvieron las siguientes concentraciones de 0.0, 0.025, 0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 1.5 mg/mL. (Mendoza y Mendoza, 2022). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.6.7. *Evaluación enzimática*

Se evaluaron la actividad de las siguientes enzimas: la catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión sulfhidril transferasa. Se realizó cada uno de estos ensayos por triplicado.

3.6.7.1. Actividad de superóxido dismutasa (SOD). Se usó el protocolo descrito por Martínez *et al.*, 2013 con modificaciones. Para la extracción de la enzima se trituró en un

mortero en frío (4°C) 5 g de pulpa con 5 ml de tampón fosfato de potasio 0.05 M (pH 7.8); luego se centrifugó a 13520 g por 30 minutos a 4°C. Después en un frasco ámbar se preparó 27 ml de buffer fosfato de potasio 0.05 M (pH 7.8) con 0.1 mM de EDTA, 1.5 ml de L-metionina 0.2 M, 1 ml de NBT 1.7 mM y 0.75 ml de triton x-100 al 1%; la cual sirvió como mezcla de reacción. En oscuridad se preparó una cubeta de cuarzo de 3 ml, conteniendo 3 ml del preparado anterior, 10 µl de riboflavina 0.01 M y 133 µl del extracto. Se leyó la absorbancia inicial a 560 nm e inmediatamente se expuso la cubeta a una lámpara de luz fluorescente de 15 watts durante 7 minutos y se tomó la absorbancia final. Se realizó el mismo procedimiento reemplazando el extracto con agua destilada como blanco.

Para la curva de calibración se utilizó la enzima superóxido dismutasa (2426 U/mg de proteína, donde 1 unidad (U) de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de producción de NBT), se realizó un estándar de 0, 0.6, 0.9, 1.5 y 3 unidades/mg cuyos datos fueron linearizados mediante logaritmo para el análisis estadístico.

3.6.7.2. Actividad de catalasa (CAT). Para la extracción de la enzima se trituró en un mortero en frío (4°C) 5 g de pulpa con 5 ml de Tris-HCl 100 mM (pH 7.8), EDTA 0.1 Mm y 0.1 % de triton x-100 después la mezcla fue centrifugada a 21 130 g durante 30 minutos a -4°C. El sobrenadante fue usado para el ensayo de actividad catalasa. La mezcla de reacción contenía 2.8 ml de un tampón tris-HCl (pH 7.8) (0.1 M), 100 µl H₂O₂ 0.88 % en tris-HCl (pH 7.8) (0.1 M) y 100 µl de extracto enzimático, finalmente la absorbancia se leyó al tiempo 0 (absorbancia inicial) y al tiempo 1 min (absorbancia final) a 240 nm (Luck, 1965 modificado por Valderrama, 2014). Para la curva de calibración se realizó un estándar de H₂O₂ a las siguientes concentraciones: 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2 µmoles de H₂O₂ con una enzima catalasa (12932 U/mg de proteína) estándar de 1.3 U/mg. Para determinar la actividad enzimática de las muestras se realizó la siguiente

fórmula (Sigma-Aldrich, 2022), donde una unidad (U) es capaz de descomponer 1 μmol de peróxido de hidrógeno por minuto:

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL} \text{ o } \text{U}/\text{ml}) = \frac{H_2O_2}{V} \times Fd$$

Donde:

H_2O_2 : Cantidad de peróxido de hidrógeno (μmol)

V: Volumen de muestra utilizada (ml)

Fd (factor de dilución): Factor de dilución de la muestra

3.6.7.3. Actividad de peroxidasa (POX). Para la extracción de la enzima peroxidasa se trituró en un mortero en frío (4°C) 5 g de pulpa con 50 ml de tampón fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.4); después la mezcla fue centrifugada a 2350 g durante 15 minutos a -4°C , el sobrenadante fue utilizado como preparación enzimática. El medio de ensayo consistió en 200 μl de tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6.4), 200 μl de guayacol (0.29 ml/100 ml), 400 μl de agua destilada y 200 μl de preparación enzimática en un volumen total de 1 ml. La reacción inició agregando 10 μl de H_2O_2 al 3% y se registró espectrofotométricamente a 470 nm durante 1 minuto (Putter, 1974, como se citó en Shirsat & Kadam, 2015). Para la curva de calibración se realizó un standard de H_2O_2 a las siguientes concentraciones: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 1.5 μmoles de H_2O_2 con una enzima peroxidasa estándar (173 U/mg de proteína) de 0.25 U/mg. Para determinar la actividad enzimática de las muestras se realizó la siguiente fórmula (Sigma-Aldrich, 2022), donde una unidad (U) es capaz de descomponer 1 μmol de peróxido de hidrógeno por minuto:

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL} \text{ o } \text{U}/\text{ml}) = \frac{H_2O_2}{V} \times Fd$$

Donde:

H_2O_2 : Cantidad de peróxido de hidrógeno (μmol)

V: Volumen de muestra utilizada (ml)

Fd (factor de dilución): Factor de dilución de la muestra

3.6.7.4. Actividad de glutatión sulfhidril transferasa (GST). Para la extracción de la enzima se trituró en un mortero en frío (4°C) 5 g de pulpa con 5 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7), EDTA 1 mM y 0.5 M de NaCl y 1 Mm de ácido ascórbico, después la mezcla fue centrifugada a 15000 g durante 15 minutos a -4°C, el sobrenadante fue utilizado como preparación enzimática. La solución de reacción contenía tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6.25), CDNB 0.75 mM, 30 mM GSH y el extracto enzimático (50 µg de proteína), se midieron las absorbancias a 340 nm al tiempo 0 (absorbancia inicial) y al tiempo 1 min (absorbancia final) (Wyrwicka y Urbaniak, 2016).

3.7. Análisis de datos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los softwares Statistical Package for the Social Science (IBM SPSS Statistics versión 25) (prueba de Kolmogorov-Smirnov y Kruskal-Wallis) para la determinación de normalidad de las muestras y si existen diferencias significativas entre los grupos a evaluar, Past y Microsoft Excel. (Shirsat & Kadam, 2015).

3.8. Consideraciones éticas

La identificación de la especie fue certificada por un profesional en el área (Anexo B). Para el caso de las muestras que fueron colectadas en la chacra se obtuvo un permiso de consentimiento al dueño de la propiedad (Anexo A)

IV. RESULTADOS

4.1. Parámetros físicos de *Cucurbita ficifolia*

Se realizaron medidas paramétricas del fruto y peso de la muestra (Tabla 1).

Tabla 1

Diámetro polar y ecuatorial de los frutos de Cucurbita ficifolia y peso fresco total y de la pulpa

Parámetros		<i>Cucurbita ficifolia</i>	
		Maduro	Inmaduro
Diámetro	Polar (cm)	28.95 ± 7.86	20.375 ± 1.88
	Ecuatorial (cm)	24.55 ± 5.01	14.975 ± 3.82
Peso fresco	Total (g)	2728 ± 429.52	928.25 ± 172.09
	Pulpa (g)	2093.5 ± 359.23	535.5 ± 170.61

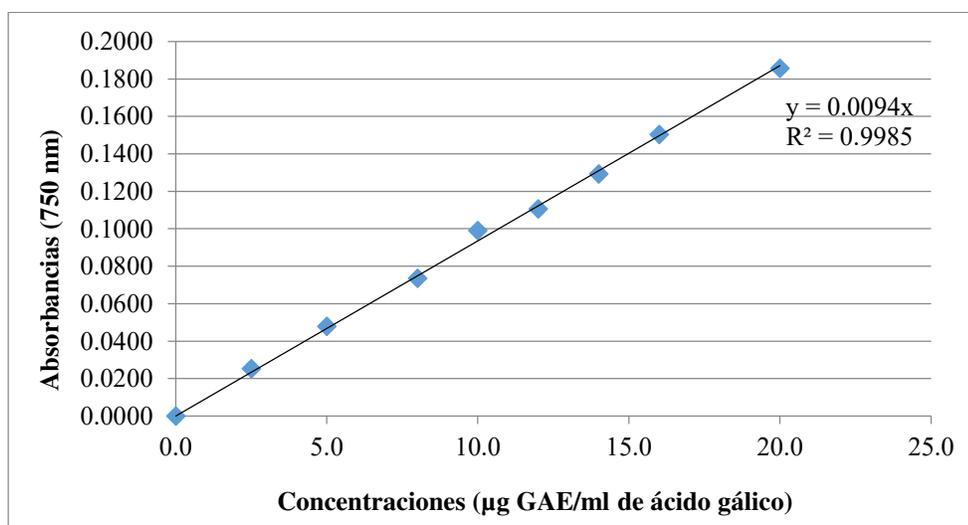
Nota: n=3 maduras y 3 inmaduras; muestras extraídas de la chacra en la provincia de Carhuaz

4.2. Polifenoles totales

En la Figura 1 se muestra la curva de calibración realizada con ácido gálico.

Figura 1

Curva de calibración de ácido gálico (µg GAE/ml) por el método Folin-Ciocalteu



Se evaluó la concentración de polifenoles totales de las muestras maduras e inmaduras en extracto acuoso y etanólico (Tabla 2).

Tabla 2

Media de la concentración de polifenoles totales por gramo de peso seco (PS)

Muestras	Polifenoles totales (mg GAE/g PS)	
	Extracto acuoso^a	Extracto etanólico^b
Maduro	25.88 ± 1.08	21.82 ± 4.39
Inmaduro	11.48 ± 1.03	9.42 ± 0.65

Nota. “a” Prueba Kruskal-Wallis 0.000, “b” Prueba Kruskal-Wallis 0.001

4.3. Actividad antioxidante por el método DPPH

Se realizó el ensayo con DPPH para medir la actividad antioxidante de las muestras maduras e inmaduras en los diferentes extractos (etanólico y acuoso), para ambos casos se realizó la prueba Kruskal-Wallis, para determinar si existen o no diferencias significativas entre las muestras maduras e inmaduras obteniendo para ambos casos valores inferiores a 0.05 por lo que podemos afirmar que existen diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 3).

Tabla 3

Medias de la actividad antioxidante

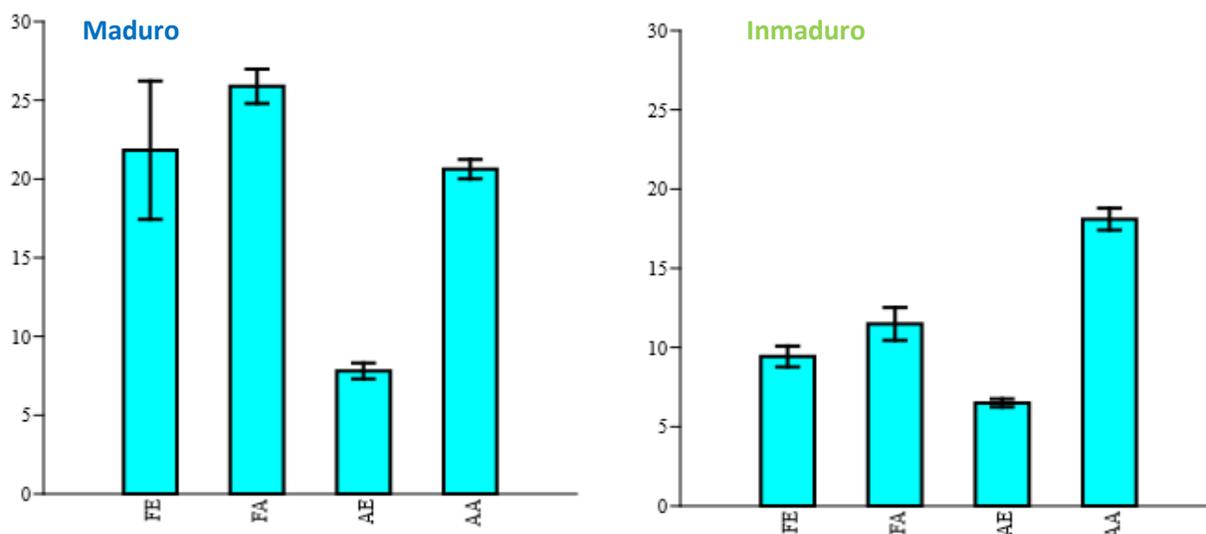
Muestras	Actividad antioxidante (%)	
	Extracto acuoso^a	Extracto etanólico^b
Maduro	20.62 ± 0.61	7.80 ± 0.50
Inmaduro	18.09 ± 0.69	6.49 ± 0.25

Nota. “a” Prueba Kruskal-Wallis 0.019, “b” Prueba Kruskal-Wallis 0.037

En la Figura 2 se muestran dos gráficos de barras donde se observan las diferencias entre polifenoles y antioxidantes de los diferentes extractos en la muestra madura e inmadura.

Figura 2

Gráfico de barras comparativo entre la concentración de polifenoles totales y actividad antioxidante DPPH de los extractos acuosos y etanólicos de las muestras maduras e inmaduras.



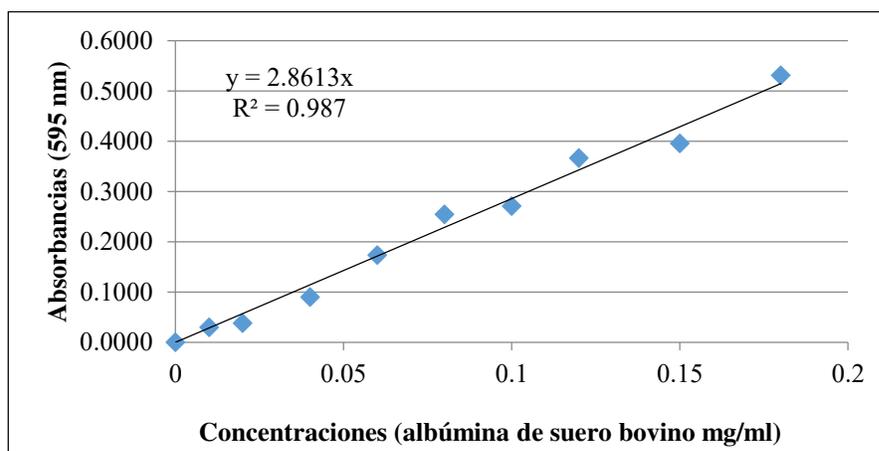
Nota. (FE) fenoles etanol, (FA) fenoles agua, (AE) antioxidantes etanol, (AA) antioxidantes agua.

4.4. Concentración de proteínas

Se realizó una curva de calibración por el método Bradford (Figura 3)

Figura 3

Curva de calibración por el método Bradford con albúmina de suero bovino (mg/ml)



Se evaluó la concentración de proteínas de las muestras maduras e inmaduras en extracto acuoso y etanólico, sin embargo, al realizar la prueba Kruskal-Wallis se obtuvo que para el caso del grupo etanólico no se encontraron diferencias significativas entre los grupos maduros e inmaduros que se puede apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4

Media de la concentración de proteínas μg por gramo de peso fresco (PF)

Muestras	Concentración de proteínas ($\mu\text{g/g}$ PF)	
	Extracto acuoso ^a	Extracto etanólico ^b
Maduro	685.56 \pm 39.57	323.89 \pm 20.29
Inmaduro	1590.59 \pm 61.86	289.50 \pm 26.16

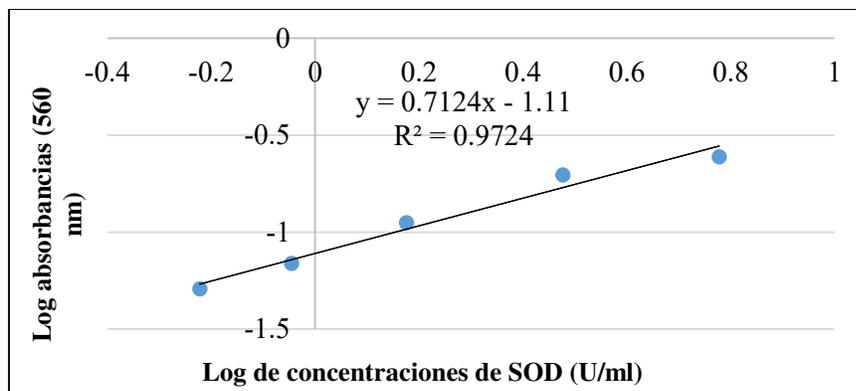
Nota. “a” Prueba Kruskal-Wallis 0.000, “b” Prueba Kruskal-Wallis 0.566

4.5. Evaluación enzimática

Se realizó la evaluación enzimática de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX) que fueron medidas en U/g de peso fresco (PF) y glutatión sulfhidril transferasa (GST) que fue evaluada en porcentaje de actividad respecto a la muestra madura e inmadura. Para las enzimas SOD, CAT y POX se realizaron curvas de calibración mostradas en las Figuras 4, 5 y 6 respectivamente; mientras que en la Figura 7 se observa un diagrama de barras comparativo de cada una de las enzimas de la muestra madura e inmadura. Para todas las enzimas se realizó la prueba Krukakl-Wallis donde todas presentan diferencias significativas entre los grupos maduros e inmaduros.

Figura 4

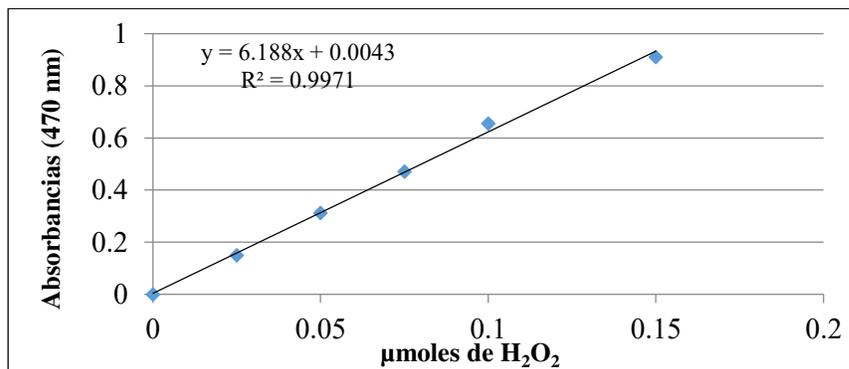
Curva de calibración de enzima SOD (U/g PF) linearizada por logaritmo natural



Nota: Enzima SOD (Sigma-aldrich)

Figura 5

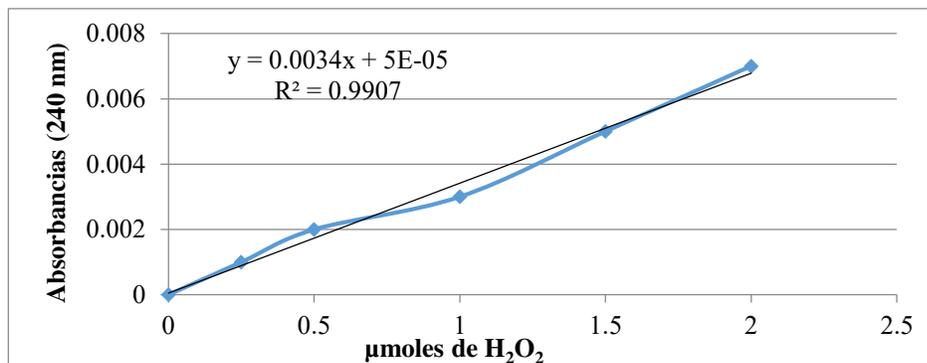
Curva de calibración de enzima POX con $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$



Nota: Enzima POX (Sigma-aldrich)

Figura 6

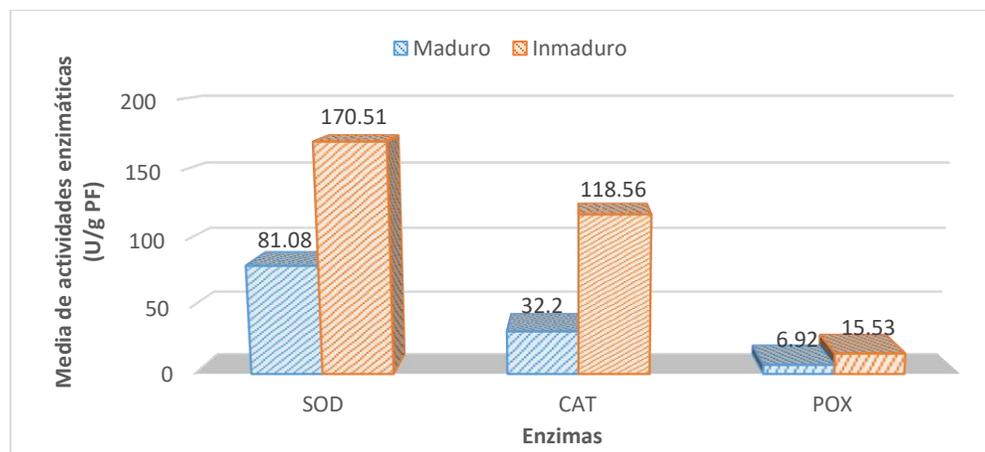
Curva de calibración de enzima CAT con $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$



Nota: Enzima CAT (Sigma-aldrich)

Figura 7

Gráfico de columnas comparativo entre las medias de las actividades enzimáticas (U/g PF) de SOD, POX y CAT en las muestras maduras e inmaduras.



Además, se realizó una tabla con las diferentes variaciones de unidades respecto a la media de actividad enzimática de SOD, CAT y POX de los frutos maduro e inmaduro (Tabla 5), para poder ser usado en las discusiones.

Tabla 5

Variación de unidades de las medias de actividad enzimática de SOD, CAT y POX para el fruto maduro e inmaduro

Variación de unidades	SOD		CAT		POX	
	Maduro	Inmaduro	Maduro	Inmaduro	Maduro	Inmaduro
U/g peso fresco (PF)	81.08	170.51	32.2	118.56	6.92	15.52
U/mg de proteína	127.74	233.13	-	-	-	-
$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{ml}$	-	-	13.48	52.696	1.858	5.979
U/ml de muestra	-	-	13.48	52.696	1.858	5.979
$\Delta\text{OD}/\text{min}/\text{mg PF}$	-	-	-	-	2.342	6.713

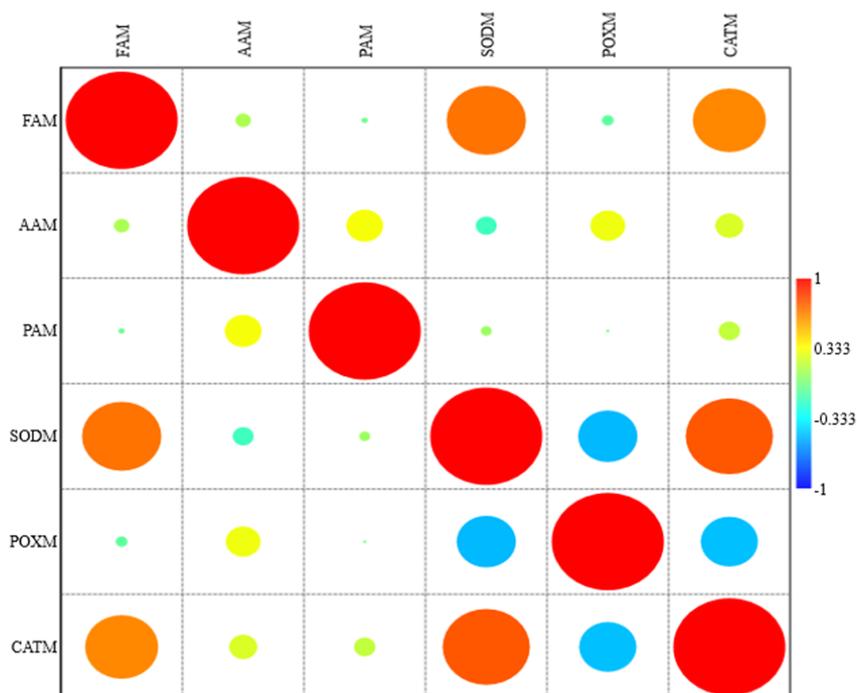
Se realizó la prueba de normalidad Shapiro Wilks mediante el estadístico SPSS donde se observan significancias inferiores a 0.05 por lo que se realizaron pruebas para datos no

paramétricos, homogeneidad de varianzas y se determinó la correlación mediante la prueba de Spearman Rho.

En la Figura 8 podemos visualizar la correlación de las muestras maduras donde nos indica que la concentración de polifenoles totales y la actividad de la enzima SOD y CAT presentan una correlación positiva alta, mientras que con la enzima POX existe una correlación negativa muy baja, sin embargo; esta última enzima presenta una correlación negativa alta frente a las enzimas SOD y CAT

Figura 8

Correlación según la prueba Spearman Rho para datos no paramétricos para muestras maduras



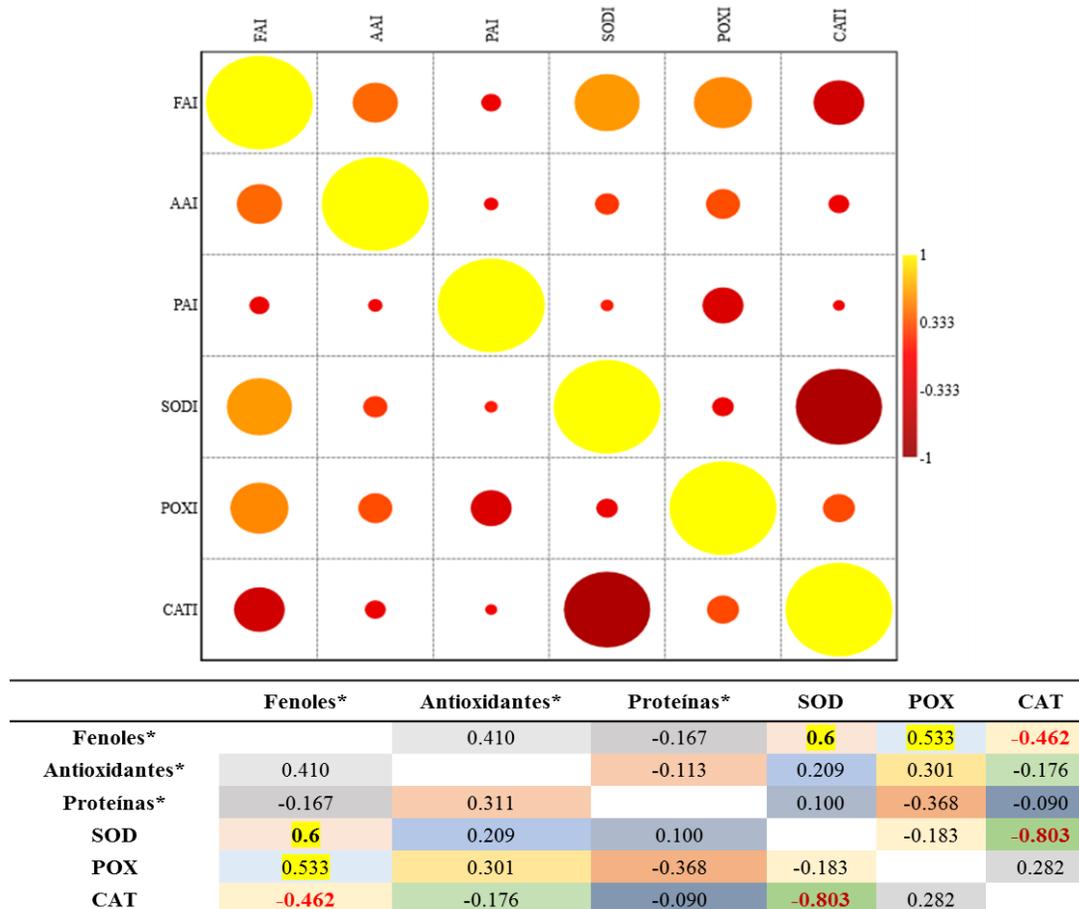
	Fenoles*	Antioxidantes*	Proteínas*	SOD	POX	CAT
Fenoles*		0.117	-0.033	0.7	-0.083	0.644
Antioxidantes*	0.117		0.311	-0.167	0.293	0.233
Proteínas*	-0.033	0.311		0.075	0	0.172
SOD	0.7	-0.167	0.075		-0.517	0.773
POX	-0.083	0.293	0	-0.517		-0.498
CAT	0.644	0.233	0.172	0.773	-0.498	

Nota. (*) Extracto acuoso. Coloración roja intensa representa una correlación positiva fuerte (valores positivos), mientras que la coloración azul intenso representa una correlación negativa fuerte (valores negativos). (FAM) fenoles agua maduro, (AAM) antioxidantes agua madura, (PAM) proteínas agua maduro, (SODM) SOD maduro, (POXM) POX maduro, (CATM) CAT maduro.

Para el caso de los datos inmaduros se observa una correlación negativa alta entre la actividad de la enzima SOD y CAT; además con respecto a los fenoles las enzimas SOD y POX presentan una correlación positiva alta. En la Figura 9 se puede observar un gráfico de correlación.

Figura 9

Correlación según la prueba Spearman Rho para datos no paramétricos para muestras inmaduras



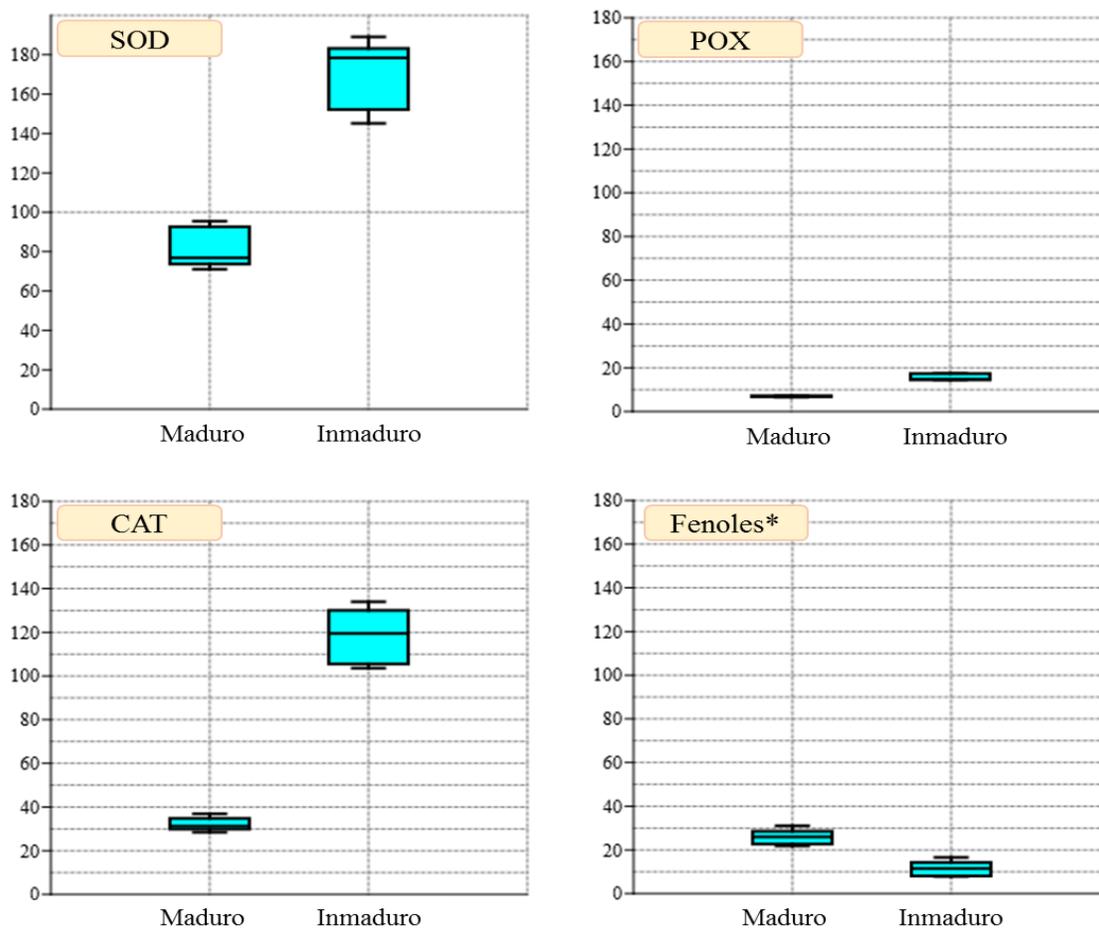
Nota. (*) Extracto acuoso. Coloración amarilla intensa representa una correlación positiva fuerte (valores positivos), mientras que la coloración roja intensa representa una correlación negativa fuerte (valores negativos).

negativos). (FAI) fenoles agua inmaduro, (AAI) antioxidantes agua inmadura, (PAI) proteínas agua inmaduro, (SODI) SOD inmaduro, (POXI) POX inmaduro, (CATI) CAT inmaduro.

En la Figura 10 se observan diagramas de cajas de las muestras maduras e inmaduras donde para todos los casos las muestras inmaduras presentan mayor actividad enzimática. Sin embargo; para la concentración de polifenoles en extracto acuoso se observa una mayor concentración en el fruto maduro.

Figura 10

*Diagrama de cajas de las enzimas POX, SOD y CAT y de la concentración de fenoles**

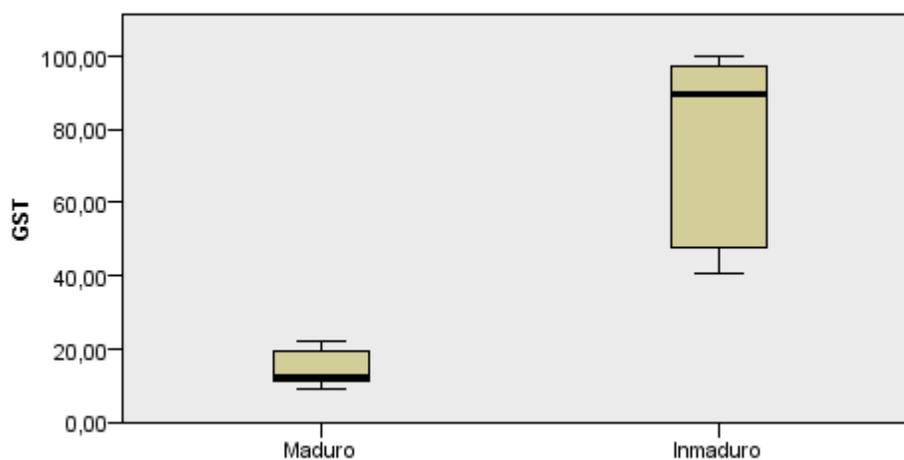


Nota. () Polifenoles totales en extracto acuoso*

Para el caso de la enzima GST los valores fueron expresados en porcentaje según las absorbancias obtenidas de cada muestra obteniendo una media para el fruto maduro de 14.34% y para el fruto inmaduro 77.54% por lo que se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes (maduro e inmaduro), donde se obtuvo un valor inferior a 0.05 por lo que existen diferencias significativas entre ambos grupos. En la Figura 11 se observa un gráfico de cajas y bigotes donde se aprecia las diferencias de la actividad GST de ambos grupos.

Figura 11

Gráfico de cajas y bigotes del porcentaje de enzima GST (%) de la muestra madura e inmadura



V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Cucurbita ficifolia presentó una concentración de polifenoles del fruto maduro en extracto acuoso (EA) de 25.88 ± 1.08 mg GAE/g PS y en extracto etanólico (EE) de 21.82 ± 4.39 mg GAE/g PS, estos valores se asemejan a la concentración de fenoles totales obtenidos por Castillo y Moncayo (2019), en un extracto etanólico de mesocarpio seco de frutos de *Cucurbita ecuadoriensis* donde obtuvieron 20.82 ± 0.87 mg GAE/g del peso seco. Para el caso del fruto inmaduro se obtuvo 11.48 ± 1.03 mg GAE/g PS para el EA y 9.42 ± 0.65 mg GAE/g PS para el EE (equivalente a 74.12 ± 6.24 mg GAE/100g PF), Bautista (2020) al evaluar los polifenoles de la pulpa fresca de *Cucurbita ficifolia* (no especifica estado de madurez) macerada en etanol obtuvo 72.26 ± 2.39 mg EAG/100g de tejido. Para ambos extractos se observa un aumento significativo de polifenoles del estado inmaduro al maduro al igual que Mokhtar *et al.*, (2021) al evaluar la cantidad de polifenoles totales de *Cucurbita moschata* en su etapa temprana (77.5 ± 1.01 mg GAE/100 g PF) y su etapa madura (97.43 ± 2.20 mg GAE/100 g PF).

Para el caso del porcentaje de inhibición de radicales libres (DPPH), se obtuvo para el EA $20.62\% \pm 0.61$ y $18.09\% \pm 0.69$ y para el EE $7.8\% \pm 0.2$ y $6.49\% \pm 0.25$ del fruto maduro e inmaduro, respectivamente; estos valores fueron bajos en contraste a los valores obtenidos por otros autores así Bautista (2020) obtuvo un porcentaje de inhibición de DPPH $76.95\% \pm 1.67$ en *Cucurbita ficifolia* y Castillo y Moncayo (2019) obtuvieron un porcentaje de inhibición de DPPH $86.32\% \pm 1.49$ en *Cucurbita ecuadoriensis*; esto podría deberse a los distintos procesos de extracción de metabolitos, además de las diferentes condiciones ambientales a la que los cultivos estuvieron expuestos.

Por otro lado, se observó un aumento significativo de la actividad antioxidante del fruto inmaduro al maduro al igual que Mokhtar *et al.*, (2021) que determinó la actividad antioxidante

con el método DPPH en *Cucurbita moschata* y observó un aumento de la actividad del estado de madurez joven al maduro.

Tanto para el fruto maduro como inmaduro se obtuvo una correlación positiva entre la concentración de polifenoles y el porcentaje de inhibición de DPPH, tal como Rosas (2011) observó, un incremento de concentración y porcentaje de inhibición significativo durante el proceso de maduración al evaluar la concentración de polifenoles y el porcentaje de inhibición de DPPH de la piña “esmeralda”. Esto podría deberse a que los polifenoles se caracterizan por ser poderosos antioxidantes capaces de neutralizar radicales libres cediendo un electrón o un átomo de hidrógeno (Tsao, 2010). Lo que nos lleva a que, el aumento de la actividad antioxidante durante el proceso de maduración de la calabaza podría estar relacionada con el aumento proporcional en la concentración de varios compuestos polifenólicos (Mokhtar *et al.*, 2021).

Diversas investigaciones (Mokhtar *et al.*, 2021; Staveckienė *et al.*, 2023), indican que el proceso de maduración desempeña un rol importante en la concentración de compuestos fenólicos en frutos. No obstante, es relevante considerar que las modificaciones específicas de estas concentraciones durante la maduración pueden cambiar según los tipos de fenoles presentes en la planta, sus niveles de concentración y factores tales como las condiciones de cultivo, las variaciones entre diferentes variedades y las metodologías analíticas empleadas para medirlos.

Por otro lado; la concentración de proteínas en extracto acuoso y la actividad enzimática de POX, SOD, CAT y GST se obtuvo en mayores concentraciones y actividades en los frutos inmaduros con valores de $1590.59 \pm 61.86 \mu\text{g/g PF}$ (fruto inmaduro) y $685.56 \pm 39.57 \mu\text{g/g PF}$ (fruto maduro) para las proteínas; Shrisat y Kadam, (2015) al evaluar la concentración de proteínas en la pulpa de *Cucurbita pepo* y *Lagenaria siceraria* pertenecientes a la familia Cucurbitaceae presentaron concentraciones de proteínas de $820 \pm 1.92 \mu\text{g/g PF}$ y $870 \pm 2.17 \mu\text{g/g PF}$

respectivamente; por lo que podríamos suponer que estas dos especies mencionadas presentarían una mayor concentración de proteínas que la pulpa de *Cucurbita ficifolia*, en estado maduro.

La enzima catalasa en la pulpa del fruto maduro presentó una actividad de 32.20 ± 1.02 U/g PF y para el fruto inmaduro 118.56 ± 3.865 U/g PF mientras que Shirsat y Kadam, (2015) obtuvieron 32.91 ± 0.81 U/g PF de la actividad catalasa en la pulpa de *Cucurbita pepo* y 18.83 ± 0.16 U/g PF en pulpa de *Lagenaria siceraria*. Para el caso de SOD los mismos autores obtuvieron un valor de actividad de 55.96 ± 2.93 U/min/mg PF en *Cucurbita pepo* y 60.27 ± 2.9 U/min/mg PF en *Lagenaria siceraria*; mientras que en nuestra evaluación se obtuvo para el fruto maduro 81.08 ± 3.23 U/g PF y para el fruto inmaduro 170.51 ± 5.53 U/g PF. Lin *et al.*, 2022 evaluaron la actividad SOD en dos variedades de *Actinidia chinensis* (kiwi) en estado maduro donde obtuvieron para ambos casos valores inferiores a 20 U/100g de PF, valor que al ser comparado con la pulpa del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* es inferior. Para el caso de POX se obtuvo una media de 2.342 Δ OD/min/mg PF para el fruto maduro y 6.73 Δ OD/min/mg PF para el fruto inmaduro, mientras que Shirsat y Kadam (2015) obtuvieron 1.04 y 0.75 Δ OD/min/mg PF para dos diferentes especies de Cucubitaceas.

Existen pocas investigaciones y muchas contradicciones respecto a las actividades antioxidantes enzimáticas en diferentes estados de maduración de frutos, Jimenez *et al.*, (2002) al evaluar la actividad SOD y CAT en diferentes estados de maduración de *Solanum sp* obtuvieron una disminución de estas actividades al inicio de la maduración, mientras que Masia, (1998) evaluó las mismas enzimas en manzanas durante su maduración y obtuvo un aumento de actividades enzimáticas; por lo que podemos decir que estas variaciones van a depender mucho de la especie, la variedad y las condiciones ambientales a la que se haya expuesto el fruto, además de sistemas

de estrés, que pueden alterar significativamente las actividades enzimáticas (Machín *et al.*, 2017; Wyrwicka & Urbaniak, 2016; Jimenez *et al.*, 2002).

La enzima GST no puede ser comparada con actividades enzimáticas específicas, sin embargo; se observaron diferencias significativas entre el estado maduro e inmaduro del fruto obteniendo mayor actividad en los frutos inmaduros (77.54%) al igual que las otras tres enzimas, por lo que podemos decir que existe una relación entre estas cuatro enzimas y el estado de maduración del fruto. La GST se encarga de catalizar la asociación de sustratos electrofílicos con glutatión reducido, obteniendo productos más polares y menos tóxicos (Wyrwicka & Urbaniak, 2016). En contraste con los resultados obtenidos Rogiers *et al.*, (1998) donde evaluaron la actividad GST en el fruto de *Amelanchier alnifolia* encontrando una mayor actividad GST en el estado maduro.

Las relaciones inversas entre la actividad de los antioxidantes enzimáticos pueden ocasionar una reducción en la concentración de polifenoles totales (biometabolitos secundarios) ubicados más adelante en la misma vía metabólica o en un sistema regulador (Steinhauser *et al.*, 2010); esto respondería al porqué se obtuvo una mayor concentración de antioxidantes no enzimáticos (polifenoles totales) en el fruto maduro que en el fruto inmaduro.

VI. CONCLUSIONES

- La pulpa de *Cucurbita ficifolia* en estado maduro e inmaduro presentan actividad antioxidante enzimática de SOD, CAT, POX y GST.
- *Cucurbita ficifolia* presenta mayor actividad antioxidante enzimática de SOD, CAT, POX y GST en el estado inmaduro que el estado maduro.
- Los frutos maduros presentan mayor capacidad antioxidante de polifenoles totales frente a los frutos inmaduros.
- La actividad antioxidante enzimática de SOD, CAT, POX y GST frente a la capacidad antioxidante de polifenoles totales es inversa entre los frutos maduros e inmaduros.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estos ensayos en diferentes etapas de los estadios maduros e inmaduros de *Cucurbita ficifolia*.
- Sería importante realizar un estudio de la maduración por días de *Cucurbita ficifolia* en la provincia de Carhuaz.
- Se recomienda realizar más estudios acerca de la relación de los estados de maduración de frutos con respecto a la concentración de polifenoles y actividad antioxidantes en *Cucurbita ficifolia*.

VIII. REFERENCIAS

- Abuajah C., Ogbonna A. & Osuji C. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2522–2529. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397330/pdf/13197_2014_Article_1396.pdf
- Andres, T. C. (2019). Biosystematics, theories on the origin, and breeding potential of *Cucurbita ficifolia*. *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*, 102–119. <https://doi.org/10.7591/9781501745447-011>
- Asto, L y Yábar, E. (2019). *Evaluación del contenido de fitoesteroles, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en la harina de semilla de calabaza (Cucurbita ficifolia)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú]. https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/5177/T010_23647802_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Barrientos, L., Lourdes, M., Salcedo, E., Villanueva, S., Vargas, J., Barradas, B. y Ruiz, M. (2018). Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodifolia* Lam. silvestre y cultivo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(51), 182-200. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v10n51/2007-1132-remcf-10-51-182.pdf>
- Bautista, R. (2020). *Análisis fisico-químico y evaluación de compuestos bioactivos en extractos de chilacayote (Cucurbita ficifolia Bouché)*. [Tesis de pregrado, Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio]. https://rinacional.tecnm.mx/bitstream/TecNM/3680/1/TESIS_RAFAEL%20BV.pdf

- Bazalar, J. (2018). Capacidad antioxidante de la pulpa de mango (*Mangifera indica* L.). In *Crescendo*, 9(1), 33–39. <http://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo/article/view/1882/1461>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>
- Carbajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1). <https://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v36n1/2215-5287-mlcr-36-01-91.pdf>
- Castillo, J., y Moncayo, S. (2019). Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 13(2), 92–104. <https://doi.org/10.53591/cna.v13i2.1193>
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(7). http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014
- De Araújo, R., De Oliveira, P., De Oliveira, L., Medeiros, A. & Torres, L. (2010). Antioxidantes e sua importância na alimentação. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 5(5), 26–30. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7465340.pdf>
- Delgado, G., Rojas, C., Sencie, A. y Vasquez, L. (2014). Caracterización de frutos y semillas de algunas cucurbitáceas en el norte del. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(1), 7–20. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v37n1/v37n1a4.pdf>

- De Oliveira, A., Valentim, B., Goulart, M., Silva, A., Bechara, H. & Trevisan, S. (2009). Vegetals as natural sources of antioxidants. *Quimica Nova*, 32(3), 689–702. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300013>
- Elanthendral, R., Bhuvanewari, S. & Gayathri, K. (2020). Phytochemical analysis and In-vitro anti-oxidant activity of hydroalcoholic extract from tender coconut mesocarp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(4), 1850-1858. https://ijpsr.com/?action=download_pdf&postid=61794
- Gonzales, G., Triana, L., Smith, M., Tovar, A., Cabello, R., Ucerro, C., Navarro, M., Camacho, M., Vicci, H., Lizardo, M., y López, M. (2017). Enzimas antioxidantes y marcadores de peroxidación lipídica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Comunidad y Salud*, 15(2), 1–13. <https://www.redalyc.org/pdf/3757/375754623002.pdf>
- Guija-Guerra, H. y Guija-Poma, E. (2023). Radicales libres y sistema antioxidante. *Horizonte Médico*, 23(2). <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v23n2/1727-558X-hm-23-02-e2158.pdf>
- Hidalgo, D. y Nuñez, S. (2021). *Determinación de la estabilidad oxidativa y capacidad antioxidante del aceite de semilla de Cucurbita máxima y Cucurbita ficifolia*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Santa]. <http://repositorio.uns.edu.pe/handle/UNS/3654>
- Hidalgo, P., Tuya, E., Figueroa, R. y Norabuena, J. (2013). *Caracterización de los sistemas agroforestales y sus bienes y servicios ambientales como estrategia de adaptación al cambio climático en el callejón de Huaylas - Ancash, 2012*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo]. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/2307>
- Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeyen, M. & Mullineaux, P. (2002). Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during

- tomato fruit ripening. *Planta*, 214(5), 751-758.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11882944/>
- Lim, T. (2012). *Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 2, Fruits*. Springer Science. New York.
[https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkozje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1553668](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkozje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1553668)
- Lin, C., Ying-Mei, W. & Gui-Ju, S. (2022). Variations of antioxidant properties and enzymes activities during the whole fruit fermentation of two kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.). *International Journal of Fruit Science*, 22(1), 860–871.
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/15538362.2022.2144983?needAccess=true&role=button>
- Lück, H. (1965). Catalasa. *Métodos de análisis enzimático*, 885–894.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50158-4>
- Machín, A., Chávez, E., Héctor, E., Santos, M. y Perez, S. (2017). Actividad de enzimas del estrés oxidativo en plantas de tomate cv. Amalia en respuesta al plomo. *Horticultura Brasileira*, 35(2), 216–223. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620170210>
- Macedo, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97–103. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2012000200003
- Martínez, M., Cruz, O., Colinas, M., Rodríguez, J. y Ramírez, S. (2013). Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita*. L.) almacenada bajo refrigeración.

Agronomía Mesoamericana, 24(1), 57-69.

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212013000100006

Masia, A. (1998). Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 668–672. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040421.x>

Mendoza, D. y Mendoza, S. (2022). *Caracterización fisicoquímica y estudio de las propiedades estructurales y tecnofuncionales del aislado proteico del subproducto de la extracción de aceite de semillas de calabaza (Cucurbita argyrosperma Huber)*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química]. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/3502/1/FQMAC-290743-0322-322-Daniel%20Alberto%20Mendoza%20Garc%C3%ADa%20%20%20%20-A.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

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://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8231950/>

Montávez, I. (s.f.). Sistema de recolección, extracción y limpieza de semillas. *Material Vegetal de Reproducción: Manejo, conservación y tratamiento*, 83-106. http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/80-402_MATERIAL_VEGETAL_DE_REPRODUCCION_MANEJO_CONSERVACION_Y_TRATAMIENTO/80-

[402/3 SISTEMAS DE RECOLECCION, EXTRACCION Y LIMPIEZA DE SEMILAS.PDF](#)

- Moya, A., Bosquez, E., Blancas, G. y Verde, J. (2019). Caracterización fisiológica y bioquímica de *Cucurbita ficifolia* Bouché durante su desarrollo. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 332–338. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/3/44.pdf>
- Quintanar, M. y Calderón, J. (2008). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101. <https://www.redalyc.org/pdf/490/49016098004.pdf>
- Rodrigues, H., Diniz, Y., Faine, L., Almeida, J., Fernandes, A. & Novelli, E. (2003). Nutritional supplementation with natural antioxidants: Effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. *Revista de Nutricao*, 16(3), 315–320. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732003000300009>
- Rosas, C. (2011). *Contenido de compuestos bioactivos y su contribución a la capacidad antioxidante durante la maduración de piña cv. "Esmeralda"*. [Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C]. https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/179/1/Rosas%20Dominguez_2011_MC.pdf
- Rogiers, S., Kumar, G., & Knowles, R. (1998). Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Annals of Botany*, 81(2), 203–211. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0543>

- Serra, J., Melero, J., Martínez, G y Fagoaga, C. (2020). Especies vegetales como antioxidantes de alimentos. *Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 71–90. <https://doi.org/10.46583/nereis>
- Servicio de Información sobre Biodiversidad Mundial (GBIF). (2014). *Cucurbita ficifolia Bouché*. <https://www.gbif.org/occurrence/3386044259>
- Shirsat, S. & Kadam, A. (2015). Analysis of tissue specific digestive and antioxidant enzymes from *Cucurbita pepo* and *Langenaria siceraria* (Molina) Standl. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7(2). https://www.researchgate.net/publication/275637727_ANALYSIS_OF_TISSUE_SPECIFIC_DIGESTIVE_AND_ANTIOXIDANT_ENZYMES_FROM_CUCURBITA_PEPPO_AND_LANGENARIA_SICERARIA_MOLINA_STANDL/link/5540b1960cf23222272f374b/download
- Sigma-Aldrich. (2020). *Catalase assay kit*. (Boletín técnico). Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/280/319/cat100bul.pdf>
- Sigma-Aldrich. (2022). *Peroxidase activity assay kit*. (Boletín técnico). Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.cn/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/399/308/mak092pis-mk.pdf>
- Steinhauser, M., Steinhauser, D., Koehl, K., Carrari, F., Gibon, Y., Fernie, R. & Stitt, M. (2010). Enzyme activity profiles during fruit development in tomato cultivars and *Solanum pennellii*. *Plant Physiology*, 153(1), 80-98. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862428/>

Staveckienė, J., Kulaitienė, J., Levickienė, D., Vaitkevičienė, N. & Vaštakaitė-Kairienė, V. (2023).

The effect of ripening stages on the accumulation of polyphenols and antioxidant activity of the fruit extracts of *Solanum* species. *Plants*, 12(14).

<http://dx.doi.org/10.3390/plants12142672>

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257627/#:~:text=Phytochemicals%2C%20especially%20polyphenols%2C%20are%20the,an%20electron%20or%20hydrogen%20atom.>

Valderrama, J. (2014). *Determinación de la actividad catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en embriones de yamú (Brycon amazonicus) conservados a -14 °C*. [Tesis de pregrado, Universidad de La Salle].

https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/260?utm_source=ciencia.lasalle.edu.co%2Fzootecnia%2F260&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages

Wang, X., Wang, G., Wang, Z., Wang, Y. & Huang, R. (2019). Purification and characterization of peroxidase from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Journal Processing and Preservation*.

[10.1111/jfpp.13977](https://doi.org/10.1111/jfpp.13977)

Wyrwicka, A. & Urbaniak, M. (2016). The different physiological and antioxidative responses of zucchini and cucumber to sewage sludge application. *PLoS ONE*, 11(6), 1–17.

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157782>

Yadav, D., Chauhan, P. S., Mishra, M. & Kwak, M. (2020). Potential health benefits of *Cucurbita ficifolia*: An updated review. *Progress in Nutrition*, 22(3).

<https://doi.org/10.23751/pn.v22i3.8542>

IX. ANEXOS

Anexo A. Permiso para el muestreo de 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 Diana Yasmín Palomino Reyes identificada con DNI 74318489, para la realización y desarrollo de proyectos 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 identificación de la especie



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

Anexo C. Panel fotográfico de la obtención de la muestra para las evaluaciones correspondientes

