



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN BOTÁNICA

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE DOS GENOTIPOS DE *Sechium edule* (Jacq.) Sw.

ANGELES URIMA OROZCO SOTA

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

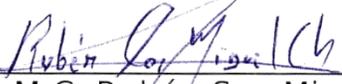
MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2022

La presente tesis titulada: **Análisis fitoquímico y efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo* de dos genotipos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw.**, realizada por la alumna: **Angeles Urima Orozco Sota**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____
	Dr. R. Marcos Soto Hernández
DIRECTORA DE TESIS	 _____
	Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez
ASESOR (A)	 _____
	Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas
ASESOR (A)	 _____
	Dra. Mariana Palma Tenango
ASESOR (A)	 _____
	M.C. Rubén San Miguel Chávez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2022

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE DOS GENOTIPOS DE *Sechium edule* (Jacq.) Sw.

Angeles Urima Orozco Sota, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Diversas enfermedades crónicas degenerativas se derivan del desequilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes presentes en el metabolismo, predominando los primeros. En este estudio se realizó un análisis fitoquímico a dos genotipos de *Sechium edule*, siendo estos *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* 80%: *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290). A partir de extractos metanólicos y extracción discontinua por cada genotipo y la mezcla 80:20, se llevaron a cabo análisis preliminares, cromatografías de capa fina y cromatografías de líquidos de alta resolución (HPLC), para la identificación de metabolitos secundarios a los que se les atribuyen propiedades antioxidantes, como cucurbitacinas y compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles); encontrando un mayor contenido y concentración de metabolitos en *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290. El efecto antioxidante *in vitro* se determinó con la prueba 2,2-Difenil-Picrilhidrazil (DPPH), donde se observó en amargo 290 un porcentaje de inhibición mayor en comparación de *nigrum spinosum* y la mezcla 80:20. *In vivo* se realizó la prueba de dosis letal media (LD₅₀) para determinar el grado de toxicidad de los extractos vía oral, teniendo como resultado a *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y a la mezcla 80:20 inocuas, a diferencia de *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 que tuvo una dosis letal de 2800 mg/kg considerado como ligeramente tóxico. Por otro lado, se realizó el análisis antioxidante en ratones tratados con los diferentes extractos y se les indujo estrés oxidativo con tetracloruro de carbono y se analizaron las pruebas para determinar el efecto antioxidante de glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa en sangre, teniendo en ambos genotipos y en la mezcla 80:20 un visible efecto antioxidante, siendo *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 el más efectivo.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, chayote, estrés oxidativo

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIOXIDANT EFFECT *in vitro* AND *in vivo* OF TWO GENOTYPES OF *Sechium edule* (Jacq.) Sw.

Angeles Urima Orozco Sota, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

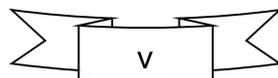
ABSTRACT

Various chronic degenerative diseases are derived from the imbalance between free radicals and antioxidants present in the metabolism, the former predominant. In this study, a phytochemical analysis was carried out on two genotypes of *Sechium edule*, these being *Sechium edule* varietal group *nigrum spinosum*, *Sechium edule* varietal group *virens levis* Amargo 290 and the mixture 80:20 (*Sechium edule* varietal group *nigrum spinosum* 80%: *Sechium edule* varietal group *virens levis* Amargo 290). From methanolic extracts and discontinuous extraction for each genotype and the 80:20 mixture, preliminary analyzes, thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC) were carried out to identify secondary metabolites to which they attribute antioxidant properties, such as cucurbitacins and phenolic compounds (flavonoids and phenols); finding a higher content and concentration of metabolites in *Sechium edule* varietal group *virens levis* Amargo 290. The antioxidant effect *in vitro* was determined with the 2,2-Diphenyl-Picrilhidrazil (DPPH) test, where a higher percentage of inhibition was observed in Amargo 290 compared to *nigrum spinosum* and the 80:20 mix. *In vivo*, the mean lethal dose test (LD₅₀) was performed to determine the degree of toxicity of the extracts orally, resulting in *Sechium edule* varietal group *nigrum spinosum* and a harmless 80:20 mixture, unlike *Sechium edule* varietal group *virens levis* Amargo 290 had a lethal dose of 2800 mg/kg considered slightly toxic. On the other hand, the antioxidant analysis was carried out in mice treated with the different extracts and oxidative stress was induced with carbon tetrachloride and the glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase tests in blood were analyzed, having in both genotypes and in the mixture 80:20 a visible antioxidant effect, being *Sechium edule* varietal group *virens levis* Amargo 290 the most effective.

Palabras clave: Phenolic compounds, chayote, oxidative stress

APOYOS FINANCIEROS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UIDCC, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), FES-Zaragoza, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Marcos Soto Hernández y la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez, con el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave: IN229820 e IN215821, el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. (GISeM) y el apoyo de beca para los estudios de Maestría CONACyT (9344201).



AGRADECIMIENTOS

Gracias Colegio de Postgraduados campus Montecillos, por abrirme las puertas y recibirme en dos ocasiones, por la lección de vida y por mostrarme un nuevo mundo y a grandes seres humanos.

Gracias Postgrado en Botánica, por ser mi núcleo y empezar a forjarme en ésta extensa y maravillosa área que estudia aquello que brota de la Madre Tierra.

Infinitas gracias a mi muy querido y extraordinario consejo:

Dr. R. Marcos Soto Hernández, lo admiro y respeto, agradezco su apoyo para mi regreso, su paciencia y confianza desde mi entrevista para el ingreso al COLPOS, le confieso que es el hombre, con más sapiencia que conozco, lo aprecio mucho y me considero afortunada por haber tenido la oportunidad de trabajar con usted.

Dra. Itzen, más que por ser una gran directora de tesis, agradezco me permitiera conocer su esencia, a la mujer, a la Dra., a la madre, a la esposa, a la hija, a la compañera de laboratorio, a la profesora, todo lo que hace día a día sin parar un minuto, siempre le dije que no se como le hace, aún pienso que tiene super poderes, gracias por su apoyo, paciencia y preocuparse por mi y mi familia.

Dra. Lucero, siempre he sentido una conexión con usted, me ha mostrado no solo su extenso conocimiento, sino que para mí tiene una fortaleza que no se puede ocultar, además me identifico con usted porque percibo que mantiene un equilibrio entre su vida en la investigación y su parte espiritual, energética y emocional.

Dra. Mariana, gracias por recordarme que debo confiar en mí. La última plática que tuvimos, permitió conocer una parte que quizá no tuvimos la oportunidad antes, pero el recordarme todo el proceso que ha sido éste proyecto. Gracias por su apoyo, confianza y por ser parte de éste logro. Tiene mi admiración y aprecio.

M.C. Rubén, gracias por todo el apoyo en el laboratorio, por su orientación, por su paciencia, por su serenidad y flexibilidad. Fue indispensable su compañía en mi

regreso, la contingencia tuvo el laboratorio en soledad excepto por usted. Reconozco su trabajo y esfuerzo en cada proyecto y en especial en el mio.

Dr. Victor Conde, gracias por ser siempre parte de mi paso por el COLPOS, desde la primera vez que puse un pie en el campus. Sus clases durante la huelga, tambien me permitieron conocerlo como persona, gracias por su energía y buenos deseos siempre en especial en esta parte de culminación, por ser mi sinodal y amigo gracias.

Dr. Jorge Cadena Iñiguez, por ser inspiración para mi en el Congreso de *Sechium edule*, por su apoyo con el artículo y el material biológico utilizado en esta investigación, gracias tambien por su pasión por la investigación y su labor en cada localidad que pisa.

Profesor Emigdio Navarrete Esquivel, de no ser por usted, no habría sido posible mi proceso para ingresar a la maestria. Gracias por su confianza y apoyo incondicional desde siempre.

Gracias a Don Domingo González, por toda la orientación, apoyo y disposición en el laboratorio durante la primera parte de ésta investigación.

A todos los Doctores y Doctoras que me dieron clases durante mi estadía en el Colegio, gracias por compartir su conocimiento y tiempo.

A la Lic. Alejandra Martínez, gracias por su amistad y por regresarme la posibilidad de volver a ser alumna del Coligio, de no ser por usted, esta segunda etapa no abria sido posible. La quiero mucho, gracias por abrirme su corazón y su hogar.

A quienes acompañaron mi proceso y tramites en la administración de Botánica: Corina Morales, Carla Vega, Maribel Jiménez y Candelaria Martínez, gracias por su amabilidad y por recibirme siempre con una sonrisa.

Gracias en especial al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por la confianza, apoyo y abrirme las puertas de su hogar.

A la MVZ. Adriana Altamirano Bautista y al MVZ. Román, responsables del Bioterio, FES-Zaragoza, UNAM.

A la Dra. Graciela Gavia García, por compartirme parte de su experiencia profesional y personal, por los ánimos en momentos difíciles y por acompañare en los procesos de la segunda parte de esta investigación, la admiro Dra.

Al Dr. David Hernández Alvaréz, por hacer más gratos las jornadas largas, por sacar al equipo siempre una sonrisa y por ser parte de ésta investigación, gracias.

Al futuro Lic. David Hernández Gavia, por recordarme que el empeño y disciplina son fundamentales desde siempre para salir avantes ante los retos, por su colaboración en el *in vivo* y por compartir su entusiasmo ante el aprendizaje.

A la Unidad de Investigación en Gerontología, en especial a la Dra. Taide L. Arista Ugalde, por compartirme su conocimiento, por su bella energía, por su disposición y tiempo, por lo ameno que hizo parte del trabajo y por mostrarme otra área de la investigación, gracias.

A todos los chicos y que me enseñaron, me acompañaron y compartieron diversas etapas de éste trabajo, mil gracias, por brindarme su tiempo, conocimiento y apoyo, Gracias Malu, Eduardo, Lamberry, Sac, Matusalem, Itze Lilian, Deyanira y Jorge, todos aportaron a ésta investigación y a mi persona algo nuevo.

A los amigos (as) y compañeros (as) que fueron parte en diferentes etapas, o desde el inicio de éste camino que duró más de lo esperado, gracias, omito nombres ya que son varios quien, en su momento, me enseñaron, ayudaron, me abrazaron, me vieron reir y llorar y confiaron en que podría terminar. Gracias.

DEDICATORIA

A mis padres, Fernando Orozco Becerra y María de los Angeles Sota Saldaña, porque de no estar a mi lado y apoyarme en cada meta que me he propuesto, no habría sido posible concluir. Gracias a ambos por su amor y cuidados, porque ahora se lo que es tener una hija y lo que eso conlleva. Los amo inmensamente, gracias por enseñarme y acompañarme en este proceso, porque a pesar de un primer intento fallido, me alentaron a terminar lo que inicie, y me motivaron en cada paso.

Mami, sin tu amor y cuidado hacia Tonantzin, no habría podido enfocarme en mis estudios, gracias por ese esfuerzo extra cada día para ver por ella. Te amo.

Papi, gracias por estar al tanto cada día y preocuparte por mi y por Tona, por ser más que su abuelo, ser como un padre para ella. Te amo.

A ti mi princesa hermosa, mi Tonantzin, gracias por tu comprensión cada que nos teníamos que separar, por esperarme cada fin de semana o a veces más. Por todo tu amor y cariño, por ser mi fuerza e inspiración para concluir, te amo de una forma indescriptible, gracias por ser mi hija y gracias por hacerme la mamá más feliz, recuerda que estoy y estaré para ti en cada sueño que te plantees.

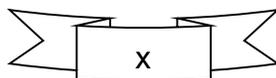
A mi hermano Angel, por amar y cuidar de mi hija como si fuese propia, gracias por todo lo que haces y representas para ella. Te amo.

A mi hermana lyali, por preocuparse por mi, por alentarme a enfocarme y terminar. Gracias por amar a mi hija y gracias por creer en mi. Te amo a ti y a mi sobrino Ari.

A mi padrino Carlos Sánchez, me abría gustado compartir éste logro contigo, gracias por ser un hombre impecable y por creer en mi, siempre te recordaré con amor, admiración y respeto.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
APOYOS FINANCIEROS	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	ix
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Planteamiento del Problema	16
1.2 Justificación	17
2 OBJETIVO GENERAL	17
2.1 Objetivos particulares	18
3 REVISIÓN DE LITERATURA	18
3.1. Metabolitos Secundarios (MS)	18
3.2 Clasificación de los metabolitos secundarios	23
3.3 Antioxidantes	31
3.4 Estrés Oxidativo	32
3.5 Alimentos funcionales.....	37
3.6 Plantas Medicinales.....	38
3.7 Género <i>Sechium</i> spp.	39
3.7.1 <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw.	40
3.7.2 Descripción de grupos varietales	41
3.7.3 Contenido de metabolitos secundarios presentes en <i>Sechium edule</i> y sus propiedades terapéuticas.....	47
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
4.1 Obtención de frutos <i>Sechium</i> spp.	48
4.2 Análisis preliminar de metabolitos secundarios	49
4.3 Cromatografía de capa Fina	52
4.4 identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	55



4.5	Análisis <i>in vitro</i>: 2,2-Difenil-Picrilhidrazil (DPPH)	59
4.6	Tratamiento de ratones	59
4.6.1	Tratamiento a ratones para la dosis letal media (LD₅₀)	59
4.6.2	Tratamiento a ratones para pruebas de actividad antioxidante <i>in vivo</i>	60
4.7	Pruebas antioxidantes en eritrocitos de ratones tratados	60
4.7.1	Prueba de Glutación Peroxidasa (GPx)	60
4.7.2	Prueba para superóxido dismutasa (SOD)	61
4.7.3	Prueba para Catalasa (CAT)	62
4.8	Análisis estadístico	63
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
5.1	Identificación de la presencia de metabolitos secundarios presentes en los extractos de los genotipos de <i>Sechium edule</i> mediante pruebas preliminares.	63
5.2	Identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos de <i>Sechium edule</i> por medio de cromatografía de capa fina.	66
5.3	Identificación y cuantificación de la presencia de metabolitos secundarios presentes en los extractos de <i>Sechium edule</i> por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	70
5.4	Análisis del efecto antioxidante <i>in vitro</i> mediante 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) en los extractos de <i>Sechium edule</i>.	84
5.5	Dosis Letal media (LD₅₀)	88
5.6	Evaluación del efecto antioxidante <i>in vivo</i> de los extractos de <i>Sechium edule</i>.	89
6	CONCLUSIONES	93
7	BIBLIOGRAFÍA	94
	ANEXOS	102
	Anexo 1. Pruebas preliminares de metabolitos secundarios	102
	Anexo 2. Cromatografía de capa fina de alcaloides y taninos	105
	Anexo 3. Prueba de DPPH	106
	Anexo 4. Prueba CAT	107

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos Fenólicos presentes en plantas y sus propiedades biológicas.	28
Cuadro 2. Tiempo de retención y longitud de onda para los estándares de cucurbitacinas.....	56
Cuadro 3. Tiempo de retención y longitud de onda de los estándares de ácidos fenólicos.....	57
Cuadro 4. Tiempo de retención y longitud de onda para los estándares de flavonoides.....	58
Cuadro 5. Metabolitos secundarios en los extractos de <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> , <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 y en la mezcla 80:20 respectivamente, mediante el análisis de pruebas preliminares.....	65
Cuadro 6. Valores de retención obtenidos de la cromatografía de capa fina de compuestos fenólicos presentes en los extractos de <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> , <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 y en la mezcla 80:20.....	68
Cuadro 7. Valores de retención obtenidos de la cromatografía de capa fina de cucurbitacinas presentes en los extractos de <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> , <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 y en la mezcla 80:20.....	70
Cuadro 8. Concentración de flavonoides presentes <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizadas por HPLC.....	72
Cuadro 9. Concentración de flavonoides presentes <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizadas por HPLC.	74
Cuadro 10. Concentración de flavonoides presentes la mezcla 80:20 (<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> (80%): <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 (20%) por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizadas por HPLC.	75

Cuadro 11. Concentración de ácidos fenólicos presentes <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.....	77
Cuadro 12. Concentración de HPLC de ácidos fenólicos presentes <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.	78
Cuadro 13. Concentración de ácidos fenólicos presentes la mezcla 80:20 (<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> (80%): <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 (20%) por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.	80
Cuadro 14. Concentración de cucurbitacinas presentes <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> por extracción discontinua y en extracto solo con metanol por HPLC.	81
Cuadro 15. Concentración de cucurbitacinas presentes <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 por extracción discontinua y en extracto solo con metanol por HPLC.....	82
Cuadro 16. Concentración de cucurbitacinas presentes la mezcla 80:20 (<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> (80%): <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 (20%) por extracción discontinua y en extracto solo con metanol por HPLC.....	83
Cuadro 17. Concentración media de inhibición (IC ₅₀) para los tratamientos de <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> , <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> y la mezcla 80:20	87
Cuadro 18. Dosis letal media (LD ₅₀) de los tratamientos de <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> , <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> y la mezcla 80:20.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.	21
Figura 2. Origen biosintético de los metabolitos secundarios.	23
Figura 3. Estructura química de los precursores de terpenos.	24
Figura 4. Heterociclos presentes en alcaloides.	25
Figura 5. Estructura química de ácidos fenólicos.	26
Figura 6. Esquema general de reducción del anión radical superoxido a través de los sistemas enzimáticos endógenos antioxidantes	34
Figura 7. Generación del radical hidroxilo a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.	34
Figura 8. Resumen de las vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos.....	36
Figura 9. A) <i>nigrum xalapensis</i> , B) <i>amarus silvestrys</i> , C) 1: <i>albus levis</i> , 2: <i>albus dulcis</i> , 3: <i>albus minor</i>	40
Figura 10. <i>Sechium edule</i> var. <i>albus minor</i>	41
Figura 11. <i>Sechium edule</i> var. <i>albus dulcis</i>	42
Figura 12. <i>Sechium edule</i> var. <i>albus levis</i>	42
Figura 13. <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum minor</i>	43
Figura 14. <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum conus</i>	43
Figura 15. <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum levis</i>	44
Figura 16. <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum xalapensis</i>	44
Figura 17. <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum spinosum</i>	45
Figura 18. <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum máxima</i>	45
Figura 19. <i>Sechium edule</i> var. <i>virens levis</i>	46
Figura 20. Material biológico deshidratado y molido.	49
Figura 21. Cromatopla en capa fina para la identificación de Flavonoides.	66
Figura 22. Cromatopla en capa fina para la identificación de Fenoles.	67
Figura 23. Cromatopla en capa fina para identificación de cucurbitacinas.	69

Figura 24. Porcentaje de inhibición de DPPH, del tratamiento con <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> (n=5 ± desviación estándar). *Diferencia significativa (Tukey p<0.05).	85
Figura 25. Porcentaje de inhibición de DPPH, del tratamiento con <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 (n=5 ± desviación estándar). *Diferencia significativa (Tukey p<0.05).	86
Figura 26. Porcentaje de inhibición de DPPH, del tratamiento con <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 (n=5 ± desviación estándar). *Diferencia significativa (Tukey p<0.05).	87
Figura 27. Efecto de los extractos de <i>Sechium</i> sobre la superoxido dismutasa de ratones tratados con CCl ₄	90
Figura 28. Efecto de los extractos de <i>Sechium</i> sobre la catalasa de ratones tratados con CCl ₄	91
Figura 29. Efecto de los extractos de <i>Sechium</i> sobre la glutatión peroxidasa de ratones tratados con CCl ₄	92

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas contienen sustancias que actúan como mecanismo de defensa contra agentes patógenos que le permiten sobrevivir en el entorno donde se desarrollan, a estos se les conoce como metabolitos secundarios. Estos se clasifican en compuestos nitrogenados (alcaloides), terpenos y compuestos fenólicos, los cuales confieren beneficios a la salud.

Procesos metabólicos como la respiración, la fotosíntesis, la glicolisis entre otros, generan de forma natural la producción de radicales libres. Al existir un desequilibrio en producción de radicales y la eliminación de éstos mediante antioxidantes, se genera estrés oxidativo, el cual trae consigo la aparición de enfermedades crónicas degenerativas.

Está comprobado que los compuestos fenólicos tienen una alta capacidad antioxidante, muchos de estos compuestos han sido identificados en los diversos grupos varietales descritos para *Sechium edule*, por ello el consumo de éste, podría ser una opción benéfica ante el daño celular provocado por estrés oxidativo.

En este estudio, se analiza el efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo* del fruto *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%), *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)), así como la identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos.

1.1 Planteamiento del Problema

Sechium edule es la especie más estudiada en el género *Sechium* en la medicina tradicional se ha reportado su actividad como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión, enfermedades relacionadas con estrés oxidativo e inflamación. También se ha reportado el uso de chayote en la inflamación intestinal e inflamación cutánea y en la cauterización de úlceras, además, se han identificado las propiedades cardiovasculares y anti-inflamatorias de las hojas y frutos. En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha comprobado la actividad antioxidante de *Sechium*

edule grupo varietal *nigrum spinosum* (Gavia, 2020), mismo genotipo utilizado en ésta investigación.

Debido a que se desconoce el efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo* del genotipo *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290, así como, si al mezclarlo con *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* se potencializa dicho efecto, en este estudio se planteó la realización del perfil fitoquímico por medio de análisis preliminares, cromatografía de capa fina, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) así como el análisis del efecto antioxidante de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* 80%: *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 20%).

1.2 Justificación

El estrés oxidativo se genera a partir de un desequilibrio entre los radicales libres producidos de forma natural en procesos metabólicos como la respiración, y los antioxidantes endógenos que contrarrestan este desbalance. La ingesta de antioxidantes dietéticos, prevé el daño celular que origina el estrés oxidativo.

Existen reportes de las propiedades antioxidantes de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*; si en este estudio se obtiene un incremento de éste efecto en el genotipo *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y/o la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*: *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290), se podrá referenciar éstos genotipos como tratamiento viable ante enfermedades derivadas del estrés oxidativo (enfermedades degenerativas), aportando sino una cura, una mejor calidad de vida a personas que las padezcan.

2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el contenido de metabolitos secundarios y el efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo* de dos genotipos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw.

2.1 Objetivos particulares

- Identificar el contenido de metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)).
- Evaluar el efecto antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de *Sechium edule* grupo varietal *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)).
- Evaluar la dosis letal media de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)).
- Evaluar el efecto antioxidante *in vivo* del extracto metanólico de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)).

3 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Metabolitos Secundarios (MS)

Las plantas producen sustancias que no están involucradas directamente con el metabolismo primario, sin embargo, toman sus precursores de la biosíntesis de éste. A estas sustancias se les denomina metabolitos secundarios, recientemente renombrados metabolitos especializados (De la Cruz *et al.*, 2012). Se estima la existencia de 200,000 metabolitos secundarios (Cadena *et al.*, 2020).

Los metabolitos secundarios (moléculas orgánicas), funcionan en una correlación planta- medio ambiente, destacando su uso como método de defensa ante depredadores y patógenos (Sepúlveda *et al.*, 2018).

Tienen importancia en diversas áreas, tales como, la medicina, uso cosmético, industria alimentaria y farmacéutica (Juárez, 2018), y se les confieren propiedades antibacterianas, analgésicas, fungicidas, antioxidantes y antitumorales (Hernández, 2018).

Kuklinsky (2003), describe tres rutas que dan origen a los metabolitos secundarios

- Ruta del ácido Shikimiko
- Ruta del acetato-malonato (ruta de los policétidos).
- Ruta de acetato-mevalonato ruta del ácido mevalonico o ruta de la condensación isoprenica.

Así, los diversos metabolitos secundarios pueden derivarse de más de una ruta metabólica

- ❖ Ácidos fenólicos: Ruta de ácido shikimico
- ❖ Taninos: Ruta del ácido shikimiko
- ❖ Flavonoides: Ruta del ácido shikímico y ruta del ácido mevalonico
- ❖ Antraquinonas: Ruta de policétidos
- ❖ Antibióticos: Ruta de policétidos
- ❖ Lignanos y cumarinas: Ruta del ácido shikimico
- ❖ Esteroides: Ruta del ácido mevalónico
- ❖ Terpenos: Ruta del ácido mevalonico

Espinosa *et al.*, (2016), señala que los terpenos, derivan de 2 rutas metabólicas, la primera, como se menciona anteriormente, es la vía del mevalonato y la segunda es la vía del metileritrol fosfato (MEP), la cual fue identificada en bacterias.

La mayor parte de la energía, nitrógeno y carbono, proceden de moléculas que tienen un vínculo común con más células, indispensables para un funcionamiento adecuado en los organismos. Tales moléculas son: azúcares, nucleótidos, lípidos y aminoácidos, los cuales existen en las plantas realizando funciones específicas pertenecientes al metabolismo primario como la fotosíntesis y la glucólisis, sin embargo, una parte del carbono asimilado y de energía, son destinados a la síntesis de productos secundarios (Figura 1) (Ávalos, 2009).

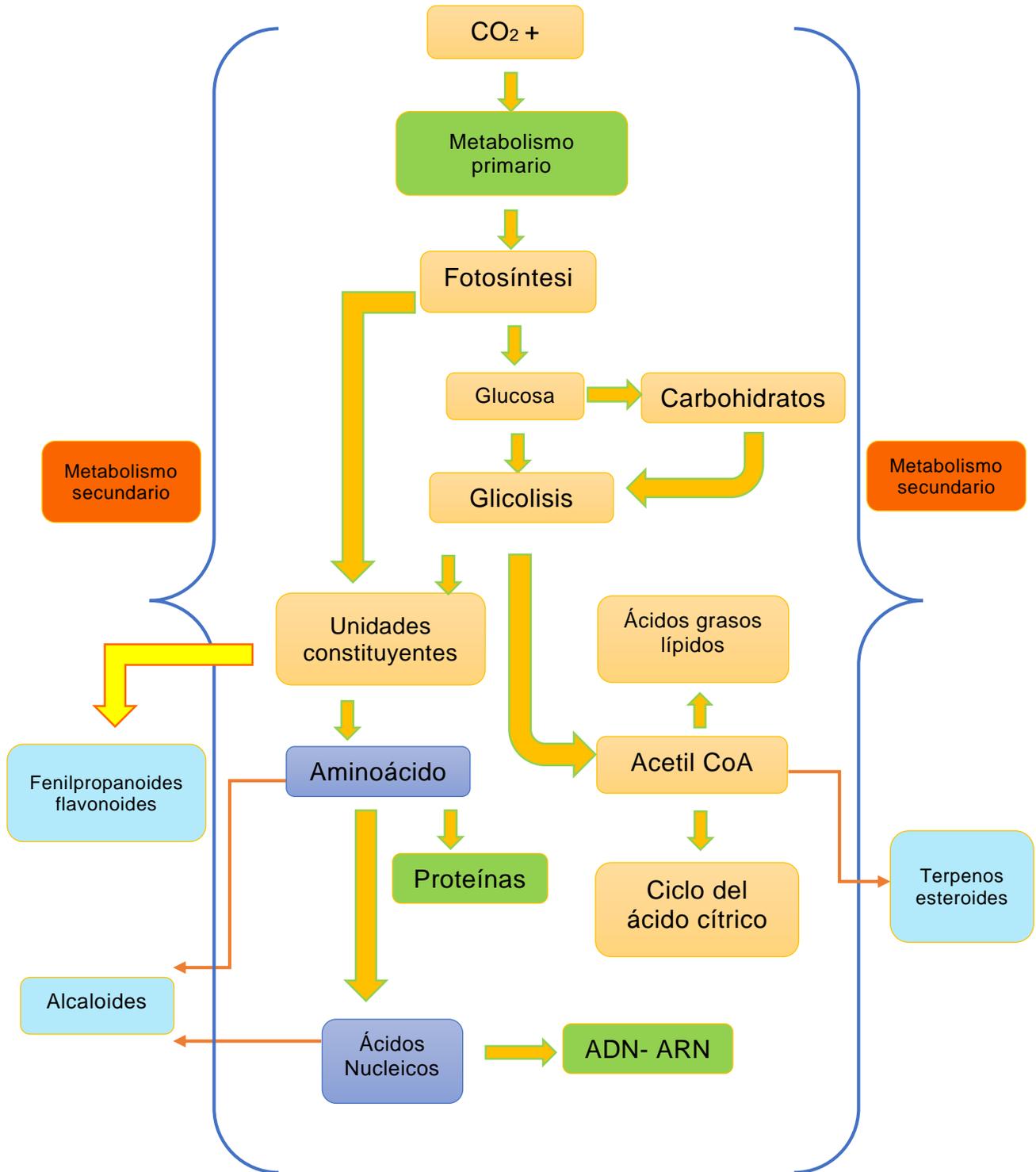


Figura 1. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas (Tomado y modificado de Ávalos *et al.*, 2009).

Los metabolitos secundarios dependen de los ciclos del metabolismo primario de la planta, por lo que resulta complejo establecer la barrera entre ambos ya que existen una gran variedad de tipos estructurales y pueden sintetizarse a partir de una sola ruta y son denominados puros o los metabolitos secundarios mixtos que provienen de más de una ruta. Uno de los precursores clave en la biosíntesis es la acetil-coenzima A que sirve como precursor de los poliacetatos y los terpenos (mediante el ácido mevalónico) y pueden formar parte de estructuras mixtas. Una ruta también importante es la del ácido shikímico ya que resulta clave en la síntesis de compuestos aromáticos, por otro lado, los compuestos nitrogenados, en general provienen de diferentes aminoácidos alifáticos o aromáticos para formar entre otros a los alcaloides (Figura 2) (Aguñiga, 2013).

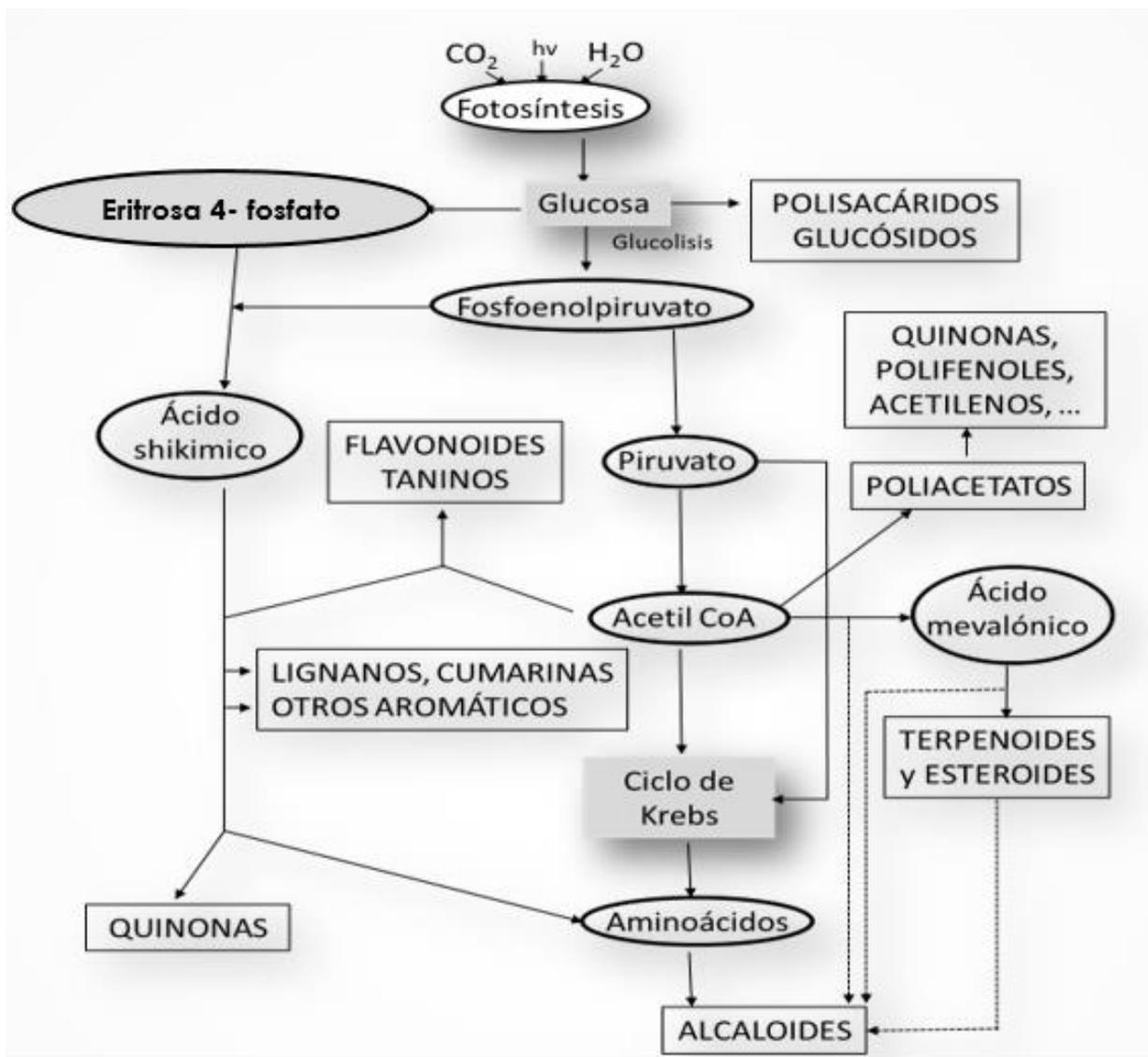


Figura 2. Origen biosintético de los metabolitos secundarios.
(Tomado de Aguiñiga, 2013)

3.2 Clasificación de los metabolitos secundarios

Sánchez & Perdomo (2018), Menciona que los metabolitos secundarios se dividen en cinco grupos, los cuales son: fenilpropanos, acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides.

Carmen & Chávez (2020), comentan que, según el interés comercial, los metabolitos pueden separarse en: terpenos, compuestos fenólicos (fenilpropanoides/ polifenoles) y compuestos de nitrógeno (alcaloides).

En este trabajo, tomaremos como referencia la clasificación citada por Carmen & Chávez (2020) englobando dentro de los compuestos fenólicos a los flavonoides y ácidos fenólicos.

Terpenos. Esta familia es la mas extensa con 76,000 productos diversos reportados. (Rudolf, 2020).

Provenientes del isopentenil difosfato (IPP) o de su isómero de doble enlace pirofosfato de dimetilalilo (DMAP) (Espinosa *et al.*, 2016).

Los terpenoides se derivan de isoisoprenos (C5), generalmente de pirofosfato, isopentenil y dimetilalil pirofosfato. Según la cantidad de isoisoprenos ligados, pueden subdividirse en hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40).

Su función en las plantas es principalmente de defensa. Algunos terpenos que destacan son: citronela, mentol y piretrinas (monoterpenos); de igual manera el capsidiol (sesquiterpeno); casbeno (diterpeno) y las cucurbitacinas (triterpenos). (Aguñiga, 2013).



Figura 3. Estructura química de los precursores de terpenos. (Tomado de Espinosa *et al.*, 2016).

Alcaloides. Familia de alrededor de 15, 000 compuestos. Se caracterizan por tener por lo menos un átomo de nitrógeno, tener actividad biológica, ser solubles en agua y formar sales (Guzmán, 2018).

Se originan principalmente de lisina, fenilalanina, triptófano, arginina y ornitina (aminoácidos), aunque también pueden tener su origen del acetato y purinas (Aguñiga, 2013).

De acuerdo a su composición elemental se dividen en: ternarios (no oxigenados) y en cuaternarios (oxigenados).

Respecto a su ruta de biosíntesis y su estructura molecular se clasifican en alcaloides verdaderos, se forman a raíz de un aminoácido, cuentan con un nitrógeno intracíclico, forman sales y son básicos (Guzmán, 2018). Según su ubicación del nitrógeno se clasifican en: pirrolidina, quinolina, piperidina isoquinolina e indol entre otros (Figura 2) (Sánchez, 2018).

Los protoalcaloides son aminas sencillas, su nitrógeno es extracíclico debido a que forma parte de una cadena lateral.

Los pseudoalcaloides, no derivan directamente de un aminoácido, sino que, toman sus átomos de hidrogeno a raíz de trasminar únicamente el nitrógeno de un aminoácido (Sánchez, 2018), en casos conocidos vienen de isoprenoides, por lo que se les llama alcaloides terpénicos (Guzmán, 2018).

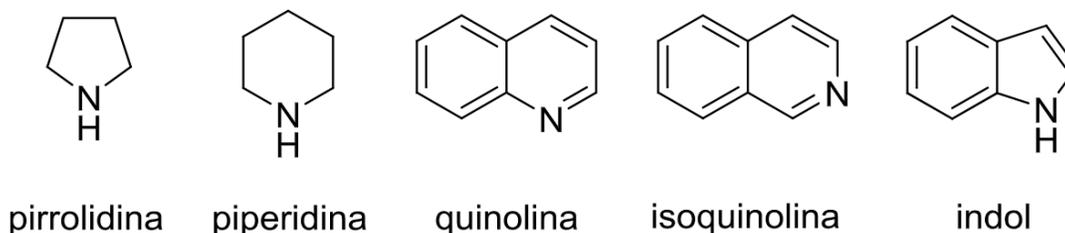


Figura 4. Heterociclos presentes en alcaloides. (Tomado de Sánchez, 2018).

Compuestos fenólicos. Grupo sumamente amplio que se subdivide en diversas clases dependiendo la cantidad de anillos fenólicos y su estructura química. Entre estas divisiones tenemos ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonoides, estilbenos y lignanos (De la Rosa *et al.*, 2016).

Pese a la diversidad de polifenoles, dentro de éstos, destacan los ácidos fenólicos, los cuales se componen de dos marcos de carbono, uno con estructuras hidroxicinámicas, que se distinguen por ser aromáticos con una estructura C6-C3, dentro de los más conocidos son el ácido sinápico, ácido caféico, *p*-cumárico y ácido ferúlico (Figura 5). El otro marco lo constituyen los hidroxibenzoicos, éstos cuentan con cadena C6- C1, y sobresalen el ácido gálico, ácido vanílico, *p*- hidroxibenzoico, ácido siríngico y el protocatecuíco (Espinosa, 2020).

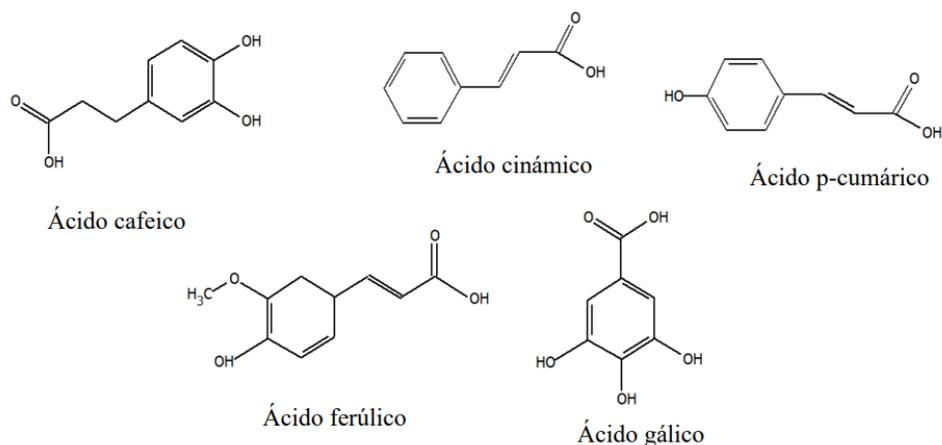
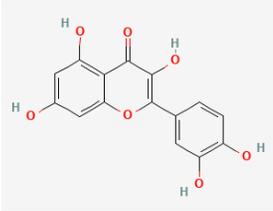
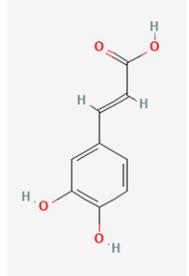
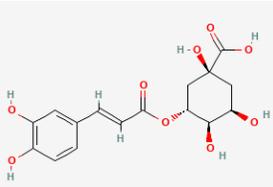


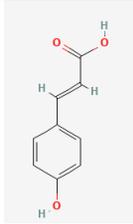
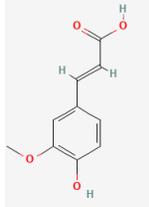
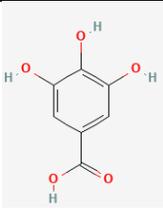
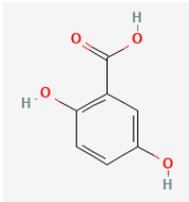
Figura 5. Estructura química de ácidos fenólicos (Tomado de Espinosa, 2020).

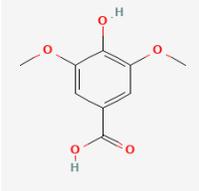
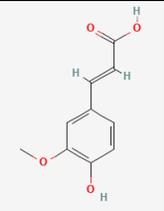
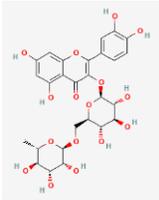
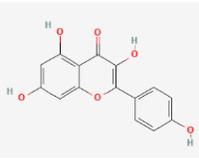
Los compuestos fenólicos se encuentran en una gran diversidad de plantas y presentan diferentes funciones (Cuadro 1), la lignina funciona como polímero estructural, los carotenoides como atrayentes, los flavonoides tienen la cualidad de funcionar como pantalla UV, atrayentes y compuestos señalizadores, el ácido salicílico también funciona como señalizador.

Las propiedades antioxidantes de un gran número de plantas que contienen compuestos fenólicos, es vital para reducir enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares entre otras (Lin *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Compuestos Fenólicos presentes en plantas y sus propiedades biológicas.

Cita	Compuesto fenólico	Estructura química	Principal grupo al que pertenece	Fuente natural	Propiedades biológicas
(Sato& Mukai, 2020)	Quercetina		Flavonoides	Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	Antioxidantes, antiinflamatorios y antifibróticos
(Kooti & Daraei, 2017)	Ácido caféico		Fenoles	Apio (<i>Apium graveolens</i> L.)	Antioxidante
(Joly <i>et al.</i> , 2020)	Ácido clorogénico		Ácidos fenólicos	Flores comestibles (Torenina)	Antioxidantes

Cita	Compuesto fenólico	Estructura química	Principal grupo al que pertenece	Fuente natural	Propiedades biológicas
(Song <i>et al.</i> , 2020)	Ácido p-cumarico		Ácidos fenólicos	Comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	Antioxidante y antibacterial
(Vijayalaxmi <i>et al.</i> , 2015)	Ácido ferúlico		Ácidos fenólicos	Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Antioxidante
(Domínguez <i>et al.</i> , 2020)	Ácido gálico		Ácidos fenólicos	Café cereza (<i>Coffea arabica</i> L.)	Antioxidante
(Siddiqi <i>et al.</i> , 2020)	Ácido gentísico		Ácidos fenólicos	Sauco (<i>Sambucus</i> L.)	Antioxidante

Cita	Compuesto fenólico	Estructura química	Principal grupo al que pertenece	Fuente natural	Propiedades biológicas
(Choi, 2019)	Ácido Siringico		Ácidos fenólicos	Dátiles (<i>Phoenix dactylifera L.</i>)	Antioxidantes
(BenSaad <i>et al.</i> , 2017)	Ácido ferúlico		Ácidos Fenólicos	Garbanzo (<i>Cicer arietinum L.</i>)	Antioxidante
(Barbosa <i>et al.</i> , 2018)	Rutina		Flavonoides	Jitomate (<i>Solanum lycopersicum L.</i>)	Antioxidante
(Sarker & oba, 2020)	Kaempferol		Flavonoides	Cebolla (<i>Allium capa L.</i>)	Anticancerígeno

3.3 Antioxidantes

A través de la evolución, los organismos desarrollaron un sistema de defensa antioxidante que les funciona para poder neutralizar a las especies reactivas de cualquier elemento. La función de un antioxidante es retrasar y/o prevenir la oxidación de un sustrato oxidante, tales como lípidos, proteínas, DNA, y otras moléculas. Dicho sistema consta de elementos enzimáticos y no enzimáticos, que ayudan a proteger las células (Corrales & Muñoz, 2012).

A nivel celular y en tejidos, se generan radicales libres y metabolitos procedentes de radicales libres; éstos últimos son prooxidantes y dan origen a nuevos radicales libres. Se requiere de un equilibrio entre su producción y su destrucción, el cual puede darse a través de antioxidantes hidrofílicas o hidrofóbicas que actúan sobre los radicales libres para otorgarle un electrón, volviéndolo menos reactivo y menos dañino que antes de recibir el electrón neutralizante (Mora *et al.*, 2019).

El cuerpo a través del metabolismo, produce antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los antioxidantes endógenos con mayor importancia se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), ésta actúa como catalizador para convertir el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. La catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) funcionan como neutralizadores del peróxido de hidrógeno al convertirlo en agua y oxígeno.

En la primera línea de defensa, hay sustancias no enzimáticas antioxidantes presentes en el plasma sanguíneo, tales como: ferritina, transferrina, ceruloplasmina y albúmina, éstas se unen a iones de metales de transición como cobre y hierro evitan la formación de más especies reactivas.

Ante los daños causados por EROs y radicales libres, los antioxidantes enzimáticos o no son capaces de prevenir o reparar proteínas y el ADN dañado, así como lípidos que se han oxidado y evitar que se continúe propagando radicales peróxido de lípidos, además de arreglar moléculas con daño.

La vitamina E, vitamina C, carotenoides, polifenoles (ácidos fenólicos, lignanos y estibenos) y ciertos minerales como cobre (Cu), zinc (Zn), Selenio (Se) y manganeso (Mn), son antioxidantes dietéticos o exógenos, los cuales pueden intervenir en la función de antioxidantes endógenos.

Los antioxidantes exógenos se encuentran presentes en verduras, frutas, frutos secos, cereales, jugos, café y té (Mirończuk, 2018).

3.4 Estrés Oxidativo

El oxígeno es una molécula imprescindible para la vida, aunque por su alta reactividad puede actuar como un elemento tóxico. Ante la alteración en el equilibrio de las sustancias prooxidantes y antioxidantes, donde los primeros superan la cantidad de los segundos, se genera el estrés oxidativo, es decir, se da un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, dando como resultado la formación de radicales libres que se encuentran implicados al daño celular (Viada, 2017).

El tejido nervioso es susceptible ante los prooxidantes debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, alta concentración de hierro y bajo contenido de enzimas antioxidantes. Está demostrado como el estrés oxidativo se asocia de manera directa con el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras enfermedades del sistema nervioso (Rios, 2003).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se clasifican en dos grupos: radicales libres (moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y que dan reactividad a la molécula) y no radicales (cuando dos radicales libres comparten sus electrones no apareados) (Gómez, 2019).

Los principales ROS que son de importancia fisiológica son el anión superóxido (O_2^-), El radical hidroxilo (OH^\cdot), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Gómez, 2019), el oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) (Viada, 2017).

Según Viada (2017), diversas investigaciones en pacientes con hipertensión arterial esencial manifestaron estrés oxidativo, con incremento de la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de peroxidación lipídica y reducción de las actividades antioxidantes de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) en sangre total.

Catalasa. Puede actuar de forma catalítica y peroxidativa ante la presencia elevada de peróxido de hidrógeno.

Superóxido dismutasa. Ante la desproporción de oxígeno, la SOD degrada al anión superóxido, gracias a sus cofactores cobre, zinc, hierro y manganeso.

Glutatión peroxidasa. Es capaz de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno a agua. De manera endógena o exógena, se puede contrarrestar efectos nocivos ocasionados por radicales libres a menos que haya un mal funcionamiento celular que dé pie al estrés oxidativo (Mora, 2019).

El anión superóxido (O_2^-) es un radical formado mediante la reducción de oxígeno con un electrón. Superóxido dismutasa funciona como catalizador en la reacción (Cu / Zn-SOD o Mn-SOD), donde un electrón se une con el radical superóxido, formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La reducción del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua involucra a la enzima catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (figura 6).

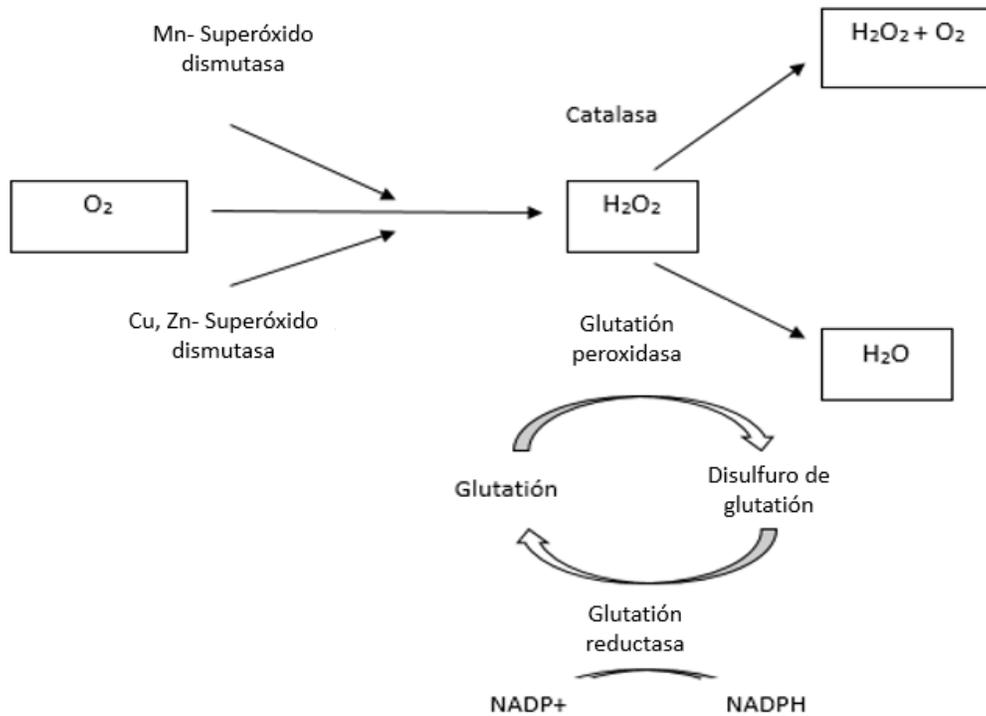
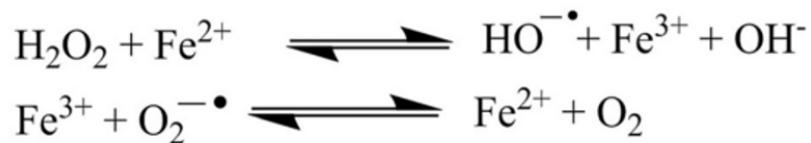


Figura 6. Esquema general de reducción del anión radical superóxido a través de los sistemas enzimáticos endógenos antioxidantes (Tomado y modificado de Zuluaga *et al.*, 2012)

La reacción de Fenton se lleva a cabo gracias a la catalización de metales de transición, el peróxido de hidrogeno se convierte en un radical hidroxilo (HO^\bullet), el cual interactúa en cadenas de radicales libres (Figura 7).

Reacción de Fenton



Reacción de Haber- Weiss



Figura 7. Generación del radical hidroxilo a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Tomado de Rosado *et al.*, 2018).

Gracias al grupo tiol presente en la cisteína, el glutatión reducido (GSH), reacciona con radicales libres derivados de proteínas y con otras moléculas, regresándolas a su forma reducida. El peróxido de hidrogeno es reducido por el glutatión reducido en la reacción donde el peróxido de hidrogeno actúa como catalizador. Los tioles de las proteínas son oxidadas por el glutatión oxidado. La glutatión reductasa_(GR) utiliza hidrogeno NADPH, que se oxida a NADP + para reducir el disulfuro de glutatión. En la primera oxidación de la vía de pentosas fosfato (PPP) se genera NADPH. La glucosa -6- fosfato deshidrogenasa actúa sobre glucosa-6- fosfato, dando como producto ribulosa 5- fosfato mientras dos moléculas de NADP+ se reducen a NADPH (Figura 6 y figura 8). La vitamina C y el ácido α -lipoico regeneran GSSG (glutatión oxidado) en GSH (glutatión reducido). La vitamina E dona un hidrogeno, eliminando peróxidos de lípidos y finalizando cadenas de reacciones oxidativas. La vitamina E no oxidada, puede reciclarse a través de glutatión y vitamina C (Mirończuk *et. al.*,2018).

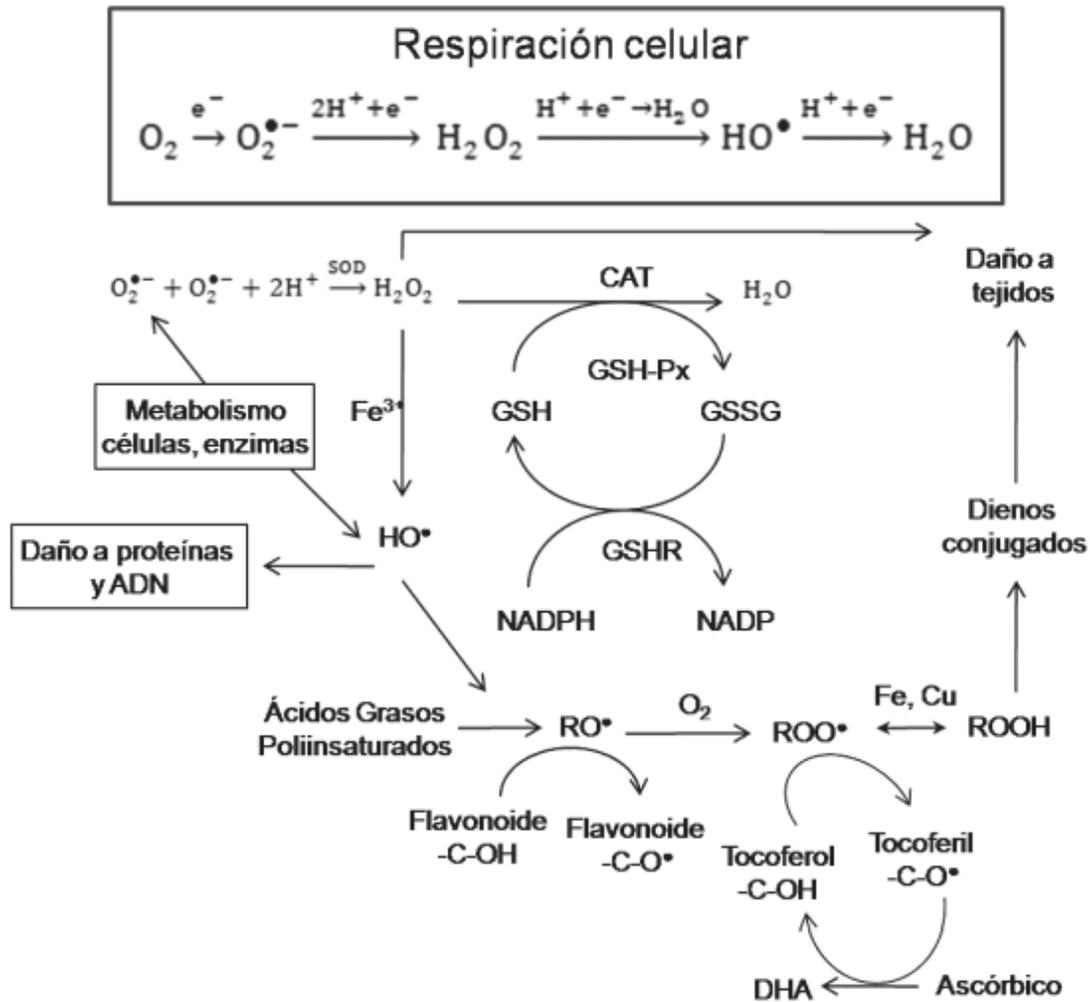


Figura 8. Resumen de las vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos. $O_2^{\bullet -}$: radical anión superóxido, HO^{\bullet} : radical hidroxilo, RO^{\bullet} : radical alquilo, ROO^{\bullet} : radical peróxido, $ROOH$: hidroperóxido, Fe: hierro, Cu: cobre, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, GSH-Px: glutatión peroxidasa, GSHR: glutatión reductasa, NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, CAT: catalasa, SOD: Superóxido Dismutasa. (Tomado de Lodoño, 2012).

3.5 Alimentos funcionales

El consumo de vegetales, frutas, nueces, pescado, aceite de olivo, hierbas, entre otros; son catalogados como alimentos funcionales. Estos son asociados al beneficio de la salud debido a su contenido de polifenoles, terpenoides, flavonoides, esteroides, pigmentos y ácidos grasos insaturados, los cuales tienen una función nutracéutica (Alkhatib *et al.*, 2017).

La alimentación basada en dicha dieta, ayuda a la modulación del estrés oxidativo e inflamatorio, previniendo enfermedades metabólicas, microvasculares, desbalance del colesterol, glucosa elevada y las relacionadas con inflamación y oxidación (Serafini & Peluso, 2016).

García (2001), menciona a la vitamina E como un antioxidante pese a que su mecanismo celular no está completamente esclarecido. Así mismo atribuye al α -tocoferol, un importante retenedor de radicales de peróxido, oxígeno singlete y otras especies reactivas del oxígeno especialmente en fases lipídicas biológicas de membranas y lipoproteínas; efecto importante en tejido nervioso y muscular. De igual manera describe como los aceites de *Glicine max L.* (soya), *Gossipium barbadense L.* (algodón), *Zea mayz L.* (maíz), contienen vitamina E, y estudios en animales de laboratorio tratados con soya, demostraron que su efecto antioxidante ayuda a la prevención de mutaciones celulares. También hace un énfasis en como el aceite de palma *Roystonea regia* gracias a sus antioxidantes naturales como vitamina E, tocoferoles y tricotrienoles actúan contra el envejecimiento de las células, aterosclerosis y el cáncer.

Otras plantas con efecto antioxidante son *Psidium guajava L.* (guayaba), por su contenido de ácido ascórbico (vitamina C), *Musa paradisiaca L.* (plátano), por su concentración polihidroxifenoles y taninos, *Arachys hypogea* (cacahuate), semilla de uva negra (*Vitis vinífera L.*), corteza de pino (*Pinus cubensis G.*), *Theobroma cacao L.* (cacao), *Cinnamomum verum J. Presl* (canela), extracto de corteza de mango (*Mangifera indica L.*), *Rosmarinus officinalis L.* (romero) y el consumo diario del fruto

de *Malus sivestris M.* (manzana) son también ricos en antioxidantes (García *et al.*, 2001).

Entre las enfermedades que se ven contrarrestadas gracias al efecto antioxidante que posee *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, es el síndrome metabólico, donde luego de tres meses de tratamiento, los pacientes tuvieron un aumento significativo de superóxido dismutasa (SOD), y de telomerasa lo que manifestó una mejora en el grupo de los 75 adultos mayores tratadas con chayote (Gavia, 2020).

3.6 Plantas Medicinales

El hombre desde tiempos ancestrales ha ido creando y evolucionando métodos contra enfermedades para conllevar una mejor calidad de vida (Escalona, 2015).

Su relación con las plantas, ha sido de suma importancia no solo para el sustento de alimento, vestido y herramientas de construcción y para la agricultura, sino que las plantas han sido la fuente de cura a enfermedades y lesiones. Existen 50,000 plantas medicinales reportadas y pese al actual uso de las plantas, la ciencia ha conseguido sintetizar químicamente los compuestos activos de estas fuentes naturales con el propósito de ofrecer al público las dosis adecuadas de una forma más accesible (Maldonado *et al.*, 2020).

La herbolaria tiene como base el uso de plantas medicinales en lugar de fármacos, o bien el uso de ambos a la vez. Se utilizan extractos de planta preparados de diferentes maneras con la finalidad de mejorar la salud. Este tipo de sanación ha permitido la entrada de fitofármacos, que tienen la ventaja de ser menos costosos y menos tóxicos que medicina sintética. Pese a que se consideran opuestos unos de los otros, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, indica que el 67% tiene su origen en la naturaleza, donde un 25% tiene como origen las plantas (Gallegos, 2016).

La OMS plantea a las hierbas, preparaciones con hierbas, productos herbarios terminados, incluso el material de herbario, como medicamentos herbarios. Estos

tienen la cualidad de tener partes de plantas, material vegetal o la mezcla de éstos como principios activos.

Sechium edule, es una especie de uso etnofarmacobiológico, tiene la capacidad de contrarrestar daños ocasionados por bacterias en el organismo humano. Cadena (2013) describe que el chayote ha sido utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades diuréticas, cardiovasculares, antiinflamatorias, contra cálculos renales, arterioesclerosis, antihipertensivas y antioxidantes; todas estas propiedades se han validado a través de estudios farmacológicos. Cui (2021), destaca a *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Como una verdura con propiedades alimenticias y medicinales.

3.7 Género *Sechium* spp.

El Género *Sechium* spp., pertenece a la familia Cucurbitaceae. Se considera que el término chayote es una modificación de los vocablos náhuatl “huiztayotl” y “chayotl”, que quiere decir “calabaza espinosa”. Es una especie neo tropical endémica de México, por lo que su diversidad domesticada y silvestre, se encuentra en este país. Por años se pensó que dentro de éste género solo existía la especie *Sechium P. Brown*, pero actualmente, gracias a diversos trabajos de investigación se han identificado ocho especies silvestres (*S. compositum*, *S. chinantlense*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, y *S. vilosum*) característicos por su sabor amargo y 2 domesticadas (*S. edule* y *S. tacaco*) con un sabor neutro llegando a ser ligeramente dulce (Figura 9). Estas especies se encuentran distribuidas desde México hasta Panamá (Aguñiga, 2013).

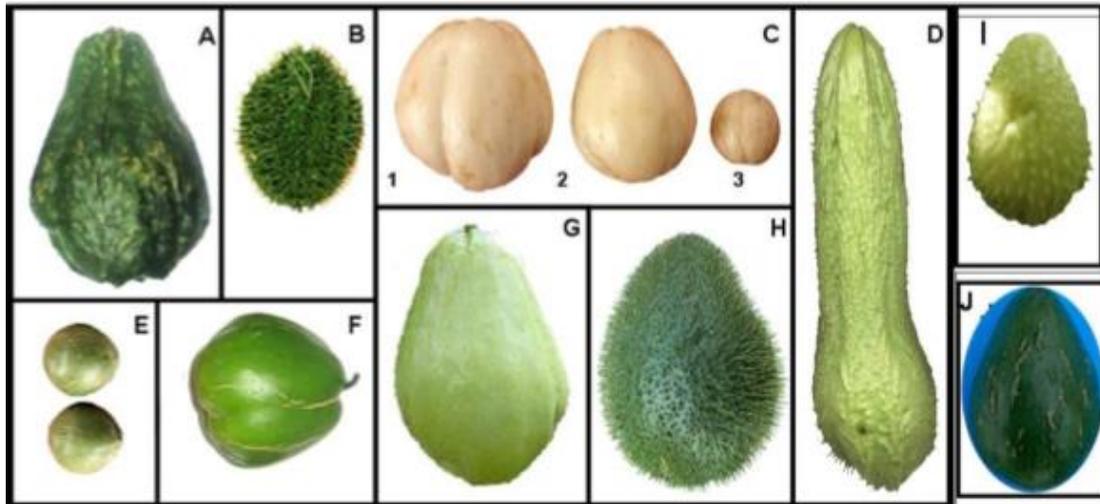


Figura 9. A) *nigrum xalapensis*, B) *amarus silvestrys*, C) 1: *albus levis*, 2: *albus dulcis*, 3: *albus minor*, D) *nigrum máxima*, E) *albus minor*, F) *nigrum levis*, G) *virens levis*, H) *nigrum spinosum*, I) *albus spinosum*, J) *nigrum conus*. (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

3.7.1 *Sechium edule* (Jacq.) Sw.

Aunque el chayote es una especie mexicana, Cadena (2010) señala a los españoles como los probables causantes de la introducción de este fruto a las Islas de Cuba, Jamaica y Puerto Rico, debido a su valor alimenticio y su adaptabilidad en diversos climas. Se considera que, en el año 1898, se propago a localidades de California, Louisiana, Hawaii y Filipinas y un año después a La Florida, con la intención de que creciera en un lugar con condiciones semejantes a las del Caribe.

El uso principal del chayote, es alimenticio, pese a que se puede aprovechar toda la planta (raíz, hojas y puntas tiernas de las guías), se consume principalmente en su madurez hortícola debido a su sabor y consistencia. (Cadena, 2018).

Esta planta trepadora que crece gracias a la polinización cruzada, tiene una gran variación morfológica, que en la región central de Veracruz han clasificado en 3 grupos: blancos, verdes y espinosos, haciendo hincapié en que los 2 primeros son generalmente lisos. El chayote se describe como una baya de forma piriforme u obovada. Se puede encontrar en diferentes tamaños y puede tener o no algunos

surcos a lo largo del fruto (Flores, 1989). Su piel va de los tonos blanquecinos, pasando por verdes tenues hasta verde oscuro, puede de poseer espinas o ser glabra. En su interior tiene una sola semilla (Avendaño, 2010).

Dentro de *Sechium edule* (Jacq.) Sw, se han establecido los siguientes grupos varietales de acuerdo a sus características morfoestructural, fisiológica, química y genética: *Sechium edule* grupo varietal *albus minor*, *albus dulcis*, *albus levis*, *nigrum minor*, *nigrum conus*, *nigrum levis*, *nigrum xalapensis*, *nigrum spinosum*, *albus spinosum*, *nigrum maxima* y *virens levis* (Aguñiga, 2013).

3.7.2 Descripción de grupos varietales

Sechium edule var. *albus minor*. (Figura 10), De color crema, este fruto llega a tener de 3.2 a 4.1cm de largo 3.3 cm de ancho y de 2.7 a 3.2 cm de grosor. Es totalmente glabro y sin presencia de costillas ni hendidura basal. Pedúnculo verde claro pubescente. Mesocarpio crema de sabor ligeramente dulce (8.0 °Bx) con fibra muy adherida (Avendaño, 2010).



Figura 10. *Sechium edule* var. *albus minor* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008).

Sechium edule var. *albus dulcis*. (Figura 11), Fruto piriforme amarillo crema, de 8.0 a 15.3 cm de longitud, de 4.8 a 8.8 cm de ancho y de 3.8 a 7.3 cm de grosor; glabro, llega a tener 5 costillas tenues con poca profundidad en su base. Pedúnculo glabro verde claro con estriado verde amarillo. Mesocarpio de color blanco crema, de sabor medianamente dulce (7.2 °Bx), con presencia de fibra medianamente adherida al mesocarpio (Avendaño, 2010).



Figura 11. *Sechium edule* var. *albus dulcis* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008).

Sechium edule var. *albus levis*. (Figura 12), Fruto piriforme de 6.1 a 16.6 cm de longitud, de 5.3 a 10.4 cm ancho y de 4.6 a 8.7 cm de grosor; totalmente glabro sin costillas marcadas y hendidura basal muy visible. Su color es amarillo crema con estrías verde amarillo, un pedúnculo de un verde tenue y poca pubescencia. Mesocarpio blanco a crema de sabor ligeramente dulce (7.6 °Bx) con presencia de fibra adherida. (Avendaño, 2010).



Figura 12. *Sechium edule* var. *albus levis* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

Sechium edule var. *nigrum minor*. (Figura 13), su color va de un verde claro a oscuro. Es obovado y poco piriforme, puede tener de 4.5 a 13.2cm de longitud y de 3.1 a 6.9 cm de ancho y de 2.8 a 6.2 cm de grosor; totalmente glabro, sin costillas ni hendidura basal. Pedúnculo verde claro de con poca pubescencia. Mesocarpio verde claro con sabor medianamente dulce y fibra medianamente adherida al mismo (Avendaño, 2010).



Figura 13. *Sechium edule* var. *nigrum minor* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

Sechium edule var. *nigrum conus*. (Figura 14), Fruto en modo de cono que va de 5.4 a 7.1cm de largo, hasta 5cm de ancho y un grosor de 3 a 4.6cm. sin costillas ni hendiduras en la base. Pedúnculo verde oscuro con baja pubescencia. Mesocarpio verde oscuro y sabor medianamente dulce (7.2°Bx) (Avendaño, 2010).



Figura 14. *Sechium edule* var. *nigrum conus* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

Sechium edule var. *nigrum levis*. (Figura 15), Fruto verde claro a verde oscuro, piriforme, con una longitud de 7.1 a 9.7 cm, puede tener de 4.6 a 7.8 cm de ancho y un grosor hasta de 7.0 cm; no tiene costillas ni hendiduras en su base. Pedúnculo verde oscuro ligera pubescencia. Mesocarpio verde claro y con sabor neutro (5.7°Bx) (Avendaño, 2010).



Figura 15. *Sechium edule* var. *nigrum levis* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

Sechium edule var. *nigrum xalapensis*. (Figura 16), Fruto piriforme verde, de 5.5 a 26.6 cm de largo, de 4.4 a 18 cm de ancho y un grosor de 4.0 a 10.7 cm. Tiene cinco costillas poco marcadas y hendidura basal pronunciada. Pedúnculo medianamente pubescente. (Avendaño, 2010).



Figura 16. *Sechium edule* var. *nigrum xalapensis* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

Sechium edule var. *nigrum spinosum*. (Figura 17). De tono verde claro a oscuro y forma piriforme, llega a tener de 5.8 a 17.1 cm de largo, un ancho de 5 a 12.2cm y un grosor de 3.6 hasta 9.7cm. Abundantes espinas, con 5 costillas poco marcadas y una pronunciada hendidura en la base. Poca pubescencia en el pedúnculo. Mesocarpio de tono verde tenue a oscuro, un sabor neutro con 6.43°Bx que aporta un dulzor. Fibra pegada al mesocarpio (Avendaño, 2010).



Figura 17. *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

Sechium edule var. *nigrum máxima*. (Figura 18), Fruto piriforme de color verde claro, tiene de 12.1 a 33.7 cm generando un promedio de 19.99 cm de largo, de 8.1 a 11.3 cm de ancho y un grosor de 6.3 a 8.8 cm. Glabro, con 5 costillas, en su base hendiduras muy pronunciadas. Pedúnculo verde tenue, con poca pubescencia, mesocarpio verde claro con un sabor neutro. (Avendaño, 2010).



Figura 18. *Sechium edule* var. *nigrum máxima* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

Sechium edule var. *virens levis*. (Figura 19), Fruto que va de 9.30 a 18.30 cm de largo, de 6.0 a 11.40 cm de ancho, y un grosor de 5.40 a 9.60 cm; tiene una forma piriforme y es de color verde claro, tiene cinco costillas poco pronunciadas y en su base una hendidura poco profunda. Su pedúnculo es de tono verde claro con muy poca pubescencia. Mesocarpio verde claro con un sabor neutro y fibra poco adherida al mesocarpio. (Avendaño, 2010).



Figura 19. *Sechium edule* var. *virens levis* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. 2008)

La caracterización bioquímica de variedades domesticadas y parientes silvestres de *Sechium edule* (Jacq.) Sw, se ha realizado por Cadena (2011) y colaboradores, quienes estudiaron 7 domesticadas y 1 pariente silvestre, determinaron que existen diferentes tipos de metabolitos secundarios. Las cucurbitacinas son los metabolitos responsables del característico sabor amargo de sus frutos. Estos metabolitos son terpenoides tetra cíclicos, presentes en plantas en forma de glucósidos, en el chayote, de igual manera se comprobó la presencia de carotenoides, xantofilas y clorofilas, responsables de la variabilidad de color en los frutos. Otros MS presentes en (*Sechium edule*) son los flavonoides, que son un amplio grupo de pigmentos fenólicos (Peña 2017).

Dentro de los flavonoides encuentran se encuentran naringenina y hesperidina (flavanonas), apigenina (flavona), kaempferol, quercetina y rutina (flavonoles) (Cartaya, 2001), mismos que han sido identificados en *Sechium edule* (Aguñiga, 2013).

Cadena (2013), asegura que la hibridación se utiliza más a menudo, ya que se obtienen diversas ventajas de ello, ya sea en el fruto a simple vista o sus características genéticas.

También menciona que generalmente una hibridación se da entre dos ejemplares, por esto no se ha visto a profundidad. Se sabe que, para consolidar una hibridación, se requiere de compatibilidad entre las especies, es decir, crecer en condiciones similares y coincidir en la floración, lo que da como resultado un fruto con mejores características que sus progenitores, y de ser fértiles, estas características podrán ser hereditarias.

“Debido a que los híbridos F1 difieren de las especies progenitoras en sus cualidades morfológicas y fisiológicas, pueden diferir también sus exigencias de estación. Por consiguiente, aunque mediante cruzamiento interespecífico se pueden producir semillas y plantitas fértiles, estos nuevos organismos sólo pueden sobrevivir y perpetuarse si encuentran un hábitculo ecológico adecuado. Son capaces de establecerse por sí mismos, o bien se polinizan cruzándose entre sí, o se retro cruzan con uno o ambos de sus progenitores o con una posible tercera especie” (Cadena, 2013).

Cadena (2013), menciona que las variantes genéticas abren la pauta para identificar diversas propiedades farmacológicas dependiendo del contenido de metabolitos secundarios presentes en ellos.

3.7.3 Contenido de metabolitos secundarios presentes en *Sechium edule* y sus propiedades terapéuticas

Es conocido el uso culinario de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. así como su uso en la medicina tradicional. Sus beneficios se han relacionados principalmente a su composición fenólica (Díaz, 2019).

El chayote contiene peroxidasas, ácidos fenólicos, saponinas, triterpenos, carotenoides, cucurbitacinas, alcaloides y fitoesteroles; los cuales son compuestos bioactivos. Los beneficios que aportan a la salud han sido estudiados, sin embargo, existen pocos estudios con respecto a sus componentes individuales, aislamiento y su potencial biológico (Vieira *et al.*, 2019).

Vieira *et al.*, (2019), reporta la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides con un efecto antioxidante.

Dentro de los polifenoles encontrados en chayote, los ácidos fenólicos, taninos y estilbenos, han demostrado su poder fungicida, la protección ante insectos además de que se le atribuye la proporción de color y aroma. Con respecto a polifenoles

específicos, se ha reportado sus propiedades antiinflamatorias, antivirales, antialérgicos, anticancerígenos hipoglucémicos.

Otros compuestos detectados son apigenina, antocianinas, ácido α -linolenico, cumarinas, entre otros (Vieira *et al.*, 2019).

Los extractos de *Sechium edule* contiene vitaminas, proteínas, minerales, flavonoides, polisacáridos, carotenoides flavonoides entre otros, los cuales le confieren propiedades anticancerígenas, antiulcerosas, antiobesidad, antidiabéticas, anti- cardiovasculares (Pu, 2021).

Shiga *et al.*, (2015), menciona que tanto en fruto, raíz y hojas, el chayote posee fibra dietética, vitaminas, minerales y almidón.

Las raíces tuberosas de *Sechium* han sido poco estudiadas, pese a ello, se conoce su función prebiótica, su efecto antioxidante y potencial hipocolesterolémico (Bandyopadhyay, 2021).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de frutos *Sechium spp.*

Se utilizaron frutos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y *Sechium edule* grupo varietal *virans levis* Amargo 290, procedentes del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule*, ubicado en Huatusco, Veracruz, específicamente en el CRUO (Centro Regional Universitario Oriente) perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo. Los frutos fueron recolectados en madurez hortícola a los 18 ± 2 días después de antesis (Cadena *et al.*, 2007), una vez lavados y secos, fueron picados en hojuelas incluyendo exocarpo, mesocarpo, espinas y semilla. Posteriormente se realizó un secado a 40 °C en un horno con circulación de aire (BLUE-M, electronic company/blue Island, Illinois, USA.) hasta su deshidratación completa. Finalmente, los frutos secos fueron molidos a un tamaño de partícula de 2 mm. Se pesaron nuevamente para calcular el porcentaje de pérdida de agua y porcentaje de rendimiento del material biológico (Cadena *et al.*, 2007).



Figura 20. Material biológico deshidratado y molido. 1. *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, 2. *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)).

4.2 Análisis preliminar de metabolitos secundarios

Se realizaron pruebas preliminares para la identificación de familias de metabolitos secundarios como: terpenos, flavonoides, taninos, saponinas, fenoles, y alcaloides.

Se pesaron cuatro gramos por genotipo de material seco molido en tubos con tapa y se agregaron 10 mL de metanol al 80% para obtener un extracto metanólico.

Los tubos con con el material bilógico y metanol, se homogenizaron y se pusieron a sonicar (RANSONIC B-220 Ultrasoni Cleaner Branson/maquilado en USA) durante 20 minutos, reposo durante 10 y nuevamente sonicación por 20 minutos, éste ciclo se repitió 3 veces.

Tubos No.1: Prueba para alcaloides. Se colocaron 0.5 mL de extracto metanólico al 80% en un tubo de ensaye, y se agregaron 5 gotas de ácido clorhídrico (HCl) 2N. Una vez bien agitado, se puso a baño maría 20 minutos.

Una vez frio se añadieron 3 gotas del reactivo Dragendorff, y la aparición un precipitado color marrón, señaló la presencia de alcaloides.

Para el control positivo se necesitaron 0.5mL de metanol y 5 gotas de *lupinus* como estándar. Se agregó ácido clorhídrico 2N y consecutivamente de 3 gotas de reactivo de Dragendorff. El color marrón afirma la presencia de alcaloides.

Tubos No.2: Prueba para saponinas con extracto metanólico. Se preparó una solución A, una solución B y una solución C. Donde la solución A consta de 1.92g de sulfato de cobre + 15mL de agua destilada, la solución B lleva 5.28g de tartrato potásico + 2.31g de hidróxido sodio + 500mL de agua destilada y la solución C se obtiene mezclando 2.5mL de Sol. A + 2.5mL de Sol. B.

Se colocaron 0.5mL del extracto metanólico en un tubo de ensaye, más 0.5mL de solución C más 0.5mL de carbonato de sodio al 5%. Una vez homogenizado, se llevó a baño maría por 20 minutos a ebullición. La presencia de un precipitado color rosa, nos indicó la presencia de saponinas.

Control positivo: 0.5mL de metanol en un tubo de ensaye y 5mg de saponina de soya en polvo como estándar + 0.5mL de solución C. Se llevó a baño maría durante 20 minutos. El precipitado rosa es referencia de presencia de saponinas.

Tubos 3 para prueba de saponinas con extracto acuoso: Ésta prueba se repitió con un extracto acuoso, elaborado igual que el extracto metanólico, pero sustituyendo el metanol por 10 mL de agua. Se tomó 0.5 ml de extracto acuoso y se agregó 1mL de agua destilada. Se agitó vigorosamente durante 1 minuto en Vortex (Super- Mixer. Lab-line instruments, Inc. USA). La formación de espuma con apariencia de panal de abeja que durara 10 minutos, se consideraba prueba positiva.

Control positivo: Se colocaron 5mg de saponina de soya en polvo, más 0.5mL de agua destilada en un tubo de ensaye. Después de la agitación en Vortex (Super-Mixer. Lab-line instruments, Inc. USA), enseguida se creó la formación de un panal de espuma.

Tubos No. 4: Prueba para flavonoides. Se colocó 0.5mL de muestra en tubo de ensaye. Se añadió un trocito de cinta de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico

(HCl) concentrado. La prueba es positiva si se desarrolla un color naranja después de la efervescencia.

Control positivo: En un tubo se puso 0.5mL de metanol al 80% y unas gotas de quercetina, se añadió una tira pequeña de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico. La tonalidad naranja es el control de flavonoides.

Tubo No.5: Prueba para taninos. Se agregaron 0.5mL de extracto metanólico al 80% e inmediatamente 3 gotas de Cloruro férrico (FeCl_3) a 3%; se agitó y el viraje de color original a violeta u azul intenso es una prueba positiva.

Control positivo: En 0.5mL de metanol al 80% se pusieron 5 gotas de ácido tánico, y enseguida 3 gotas de Cloruro férrico (FeCl_3) a 3%, se observó un color azul intenso a púrpura.

Tubo No.6: Prueba para terpenos. Se colocó 0.5mL de muestra y se puso a evaporar a baño maría. Se resuspendió con unas gotas de cloroformo y se realizó la prueba de Liberman: 4 gotas de anhídrido acético y 4 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Un viraje a morado intenso indica la presencia de terpenos.

Control positivo: En un tubo de ensaye se añadieron 0.5mL de metanol y 5 gotas de ácido ursólico como estándar, se puso en baño maría hasta su evaporación. Se resuspendió con unas gotas de cloroformo, se realizó la prueba de Liberman: 4 gotas de anhídrido acético y 4 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y se agitó por 1 minuto. Se observará una tonalidad morado intenso a café.

Tubo No. 7: Prueba para fenoles. Se colocó 0.5mL de extracto metanólico más 0.5mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% y 0.5mL de una solución de carbonato de sodio al 2.5%.

Control positivo: En un tubo de ensaye se añadió 5 gotas de ácido gálico, 0.5mL de metanol al 80% + 0.5mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% y 0.5mL de una solución de carbonato de sodio al 2.5%. El color azul afirma presencia de fenoles (Dominguez,1988: Raffauf,1994).

4.3 Cromatografía de capa Fina

Los extractos metanólicos de cada genotipo de *Sechium edule*, y la mezcla 80:20 se concentraron mediante evaporación, y para su aplicación en las placas se resuspendieron con unas gotas de metanol al 80%.

Para cada grupo de metabolitos secundarios se utilizó una cromatoplaaca de sílica gel de 10cm x 10cm, marcada previamente con un centímetro de margen en los laterales, así como 1cm de margen inferior y superior.

Identificación de alcaloides: En la base de la placa se hicieron 4 divisiones iguales y se numeraron del 1 al 4; aplicando con un capilar 3 μ L aproximadamente de extracto de *Sechium edule grupo varietal nigrum spinosum* en el número 1, 3 μ L de *Sechium edule variedad virens levis* Amargo 290 en el número 2, 3 μ L de la mezcla 80:20 (*Sechium edule grupo varietal nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule variedad virens levis* Amargo 290 (20%)) en el número 3 y como estándar 3 μ L de *Lupinus* en el número 4.

Se observó en una cámara de luz-UV (COLE-PARMER 9818-Series Darkrooms; Cole-Parmerinstrument Co., FRANCE) a 365 nm. Para cerciorarse de la correcta aplicación y después se llevó a una cámara cromatográfica con 10mL de la fase móvil diclorometano- metanol- hidróxido de amonio 8:2:0.5 v/v.

Una vez que la fase móvil llegó a la línea superior de la placa, se retiró de la cámara y se colocó en la campana de extracción de gases (LABOCONCO. Kansas City Missouri) para eliminar los residuos de disolvente.

Se observó nuevamente en la cámara de luz-UV (COLE-PARMER 9818-Series Darkrooms; Cole-Parmerinstrument Co., FRANCE) a 365 nm. Para detectar la presencia de alcaloides.

La placa fue revelada con el reactivo de Dragendorff dentro de la campana de extracción. Una vez que la placa se encontró seca, se llevó al horno a 110°C por 5 minutos. Las bandas color marrón indican la presencia de alcaloides.

Identificación de flavonoides. Se preparó la cromatoplaque dividiendo el margen inferior en 4. En el 1 se colocó *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, en el numero 2: *Sechium edule* variedad *virens levis* Amargo 290, la mezcla 80:20 respectivamente en el número 3 y estándar en el número 4, en éste caso fue quercetina. Se observó en una cámara de Luz-UV y a continuación se introdujo la placa en la cámara de vidrio previamente saturada con 10mL de fase móvil cloroformo- metanol- agua destilada 65: 45: 12 \forall , una vez que alcanzó el frente de la cromatoplaque, se retiró y colocó en la campana de extracción hasta estar seca.

Una vez seca, la placa se llevó al horno a 110°C por 5 minutos y después se reveló con el agente cromogénico Natural Product's/Polietilenglicol (NP 1% /PEG 5%). Se observó con luz UV de onda larga y se tomó como prueba positiva las bandas color amarillo-anaranjado.

Identificación de taninos. Se colocó en la placa cromatográfica previamente marcada en el mismo orden que en las placas anteriores, pero en el número 4 se puso ácido tánico como estándar. Se observó en la cámara de luz-UV para asegurar su correcta aplicación.

La placa se llevó a la cámara cromatográfica con 10mL de la fase móvil acetato de etilo- metanol 1:1 \forall . una vez que la fase llegó al frente de la cromatoplaque, fue retirada de la cámara y se llevó a la cámara de extracción hasta que se evaporó por completo la fase móvil. Se observó bajo luz-UV el perfil de separación.

La placa fue revelada con cloruro férrico al 2% dentro de la campana de extracción. La tinción de las bandas a un color azul intenso a púrpura, habría indicado la presencia de taninos.

Identificación de terpenos. Se empleó una cromatoplaque de sílica gel de 10x10 cm marcada de la siguiente manera: 1. Cucurbitacina B., 2. Cucurbitacina D. 3. *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, 4. *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290., 5. Mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)), 6. cucurbitacina E., 7. cucurbitaina I.

Se colocó 3 μ L aproximadamente por punteo de cada extracto y genotipo. Se usó como estándar de cucurbitacina B, cucurbitacina D, cucurbitacina E y cucurbitacina I (Sigma, St Louis, M).

Se corrió en una fase móvil de cloroformo-metanol 9:1 v/v , hasta alcanzar el frente de la cromatopla y se retiró para dejarla en la campana y libre de solventes para ser observada bajo luz-UV.

La placa fue revelada con vainillina en ácido fosfórico al 50%, se llevo al horno a 110°C durante 5 minutos. Los tonos fucsias, rosas, violetas, morados y lilas en las bandas muestran la presencia de cucurbitacina.

Identificación de Fenoles. La placa fue marcada en el 1 se colocó *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, en el numero 2: *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290, la mezcla 80:20 respectivamente en el número 3 y ácido gálico como estándar en el número 4.

Se colocó la placa en una cámara cromatográfica con la fase móvil acetato de etilo-metanol 9:1 v/v . Una vez corrida la placa y libres de solvente se verificó bajo luz-UV la separación de los compuestos y se continuó con un revelado utilizando el reactivo de Folin + carbonato de sodio al 20%.

La presencia de fenoles se observa con mediante manchas de color azul, gris en la placa.

Finalmente, para todas las cromatoplas se determinó el Rf (Ratio of Front por sus siglas en inglés), tomando la siguiente ecuación: $RF = D_s/D_f$. Donde se dividió la distancia que recorrió la muestra entre la distancia que recorrió el estándar, tomando en cuenta los márgenes marcados en la placa.

4.4 identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La identificación se realizó a las muestras que pasaron por extracción discontinua, así como en extracto metanólico de los genotipos de *Sechium edule* y la mezcla 80:20.

Para la extracción discontinua, se inició pesando 2g de cada genotipo, incluyendo la mezcla 80:20, se colocó cada muestra en tubos de ensaye y se le agregaron 5 mL de hexano grado HPLC (Sigma- Aldrich, USA). Se homogeneizo la muestra agitando en el vortex durante 1 minuto y se dejaron reposar durante 14 días. Pasado éste tiempo, se recuperó el sobrenadante de cada tubo siendo filtrado con una membrana de 0.45 µm (Millipore, Irlanda). De cada sobrenadante colectado y filtrado, se puso por separado, 1.5mL en viales de HPLC. Las muestras se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para cada extracto y cada grupo de metabolitos secundarios.

Después de haber retirado el sobrenadante de hexano, se dejó secar el material de cada tubo por 24 horas. Después se agregó 5mL de diclorometano de grado HPLC a cada muestra, dejándolas reposar durante 2 días. Se tomó el sobrenadante nuevamente para filtrarlo y ser colocado en viales de HPLC para su análisis.

Después de retirar el diclorometano, se dejó evaporar el resto del disolvente por 24 horas, se reincorporó el material biológico seco en tubos por separado y se cubrieron con 5 mL metanol, el cual se recuperó a los 2 días para ser filtrado y pasado a viales de HPLC.

Para las muestras que pasaron únicamente por metanol, se tomó el sobrenadante que se obtuvo a los 14 días de reposar las muestras. Una vez que se filtró el sobrenadante de cada genotipo y la mezcla 80:20 por separado, se colocó 1.5mL del extracto en viales de HPLC para su análisis.

Las cucurbitacinas fueron analizadas en una Columna Symmetry Shield C18 (4.6 x 250 mm) (Waters, España), por análisis Isocrático, en disolventes agua: metanol:

acetonitrilo (50:30:20); flujo 1 mL min⁻¹; temperatura 25°C; volumen de inyección: 40 µl; La detección se hizo a 235 nm y tiempo de análisis 60 min (Cuadro 2). Se tomaron como estándares de referencia cucurbitacina E, I, B y D (Sigma-Aldrich, USA).

Cuadro 2. Tiempo de retención y longitud de onda para los estándares de cucurbitacinas

λ 235 nm

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Cucurbitacina B	38.83
Cucurbitacina D	15.69
Cucurbitacina E	52.87
Cucurbitacina I	19.79

La detección tanto de ácidos fenólicos como de flavonoides se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Aguiñiga *et al.*, (2017) con algunas modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1100, equipado con un inyector automático modelo 1200 y un detector de arreglo de diodos modelo 1100. Se utilizó una columna Hypersil ODS (125 x 40 mm) Hewlett Packard. Como fase móvil: (A) agua pH 2.5 con ácido trifluoroacético y (B) acetonitrilo. El análisis fue por gradiente: 15 a 35% B de 0.1 a 20 min, 35% B de 20 a 25 min. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL min⁻¹ a una temperatura de 30°C y el detector se ajustó a λ₁ 254, λ₂ 280, λ₃ 330 y λ₄ 365 nm a diferentes tiempos de retención (Cuadro 3 y 4).

También se programó el detector para obtener los espectros de absorción de cada uno de los componentes de las muestras analizadas y poderlos comparar con los espectros de los estándares.

Dependiendo de los máximos de absorción se crearon las curvas de calibración en las cuatro distintas longitudes de onda programadas. Los estándares de referencia fueron de la marca Sigma-Aldrich, USA (Cuadros 2-4).

Cuadro 3. Tiempo de retención y longitud de onda de los estándares de ácidos fenólicos

λ 254 nm	
Compuesto	Tiempo de retención (min)
Ácido protocatecuico	2.09
Ácido p-hidroxibenzoico	2.56
Ácido vainillico o caféico	3.39
Ácido b-resorcílico	4.26
Ácido 3,5-di-hidroxibenzoico	11.27
λ 280 nm	
Ácido gálico	1.55
Ácido siríngeo	3.00
Ácido p-cumárico	5.29
λ 330 nm	
Ácido clorogénico	3.70
Ácido sinápico	5.96
Ácido ferúlico	6.10
Ácido rosmárico	9.27

Cuadro 4. Tiempo de retención y longitud de onda para los estándares de flavonoides

λ 254 nm	
Compuesto	Tiempo de retención (min)
Rutina	5.73
Morina	11.05
Quercetina	13.29
λ 280 nm	
Catequina	2.43
Hesperidina	8.25
Floridtzina	9.06
Naringenina	15.8
Floretina	16.2
λ 330 nm	
Apigenina	17.1
λ 365 nm	
Miricetina	9.1
Kaempferol	17.5
Isorhamnetina	18.2

4.5 Análisis *in vitro*: 2,2-Difenil-Picrilhidrazil (DPPH)

Para ésta prueba se utilizó el polvo oscuro de DPPH, que consta de moléculas de radicales libres, el cual es estable; con éste se preparó una solución 0.1mM de DPPH en metanol, después se hizo una curva estándar de 0, 0.1, 0.2, 0.3,0.4, 0.6, 0.8, y 1 mM de DPPH. Los extractos se pusieron en concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6,0.7,0.8,0.9 y 1.

Se colocaron en placas de 96 pozos de fondo plano 50µL de cada dilución y 150 µL de DPPH 0.1Mm en cada pozo por cuatuplicado. A continuación, se incubo en obscuridad por 30 minutos sobre una plancha con agitación suave.

Al término, la solución fue leída en un espectrofotómetro a 517 nm.

$$\% DPPH = \frac{(Abs\ control - Abs\ muestra)}{Abs\ control}$$

Por último, se restó el valor del blanco al % final del DPPH.

4.6 Tratamiento de ratones

4.6.1 Tratamiento a ratones para la dosis letal media (LD₅₀)

Se experimentó con 62 ratones hembra (n=5 y n=6 por dosis), estos fueron tratados por vía intraperitoneal con los extractos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%) y *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)). Fue aplicada una sola inoculación por cada extracto a dosis de 0, 8, 16, 40, 60, 160, 400, 600, 1600, 2900 y 5000 mg/kg, (Lorke 1983) para la determinación de la dosis letal media. Se monitoreo por 24 horas evaluando supervivencia, o síntomas indicativos como espasmos musculares, diarrea o postración. Después del tratamiento se mantuvieron en observación durante 7 días para observar su comportamiento. La dosis letal media fue calculada mediante un análisis Probit.

4.6.2 Tratamiento a ratones para pruebas de actividad antioxidante *in vivo*

Nuevamente, se experimentó con 62 ratones hembra, a los cuales se les monitoreo el peso durante el tratamiento, el cual duró 7 días.

Se les aplicó vía intraperitoneal los tratamientos de los frutos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* variedad *virens levis* Amargo 290 (20%)).

Las dosis de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* fueron: 800 y 640 kg/mg, para *Sechium edule* variedad *virens levis* Amargo 290 la dosis fue de 160mg/kg, y para la mezcla 80:20 las dosis 800 kg/mg, 400 kg/mg, 200 kg/mg y 100 kg/mg. Se trabajó con un testigo de ratones sanos, un control (CCl₄) y un vehículo (PBS).

Dos días antes del sacrificio, se les indujo estrés oxidativo con la administración de CCl₄ (tetracloruro de carbono) al 10% en aceite de oliva por vía intraperitoneal (Aguñiga *et al.*, 2020); se aplicó una dosis cada 24 horas.

Al término del tratamiento los ratones se anestesiaron con 6.3 mg/kg de pentobarbital sódico (PISA, México) administrado vía intraperitoneal; luego del efecto, la sangre se recuperó por plexo axilar en tubos vacuotainer para suero (BD, USA) y tubos con EDTA (BD, USA); se agitó y se reservó para los análisis posteriores.

4.7 Pruebas antioxidantes en eritrocitos de ratones tratados

4.7.1 Prueba de Glutación Peroxidasa (GPx)

Para ésta prueba, se tomaron 10 µL de sangre entera y se agregaron 200 µL de diluyente proporcionado por el estuche de RANSOL (Randox Laboratorios Ltd, UK). Se incubo durante 5 minutos y se agregaron 200 µL de Drabkin a doble concentración para ser procesada antes de 20min.

En una placa de 96 pozos se colocó 5 µL de la dilución descrita arriba, y se le añadió 200 µL del reactivo de trabajo que incluye el kit (glutación 4 mmol L⁻¹, glutación reductasa 0.5 U L⁻¹ y NADPH 0.34 mmol L⁻¹). Justo antes de la lectura se agregaron

8 μL de cumeno (hidroperóxido de cumeno 0.18 mmol L^{-1}); se mezcló y se cronometró la lectura al minuto 1 y al minuto 3, ambas a una longitud de onda de 340nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1600 Series (Knauer, Japón). La concentración de GPx se evalúa por la disminución en la lectura de absorción debido a la oxidación de NADPH a NADP+.

Para el cálculo se usó la fórmula siguiente:

$$Gpx = \Delta \text{muestra} - \Delta \text{blanco} \cdot (8,412)(41)$$

4.7.2 Prueba para superóxido dismutasa (SOD)

Para determinar la SOD se utilizó el kit RANSOD (Randox). Se inició tomando 40 μL de sangre y se le agregaron 240 μL de cloruro de sodio (solución salina) al 0.9% para lavar los eritrocitos. Se hicieron 3 lavados, recuperando el sobrenadante entre cada uno de ellos. Las muestras fueron centrifugadas a 2500rev/ 5 min.

A los eritrocitos ya lavados se les agregó 160 μL de agua fría y se dejaron reposar por 15 minutos a 4°C .

Pasados los 15min. Se tomó 100 μL del lisado y se diluyeron con 1.9 μL del tampón de fosfato al 0.01mmol/L, con un pH 7.

El espectro se preparó a 0 con agua como blanco y se programó para hacer la lectura a 505nm.

Se colocaron en una placa de 96 pozos 6 μL de la muestra diluida + 200 μL del sustrato a 37°C y al final justo para cronometrar 30 μL de xantinoxidasa (proveniente del kit), se mezcló y se leyó a los 30 segundos y a los 3 minutos.

Para los cálculos se sacaron los promedios de las Δ /min y se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de inhibición. El blanco utilizado fue un buffer de fosfatos.

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left(\frac{\Delta \text{ muestra/min} \cdot 100}{\Delta \text{ blanco/min}} \right)$$

Para obtener SOD en U/mL se aplica la ecuación de calibración siguiente.

$$\text{Actividad de la enzima} = [1.21 + (0.01 * \% \text{ de inhibición})] * 100$$

4.7.3 Prueba para Catalasa (CAT)

Siguiendo el método de Gavia (2017) con algunas modificaciones, para determinar la actividad de la enzima catalasa, se utilizó como sustrato el peróxido de hidrogeno, H₂O₂, midiendo el decremento de su concentración por análisis espectrofotométrico [Aebi, 1984].

Se calibro la absorbancia del espectrofotómetro a 0.45 a 0.5 para poder calcular el peróxido de hidrogeno.

Se diluyó 10 µL de sangre con 290 µL de PBS, una vez homogénea nuestra muestra, se colocó en una placa de 96 pozos, 10 µL de ésta más 190 µL de la solución de trabajo [200 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (Sigma, St. Louis, EUA) y 200 mL de H₂O₂ 20 mM]. Como blanco se tomaron los mismos elementos, pero sin muestra.

La lectura se realizó a una longitud de onda de 240nm midiendo la reducción de la concentración de H₂O₂ cada 20 segundos durante 3 minutos.

Se calculó el cambio de absorbancia a 240nm por minuto (ΔA_{240}) como pendiente lineal de la gráfica de A₂₄₀ (dependiente, eje de las Y) contra tiempo (independiente, eje de las X).

La ecuación para la actividad de catalasa es:

$$U \text{ CAT}/mL = \left(\frac{\Delta A_{240}}{0.0394} \right) * 100$$

Para muestras de sangre, se hace una corrección con la concentración de hemoglobina de la muestra (método EO-003), utilizando la fórmula siguiente:

$$\left[\frac{U\text{ CAT}/mL}{mg/mL\text{ de Hb en la muestra}} \right] * 1000$$

4.8 Análisis estadístico

Se realizó por triplicado un análisis estadístico, los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Para la determinación la diferencia significativa se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de Tukey y Dunnett ($p < 0.05$) empleando el paquete estadístico SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc., USA) teniendo como variables al extracto y las concentraciones (Aguñiga, 2013; Aguiñiga, 2017; Gómez, 2019).

Para el análisis de los datos de la dosis letal media (LD_{50}), fue utilizada la función Probit, donde a través de una regresión lineal, se calcula la relación entre un estímulo y la cantidad de casos con respuesta a éste.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de la presencia de metabolitos secundarios presentes en los extractos de los genotipos de *Sechium edule* mediante pruebas preliminares.

Se realizaron pruebas preliminares para la identificación de metabolitos secundarios como: alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos, para los extractos de los genotipos *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)).

En todos los extractos analizados hubo ausencia de alcaloides y taninos (Cuadro 5). En lo que respecta a los resultados de fenoles, se identificó una mayor concentración de éstos en *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* que en *Sechium edule*

grupo varietal *virens levis* Amargo 290. Para la muestra 80:20, se ven niveles como en *nigrum spinosum*.

La prueba de flavonoides arrojó como resultado una mayor proporción en *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 en comparación con *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*. En cuanto a la mezcla 80:20, se mantuvo la concentración como en *nigrum spinosum* (Cuadro 5).

La prueba de saponinas mostró una alta concentración en ambos genotipos, así como en la mezcla 80:20.

En los terpenos, se pudo ver una diferencia considerable entre *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290, siendo este último el que mostro una concentración más alta que el primero. Pese a lo anterior, la mezcla 80:20 no mostró mayor presencia de terpenos que Amargo 290 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Metabolitos secundarios en los extractos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y en la mezcla 80:20 respectivamente, mediante el análisis de pruebas preliminares.

Metabolitos secundarios	<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>	<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290	Mezcla 80:20
Alcaloides	-	-	-
Fenoles	+++	++	+++
Flavonoides	++	+++	++
Saponinas	+++	+++	+++
Taninos	-	-	-
Terpenos	++	++++	++

(+) Representa la concentración de metabolitos (-) la ausencia

Los resultados obtenidos para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* son muy similares a los que reporta Aguiñiga (2013), con la diferencia en el contenido de taninos.

Por otra parte, Uriostegui (2014), muestra en sus resultados la presencia de taninos en *Sechium edule* variedad *virens levis* Amargo 290, sin embargo, éste estudio no identifica dichos compuestos.

Las alteraciones en el contenido de metabolitos puede estar bajo las condiciones agroclimáticas en las que se desarrollan las plantas, como el periodo otoño-invierno muestran una relación entre bajas temperaturas y el aumento de compuestos fenólicos (Nenadis *et al.*, 2015), y su relación con la baja exposición de radiación UV cambia el contenido de estos (Bilger *et al.*, 2016), por tanto en este estudio se trabajó con material colectado en diferente periodo a los reportados por Aguiñiga y Uriostegi.

5.2 Identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Sechium edule* por medio de cromatografía de capa fina.

Seguido del análisis preliminar y una vez identificado los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos, se realizó la cromatografía de capa fina para la identificación de flavonoides, fenoles y cucurbitacinas corroborando la presencia y/o ausencia de estos mediante la comparación del frente de retención (Rf) con los estándares para cada caso.

En el caso de los flavonoides se usó como estándar a la quercetina quien tuvo un Rf de 0.96, mientras que en los extractos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 se identificaron dos principales componentes con un Rf de 0.82 y 0.97 en ambos casos, mientras que en la mezcla 80:20 además de los ya mencionados se identificó un tercer componente con Rf de 0.76, todos ellos dando una coloración azul a UV-365 nm (Figura 21 y Cuadro 6).

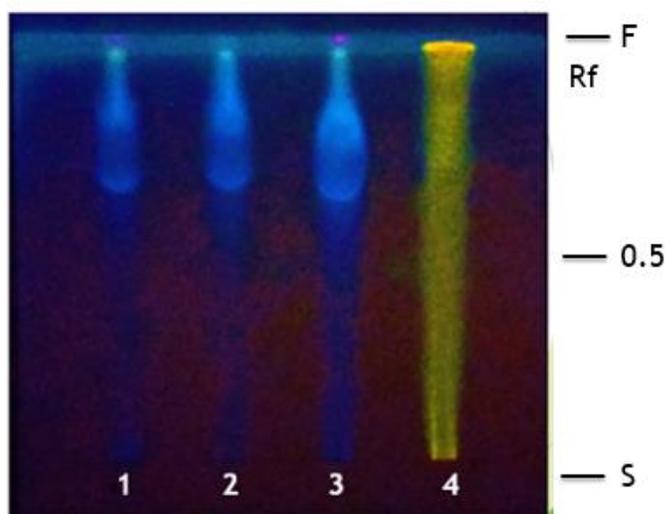


Figura 21. Cromatoplaaca en capa fina para la identificación de Flavonoides. 1. *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, 2. *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *viren levis* Amargo 290 (20%)), 4. Estándar Quercetina. Fase móvil: cloroformo-metanol- agua destilada (65:45:12 v/v), Revelador NP1% /PEG 5%, UV-365 nm.

Se demostró la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides mediante cromatografía de capa fina. En el estudio de Aguiñiga (2013) los Rf reportados son menores a los reportados en éste estudio en el genotipo *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*. Mientras que (Wagner y Bladt, 2001) identifican un Rf para la quercetina de 0.98 muy similar a observado en nuestra cromatoplacla.

En cuanto a la cromatografía en capa fina la identificación de fenoles se uso como estándar ácido gálico quien presento un Rf de 0.90, mientras que en todos los extractos se mostró la presencia de un componente de baja polaridad y uno de mayor polaridad. Siendo el caso para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* que presentó componentes con Rf de 0.09 y 0.77, mientras que *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 los componentes presentaron Rf de 0.09 y 0.81, y finalmente para la mezcla 80:20 los componentes presentaron Rf de 0.103 y 0.81 a luz visible revelado con Folin más carbonato de sodio al 20% (Figura 22 y Cuadro 6).

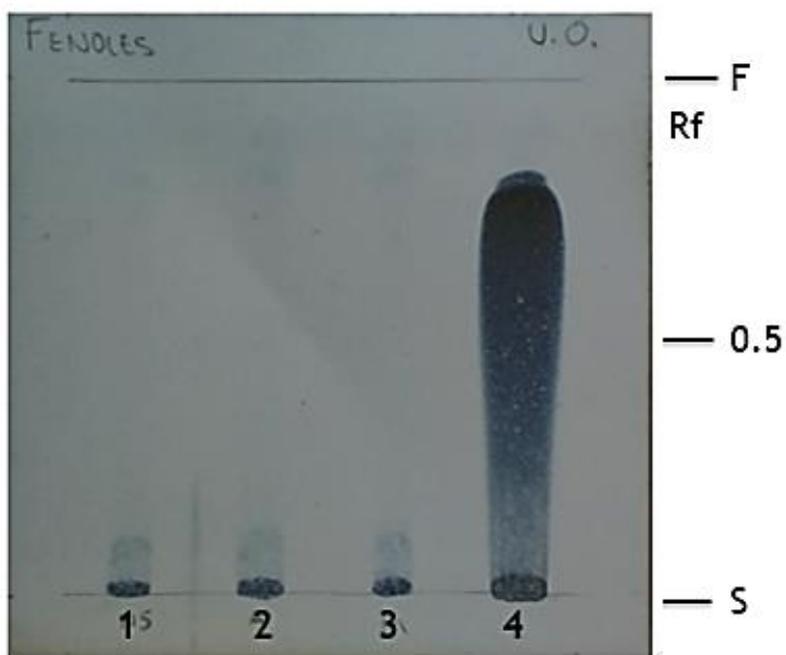


Figura 22. Cromatoplacla en capa fina para la identificación de Fenoles. 1. *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, 2. *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)), 4. Estándar ácido gálico. Fase móvil: acetato de etilo- metanol 9:1 v/v y revelador Folin + carbonato de sodio al 20% y visto a luz visible.

Cuadro 6. Valores de retención obtenidos de la cromatografía de capa fina de compuestos fenólicos presentes en los extractos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y en la mezcla 80:20.

Compuestos fenólicos	<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>	<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290	Mezcla 80:20	Color 365 nm/ luz visible
Flavonoides	0.97	0.97	0.97	Azul
	0.81	0.82	0.82	Azul
			0.76	Azul
Fenoles		0.81	0.81	Café
	0.77			Café
			0.103	Café
	0.09	0.09		Café

Se usaron como estándares Quercetina y Ácido gálico presentando un Rf de 0.96 y 0.90 respectivamente.

La identificación de cucurbitacinas se realizó usando como estándares la cucurbitacina B, D, E e I, donde se presentaron Rf de 0.82, 0.51, 0.71 y 0.43, respectivamente. En el caso de los extractos en todos se identificó la presencia de diversos compuestos cromogénicos específicos para terpenos, en *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* que presentaron componentes con Rf de 0.43 y 0.68, mientras que *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 los componentes presentaron Rf de 0.45, 0.71, 0.75 y 0.81, en la mezcla 80:20 los componentes presentaron Rf de 0.41 y 0.67 a luz visible revelado con Vainillina ácido fosfórico (Figura 23 y Cuadro 7).

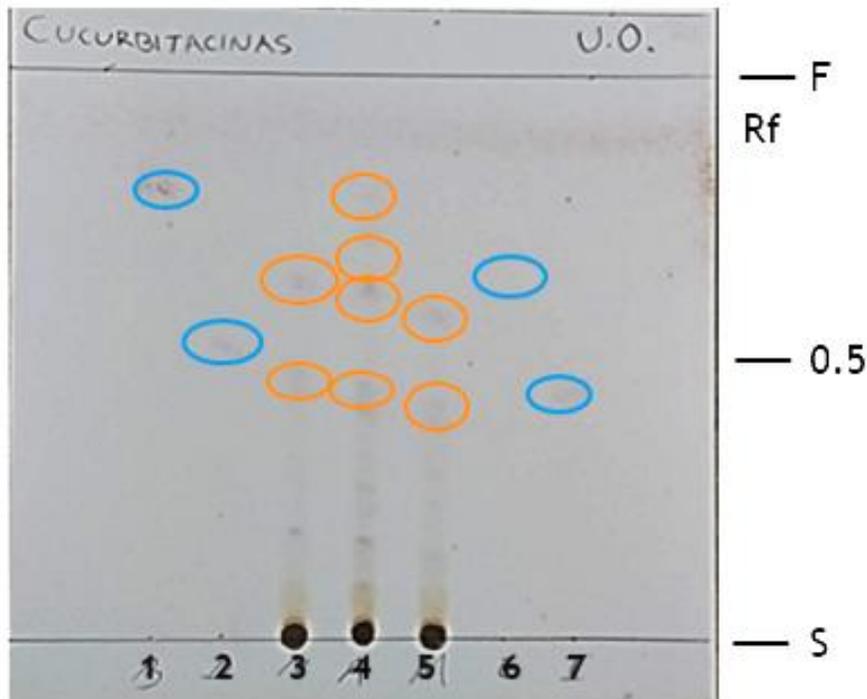


Figura 23. Cromatoplaça en capa fina para identificación de cucurbitacinas.
 1. Cucurbitacina B, 2. Cucurbitacina D, 3. *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*.,
 4. *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290, 5. Mezcla 80:20 (*Sechium edule*
 grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo
 290 (20%)). 6. Cucurbitacina E, 7. Cucurbitacina I. Fase móvil de cloroformo-metanol 9:1
 v/v, revelador: vainillina en ácido fosfórico al 50%, luz visible.

Este grupo de compuestos han sido identificados por (Wagner y Bladt, 2001) bajo las mismas condiciones de fase móvil y revelador encontrando similitud con el estándar para Cucurbitacina B, por su parte Aguiñiga 2013 ya había identificado a este grupo de metabolitos para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* en las mismas condiciones, al igual que Uriosteguí (2014) para *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290.

Cuadro 7. Valores de retención obtenidos de la cromatografía de capa fina de cucurbitacinas presentes en los extractos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y en la mezcla 80:20.

<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>	<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290	Mezcla 80:20	Color Luz visible
	0.81		Café rojizo
			Café rojizo
0.68	0.78	0.67	Café rojizo
	0.71		Café rojizo
0.43	0.45	0.41	Café rojizo

Rf de 0.82 para el estándar de Cucurbitacina B, Rf 0.51 de cucurbitacina D, un Rf de 0.71 para la Cucurbitacina E y Rf 0.43 para el estándar de Cucurbitacina I.

5.3 Identificación y cuantificación de la presencia de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Sechium edule* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Una vez identificados en cada uno de los extractos, fenoles y cucurbitacinas, se procedió a una extracción discontinua con disolventes de diferente polaridad como hexano, diclorometano y metanol, así como una extracción simple con metanol y se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la

identificación de diversos metabolitos secundarios presentes en los extractos, así como para determinar cuál método de extracción presenta mayor rendimiento, los cuales fueron comparados con diversos estándares de acuerdo al análisis específico.

Para identificar la presencia de flavonoides por HPLC se compararon con diversos estándares como catequina, rutina, hesperidina, floridtzina, miricetina, morina, quercetina, naringenina, floretina, apigenina, kaempferol y isorhamnetina, los cuales permitieron identificar en *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* la presencia de rutina, miricetina, quercetina, apigenina y kaempferol, siendo el extracto hexano el que presenta una menor concentración total de flavonoides con 0.086 μg por g polvo seco, mientras que el que mayor contenido de flavonoides presenta es el extracto con solo metanol con 1.184 μg por g polvo seco (Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentración de flavonoides presentes en *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración $\mu\text{g} \cdot \text{g}$ polvo seco)				
Catequina				
Rutina	0.023	0.765	0.122	0.550
Hesperidina				
Floridtzina				
Miricetina			0.069	
Morina				
Quercetina	0.026	0.043	0.311	0.409
Naringenina				
Floretina				
Apigenina	0.035		0.098	0.079
Kaempferol				0.146
Isorhamnetina				
TOTAL	0.086	0.809	0.601	1.184

En el caso de *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 se identificó la presencia rutina, miricetina, quercetina, apigenina y kaempferol, siendo el extracto con hexano el que menor contenido total de flavonoides presenta con 0.174 μg por

g polvo seco, mientras que el que mayor contenido total presenta es el extracto de diclorometano con 5 989 μg por g polvo seco, pero solo se identificó la presencia de rutina y altas concentraciones de quercetina. En cuanto al contenido de quercetina le sigue el extracto con solo metanol y aunado a ello presenta mayor diversidad de metabolitos secundarios (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración de flavonoides presentes en *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración $\mu\text{g} * \text{g}$ polvo seco)				
Catequina				
Rutina	0.152	1530.031	2173.843	636.631
Hesperidina				
Floridtzina				
Miricetina			91.837	
Morina				
Quercetina	0.022	4459.193	1176.651	1477.218
Naringenina				
Floretina				
Apigenina			116.856	367.012
Kaempferol				275.125
Isorhamnetina				
TOTAL	0.174	5989.224	3559.177	2755.986

Para la mezcla 80:20 se lograron identificar los mismos metabolitos presentes en *nigrum spinosum* y Amargo 290, siendo el extracto con solo metanol el que mayor concentración total y diversidad de flavonoides presenta (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentración de flavonoides presentes en la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)) por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

Mezcla 80:20 (<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i> (80%): <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290 (20%))				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración $\mu\text{g} \cdot \text{g}$ polvo seco)				
Catequina				
Rutina	0.035	0.685	0.753	0.947
Hesperidina				
Floridtzina				
Miricetina			0.007	
Morina				
Quercetina	0.028	0.632	0.090	0.552
Naringenina				
Floretina				
Apigenina			0.201	0.051
Kaempferol			0.134	0.102
Isorhamnetina				
TOTAL	0.064	1.317	1.188	1.654

De los extractos con solo metanol *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 es quien mayor contenido de flavonoides presenta, mientras que en la mezcla 80:20 se identificó un aumento en la concentración total de flavonoides con respecto a *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*.

En cuanto a la identificación de ácidos fenólicos por HPLC se utilizaron como estándares ácidos *p*-hidroxibenzoico, gentísico, beta-resorcílico, sinápico, gálico, protocatecuico, clorogénico, caféico, *p*-cumarico, ferúlico, rosmarínico y 3,5-dihidroxibenzoico, por lo que se identificaron para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* la presencia de todos ellos menos el ácido protocatecuico, el extracto con solo metanol fue el que presento mayor concentración y diversidad de ácidos fenólicos totales con 1.487 µg por g polvo seco siendo el ácido sinápico y el ácido gálico los más abundantes con 0.389 µg por g polvo seco en ambos casos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentración de ácidos fenólicos presentes en *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración $\mu\text{g} * \text{g}$ polvo seco)				
Ac. <i>p</i>-hidroxibenzoico				0.041
Ac. gentisico	0.159	0.356		0.072
Ac. beta-resorcílico		0.008	0.037	
Ac. sinapico			0.064	0.389
Ac. gálico	0.004	0.007		0.389
Ac. protocatecuíco				
Ac. clorogénico		0.003	0.025	0.123
Ac. caféico	0.015	0.055	0.038	
Ac. <i>p</i>-cumarico		0.010	0.207	0.312
Ac. ferúlico			0.024	0.015
Ac. rosmarínico			0.216	0.140
Ac. 3,5-dihidroxibenzoico	0.101	0.001	0.026	0.001
TOTAL	0.280	0.443	0.641	1.487

Para *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 se logró la identificación de todos los estándares analizados, siendo el extracto con metanol por extracción

discontinúa el que presenta mayor concentración y diversidad de ácidos fenólicos totales con 11.201 µg por g polvo seco (Cuadro 12).

Cuadro 12. Concentración de HPLC de ácidos fenólicos presentes en *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i>				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración µg * g polvo seco)				
Ac. <i>p</i>-hidroxibenzoico	0.001			0.076
Ac. gentisico	0.008	0.029	2.938	0.007
Ac. beta-resorcílico		0.009	0.011	
Ac. sinapico			0.001	
Ac. gálico		0.001		
Ac. protocatecuico			7.394	
Ac. clorogénico		0.00085	0.030	0.001
Ac. caféico	0.00092	0.015	0.622	
Ac. <i>p</i>-cumarico		0.010	0.186	0.272
Ac. ferúlico			0.001	0.003
Ac. rosmarínico			0.002	
Ac. 3,5-dihidroxibenzoico	0.089	0.034	0.012	0.006
TOTAL	0.100	0.101	11.201	0.368

En cuanto a la mezcla 80:20 se logró la identificación de todos los estándares siendo el extracto con metanol por extracción discontinúa el que presenta mayor concentración y diversidad de ácidos fenólicos totales con 22.385 µg por g polvo seco (Cuadro 13).

Entre los genotipos analizados el *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 es quien mayor contenido de ácidos fenólicos presenta, mientras que en la mezcla 80:20 se identificó un aumento en la concentración total y diversidad de flavonoides con respecto a *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*.

Cuadro 13. Concentración de ácidos fenólicos presentes en la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* 80%: *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 20% por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

Mezcla 80:20				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración $\mu\text{g} * \text{g}$ polvo seco)				
Ac. <i>p</i>-hidroxibenzoico				0.039
Ac. gentisico	0.007	0.256	21.134	0.192
Ac. beta- resorcílico		0.005	0.039	
Ac. sinapico				0.046
Ac. gálico	0.004	0.006		
Ac. protocatecuico			1.448×10^{-7}	
Ac. clorogénico		0.002		
Ac. caféico	0.001	0.036	0.806	
Ac. <i>p</i>-cumarico	0.091	0.012	0.329	
Ac. ferúlico			0.001	0.028
Ac. rosmarínico			0.014	0.252
Ac. 3,5-dihidroxibenzoico	0.016	0.015	0.058	0.002
TOTAL	0.121	0.335	22.385	0.562

En el análisis de cucurbitacinas se utilizaron como estándares Cucurbitacina B, D, E e I para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* se identificaron todas la cucurbitacinas siendo el extracto con solo metanol el que presenta mayor concentración de cucurbitacinas totales presenta con 0.878 µg por g polvo seco (Cuadro 14).

Cuadro 14. Concentración de cucurbitacinas presentes en *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración µg * g polvo seco)				
Cucurbitacina B	0.057			
Cucurbitacina D		0.115	0.239	0.151
Cucurbitacina E	0.368			0.727
Cucurbitacina I		0.168	0.129	
Total	0.425	0.283	0.368	0.878

Para *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 se identificó la presencia de Cucurbitacina D, E e I, siendo el extracto discontinuo de metanol el que presenta mayor concentración de cucurbitacinas totales con 0.608 µg por g polvo seco (Cuadro 15).

En la mezcla 80:20 se identificaron todas las cucurbitacinas analizadas con el estándar mostrando un aumento en la concentración total en el extracto discontinuo con diclorometano con 2.323 µg por g polvo seco (Cuadro 16).

Cuadro 15. Concentración de cucurbitacinas presentes en *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i> Amargo 290				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración $\mu\text{g} * \text{g}$ polvo seco)				
Cucurbitacina B				
Cucurbitacina D	0.811	0.118	0.190	0.518
Cucurbitacina E				0.078
Cucurbitacina I			0.417	
Total	0.811	0.118	0.608	0.596

Cuadro 16. Concentración de cucurbitacinas presentes en la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)) por extracción discontinua y en extracto solo con metanol analizados por HPLC.

Mezcla 80:20				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Extracto solo con metanol
(concentración µg * g polvo seco)				
Cucurbitacina B	0.015			0.111
Cucurbitacina D	0.501	1.423	0.357	0.278
Cucurbitacina E	0.117	0.223		0.057
Cucurbitacina I		0.675	0.203	
Total	0.633	2.323	0.560	0.447

Los grupos de metabolitos secundarios reportados para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* por Aguiñiga (2013), se asemejan a lo identificado en esta investigación, sin embargo, los metabolitos específicos y la concentración de estos difieren entre sí.

Por otra parte, Aguiñiga (2017), indica la presencia de cucurbitacinas B, D, e I, en *nigrum spinosum*, en este estudio se detectaron cucurbitacinas B y E para el mismo genotipo. Se puede considerar como un factor que influya en este dato, el tiempo de almacenamiento del material biológico o las condiciones agroclimáticas en el que se desarrolló.

5.4 Análisis del efecto antioxidante *in vitro* mediante 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) en los extractos de *Sechium edule*.

Una vez identificados los metabolitos secundarios presentes en los extractos analizados, se optó de acuerdo al rendimiento de los componentes totales trabajar con los extractos obtenidos de los lavados con metanol únicamente, debido a la alta polaridad que éste disolvente posee. Para identificar la actividad antioxidante se utilizó un análisis con 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH) por su capacidad de actuar como radical libre, ya que permite la evaluación de propiedades antioxidantes de diferentes compuestos naturales (Szabo *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2012).

La prueba DPPH permitió evaluar la capacidad antioxidante de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis amargo 290* y la mezcla 80:20. Éste ensayo permite la liberación de radicales hidrazilo.

La liberación de radicales procedente de DPPH, esperan la unión con un electrón donado por un antioxidante. Es ya conocido la capacidad antioxidante de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, la cual se corroboró al identificar un aumento en el % de inhibición conforme al incremento de la concentración de dicho genotipo; de 0.1 a 0.2 mg/mL y de 0.5 a 0.6mg/mL, se observa una alza en el efecto inhibitorio del DPPH, subiendo en en el primer caso un 10%, y en el segundo caso un 15%, es decir, de 0.1 a 0.2mg/mL el porcentaje de inhibición sube de 30 a 40% de inhibición de DPPH, y de 0.5 a 0.6 se incrementa de 55% a 70% de inhibición de DPPH (Figura 24).

Srivibulkovit (2018), menciona que en esta prueba el tono violeta del DPPH es modificado a un tono amarillo cuando se encuentran estables las moléculas de DPPH debido a la reducción por la actividad del antioxidante.

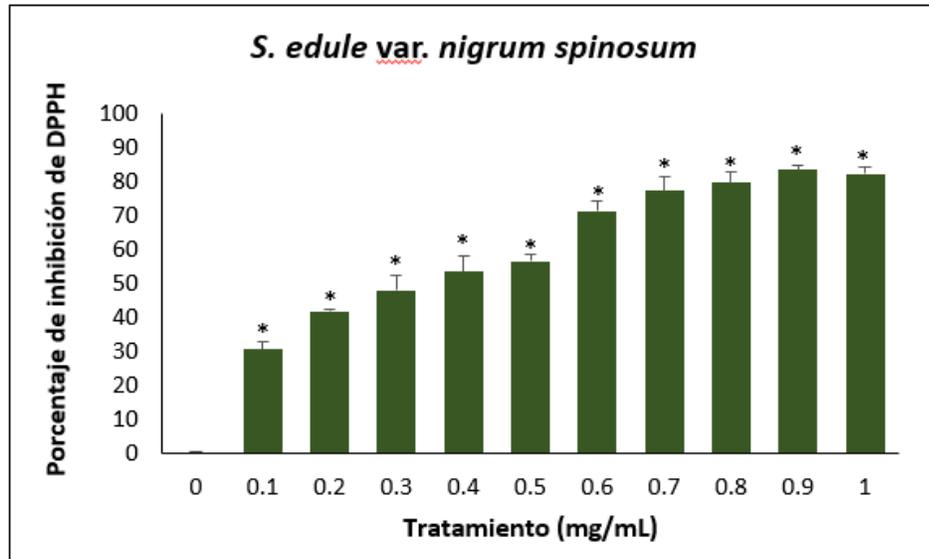


Figura 24. Porcentaje de inhibición de DPPH, del tratamiento con *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* ($n=5 \pm$ desviación estándar). *Diferencia significativa respecto a 0 (Tukey $p<0.05$).

Para *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* amargo 290, se observa un incremento en el porcentaje de inhibición a partir de la concentración 0.3mg/mL, donde el aumento se da de 0.2mg/mL con 45% de inhibición de DPPH y en 0.3mg/mL sube a 70% de inhibición de DPPH (Figura 25).

Sánchez (2021), reporta un % de inhibición de DPPH en *Sechium edule* (Jacq). S.w en un volumen de 50 μ L de extracto con metanol de grado reactivo de 22 a 26%, el cuál es menos al obtenido en este estudio, sin embargo, se sigue verificando la actividad antioxidante de éste fruto.

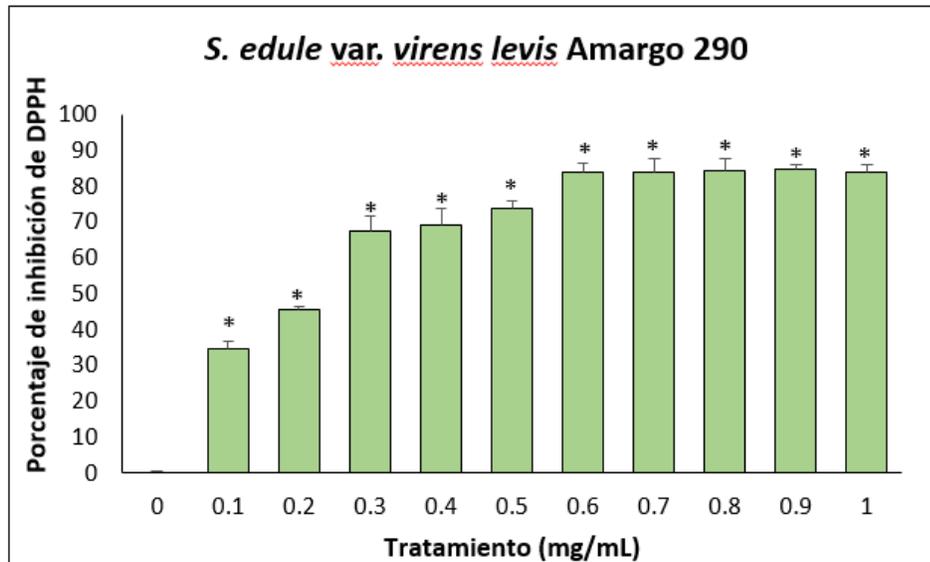


Figura 25. Porcentaje de inhibición de DPPH, del tratamiento con *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (n=5 ± desviación estándar). *Diferencia significativa respecto de 0 (Tukey p<0.05).

El efecto que se obtuvo en la mezcla 80:20, es también un incremento en el porcentaje de inhibición en relación al aumento de la concentración del tratamiento, sin embargo, no se nota un aumento tan significativo como en amargo 290, pero sí demuestra que el efecto antioxidante se mantiene, aunque en un porcentaje ligeramente por debajo de *nigrum spinosum* (Figura 26).

Estos datos permitieron calcular la concentración media de inhibición (IC₅₀) para los dos genotipos de estudio, así como la mezcla 80:20. Se obtuvo un mayor efecto en *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 con una IC₅₀ de 0.281 mg/mL (Cuadro 17).

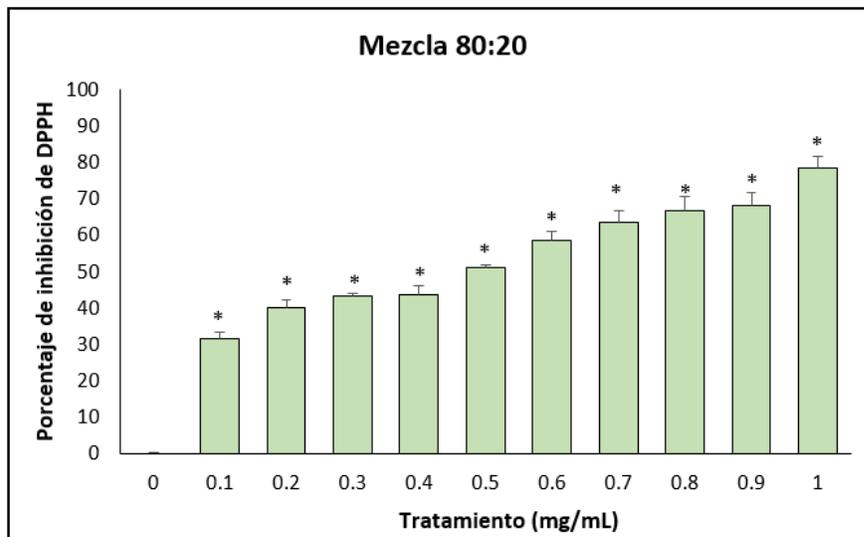


Figura 26. Porcentaje de inhibición de DPPH, del tratamiento con la mezcla 80:20 (*Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (80%): *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (20%)) (n=5 ± desviación estándar). *Diferencia significativa respecto a 0 (Tukey p<0.05).

Cuadro 17. Concentración media de inhibición (IC₅₀) para los tratamientos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20

Tratamiento	IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>	0.389
<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i>	0.281
Mezcla 80:20	0.480

El efecto de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* es similar al reportado por Aguiñiga *et al.*, 2020, siendo un poco menor, pero se mantiene el efecto antioxidante *in vitro*. Por otro lado, estudios como el de Gavia (2020), ha demostrado la capacidad antioxidante de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* en pacientes con síndrome metabólico.

Los genotipos trabajados en esta investigación, se encuentran por encima de lo reportado por Loizzo (2016), el cuál indica que el fruto fresco de *Sechium edule* tiene una IC₅₀ de 0,2 mg/ml. Podría considerarse que al llevar a sequedad el fruto, se concentran los flavonoides y ácidos fenólicos presentes en *Sechium* por lo que muestran una IC₅₀ más elevada.

5.5 Dosis Letal media (LD₅₀)

Una vez identificado el efecto antioxidante *in vitro*, se analizó la toxicidad aguda de los extractos para determinar el grado de toxicidad de los genotipos de estudio. La LD₅₀ para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, fue mayor a 5000 mg/Kg, lo que indica que es inocuo, sin embargo, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* amargo 290, indicó un valor de 2800mg/Kg, dato que nos indica que su ingesta podría ser ligeramente dañina. La mezcla 80:20 permite contrarrestar el efecto que tendría por si solo amargo 290, al incrementar su LD₅₀ a 4800mg/kg, es decir, se vuelve prácticamente inocuo y sus propiedades prevalecen (Cuadro 18).

La LD₅₀ es la proporción en miligramos por kilo de peso corporal (mg/kg) de un ingrediente activo. La LD₅₀ reportada por la OMS para la clasificación de peligrosidad según la ingesta de plaguicidas es la siguiente: Sumamente peligroso < 5 Muy peligroso 5 – 50, Moderadamente peligroso 50 – 2000, Poco peligroso Más de 2000 y Poco probable que presente un peligro agudo 5000 o inocuo (OMS, 2014). De acuerdo a esta clasificación nuestros extractos son de inocuos a ligeramente poco peligroso.

Cuadro 18. Dosis letal media (LD₅₀) de los tratamientos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* y la mezcla 80:20

Tratamiento	LD ₅₀ (mg/kg)
<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>	>5000
<i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>virens levis</i>	2800
Mezcla 80:20	4800

5.6 Evaluación del efecto antioxidante *in vivo* de los extractos de *Sechium edule*.

En condiciones basales el mecanismo inicial de protección antioxidante que participa en la homeostasis celular en respuesta a agentes tóxicos, se relaciona con las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), albúmina y las proteínas secuestradoras de metales considerados como los antioxidantes primarios (Niki *et al.*, 1999). La actividad biológica de este tipo, se compone de diversos procesos donde se generan de modo natural moléculas oxidantes. En la respiración, un oxígeno, pierde un electrón, dando como producto un anión superóxido, el cual, puede convertirse casi de inmediato en peróxido de hidrógeno gracias a la SOD. Luego, de no detenerse la reacción, se transforma en agua gracias a la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), se evita de esta forma el estrés oxidativo (Rosado, 2018).

Una vez determinada la baja toxicidad de los extractos se procedió evaluar su efecto sobre la protección a estrés oxidativo a ratones tratados con CCl₄. De manera inicial se evaluó la SOD; se encontró que los ratones sanos presentan aproximadamente 150 U/mL de la enzima y que al ser inducidos con tetracloruro de carbono (CCl₄) este no sufrió grandes cambios al igual que el vehículo, mientras que los tratados con dosis de 640 mg/kg de extracto de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* al igual que la dosis de 160 mg/kg *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y las diferentes dosis de la mezcla 80:20 presentan diferencia significativas con respecto al control sano y CCl₄ (Figura 27), finalmente el ácido gálico nuestro control antioxidante es diferente de todos los tratamientos, sin embargo en cuanto a la actividad de la SOD hay cierta tendencia similar con los diferentes extractos analizados.

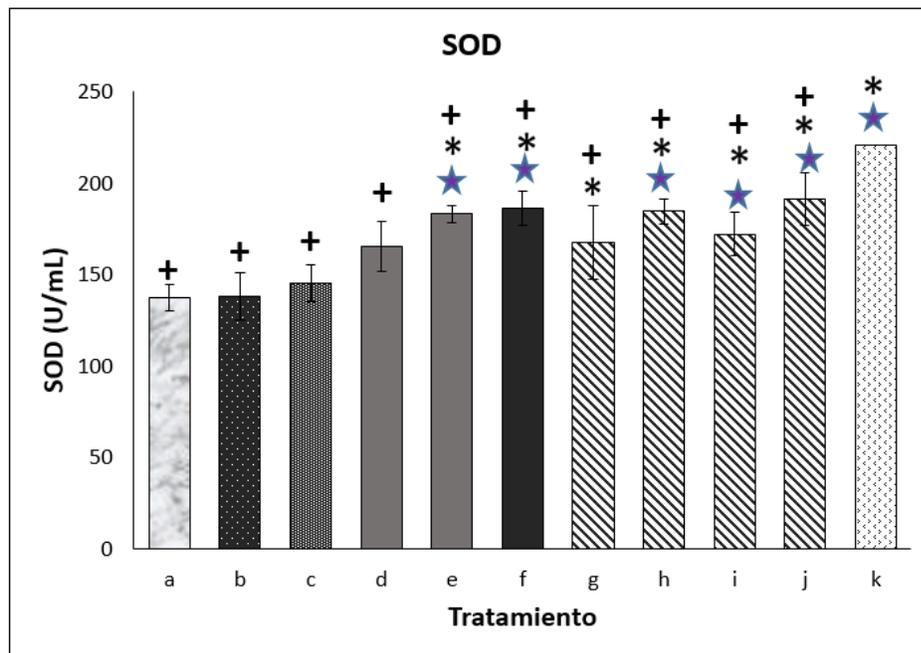


Figura 27. Efecto de los extractos de *Sechium* sobre la superóxido dismutasa de ratones tratados con CCl_4 . a) Ratón sano, b) Control CCl_4 , c) CCl_4 +vehículo (PBS), d) CCl_4 + S.e. grupo varietal *nigrum spinosum* (800 mg/kg), e) CCl_4 + S.e. grupo varietal *nigrum spinosum* (640 mg/kg), f) CCl_4 + S.e. grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (160 mg/kg), g) CCl_4 + Mezcla 80:20 (800 mg/kg), h) CCl_4 + Mezcla 80:20 (400 mg/kg), i) CCl_4 + Mezcla 80:20 (200 mg/kg), j) CCl_4 + Mezcla 80:20 (100 mg/kg), k) CCl_4 + ácido gálico (50 mg/kg), (n=6) Diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$) \pm la desviación estándar. ★ Representa la diferencia significativa con respecto al ratón sano (a), * representa la diferencia significativa con respecto al control CCl_4 (b) y + la diferencia significativa con respecto al ácido gálico (k).

En cuanto al efecto de la actividad de la catalasa no se identificó una clara diferencia entre el control sano y los tratados con CCl_4 , por otro lado se logró identificar una diferencia significativa del tratamiento con el extracto de *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y con daño de CCl_4 en comparación con los ratones sanos, mientras que el ratón control de daño con CCl_4 muestra cierto aumento en cuanto a la actividad de la enzima, el tratamiento que redujo la concentración fue *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* en dosis de 800 mg/kg. Con respecto a los tratamientos de la mezcla 80:20 se identifica una ligera reducción en su actividad (Figura 28).

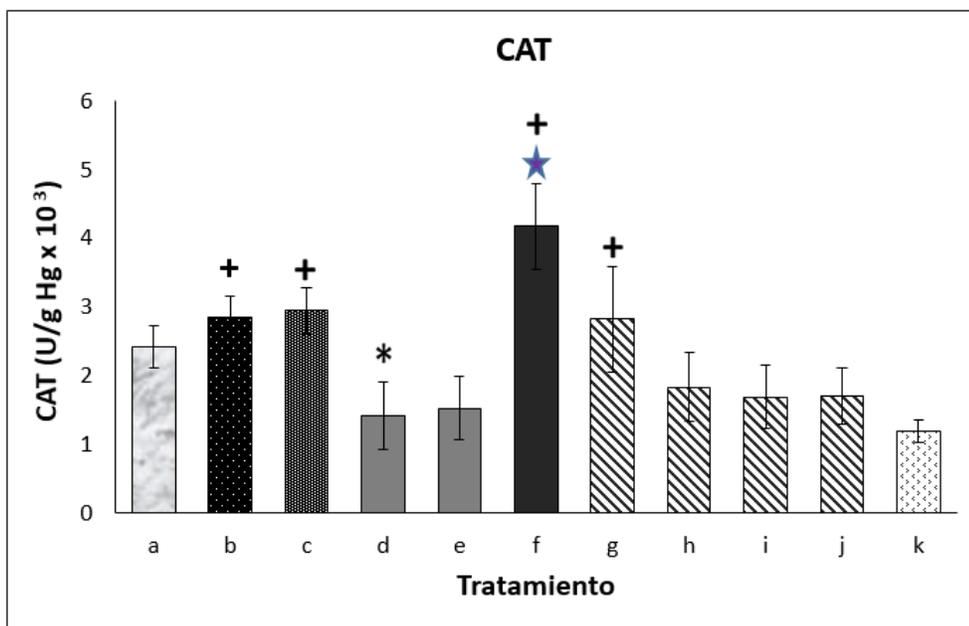


Figura 28. Efecto de los extractos de *Sechium* sobre la catalasa de ratones tratados con CCl₄. a) Ratón sano, b) Control CCl₄, c) CCl₄+vehículo (PBS), d) CCl₄+ S.e. grupo varietal *nigrum spinosum* (800 mg/kg), e) CCl₄+ S.e. grupo varietal *nigrum spinosum* (640 mg/kg), f) CCl₄+ S.e. grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (160 mg/kg), g) CCl₄+ Mezcla 80:20 (800 mg/kg), h) CCl₄+ Mezcla 80:20 (400 mg/kg), i) CCl₄+ Mezcla 80:20 (200 mg/kg), j) CCl₄+ Mezcla 80:20 (100 mg/kg), k) CCl₄+ ácido gálico (50 mg/kg), (n=6) Diferencia significativa (Tukey p<0.05) ± la desviación estándar. ★ Representa la diferencia significativa con respecto al ratón sano (a), * representa la diferencia significativa con respecto al control CCl₄ (b) y + la diferencia significativa con respecto al ácido gálico (k).

Respecto a la Gpx, en el ratón sano se obtuvo casi 80,000 U/L de Gpx, el control inducido con CCl₄ muestra una baja considerable a 40,000 U/L respecto a los ratones tratados e inducidos con CCl₄, se tiene 30,000 U/L de Gpx en la dosis más baja de la mezcla 80:20 (100mg/Kg), y alrededor de 60,000 U/L en los tratamientos de *nigrum spinosum* y amargo 290, se observa un efecto antioxidante mayor que el ácido gálico, el cual mostró una Gpx por debajo de 30,000 U/L (Figura 29).

El estudio de Aguiñiga (2020), presenta un control sano con casi 50,000 U/L de Gpx y una baja extrema a 1000 U/L al control CCl₄, pero demuestra también un incremento del efecto antioxidante en el tratamiento del híbrido de *Sechium* H387 07, con un aumento de 2000 U/L de Gpx.

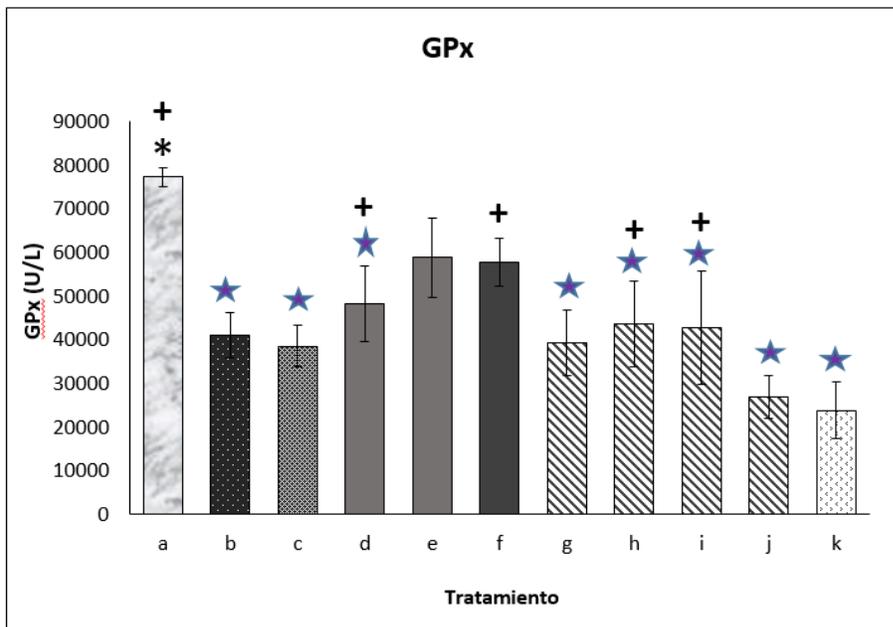


Figura 29. Efecto de los extractos de *Sechium* sobre la glutatión peroxidasa de ratones tratados con CCl₄. a) Ratón sano, b) Control CCl₄, c) CCl₄+vehículo (PBS), d) CCl₄+ S.e. grupo varietal *nigrum spinosum* (800 mg/kg), e) CCl₄+ S.e. grupo varietal *nigrum spinosum* (640 mg/kg), f) CCl₄+ S.e. grupo varietal *virens levis* Amargo 290 (160 mg/kg), g) CCl₄+ Mezcla 80:20 (800 mg/kg), h) CCl₄+ Mezcla 80:20 (400 mg/kg), i) CCl₄+ Mezcla 80:20 (200 mg/kg), j) CCl₄+ Mezcla 80:20 (100 mg/kg), k) CCl₄+ ácido gálico (50 mg/kg), (n=6) Diferencia significativa (Tukey p<0.05) ± la desviación estándar. ★ Representa la diferencia significativa con respecto al ratón sano (a), * representa la diferencia significativa con respecto al control CCl₄ (b) y + la diferencia significativa con respecto al ácido gálico (k).

Se observa como el fruto de *Sechium edule* muestra mayor efecto antioxidante en comparación con el ácido gálico en las pruebas de CAT y Gpx, siendo que éste compuesto y sus derivados (taninos hidrolizados y polioles) son catalogados excelentes antioxidantes demostrando propiedades antimicóticas, y protección ante estrés oxidativo (Choubey, 2018).

Nouri (2021), también revela el efecto antioxidante y antiinflamatorio del ácido gálico, en su estudio *in vivo*, donde obtiene resultados de SOD y CAT (en U/ mg de proteína) menores a las obtenidas respectivamente conforme a las unidades reportadas, Jalili (2021), también reporta SOD y CAT en U/mg de proteína el efecto protector del ácido gálico incluso sobre toxicidad inducida *in vivo*. Pese a su efecto, puede sugerirse incluso sobre este compuesto el fruto de *Sechium* para una protección molecular ante un estrés oxidativo.

6 CONCLUSIONES

En *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 y la mezcla 80:20 se logró identificar la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos y cucurbitacinas en diferentes proporciones.

Todos los extractos mostraron efecto antioxidante *in vitro*.

La dosis letal media indica que el extracto de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* es inocuo, mientras que *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 podría causar ligeros daños y al mezclarlos se reduce la toxicidad siendo casi inocuo.

El extracto de *Sechium edule* grupo varietal *virens levis* Amargo 290 en dosis de 160 mg/kg es altamente antioxidante *in vivo*, ya que aumenta las concentraciones de GPx, SOD y CAT.

La mezcla 80:20 mantiene un efecto antioxidante *in vivo* aun en bajas dosis.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Aguiñiga Sánchez I. (2013) Potencial Anti leucémico *in vitro* De Extractos de Cuatro Genotipos de *Sechium* spp. (Cucurbitaceae) (tesis de maestría) Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
- Aguiñiga-Sánchez, I. *et al.*, (2017). Chemical analyses and *in vitro* and *in vivo* toxicity of fruit methanol extract of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1638–1645. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1316746>
- Aguiñiga-Sánchez, I. *et al.*, (2020). Phytochemical Analysis and Antioxidant and Anti-Inflammatory Capacity of the Extracts of Fruits of the *Sechium* Hybrid. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(20), 4637. <https://doi.org/10.3390/molecules25204637>
- Alkhatib, A. *et al.*, (2017). Functional Foods and Lifestyle Approaches for Diabetes Prevention and Management. *Nutrients*, 9(12), 1310. <https://doi.org/10.3390/nu9121310>
- Ávalos García, A. & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas, *Reduca (Biología)*, 2 (3), 119-145.
- Avendaño Arrazate, C.H., Cadena Iñiguez, J., Arévalo Galarza, Ma. del. C., Campos Rojas, E., Cisneros Solano, V.M., Aguirre Medina, J.F. (2010), Las Variedades del Chayote Mexicano, Recurso Ancestral con Potencial de Comercialización, *Grupo Interdisciplinario de Investigación en Sechium edule en México, A.C.* 33-35pp.
- Bag, A., & Chattopadhyay, R. R. (2015). Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLoS one*, 10(7), e0131321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131321>
- Bandyopadhyay, B., Mandal, V., & Mandal, N. C. (2021). Partial characterization of novel inulin-like prebiotic fructooligosaccharides of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae) tuberous roots. *Journal of food biochemistry*, 45(6), e13764. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13764>
- Barbosa, P., Ruviano, A. R., & Macedo, G. A. (2018). Comparison of different Brazilian citrus by-products as source of natural antioxidants. *Food science and biotechnology*, 27(5), 1301–1309. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0383-4>
- BenSaad, L. A. *et al.*, (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1): 47. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555-0>
- Bilger, W., Rolland, M., Nybakken, L. (2007). UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochemical & photobiological sciences*, 6(2):190-195.

- Cadena J., L. Arévalo, C. Avedaño, M. Soto, L. Ruíz, E. Santiago, M. Acosta, V. Cisneros, J. Aguirre, D. Ochoa. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Fresh produce 1:41-53.
- Cadena Iñiguez, J. *et al.*, (2011) Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. *Rev. Chapingo Ser.Hortic* [online]. (17) (2): 45-55.
- Cadena Iñiguez, J., Avedaño Arrazate, C.H., Cisneros Solano, V.M., Arevalo Galarza, Ma. de L. C., Aguirre Medina, J.F. (2013). Modelo De Mejoramiento Genético Participativo En Chayote (*Sechium Spp*), *Grupo Interdisciplinario de Investigación en Sechium edule en México*, 17-53. ISBN: 978-607-715-182-1
- Cadena-Iñiguez, J. (2018). El Chayote (*Sechium edule* (JACQ.) SW.), Importante Recurso Fitogenético Mesoamericano. *Agro Productividad*, 3(2). Recuperado a partir de <http://www.revistaagroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/589>
- Cadena Iñiguez, J.*et al.*, (2020). Diseño y evaluación de compuestos funcionales del jugo de dos genotipos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., Para nuevos proyectos rurales.
- Cannon, J., Li, D., Wood, S.G., Owen, Investigation of secondary metabolites in plants. *J. Chem. Ed.* 78 (9) 1234-1237.
- Carmen Alquizar, M.T.D.J & Chávez Vázquez, N.Y., (2020). Identificación De Metabolitos Secundarios En Cianobacterias Presentes En Las Aguas Termales “Los Perolitos” Del Distrito De Baños Del Inca – Cajamarca (Tesis universitaria inédita) Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.
- Cartaya, O., & Reynaldo, Inés (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22 (2),5-14.
- Choi B. Y. (2019). Biochemical Basis of Anti-Cancer-Effects of Phloretin-A Natural Dihydrochalcone. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(2), 278. <https://doi.org/10.3390/molecules24020278>
- Corrales MCs, C.L., & Muñoz Ariza, M.M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno.
- de la Cruz Chacón, I., *et al.*, (2012). *Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos*. *Universitas Scientiarum*.17 (2), 189-202.
- Cui, H., Zhu, Z., Lu, Z., Ding, Z., Zhang, C., & Luan, F. (2021). The complete chloroplast genome sequence of the *Sechium edule* (Jacq.) Swartz.

- (Cucurbitaceae). *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 6(1), 97–98.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1847614>
- Córdova Ramos, Javier S., Glorio-Paulet, Patricia, Hidalgo, Alyssa, & Camarena, Felix. (2020). Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del lupino andino (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Scientia Agropecuaria*, 11(2): 157-165. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.02.02>
- De la Rosa Hernández, M. *et al.*, (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 47 (2), 22-35
- De Teresa Galván, C., *et al.*, (2008). Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1(2), 61-72.
- Díaz-de-Cerio, E., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., & Gómez-Caravaca, A. M. (2019). New insight into phenolic composition of chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). *Food chemistry*, 295, 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.146>
- Dominguez, R. *et al.*, (2020). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food chemistry*, 330, 127266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127266>
- Domínguez, X. A. 1988. Métodos de investigación fitoquímica. 4ta. Reimpresión. Ed. Limusa, México. 281 p.
- Espinosa Andrews, H. *et al.*, (2016). Los compuestos Bioactivos y Tecnologías de Extracción. Nanobio. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b85320f15.pdf#page=40
- Espinosa Panchi, M.N., (2020). Extracción, cuantificación y caracterización de compuestos fenólicos extraídos a partir de la Arquitecta (*Lasiocephalus ovatus* Schltzl.), planta nativa del Cerro Teligote. [Tesis universitaria inédita] Universidad Técnica De Ambato.
- Flores M., E. 1989. El Chayote, *Sechium edule* Swartz (Cucurbitaceae). *Revista Biología Tropical* (37), 1-54.
- Gallegos Zurita, M., (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac Med.* (77) (4) 327-32. <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- García Bacallo, L. *et al.*, (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana Investigación Biomedica.* (20) (3) 231-5. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/plantas_con_propiedades_antioxi dantes.pdf

- Gavia García, G., (2017). Efecto del TBHQ sobre la capacidad antioxidante y el proceso inflamatorio en ratas lactantes desnutridas. [Tesis doctoral inédita] Universidad Autónoma Metropolitana.
- Gavia García, G., *et al.*, (2020). Effect of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Chayote) on Telomerase Levels and Antioxidant Capacity in Older Adults with Metabolic Syndrome. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(7), 634. <https://doi.org/10.3390/antiox9070634>
- Gómez García, G. (2019). Efecto Hepatoprotector “*In Vivo*” de Extractos de *Sechium P. Browne* (Tesis de maestria) Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
- Grzesik, M. *et al.*, (2019). Dietary antioxidants as a source of hydrogen peroxide. *Food chemistry*, 278, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.109>
- Guzmán Núñez, V. I. (2018). Estudio Fitoquímico De Metabolitos Secundarios En *Skytanthus Acutus*. (Tesis de Universidad). Universidad Técnica de Federico Santa María.
- Hernández Alvarado, J. *et al.*, (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*, 8(1), 14-27. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.8.1>
- Jalili, C., Korani, M., Pazhouhi, M., Ghanbari, A., Zhaleh, M., Davoudi, S., & Rashidi, I. (2021). Protective effect of gallic acid on nicotine-induced testicular toxicity in mice. *Research in pharmaceutical sciences*, 16(4), 414–424. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.319579>
- Joly, N. *et al.*, (2020). Potato By-Products as a Source of Natural Chlorogenic Acids and Phenolic Compounds: Extraction, Characterization, and Antioxidant Capacity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(1), 177. <https://doi.org/10.3390/molecules26010177>
- Juárez Cevallos, M.L., (2018) *Identificación de metabolitos secundarios de Eichhornia crassipes (Jacinto de Agua) del Rio Chira, Sullana*. [Tesis universitaria inédita] Universidad San Pedro Perú.
- Kooti, W., & Daraei, N. (2017). A Review of the Antioxidant Activity of Celery (*Apium graveolens* L). *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(4), 1029–1034. <https://doi.org/10.1177/2156587217717415>
- Kuklinsky, C. (2003). Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. *Farmacognosia*. España: Omega.
- Lin, D. *et al.*, (2016). An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2

Diabetes. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(10), 1374.
<https://doi.org/10.3390/molecules21101374>

- Loizzo, MR, Bonesi, M., Menichini, F., Tenuta, MC, Leporini, M. y Tundis, R. (2016). Potencial de enzimas antioxidantes e hidrolizadoras de carbohidratos de la cáscara, hojas y pulpa fresca y procesada de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz (Cucurbitaceae). *Alimentos vegetales para la nutrición humana*, 71 (4), 381-387.
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista. <http://hdl.handle.net/10567/133>
- Lorke D.1983. Un nuevo enfoque para las pruebas prácticas de toxicidad aguda. *Arch Toxicol*. 54: 275-287.
- Maldonado, C. *et al.*, (2020). La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*. 55(1): 1-5.
- Mirończuk Chodakowska, I. *et al.*, (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1): 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4):1036-1043.
- Mora ASÁ, Z. *et al.*, (2019). Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. *Revista Médica Sinergia*. 4(05): 89-100.
- Nenadis, N., Llorens, L., Koufogianni, A., Díaz, L., Font, J., González, J. A., Verdager, D. (2015). Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. *Journal of photochemistry and photobiology B: biology*, 153:435-444.
- Niki, E. (1999). Action of antioxidants against oxidative stress. In *Advances in DNA Damage and Repair* (pp. 313-318). Springer US.
- Nouri, A., Heibati, F., & Heidarian, E. (2021). Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 394(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01931-0>
- OMS Medicina tradicional: definiciones [Internet]. WHO. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.

- Peña Galván, M.L. *et al.*, (2017). Determinación De Fenoles, Flavonoides Y Parámetros Fisicoquímicos En Chayote (*Sechium edule*) Procesado Térmicamente. *Jóvenes en la Ciencia, Revista de Divulgación Científica*. (3) (2):101-106.
- Pu, Y. T., *et al.*, (2021). Origin, Evolution, Breeding, and Omics of Chayote, an Important Cucurbitaceae Vegetable Crop. *Frontiers in plant science*, 12, 739091. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.739091>
- Raffauf, R. 1994. Plant screening. A field test manual.
- Ríos, M. D. C. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva*, 2(1) 17-28.
- Rosado Pérez J. *et al.*, (2018). *VM Curr Pharm Des*. 24 (40): 4807-4824.
- Rudolf, JD y Chang, CY (2020). Terpeno sintasas disfrazadas: enzimología, estructura y oportunidades de terpeno sintasas no canónicas. *Informes de productos naturales*, 37 (3), 425–463. <https://doi.org/10.1039/c9np00051h>
- Sánchez Flores, E. M. (2021). Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante e inhibitoria del chayote (*Sechium edule*) en conserva con salmuera (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química).
- Sánchez Mendigaño K.J. & Perdomo González E. (2018). Identificación de metabolitos secundarios en *Critoniella acuminata* (Kunth) R.M. King y H. Rob. determinación de su actividad antioxidante y citotóxica. Tesis para obtener título de Químico. Bogotá, Colombia. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A).
- Sánchez Pérez, D.P. (2018). Obtención de precursores quirales para la síntesis de alcaloides indólicos. [Tesis de maestría inédita] Benemérita Universidad del Estado de Puebla.
- Sarker, U., & Oba, S. (2020). Nutraceuticals, phytochemicals, and radical quenching ability of selected drought-tolerant advance lines of vegetable amaranth. *BMC plant biology*, 20(1), 564. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02780-y>
- Sato, S., & Mukai, Y. (2020). Modulation of Chronic Inflammation by Quercetin: The Beneficial Effects on Obesity. *Journal of inflammation research*, 13, 421–431. <https://doi.org/10.2147/JIR.S228361>
- Sepúlveda Vázquez J. *et al.*, (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *J. Selva Andina Anim. Sci.* 5(2), 79-95.
- Serafini, M., & Peluso, I. (2016). Functional Foods for Health: The Interrelated Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Fruits, Vegetables, Herbs, Spices and Cocoa in Humans. *Current pharmaceutical design*, 22(44), 6701–6715. <https://doi.org/10.2174/1381612823666161123094235>

- Shiga, T. M., *et al.*, (2015). Polysaccharide composition of raw and cooked chayote (*Sechium edule* Sw.) fruits and tuberous roots. *Carbohydrate polymers*, 130, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.055>
- Siddiqi, S. A. *et al.*, (2020). Potential of dates (*Phoenix dactylifera* L.) as natural antioxidant source and functional food for healthy diet. *The Science of the total environment*, 748, 141234. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141234>
- Singh, A. K. *et al.*, (2018). Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients*, 10(6), 731. <https://doi.org/10.3390/nu10060731>
- Srivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 34(7), 795–800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
- Skrovankova, S. *et al.*, (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24673–24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Song, J. *et al.*, (2020). New progress in the pharmacology of protocatechuic acid: A compound ingested in daily foods and herbs frequently and heavily. *Pharmacological research*, 161, 105109. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105109>
- Swamy, M. K. *et al.*, (2018). Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(18), 7775–7793. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9223-y>
- Szabo, M., Idrîoiu, C., Chambre, D., Lupea, A. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical papers*, 61(3):214-216.
- Vieira, E. F., *et al.*, (2019). Chayote (*Sechium edule*): A review of nutritional composition, bioactivities and potential applications. *Food chemistry*, 275, 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.146>
- Vijayalaxmi, S., *et al.*, (2015). Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *Journal of food science and technology*, 52(5), 2761–2769. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1295-9>
- Wagner H. and S. Bladt. 2001. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer second edition. Munich Germany. p. 371.
- Zuluaga Vélez, A. *et al.*, (2012). Una mirada al estrés oxidativo en la célula. *Revista Médica de Risaralda*, 18 (2), 145-154.

ANEXOS

Anexo 1. Pruebas preliminares de metabolitos secundarios

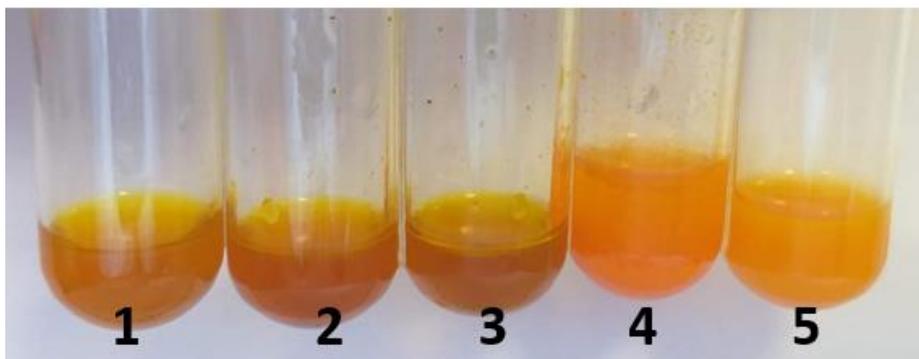


Figura 29. Prueba para identificación de alcaloides, 1. *nigrum s.*, 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum s.*: Amargo 290), 4. Estándar *Lupinus*, 5. Control negativo.

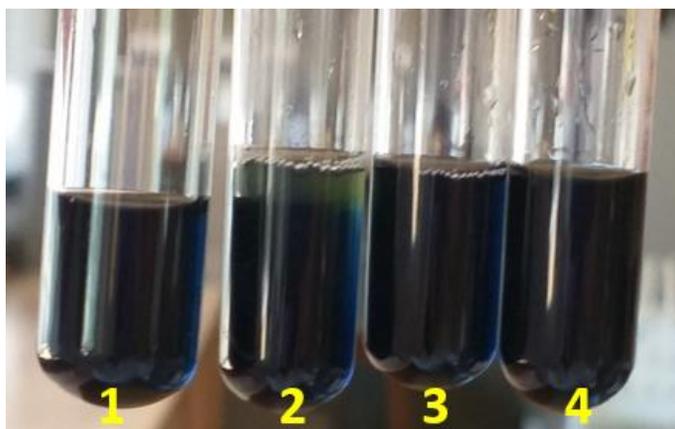


Figura 30. Prueba para identificación de fenoles, 1. *nigrum s.*, 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum s.*: Amargo 290), 4. Estándar ácido gálico.



Figura 31. Prueba para identificación de flavonoides, 1. *nigrum s.*, 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum s.*: Amargo 290), 4. Estándar quercetina.

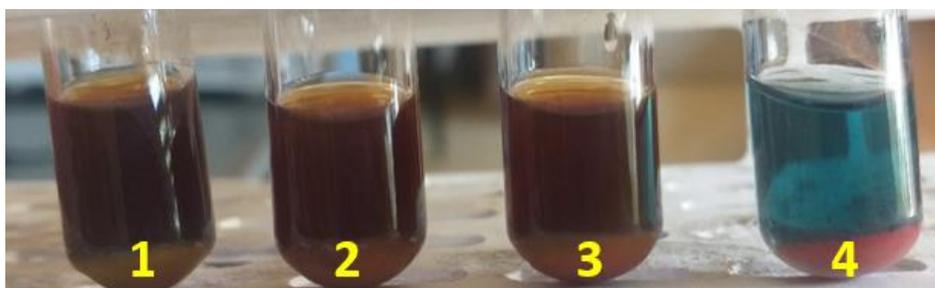


Figura 32. Prueba para identificación de saponinas en extracto metanólico, 1. *nigrum s.*, 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum s.*: Amargo 290), 4. Estándar saponina de soya en polvo.

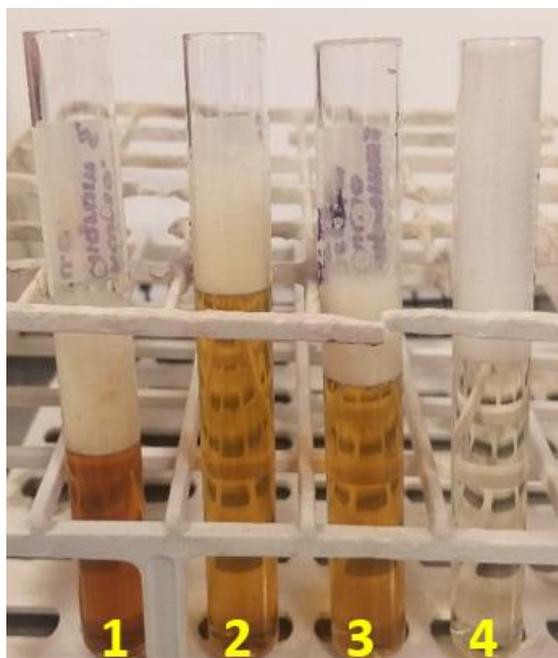


Figura 33. Prueba para identificación de saponinas, 1. *nigrum* S., 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum* S.: Amargo 290), 4. Estándar saponina de soya en polvo.

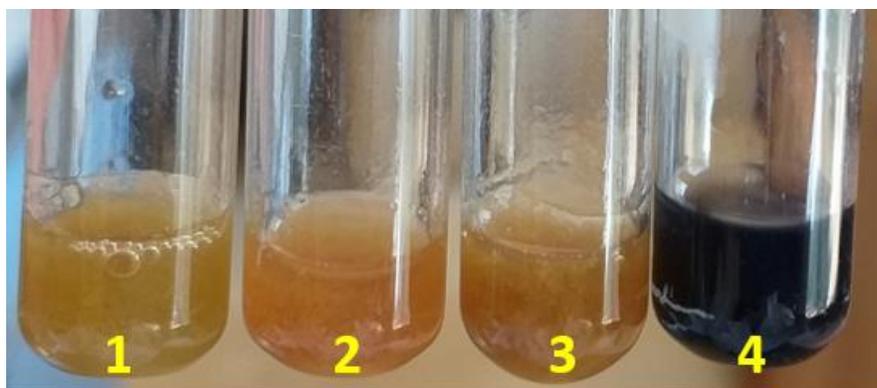


Figura 34. Prueba para identificación de taninos, 1. *nigrum* s., 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum* s.: Amargo 290), 4. Estándar ácido Tanico.



Figura 35. Prueba para identificación de terpenos, 1. *nigrum s.*, 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum s.*: Amargo 290), 4. Estándar ácido ursólico.

Anexo 2. Cromatografía de capa fina de alcaloides y taninos



Figura 36. Placa para identificación de alcaloides, 1. *nigrum s.*, 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum s.*: Amargo 290), 4. Estándar *Lupinus*.

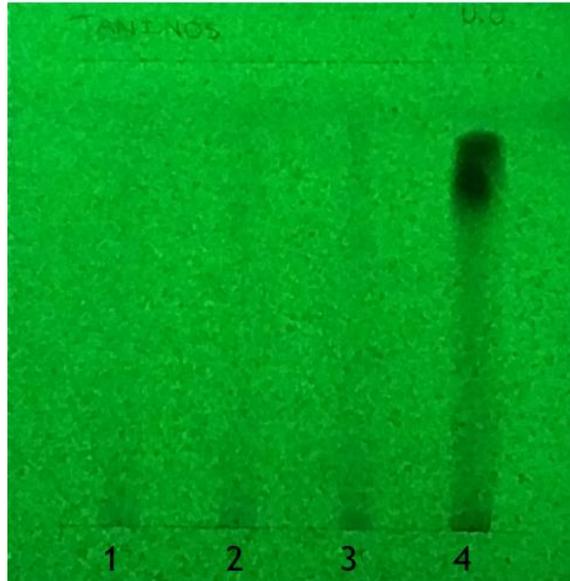


Figura 37. Placas para identificación de taninos, 1. *nigrum s.*, 2. Amargo 290, 3. Mezcla 80:20 (*nigrum s.*: Amargo 290), 4. Estándar ácido tánico.

Anexo 3. Prueba de DPPH

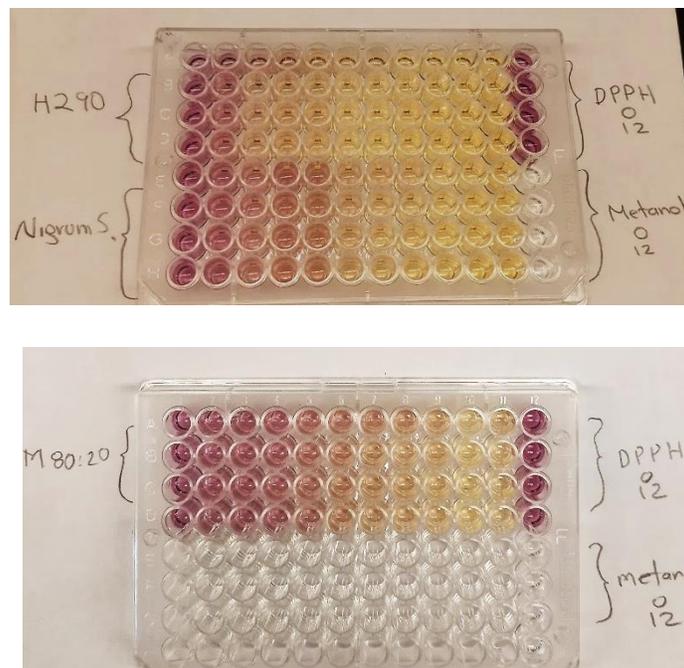


Figura 38. Prueba *in vitro* para los genotipos de *Sechium edule nigrum spinosum*, amargo 290 y mezcla 80:20.

Anexo 4. Prueba CAT

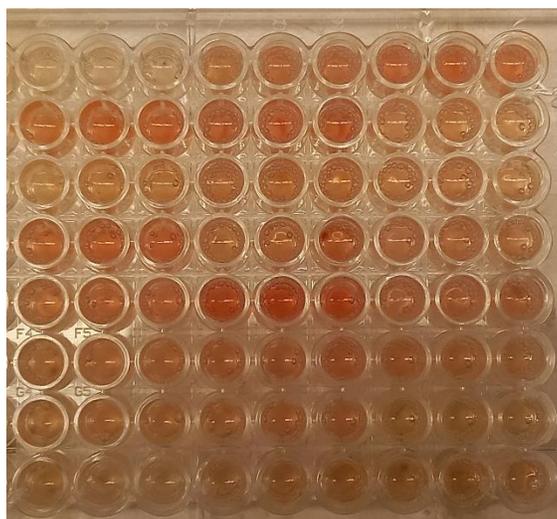
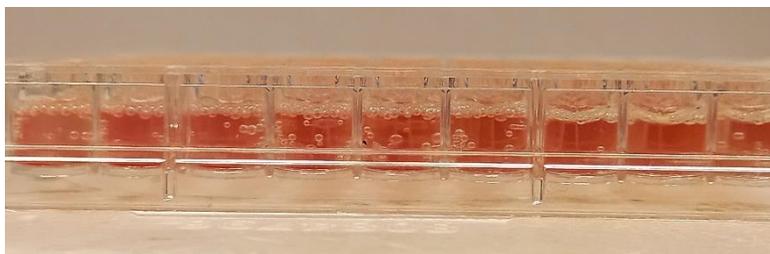


Figura 39. Reacción de la prueba de CAT (catalasa) para los genotipos de *Sechium edule nigrum spinosum*, amargo 290 y mezcla 80:20.