UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA

Trabajo de titulación previo a la obtención del grado de Biólogo

Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* **H.C. Cutler & Whitaker**

AUTOR: Jhon Esteban Castillo Jalca

TUTOR: Blgo. Xavier Cornejo, M.Sc.

GUAYAQUIL, OCTUBRE, 2019

Universidad de Guayaquil

ANEXO 4

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Guayaquil, 13 de agosto de 2019

Blga. Dialhy Coello, Mgs.
DIRECTORA DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. -

De mis consideraciones:

Envío a usted el informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación **Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker**, del estudiante **Jhon Esteban Castillo Jalca**, indicando que ha cumplido con todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes:

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado del porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que el estudiante **Jhon Esteban Castillo Jalca** está apto para continuar el proceso de titulación de revisión final.

Atentamente,

_____

Blgo. Xavier Cornejo, M.Sc.
TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
C.I. 0910758366

Universidad de Guayaquil

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

ANEXO 5

RÚBRICA DE EVALUACIÓN TRABAJO DE TITULACIÓN RÚBRICA DE EVALUACIÓN TRABAJO DE TITULACIÓN

Título del Trabajo: Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker
Autor: Jhon Esteban Castillo Jalca

ASPECTOS EVALUADOS	**PUNTAJE MÁXIMO**	**CALF.**
ESTRUCTURA ACADÉMICA Y PEDAGÓGCA	4.5	4.5
Propuesta integra Dominios, Misión y Visión de la Universidad de Guayaquil.	0.3	0.3
Relación de la pertinencia con las líneas y sublíneas de investigación de la Universidad de Guayaquil, Facultada de Ciencias Naturales, Escuela de Biología.	0.4	0.4
Base conceptual cumple con las fases de comprensión, interpretación, explicación y sistematización en la resolución de un problema.	1.0	1.0
Coherencia en relación con los modelos de actuación profesional, problemática, tensiones y tendencias de la profesión, problemas a encarar, prevenir o solucionar de acuerdo al PND-BV	1.0	1.0
Evidencia el logro de capacidades cognitivas relacionadas al modelo educativo como resultados de aprendizaje que fortalecen el perfil de la profesión.	1.0	1.0
Responde como propuesta innovadora de investigación al desarrollo social o tecnológico	0.4	0.4
Responde a un proceso de investigación-acción, como parte de la propia experiencia educativa y de los aprendizajes adquiridos durante la carrera	0.4	0.4
RIGOR CIENTÍFICO	4.5	4.5
El título identifica de forma correcta los objetivos de la investigación	1.0	1.0
La introducción expresa los antecedentes del tema, su importancia dentro del contexto general, del conocimiento y de la sociedad, así como, del campo al que pertenece, aportando significativamente a la investigación.	1.0	1.0
El objetivo general, los objetivos específicos y el marco metodológico están en correspondencia	1.0	1.0
El análisis de la información se relaciona con datos obtenidos y permite expresar las conclusiones en correspondencia a los objetivos específicos	0.8	0.8
Actualización y correspondencia con el tema, de las citas y referencias bibliográficas	0.7	0.7
PERTINENCIA E IMPACTO SOCIAL	1.0	1.0
Pertinencia de la investigación	0.5	0.5
Innovación de la propuesta proponiendo una solución a un problema relacionado con el perfil de egreso profesional	0.5	0.5
CALIFICACIÓN TOTAL* **10**		10
*El resultado será promediado con la calificación del Tutor Revisor y con la calificación obtenida en la Sustentación oral.		

_____

Blgo. Xavier Cornejo, M.Sc.
DOCENTE TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
C.I. 0910758366

FECHA: 13 de Agosto del 2019

Universidad de Guayaquil

ANEXO 6

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado Francisco Xavier Cornejo Sotomayor, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por Jhon Esteban Castillo Jalca, C.C.: 0950687145, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Biólogo.

Se informa que el trabajo de titulación **Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker**, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio (URKUND) quedando el 2% de coincidencia.

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document:	Tesis_Castillo_Urkund.docx (D54804880)
Submitted:	8/13/2019 10:23:00 PM
Submitted By:	emilio.cucalonz@ug.edu.ec
Significance:	2 %

Sources included in the report:

Trabajo de titulacion Viviana Valdez Urkund.docx (D48152160)

Instances where selected sources appear:

URKUND Tesis_Castillo_Urkund.docx (D54804880)

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES CARRERA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE BIÓLOGO

ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA EN EXTRACTOS DE Cucurbita ecuadorensis H.C. Cutler & Whitaker

Autor Jhon Esteban Castillo Jalca

Tutor Blgo. Xavier Cornejo, M.Sc.

GUAYAQUIL, 2019

© Derechos de Autor Jhon Esteban Castillo Jalca 2019

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación está dedicado a mis tres pilares fundamentales: a la mujer más inteligente y amorosa que he conocido en mi vida, para el hombre más perseverante y valiente del planeta, sin olvidar a la niña más hermosa que han visto mis ojos. Madre, padre y hermana, esta tesis logró ser realizada gracias a la bendición de Dios y con el apoyo de ustedes.

_____

Blgo. Xavier Cornejo, M.Sc.
DOCENTE TUTOR
C.I.: 0910758366

Universidad de Guayaquil

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

ANEXO 7

Guayaquil, 26 de agosto del 2019
Blga. Dialhy Coello, Mgs.
DIRECTORA (e) DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H. C. Cutler & Whitaker del estudiante Jhon Esteban Castillo Jalca. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de 15 palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo 10 años.
- La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que el estudiante Jhon Esteban Castillo Jalca está apto para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,

_____

Blga. Mónica Armas Soto, MSc.
DOCENTE TUTOR REVISOR
C.I. 0907686240

Universidad de Guayaquil

ANEXO 8

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

RÚBRICA DE EVALUACIÓN MEMORIA ESCRITA TRABAJO DE TITULACIÓN

Título del Trabajo: Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H. C. Cutler & Whitaker
Autor(s): Jhon Esteban Castillo Jalca

ASPECTOS EVALUADOS	PUNTAJE MÁXIMO	CALF.	COMENTARIOS
ESTRUCTURA Y REDACCIÓN DE LA MEMORIA	**3**	**3**	
Formato de presentación acorde a lo solicitado	0.6	0.6	
Tabla de contenidos, índice de tablas y figuras	0.6	0.6	
Redacción y ortografía	0.6	0.6	
Correspondencia con la normativa del trabajo de titulación	0.6	0.6	
Adecuada presentación de tablas y figuras	0.6	0.6	
RIGOR CIENTÍFICO	**6**	**6**	
El título identifica de forma correcta los objetivos de la investigación	0.5	0.5	
La introducción expresa los antecedentes del tema, su importancia dentro del contexto general, del conocimiento y de la sociedad, así como del campo al que pertenece	0.6	0.6	
El objetivo general está expresado en términos del trabajo a investigar	0.7	0.7	
Los objetivos específicos contribuyen al cumplimiento del objetivo general	0.7	0.7	
Los antecedentes teóricos y conceptuales complementan y aportan significativamente al desarrollo de la investigación	0.7	0.7	
Los métodos y herramientas se corresponden con los objetivos de la investigación	0.7	0.7	
El análisis de la información se relaciona con datos obtenidos	0.4	0.4	
Factibilidad de la propuesta	0.4	0.4	
Las conclusiones expresan el cumplimiento de los objetivos específicos	0.4	0.4	
Las recomendaciones son pertinentes, factibles y válidas	0.4	0.4	
Actualización y correspondencia con el tema, de las citas y referencia bibliográfica	0.5	0.5	
PERTINENCIA E IMPACTO SOCIAL	**1**	**1**	
Pertinencia de la investigación/ Innovación de la propuesta	0.4	0.4	
La investigación propone una solución a un problema relacionado con el perfil de egreso profesional	0.3	0.3	
Contribuye con las líneas / sublíneas de investigación de la Carrera/Escuela	0.3	0.3	
CALIFICACIÓN TOTAL*	**10**	**10**	

***** El resultado será promediado con la calificación del Tutor y con la calificación de obtenida en la Sustentación oral

_____

Blga. Mónica Concepción Armas S, MSc.
DOCENTE TUTOR REVISOR
No. C.I. 0907686240

FECHA: 26 de agosto del 2019

Universidad de Guayaquil

ANEXO 10

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Presidencia de la República del Ecuador | Plan Nacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Saberes | SENESCYT Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN

TÍTULO Y SUBTÍTULO:	Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker		
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Jhon Esteban Castillo Jalca		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Francisco Xavier Cornejo Sotomayor		
INSTITUCIÓN:	Universidad de Guayaquil		
UNIDAD/FACULTAD:	Facultad de Ciencias Naturales		
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:	Biología		
GRADO OBTENIDO:	Biólogo		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	Octubre, 2019	**No. DE PÁGINAS:**	80
ÁREAS TEMÁTICAS:	Desarrollo biotecnológico, conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y adaptación al cambio climático.		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Actividad antioxidante, actividad antibacteriana, *Cucurbita ecuadorensis*.		

RESUMEN/ABSTRACT (150-250 palabras):
Los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker, una especie endémica de los bosques secos de la costa de Ecuador, fueron alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos, esteroles y cumarinas, mientras que las quinonas, antraquinonas y saponinas estuvieron ausentes. El mesocarpio del fruto de esta especie presentó contenidos de 9.19 ± 0.25 g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco, 14.90 ± 0.30 g de lípidos totales/ 100 g de peso seco y 3.39 ± 0.08 g de proteínas totales/ 100 g de peso seco, respectivamente. El mayor contenido fenólico fue para el extracto etanólico de los frutos con 20.82 ± 0.87 mg de GAE /g de extracto seco. El mayor contenido de flavonoides totales fue para el extracto etanólico de los frutos con 134.36 ± 0.34 mg de CE/ g de extracto seco. El extracto etanólico del fruto revelo la mayor capacidad antioxidante con IC50= 1.90 mg/mL. Todos los extractos evaluados de esta especie, no presentaron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* y *Listeria monocytogenes*. En base a estos resultados, los frutos de *C. ecuadorensis* se los puede considerar como un suplemento nutricional con un potencial antioxidante natural.

ADJUNTO PDF:	X	SI		NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	**Teléfono:** 0986607662		E-mail: jhon.castilloj@ug.edu.ec	
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	**Nombre:** Universidad de Guayaquil			
	Teléfono: (04) 3080777 - 3080758			
	E-mail: info@fccnngye.com			

Universidad de Guayaquil

ANEXO 11

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Guayaquil, 26 de agosto del 2019

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR

Habiendo sido nombrado Xavier Cornejo Sotomayor, tutor del trabajo de titulación Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H. C. Cutler & Whitaker certifico que, el presente trabajo de titulación, elaborado por Jhon Esteban Castillo Jalca, con C.I. No. 0950687145, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Biólogo en la Carrera de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

_____

Blga. Mónica Armas Soto, MSc.
DOCENTE TUTOR REVISOR
C.I. No: 0907686240

Universidad de Guayaquil

ANEXO 12

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES ACADÉMICOS

Yo, Jhon Esteban Castillo Jalca con C.I. No. 0950687145, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker son de mi absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.

_____

Jhon Esteban Castillo Jalca
C.I. No. 0950687145

Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker

Autor: Jhon Esteban Castillo Jalca

Tutor: Blgo. Xavier Cornejo Sotomayor, M.Sc.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el tamizaje fitoquímico, se cuantificaron los contenidos de fenoles y flavonoides totales, se evaluaron la actividad antioxidante y actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp*. spizizenii* y *Listeria monocytogenes*, de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker, una especie endémica de los bosques secos de la costa de Ecuador. Además, se cuantificaron los contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas en el mesocarpio del fruto de esta especie**.** Los metabolitos secundarios presentes en todos los extractos evaluados de *C. ecuadorensis,* fueron alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos, esteroles y cumarinas, mientras que las quinonas, antraquinonas y saponinas estuvieron ausentes. El mesocarpio del fruto de esta especie presentó contenidos de 9.19 ± 0.25 g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco, 14.90 ± 0.30 g de lípidos totales/ 100 g de peso seco y 3.39 ± 0.08 g de proteínas totales/ 100 g de peso seco, respectivamente. El mayor contenido fenólico fue para el extracto etanólico de los frutos con 20.82 ± 0.87 mg de GAE /g de extracto seco. El mayor contenido de flavonoides totales fue para el extracto etanólico de los frutos con 134.36 ± 0.34 mg de CE/ g de extracto seco. El extracto etanólico del fruto revelo la mayor capacidad antioxidante con IC_{50}= 1.90 mg/mL. La presencia de fenoles, flavonoides, terpenoides y cumarinas podrían contribuir a dicha actividad. Todos los extractos evaluados de esta especie, no presentaron actividad antibacteriana

contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp*. spizizenii* y *Listeria monocytogenes*. Estos resultados revelaron información importante sobre la capacidad de eliminar radicales libres y el elevado contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas que poseen los frutos de *Cucurbita ecuadorensis,* por lo tanto, se los puede considerar como un suplemento nutricional con un potencial antioxidante natural. Este trabajo podría considerarse como el primer registro sobre el tamizaje fitoquímico, contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas, el contenido de fenoles y flavonoides, la actividad antioxidante y actividad antibacteriana de *Cucurbita ecuadorensis*.

Palabras claves: 2,2-Difenil-l-Picrilhidrazilo (DPPH), actividad antioxidante, actividad antibacteriana, *Cucurbita ecuadorensis,* tamizaje fitoquimico

Biological activity and chemical composition in extracts of *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker

Author: Jhon Esteban Castillo Jalca
Advisor: Blgo. Xavier Cornejo Sotomayor, M.Sc.

ABSTRACT

In the present work, phytochemical screening was performed, total phenol and flavonoid contents were quantified, antioxidant activity and antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Listeria monocytogenes*, in the ethanolic and chloroform extracts of the fruits and leaves of *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker, an endemic species of the dry forests of the coast of Ecuador. In addition, the total carbohydrate, lipid and protein contents were quantified in the mesocarp of fruits of this species. The secondary metabolites present in all evaluated extracts of *C. ecuadorensis*, were alkaloids, flavonoids, tannins, triterpenes, sterols and coumarins; while quinones, anthraquinones and saponins were absent. The mesocarp of fruits presented contents of 9.19 ± 0.25 g of total carbohydrates/ 100 g of dry weight, 14.90 ± 0.30 g of total lipids/ 100 g of dry weight and 3.39 ± 0.08 g of total proteins/ 100 g of weight dry, respectively. The highest phenolic content was for the ethanolic extract of fruits with 20.82 ± 0.87 mg GAE/ g dry extract. The highest content of total flavonoids was for the ethanolic extract of fruits with 134.36 ± 0.34 mg CE/ g dry extract. The ethanolic extract of fruits revealed the highest antioxidant capacity with IC50 = 1.90 mg/ mL. The presence of phenols, flavonoids, terpenoids and coumarins could contribute to this activity. All evaluated extracts

of this species did not present antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Listeria monocytogenes*. These results revealed important information the ability to eliminate free radicals and the high total carbohydrate lipids and proteins that the fruits of *Cucurbita ecuadorensis* contain. Those could be regarded as a nutritional supplement with a natural antioxidant potential. This work could be considered as the first record of phytochemical screening, the total contents of carbohydrates, lipids and proteins, the total contents of phenols and flavonoids, the antioxidant activity and antibacterial activity of *Cucurbita ecuadorensis*.

Keywords: 2,2-Diphenyl-l-Picrylhydrazyl (DPPH), antioxidant activity, antibacterial activity, *Cucurbita ecuadorensis*, phytochemical scree

© Derechos de autor

Jhon Esteban Castillo Jalca

2019

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

En mi calidad de Tutor de este Trabajo de Titulación Certifico que, el presente trabajo ha sido elaborado por el señor Jhon Esteban Castillo Jalca por lo cual autorizo su presentación.

_____

Blgo. Francisco Xavier Cornejo Sotomayor, M.Sc
Director del Trabajo de Titulación

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación está dedicado a mis tres pilares fundamentales: a la mujer más inteligente y amorosa que he conocido en mi vida, para el hombre más perseverante y valiente del planeta, sin olvidar a la niña más hermosa que han visto mis ojos. Madre, padre y hermana, esta tesis logró ser realizada gracias a la bendición de Dios y con el apoyo de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme las bendiciones, fortalezas y capacidades que me ayudaron a seguir adelante y superar cada problema.

A mis amados padres y hermana que son mis inspiraciones, fuerzas y motivaciones, que me brindaron el sustento y apoyo moral e incondicional para poder lograr cumplir un objetivo más en mi vida.

Agradezco a la Universidad de Guayaquil por permitirme realizar esta tesis en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales (2017-2018)

Agradezco a los colegas Shirley Moncayo, Jaime Santos y Leonardo García, que formaron parte del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales (2010-2019), por haberme brindado su confianza, apoyo y aporte para adquirir el dominio técnico-científico en las áreas correspondientes para poder realizar esta tesis.

A mi tutor de tesis, Biólogo Xavier Cornejo Sotomayor, M.Sc., siempre estaré agradecido por haberme brindado su apoyo en momentos de gran dificultad, también por impartirme sus consejos, conocimientos botánicos, para poder aprovechar las oportunidades que se me presenten y obtener experiencia requerida para mi vida profesional.

Por último, pero no menos importante, a mi colega, la Bióloga Viviana Valdez, por su colaboración al trabajar conjuntamente en el área de Fotoquímica.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I 1
1. INTRODUCCIÓN 1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 3
3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA 5
4. HIPÓTESIS 7
5. OBJETIVOS 7
5.1. Objetivo general 7
5.2. Objetivos específicos 7
CAPITULO II 8
6. ANTECEDENTES 8
7. MARCO TEÓRICO 13
7.1. Descripción botánica y taxonómica de *Cucurbita ecuadorensis* 13
7.1.1. Ecología 14
7.2. Tamizaje fitoquímico 14
7.3. Metabolitos Secundarios 15
7.3.1. Alcaloides 15
7.3.2. Taninos 16
7.3.3. Flavonoides 18
7.3.4. Cumarinas 19
7.3.5. Triterpenos y esteroles 20
7.3.6. Quinonas 21
7.4. Actividad antioxidante 22
7.4.1. Fundamento de la técnica de eliminación de radicales libres de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) 22
7.4.2. Fundamento de la cuantificación de fenoles 23
7.4.3. Fundamento de la cuantificación de flavonoides 24
7.5. Actividad antibacteriana 24
7.5.1. Mecanismo de acción de los taninos como antibacterianos 24
7.5.2. Mecanismo de acción de flavonoides como antibacterianos 25
7.5.3. Mecanismo de acción de alcaloides como antibacterianos 25
7.5.4. Mecanismo de acción de cumarinas como antibacterianos 25
7.5.5. Mecanismo de acción de quinonas como antibacterianos 25
CAPITULO III 26
8. MATERIALES Y MÉTODOS 26

8.1. Material biológico 26
8.2. Procesamiento del material vegetal 26
8.3. Tamizaje fitoquímico 26
8.3.1. Determinación de alcaloides. 26
8.3.2. Determinación de flavonoides. 27
8.3.3. Determinación de saponinas. 27
8.3.4. Determinación de quinonas y antraquinonas. 27
8.3.5. Determinación de esteroides y triterpenos. 28
8.3.6. Determinación de taninos. 28
8.3.7. Determinación de cumarinas. 28
8.4. Cuantificación de carbohidratos, proteínas y lípidos 28
8.4.1. Extracción y cuantificación de carbohidratos totales. 28
8.4.2. Extracción y cuantificación de proteínas totales. 29
8.4.3. Extracción y cuantificación de lípidos totales. 29
8.5. Cuantificación de flavonoides y fenoles totales 30
8.5.1. Cuantificación de flavonoides totales. 30
8.5.2. Cuantificación de fenoles totales. 30
8.6. Actividad Antioxidante 31
8.6.1. Preparación del DPPH y ácido ascórbico. 31
8.6.2. Preparación del extracto. 31
8.6.3. Procedimiento. 31
8.6.4. Cálculos del porcentaje de inhibición. 31
8.7. Actividad antibacteriana 32
8.7.1. Condiciones de cultivo 32
8.7.2. Evaluación de la actividad antibacteriana 32
8.8. Análisis estadístico 33
CAPITULO IV 34
9. RESULTADOS 34
9.1. Tamizaje fitoquímico 34
9.2. Cuantificación de carbohidratos, lípidos y proteínas 36
9.3. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales 37
9.3.1. Cuantificación de fenoles totales 37
9.3.2. Cuantificación de flavonoides totales 38
9.4. Actividad antioxidante 39
9.5. Actividad antibacteriana 41

10. DISCUSIÓN 43
10.1. Tamizaje fitoquímico 43
10.2. Contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas 45
10.3. Contenidos totales de fenoles y flavonoides 46
10.3.1. Contenidos de fenoles totales 46
10.3.2. Contenidos de flavonoides totales 47
10.4. Actividad antioxidante 48
10.5. Actividad antibacteriana 51
11. CONCLUSIONES 53
12. RECOMENDACIONES 55
13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 56
14. ANEXOS 71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antibióticos utilizados como control positivo contra bacterias Gram negativas (*) y Gram positivas. 33

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de extractos etanólicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*. 35

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de extractos clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*. 35

Tabla 4. Contenidos de fenoles totales determinados en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*. 37

Tabla 5. Contenidos de fenoles totales determinadas en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*. 38

Tabla 6. Porcentaje de inhibición y IC_{50} de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis.* 40

Tabla 7. Actividad antibacteriana contra tres bacterias Gram negativas (**) y tres Gram positivas (*). 42

Tabla 8. Tabla comparativa de los contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de las especies de Cucurbitaceae de uso alimenticio y/o medicinal 45

Tabla 9. Tabla comparativa de los contenidos de fenoles totales en los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal 47

Tabla 10. Tabla comparativa de los contenidos de Flavonoides totales en los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal 48

Tabla 11. Tabla comparativa de los contenidos de Flavonoides totales en las hojas de *Cucurbita ecuadorensis* con las hojas de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal 48

Tabla 12. Tabla comparativa de la actividad y capacidad antioxidante de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal 49

Tabla 13. Tabla comparativa de la actividad y capacidad antioxidante en las hojas de *Cucurbita* ecuadorensis con los hojas de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal 50

Tabla 14. Tabla comparativa de la actividad antibacteriana de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal 52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hojas (a) y fruto (b) de *Cucurbita ecuadorensis.* Fuente: autor. 14

Figura 2. Esquematización de las rutas biosintéticas de diversas moléculas orgánicas para la formación de los metabolitos secundarios en las plantas. Obtenido de Ávalos y Pérez (2009). 15

Figura 3. Estructura básica de los alcaloides. Obtenido de Martínez, Domínguez y Vargas (2009). 16

Figura 4. Estructuras de un tipo de tanino. Obtenido de García, Fernández, Fuentes (2015). 17

Figura 5. Esquematización de las reacciones de taninos en contacto a iones hierro. Obtenido de Ochoa y Sarmiento (2018). 17

Figura 6. Estructura básica y tipos de flavonoides. Obtenido de Arango (2008). 18

Figura 7. Reacción química de los flavonoides en contacto con el ácido clorhídrico y fragmentos de magnesio. Obtenido de Delporte (2010). ... 19

Figura 8. Biosíntesis de la ciclación del escualeno para la formación de Triterpenos. Obtenido de Kushiro y Ebizuka (2010). 20

Figura 9. Reacción química de triterpenos y esteroles ante el ácido sulfúrico y anhídrido acético. Obtenido de Ardilla (2014). 21

Figura 10. Estructura básica y clasificación de quinonas de acuerdo a su naturaleza química. Obtenido de Leyva, Loredo, López, Escobedo y Navarro (2017). 21

Figura 11. Reacción química entre el DPPH y un agente antioxidante. Obtenido de Moon y Shibamoto (2009). 23

Figura 12. Reacción química de los fenoles ante el reactivo Folin-Ciocalteu. Obtenido de (Muñoz, Torres, Núñez, de la Rosa, García, Ayala y Álvarez, 2017). 23

Figura 13. Formación de complejos lábiles de los flavonoides y flavonas con iones de aluminio. 24

Figura 14. Contenidos totales de carbohidratos (■), proteínas (■) y lipídos (■), determinadas en la biomasa seca del mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis*. 36

Figura 15. Curva de calibración de ácido gálico (GAE) para la determinación de contenidos de fenoles totales de los extractos etanólicos y cloroformicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*. 37

Figura 16. Curva de calibración de quercetina (CE) para la determinación de contenidos de flavonoides totales de los extractos etanólicos y cloroformicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*. 38

Figura 17. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* comparadas con el ácido ascórbico. 39

Figura 18. Comparación de los porcentajes de inhibición del DPPH (actividad antioxidante) frente a los contenidos de fenoles totales (mg GAE/ g; línea café) de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis.* 41

Figura 19. Comparación de los porcentajes de inhibición del DPPH (actividad antioxidante), frente a los contenidos de flavonoides totales (mg CE/ g; línea roja) de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*. 41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Secado (a, b) y maceración (c) del mesocarpio de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis*. 71

Anexo 2. Extractos etanólicos del mesocarpio del fruto (a) y hojas (b), después de cinco días de reposo en oscuridad a temperatura ambiente. 71

Anexo 3. Concentración de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* en un rotavapor Buchi r-3..... 72

Anexo 4. Obtención del extracto clorofórmico de los frutos (a, b, c) y hojas (d, e, f) de *Cucurbita ecuadorensis*, observándose una extracción líquido-líquido. 72

Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales utilizando quercetina (CE) como estándar. 73

Anexo 6. Determinación de flavonoides mediante la prueba de shinoda, (a) control negativo, (b) positivo para flavonoles. 73

Anexo 7. Determinación de taninos mediante la prueba $FeCl_3$ 10%: (a) control negativo en frutos, (b) positivo para taninos condensados en frutos, (c) control negativo en hojas, (d) positivo para taninos condensados en hojas. 74

Anexo 8. Determinacion positiva para cumarinas: (a; flecha) fluorescencia celeste, mediante la determinación de luz UV. 74

Anexo 9. Determinación de esteroles mediante la prueba de Salkoswki: (a) control negativo, (b) positivo para esteroles. 75

Anexo 10. Cuantificación de fenoles totales mediante la metodología de Folin-Cicalteou. 75

Anexo 11. Cuantificación de flavonoides totales por el método colorimétrico de cloruro de aluminio. 76

Anexo 12. Actividad antioxidante del ácido ascórbico, comparado a los extractos etanólicos (b) y clorofórmicos (c) de los frutos y extractos etanólicos (d) y clorofórmicos (e) de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis*..... 76

Anexo 13. Diferentes concentraciones del extracto etanólico de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis*, para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}). 77

Anexo 14. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto etanólico del mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis*. 77
Anexo 15. Diferentes concentraciones del extracto clorofórmico de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis*, para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}). 78
Anexo 16. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto clorofórmico del mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis.* 78
Anexo 17. Diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis,* para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}). 79
Anexo 18. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto etanólico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis*..... 79
Anexo 19. Diferentes concentraciones del extracto clorofórmico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis,* para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}). 80
Anexo 20. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto clorofórmico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis*..... 80

LISTA DE SIMBOLOS

nm: Nanómetros

rpm: Revoluciones por minuto

mm: Milímetros

mM: Milimolar

UFC: Unidad Formadora de Colonia

µL: Microlitros

µg: Microgramos

ATTCC: American Type Culture Collection

°C: grados centígrados

%: porcentaje

mg/mL: miligramos por mililitros

g: gramos

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el tamizaje fitoquímico, se cuantificaron los contenidos de fenoles y flavonoides totales, se evaluaron la actividad antioxidante y actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp*. spizizenii* y *Listeria monocytogenes*, de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker, una especie endémica de los bosques secos de la costa de Ecuador. Además, se cuantificaron los contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas en el mesocarpio del fruto de esta especie**.** Los metabolitos secundarios presentes en todos los extractos evaluados de *C. ecuadorensis,* fueron alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos, esteroles y cumarinas, mientras que las quinonas, antraquinonas y saponinas estuvieron ausentes. El mesocarpio del fruto de esta especie presentó contenidos de 9.19 ± 0.25 g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco, 14.90 ± 0.30 g de lípidos totales/ 100 g de peso seco y 3.39 ± 0.08 g de proteínas totales/ 100 g de peso seco, respectivamente. El mayor contenido fenólico fue para el extracto etanólico de los frutos con 20.82 ± 0.87 mg de GAE /g de extracto seco. El mayor contenido de flavonoides totales fue para el extracto etanólico de los frutos con 134.36 ± 0.34 mg de CE/ g de extracto seco. El extracto etanólico del fruto revelo la mayor capacidad antioxidante con IC_{50}= 1.90 mg/mL. La presencia de fenoles, flavonoides, terpenoides y cumarinas podrían contribuir a dicha actividad. Todos los extractos evaluados de esta especie, no presentaron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp*. spizizenii* y *Listeria monocytogenes*. Estos resultados revelaron información importante sobre la capacidad de eliminar radicales libres y el elevado contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas que poseen los frutos de *Cucurbita ecuadorensis,* por lo tanto, se los puede considerar como un suplemento nutricional con un potencial antioxidante natural. Este trabajo podría considerarse como el primer registro sobre el tamizaje fitoquímico, contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas, el contenido de fenoles y flavonoides, la actividad antioxidante y actividad antibacteriana de *Cucurbita ecuadorensis*.

Palabras claves: 2,2-Difenil-l-Picrilhidrazilo (DPPH), actividad antioxidante, actividad antibacteriana, *Cucurbita ecuadorensis,* tamizaje fitoquimico

ABSTRACT

In the present work, phytochemical screening was performed, total phenol and flavonoid contents were quantified, antioxidant activity and antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Listeria monocytogenes*, in the ethanolic and chloroform extracts of the fruits and leaves of *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker, an endemic species of the dry forests of the coast of Ecuador. In addition, the total carbohydrate, lipid and protein contents were quantified in the mesocarp of fruits of this species. The secondary metabolites present in all evaluated extracts of *C. ecuadorensis*, were alkaloids, flavonoids, tannins, triterpenes, sterols and coumarins; while quinones, anthraquinones and saponins were absent. The mesocarp of fruits presented contents of 9.19 ± 0.25 g of total carbohydrates/ 100 g of dry weight, 14.90 ± 0.30 g of total lipids/ 100 g of dry weight and 3.39 ± 0.08 g of total proteins/ 100 g of weight dry, respectively. The highest phenolic content was for the ethanolic extract of fruits with 20.82 ± 0.87 mg GAE/ g dry extract. The highest content of total flavonoids was for the ethanolic extract of fruits with 134.36 ± 0.34 mg CE/ g dry extract. The ethanolic extract of fruits revealed the highest antioxidant capacity with IC50 = 1.90 mg/ mL. The presence of phenols, flavonoids, terpenoids and coumarins could contribute to this activity. All evaluated extracts of this species did not present antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Listeria monocytogenes*. These results revealed important information the ability to eliminate free radicals and the high total carbohydrate lipids and proteins that the fruits of *Cucurbita ecuadorensis* contain. Those could be regarded as a nutritional supplement with a natural antioxidant potential. This work could be considered as the first record of phytochemical screening, the total contents of carbohydrates, lipids and proteins, the total contents of phenols and flavonoids, the antioxidant activity and antibacterial activity of *Cucurbita ecuadorensis*.

Keywords: 2,2-Diphenyl-l-Picrylhydrazyl (DPPH), antioxidant activity, antibacterial activity, *Cucurbita ecuadorensis*, phytochemical screening.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

Las primeras culturas del Ecuador que datan del periodo precerámico, obtuvieron información de manera empírica sobre los usos alimenticios, medicinales, tóxicos y otras numerosas propiedades biológicas que poseen las plantas. A partir de estos conocimientos transmitidos de generación en generación y con el avance de la ciencia y tecnología, se dio origen a la fitoquímica, disciplina encargada del estudio de los compuestos químicos en plantas. El objetivo fue encontrar las evidencias de los efectos terapéuticos de las plantas que son utilizadas como medicina tradicional y que poseen propiedades capaces de prevenir o mitigar enfermedades y/o contrarrestar agentes patógenos en los seres vivos (Naranjo y Escaleras, 1995; Valencia, 1995; de la Torre, Navarrete, Muriel, Macías y Balslev, 2008; Torri, 2013).

En las plantas se encuentran muchos compuestos químicos producto del metabolismo primario y secundario, estos son utilizados para insumos alimenticios por poseer propiedades antioxidantes, anticancerígenas antibacterianas, entre otras (Williams, Stone, Hauck y Rahman, 1989; Lock, 1998; Cano, Macías, Pereira, Dranguet, Guzmán y Calzada, 2009), que son valoradas en la industria farmacéutica, debido a que permiten desarrollar medicamentos provenientes de fuentes naturales (Bingham *et al*., 1998; Paganga, Miller y Rice-Evans, 1999; Kuklinski, 2000).

Como producto del metabolismo primario se encuentran los carbohidratos, lípidos y proteínas; estos compuestos que cumplen un rol directo en todo el reino vegetal al ser los responsables de los procesos de biosíntesis que controlan el crecimiento, fotosíntesis, asimilación de nutrientes, entre otros. Estos metabolitos al ser beneficiosos para el consumo humano tienen una gran importancia en el campo biotecnológico, debido a que permiten innovar nuevos recursos de origen natural para producciones industriales (Petiard y Bariaud-Fontanel, 1987; Rivas, Oranday y Verde, 2016; Fang, Fernie y Luo, 2018).

En cambio, los metabolitos secundarios son principios activos que no actúan de manera directa en las plantas, estos se han desarrollado a través de

procesos evolutivos, y poseen importancias ecológicas, entre ellas, contrarrestar agentes patógenos y/o depredadores cuando la planta se encuentra en condiciones adversas (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2004; Ávalos y Pérez, 2009; Kroymann, 2011; Vélez, Campos y Sánchez, 2014). A pesar de ello, algunos de estos compuestos son de alto interés en la industria farmacológica lo que permiten obtener nuevos recursos naturales para fines medicinales, o como repelentes, cosméticos, entre otros, considerándolos de gran importancia social y económica (Miller y Rice-Evans, 1999; Gonzáles y Castro, 2017).

Actualmente, la medicina tradicional es analizada y valorada gracias a la importancia de los compuestos químicos y las propiedades biológicas con potencial medicinal que nos brindan las plantas. Sin embargo, en Ecuador se registran alrededor de 21,400 especies de plantas nativas entre ellas 4173 son endemicas, con escaso estudio fitoquímico que evalúen el alto potencial medicinal o terapéutico que poseen las plantas (Lock, 1998; Neill y Ulloa-Ulloa, 2011; Vogelsang, 2011; Quispillo, 2013; Bailon-Moscoso Romero-Benavides, Tinitana-Imaicela y Ostrosky-Wegman, 2015; Rivas, Oranday y Verde, 2016).

En la provincia de Manabí, los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* son utilizados por los moradores rurales como astringente para aliviar ronchas (de la Torre y Navarrete, 2008). Es por eso que la presente tesis busca ampliar la información acerca de las propiedades terapéuticas de esta especie endémica de la costa de Ecuador y norte de Perú como opción a un nuevo suplemento alimenticio con propiedades terapéuticas naturales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La flora en el Ecuador es muy diversa debido a procesos adaptativos y de coevolución que han ido desarrollando las especies nativas de los Andes (Gentry, 1990; Ulloa Ulloa y Jørgensen, 1995; Jørgensen y León-Yánez, 1999). Jørgensen y León-Yánez (1999) registraron más de 16000 especies de plantas vasculares en Ecuador, posteriormente Neill y Ulloa-Ulloa (2011) adicionaron y actualizaron los nombres de alrededor de 5.400 especies, entre ellas plantas endémicas. De estos datos, se estima que el 60 % de las especies son medicinales y aún se mantiene una fuerte tradición en cuanto a su uso, especialmente por los pueblos indígenas (Naranjo y Escaleras, 1995).

La familia Cucurbitaceae son plantas angiospermas que se distribuye en zonas secas y húmedas del Ecuador (Jørgensen y León-Yánez, 1999). Los primeros habitantes de este país se alimentaban de frutos, hojas, flores y semillas de varias especies de esta familia desde tiempos del precerámico. (Jayaprakasam, Seeram y Nair, 2003; Piperno y Stothert, 2003; de la Torre *et al.,* 2008; Álvarez, 2014). Los compuestos químicos y actividad biológica de los miembros de las Cucurbitaceae son de importancia, estudios realizados a especies de esta familia reportan compuestos con propiedades citotóxicas, antibacterianas, antioxidantes, cicatrizantes, antihelmínticas, hepatoprotectoras, cardiovasculares, antidiabéticas y antinflamatorias (Jayaprakasam, Seeram y Nair, 2003; Caili, Huan y Quanhong, 2006).

A esta familia pertenece *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker (Cutler y Whitaker, 1968), una rastrera-trepadora de frutos grandes que es conocida por su nombre vernáculo como: ‘Chía’ en la provincia de Manabí, ‘Alamama’ o ´Jalamama´, ‘Mate Chino’ en la provincia del Guayas y ‘Malambo’ en la provincia de Esmeraldas (de la Torre *et al.*, 2008). Esta fue semi-domesticada y utilizada como alimento por habitantes de la cultura Las Vegas, hasta su posterior remplazo por *Cucurbita moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir (Piperno, Andres y Stothert, 2000; Pickersgill, 2007; Stothert, 2011).

Según los registros tomados de las colecciones montadas que reposan en los herbarios, los frutos y hojas de *C. ecuadorensis* tienen diversas aplicaciones de uso tradicional en áreas rurales de la costa de Ecuador y noroccidente de Perú, son utilizados para aliviar ronchas en el cuerpo humano, los frutos sirven ocasionalmente para alimentación humana y en la naturaleza son un alimento silvestre preferido por equinos (de la Torre *et al.*, 2008). Sin embargo, en cuanto al conocimiento de sus propiedades fitoquímicas, no se registran estudios en *C. ecuadorensis* que evidencien los compuestos químicos responsables de sus propiedades.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La fitoquímica estudia los metabolitos primarios y secundarios producidos por especies vegetales de interés, mediante el análisis, aislamiento, purificación, y elucidación de las estructuras, además, caracteriza la actividad biológica de diversas sustancias químicas producidas (Valencia, 1995; Lock, 1998). Teniendo en cuenta la riqueza de plantas útiles que posee el Ecuador, se considera necesario realizar los estudios fitoquímicos respectivos para conocer los principios activos, actividad biológica y nutrientes producidos por las especies nativas (de la Torre *et al.,* 2008).

La familia Cucurbitaceae posee fenoles, flavonoides, flavonas, saponinas, taninos, alcaloides, terpenoides, triterpenoides, esteroides; metabolitos con propiedades antioxidantes, antinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, , en general (De Tommasi, De Simone, Speranza y Pizza, 1999; Basch, Gabardi, y Ulbricht, 2003; Siciliano, De Tommasi, Morelli y Braca 2004; Caili, Huan y Quanhong, 2006; Khan, Hussain, Matjais, Zakaria y Khan, 2011; Okunrobo, Uwaya, Imafidon, Osarumwense y Omorodion, 2012; Yue, Xu, Cao, Zhang y Zhao, 2013; Noumedem *et al*, 2013; Thiruvengadam y Ill-Chung, 2015).

Los estudios fitoquímicos en las hojas y frutos del género *Cucurbita*, revelan la presencia de taninos, saponinas, cumarinas, quinonas, flavonoides, terpenos, alcaloides, fenoles y esteroles. Además, los frutos y semillas de *Cucurbita* poseen un alto porcentaje en flavonoides y fenoles totales, mostrando actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli,* y *Pseudomonas fluorescens* (Karpagam, Varalakshmi, Bai y Gomathi, 2011; Jacobo, Maróstica, Zazueta y Gallegos, 2011; Noumedem *et al*., 2013; Bahramsoltani *et al*., 2017; Singh, 2012).

En la provincia de Manabí, los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* son utilizados por los moradores rurales como astringente para aliviar ronchas (de la Torre y Navarrete, 2008). Con este antecedente, es de interés realizar los estudios pertinentes que permitirá generar información técnica-científica de la actividad antibacteriana, antioxidante y los principios activos responsables de las

propiedades que se evaluaran en el extracto de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

4. HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos y clorofórmicos obtenidos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* poseen actividad antioxidante y antibacteriana.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la composición química mediante el tamizaje fitoquímico, la actividad antioxidante y antibacteriana en extractos etanólico y clorofórmico de *Cucurbita ecuadorensis*.

5.2. Objetivos específicos

Cuantificar los carbohidratos, lípidos y proteínas totales presentes en la biomasa seca de los frutos de *C. ecuadorensis*.

Cuantificar flavonoides y fenoles totales presentes en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis*.

Evaluar la actividad antioxidante mediante la técnica del 2,2-Difenil-l-Picrilhidrazilo (DPPH) y la actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis*.

CAPITULO II

6. ANTECEDENTES

La familia Cucurbitaceae son plantas angiospermas que se distribuye en zonas secas y húmedas del Ecuador (Jørgensen y León-Yánez, 1999). Los primeros habitantes de este país se alimentaban de frutos, hojas y semillas de varias especies de esta familia desde tiempos del precerámico. (Jayaprakasam, Seeram y Nair, 2003; Piperno y Stothert, 2003; de la Torre *et al*., 2008; Álvarez, 2014).

Varias frutas, semillas y hojas de la familia Cucurbitaceae son de importancia alimenticia o terapéutica debido a sus altos componentes nutricionales y metabolitos secundarios como cumarinas, quinonas, taninos, alcaloides, triterpenoides, esteroles, fenoles, flavonoides, flavonas y saponinas; responsables de propiedades terapéuticas como: antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, antihipertensivas, antiparasitarias, entre otros (De Tommasi, De Simone, Speranza y Pizza, 1999; Basch, Gabardi, y Ulbricht, 2003; Siciliano, De Tommasi, Morelli y Braca 2004; Pozner y Novara 2010; Khan, Hussain, Matjais, Zakaria y Khan, 2011; Okunrobo, Uwaya, Imafidon, Osarumwense y Omorodion, 2012; Yue, Xu, Cao, Zhang y Zhao, 2013; Noumedem *et al*, 2013; Thiruvengadam y Ill-Chung, 2015).

Los frutos silvestres de Cucurbitaceae poseen un sabor amargo el cual es apetecible para caballos, burros y cerdos, esta característica es ocasionada por el cucurbitano o cucurbitacina, un tipo de triterpenoide que posee propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias (Konoshima *et al*., 1994; Lira, 1995; Dandawate, Subramaniam, Padhye y Anant, 2016).

Se ha demostrado que los valores nutricionales varían en los frutos de la familia Cucurbitaceae con alta demanda alimenticia a nivel mundial, como *Citrullus lanatus* (sandía), *Cucumis melo* (melón)*, Cucumis sativus* (pepino) y *Momordica charantia* (achochilla), revelando concentraciones de 4.5, 6, 1.9 y 4.8 g de carbohidratos totales/100 g de peso seco; 0.15, 0.0, 2 y 0.18 g de lípidos totales/100 g de peso seco y 0.4, 0.6, 0.7 y 0.15 g de proteínas totales/100 g de

peso seco, respectivamente (Valero, Rodríguez, Ruiz y Ávila 2018; Semeniuk, Bela, Vonka, Romero y Núñez, 2018).

Actualmente, son escasos los estudios fitoquímicos que evidencien los efectos terapéuticos de las hojas de diversas especies del género *Cucurbita*. Sin embargo, los frutos y semillas poseen metabolitos secundarios como flavonoides, fenoles, tocoferoles, terpenos, triterpenos, taninos, cumarinas, quinonas, saponinas, alcaloides y esteroles. Estos metabolitos son los responsables de las actividades antioxidantes, anticancerígenas y antibacterianas contra *Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtilis*, *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. Además, poseen abundantes nutrientes como carbohidratos, ácidos grasos, polisacáridos, proteínas, entre otros (Karpagam, Varalakshmi, Bai y Gomathi, 2011; Jacobo, Maróstica, Zazueta y Gallegos, 2011; Singh, 2012; Noumedem et al., 2013; Bahramsoltani *et al*., 2017; Salehi *et al*., 2019).

Jacobo, Maróstica, Zazueta y Gallegos (2011), en el trabajo de revisión ‘‘*Cucurbita moschata* Duchesne vs Cehualca, propiedades médicas, fisicoquímicas y beneficios para la salud’’ mencionaron que el mesocarpio del fruto y los aceites de las semillas de *Cucurbita moschata* poseen efectos antioxidantes, antidiabéticos, antihipertensivos, antitumorales y antiparasitario intestinal, a causa de los compuestos bioactivos como fenoles, proteínas y polisacáridos que poseen.

Estudios reportan contenidos fenólicos en frutos de *Cucurbita moschata*, revelando concentraciones entre 4.76 mg equivalente de ácido gálico (GAE)/ g de extracto seco y 22.92 ± 1.06 mg GAE/ g de extracto seco. Estos valores están directamente relacionado con la actividad antioxidante evaluada por la técnica 2,2-Difenil-l-Picrilhidrazilo (DPPH), la que presentó una concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) de 4.015 ± 0.20 mg de extracto/mL (Jacobo, Maróstica, Zazueta y Gallegos, 2011; Bahramsoltani *et al.*, 2017).

Qian (2014), demostró que el extracto del fruto de *Cucurbita moschata* posee un alto potencial antibacteriano contra *Escherichia coli, Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, con una zona de inhibición de 9.78, 13.21 y 11.36 mm

de diámetro. Wang, Liu, Wang, Yu, Xu y Yang (2017), caracterizaron la actividad antibacteriana de un tipo de polisacárido aislado y purificado de extractos de semillas, denominado Protein-bound polysaccharide (PSP-1), obteniendo una zona de inhibición de 7.2, 13.6, 0.8, 0.2 y 1.0 mm de diámetro para las bacterias *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pichia fermentans y Escherichia coli*, respectivamente.

El extracto etanólico de las hojas de esta especie no presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (del Castillo, Molinares, Campo, y Bettin, 2017). No obstante, Salehi, B *et al*., 2019) menciona que los extractos acetónicos de las semillas y el mesocarpio del fruto poseen efecto bacteriostático contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

En la cuantificación de los componentes nutricionales del fruto de *Cucurbita moschata*, registraron concentraciones de 1.9 g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco, 0.16 g de lípidos totales/ 100 g de peso seco y 0.97 g proteínas totales/ 100 g de peso seco, respectivamente (Jacobo, Maróstica, Zazueta y Gallegos, 2011).

Las hojas de *Cucurbita pepo* poseen taninos, quinonas, saponinas, cumarinas, flavonoides, esteroles, terpenoides, alcaloides, fenoles, lecitina, cucurbitano, flavonoides, vitaminas B, C y E; agentes responsables de las actividades biológicas reportadas para esta especie como antioxidante, antiparasitaria, hepatoprotectora e inhiben el crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis, Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Andjelkovic, Van Camp, Trawka, y Verhé, 2010; EI-Aziz, EI-Kalek y City, 2011). Además, la decocción de las frutas posee actividad antibacteriana contra *Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Magassouba *et al*., 2010; Noumedem *et al*., 2013).

Se reportaron débiles concentraciones de fenoles totales en el mesocarpio del fruto de *Cucurbita pepo*, entre 4.99 ± 0.29 y 5.49 mg GAE/ g de extracto seco (Deng, Lin, Xu, X, Gao, Xie, y Li, 2013; Blanco, Font, Martínez y Del Río, 2015).

Los contenidos nutricionales de los frutos de *Cucurbita pepo* obtienen concentraciones de 2.2 g carbohidratos totales/ 100 g de peso seco, 0.2 g lípidos totales/ 100 g de peso seco y 0.65 g proteínas totales/ 100 g de peso seco, respectivamente (Valero, Rodríguez, Ruiz y Ávila, 2018).

Las partes aéreas de *Cucurbita maxima* poseen propiedades antidiabéticas, diuréticas, hepatoprotectoras, anticancerígenas, poteancivas, entre otros (Dubey, 2012). Además, son utilizadas como medicina tradicional para tratar la anemia, vómitos de sangre, trastornos urinarios, cataratas, insuficiencia renal, heridas, prostatitis, osteosarcoma, presión arterial, estreñimiento, cáncer en el pulmón y cabeza (Salehi *et al*., 2019).

Extractos del fruto de esta especie poseen alcaloides, esteroles, terpenoides, saponinas, fenoles y flavonoides, metabolitos responsables de la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus werneri*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kleibsella pneumoniae* (Ravishankar *et al*., 2012; Singh, 2012).

La concentración de fenoles varía entre 2.68 ± 0.03 a 7.34 ± 0.4 mg GAE/ g de extracto seco y flavonoides desde 1.55 ± 0.04 a 7.49 ± 0.20 mg equivalentes de quercetina (CE)/ g de extracto seco, a los que se atribuye su actividad antioxidante evaluada con la técnica del DPPH, con un IC50= 0.038 mg/mL (Saha, Mazumder y Haldar, 2011; Moyo, Amoo, Ncube, Ndhlala, Finnie, y Van Staden, 2013; Gurav, Mondal, y Vijayakumar, 2014; Kushawaha, Chatterji, Yadav, y Watal, 2016).

Singh (2012), señala que el extracto de las semillas de *Cucurbita maxima* posee efecto bacteriostático frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* con una zona inhibitoria de 16, 28, 10, 20, 24 mm de diámetro. Adicionalmente, Pérez y Anesini (2014), indicaron que no posee actividad antibacteriana contra *Salmonella typhi*.

Las especies más consumidas por los habitantes del Ecuador del género *Cucurbita,* son los frutos de *Cucurbita maxima* (zapallo) y *Cucurbita ficifolia* (zambo), por esta razón Ortega (2013); Estrada, Sánchez y Alcántar (2018)

realizaron estudios acerca de la cuantificación de metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos y proteínas) de los frutos de estas especies, estos revelan concentraciones entre 2.2 g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco, 0.2 g de lípidos totales/ 100 g de peso seco y 0.65 g de proteínas totales/ 100 g de peso seco, para *Cucurbita maxima* y 4.4 g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco, 0.3 ± 0.3 g de lípidos totales/ 100 g de peso seco, 0.4 ± 0.1 g de proteínas totales/ 100 g de peso seco para *Cucurbita ficifolia*.

Con base a los antecedentes previamente citados, se considera que los valores nutricionales y compuestos químicos responsables de las actividades biológicas en las especies del género *Cucurbita* de la familia Cucurbitaceae son de gran importancia (Jayaprakasam, Seeram y Nair, 2003; Caili, Huan y Quanhong, 2006; Salehi *et al*., 2019); sin embargo, no se han realizado estudios fitoquímicos en *Cucurbita ecuadorensis*.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Descripción botánica y taxonómica de *Cucurbita ecuadorensis*

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Dilleniidae

Orden Cucurbitales

Familia Cucurbitaceae

Subfamilia Cucurbitoideae

Tribu Cucurbitae

Género *Cucurbita*

Especie *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker

Cucurbita ecuadorensis es una herbácea de hábito rastrero, endémica de los bosques secos de la costa de Ecuador y norte de Perú, en la biorregión del Bosque Seco Deciduo del Pacífico Ecuatorial (BSDPE). Puede alcanzar hasta 10 m de longitud. Posee un tallo cubierto por tricomas largos y ásperos, en relación a los tipos de tricomas de la mayoría de las especies del mismo género. Las hojas son simples, pentalobuladas, con márgenes irregulares, miden generalmente entre 11-32 cm de ancho; de color verde oscuro con manchas claras, y escabrosas en el haz; pueden poseer dos o tres zarcillos por nudo (fig. 1). Las flores en general son solitarias, monoicas, con un pedicelo pubescente de 2 a 5 cm de longitud, la corola mide 5-8 cm de longitud, el cáliz es pubescente, posee lóbulos agudos de 1-2 cm de largo. Las flores masculinas poseen un cáliz ampliamente redondeado y una corola estrictamente acampanada de color amarillo con aroma distintivo. La flor femenina, posee el pedúnculo floral estriado longitudinalmente y ligeramente dilatado en la unión con la flor o el fruto. Su fruto es un pepo globoso de aproximadamente 10 a 18 centímetros de diámetro con epicarpio liso y duro, el mesocarpio es carnoso, y poco fibroso de color blanco, tiene olor a melón y frecuentemente con sabor amargo. Las semillas son numerosas, embebidas en el mesocarpio, de forma ovada, 11 a 15 mm de largo

y 7-8 mm de ancho. El cuerpo de la semilla posee una coloración crema con el margen blanco (fig. 1) (Cutler y Whitaker, 1968; Santiana, 2011).

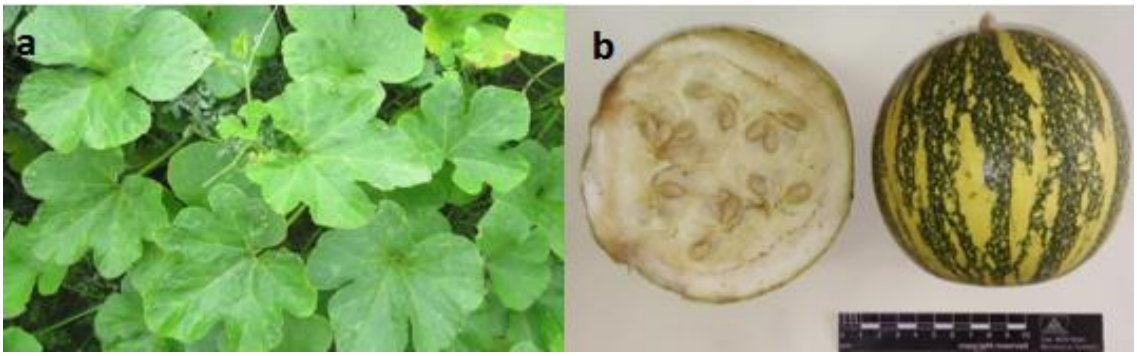


Figura 1. Hojas (a) y fruto (b) de *Cucurbita ecuadorensis.* Fuente: autor.

7.1.1. Ecología

Es una especie endémica de la biorregión del Bosque Seco Deciduo del Pacífico Ecuatorial, ha sido categorizada en estado de conservación vulnerable (VU) (Santiana, 2011). Su patrón de distribución abarca zonas secas de la provincia de Loja, Guayas, Santa Elena, Manabí, Esmeraldas y Los Ríos, con una inusual disyunción en los Andes del norte de la provincia de Imbabura (Cutler y Whitaker, 1968; de la Torre *et al.*, 2008; Santiana, 2011). Recientemente ha sido registrada en el Departamento de Tumbes, en el noroccidente de Perú (Cornejo, com. pers.).

7.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje o screening fitoquímico, es la parte inicial para identificar cualitativamente los principales metabolitos secundarios responsables de las propiedades biológicas que se encuentra en una planta objetivo (Lock, 1998). Se desarrolla a partir del análisis por medio de reacciones de coloración o precipitación en extractos que se han obtenido con la ayuda de solventes orgánicos como el etanol, metanol, cloroformo, entre otros. Esta evaluación solo requiere de pequeñas cantidades de reactivos, además, las reacciones dependerán de la proporción de metabolitos que se encuentren en el extracto, por lo que se considera es rápida y de bajo costo. Adicionalmente, sirve como

punto de partida para la extracción o aislamiento de los grupos químicos de interés (Who, 1998; Pesante, Larrea y Bustamante, 2017).

7.3. Metabolitos Secundarios

Se forman mediante las rutas biosintéticas de diversas moléculas orgánicas del metabolismo primario del carbono, originando compuestos bioactivos de estructuras complejas de bajo peso molecular como los alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos, cumarinas, esteroles quinonas, entre otros (fig. 2), que presentan una distribución variable en hojas, flores, frutos, y estarán restringidas de acuerdo a familias, géneros o incluso especies en el reino vegetal (Ávalos y Pérez, 2009; Gudiel, 2009; Ochoa y Sarmiento, 2018).

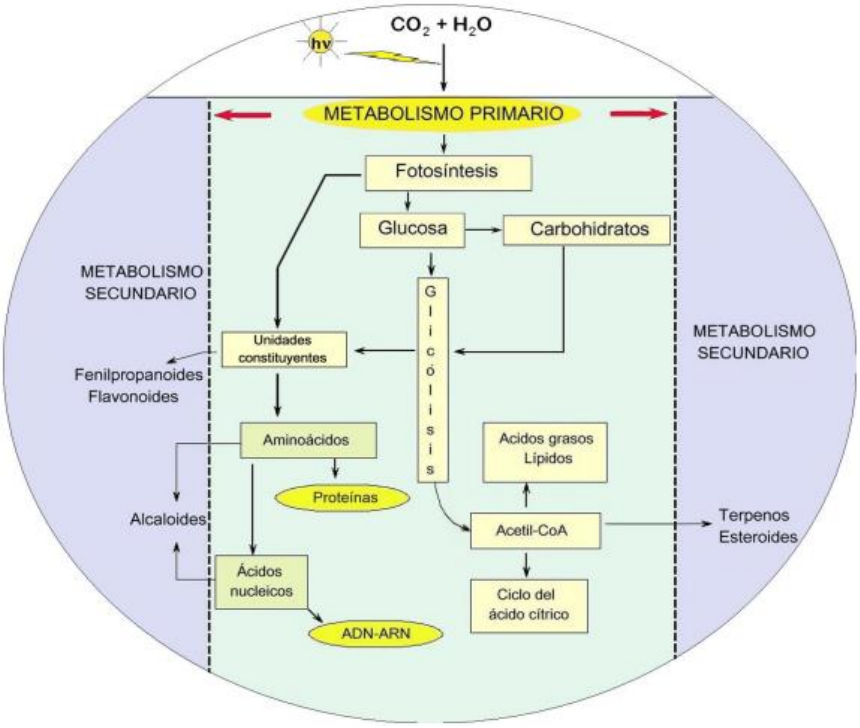


Figura 2. Esquematización de las rutas biosintéticas de diversas moléculas orgánicas para la formación de los metabolitos secundarios en las plantas. Obtenido de Ávalos y Pérez (2009).

7.3.1. Alcaloides

Son metabolitos secundarios nitrogenados, procedentes del metabolismo de los aminoácidos que se encuentran en tejidos periféricos, solubles en agua (fig. 3). Son conocidos por su actividad biológica contra herbívoros y agentes patógenos, además ser anestésicos, antitumorales, antipalúdicos, adicionalmente, estimulan el sistema nervioso central,

autónomo, la respiración, circulación sanguínea (Wink, 2006; Fattorusso y Taglialatela, 2008).

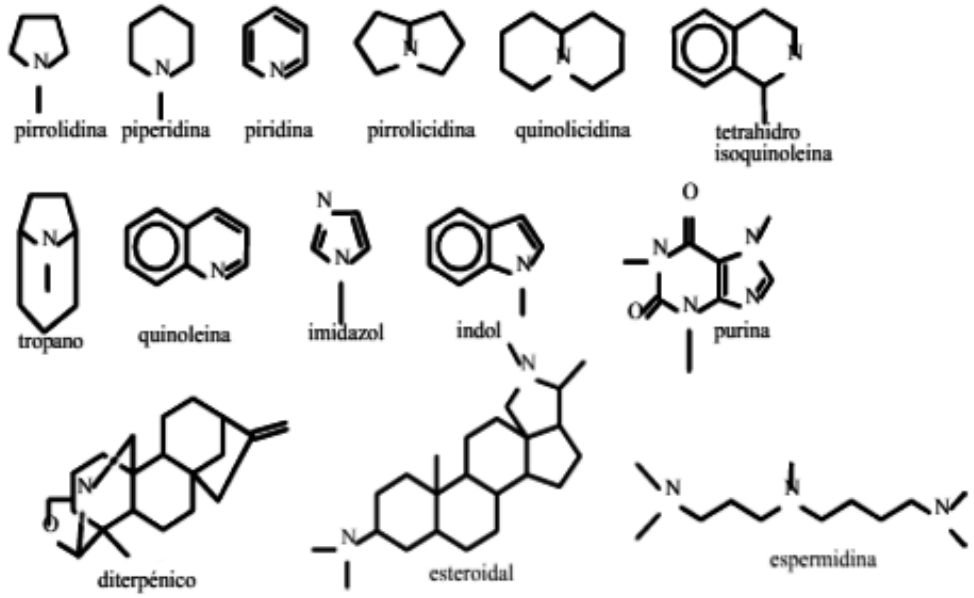


Figura 3. Estructura básica de los alcaloides. Obtenido de Arango (2008).

7.3.1.1. Reconocimiento de alcaloides

En el momento de realizar un tamizaje fitoquímico, el extracto se combinará con el yodo y metales pesados como el bismuto, mercurio y tungsteno, si se forman precipitados, se interpretará como positivo para alcaloides (García y Ramírez, 2009).

7.3.2. Taninos

Son polímeros fenólicos, de estructura compleja cuando los grupos hidroxilos se adhieren a proteínas o a leves cantidades de iones de hierro, son solubles en agua, presentan una amplia distribución, encontrando estos compuestos en cualquier parte aérea de una planta, protegiéndolas de agentes bacterianos (fig. 4). Poseen propiedades astringentes, vasoconstrictoras, antibacterianas y antinflamatorias (García y Carril, 2009; Sieniawska y Baj, 2017). Se clasifican en dos grupos dependiendo de su síntesis biológica: (i) taninos hidrosolubles, son producidos por la vía del ácido shikímico, y, (ii) los taninos condensados, éstos derivan por biosíntesis del catecol (Isaza y Hipólito, 2007; Patra y Saxena, 2011; Vélez, Campos y Sánchez, 2014).

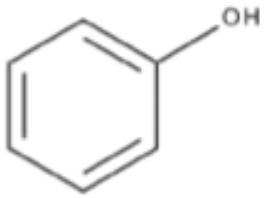


Figura 4. Estructuras de un tipo de tanino. Obtenido de García, Fernández, Fuentes (2015).

El-Kamali y Mahjoub (2009) mencionaron que en *Cucurbita pepo* se encuentran compuestos fenólicos como el ácido protocatecéutico, ácido sirínico, ácido trans-p-cumárico, ácido trans-sinápico, tirosol, vanilina. Adicionalmente, Krimer-Malešević, Mađarev-Popović, Vaštag, Radulović y Peričin (2011) detectaron la presencia de fenoles en extractos de semillas de *C. pepo* como el ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehido, ácido protocatecúcico, ácido vanílico, ácido jeringo; Ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico.

7.3.2.1. Reconocimiento de taninos

En la prueba de Cloruro férrico 10%, los taninos reaccionan con iones de hierro, formando múltiples puentes de hidrógenos (fig. 5), obteniendo estructuras complejas, provocando una reacción de color negro azulado o negro grisáceo (Vázquez *et al.,* 2012).

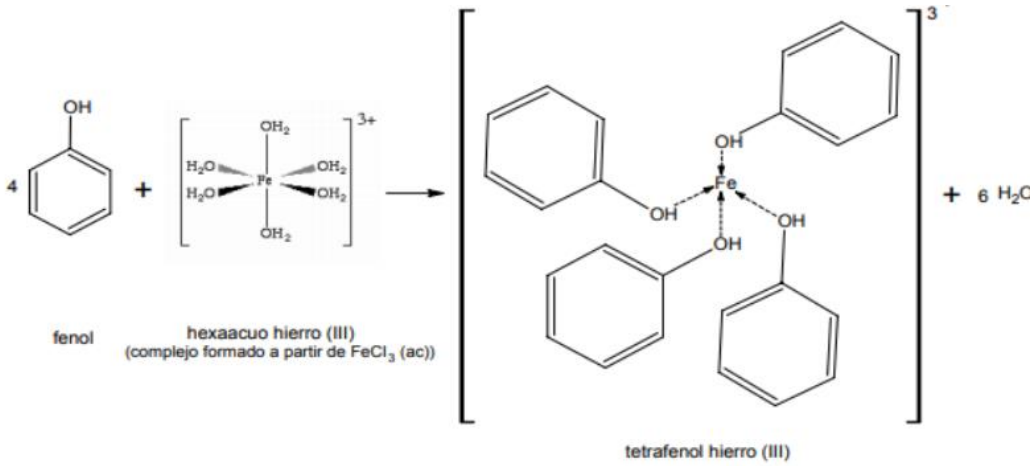


Figura 5. Esquematización de las reacciones de taninos en contacto a iones hierro. Obtenido de Ochoa y Sarmiento (2018).

7.3.3. Flavonoides

Son compuestos fenólicos responsables de la coloración de flores, frutos y a veces hojas, están ampliamente distribuidos en todas las especies vegetales. Existen más de 4.000 compuestos con un origen biosintético en común el cual involucra un solo precursor denominado 2-fenilcromano (C_6-C_3-C_6); además, están estructurados por dos anillos aromáticos unidos por un puente de carbono, según el grado de oxidación del anillo piránico puede agruparse en distintas clases, tales como: las flavonas, flavonoles, flavononas, flavanos, calconas, auronas y antocianinas (fig. 6) (Escamilla, Cuevas y Guevara, 2009; Llacuna y Mach, 2012; Vázquez *et al*.,2012).

La mayoría de estos compuestos se los consideran nutrientes importantes, por estar presentes en los alimentos y por su alto potencial como antioxidante (Porras y López, 2009; Patil y Masand, 2019). No obstante, poseen otras propiedades biológicas como hepatoprotectoras, vasoconstrictoras, antinflamatorias y cardiotónicas (Hoensch y Ortel, 2015; Wang, Li y Bi, 2018).

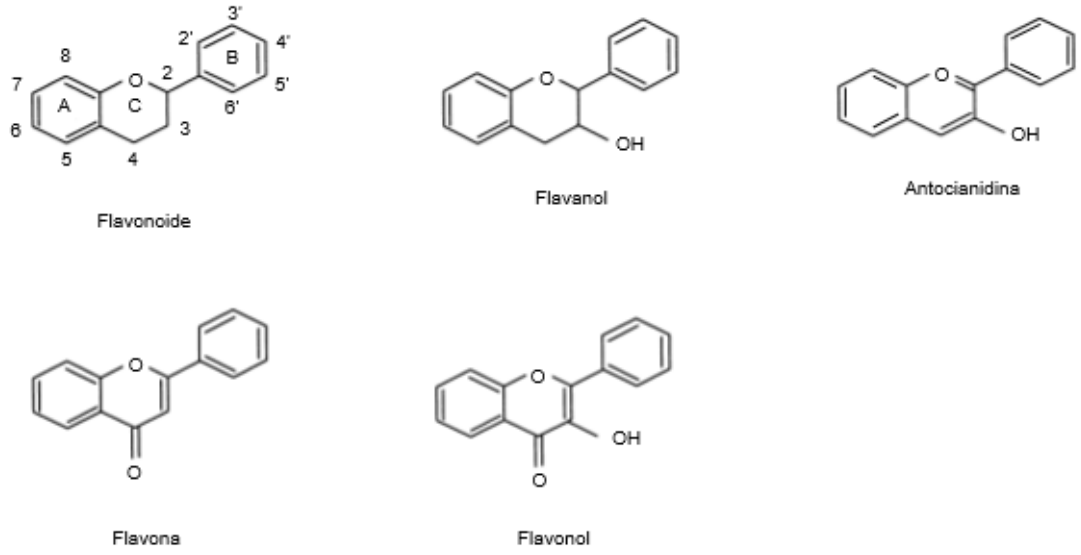


Figura 6. Estructura básica y tipos de flavonoides. Obtenido de Martínez, González, Culebras y Tuñón (2002).

Estudios mediante cromatografía líquida de alta resolución, indicaron que los frutos de *Cucurbita pepo* contienen flavonoides como la quercetina y otros derivados (Iswaldi, Gómez, Lozano, Arráez, Segura y Fernández, 2013).

7.3.3.1. Reconocimiento de flavonoides

En la prueba de Shinoda, cuando se agrega ácido clorhídrico y fragmentos de Magnesio en el extracto, este ácido reacciona con el Magnesio, convirtiéndose en Cloruro de Magnesio dejando un hidrógeno libre, este hidrógeno produce la reducción del ion flavilio de color rojo escarlata (fig. 7) (Delporte, 2010).

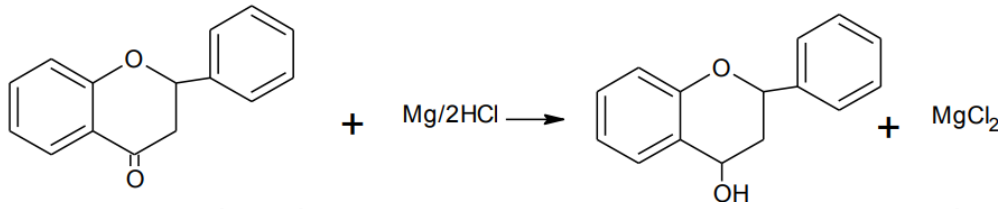


Figura 7. Reacción química de los flavonoides en contacto con el ácido clorhídrico y fragmentos de magnesio. Obtenido de Delporte (2010).

7.3.4. Cumarinas

Son compuestos fluorescentes miembros del grupo de las Benzopironas, derivados de la lactona del ácido *o*-hidroxicinámico. Su distribución abarca desde la raíz hasta flores y frutos, no obstante, no todas las familias del reino vegetal poseen estas sustancias. Son de gran interés por sus propiedades terapéuticas, vasodilatoras, antitumorales, espasmolíticas, alelopáticas, antioxidantes y antibacteriana (Domínguez, 1973; Jain y Joshi, 2012).

7.3.4.1. Reconocimiento de cumarinas

Estos compuestos revelan su presencia en los extractos, cuando están expuestos a la luz ultravioleta (Domínguez, 1973).

7.3.5. Triterpenos y esteroles

Los triterpenos son terpenos de 30 carbonos que proceden de la ciclación del escualeno (fig. 8), pueden ser tetracíclicos o pentacíclicos que poseen más de 100 esqueletos diferentes con grupos hidroxilo, cetona, aldehído o ácido carboxílico (Tomas y Lock, 2001; Kushiro Ebizuka, 2010; Chen, Tholl, Bohlmann y Pichersky, 2011). Estas sustancias se encuentran en las mitocondrias, cromosomas o cloroplastos de las células, dependiendo la especie vegetal. Además, poseen un papel importante de protección contra hongos, bacterias y herbívoros (Nes y Heftmann, 1981; Sandjo y Kuete, 2013; Koul, 2018).

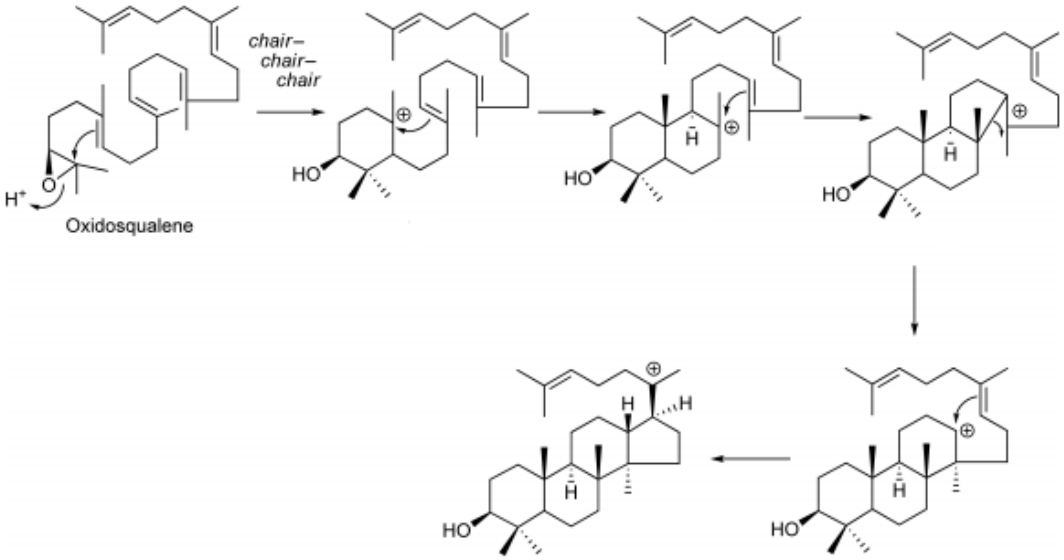


Figura 8. Biosíntesis de la ciclación del escualeno para la formación de Triterpenos. Obtenido de Kushiro y Ebizuka (2010).

Los esteroles son derivados de los triterpenos que han perdido tres metilos en los carbonos cuatro y seis, con una estructura tetracíclica que consta de tres anillos de seis carbonos fusionados con un anillo de cinco carbonos (Ege, 1998). Estos metabolitos se encuentran en alimentos como frutas, vegetales y hojas, almacenándose principalmente entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática o en el citoplasma (Menon, 2018).

Plat *et al*. (2019) consideran que estos compuestos son suplementos nutricionales, porque poseen efectos inhibidores de componentes lipídicos, reduciendo las concentraciones de colesterol en la absorción del intestino delgado. No obstante, revelan propiedades antibacterianas y antioxidantes (Cely, Matulevich y Castrillón, 2014).

7.3.5.1. Reconocimiento de triterpenos y esteroles

Cuando el grupo hidroxilo de estos compuestos están en contacto con agentes deshidratantes como el ácido sulfúrico y anhídrido acético, aumenta la saturación en la conjugación de los anillos (fig. 9), formando una coloración rosada, roja, magenta o violeta, revelando presencia para triterpenos. Sin embargo, cuando forman una coloración verde-azulada, revelan presencia para esteroles (Ardila, 2014).

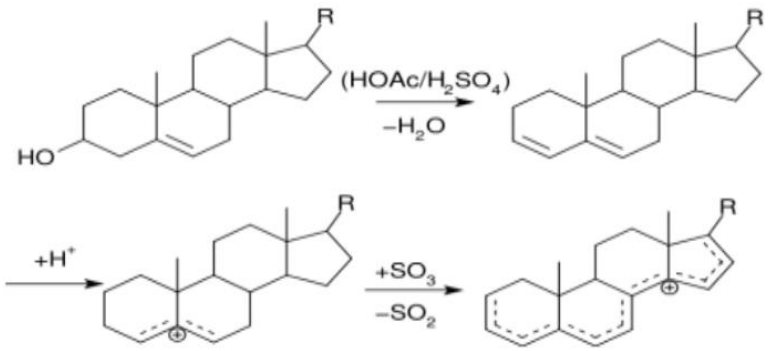


Figura 9. Reacción química de triterpenos y esteroles ante el ácido sulfúrico y anhídrido acético. Obtenido de Ardilla (2014).

7.3.6. Quinonas

Son compuestos fenólicos oxidados formados por ciclación a partir del Acetil-S-CoA. De acuerdo a su naturaleza química se clasifican en monocíclicas (benzoquinonas); bicíclicas (naftoquinonas) y tricíclicas (antraquinonas) (fig. 10). Las quinonas son conocidas por su abundancia en el reino vegetal, acción terapéutica sobre sistema respiratorio y su altas propiedades antimicrobianos, antitumorales, antioxidantes (Accame, 2000; Leyva, Loredo, López, Escobedo y Navarro, 2017).

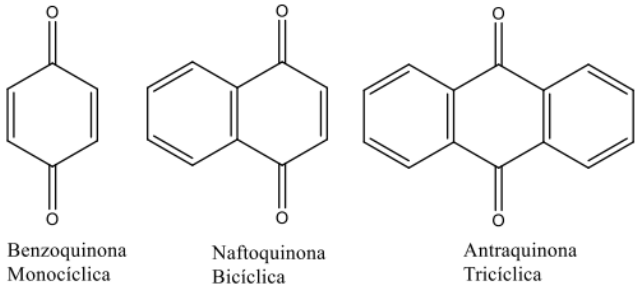


Figura 10. Estructura básica y clasificación de quinonas de acuerdo a su naturaleza química. Obtenido de Leyva, Loredo, López, Escobedo y Navarro (2017).

7.3.6.1. Reconocimiento de Quinonas

Cuando las quinonas, naftoquinonas y antraquinonas están en contacto en un medio ácido, se oxidan estas sustancias y se hidrolizan los compuestos glicosídicos, presentando un comportamiento característico, dando como resultado una coloración rojiza (Carvajal *et al.,* 2009).

7.4. Actividad antioxidante

Los antioxidantes son moléculas capaces de inhibir los radicales libres producidos como consecuencia de las reacciones de oxidación durante el metabolismo. Estos radicales libres ocasionan daños a nivel celular, causando enfermedades como cáncer, aterosclerosis, mal de Alzheimer, entre otros (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995; Moon y Shibamoto, 2009).

El cuerpo humano no es capaz de generar cantidades necesarias de antioxidantes para capturar la acumulación de radicales libres en las células, por esta razón, requieren antioxidantes exógenos, de preferencia de origen natural (Martínez, González, Culebras y Tuñon, 2002). Entre los principales antioxidantes están los β-carotenos (percusores de la vitamina A), la vitamina C y E (Martínez, González, Culebras y Tuñón, 2002). Sin embargo, los estudios en plantas alimenticias y medicinales que revelan principios activos como los fenoles y flavonoides, están aumentando en las últimas décadas debido al alto potencial como antioxidante natural y elevado consumo de estos principios activos a través de la dieta (Maestro y Borja, 1993; Martínez *et al*., 2002; Moon y Shibamoto, 2009).

Existen diversos procedimientos para evaluar la capacidad antioxidante en extractos de plantas, sin embargo, la metodología más utilizada es la técnica de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), esta consiste en la eliminación de radicales libres si los contenidos de fenoles y flavonoides totales encontrados en el extracto actúan como un antioxidante natural (Moon y Shibamoto, 2009).

7.4.1. Fundamento de la técnica de eliminación de radicales libres de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

El DPPH es un radical libre que posee un electrón desapareado, cuando este reactivo entra en contacto con un agente antioxidante natural,

absorbe un átomo de hidrógeno del antioxidante (fig. 11), desnaturalizando el color violeta intenso a un amarillo pálido, este color está caracterizado por una longitud de onda de 517 nm, por lo que esta técnica puede ser medida mediante un espectrofotómetro de UV visible (Moon y Shibamoto, 2009).

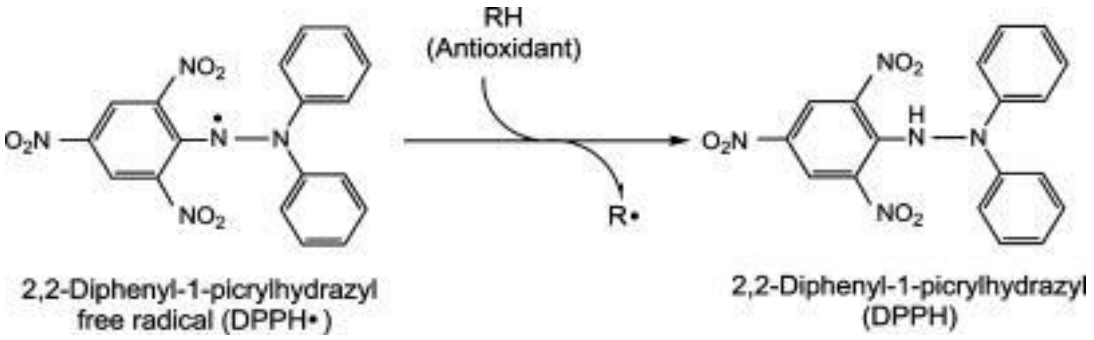


Figura 11. Reacción química entre el DPPH y un agente antioxidante. Obtenido de Moon y Shibamoto (2009).

7.4.2. Fundamento de la cuantificación de fenoles

Cuando se alcalinizan los compuestos fenólicos con el carbonato de sodio, estos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico), de color amarillo, dando lugar a una reacción de óxido/reducción, generando un ión fenolato que presenta una coloración azul cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 765 nm (fig. 12) (Muñoz *et al.,* 2017).

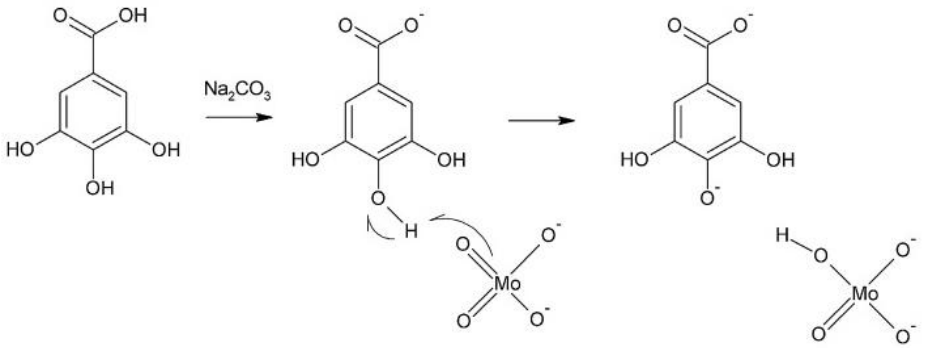


Figura 12. Reacción química de los fenoles ante el reactivo Folin-Ciocalteu. Obtenido de (Muñoz, Torres, Núñez, de la Rosa, García, Ayala y Álvarez, 2017).

7.4.3. Fundamento de la cuantificación de flavonoides

Cuando el extracto entra en contacto con el cloruro de aluminio, se forma complejos lábiles estables con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles (fig. 13) (Chang *et al.,* 2002).

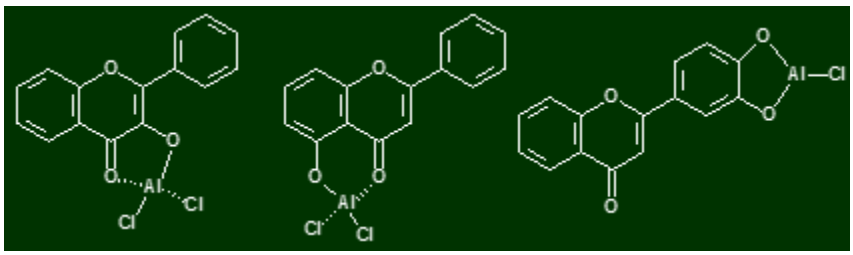


Figura 13. Formación de complejos lábiles de los flavonoides y flavonas con iones de aluminio.

7.5. Actividad antibacteriana

La mayoría de los metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, alcaloides, quinonas, cumarinas y otros compuestos aromáticos que se encuentran en extractos de plantas, inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas bloqueando la síntesis del péptidoglicano, destruyendo la pared celular y desestabiliza la membrana citoplasmática, por el cual expulsa el citoplasma hacia el exterior provocando una lisis celular en bacterias Gram negativas (Morales, 1995; Tereschuk, Riera, Castro y Abdala, 1997; Domingo y López, 2003; Cavalieri *et al.,* 2005; Pineda, Camiloaga y Zuñiga, 2007; Cuca, Coy, Coy y Lozano, 2011; Peña, 2011; Escalona *et al*., 2013; Cardoso y Pastrana, 2015).

7.5.1. Mecanismo de acción de los taninos como antibacterianos

Los taninos al poseer grupos hidroxilos en su estructura, a través de reacciones con grupos sulfhidrilos o de otras interacciones con proteínas son los responsables de la inhibición enzimática, es decir, se encuentran íntimamente relacionados con la toxicidad de las bacterias, entre más grupos hidroxilos obtenga la molécula de un tanino, más letal es para el microorganismo (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

7.5.2. Mecanismo de acción de flavonoides como antibacterianos

Las moléculas de flavonoides cuando presentan grupos metilos en sus estructuras inhiben una numerosa variedad de enzimas en las bacterias, como las hidrolasas: ß-glucoronidasa, hialuronidasa, fosfatasa alcalina, aril-sulfatasa, ATPasa H+ de las membranas lisosomal, perjudicando el metabolismo y crecimiento del agente patógeno (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

7.5.3. Mecanismo de acción de alcaloides como antibacterianos

Los alcaloides presentes en el extracto producen mutaciones en el ADN y ARN, ocasionando efectos negativos en la traducción proteica en las bacterias. Además, son los responsables de la desestabilización de la membrana e inhibición de hidrolasas o la proteínas G (adenilato ciclasa) (Peña, 2011; Suárez, Enrique, Barrera, Andrés, Coy y Moreno, 2011; Rivas, Oranday y Verde, 2016).

7.5.4. Mecanismo de acción de cumarinas como antibacterianos

Las cumarinas son compuestos fenólicos con acción fotosensibilizantes sobre las bacterias, provocando alteración en el ADN o ARN y desorganización de procesos biológicos cuando están expuestos a luz UV (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

7.5.5. Mecanismo de acción de quinonas como antibacterianos

Son compuestos fenólicos que se adhieren a polipéptidos de la pared celular que inactivan las enzimas y las proteínas ocasionando complejos irreversibles en su estructura, logrando inhibir su función (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

CAPITULO III

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material biológico

Los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* fueron colectados en la parroquia San Vicente, provincia de Manabí (0°57’49.8’’S, 80°41’41.83’’W), en la costa de Ecuador. La identificación botánica fue realizada por el M.Sc. Xavier Cornejo, curador del herbario GUAY de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil.

8.2. Procesamiento del material vegetal

Del material vegetal se obtuvieron dos tipos de extractos: etanólico y clorofórmico. El extracto etanólico se obtuvo mediante el secado y maceración de las hojas y del mesocarpio del fruto de *C. ecuadorensis* (anexo 1). Se colocó el material vegetal en un matraz con etanol al 99%, se dejó en reposo durante cinco días, en oscuridad a temperatura ambiente (anexo 2). Posteriormente, el extracto se concentró en un rotavapor Buchi r-3 (anexo 3).

El extracto clorofórmico se obtuvo mediante una extracción líquido-líquido, se agregó en un embudo de decantación una solución de extracto etanólico del material vegetal y cloroformo a relación 1:1. Se dejó en reposo durante 24 h, la solución se separó en dos fases y se recogió la fase apolar clorofórmica (anexo 4). Posteriormente, el extracto se concentró en un rotavapor Buchi r-3 (anexo 3).

8.3. Tamizaje fitoquímico

Se determinó la presencia de alcaloides, flavonoides, quinonas, antraquinonas, esteroides, triterpenos, saponinas, taninos y cumarinas mediante la metodología propuesta por Gudiel (2009) y Rondón (2017).

8.3.1. Determinación de alcaloides.

Se agregaron 2 mL de ácido clorhídrico al 5% a 10 mg de extracto seco. Posteriormente, al extracto diluido se le añadieron 3 gotas de los reactivos Wagner, Mayer, Bouchardat y Dragendorff. Un precipitado rojo marrón (Wagner), precipitado de color blanco amarillento (Mayer), precipitado marrón (Bouchardat) y precipitado rojo anaranjado (Dragendorff), revela la presencia de alcaloides.

8.3.2. Determinación de flavonoides.

Prueba de Shinoda. Se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado a 2 mL de extracto diluido en alcohol etílico. La presencia del color naranja, rojo o magenta revela la presencia de flavonas y flavonoles, respectivamente.

Prueba de hidróxido de sodio (10%). A 1 mL de extracto diluido en alcohol etílico, fueron añadidos 3 gotas de hidróxido de sodio al 10%. La coloración amarilla-roja, café-naranja, púrpura-roja o azul, indica la presencia de flavonas, flavonoles, chalconas y antocianinas, respectivamente.

8.3.3. Determinación de saponinas.

Prueba de la espuma. Se agregó 1 mL de agua destilada caliente a 20 mg del extracto etanólico en un tubo de ensayo, se agitó vigorosamente para formar espuma, se dejó en reposo durante 10 minutos. El contenido de saponinas se reportó de la siguiente manera: sin espuma (ausencia); espuma menos de 3 mm de alto (pobre); espuma de 6 mm de altura (moderada) y espuma de más de 8 mm de altura (abundante).

8.3.4. Determinación de quinonas y antraquinonas.

Prueba de Borntrager. Se trató con 3 mL de cloroformo a 3 mL de extracto, la capa de cloroformo se separó. Posteriormente se agregaron gotas de hidróxido de potasio al 5%. La aparición de color rojo en fase alcalina indicó la presencia de quinonas.

Prueba de hidróxido de amonio. A 2 mL de extracto disuelto en alcohol etílico se añadió una gota de hidróxido de amonio concentrado. Se dejó en reposo durante dos minutos, una formación de color rojo indicó la presencia de antraquinona.

Prueba de ácido sulfúrico. En 10 mg de extracto disuelto en alcohol etílico se añadió una gota de ácido sulfúrico concentrado, la formación de color rojo indicó la presencia de quinonas.

8.3.5. Determinación de esteroides y triterpenos.

Prueba de Salkowski. En 3 mL del extracto disuelto en alcohol etílico, se agregaron 2 mL de cloroformo y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente hasta que se formó una doble fase. La presencia de color café pardo en la capa media indicó un anillo esteroideo.

Prueba Lieberman Bouchard. A 2 mL del extracto disuelto en alcohol etílico se agregó 1 mL de anhídrido acético y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó en reposo por 5 minutos, una capa intermedia de color azul-verde indicó esteroles, y el color rosado, rojo, magenta o violeta reveló la presencia de terpenoides

8.3.6. Determinación de taninos.

Se disolvió 10 mg de extracto en 1 mL de etanol, seguido se añadió 4 gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 10%. La formación de un color negro azulado o verdoso indicó la presencia de fenoles.

8.3.7. Determinación de cumarinas.

Se disolvió 10 mg de extracto seco en etanol. Se agregó 0.5 ml de agua destilada hirviendo. En un papel filtro se aplicó 2 manchas, a una mancha se agregó 1 gota de hidróxido de potasio al 10%. Se observó bajo luz ultravioleta en completa oscuridad. La fluorescencia azul o verde, reveló la presencia de cumarinas.

8.4. Cuantificación de carbohidratos, proteínas y lípidos

Se realizó la cuantificación de carbohidratos, lípidos y proteínas a la biomasa seca del fruto de *C. ecuadorensis.*

8.4.1. Extracción y cuantificación de carbohidratos totales.

Se utilizó el método de Fenol-sulfúrico propuesta por Dubois *et al*. (1956). A 10 mg de biomasa seca se añadieron 4 mL de NaOH 1M, Se agitó en vórtex y luego se sometieron las muestras en baño de maría a 95-100 ºC por 1 hora. Se repartió 1 mL en tubos (triplicado). Se añadieron 25 µL de fenol al 80%. Se

agregó 2,5 mL de ácido sulfúrico. Se repitió esta operación con todas las muestras y la curva patrón. Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos, las muestras se leyeron a 484 nm bajo a curva de calibración de glucosa (200, 400, 600, 800, 1000 μg/ mL) antes de las 2 horas en un espectrofotómetro Multiskan GO Thermo Scientific. El contenido total de carbohidratos se expresó como mg de carbohidratos totales/100 g de peso seco.

8.4.2. Extracción y cuantificación de proteínas totales.

Se utilizó el método colorimétrico propuesto por Lowry *et al*. (1951). Se agregaron 2 mL de NaOH 1 M a 10 mg de biomasa seca, las muestras se sometieron a baño de maría a 95-100 ºC por 1 hora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm, se transfirió 100 µL del sobrenadante a un tubo de ensayo (por triplicado), se añadieron 400 µL de agua destilada, 500 µL de NaOH 1M. Se añadieron 2 mL de la disolución de 50 mL de Na_2CO_3 al 5% con 2 mL Tartrato de sodio-potasio al 1% y $CuSO_4$. 5 H_2O al 0,5%, tanto a las muestras a analizar como a la curva patrón y al blanco, se agitó para homogenizar. Después de 10 minutos, se añadió 400 µL del reactivo Folin-Ciocalteau con agua destilada 1:1, se agitó inmediatamente. Para finalizar se dejó en reposo 30 minutos a temperatura ambiente y leyó a 750 nm bajo a curva de calibración de albumina de suero de bovino (BSA) (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 μg/ mL) en un espectrofotómetro Multiskan GO Thermo Scientific. El contenido total de proteínas se expresó como mg de proteínas totales/100 g de peso seco

8.4.3. Extracción y cuantificación de lípidos totales.

Se utilizó el método de carbonización simple propuesto por Folch *et al.* (1956). Se adicionó 1.5 mL de cloroformo y 3 mL de metanol a 10 mg de biomasa seca. Se almacenó a -4°C en oscuridad durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se recolectó el sobrenadante. Se agregaron 1.5 mL de cloroformo y 2 mL de agua destilada. Se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante cinco minutos para separar la fase acuosa y orgánica. Se retiró la fase superior acuosa, posteriormente se evaporó la fase orgánica a 50°C durante 24 horas. Se resuspendió en 1 mL de cloroformo. Se

tomó 500 μL de extracto lipídico resuspendido, se adicionó 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y se llevó a 200°C durante 15 min, posteriormente se enfrió a -4°C durante 10 min. Se agregó 2 mL de agua destilada y se leyó a 375 nm bajo a una curva de calibración de tripalmitina (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 μg/ mL) en un espectrofotómetro Multiskan GO Thermo Scientific. El contenido total de lípidos se expresó como mg de lípidos totales/ 100 g de peso seco.

8.5. Cuantificación de flavonoides y fenoles totales

8.5.1. Cuantificación de flavonoides totales.

Se aplicó el método colorimétrico de cloruro de aluminio propuesta por Zhishen *et al*. (1999). Se pesó 5 mg de los extractos etanólico y clorofórmico y se disolvieron en 5 mL de etanol absoluto. Se añadió una alícuota (0.25 mL) de extracto a un tubo de ensayo. Se agregó un 1 mL de H_2O destilada. Se añadió al tubo de ensayo 0.075 mL de $NaNO_2$ al 5%. Después de 6 minutos, se agregó 0,075 mL de $AlCl_3$ al 10%. Después de 5 minutos, 0.5 mL de NaOH 1 M y se completó el volumen total hasta 2.5 mL con H_2O. Se mezcló bien la solución. La absorbancia se medió frente a blanco de reactivo preparado a 510 nm, bajo a una solución estándar de Quercetina (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μg/ mL) (anexo 5) en un espectrofotómetro Multiskan GO Thermo Scientific. El contenido total de flavonoides se expresó como mg equivalentes de quercetina (CE)/ g de masa fresca. Las muestras se analizan por triplicado.

8.5.2. Cuantificación de fenoles totales.

Se realizó el método de Folin-Cicalteou propuesta por Singleton *et al*. (1999). Se pesó 10 mg de los extractos etanólico y clorofórmico y se disolvieron en 2 mL de etanol absoluto. Se añadió una alícuota (150 μL) de extracto a un tubo de ensayo. Se agregó 75 μL de Folin-Cicalteou. Inmediatamente se agitó en vortex. Se esperó 10 minutos, en absoluta oscuridad. Se añadió 375 μL de la solución de Carbonato de sodio. Se agitó y guardó en absoluta oscuridad por 30 minutos. La absorbancia se midió frente a blanco de reactivo preparado a 760 nm bajo una solución estándar de Ácido gálico (30, 50, 80, 100, 120, 150, 180, 210 μg/ mL) en un espectrofotómetro Multiskan GO Thermo Scientific. El

contenido total de flavonoides se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/ g de extracto seco. Las muestras se analizaron por triplicado.

8.6. Actividad Antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante mediante la técnica de eliminación de radicales libres de 2,2 difenil-1 picrilhidrazilo (DPPH) propuesta por Brand-Williams *et al.* (1995).

8.6.1. Preparación del DPPH y ácido ascórbico.

Se preparó una solución stock (A) de DPPH a 6 $x10^{-5}$ M diluida en metanol. Posteriormente, se preparó una solución stock (B), tomando 5 mL de la solución stock (A) diluido a 1mL de metanol. Se preparó una solución de ácido ascórbico a 1mM.

8.6.2. Preparación del extracto.

Se preparó una solución del extracto etanólico y clorofórmico del fruto y hoja de *C. ecuadorensis* a una concentración de 5 mg/mL.

8.6.3. Procedimiento.

Se colocó en un tubo de ensayo 100 µL de la solución de cada extracto y 1400 µL de la solución stock (B). Se dejó en oscuridad y tapados los tubos durante 30 minutos. Posteriormente, se medió las lecturas a 517 nm en un espectrofotómetro uv-visible BioMate 3S Thermo Scientific, utilizando como control negativo el metanol y control positivo el ácido ascórbico.

8.6.4. Cálculos del porcentaje de inhibición.

Se determinó el porcentaje de inhibición del DPPH mediante la fórmula:

$$\%I = \frac{\text{absorbancia del DPPH} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{absorbancia del DPPH}} \text{ x } 100$$

El porcentaje de inhibición de los extractos fue mayor al 50 %, por lo tanto, se realizó una solución estándar con concentraciones de 2.5, 1.25, 0.75, 0.5, 0.2 mg/mL, para encontrar la mínima inhibitoria del 50% (IC_{50}). El porcentaje de

inhibición de la solución de ácido ascórbico sirvió como patrón de antioxidante para la comparación de los porcentajes de inhibiciones.

8.7. Actividad antibacteriana

8.7.1. Condiciones de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Müeller-Hinton Agar a 30°C durante 24 h, para los cultivos de tres bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802) y tres Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* subsp*. spizizenii* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115)

8.7.2. Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión de disco propuesta por Bauer-Kirby (1966). Se diluyó las colonias de bacterias Gram positivas y Gram negativas en solución salina estéril al 0,9 %, se midieron las lecturas a 550 nm en un espectrofotómetro uv-visible BioMate 3S Thermo Scientific hasta que se obtuvo una turbidez a un estándar McFarland N °1 (300-8 CFU / mL).

Se tomó 200 µL del inóculo bacteriano estandarizado al McFarland N°1 y se incubó en agar Muller-Hinton a 36°C durante 24 h. Posteriormente, los extractos etanólicos de los frutos y hojas se diluyeron en etanol al 99% a una concentración de 200 ppm (200 mg/mL).

Se usó etanol al 99% como control negativo y como control positivo antibióticos para cada bacteria Gram negativa y Gram positiva (tabla 1). Se adicionaron 20 µL de cada solución de los extractos en un disco de filtro estéril individual de 6,35 mm y se colocaron en la superficie del agar Muller-Hinton previamente inoculado.

Los perímetros de la circunferencia de la zona de inhibición fue medida con un calibrador vernier digital posicionando la placa de Petri sobre un fondo oscuro.

Tabla 1. Antibióticos utilizados como control positivo contra bacterias Gram negativas (*) y Gram positivas.

Antibiótico	Dosis	Bacteria	Cepa
Gentamicin® Oxoid™	(10µg)	*Escherichia coli* *	ATCC 25922
Tobramicina® Oxoid™	(10µg)	*Pseudomonas aeruginosa* *	ATCC 15442
Tetracycline® Oxoid™	(30 µg)	*Vibrio parahaemolyticus**	ATCC 17802
Ceftriaxone® Oxoid™	(30 µg)	*Staphylococcus aureus*	ATCC 25923
Sulfamethoxazole® Oxoid™	(25 µg)	*Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*	ATCC 6633
Penicillin® G Oxoid™	(10µg)	*Listeria monocytogenes*	ATCC 19115

8.8. Análisis estadístico

Se comparó el porcentaje de inhibición del DPPH en extractos etanólico y clorofórmico de las hojas y mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis*, frente al ácido ascórbico, realizando un test de Anova simple, mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus.

CAPITULO IV

9. RESULTADOS

9.1. Tamizaje fitoquímico

El análisis fitoquímico de extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*, se realizó mediante varios ensayos químicos para identificar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, saponinas, quinonas, antraquinonas, triterpenoides, esteroles, taninos y cumarinas.

Los alcaloides fueron abundantes en todas las pruebas utilizadas en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos de *C. ecuadorensis*. No obstante, en ambos extractos de las hojas, los alcaloides se encontraron en menor proporción.

Los flavonoides fueron moderados en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis*. Posiblemente corresponden a los flavonoles, el cual se evidenció tratando la muestra con una solución de hidróxido de sodio al 10% y se observó la formación de una coloración café-naranja (anexo 6). Mientras que las saponinas, quinonas y antraquinonas se encontraron ausentes en todos los extractos evaluados (tablas 2 y 3).

En los extractos evaluados de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis*, los compuestos fenólicos estuvieron presentes en pequeñas cantidades, posiblemente corresponden a los taninos condensados como el catecol, el cual se evidenció cuando se trató la muestra con una solución de cloruro férrico al 10% y se observó la formación de un precipitado marrón (anexo 7).

Las cumarinas se encuentran en proporciones moderadas en los extractos etanólicos de los frutos y hojas, mientras que en los extractos clorofórmicos de estas partes aéreas, están en débiles proporciones (anexo 8; tablas 2 y 3). En los extractos etanólicos de los frutos y hojas, los triterpenos estuvieron presentes en moderadas cantidades. Los esteroles fueron más abundantes en el extracto etanólico de los frutos y moderados en el extracto etanólico de las hojas (anexo 9; tabla 2).

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de extractos etanólicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

	Alcaloides					**Flavonoides**	**Saponinas**	**Quinonas/Antraquinonas**			**Esteroles/ Triterpenos**		**Taninos**	**Cumarinas**
Extractos etanólicos	RW	RM	RB	RD	RS	NaOH 10%	Espuma	RBg	NH_4OH 10%	H_2SO_4	RS-L	RL-B	$FeCl_3$10%	Luz UV
Frutos	+++	+++	+++	+++	-	++	-	-	-	+	+++	+ Azul	+ Negro	+++
Hojas	+	+	-	+	-	++	-	-	-	-	++	++ Azul	+ Negro	+

Claves: Ausente (-), Moderado (++), Abundante (+++). Reactivo de Wagner (RW), Reactivo de Meyer (RM), Reactivo de Bouchardart (RB), Reactivo de Dragendorff (RD), Reactivo de Shinoda (RS), Reactivo de Borntrager (RBg), Reactivo de Salkoswki (RS-L), Reactivo de Liberman Bouchard (RL-B).

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de extractos clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

	Alcaloides					**Flavonoides**	**Saponinas**	**Quinonas/Antraquinonas**			**Esteroles/ Triterpenos**		**Taninos**	**Cumarinas**
Extractos clorofórmicos	RW	RM	RB	RD	RS	NaOH 10%	Espuma	RBg	NH_4OH 10%	H_2SO_4	RS-L	RL-B	$FeCl_3$ 10%	Luz UV
Frutos	++	++	++	++	-	++	-	-	-	-	++	-	+ Negro	++
Hojas	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+ Azul	+ Negro	+

Claves: Ausente (-), Moderado (++), Abundante (+++). Reactivo de Wagner (RW), Reactivo de Meyer (RM), Reactivo de Bouchardart (RB), Reactivo de Dragendorff (RD), Reactivo de Shinoda (RS), Reactivo de Borntrager (RBg), Reactivo de Salkoswki (RS-L), Reactivo de Liberman Bouchard (RL-B).

9.2. Cuantificación de carbohidratos, lípidos y proteínas

Se cuantificaron los carbohidratos, lípidos y proteínas totales en la biomasa seca del mesocarpio del fruto de *C. ecuadorensis*. Esta reveló concentraciones de 9.19 ± 0.25 g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco; 14.90 ± 0.30 g de lípidos totales/ 100 g de peso seco y 3.39 ± 0.08 g de proteínas totales/ 100 g de peso seco, respectivamente. La presencia de lípidos en el mesocarpio del fruto fue mayoritaria entre los metabolitos primarios evaluados (fig. 14).

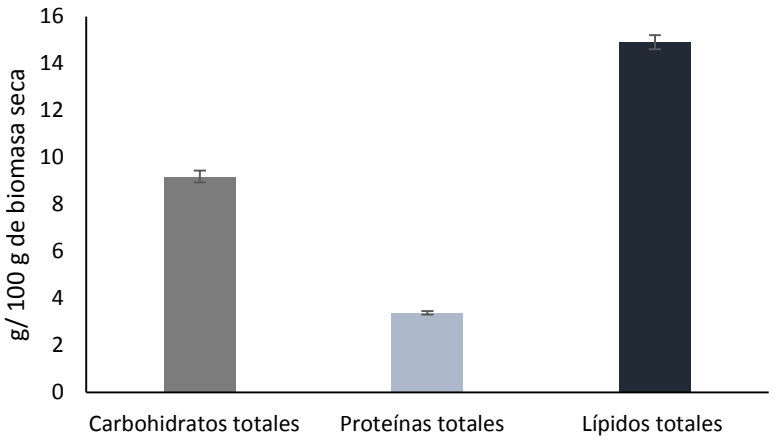


Figura 14. Contenidos totales de carbohidratos (■), proteínas (■) y lípidos (■), determinadas en la biomasa seca del mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis*.

9.3. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

9.3.1. Cuantificación de fenoles totales

Se determinó el contenido fenólico total del extracto etanólico y clorofórmico de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis* por medio de una curva de calibración de ácido gálico (GAE), en la cual se obtuvo la ecuación de regresión lineal y= 0.0071x + 0.0226, r^2= 0.9961 (fig. 15; anexo 10).

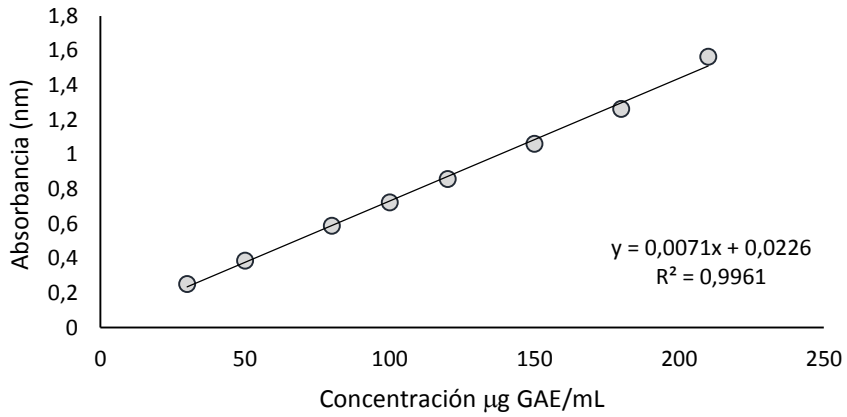


Figura 15. Curva de calibración de ácido gálico (GAE) para la determinación de contenidos de fenoles totales de los extractos etanólicos y cloroformicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

Se observó que el extracto etanólico de los frutos de *C. ecuadorensis* posee el mayor contenido fenólico, con una concentración de 20.82 ± 0.87 mg GAE/ g de extracto seco, no obstante, el extracto clorofórmico de las hojas presentó el menor contenido fenólico de 5.44 ± 0.18 mg GAE/ g de peso seco (tabla 4).

Tabla 4. Contenidos de fenoles totales determinados en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

Muestras	Fenoles totales (mg GAE/ g extracto seco)
Extracto etanólico de los frutos	20.82 ± 0.87
Extracto clorofórmico de los frutos	18.04 ± 0.75
Extracto etanólico de las hojas	10.79 ± 0.61
Extracto clorofórmico de las hojas	5.44 ± 0.18

9.3.2. Cuantificación de flavonoides totales

Se determinó el contenido de flavonoides totales de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas por medio de una curva de calibración de quercetina (CE), en la cual se obtuvo la ecuación de regresión lineal y= 0.00045x + 0.067, r^2= 0.997 (fig. 16; anexo 11).

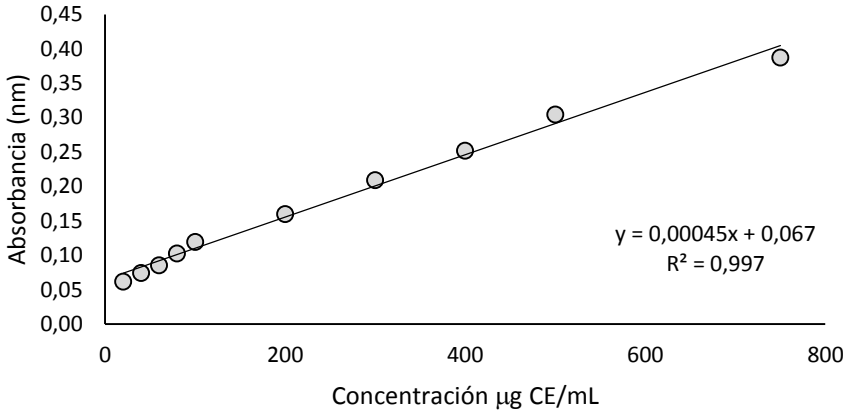


Figura 16. Curva de calibración de quercetina (CE) para la determinación de contenidos de flavonoides totales de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

El mayor contenido de flavonoides de los extractos evaluados se encontró en el extracto etanólico de los frutos de *C. ecuadorensis*, con una concentración de 134.36 ± 0.34 mg CE/ g de extracto seco, no obstante, el extracto clorofórmico de las hojas presentó el menor contenido fenólico de 44.05 ± 1.65 mg CE/ g de extracto seco (tabla 5).

Tabla 5. Contenidos de fenoles totales determinadas en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

Muestras	Flavonoides totales (mg CE/ g extracto seco)
Extracto etanólico de los frutos	134.36 ± 0.34
Extracto clorofórmico de los frutos	132.38 ± 1.69
Extracto etanólico de las hojas	44.22 ± 0.59
Extracto clorofórmico de las hojas	44.05 ± 1.65

9.4. Actividad antioxidante

Las actividades antioxidantes (porcentaje de inhibición del radical DPPH) de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas fueron comparadas frente al ácido ascórbico. El ácido ascórbico obtuvo un 95.00 ± 0.0 % de inhibición de DPPH, semejante al extracto etanólico del fruto que reveló un 86.32 ± 1.49% de inhibición del DPPH. Seguido del extracto clorofórmico de los frutos con el 70.50 ± 0.10 % de inhibición, el extracto etanólico de las hojas con el 77.21 ± 0.11 % de inhibición; y el extracto clorofórmico de las hojas con el 66.91 ± 0.12% de inhibición, siendo estos resultados considerables frente al ácido ascórbico (fig. 17; anexo 12).

Puesto que el p-valor del test de Anova simple fue inferior a 0.05, hubo diferencia significativa estadísticamente entre las medias de la actividad antioxidante entre los extractos evaluados de *C. ecuadorensis* y el ácido ascórbico, para un nivel de confianza del 95%.

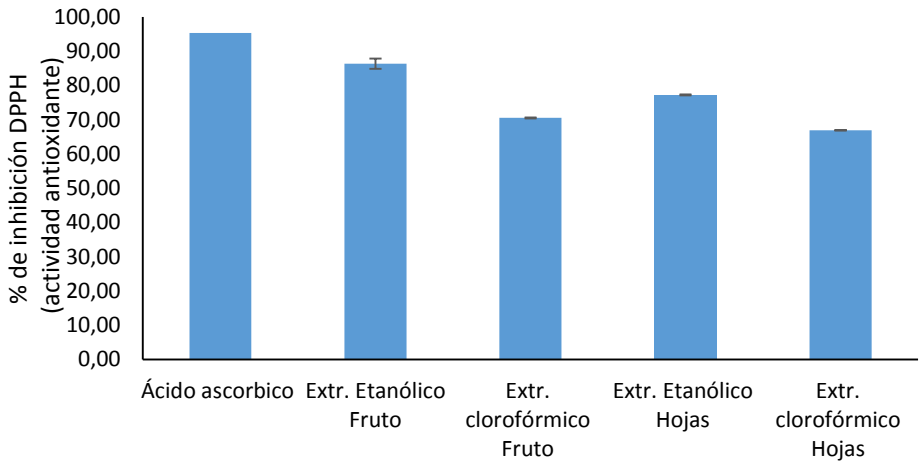


Figura 17. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* comparadas con el ácido ascórbico.

El extracto etanólico del fruto de *C. ecuadorensis* presentó una concentración de inhibición del 50% (IC_{50}) de 1.90 mg/mL (tabla 6; anexo 13), este se calculó con la ecuación de la regresión lineal y= 14.092x + 22.872, r^2= 0.9916 (anexo 14).

El extracto clorofórmico del fruto de *C. ecuadorensis* presentó un IC_{50}= 1.95 mg/mL (tabla 6; anexo 15), este se calculó con la ecuación de regresión lineal y= 7.2036x + 35.955 con un r^2= 0.977 (anexo 16).

El extracto etanólico de las hojas de *C. ecuadorensis* presentó un IC_{50}= 1.91 mg/mL (tabla 6; anexo 17), este se calculó con la ecuación de regresión lineal y= 22.489x + 7.1014con un r^2= 0.9987 (anexo 18).

El extracto clorofórmico de las hojas de *C. ecuadorensis* presentó un IC_{50}= 2.00 mg/mL (tabla 6; anexo 19), este se calculó con la ecuación de regresión lineal y= 21.943x + 6.4805 con un r^2= 0.9791 (anexo 20).

Tabla 6. Porcentaje de inhibición y IC_{50} de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

Muestras	Capacidad antioxidante IC_{50} mg/mL
Ácido ascórbico	-
Extracto etanólico de los frutos	1.90
Extracto clorofórmico de los frutos	1.95
Extracto etanólico de las hojas	1.91
Extracto clorofórmico de las hojas	2.00

Claves: Ausente (-)

Por otro lado, en la fig. 18 se observa un estudio comparativo del contenido de flavonoides y fenoles totales con la actividad antioxidante. Los contenidos de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/ g de los extractos etanólicos y clorofórmicos del fruto de *C. ecuadorensis*, se encuentran relacionados con la actividad antioxidante los mencionados extractos. Sin embargo, la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas no esta relacionada con los contenidos de fenoles totales de dichos extractos.

Además, los contenidos totales de flavonoides expresados como mg equivalentes de quercetina (CE)/ g de los extractos etanólico y clorofórmico del fruto de *C. ecuadorensis*, no están relacionadas con la actividad antioxidante de dichos extractos (fig. 19). Sin embargo, la actividad antioxidante de los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas está directamente relacionadas con los contenidos totales de los mencionados extractos (fig. 19).

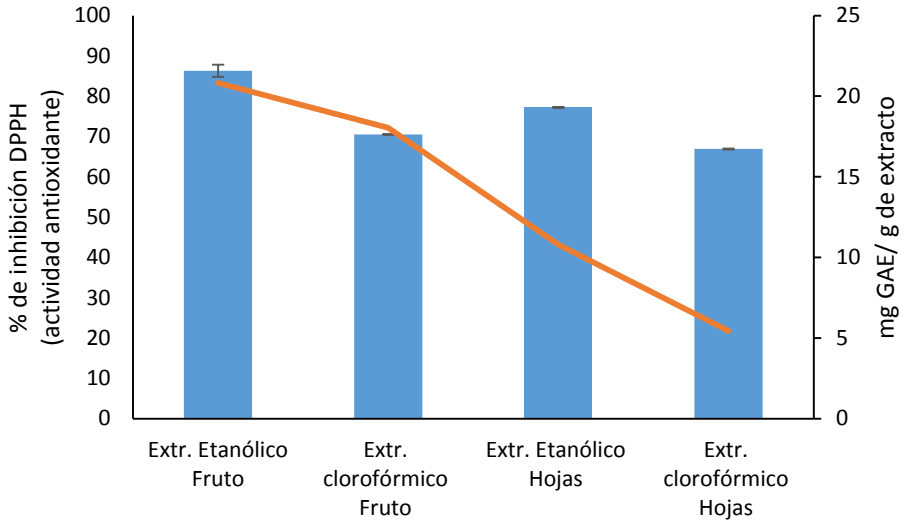


Figura 18. Comparación de los porcentajes de inhibición del DPPH (actividad antioxidante) frente a los contenidos de fenoles totales (mg GAE/ g; línea café) de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

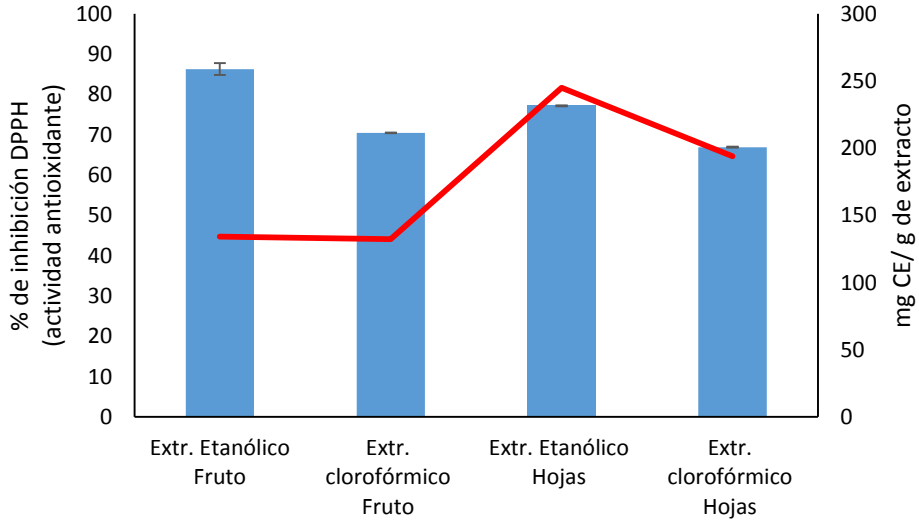


Figura 19. Comparación de los porcentajes de inhibición del DPPH (actividad antioxidante), frente a los contenidos de flavonoides totales (mg CE/ g; línea roja) de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

9.5. Actividad antibacteriana

Los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis* no presentaron actividad antibacteriana contra las tres bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802), y las tres Gram positivas ensayadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115) (tabla 7).

Tabla 7. Actividad antibacteriana contra tres bacterias Gram negativas (**) y tres Gram positivas (*).

Zona del halo de inhibición (mm)										
	Extractos etanólicos		Extractos clorofórmicos		Antibióticos de referencia					
Bacterias	**Frutos**	**Hojas**	**Frutos**	**Hojas**	**CN**	**TOB**	**TE**	**CRO**	**SXT**	**P**
****Escherichia coli* ATCC 25922**	NI	NI	NI	NI	22					
****Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442**	NI	NI	NI	NI		22				
****Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802**	NI	NI	NI	NI			27			
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	NI	NI	NI	NI				13		
***Bacillus subtilis* ATCC 6633**	NI	NI	NI	NI					30	
***Listeria monocytogenes* ATCC 19115**	NI	NI	NI	NI						18

Claves: No presentó inhibición (NI), Gentamicin (CN) (10 µg), Tobramicina (TOB) (10µg), Tetracycline (TE) (30 µg), Ceftriaxone (CRO) (30 µg), Sulfamethoxazole (STX) (25 µg), Penicillin G (P) (10 µg).

10. DISCUSIÓN

10.1. Tamizaje fitoquímico

Todos los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* analizados, revelaron la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos, esteroles y cumarinas, mientras que las saponinas, quinonas y antraquinonas se encontraron ausentes. Estos metabolitos secundarios que podrían ser responsables a las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, antihipertensivas y antiparasitarias (De Tommasi, De Simone, Speranza y Pizza, 1999; Basch, Gabardi, y Ulbricht, 2003; Siciliano, De Tommasi, Morelli y Braca 2004; Pozner y Novara 2010; Khan, Hussain, Matjais, Zakaria y Khan, 2011; Okunrobo, Uwaya, Imafidon, Osarumwense y Omorodion, 2012; Yue, Xu, Cao, Zhang y Zhao, 2013; Noumedem *et al*, 2013; Thiruvengadam y Ill-Chung, 2015).

La familia Cucurbitaceae es conocida debido a la presencia de saponinas (Karpagam, Varalakshmi, Bai y Gomathi, 2011; Gurav, Mondal, y Vijayakumar, 2014; Kushawaha, Chatterji, Yadav, y Watal, 2016); no obstante, en algunas especies del género *Cucurbita* se las encuentra con menor frecuencia o ausentes (Singh, 2012; Noumedem *et al.,* 2013; Salehi *et al*., 2019). Por otro lado, los estudios sobre los contenidos de las quinonas y sus derivados en esta familia son escasos.

En todas las pruebas utilizadas en los extractos etanólicos y clorofórmicos de *C. ecuadorensis* se detectaron presencias considerables de alcaloides en los frutos, mientras que en las hojas los alcaloides se encuentran en menor proporción. Diversos estudios sobre el contenido de alcaloides presentes en el género *Cucurbita*, indican que la mayor proporción se encuentran en las semillas, las mismas que han sido estudiadas por ser los responsables de propiedades antibacterianas (Noumedem *et al.,* 2013; Kushawaha, Chatterji, Yadav, y Watal, 2016; Bahramsoltani *et al.*, 2017; Wang, Liu, Wang, Yu, Xu y Yang, 2017).

Los contenidos de flavonoides en los extractos etanólico y clorofórmico de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis* fueron moderados, posiblemente corresponden a los flavonoles. Esto coincide con Iswaldi, Gómez, Lozano, Arráez, Segura y Fernández (2013), quienes mencionaron que los flavonoles

como la quercetina y otros derivados responsables de la actividad antioxidante y antibacteriana en especies del género *Cucurbita*.

En el extracto etanólico y clorofórmico de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis*, los compuestos fenólicos fueron pocos frecuentes, estos posiblemente corresponden a los taninos condensados como el catecol. Sin embargo, Salehi *et al*., 2019 mencionan que los taninos y otros derivados, son abundantes en algunas especies del género *Cucurbita*.

Los triterpenos estuvieron presentes en moderadas proporciones en los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos de *C. ecuadorensis*. Este metabolito, podría estar relacionado con la presencia del cucurbitano o cucurbitacina, un triterpenoide localizado en los frutos de esta familia responsable de las propiedades antioxidantes y antinflamatorias, además es el responsable del sabor amargo en los frutos, lo cual es apetecible por equinos (Konoshima *et al.*, 1994; Lira, 1995; Dandawate, Subramaniam, Padhye y Anant, 2016), esto podría explicar el uso de los frutos de *C. ecuadorensis* en caso de afecciones de la piel y su consumo por equinos en Ecuador (de la Torre *et al.*, 2008).

En los extractos etanólicos de los frutos y hojas de *C. ecuadorensis*, las cumarinas se encuentran en proporciones moderadas, mientras que en los extractos clorofórmicos de estas partes aéreas se encuentran en débiles proporciones. Esta variación de cumarinas en ambos extractos podría estar relacionados al tipo de solvente orgánico que se ha utilizado, debido a que éste compuesto es soluble en solventes polares como el etanol, mientras que en solventes apolares como el cloroformo mantiene su proporción (Domínguez, 1973).

No todas las familias del reino vegetal poseen cumarinas, sin embargo, en Cucurbitaceae este compuesto se encuentra distribuido en hojas y frutos. Estas son de gran interés por sus propiedades terapéuticas, vasodilatadoras, antitumorales, espasmolíticas, alelopáticas y antioxidantes (Domínguez, 1973; Jain y Joshi, 2012). No obstante, los registros de cumarinas en especies del género *Cucurbita* son muy escasos.

10.2. Contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas

Como producto del metabolismo primario se encuentran los carbohidratos, lípidos y proteínas. Con el consumo adecuado, estos metabolitos pueden ser beneficiosos para el ser humano, además poseen una gran importancia en el campo biotecnológico, debido a que permiten innovar nuevos suplementos alimenticios de origen natural para producciones industriales (Petiard y Bariaud-Fontanel, 1987; Rivas, Oranday y Verde, 2016; Fang, Fernie y Luo, 2018).

Los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* contienen un elevado valor nutricional y exhiben diferencias marcadas en cuanto a las concentraciones de carbohidratos, lípidos y proteínas totales, en comparación con otras conocidas especies de Cucurbitaceae de uso alimenticio y medicinal (tabla 8).

Tabla 8. Tabla comparativa de los contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de las especies de Cucurbitaceae de uso alimenticio y/o medicinal

Frutos	g de carbohidratos totales/ 100 g de peso seco	g de lípidos totales/ 100 g de peso seco	g de proteínas/ 100 g de peso seco	Fuente
Cucurbita ecuadorensis	9.19 ± 0.25	14.90 ± 0.30	3.39 ± 0.08	Autor
Citrullus lanatus (sandía)	4.50	0.15	0.40	Valero, Rodríguez, Ruiz y Ávila (2018)
Cucumis melo (melón)	6.00	0.00	0.60	
Cucumis sativus (pepino)	1.90	2.00	0.70	
Cucurbita pepo (calabacín)	2.20	0.20	0.65	
Cucurbita moschata	1.90	0.16	0.97	Jacobo, Maróstica, Zazueta y Gallegos (2011)
Cucurbita maxima (zapallo)	2.10	0.25	0.70	Ortega (2013); Estrada, Sánchez y Alcántar (2018)
Cucurbita ficifolia (zambo)	4.40	0.30	0.40	
Momordica charantia (achochilla)	4.80	0.18	0.15	Semeniuk, Bela, Vonka, Romero y Núñez (2018)

El elevado valor nutricional registrado en los frutos de *C. ecuadorensis* (Tabla 8) concuerda con Piperno, Andres y Stothert (2000); Pickersgill (2007); Stothert (2011), el cual mencionan que esta especie fue semi-domesticada y utilizada como alimento por habitantes de la cultura Las Vegas, hasta su posterior remplazo por *Cucurbita moschata*, presumiblemente porque posee un sabor más agradable.

Los altos contenidos de lípidos totales que posee el mesocarpio de los frutos de *C. ecuadorensis*, sugieren su uso como antihipercolesterolemicos debido a que los triterpenos podrían inhibir los componentes lipídicos, y reducir las concentraciones de colesterol en la absorción del intestino delgado (Plat *et al*., 2019).

10.3. Contenidos totales de fenoles y flavonoides

10.3.1. Contenidos de fenoles totales

Los fenoles son de estructura compleja con grupos hidroxilos adheridos a proteínas o a leves cantidades de iones de hierro, presentan una amplia distribución en cualquier parte aérea de una planta, poseen propiedades astringentes, vasoconstrictoras, antibacterianas y antinflamatorias (García y Carril, 2009; Sieniawska y Baj, 2017).

Los extractos etanólico y clorofórmico de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* mostraron 20.82 ± 0.87 mg de GAE /g de extracto seco y 18.04 ± 0.75 mg de GAE /g de extracto seco, respectivamente. Estas concentraciones de fenoles totales estan entre las más altas comparadas con el de otras especies en el mismo género; los contenidos fenólicos son solamente comparables a los de *Cucurbita moschata* (tabla 9). Las elevadas concentraciones de contenidos fenólicos de esta especie al tener relación con la actividad antioxidante en los frutos, son uno de los metabolitos responsables de dicha actividad.

Tabla 9. Tabla comparativa de los contenidos de fenoles totales en los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal

Material vegetal	**Fenoles totales (mg de GAE/ g de extracto seco)**		**Fuente**
Frutos	Extracto etanólico	Extracto clorofórmico	
Cucurbita ecuadorensis	20.82 ± 0.87	18.04 ± 0.75	Autor
Cucurbita moschata	22.92 ± 1.06	S/D	Jacobo, Maróstica, Zazueta y Gallegos (2011)
Cucurbita maxima	7.34 ± 0.4	S/D	Deng, Lin, Xu, X, Gao, Xie, y Li (2013); Gurav, Mondal, y Vijayakumar (2014)
Cucurbita pepo	4.99 ± 0.29	S/D	

Claves: Sin datos (S/D)

Los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis* mostraron contenidos fenólicos totales de 10.79 ± 0.61 mg de GAE/ g de extracto seco y 5.44 ± 0.18 mg de GAE / g de extracto seco. Por lo tanto se podría considerar que este es el primer registro de los contenidos fenólicos totales en extractos etanólicos y cloroformicos de las hojas de una especie de este género.

10.3.2. Contenidos de flavonoides totales

Los flavonoides son pigmentos conformados por compuestos fenólicos que se encuentran en todas las partes aéreas del reino vegetal; son metabolitos de interés debido a sus potenciales propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antinflamatorias (Singleton *et al*., 1999; Zhishen *et al*., 1999; Rondón *et al*., 2017).

Los extractos etanólico y clorofórmico de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* presentaron 134.36 ± 0.34 mg de CE/ g de extracto seco y 132.38 ± 1.69 mg de CE/ g de extracto seco. Estas concentraciones de fenoles totales estan entre las más altas comparadas con dos especies del mismo género (tabla 10).

Tabla 10. Tabla comparativa de los contenidos de Flavonoides totales en los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal

Material vegetal	**Flavonoides totales (mg de CE/ g de extracto seco)**		**Fuente**
Frutos	Extracto etanólico	Extracto clorofórmico	
Cucurbita ecuadorensis	134.36 ± 0.34	132.38 ± 1.69	Autor
Cucurbita moschata	77.77 ± 1.82	S/D	Valenzuela, Cravzov, Soro, Tauguinas, Giménez y Gruszycki (2014)
Cucurbita maxima	80.14 ± 0.18	S/D	Kushawaha, Chatterji, Yadav, y Watal (2016)

Claves: Sin datos (S/D)

Los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis* mostraron contenidos de flavonoides totales de 44.22 ± 0.59 mg de CE/ g de extracto seco y 44.05 ± 1.65 mg de CE / g de extracto seco. Estas concentraciones de fenoles totales estan entre las más altas comparadas con el de otras especies del mismo género (tabla 11).

Tabla 11. Tabla comparativa de los contenidos de Flavonoides totales en las hojas de *Cucurbita ecuadorensis* con las hojas de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal

Material vegetal	**Flavonoides totales (mg de CE/ g de extracto seco)**		**Fuente**
Hojas	Extracto etanólico	Extracto clorofórmico	
Cucurbita ecuadorensis	44.22 ± 0.59	44.05 ± 1.65	Autor
Cucurbita maxima	26.50 ± 1.40	S/D	Saha, Mazumder y Haldar (2011)
Cucurbita pepo	25.43	S/D	Koh, Lu, y Zhou (2019).

Claves: Sin datos (S/D)

10.4. Actividad antioxidante

A pesar de que hubo diferencia significativa estadísticamente entre los extractos evaluados de *C. ecuadorensis* y el ácido ascórbico, el porcentaje de

inhibición del radical DPPH en el extracto etanólico de los frutos fue de 86.32%, cercano al del ácido ascórbico (Vitamina C) que obtuvo un porcentaje del 95.00%.

La actividad antioxidante de los frutos de *C. ecuadorensis* poseen un 86.32 ± 1.49 % de inhibición del DPPH, con un IC_{50} = 1.90 mg/mL. Esta propiedad está relacionada con los contenidos de fenoles totales presentes en los frutos (fig. 18) y coincide con Bahramsoltani *et al.* (2017), quienes mencionaron que los contenidos de fenoles totales de los frutos atribuyen a la actividad antioxidante. Estos resultados estan entre las más altas comparadas con el de otras especies en el mismo género (Tabla 12).

Tabla 12. Tabla comparativa de la actividad y capacidad antioxidante de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal

Material vegetal	**Actividad antioxidante**	**Capacidad antioxidante**	**Fuente**
Frutos	**Porcentaje de innhibicion (%)**	**IC_{50} (mg/mL)**	
Cucurbita ecuadorensis	86.32 ± 1.49	1.90 ± 0.14	Autor
Cucurbita maxima	29.60	4.07	Valenzuela, Cravzov, Soro, Tauguinas, Giménez y Gruszycki (2014); Indrianingsih, Rosyida, Apriyana, Hayati, Nisa, Darsih, Kusumaningrum, Ratih y Indirayati (2019)
Cucurbita moschata	23.85	4.02	Bahramsoltani *et al.* (2017); Indrianingsih, Rosyida, Apriyana, Hayati, Nisa, Darsih, Kusumaningrum, Ratih y Indirayati (2019)

Adicionalmente, las hojas de *C. ecuadorensis* posee un 77.21 ± 0.11 % de inhibición del DPPH con un IC_{50} = 1.91 mg/mL. Estos resultados demuestran la actividad antioxidante presente en hojas de *C. ecuadorensis*, esta propiedad está relacionada con los contenidos de flavonoides totales de dichos extractos (fig. 19) y coinciden con Moyo, Amoo, Ncube, Ndhlala, Finnie, y Van Staden (2013), quienes indican que los contenidos de flavonoides totales están relacionados con la actividad antioxidante de los frutos en *Cucurbita maxima*. Estos resultados están por debajo comparadas con el de otras especies en el mismo género que presentaron triterpenos, esteroles y otros compuestos bioactivos en mayores proporciones (Tabla 13).

Tabla 13. Tabla comparativa de la actividad y capacidad antioxidante en las hojas de *Cucurbita ecuadorensis* con las hojas de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal

Material vegetal	**Actividad antioxidante**	**Capacidad antioxidante**	**Fuente**
Hojas	**Porcentaje de innhibicion (%)**	**IC50 (mg/mL)**	
Cucurbita ecuadorensis	77.21 ± 0.11	1.91	Autor
Cucurbita pepo	84.28	0.49	Dar, Farman, Dar, Khan, Munnir, Rasheed y Waqas (2017)
Cucurbita maxima	85.15	0.47	Yenda, V-Rao y Rao (2014)

10.5. Actividad antibacteriana

A pesar de que los extractos de *C. ecuadorensis* poseen alcaloides en todas las pruebas utilizadas, no presentaron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp*. spizizenii* y *Listeria monocytogenes*. La causa podría ser la ausencia de otros compuestos con actividad antibacteriana como quinonas, antraquinonas y saponinas, debido a que estas sustancias desestabilizan la membrana y se adhieren a polipéptidos de la pared celular de las bacterias que inactivan o inhiben la función de las enzimas o de las proteínas, ocasionando complejos irreversibles en su estructura (Ravishankar *et al*., 2012; Singh, 2012; Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Adicionalmente, ambos extractos de las hojas de *C. ecuadorensis* tampoco poseen actividad antibacteriana contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* subsp*. spizizenii* y *Listeria monocytogenes*. Este resultado coincide con Castillo, Molinares, Campo, y Bettin (2017), quienes mencionan que el extracto etanólico de las hojas de *Cucurbita moschata* no posee actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae.* Por el contrario, EI-Aziz, EI-Kalek y City (2011), reportan que el extracto etanólico de las hojas de *Cucurbita pepo* inhibe el crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis, Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae.*

Los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos evaluados, difieren con numerosos estudios realizados de los frutos de varias especies del género *Cucurbita*. Es decir, la mayoría de las especies de este género se caracterizan por inhibir el crecimiento de las cepas de *Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtilis*, *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* (Noumedem *et al.,* 2013; Kushawaha, Chatterji, Yadav, y Watal, 2016; Bahramsoltani *et al.*, 2017; Wang, Liu, Wang, Yu, Xu y Yang, 2017; Salehi *et al*., 2019). Por lo tanto, se considera que *C. ecuadorensis* podría ser la única especie de este género que no posee actividad antibacteriana en los frutos y hojas (tabla 14).

Tabla 14. Tabla comparativa de la actividad antibacteriana de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* con los frutos de algunas especies de *Cucurbita* de uso alimenticio y/o medicinal

	Inhibición de crecimiento	
Especie	**Bacterias**	**Fuente**
Cucurbita ecuadorensis	NI	Autor
Cucurbita moschata	*Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginos, Pichia fermentans* y *Staphylococcus aureus*	Wang, Liu, Wang, Yu, Xu y Yang (2017); Salehi *et al.* (2019)
Cucurbita pepo	*Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae y Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa*	Magassouba *et al*. (2010); Noumedem *et al*. (2013)
Cucurbita maxima	*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus werneri*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Kleibsella pneumoniae*	Ravishankar *et al*. (2012); Singh (2012)

Claves: No presentó inhibición (NI).

11. CONCLUSIONES

Es importante evaluar las propiedades terapéuticas de las plantas con usos etnobotánicos, a través de técnicas científicas que permitan proporcionar información sobre las especies de plantas que poseen potenciales terapéuticos que aportan uno o varios beneficios para la salud.

Según la bibliografía, este trabajo podría considerarse como el primer registro sobre el tamizaje fitoquímico, los contenidos totales de carbohidratos, lípidos y proteínas, los contenidos totales de fenoles y flavonoides, la actividad antioxidante y la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*.

Los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de esta especie revelaron la mayoría de los metabolitos secundarios. Sin embargo, es importante destacar que los taninos, flavonoides, triterpenos, esteroles y cumarinas fueron los compuestos que contribuyen con la eliminación de radicales libres (actividad antioxidante). Los extractos evaluados de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis* poseen un gran potencial de actividad antioxidante siendo cercanos a la propiedad antioxidante del ácido ascórbico (vitamina C).

El mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis* posee altos contenidos de carbohidratos, lípidos y proteínas, en comparación con los componentes nutricionales de los frutos de otras especies de la familia Cucurbitaceae, que son mayormente consumidos en el Ecuador y que poseen una alta demanda alimenticia a nivel mundial, como: *Citrullus lanatus* (sandía)*, Cucumis melo* (melón)*, Cucumis sativus* (pepino), *Momordica charantia* (achochilla), *Cucurbita maxima* (zapallo) y *Cucurbita ficifolia* (zambo).

Los altos contenidos de lípidos totales que posee el mesocarpio de los frutos de *C. ecuadorensis*, y el hecho de que los triterpenos podrían inhibir los componentes lipídicos, y reducir las concentraciones de colesterol en la absorción del intestino delgado (op. cit.), indican la factibilidad de poder realizar ensayos de consumo de los frutos de esta especie por sus propiedades medicinales, para contribuir a regular los elevados niveles de colesterol en seres humanos.

La actividad antibacteriana no fue satisfactoria en todos los extractos evaluados.

La presente tesis reporta importante información sobre el elevado potencial antioxidante y nutricional que poseen los frutos de *Cucurbita ecuadorensis*, por lo que podría considerarse como un efectivo suplemento nutricional con un gran potencial antioxidante natural.

12. RECOMENDACIONES

Realizar estudios dirigidos a la identificación de los compuestos bioactivos mayoritarios en *C. ecuadorensis*, mediante técnicas de cromatografía de gases o líquida de alta resolución.

Aislar y purificar los compuestos bioactivos presentes de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis*, para orientar el análisis del potencial terapéutico de los frutos como antioxidante y conocer el o los componentes responsables de dicha propiedad.

Realizar estudios cualitativos y cuantitativos acerca de las vitaminas u otros compuestos nutricionales que están presentes en los frutos de *C. ecuadorensis*.

Realizar ensayos *in vivo* del potencial antihipercolesterolemico de los extractos de los frutos de *C. ecuadorensis,* con dirección a aplicaciones en farmacología.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los metabolitos secundarios estuvieron presentes en los frutos y hojas de *C. ecuadorensis,* se podrían realizar más estudios sobre las propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas, antihipertensivas, alelopáticas, vasodilatoras, antitumorales, espasmolíticas y otros.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Accame, M. (2000). Compuestos, M.E. Compuestos fenólicos: Quinonas. *Panorama Actual del Medicamento*, 24: 778-782.

Álvarez, G. (2014). Caracterización y potencial de uso de especies frutales nativas de la región sur de la Amazonía ecuatoriana. Vol. 2. *CEDAMAZ*. Ecuador.

Andjelkovic, M., Van Camp, J., Trawka, A., y Verhé, R. (2010). Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil*. European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2): 208-217.

Arango, G. J. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. *Facultad de Química Farmacéutica. UDEA*.

Ardila, D. (2014). Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de las plantas *Annona muricata, Annona cherimola* y *Physalis peruviana* en la línea célular MCF-7 de adenocarcinoma de seno. Bachelor's thesis, Universidad Pontifica Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá

Ávalos, A y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.

Bahramsoltani *et al*. (2017). Evaluation of phytochemicals, antioxidant and burn wound healing activities of *Cucurbita moschata* Duchesne fruit peel. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20: 798.

Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J., Tinitana-Imaicela, F. y Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: a review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, 24: 2283-2296.

Basch, E., Gabardi, S., y Ulbricht, C. (2003). Bitter melon (*Momordica charantia*): A review of efficacy and safety. *Am. J. Health-Syst. Pharm*., 65: 356-359.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris J y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493.

Bingham, S., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L. y Cobarde, A. (1998). Fitoestrógenos: ¿Somos ahora? *Br. J. Nutr*., 79: 393-406.

Blanco, M. T., Font, R., Martínez, D., y Del Río, M. (2015). Diversity of natural pigments and phytochemical compounds from exocarp and mesocarp of 27 *Cucurbita pepo* accessions. *Scientia Horticulturae*, 197: 357–365.doi:10.1016/j.scienta.2015.09.064

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - *Food Science and Technology*, 28(1): 25–30.

Caili, F. U., Huan, S., y Quanhong, L. I. (2006). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant foods for human nutrition*, 61(2): 70-77.

Cano, D., Macías, C., Pereira, E., Dranguet, Y., Guzmán, V y Calzada, A. (2009). *Farmacología de las plantas medicinales*. Facultad de ciencias Médicas. Cuba. 1-13 pp.

Cardoso, S y Pastrana, O. (2015). Acción de agentes antibacterianos; Agentes químicos. Guía teorico-practico. Universidad Católica de Salta, Facultad de Ciencias y veterinarias. Argentina.

Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). Colombia forestal, 12(1): 161-170.

Cavalieri, S. J. *et al*. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. American Society for Microbiology. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.

Cely, W., Matulevich, J. y Castrillón, W. (2014). Triterpenes and sterols *of Salvia leucantha* (Lamiaceae) and evaluation of their antioxidant capacity. Universidad Militar Nueva Granada. 10(1), 68-79.

Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI, 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow

aerobically; Approved standard. M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cuca, L., Coy, C., Coy, E. y Lozano, J. (2011). Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia*. 45(2): 275-282

Cutler, H. C y Whitaker, T. W. (1968). A New Species of *Cucurbita* from Ecuador. *Ann. Missouri Bot. Gard*., 55: 392-396.

Chang, C., Yang, M. H., Wen, H. M y Chern, J. C (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.

Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J. y Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*, 66(1), 212–229.doi:10.1111/j.1365-313x.2011.04520.x

del Castillo Pereira, A., Molinares Moscarella, P., Campo Urbina, M., y Bettin Martínez, A. (2017). Actividad antibacteriana del extracto total de hojas de *Cucurbita moschata* Duchesne (Ahuyama). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 0-0.

de la Torre, L., Muriel, P. y Balslev, H. (2006). Etnobotánica en los Andes del Ecuador. Universidad Mayor de San Andrés. 246-267.

de la Torre, L., H. Navarrete, P. Muriel., M. J. Macía y H. Baslev (eds.). (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA de la escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.

Delporte, C. (2010). Farmacognosia, Trabajos prácticos. Departamento de farmacología y toxicología. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile, 31.

Dandawate, P. R., Subramaniam, D., Padhye, S. B., y Anant, S. (2016). Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. *Chinese journal of natural medicines*, 14(2), 81-100.

Dar, P., Farman, M., Dar, A., Khan, Z., Munnir, R., Rasheed, A y Waqas, U. (2017). Evaluation of antioxidant potential and comparative analysis of antimicrobial activity of various extracts of *Cucurbita pepo* L. leaves. *Journal of Agricultural Science and Food Technology*. 3 (6). 103-109.

Deng, G.-F., Lin, X., Xu, X.-R., Gao, L.-L., Xie, J.-F., y Li, H.-B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 260–266.doi:10.1016/j.jff.2012.10.015

De Tommasi, N., De Simone, F., Speranza, G. y Pizza, C. (1999). Studies on the Constituents of *Cyclanthera pedata* Fruits: Isolation and Structure Elucidation of New Triterpenoid Saponins. *American Chemical Society*. Italy. 47, 4512-4519.

Domingo, D. y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4): 385-393.

Dominguez, X. A. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Limusa. México, DF.

Dubey, S. D. (2012). Overview on *Cucurbita maxima*. *International Journal of Phytopharmacy*, *2*(3), 68-71.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Chem.,* 28: 350-356.

Ege, S. (1998). Química orgánica: estructura y reactividad (Vol. 2). *Reverté*

El-Aziz, A. B., El-Kalek, H. A. y City, N. (2011). Antimicrobial proteins and oil seeds from pumpkin (Cucurbita moschata). *Nature and Science*, 9(3), 105-119.

El-Kamali, H. y Mahjoub, S. (2009). Antibacterial activity of *Francoeuria crispa*, *Pulicaria undulata*, *Ziziphus spina-christi* and *Cucurbita pepo* against seven standard pathogenic bacteria. *Ethnobotanical Leaflets*. (6), 6.

Escalona *et al*. (2013). Role of polyphenols in the antimicrobial activity of ethanol *Tamarindus indica* L. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (5): 516–522.

Estrada, C., Sánchez, M., Alcántar J. (2018). Caracterización parcial del chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché), como alternativa de uso industrial para la región Cañada de Oaxaca. Universidad de Papaloapam. vol. 22 número 66.

Fang, C., Fernie, R., y Luo, J. (2018). Exploring the diversity of plant metabolism. *trends in plant science*. doi:10.1016/j.tplants.2018.09.006

Fattorusso, E., y Taglialatela, O. (Eds.). (2008). Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis, and biology. John Wiley & Sons.

García, A y Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*. Madrid. 2(3).

García, E. M., Fernández, I., y Fuentes-López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

García, P y Ramírez, N. (2009). Establecimiento de un medio de cultivo sumergido para *Psilocybe* sp. Trabajo de tesis. Universidad EAFIT. Colombia.

Gentry, L. (1990). Floristic similarities and differences between southern Central America and upper and central Amazonia. 141-157.

Gonzáles, A y Castro, M. (2017). Papel ecológico de los metabolitos secundarios. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. México.

Gudiel, L. (2009). Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de *Polypodium triseriale* Sw. (calahuala). Trabajo de tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Gurav, A., Mondal, D. B., y Vijayakumar, H. (2014). In vitro qualitative and quantitative phytochemical analysis of ethanolic and 50% ethanolic extracts of *Tinospora cordifolia*, *Momordica charantia*, *Cucurbita maxima* and *Raphanus sativus*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 1937.

Herrera, S., y Marín, D. C. (2018). Utilización de la pulpa y cáscara de zapallo (*Cucurbita maxima*) para la elaboración de productos alimentarios y su aplicación gastronómica.

Hoensch, H y Oertel, R. (2015). The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clinical Nutrition Experimental*, 3, 8–14.doi:10.1016/j.yclnex.2015.09.001

Indrianingsih, A. W., Rosyida, V. T., Apriyana, W., Hayati, S. N., Nisa, K., Darsih, C., Kusumaningrum, A., Ratih, D y Indirayati, N. (2019). Comparisons of antioxidant activities of two varieties of pumpkin (*Cucurbita moschata* and *Cucurbita maxima*) extracts. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 251, No. 1, p. 012021). IOP Publishing.

Isaza, M y Hipólito, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et technica*, 13(33).

Iswaldi, I., Gómez, A., Lozano, J., Arráez, D., Segura, A., y Fernández, A. (2013). Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*, 50(1), 77-84.

Jacobo, N., Maróstica, M. R., Zazueta, J. J., y Gallegos, J. (2011). Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs. Cehualca; a Review. *Food Research International*. 2587-2593 pp.

Jain, P y Joshi, H. (2012). Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of applied pharmaceutical science*, 02 (06), 236-240.

Jayaprakasam, B., Seeram, N. P. y Nair, M. G. (2003). Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. Michigan State University. USA.

Jørgensen, P. y León-Yánez, S. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden Press*, U.S.A., p. 1181.

Karpagam, T., Varalakshmi, B., Bai, J. S., y Gomathi, S. (2011). Effect of different doses of *Cucurbita pepo* Linn extract as an anti-Inflammatory and analgesic nutraceautical agent on inflamed rats. IJPRD 2011, 3:184–192.

Khan, M. S., Hussain, S. A., Matjais, A. M., Zakaria, Z. A., y Khan, M. (2011). Antiulcer activity of *Ficus religiosa* stem back ethanolic extract in rats. J. *Med. Plant. Res*. 5(3): 354-359.

Konoshima, T *et al*. (1994). Inhibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumors. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17(5), 668-671.

Koh, H. S. A., Lu, J., y Zhou, W. (2019). Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from Undaria pinnatifida grown in New Zealand. *Carbohydrate polymers*, *212*, 178-185.

Koul, O. (2008). Phytochemicals and insect control: an antifeedant approach. Crit *Rev Plant Sci.* 27(1):1-24.

Krimer-Malešević, V., Mađarev-Popović, S., Vaštag, Ž., Radulović, L., y Peričin, D. (2011). Phenolic acids in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. In Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention (pp. 925-932). Academic Press.

Kroymann, J. (2011). Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 246–251.doi:10.1016/j.pbi.2011.03.021

Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. 1ª ed. Ed. Ediciones Omega S.A. España.

Kushawaha, D. K., Chatterji, S., Yadav, M., y Watal, G. (2016). Antimicrobial potential and preliminary phytochemical evaluation of *Cucurbita maxima* seeds. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 7, 578-582.

Kushiro, T., y Ebizuka, Y. (2010). Triterpenes. *Comprehensive Natural Products* II, 673–708.doi:10.1016/b978-008045382-8.00007-1

Leyva, E., Loredo, S., López, L., Escobedo, E y Navarro, G. (2017). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.

Lira, R. (1995). Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica: *Cucurbita*, *Sechium, Sicana* y *Cyclanthera*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene Pools.9. *International Plant Genetic Resources Institute*. Rome, Italy. 281p.

Lock, O. (1998). Investigación Fitoquímica. 1ª ed. Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. Domínguez X. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1ª ed. pp 1–3.

Lowry O., Rosenbrough H., Farr A. y Randall R. (1951). Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Biochem*., 193: 265-275.

Llacuna, L y Mach, N. (2012). Papeles de antioxidantes para la prevención del cáncer. *Rev Esp Nutr Hum Diet*. 16(1):16-24.

Maestro, R y Borja, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C).* Vol. 44.

Magassouba, F et al. (2010). Corrigendum to “Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine” [Journal of Ethnopharmocology 114 (1) (2007) 44–53]. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(3), 705-708.

Marsh, B. y Weinstein, B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 7: 574-576.

Martínez, F., Domínguez, M y Vargas, C. (2009). Estructuras de los alcaloides. Recuperado de http://alcaloides1109.blogspot.com-/2009/11/estructura-del-alcaloide-los-alcaloides.html

Martínez, S., González, J., Culebras, J y Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. Universidad de León. 17:271-278.

Menon, A. K. (2018). Sterol gradients in cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 53: 37–43. doi:10.1016/j.ceb.2018.04.012

Moon, J y Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J Agric Food Chem*. Univesity of california. 57(5):1655-66. doi: 10.1021/jf803537k

Morales, L. (1995). Estudio in vitro de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tres plantas del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Biología. Lima, Perú.

Moyo, M., Amoo, S. O., Ncube, B., Ndhlala, A. R., Finnie, J. F., y Van Staden, J. (2013). Phytochemical and antioxidant properties of unconventional leafy vegetables consumed in southern Africa. *South African Journal of Botany*, 84, 65–71. doi:10.1016/j.sajb.2012.09.010

Muñoz, Ó., Torres, A., Núñez, A., de la Rosa, A., Rodrigo, J., Ayala, J., y Álvarez, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28.

Neill, D.A., Ulloa-Ulloa, C., 2011. Adiciones a la Flora de Ecuador: Segundo Suplemento, 2005–2010. *Fundación Jatun Sacha*, Quito-Ecuador.

Nes, D., y Heftmann E. (1981). A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *J Nat Prod.* 44(4):377-400

Noumedem, J. A. K., Mihasan, M., Lacmata, S. T., Stefan, M., Kuiate, J. R. y Kuete, V. (2013). Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 1-9pp.

Ochoa, L y Sarmiento, A. (2018). Estudio fitoquímico de la especie vegetal *Bucquetia glutinosa* (l. f.) dc. (Melastomataceae) y evaluación de su actividad biológica. Trabajo de tesis. Universidad de Ciencias Aplicada y ambiental. Colombia

Okunrobo O. L., Uwaya, O. J., Imafidon, E. K., Osarumwense, O. P., y Omorodion E. J. (2012). Quantitative determination, Metal analysis and Antiulcer evaluation of Methanol seeds extract of *Citrullus lanatus* Thunb (Cucurbitaceae) in Rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Benin-Nigeria. S804-S808.

Ortega, D. (2013). Utilización de la pulpa de zambo (*Cucurbita ficifolia*) en la elaboración de compotas como suplemento alimenticio infantil. Internet. http://dspace. ucacue. edu. ec/bitstream/reducacue/5403/4/Utilizaci% C3% B3n% 20de% 20la% 20pulpa% 20de% 20sambo, 20.

Paganga, G., Miller, N y Rice-Evans, C. (1999). El contenido polifenólico de frutas y hortalizas y sus actividades antioxidantes. ¿Qué constituye una porción? *Radic libre. Res.* 30: 153-162.

Patil, V y Masand, N. (2019). Anticancer potential of flavonoids: chemistry, biological activities, and future perspectives. *Studies in natural products chemistry*, 401–430. doi:10.1016/b978-0-444-64179-3.00012-8

Patra, A., Saxena, J., 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 24–37.

Peña, (2011). Evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides provenientes de las hojas de *Siparuna sessiliflora*. Universidad de Javeriana. Bogotá-Colombia.

Pesante, O., Larrea, N y Bustamante, K. (2017). Guías de prácticas de laboratorio de la asignatura farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Guayaquil. Guayaquil-Ecuador.

Petiard, V y Bariaud-Fontanel, A. (1987). El cultivo de células. Mundo Científico 7: 730-736.

Pickersgill, B. (2007). Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany* 100: 925–940. doi:10.1093/aob/mcm193.

Paillacho, G. (2016). Valor alimenticio del zambo (*Cucurbita ficifolia* L.) y su aplicación en la gastronomía ecuatoriana a través de la creación de nuevas recetas (doctoral dissertation, unibe).

Pineda, C., Camiloaga, E y Zuñiga, S. (2007) Actividad antimicrobiana del extracto de hojas de Chincho (*Tagetes elliptica* L.) contra Salmonella typhimurium en cobayos (*Cavia porcellus* L). Investigación Valdizana. 1(1): 10-13.

Piperno, D. R., Andres, T. C., y Stothert, K. E. (2000). Phytoliths in *Cucurbita* and other Neotropical Cucurbitaceae and their Occurrence in Early Archaeological Sites from the Lowland American Tropics. *Journal of Archaeological Science*. 27:193–208.

Piperno, D y Stothert, K. (2003). Phytolith evidence for early Holocene *Cucurbita* domestication in southwest Ecuador. Science 299. 1054 1055.

Plat, J et al (2019). Plant-based sterols and stanols in health y disease: "Consequences of human development in a plant-based environment?" *Progress in Lipid Research*. doi:10.1016/j.plipres.2019.02.003

Porras, A y López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectivas en la ingeniería de alimentos*. 121-134 pp.

Pozner, R., y Novara, L. (2010). Cucurbitaceae. Aportes Botanicos de Salta-Serie Flora, 9(8), 1-57.

Qian, Z. (2014). Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschata* and their antibacterial activity. *Carbohydrate polymers*, 101, 432-434.

Quispillo, J. (2013). Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del escobillón rojo (*Callistemon speciosus*). Tesis de Grado. Riobamba-Ecuador.

Ravishankar, K et al. (2012). Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of *Cucurbita maxima* seed extract". International journal of research in pharmacy and chemistry, 2(1), 86-91.

Rivas, C., Oranday, M. A., y Verde, M. J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *Omnia Science*.

Rondón, M *et al*. (2017). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University – Science*. Guayaquil-Ecuador.

Saha, P., Mazumder, U. K., y Haldar, P. K. (2011). In vitro antioxidant activity of *Cucurbita maxima* aerial parts. Free Radicals and Antioxidants, 1(1), 42–48. doi:10.5530/ax.2011.1.8

Sandjo, L y Kuete, V. (2013). Triterpenes and steroids from the medicinal plants of africa. *Medicinal plant research in africa,* 135–202.doi:10.1016/b978-0-12-405927-6.00004-7

Santiana, J. (2011). Cucurbitaceae. en: León- Yánez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endera, L., Ulloa Ulloa, C y Navarrete, H. (eds.). (2011). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2° edición. Publicaciones del Herbario QCA, Pontifica Universidad Católica del Ecuador, Quito.

Salehi, B *et al*. (2019). Cucurbits Plants: A Key Emphasis to Its Pharmacological Potential. *Molecules*, 24(10), 1854.

Semeniuk, L. V., Bela, A. J., Vonka, C. A., Romero, M. C., y Nuñez, M. B. (2018). Composición fitoquímica y nutricional de *Momordica charantia* y actividad antioxidante. *Dominguezia*, 34(1), 39-44.

Sepúlveda, G., Porta, H y Rocha, M. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, 355-363 pp.

Siciliano. T., De Tommasi, N., Morelli, I., y Braca, A. (2004). Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by

liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *J Agr Food Chem*. 52:6510–6515.

Sieniawska, E y Baj, T. (2017). Tannins. In A, Hany; Aromatic and Medicinal Plants - *Back to Nature*.

Singht, K. (2012).Phytochemical determination and antibacterial activity of *Trichosanthes dioica* Roxb (Patal), *Cucurbita Maxima* (pumpkin) and *Abelmoschus esculentus* Moench (Okra) plant seeds. National Institute Of Technology. Odisha.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Ravento's, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299, 152–178.

Suárez, C., Enrique, L., Barrera, C., Andrés, C., Coy Barrera, E. D., y Lozano Moreno, J. M. (2011). Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 275-282

Thiruvengadam, M., y Ill-Min, C. (2015). Phenolic compound production and biological activities from in vitro regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*. Korea Del Sur. 7pp.

Tereschuk, M., Riera, M., Castro, G y Abdala, L. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J Ethnopharmacol*. 56(3):227-32.

Tomas, G. y Lock, O. (2001). Aislamiento y caracterización de un triterpenoide a partir de la *Gentianella thyrsoidea* Hooker. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, 4(1): 30-35.

Torri, M. (2013). Perception and Uses of Plants from Reproductive Health among Traditional Medwives in Ecuador: Moving Towards Intercultural Pharmacological Practices. Midwifery. 29, 809–817.

Ulloa-Ulloa, C y Jørgensen, P. M. (1995). Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Abya-Yala, Quito.

Valencia, C. (1995). Fundamentos de Fitoquímica. Primera edición. Editorial Trillas. Mexico. 235p.

Valenzuela, G. M., Cravzov, A. L., Soro, A. S., Tauguinas, A. L., Giménez, M. C., y Gruszycki, M. R. (2014). Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de *Cucurbita* spp. *Dominguezia*, 30(1), 19-24.

Vazquez, F., Alvarez, P., Lopéz, D., Wall-Medrano y de la Rosa, A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*. vol. 6 (2) pp. 84-93.

Vélez, M., Campos, R y Sánchez, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems,* 17 (2014): 489 – 499.

Vogelsang, E. (2011). Plantas Ornamentales y Fitomedicina. Revista de la Facultad de Agronomía. La Plata - Venezuela. LUZ. pp. 157.

Wang, L., Liu, F., Wang, A., Yu, Z., Xu, Y., y Yang, Y. (2017). Purification, characterization and bioactivity determination of a novel polysaccharide from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds. *Food hydrocolloids*, 66, 357-364.

Wang, T., Li, Q., y Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12–23. doi:10.1016/j.ajps.2017.08.004

Who. (1998). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva. pp.115.

Wink, M. 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insect and microbial infections. *En Naturally Occuring Bioactive Compounds. Elselvier* pp 251-268.

Williams, D., Stone, M., Hauck, P., y Rahman, S. (1989). ¿Por qué se metabolizan los metabolitos secundarios (productos naturales)? Diario de productos naturales, 52 (6), 1189-1208. Doi: 10.1021 / np50066a001

Yenda, B., V-Rao, B y Rao, G. (2014). In vitro antioxidant activity studies on leaves of *Cucurbita maxima*. *Int. J. Adv. Res. Sci Technol*. (4): 241-244.

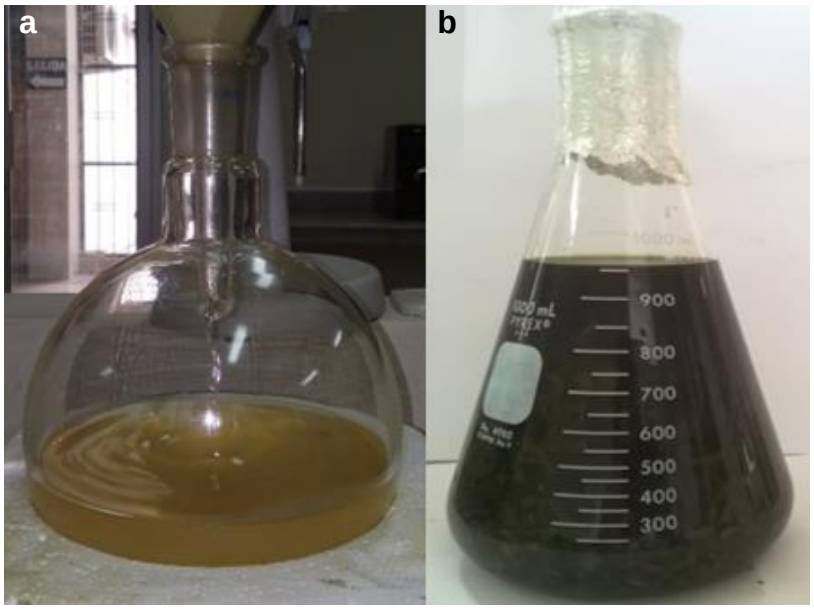
Yue, J., Xu, J., Cao, J., Zhang, X y Y, Zhao, (2013). Cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. and their inhibitory activity against a-glucosidase, a-amylase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). *Journal of Functional Foods*. China. 37: 624-631.

Zhi-Gang, B. (2014). Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschata* and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*. China. 482-484 pp.

Zhishen, J., Mengcheng T y W. Jianming. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64:555-559.

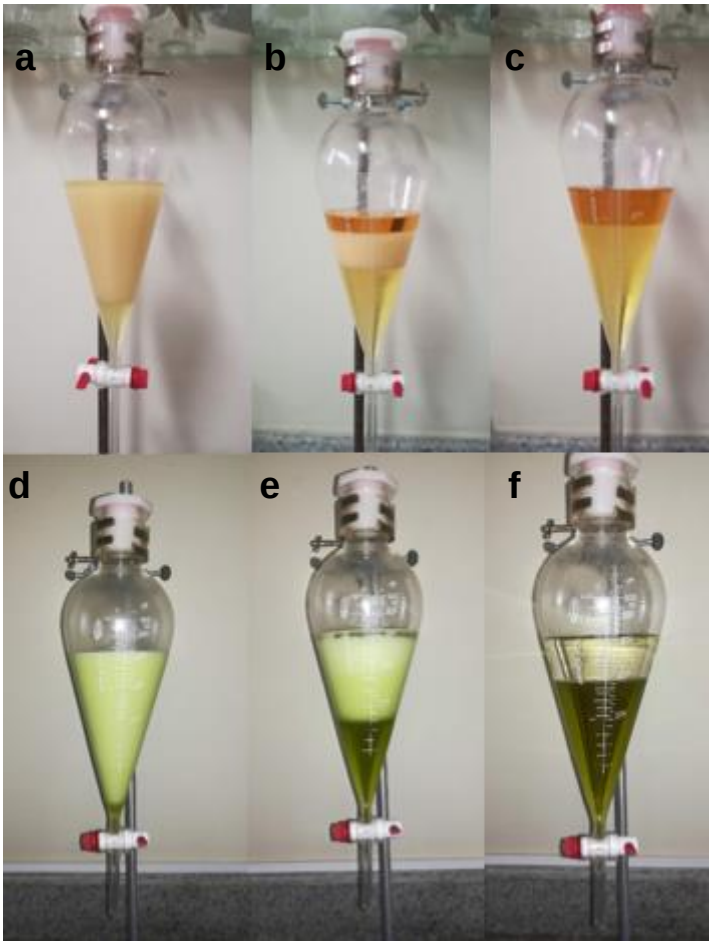
14. ANEXOS

Anexo 1. Secado (a, b) y maceración (c) del mesocarpio de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis.*

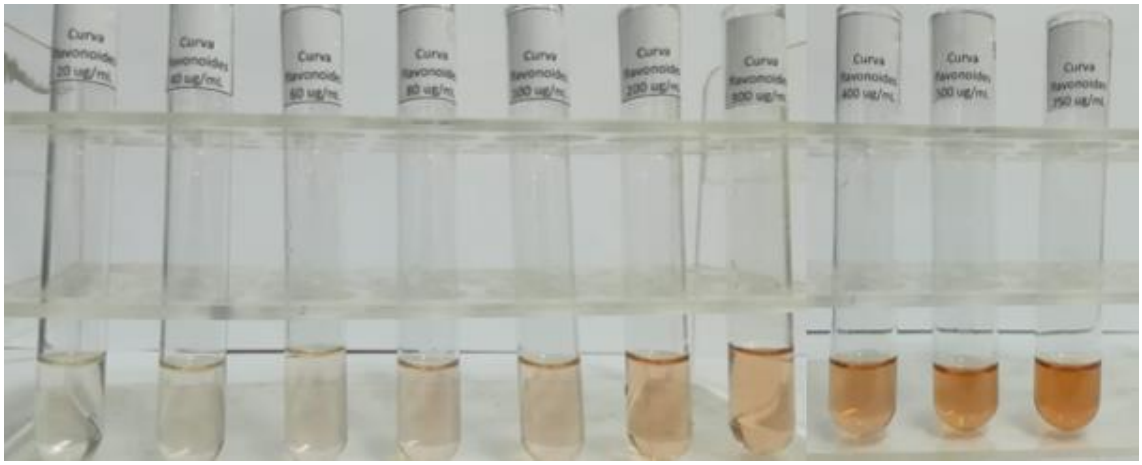


Anexo 2. Extractos etanólicos del mesocarpio del fruto (a) y hojas (b), después de cinco días de reposo en oscuridad a temperatura ambiente.

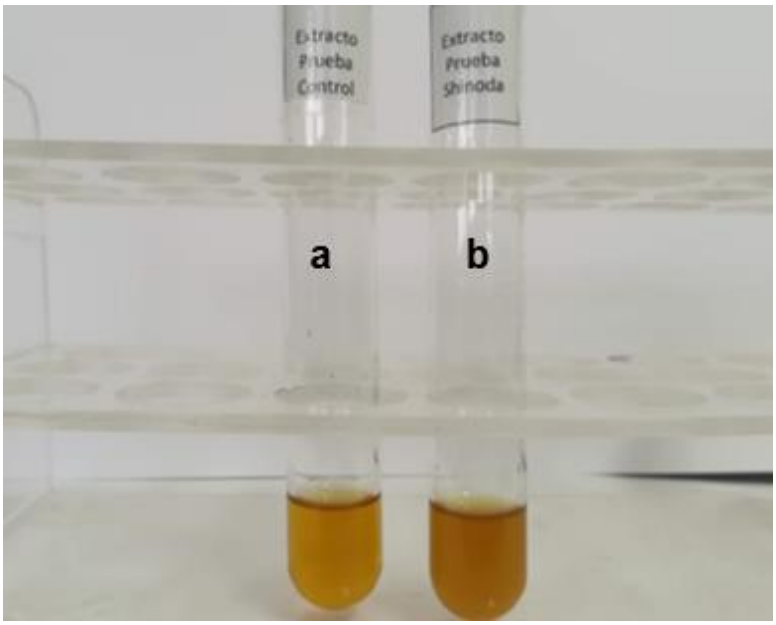
Anexo 3. Concentración de los extractos etanólicos y clorofórmicos de los frutos y hojas de *Cucurbita ecuadorensis* en un rotavapor Buchi r-3.



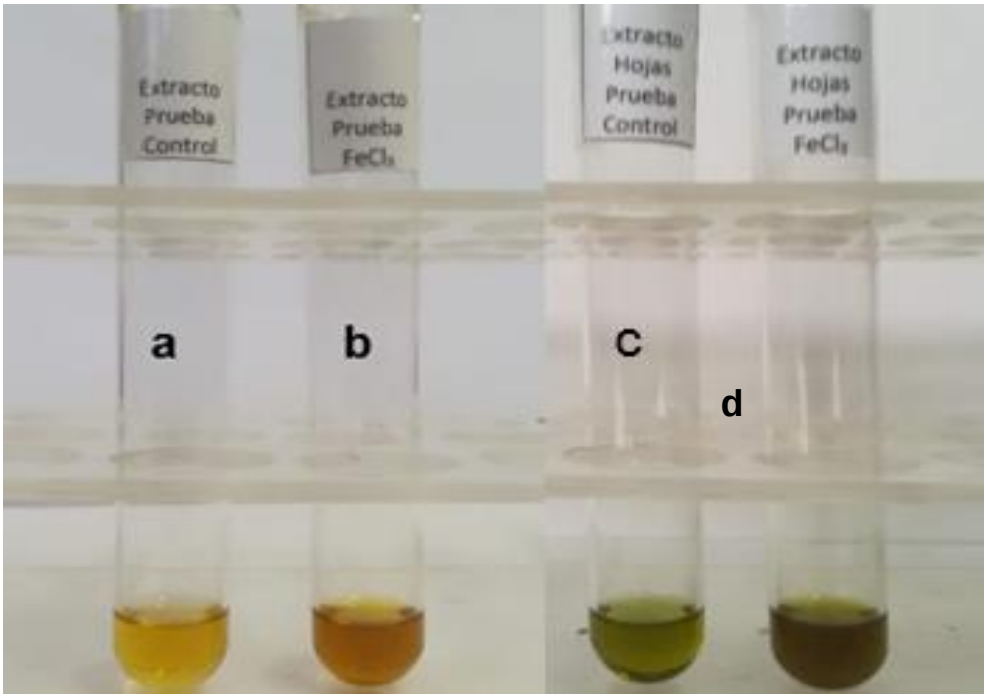
Anexo 4. Obtención del extracto clorofórmico de los frutos (a, b, c) y hojas (d, e, f) de *Cucurbita ecuadorensis*, observándose una extracción líquido-líquido.



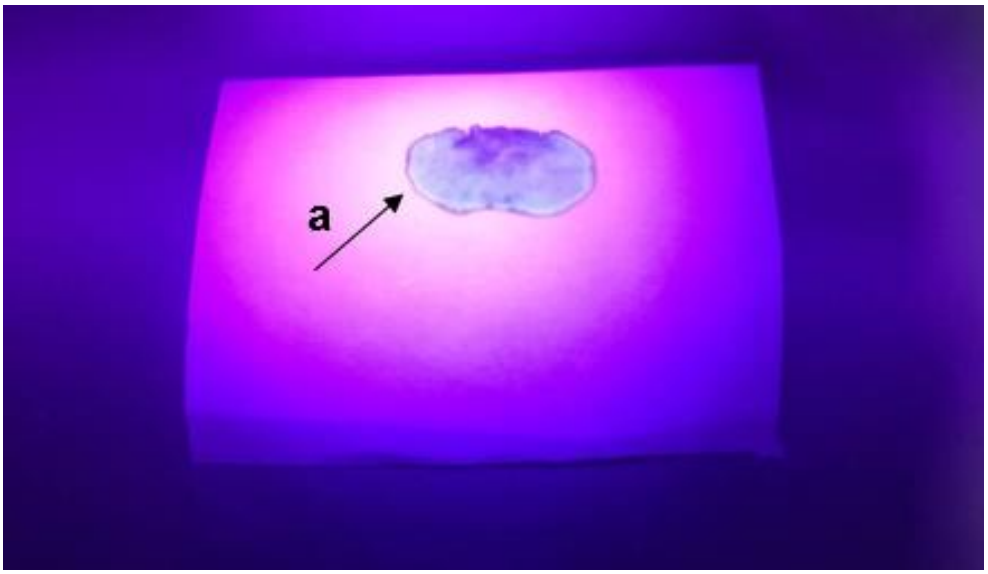
Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales utilizando quercetina (CE) como estándar.



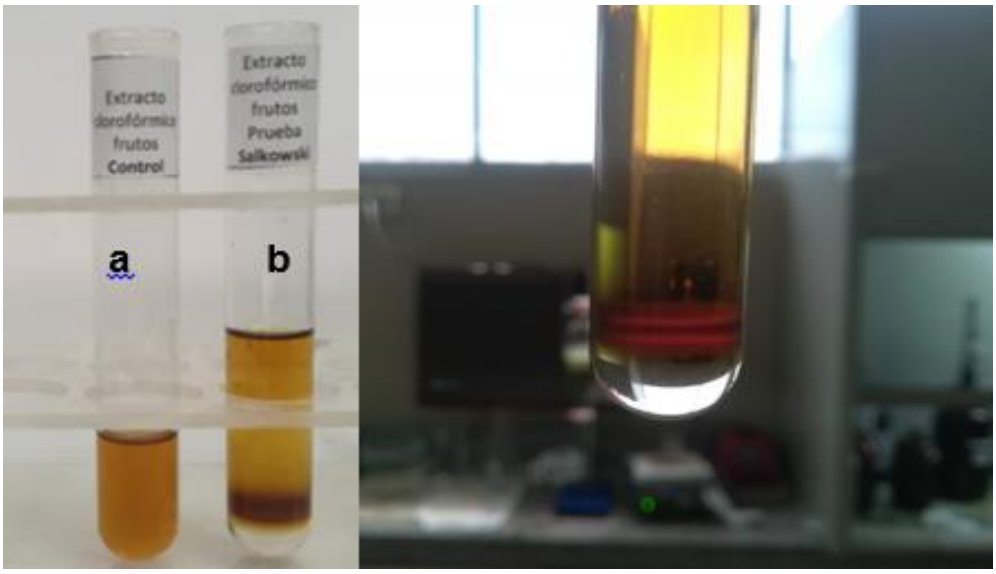
Anexo 6. Determinación de flavonoides mediante la prueba de shinoda, (a) control negativo, (b) positivo para flavonoles.



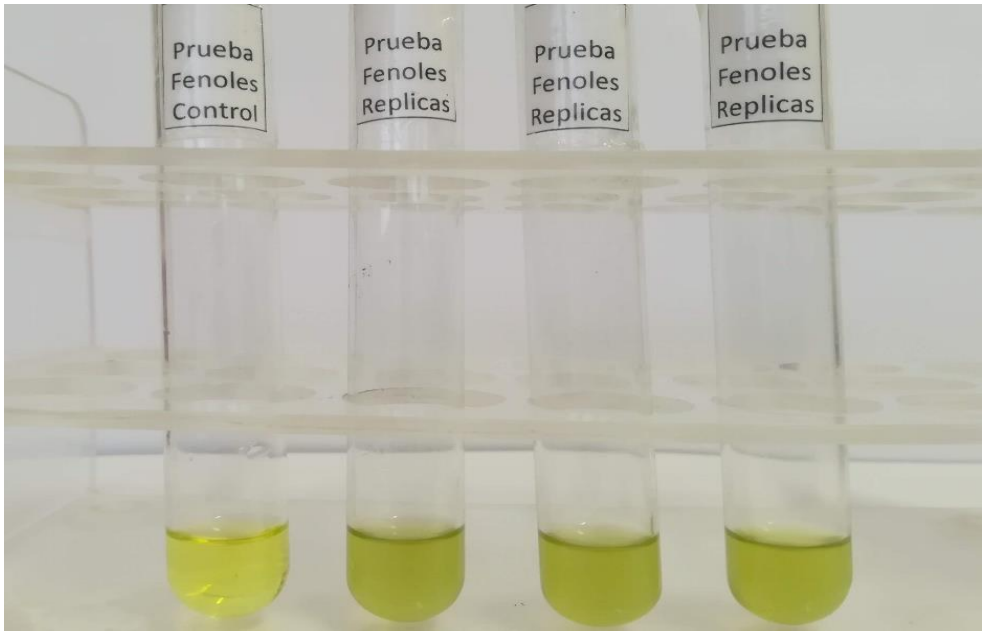
Anexo 7. Determinación de taninos mediante la prueba $FeCl_3$ 10%: (a) control negativo en frutos, (b) positivo para taninos condensados en frutos, (c) control negativo en hojas, (d) positivo para taninos condensados en hojas.



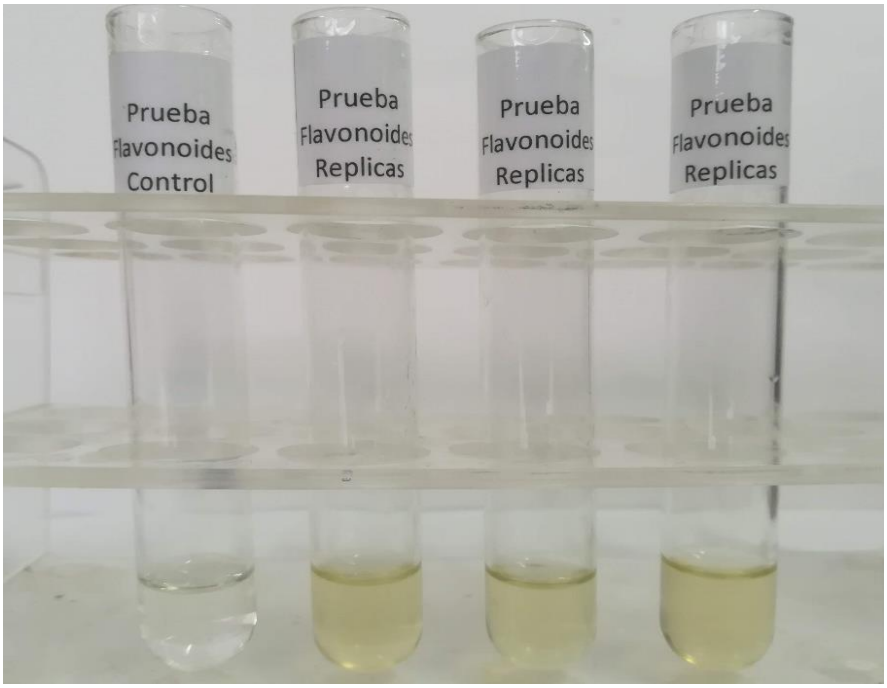
Anexo 8. Determinacion positiva para cumarinas: (a; flecha) fluorescencia celeste, mediante la determinación de luz UV.



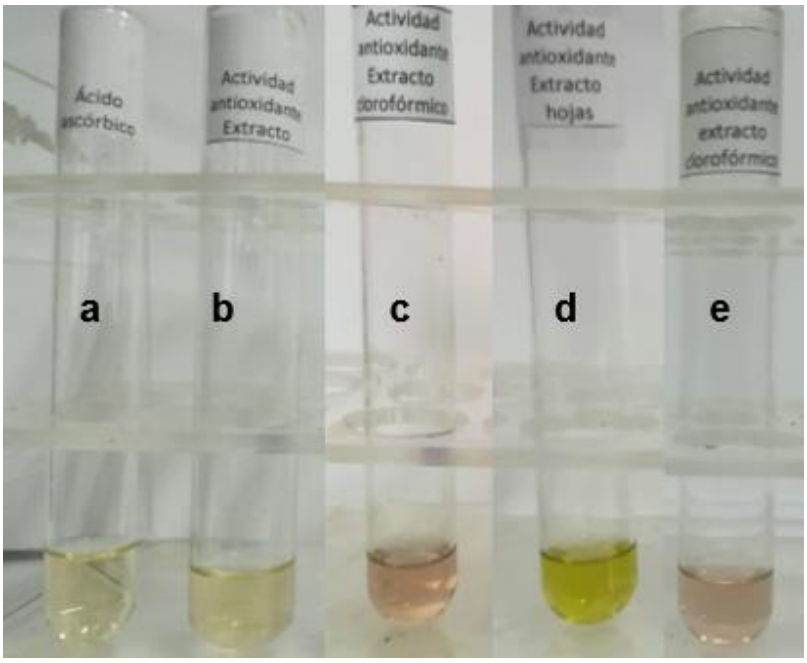
Anexo 9. Determinación de esteroles mediante la prueba de Salkoswki: (a) control negativo, (b) positivo para esteroles.



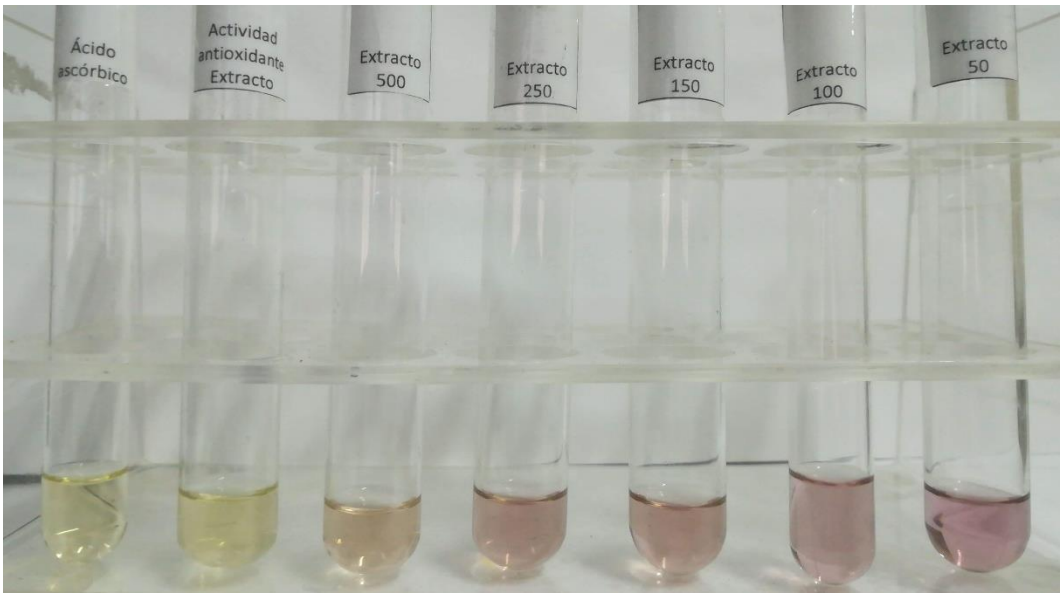
Anexo 10. Cuantificación de fenoles totales mediante la metodología de Folin-Cicalteou.



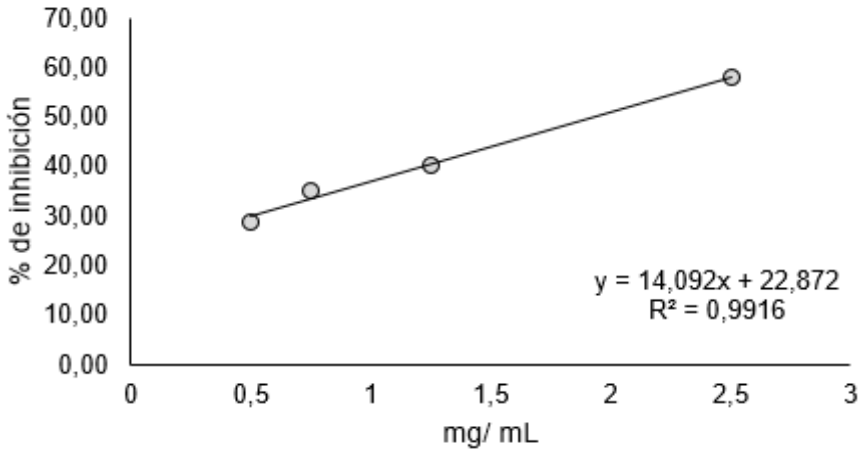
Anexo 11. Cuantificación de flavonoides totales por el método colorimétrico de cloruro de aluminio.



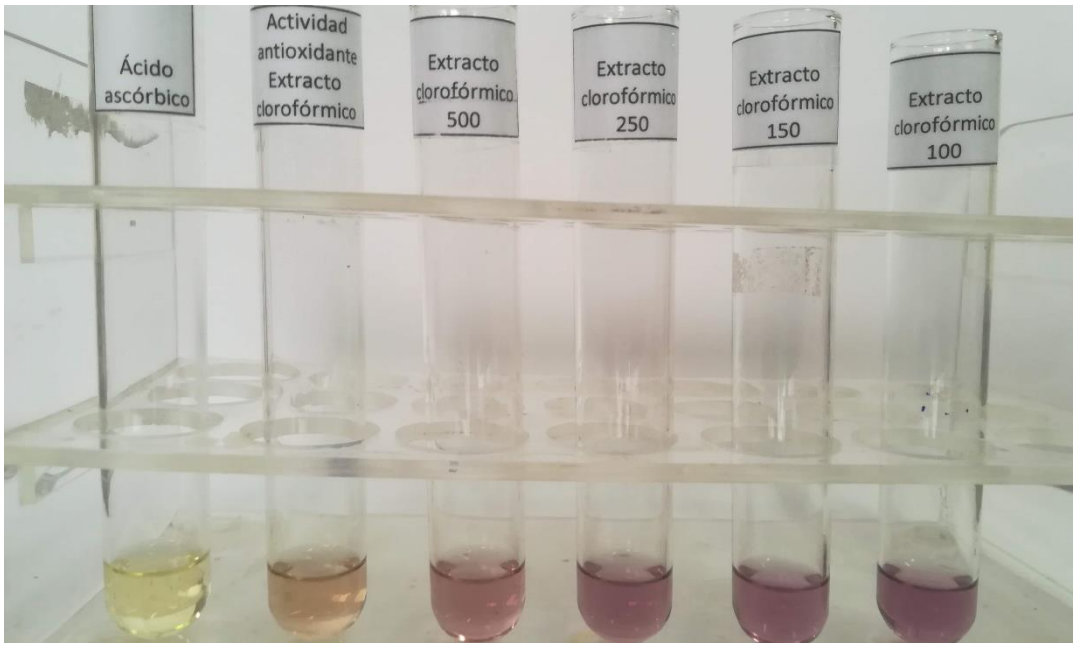
Anexo 12. Actividad antioxidante del ácido ascórbico, comparado a los extractos etanólicos (b) y clorofórmicos (c) de los frutos y extractos etanólicos (d) y clorofórmicos (e) de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis*



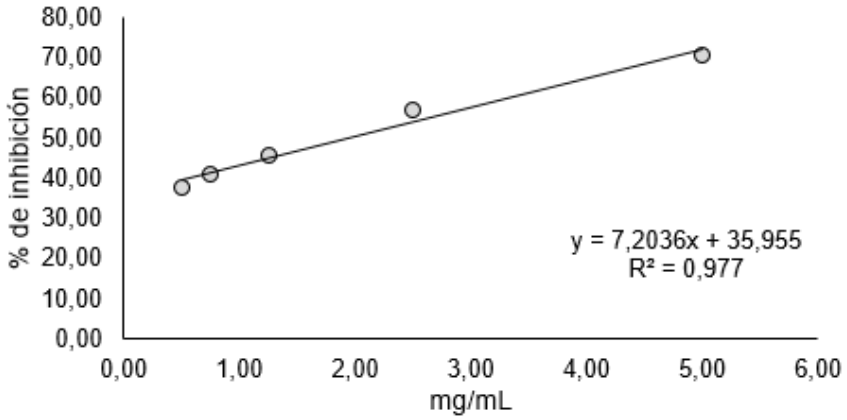
Anexo 13. Diferentes concentraciones del extracto etanólico de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis*, para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}).



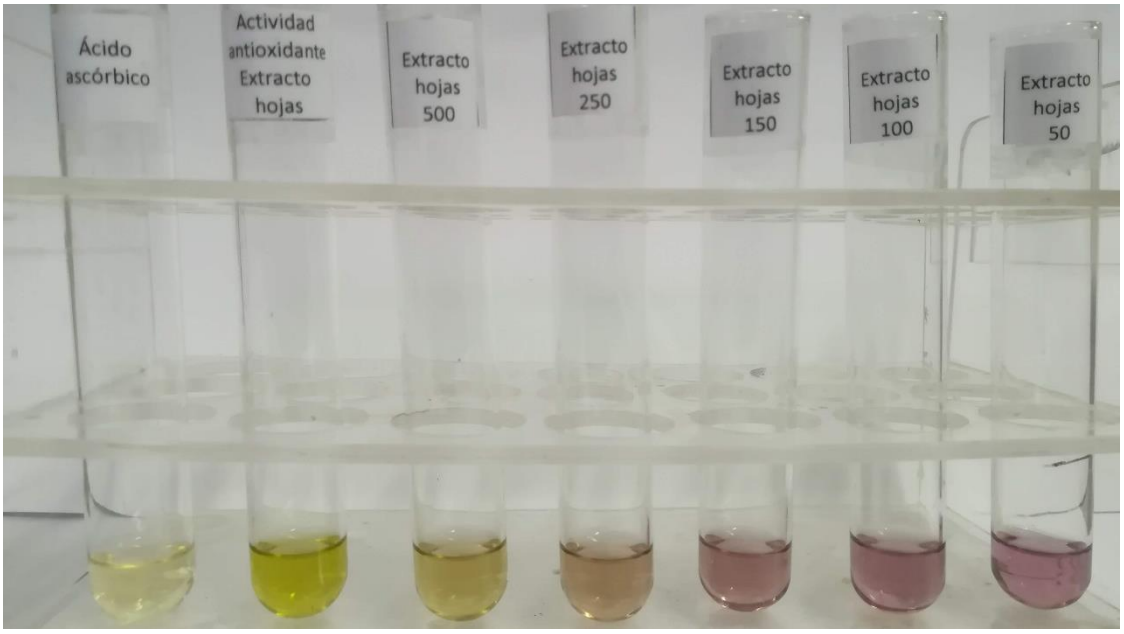
Anexo 14. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto etanólico del mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis.*



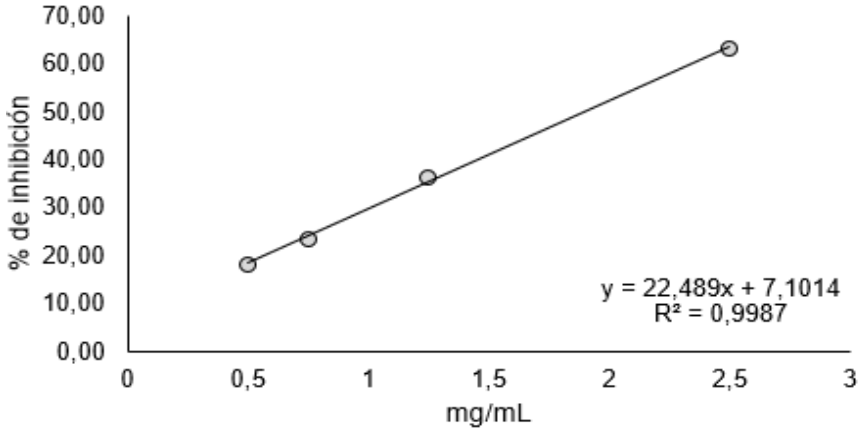
Anexo 15. Diferentes concentraciones del extracto clorofórmico de los frutos de *Cucurbita ecuadorensis*, para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}).



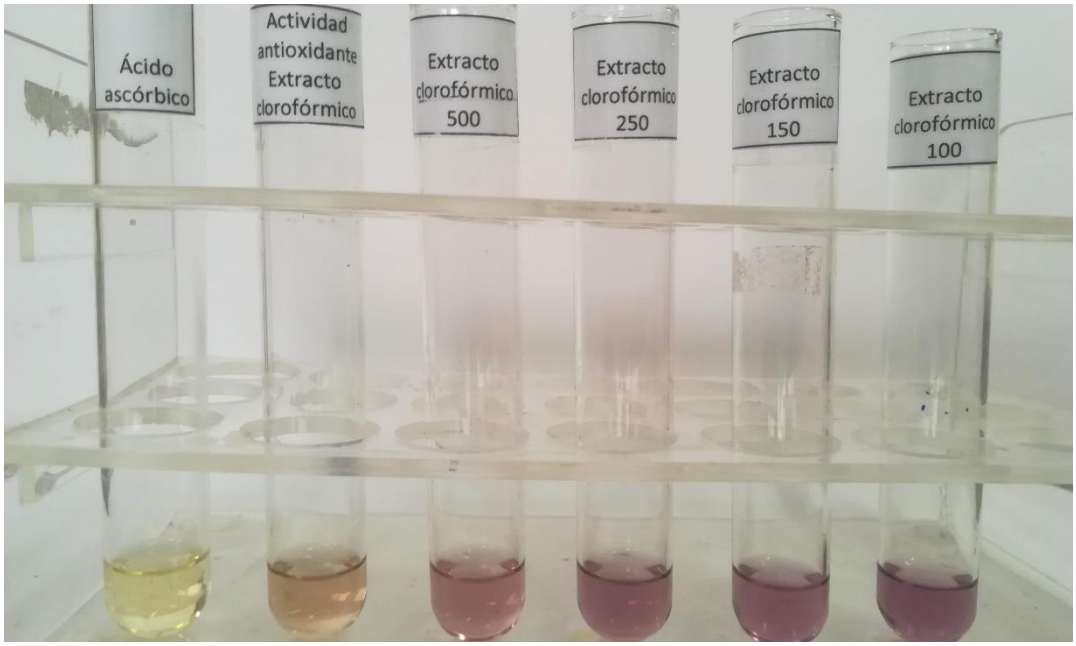
Anexo 16. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto clorofórmico del mesocarpio del fruto de *Cucurbita ecuadorensis.*



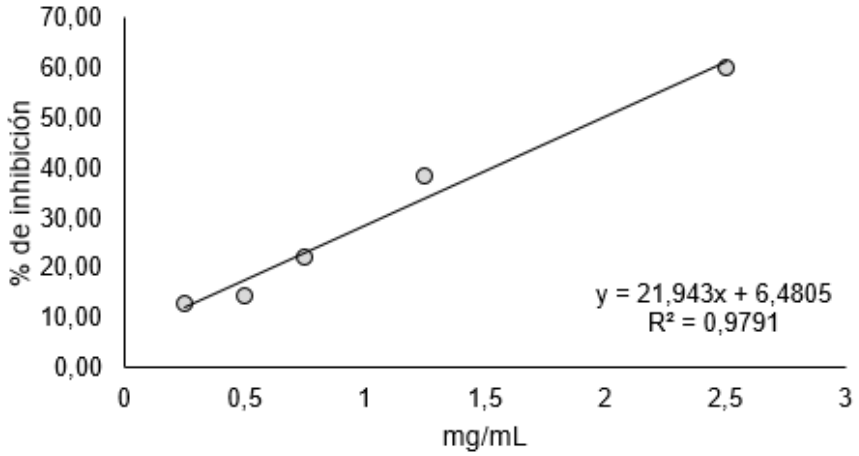
Anexo 17. Diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis,* para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}).



Anexo 18. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto etanólico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis.*



Anexo 19. Diferentes concentraciones del extracto clorofórmico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis,* para determinar la concentración de inhibición del 50% (IC_{50}).



Anexo 20. Regresión lineal para calcular el IC_{50} del extracto clorofórmico de las hojas de *Cucurbita ecuadorensis.*