

Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de *Cucurbita pepo* L. (calabaza)

Microwave-assisted extraction of *Cucurbita pepo* L. (pumpkin) seed lipids

MSc. Suslebys Salomón Izquierdo,^I Lic. Addiss Bermello Crespo,^I
MSc. Tania Márquez Conde,^{II} Dr. Orestes D. López Hernández,^I Téc. María L.
González Sanabia,^I Dr. C. Julio C. Llópiz Yurell^{III}

^I Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.

^{II} Centro Estatal para la Calidad de los Medicamentos. La Habana, Cuba.

^{III} Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: los lípidos presentes en las semillas de *Cucurbita pepo* L. ricos en ácidos grasos poliinsaturados han demostrado tener acción antiinflamatoria en la hiperplasia prostática benigna. El empleo de la energía de las microondas en la extracción de compuestos de origen natural tiene como ventaja principal, la rapidez del calentamiento, que permite significativos ahorros de tiempo y en consecuencia energía en el proceso, todo lo cual se manifiesta en una reducción de los costos en general.

Objetivos: estudiar el efecto del tiempo en la obtención de los lípidos contenidos en las semillas de *Cucurbita pepo* L. mediante la extracción asistida por microondas.

Métodos: se estudiaron diferentes tiempos (1, 5, 10 y 15 min) para extraer los lípidos de las semillas de *Cucurbita pepo* L., empleando etanol como disolvente. Se evaluó mediante espectroscopia de reflexión interna y cromatografía gaseosa la presencia de los ácidos grasos mayoritarios responsables de la actividad farmacológica.

Resultados: se demostró que el tiempo de extracción de 1 min era el más adecuado. El análisis cualitativo y cuantitativo mediante espectroscopia de reflexión interna y cromatografía gaseosa, respectivamente, evidenció la presencia de los ácidos grasos en proporción mayoritaria reportados en la literatura con actividad sobre la hiperplasia prostática benigna.

Conclusiones: los resultados demostraron la factibilidad del empleo de la energía de las microondas en la extracción del componente lipídico a partir de las semillas de *Cucurbita pepo* L.

Palabras clave: *Cucurbita pepo* L., semillas, lípidos, ácidos grasos, hiperplasia prostática benigna, extracción asistida por microondas.

ABSTRACT

Introduction: lipids from *Cucurbita pepo* L. seeds, rich in polyunsaturated fatty acids, show an effective antiinflammatory effect in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). The use of microwave energy in the extraction of natural compounds has among its main advantages quick heating, which saves time and energy in the process, thus reducing the general costs.

Objectives: to study different extraction times to obtain lipids from *Cucurbita pepo* L. seeds through microwave-assisted extraction.

Methods: lipids from *Cucurbita pepo* L. seeds were extracted with ethanol as solvent at several times (1, 5, 10 y 15 min). The evaluation was based on attenuated total internal reflection spectrometry and gas chromatography to detect the major fatty acids responsible for the pharmacological action.

Results: the one-minute extraction time was the most efficient. Qualitative and quantitative analysis by attenuated total internal reflection spectrometry and gas chromatography indicated the presence of the major fatty acids reported in the literature as having pharmacological effect over benign prostate hyperplasia.

Conclusions: the results demonstrated the feasibility of employing microwave energy in the extraction of the lipid component from *Cucurbita pepo* L. seeds.

Key words: *Cucurbita pepo* L., seeds, lipids, fatty acids, benign prostate hyperplasia, microwave-assisted extraction.

INTRODUCCIÓN

El extracto lipofílico a partir de las semillas de *Cucurbita pepo* L., rico en ácidos grasos poliinsaturados, ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (HPB) por sus propiedades antiinflamatorias y diuréticas.^{1,2}

La acción se le atribuye al componente lipídico-esteroidal y triterpénico de la semilla de calabaza que es, por una parte antiinflamatoria, debido a los ácidos grasos poliinsaturados que actúan inhibiendo diferentes eventos de la cascada inflamatoria, y por otra parte, antiandrogénica de los fitosteroles, que producen la inhibición natural de la 5-alfa-reductasa y disminución de la unión entre la dihidrotestosterona y su receptor.¹

La caracterización preliminar del aceite extraído a las semillas de la planta cultivada en Cuba³ evidenció que el perfil cromatográfico correspondió a la presencia de los ácidos grasos libres, ácido palmítico (C 16), ácido esteárico (C 18), ácido oleico (C

18:1) y ácido linoleico (C 18:2); los valores se corresponden a los citados en la literatura.

En un estudio realizado con semillas cubanas por López y otros,⁴ determinaron que la extracción por reflujo con etanol durante 1 h es el procedimiento más ventajoso para la obtención del componente lipídico; su evaluación demostró actividad antiandrogénica al inhibir el tamaño de la próstata tras la administración de testosterona propionato en el modelo de hiperplasia prostática en ratas.⁵

Las microondas, por su naturaleza, son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, con una frecuencia que oscila entre los 0,3 y 300 GHz, correspondiente a una longitud de onda de 1 m a 1 mm, que se caracteriza por desplazarse en forma de ondas sinusoidales. Su principal efecto, cuando interactúan con un material receptivo, es de naturaleza térmica.^{6,7}

La extracción asistida por microondas mediante disolvente consiste en el calentamiento de este último en contacto con la muestra. El proceso implica la perturbación de los enlaces por puente de hidrógeno, como resultado de la rotación de dipolos por la radiación en las moléculas y la migración de iones; con la consiguiente penetración del solvente en la matriz, y transporte al seno del líquido de los componentes.^{7,8}

La rapidez en el calentamiento es la principal ventaja de las microondas frente a los métodos tradicionalmente empleados en la extracción con disolventes, que causan el calentamiento a partir de la transmisión de la energía al material de forma indirecta (radiación, convección, conducción). El empleo de las microondas permite, por tanto, significativos ahorros de tiempo; disminución de los volúmenes de disolventes necesarios en los tratamientos y, en consecuencia, de energía en el proceso; no contamina el medio ambiente, lo cual se manifiesta en la reducción de los costos en general, que constituyen aspectos deseables de alcanzar en todo proceso de extracción, además de que permite obtener altos recobrados de los compuestos de interés (Pare y otros. Microwave-assisted natural products extraction. United States patent. US 5,002,784;1991 march 26).^{6,7}

El objetivo de este trabajo estuvo en estudiar el efecto del tiempo en la obtención de los lípidos contenidos en las semillas de *Cucurbita pepo* L. mediante la extracción asistida por microondas.

MÉTODOS

Para el estudio se emplearon semillas secas y molidas de *Cucurbita pepo* L., procedentes de la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig" de San Antonio de los Baños, e identificadas por el Dr. C. Víctor Fuentes Fiallo. El ejemplar depositado en la citada estación tiene número de herbario ROIG 4744.

Extracción asistida por microondas

El proceso de extracción se llevó a cabo en un horno de microondas doméstico modificado, SHARP-4A56M, con un nivel de potencia máxima de 900 W, acoplado a un condensador. Las semillas de *Cucurbita pepo* L. (2 g) se colocaron en reactores esféricos de vidrio de 100 mL de capacidad y se añadió etanol (50 mL), irradiándose con una potencia de 700 W a diferentes tiempos (1, 5, 10, 15 min).

Posteriormente se separó el extracto del residuo por lona y se eliminó el disolvente mediante rotoevaporación a 50 ± 2 °C. Cada ensayo se realizó por triplicado.

El rendimiento de lípidos se calculó por la ecuación siguiente:

$$\% \text{ lípidos: } g \text{ lípidos extraídos} / g \text{ material vegetal} \times 100$$

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se analizaron con el *Software Statgraphics plus* versión 5.1.

Análisis por espectroscopia de reflexión interna (FTIR)

Se empleó un espectrómetro Nicolet IR100 con una resolución de 4 cm^{-1} , en el rango espectral de $4\ 000$ a 700 cm^{-1} . El aditamento de ATR utilizado fue el módulo *Thunderdome Swap-Top* de *Termo Electron Corp.*, modelo 0074-150 con cristal esférico de Germanio.⁸ Todos los espectros modelos se tomaron de la base de datos ASTRIO-DB: *Spectral Database for Organic Compounds*⁹ del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* de Japón. Estos se midieron en tabletas de KBr y en Nujol, en un espectrómetro Nicolet 170SX o un JASCO FT/IR-410 en el rango de $4\ 000$ a 400 cm^{-1} .

Análisis por cromatografía gaseosa

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Chrompack con las condiciones siguientes: columna CP-WAX de 30 m y diámetro interno de 0,53 mm, flujo de nitrógeno de 20 mL/min, temperatura de la columna de 185 °C, temperatura del detector de ionización por llama y del inyector de 220 °C. Se realizó la metilación¹⁰ de las muestras con metanol/H₂SO₄. En la identificación se utilizó patrón de referencia certificado para uso cromatográfico SUPELCO C8-C24 lote LB-00535. La cuantificación se efectuó mediante la normalización de las áreas.¹¹

RESULTADOS

En la figura 1 (gráfico del análisis de varianza) se muestra de forma comparativa los rendimientos para los tiempos de extracción estudiados, el menor rendimiento promedio con un valor de 18,0 % corresponde al tiempo de 15 min y el mayor con un promedio de 23,4 % se alcanzó con 1 min.

Análisis de varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	48,2382	3	16,0794	0,99	0,4459
Intragrupos	130,212	8	16,2765		
Total (Correlación)	178,45	11			

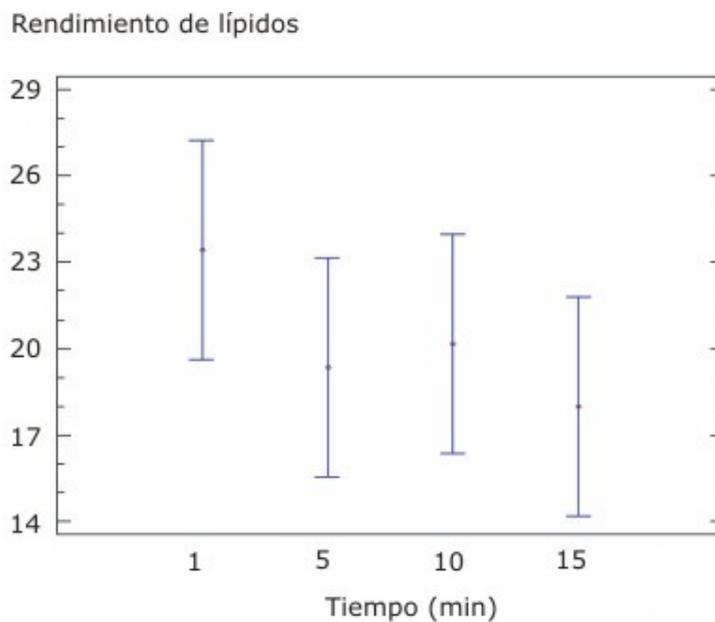


Fig. 1. Rendimiento de las extracciones con diferentes tiempos.

En la figura 2 se muestran los espectros infrarrojos de una de las réplicas de los extractos lipídicos obtenidos por microondas a los diferentes tiempos de extracción estudiados.

En la figura 3 se muestran respectivamente los espectros modelos del ácido linoleico (C 18:2), oleico (C 18:1), palmítico (C 16) y esteárico (C 18).¹⁰

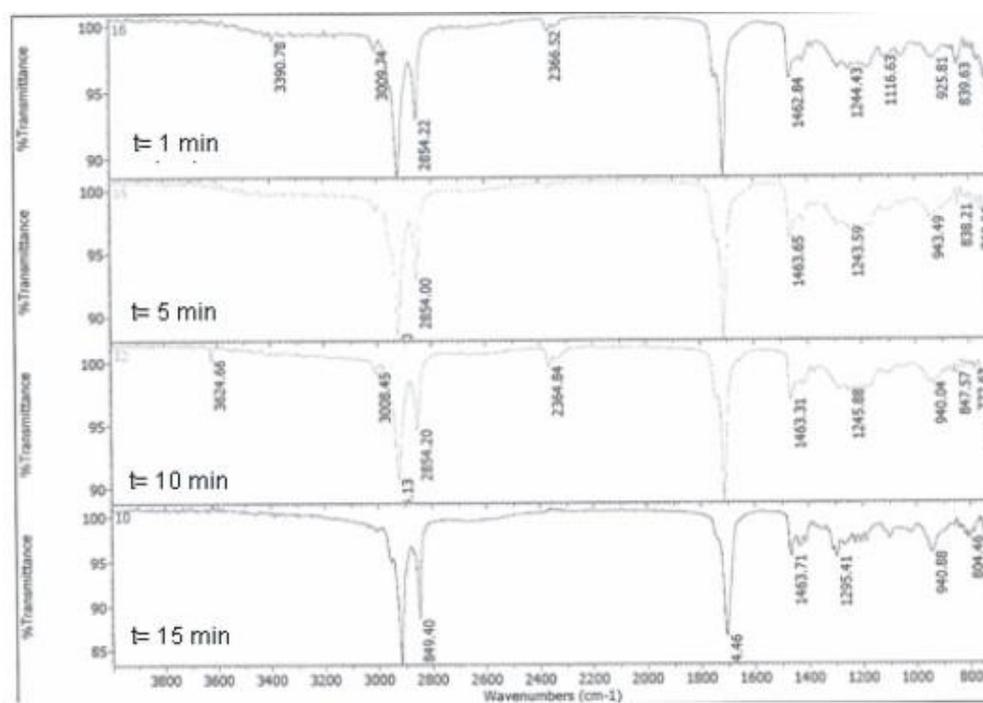


Fig. 2. Espectros infrarrojos de los extractos lipídicos extraídos a diferentes tiempos.

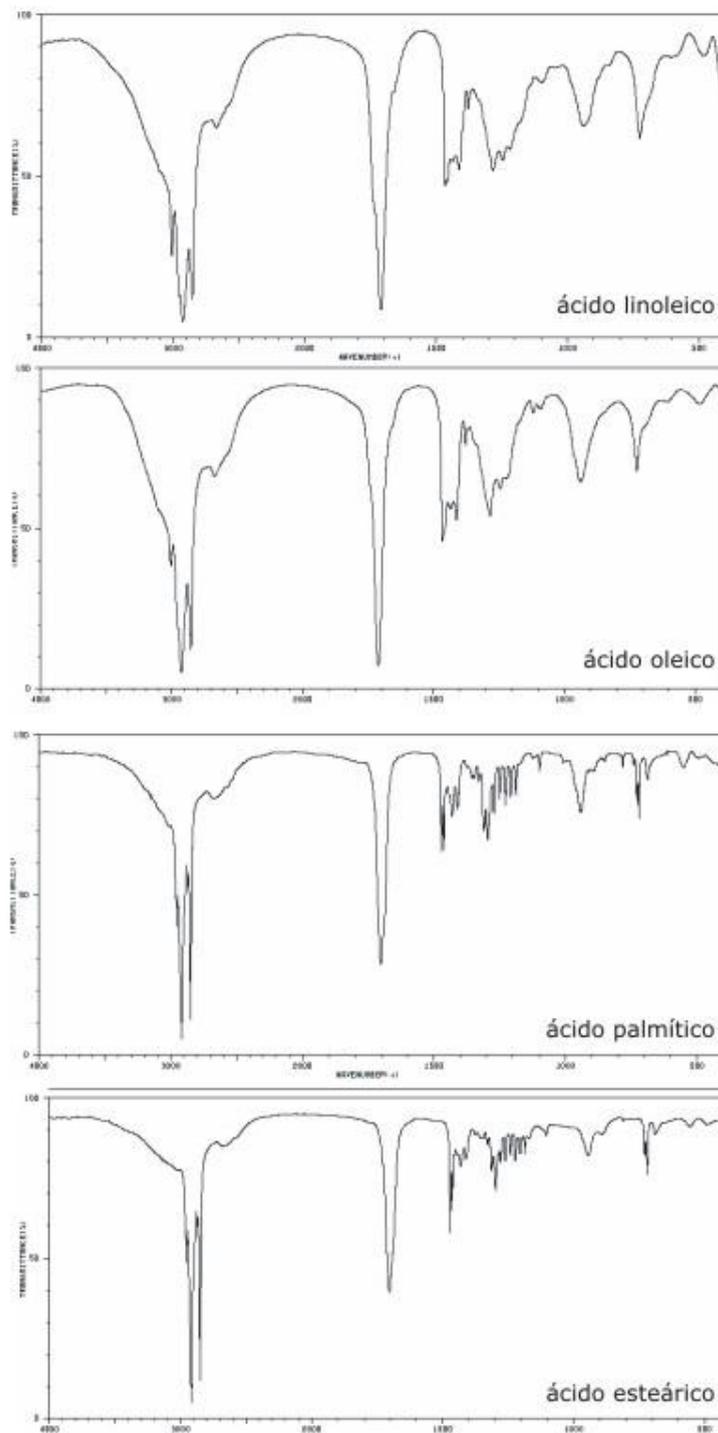


Fig. 3. Espectros infrarrojos modelos de los patrones de los ácidos grasos. Tomado de: base de datos ASTRIO-DB: *Spectral Database for Organic Compounds 10* del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology de Japón.

DISCUSIÓN

A través del análisis de varianza (Fig. 1), se puede determinar que no existen diferencias significativas en los rendimientos para los diferentes tiempos de extracción estudiados, esto se evidencia por el valor de probabilidad mayor que 0,05, siendo homogéneos todos los grupos, con previa demostración de la normalidad de varianza. En todos los casos los rendimientos se encuentran dentro del rango reportado por López¹² con valores entre 15 y 30 %.

En la figura 2 se observa la analogía entre los espectros infrarrojos de los extractos obtenidos por microondas, que tienen a su vez gran similitud con los espectros modelos de los patrones⁹ de los ácidos grasos mayoritarios, presentes en el extracto lipídico según lo reportado en la literatura³ (Fig. 3), porque exhiben las absorciones características de los grupos funcionales correspondientes a los ácidos grasos.¹³

El grupo carbonilo (C=O) se identifica por la posición de la vibración de valencia cercana a los $1\,700\text{ cm}^{-1}$; el metileno (CH_2), por las bandas a $2\,850$, $2\,925$ y $1\,460\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a un modo de vibración simétrico, asimétrico y la flexión simétrica en el plano de los hidrógenos del grupo, respectivamente; el metilo (CH_3) por la posición de la vibración de valencia asimétrica cercana a $2\,955\text{ cm}^{-1}$. el grupo carboxílico (COOH) se identifica por los sobretonos del grupo a $2\,670\text{ cm}^{-1}$, la ancha vibración de valencia del OH ácido ($2\,500\text{-}3\,300\text{ cm}^{-1}$) al que se le superponen las vibraciones de valencia de los grupos CH_3 y CH_2 más finas e intensas, la vibración de valencia del enlace C-OH cercana a $1\,246\text{ cm}^{-1}$, el doblaje fuera del plano del OH carboxílico a los 940 cm^{-1} .¹³

El análisis por cromatografía gaseosa del extracto obtenido con 1 min evidenció que los componentes mayoritarios (que representa 95 % del total de ácidos grasos en el extracto) son el ácido linoleico, el ácido oleico, el ácido palmítico y el ácido esteárico, al igual que lo citado en la literatura.³ La concentración del ácido linoleico resultó de 30,67 %, el ácido oleico de 33,4 %, el ácido palmítico 24,47 % y el ácido esteárico de 11,5 %.

De acuerdo con los resultados se puede afirmar que el método de extracción asistida por microondas empleado es factible en la obtención del componente lipídico a partir de las semillas de *Cucurbita pepo* L., porque permite obtener altos valores de rendimiento en tiempos extremadamente cortos.

Se demostró que bajo las condiciones estudiadas los componentes mayoritarios en el extracto lipídico son los ácidos grasos poliinsaturados linoleico, oleico, palmítico y esteárico, coincidiendo a lo citado en la literatura en cuanto a composición de los extractos obtenidos por métodos tradicionales, con probada actividad antiinflamatoria sobre la hiperplasia prostática benigna.

El tiempo de extracción de 1 min es el más propicio debido al ahorro de tiempo y de energía, demostrándose las ventajas del método en cuanto al tiempo sobre el tradicional por reflujo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carbin B, Larsson B, Lindahl O. Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytosterols. *Br J Urol.* 1990;66(6):639-41.
2. Bombardelli E, Morazzoni P. *Cucurbita pepo* L. *Fitoterapia.* 1997;68(4):291-301.
3. Menéndez Castillo R, Enríquez Ramírez L, Chalala M. Caracterización fitoquímica preliminar de *Cucurbita pepo* L. cultivada en Cuba. *Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet].* 2006 Dic [citado 2011 Oct 21]; 11(3-4): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000300009&lng=es
4. López Hernández OD, Márquez Conde T, Salomón Izquierdo S, González Sanabria ML. Extracción de lípidos de las semillas de *Cucurbita pepo* L. (calabaza). *Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet].* 2009 Jun [citado 2011 Oct 21];14(2): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
5. Bellma Menéndez A, Tillán Capó J, Menéndez Castillo RA, López González O, Carrillo Domínguez C, González Sanabria ML. Evaluación del extracto lipofílico de *Cucurbita pepo* L. sobre la hiperplasia prostática inducida por andrógenos. *Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet].* 2006 Jun [citado 2011 Oct 21]; 11(2): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
6. Mandal Vivekananda, Mohan Yogesh, Hemalatha S. Microwave assisted extraction -an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews.* 2007;1(1):7-18.
7. Jain T, Jain V, Pandey R, Vyas A, Shukla S. Microwave assisted extraction for phytoconstituents - An overview. *Asian J Research Chem.* 2009;2(1):19-25.
8. Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE. Introduction to infrared and raman spectroscopy. New York: Academic Press; 1975.
9. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology [citado 2008 Oct 21]. ASTRIO-DB: Spectral Database for Organic Compounds (on line). Disponible en: <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/>
10. The International Organization for Standardization. ISO-5509:2000. TC/34/SC11 "Animal and vegetable fats and oils, reparation of methyl esters of fatty acids" [citado 2011 Oct 21]. Disponible en: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=43172
11. The International Organization for Standardization. ISO-5508:1990. TC/34/SC11 "Animal and vegetable fats and oils. Analysis of fatty acids by Gas Chromatography" [citado 2011 Oct 21]. Disponible en: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=11558

12. López Hernández OD. Desarrollo de una tecnología de obtención de microcápsulas de lípidos mediante secado por aspersion [Tesis]. La Habana: Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría"; 2010.

13. Socrates G. Infrared Characteristic Group Frequencies. New York: John Wiley and Sons; 1980.

Recibido: 29 de noviembre de 2011.

Aprobado: 19 de julio de 2012.

Susleby Salomón Izquierdo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba. Correo electrónico: suslebyssi@infomed.sld.cu