

Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de *Cucurbita* spp

Gabriela M. Valenzuela*, Alicia L. Cravzov, Ariadna S. Soro, Alicia L. Tauguinás, María C. Giménez, Mabel R. Gruszycki

Universidad Nacional del Chaco Austral. Comandante Fernández 755 (3700). Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: gabriela@uncaus.edu.ar

Resumen

El propósito de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante en extractos de semillas de cuatro variedades de *Cucurbita* spp: Tetsukabuto, un híbrido entre *C. moschata* y *C. maxima* Duchesne ex Lam. (“zapallo japonés”); *C. mixta* Pangalo (“calabaza rayada”); *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir. (“coreanito”) y *C. maxima* Duchesne (“calabaza plomo”) con respecto a su contenido de fenoles totales y flavonoides. Se obtuvieron extractos de polaridad decreciente utilizando los siguientes solventes: agua acidificada, metanol, acetona y acetato de etilo; los fenoles totales y los flavonoides se cuantificaron con el método de Folin-Ciocalteu, y el de formación de complejos con $AlCl_3$ al 5 % respectivamente. Para determinar la actividad antioxidante de los extractos se utilizó la técnica de decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]). El contenido de fenoles totales fue: Tetsukabuto ($165,48 \pm 0,94$); *C. mixta* Pangalo ($293,07 \pm 6,86$); *C. moschata* ($118,79 \pm 3,72$); *C. maxima* Duchesne ($194,91 \pm 7,51$) ($\mu\text{mol GAE/g}$ de extracto). Los valores de flavonoides oscilaron entre ($32,18 \pm 1,39$) y ($96,63 \pm 1,14$) mg de quercetina/g de extracto. La actividad antioxidante expresada como concentración inhibidora media (IC₅₀) mostró los siguientes resultados: Tetsukabuto ($117,69 \pm 5,81$), *C. mixta* Pangalo ($77,75 \pm 3,64$), *C. moschata* ($110,67 \pm 1,70$), *C. maxima* Duchesne ($87,39 \pm 8,64$) (mg/ml). Un análisis unidireccional de varianza mostró que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las variedades estudiadas. De los resultados obtenidos se observa una clara relación entre el contenido de fenoles totales y flavonoides con actividad antioxidante. *C. mixta* Pangalo fue la variedad que mostró mayor actividad antioxidante, que puede ser considerada fuente de antioxidantes naturales para producir un efecto benéfico para la salud.

Relationship between antioxidant activity and total phenolic and total flavonoid contents in *Cucurbita* spp seeds

Summary

The purpose of this study was to determine the antioxidant activity in seed extracts of four varieties from *Cucurbita* spp: Tetsukabuto, a hybrid between *C. moschata* and *C. maxima* Duchesne ex Lam. (“zapallo japonés”); *C. mixta* Pangalo (“calabaza rayada”); *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir. (“coreanito”), and *C. maxima* Duchesne (“calabaza plomo”) in relation to total phenolic and total flavonoid

Palabras clave: actividad antioxidante - semillas - calabaza.

Key words: antioxidant activity - seeds - pumpkin.

contents. Extracts of decreasing polarity were obtained using the following solvents: acidified water, methanol, acetone, and ethyl acetate, the total phenols and flavonoids were quantified by the Folin-Ciocalteu and complexation with AlCl_3 to 5% respectively. To determine the antioxidant activity of extracts free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) bleaching technique was used. Total phenolic content was: Tetsukabuto (165.48 ± 0.94); *C. mixta* Pangalo (293.07 ± 6.86); *C. moschata* (118.79 ± 3.72); *C. maxima* Duchesne (212.87 ± 7.51) ($\mu\text{mol GAE/g}$ of extract). Flavonoid values ranged from (32.18 ± 1.39) and (96.63 ± 1.14) quercetin mg/g of extract. Antioxidant activity expressed as median inhibitory concentration (IC50) showed the following results: Tetsukabuto (117.69 ± 5.81), *C. mixta* Pangalo (77.75 ± 3.64), *C. moschata* (110.67 ± 1.70), *C. maxima* Duchesne (87.39 ± 8.64) (mg/ml). A one-way analysis of variance showed significant differences ($p < 0.05$) among the studied varieties. Results obtained show a clear relationship between the content of total phenols and total flavonoid with antioxidant activity. *C. mixta* Pangalo variety showed higher antioxidant activity, which can be considered a source of natural antioxidants with a beneficial effect on health.

Introducción

Desde la antigüedad las semillas de calabaza (*Cucurbita* spp) tienen múltiples usos en diferentes países, como alimento y con fines medicinales (Robinson y col., 1997). El hombre, desde sus inicios, en un proceso de relación con el entorno buscó siempre en la naturaleza la manera de encontrar la cura de las enfermedades que lo aquejaban. En forma empírica en su afán de encontrar la sanación de sus dolencias, fue descubriendo el efecto del buen uso de las plantas, y con el paso del tiempo investigó y extrajo sus propiedades (Cáceres y col., 2009).

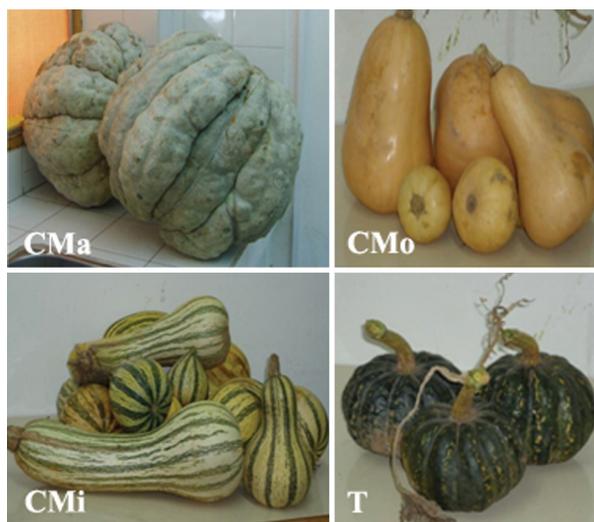
Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas, y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos.

El estudio de las reacciones oxidativas se ha incrementado en los últimos años debido a que la oxidación de los componentes celulares por acción de los radicales libres, entre otros factores, fue reconocida como la causa de procesos como el envejecimiento celular y numerosas enfermedades, como cáncer, mal de Parkinson, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Espin y col., 2000; Fukumoto y Mazza, 2000). Por sus potenciales aplicaciones en la prevención de numerosas enfermedades (Yu y col., 2001) los antioxidantes naturales presentes en granos, vegetales y frutas han recibido considerable atención.

La búsqueda de variantes naturales es premisa futura; por lo tanto, en este trabajo se determinó el

contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante en cuatro variedades de semillas de *Cucurbita* spp (Figura 1) cultivadas en la provincia del Chaco: Tetsukabuto (“zapallo japonés”) híbrido entre *C. moschata* y *C. maxima* Duchesne ex Lam., *C. mixta* Pangalo (“calabaza rayada”), *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir. (“coreanito”) y *C. maxima* Duchesne (“calabaza plomo”).

Figura 1.- Variedades de *Cucurbita* spp



CMa: *Cucurbita maxima* Duchesne o “calabaza plomo”; **CMi:** *Cucurbita mixta* Pangalo o “calabaza rayada”; **CMo:** *Cucurbita moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir. o “coreanito”; **T:** “tetsukabuto”, un híbrido entre *C. moschata* y *C. maxima*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se procedió a la recolección de semillas de diferentes variedades de *Cucurbita* spp de productores de la región. Las muestras fueron desecadas hasta obtener peso constante y luego, almacenadas en bolsas plásticas, cerradas herméticamente e identificadas con etiquetas. Muestras frescas de las especies vegetales (hoja, flor y fruto) fueron depositadas en la Cátedra de Farmacobotánica de la Universidad Nacional del Chaco Austral para su identificación.

Obtención de extractos con solventes de polaridad decreciente

Se homogeneizaron 10 gramos de semillas de calabaza en 50 ml de agua desionizada acidificada (2 % de ácido acético) por medio de un homogeneizador (Ultra-Turrax T25, JANKE y Kunkel, IKA-Labortechnik). La suspensión se dejó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 800 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recogió en un erlenmeyer, y el sedimento se trató nuevamente con 50 ml de agua acidificada. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 10 min y el sobrenadante resultante se combinó con el sobrenadante de la primera centrifugación, mientras que el sedimento restante se homogeneizó en 50 ml de metanol acidificado (ácido acético al 2 %). Este procedimiento se realizó por duplicado.

Se extrajo luego el residuo restante de cada fracción con acetona y acetato de etilo. Finalmente fueron obtenidos cuatro extractos de semilla de calabaza: un extracto de acuoso (W), un extracto metanólico (M), uno en acetona (Ac) y otro extracto de acetato de etilo (AcEt). Todas las fracciones fueron evaporadas a presión reducida y se volvieron a disolver en el mismo solvente que se utilizó para su extracción; este proceso se practicó para cada una de las cuatro variedades de *Cucurbita* spp estudiadas.

Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Singleton y col. (1999), que se fundamenta en que los compuestos fenólicos reducen el reactivo de Folin-Ciocalteu (reactivo de tungsteno y molibdato) para formar un complejo azulado que

absorbe a 765 nm. A 200 μ l de muestra se agregaron 2 ml de agua desionizada y 0,2 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu; después de 2 minutos se agregó 0,8 ml de carbonato de sodio 15,9 %, se incubó a 50 °C durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 25.

Se realizó una curva de calibración con una solución alcohólica de ácido gálico (AG). Se empleó una solución madre de concentración 0,1 mg/ml, que abarcaba un rango de 0,002 a 0,035 mg de ácido por ml de solución. Los resultados fueron expresados en μ mol de ácido gálico por g de extracto (μ mol AG/g extracto).

Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales en los diferentes extractos fue determinado por el método de Popova y col. (2004) con modificaciones. A una alícuota de 0,2 ml de extracto se le adicionaron 1,8 ml de metanol y 1 ml de solución etanólica de $AlCl_3$ 5 %. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 425 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 25. Se usaron soluciones de quercetina entre 5-25 μ g/ml, para construir la curva de calibración.

El contenido de flavonoides totales fue calculado como mg equivalentes de quercetina (QE)/g de extracto. Este procedimiento se efectuó con cada uno de los extractos de cada variedad por triplicado.

Actividad antioxidante

Se usó el método descrito por Brand-Williams (1995). Este método está basado en la reducción de una solución alcohólica de DPPH en presencia de un antioxidante donador de hidrógeno. Se calculó la cantidad de antioxidantes necesarios en la muestra para reducir la concentración inicial de radical DPPH en un 50 %. El radical DPPH fue disuelto en etanol al 95 %; se tomaron 2,5 ml de solución de DPPH de absorbancia igual a 1,0 y se agregaron alícuotas del extracto. Los valores de eficiencia de concentración se realizaron a los 10 minutos de reacción, la disminución de las absorbancias fue registrada a intervalos de 1 minuto. Se trabajó a 515 nm como la longitud de onda máxima en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 25. La concentración del radical DPPH, en el medio de la reacción,

se calculó mediante regresión no lineal a partir de una curva de calibración obtenida por diferentes concentraciones del extracto vs. la concentración del radical DPPH.

La capacidad atrapadora de radicales libres (*ARR*) se calculó mediante la ecuación:

$$ARR(\%) = 100 \left[1 - \frac{A_m^\infty}{A^0} \right]$$

donde

A^0 : absorbancia al tiempo 0 sin el agregado de muestra.

A_m^∞ : absorbancia de la muestra en estado estacionario obtenida mediante el ajuste de los perfiles cinéticos a tiempo infinito.

Sin embargo, los resultados obtenidos por este método se informan como IC_{50} que es la concentración inhibitoria media, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de inhibir el 50 % del radical DPPH.

Análisis de datos

Los resultados se analizaron mediante ANOVA de un factor ($p < 0,05$) y se empleó la prueba LSD para la comparación de medias. Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Plus.

Resultados

Contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos son muy importantes como constituyentes en las plantas debido a su habilidad para secuestrar radicales libres y que está relacionada con la presencia en la molécula del grupo hidroxilo. En la tabla 1 se muestra la concentración de compuestos fenólicos totales de cada fracción para las cuatro variedades de semillas de *Cucurbita* spp. Un análisis unidireccional de varianza muestra que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las variedades estudiadas.

Tabla 1.- Fenoles totales en extractos de semillas de calabaza, como μmol de ácido gálico/g extracto

Variedad	Fracción				
	W	M	Ac	AcEt	Total
CMi	67,48 \pm 1,22	95,96 \pm 3,25	48,72 \pm 3,46	80,91 \pm 1,89	293,07 \pm 6,86
CMo	14,15 \pm 0,20	70,78 \pm 0,20	22,57 \pm 1,40	11,29 \pm 0,21	118,79 \pm 3,72
T	25,06 \pm 0,78	68,80 \pm 1,48	29,49 \pm 2,67	42,12 \pm 0,67	165,48 \pm 0,94
CMa	53,88 \pm 0,58	62,79 \pm 3,34	30,75 \pm 2,76	47,49 \pm 0,13	194,91 \pm 7,51

*Fracciones: W: acuosa; M: metanol; Ac: acetona; AcEt: acetato de etilo.

**Variedad de semillas. CMi, *C. mixta* Pangalo; CMo, *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir; T, híbrido entre *C. moschata* y *C. maxima* Duchesne ex Lam.; CMa, *C. maxima* Duchesne.

Tabla 2.- Flavonoides totales en extractos de semillas de calabaza, como mg de quercetina/g extracto

Variedad	Fracción				
	W	M	Ac	AcEt	Total
CMi	1,35 \pm 0,05	1,42 \pm 0,15	39,12 \pm 1,94	54,74 \pm 0,46	96,63 \pm 1,14
CMo	0,43 \pm 0,07	0,41 \pm 0,04	25,64 \pm 0,12	53,55 \pm 0,21	80,14 \pm 0,18
T	1,72 \pm 0,08	0,53 \pm 0,01	20,66 \pm 1,02	9,27 \pm 0,18	32,18 \pm 1,39
CMa	0,48 \pm 0,06	0,29 \pm 0,33	24,23 \pm 1,85	52,77 \pm 0,05	77,77 \pm 1,82

*Fracciones: W: acuosa; M: metanol; Ac: acetona; AcEt: acetato de etilo.

**Variedad de semillas. CMi, *C. mixta* Pangalo; CMo, *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir; T, híbrido entre *C. moschata* y *C. maxima* Duchesne ex Lam.; CMa, *C. maxima* Duchesne.

Contenido de flavonoides totales

Los resultados del contenido de flavonoides totales se presentan en la tabla 2 y se correlacionan con el de contenido de fenoles totales puesto que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos. Un análisis unidireccional de varianza muestra que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las variedades estudiadas.

Actividad antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante indican que todas las variedades de semillas de *Cucurbita* spp fueron capaces de atrapar radicales DPPH de una manera dependiente de la concentración; un análisis unidireccional de varianza muestra que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las variedades estudiadas. Su actividad antioxidante expresada como concentración inhibidora media (IC_{50}) se muestra en el figura 2.

Discusión

Los compuestos fenólicos tienen una importante acción en la estabilización de la oxidación lipídica, han sido asociados con la capacidad atrapadora de radicales libres y se ha sugerido que tienen efecto inhibitorio sobre la mutagénesis y la carcinogénesis (Ortiz y col., 2007). Los valores más altos de fenoles totales se observaron en la fracciones metanólicas de las cuatro variedades de *Cucurbita* spp con valores que van desde 10,68-16,32 mg AG/g extracto, mayores a su vez, que los informados por Xanthopoulou y col. (2009), pues hallaron valores en la fracción metanólica de 0,09-0,20 mg AG/g extracto de semillas de zapallo, y también

son superiores a los publicados por Parry y col. (2008), 1,58 mg AG/g de harina y en extractos metanólicos de aceite de semillas de calabaza (Parry y col., 2006), que informó un valor de 0,98 mg AG/g aceite.

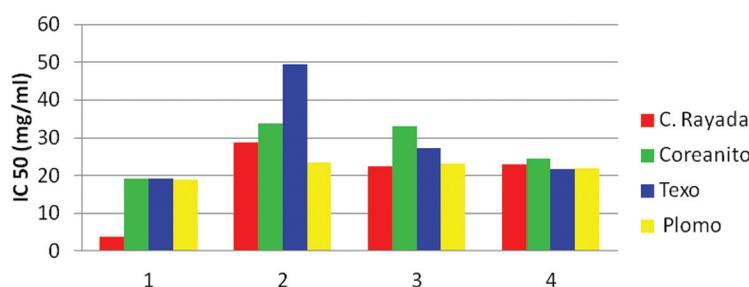
A su vez, se obtuvo alta concentración de compuestos fenólicos en la fracción acuosa que se puede atribuir a la presencia de proteínas y otros compuestos solubles en agua que contienen anillos fenólicos: *C. mixta* Pangalo ($67,48 \pm 1,22 \mu\text{mol GA/g}$ extracto) y *C. maxima* Duchesne, ($53,88 \pm 0,58 \mu\text{mol GA/g}$ extracto) son las variedades que presentaron mayor contenido en esta fracción.

En las fracciones de acetato de etilo, donde se utilizó este solvente para extraer los compuestos fenólicos, es muy difícil que algunos azúcares atraviesen el extracto, pero sí otros fenoles diferentes a ácidos fenólicos y que redujeron el reactivo de Folin-Ciocalteu, debido a que en esta fracción fueron relevantes las concentraciones halladas en todas las variedades de *Cucurbita* spp, con valores de $11,29 \pm 0,21$ a $80,91 \pm 1,89 \mu\text{mol GA/g}$ extracto.

En cambio, en las fracciones con acetona se observaron los valores más bajos en la cuantificación de fenoles totales. Según la técnica espectrofotométrica todas las especies presentaron mayor concentración de flavonoides totales en la fracción de acetato de etilo con valores que oscilaron entre $54,74 \pm 0,46$ y $9,27 \pm 0,18$ (mg de quercetina/g de extracto); *C. mixta* Pangalo fue la variedad que presentó mayor contenido, incluso menor que los informados por (Cáceres y col., 2009) pues hallaron para *Cucurbita argyrosperma*, valores de $110 \pm 5,32$ mg de quercetina/g de muestra. Pero a su vez, es mayor que el hallado por (Ojiako y col., 2007) en *Cucurbita moschata* (quercetina 17,73 mg/100g).

En las cuatro variedades de semillas de *Cucurbita* spp estudiadas, la capacidad atrapadora de radicales

Figura 2.- Concentración inhibitoria media en extractos de semilla de calabaza



Extractos: 1, acuoso; 2, metanólico; 3, acetona; 4, acetato de etilo.

libres más alta se detectó en las fracciones acuosas, donde se destacó *C. mixta* Pangalo (IC_{50} $3,83 \pm 0,47$), con una capacidad mayor que la detectada por Xanthopoulou y col. (2009) para semillas de cucurbita. Sin embargo, los valores hallados por estos autores son mayores que los hallados para Tetsukabuto, *C. moschata* y *C. maxima* Duchesne en la fracción acuosa.

Además, extractos en acetona de avellana (0,098 mg/ml) (Alasalvar y col., 2006) y extracto acuoso de nuez 0,15-0,22 mg/ml (Pereira y col., 2008) parecen ser más eficaces inactivadoras del radical DPPH que los correspondientes extractos de semilla de calabaza.

Conclusión

De los resultados obtenidos se observa una clara relación entre el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad atrapadora de radicales libres. *C. mixta* Pangalo mostró mayor actividad antioxidante, y se podría considerar a esta especie una nueva fuente de antioxidantes naturales, para producir un efecto benéfico sobre la salud.

Referencias bibliográficas

- Alasalvar, C.; Karamac, M.; Amarowicz, R.; Shahidi, F. (2006). "Antioxidant and antiradical activities in extracts of Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut green leafy cover". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 4826-4832.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity." *Lebensm. Wiss. Technology* 28: 25-30.
- Cáceres, A.; Lange, K.; Cruz, S.; Velásquez, R.; Sequeda, L.; Lima, S. (2009). "Actividad antioxidante de diez especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutraceuticos". *Guatemala: Informe final proyecto FODECYT*.
- Espin, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J.; García-Viguera, C. (2000). "Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5): 1588-1592.
- Fukumoto, L.R.; Mazza, G. (2000). "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8): 3597-3604.
- Ojiako, O.A.; Igwe, C.U. (2007). "Nutritional and anti-nutritional compositions of Cleome ruti-dosperma, Lagenaria siceraria, and Cucurbita maxima seeds from Nigeria". *Journal of Medicinal Food* 10(4): 735-738.
- Ortiz, H.; Barragan, H.; Murillo, E. (2007). "Poder antioxidante de los flavonoides de hoja y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. ('casco de vaca')". *Scientia et Technica* 1(33).
- Parry J.W.; Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. (2008). "Fatty acid composition, antioxidant properties, and antiproliferative capacity of selected cold-pressed seed flours". *Journal of the American Oil Chemists Society* 85: 457-464.
- Parry J.; Hao, Z.; Luther, M.; Su, L.; Zhou, K.; Yu, L. (2006). "Characterization of cold pressed onion, parsley, cardamom, mullein, roasted pumpkin, and milk thistle seed oils". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 847-854.
- Pereira, J.A.; Oliveira, I.; Sousa, A.; Ferreira, I.C.F.R.; Bento, A.; Estevinho, L. (2008). "Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars". *Food and Chemical Toxicology* 46: 2103-2111.
- Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S. (2004). "Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis". *Phytochem. Anal.* 15: 235-240. doi:10.1002/pca.777.
- Robinson, R.W.; Decker-Walters, D.S. (1997). "*Cucurbits. Cab international*, Wallingford, UK, 226 pp.
- Singleton, V.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent". *Methods in enzymology* 299: 154-178.
- Xanthopoulou, M.N.; Nomikos, T.; Fragopoulou, E.; Antonopoulou, S. (2009). "Antioxidant and lipooxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts". *Food Research International* 42(5): 641-646.
- Yu, J.; Vasanthan, T.; Temelli, F. (2001). "Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(9), 4352-4358.