

ESTUDIO BIODIRIGIDO DE UN EXTRACTO ALCOHÓLICO DE FRUTOS DE *Sechium edule* (Jacq.) Swartz

BIO-GUIDED STUDY OF AN ALCOHOLIC EXTRACT OF *Sechium edule* (Jacq.) Swartz FRUITS

M. Elena Monroy-Vázquez^{1,2}, Marcos Soto-Hernández^{1,2*}, Jorge Cadena-Iñiguez^{2,3}, Edelmiro Santiago-Osorio^{2,4}, Lucero del Mar Ruiz-Posadas^{1,2}, Hortensia Rosas-Acevedo⁵

¹Botánica. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ²Interdisciplinary Research Group of *Sechium edule* in México (GISEM), Agustín Melgar 10. 56153. Texcoco, Estado de México. (msoto@colpos.mx). ³Campus San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados. 78600. Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. ⁴Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 09230. Avenida Guelatao 66, Iztapalapa, México D.F. ⁵Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 0450. Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, México, D.F.

RESUMEN

Sechium edule (chayote) es una especie neotropical con amplia variación biológica en forma, color y sabor de los frutos, los cuales han sido utilizados como fuente de alimento y medicina. En esta investigación se usaron frutos de *S. edule* var. *nigrum spinosum* para evaluar la actividad antiproliferativa y citotóxica en dos líneas tumorales (L-929 y HeLa); además, de aislar y caracterizar los componentes de mayor actividad a partir de un extracto alcohólico. El extracto se fraccionó por cromatografía en columna, los ensayos biológicos se realizaron con el extracto y las fracciones principales evaluando seis concentraciones (0, 0.047, 0.23, 0.47, 1.18, 2.37 mg·mL⁻¹). De cuatro fracciones aisladas, tres tuvieron actividad antiproliferativa y citotóxica de tipo dosis dependiente. El análisis por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, reveló como componentes mayoritarios de la fracción más activa a ésteres de tipo metílico de ácido hexadecanoico, etílico del ácido hexadecanoico, metílico del ácido 10-octadecenoico, metílico del ácido octadecanoico, octílico del ácido octadecenoico y metílico del ácido 9-oxononanoico, ampliando con ello la gama de especies vegetales con posibilidad de detener la proliferación de células cancerígenas.

Palabras clave: Cáncer, chayote, fracciones, ácidos grasos, Cucurbitaceae

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Junio, 2008. Aprobado: Agosto, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 777-790. 2009.

ABSTRACT

Sechium edule (chayote) is a Neotropic species with wide biologic variation of form, color, and fruits flavor fruits, which has been utilized as source of food and medicine. In this research, fruits of *S. edule* var. *nigrum spinosum* were used in order to assess antiproliferative and cytotoxic activity in two tumoral lines (L-929 and HeLa), besides for isolating and characterizing the components of most important activity starting from an alcoholic extract. The extract was fractionated by column chromatography; the bioassays were carried out using the extract and the main fractions assessing six concentrations (0, 0.047, 0.23, 0.47, 1.18, 2.37 mg mL⁻¹). Three out of four isolated fractions had antiproliferative and cytotoxic dose-dependent activity. The analysis by hydrogen nuclear magnetic resonance and gas chromatography, coupled to mass spectrometry, revealed esters of: methyl of hexadecanoic acid, ethyl of hexadecanoic acid, methyl of 10-octadecenoic acid, methyl of octadecenoic acid, octyl of octadecenoic acid, and methyl of 9-oxononanoic methyl acid as the principal components of the most active fraction, thus extending the range of vegetal species with the possibility of blocking proliferation of carcinogenic cells.

Key words: Cancer, chayote, fractions, fatty acids, Cucurbitaceae.

INTRODUCTION

Natural products coming from plants are valued by man as source of active principles for medicinal use (Farnsworth *et al.*, 1992), due to their chemical constituents, generally secondary

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales provenientes de plantas son valorados por el hombre como fuente de principios activos para uso medicinal (Farnsworth *et al.*, 1992) debido a sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios (Bye *et al.*, 1992), que en la naturaleza funcionan como defensa química contra herbívoros. La complejidad estructural de estos metabolitos puede determinar su actividad biológica; por lo que representan un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos (Hostettmann *et al.*, 1995). La búsqueda de medicamentos naturales surge por el incremento en la frecuencia de padecimientos como el cáncer. Éste se ha extendido en el panorama epidemiológico mundial desde finales del siglo XX, con un registro de 22 millones de casos. En México, el cáncer ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte (INEGI, 2007); causando en el año 2001, la pérdida de 33.5 años potenciales de vida (RHNM, 2001). En términos de tratamiento del cáncer, existen serias limitaciones debido a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos y a la resistencia desarrollada por algunas células cancerosas a dichos productos (Setzer y Setzer, 2003); por ello, los compuestos obtenidos mediante la extracción fitoquímica, cobran relevancia como nuevos recursos para tratamientos alternativos y la farmacéutica (Mans *et al.*, 2000).

Sechium edule (Cucurbitaceae), comúnmente llamado “chayote”, es una especie neotropical (Newstrom, 1991), estudiada desde el punto de vista taxonómico, ecológico, nutricional, agronómico, fisiológico, químico y genético (Lira-Saade y Caballero, 2002; Modgil *et al.*, 2004; Cadena-Íñiguez, 2005). El chayote se emplea en la medicina tradicional como diurético, cardiovascular, antiinflamatorio, contra calcificaciones renales y arteriosclerosis (Jensen y Lai, 1986). Contiene alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides, triterpenos (Salama *et al.*, 1986) y flavonoides glicosilados (Siciliano *et al.*, 2004). Se le atribuyen propiedades antiinflamatorias (Salama *et al.*, 1987); antihipertensivas (Gordon *et al.*, 2000); antimicrobianas (Ordoñez *et al.*, 2003) y antioxidantes (Ordoñez *et al.*, 2006), validadas con estudios farmacológicos. Una característica importante de *S. edule*, es su variación biológica, observada principalmente en la forma, color y sabor

metabolitos (Bye *et al.*, 1992) que en la naturaleza funcionan como defensa química contra herbívoros. La complejidad estructural de estos metabolitos puede determinar su actividad biológica; por lo que representan un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos (Hostettmann *et al.*, 1995). La búsqueda de medicamentos naturales surge por el incremento en la frecuencia de padecimientos como el cáncer. Éste se ha extendido en el panorama epidemiológico mundial desde finales del siglo XX, con un registro de 22 millones de casos. En México, desde 1990 el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte (INEGI, 2007); causando en el año 2001, la pérdida de 33.5 años potenciales de vida (RHNM, 2001). En términos de tratamiento del cáncer, existen serias limitaciones debido a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos y a la resistencia desarrollada por algunas células cancerosas a dichos productos (Setzer y Setzer, 2003); por ello, los compuestos obtenidos mediante la extracción fitoquímica, cobran relevancia como nuevos recursos para tratamientos alternativos y la farmacéutica (Mans *et al.*, 2000).

Sechium edule (Cucurbitaceae), usualmente llamado “chayote”, es una especie neotropical (Newstrom, 1991), estudiada desde el punto de vista taxonómico, ecológico, nutricional, agronómico, fisiológico, químico y genético (Lira-Saade y Caballero, 2002; Modgil *et al.*, 2004; Cadena-Íñiguez, 2005). El chayote se emplea en la medicina tradicional como diurético, cardiovascular, antiinflamatorio, contra calcificaciones renales y arteriosclerosis (Jensen y Lai, 1986). Contiene alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides, triterpenos (Salama *et al.*, 1986), y glicosidos flavonoides (Siciliano *et al.*, 2004). Antiinflamatorio (Salama *et al.*, 1987), antihipertensivo (Gordon *et al.*, 2000), antimicrobiano (Ordoñez *et al.*, 2003), y propiedades antioxidantes (Ordoñez *et al.*, 2006) se atribuyen al chayote, validadas por estudios farmacológicos. Una característica importante de *S. edule* es su variación biológica, principalmente observada en la forma, color y sabor de los frutos, atribuido a la variación en la concentración de triterpenos tetracyclicos, como los cucurbitacinas (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2007a). Partiendo de lo mencionado y basado en el hecho de que estos metabolitos tienen potencial actividad como agentes antineoplásicos (Anónimo, 1996), además de la búsqueda de nuevos usos para esta especie, Cadena-Íñiguez (2005) y Cadena-Íñiguez *et al.* (2006) evaluaron extractos alcohólicos de frutos de ocho variedades en líneas tumorales P-388 y L-929 (leucemia monocítica)

de los frutos, atribuido éste último a la variación en la concentración de triterpenos tetracíclicos, tales como las cucurbitacinas (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007a). Partiendo de lo anterior y con base en que estos metabolitos tienen actividad potencial como agente antineoplásico (Anónimo, 1996), además de la búsqueda de nuevos usos para esta especie, Cadena-Iñiguez (2005) y Cadena-Iñiguez *et al.* (2006), evaluaron los extractos alcohólicos de frutos de ocho variedades en las líneas tumorales P-388 y L-929 (leucemia monocítica y fibrosarcoma de pulmón respectivamente), de los cuales *S. edule* var. *nigrum spinosum*, mostró la mayor actividad antiproliferativa, sin embargo, no se identificaron los metabolitos contenidos en el extracto responsables de dicha acción. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se planteó la hipótesis bajo un enfoque bioprospectivo que *S. edule* var. *nigrum spinosum* tiene actividad antineoplásica por contener en su composición bioquímica metabolitos del grupo de los triterpenos tetracíclicos; por tal motivo, se evaluó un extracto alcohólico de frutos de dicha variedad, con el fin de determinar su actividad en dos líneas tumorales, además de identificar los principales metabolitos responsables de la misma, de tal forma que lo anterior permita enriquecer el valor de uso de este recurso fitogenético Mesoamericano como un alimento funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal, extracción y aislamiento

Se utilizaron frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., var. *nigrum spinosum*, procedentes del Banco Nacional de Germoplasma de *S. edule* en México. Esta variedad se desarrolla bajo condiciones de cultivo, en altitudes que oscilan entre los 800 a 2500 m, con requerimientos de alta humedad ambiental (80-85 %), suelos ácidos a ligeramente ácidos (4.5 a 6.5 de pH), bien drenados y ricos en humus (Flores, 1989; Cadena, *et al.*, 2001), con precipitación media anual de 1500 a 2000 mm., fotoperiodo de hasta 12 h luz para inicio de floración y temperaturas de 20 a 25 °C; es muy susceptible a la sequía, heladas que generalmente ocasionan muerte de la planta (Cadena *et al.*, 2001). El ejemplar herborizado se depositó en el Herbario Ortorio del Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México, con la accesión No. 300-2005.

A diferencia del resto de las variedades tanto cultivadas como en condiciones de traspatio, *n. spinosum*, presenta en la composición de sus frutos hasta diez veces más contenido de

and lung fibrosarcoma, respectively), of which *S. edule* var. *nigrum spinosum* showed the highest antiproliferative activity; however, the metabolites contained in the extract which produced this effect, were not identified. Based on the aforesaid, in the present study the hypothesis was exposed under a bioprospective approach that *S. edule* var. *nigrum spinosum* has antineoplastic activity because of containing metabolites of the tetracyclic triterpene group in its biochemical composition; therefore, an alcoholic fruit extract of this variety was assessed, with the purpose to determine its activity in two tumoral lines, besides identifying the principal metabolites responsible for this activity, so that the aforementioned allows enriching the value of this Middle American phylogenetic resource using it as functional food.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal Material, Extraction and Isolation

Sechium edule (Jacq.) Sw., var. *nigrum spinosum* from the Banco Nacional de Germoplasma de *S. edule* in México was used. This variety is developed under crop conditions at altitudes between 800 and 2500 m, with requirements of high environmental humidity (80-85 %), acid and slightly acid soils (4.5 to 6.5 pH), well-drained and rich in humus (Flores, 1989; Cadena *et al.*, 2001). With annual mean precipitation of 1500 to 2000 mm, photoperiod of up to 12 h light for the beginning of flowering, and temperatures of 20 to 25 °C, it is highly susceptible to drought and frosts that generally cause plant mortality (Cadena *et al.*, 2001). The herbaceous specimen was deposited in the Herbario Ortorio of the Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Mexico, with accession No.300-2005.

Unlike the rest of the varieties, cultivated as well as under backyard conditions, *n. spinosum* has in its fruit composition up to ten times as much tetracyclic triterpene content as the varieties of yellow fruits like *a. levis* and *a. dulcis*; and presumably the type of metabolites with respect to the varieties of green fruits like *nigrum levis*, *virens levis*, *nigrum xalapensis* show higher antiproliferative activity in the preliminary assays (Cadena-Iñiguez, 2005; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2005). The fruits were used when reaching horticultural maturity at 18 ± 2 days after anthesis (Aung *et al.*, 1996; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007b), chopped in small pieces, dried for three days at 50 °C up to 10% humidity, and macerated for standardizing at 2 mm particle size (no.10 mesh). Subsequently, a discontinuous extraction was made submerging the macerated fruit in methanol (99.8 %, certified

triterpenos tetracíclicos que las variedades de frutos amarillos, tales como *albus minor*, *a. levis* y *a. dulcis*, y presumiblemente el tipo de metabolitos respecto a las variedades de fruto color verde como *nigrum levis*, *virens levis*, *nigrum xalapensis*, muestran mayor actividad antiproliferativa en los ensayos preliminares (Cadena-Iñiguez, 2005; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2005). Los frutos se usaron cuando alcanzaron su madurez hortícola a los 18 ± 2 días después de antesis (Aung *et al.*, 1996; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007b), cortados en trozos pequeños, secados por tres días a 50°C , hasta 10 % de humedad y macerados para estandarizar a tamaño de partícula de 2mm (malla No. 10). Posteriormente, se realizó una extracción discontinua al sumergir el macerado en metanol (99.8 %, ACS certificado, Merck) por 48 horas a temperatura ambiente ($20^\circ\text{C} \pm 2$). El extracto alcohólico se filtró con papel en 12 ocasiones, renovando el disolvente, hasta que el macerado no produjo filtrados con color; posteriormente, se evaporó el disolvente a presión reducida (Rotavapor Büchi, R-114, Suiza) a 45°C , hasta obtener un extracto crudo sin disolvente orgánico (Kuklinski, 2000), el cual fue evaluado en un primer bioensayo. Posteriormente, a partir de 20 g de extracto, se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna (CC), empacada con gel de sílice 60 (Merck, D. F. México), con fase móvil de hexano-acetato de etilo (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1) y acetato de etilo-metanol (10:0, 9:1, 8:2). Se recolectaron fracciones de 100 mL cada una; éstas se monitorearon por cromatografía en capa fina, empleando como adsorbente gel de sílice (60 GF₂₅₄, Merck, México) con fase móvil acetato de etilo-metanol (8:2). Las cromatoplasas se observaron con luz UV a 254 y 365 nm (Cole-Parmer 9818, Chicago) y se revelaron con un agente cromogénico de anisaldehído-ácido acético glacial-metanol-ácido sulfúrico (0.05, 1.0, 8.5 y 0.5 mL, respectivamente) calentando a 110°C por 5 min, lo que permitió reunir las fracciones por su identidad cromatográfica. La selección de las fracciones para la segunda fase de ensayos biológicos, se realizó con base en la coloración de las marcas rojo violeta y café marrón de la cromatoplasa relacionadas con compuestos triterpénicos (Che *et al.*, 1985; Afifi *et al.*, 1999).

Evaluación de la actividad antiproliferativa

La evaluación de la acción antineoplásica se realizó a través de la medición de la actividad antiproliferativa y el índice de citotoxicidad. La primera se define biológicamente, como la reducción en número de la multiplicación celular, mientras que la citotoxicidad se refiere a la cualidad de ser tóxico a células provocando su destrucción (National Cancer Institute, 2009). Los bioensayos se realizaron empleando las líneas celulares tumorales L-929 (fibrosarcoma de pulmón de ratón) y HeLa (cáncer cérvico-uterino humano). Las líneas se mantuvieron

ACS, Merck) for 48 h at environmental temperature ($20^\circ\text{C} \pm 2$). The alcoholic extract was filtered through filter paper 12 times, changing the solvent until the crushed fruit produced filtrates without coloring, later on, the solvent evaporated at reduced pressure (Rotavapor Büchi, R-114, Switzerland) at 45°C , until obtaining a raw extract without organic solvent (Kuklinski, 2000), which was assessed in a first bioassay. Subsequently, starting from 20 g of extract, fractionation by column chromatography (CC) was carried out, packed with silica gel 60 (Merck, D.F. México) with hexane-ethyl acetate as mobile phase (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1), and ethyl acetate-methanol (10:0, 9:1, 8:2). Fractions of 100mL each were collected and monitored by thin-layer chromatography, employing silica gel as absorbent (60 GF₂₅₄, Merck, Mexico) with ethyl acetate-methanol (8:2) as mobile phase. Chromatoplates were observed under UV light at 254 and 365 nm (Cole-Parmer 9818, Chicago) and revealed using a chromogenic agent of acetic anisaldehyde-acetic acid - methanol-sulfuric acid (0.05, 1.0, 8.5, and 0.5 mL, respectively) heating to 110°C for 5 min, which allowed joining the fractions by their chromatographic identity. The selection of fractions for the second phase of bioassays was made, based on the coloring of violet red and coffee brown marks of the chromatoplate related to triterpenoid compounds (Che *et al.*, 1985; Afifi *et al.*, 1999).

Assessment of Antiproliferative Activity

Evaluation of antineoplastic action was carried out through measuring of antiproliferative activity and the cytotoxicity index. The former is biologically defined as reduction in number of cell multiplication, whereas cytotoxicity refers to the quality of being toxic for cells provoking their destruction (National Cancer Institute, 2009). Bioassays were conducted employing the tumoral cell lines L-929 (rat lung fibrosarcome) and HeLa (human uterine cervical cancer). The lines were kept as crops in monolayer in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen, U.S.A.) supplemented with 10 % deactivated SFB (bovine fetal serum) (Gibco BRL, U.S.A.) at 37°C at 5 % CO_2 atmosphere and 95 % humidity in incubator (scientific Thermo Form, Marietta, U.S.A.), at density of 1×10^6 cells mL^{-1} . The alcoholic extract, as well as the fractions (71.2 mg of each) were solubilized in 40 μL absolute ethanol and 960 μL phosphate buffer solution (PBS: sodium chloride (8 g), potassium chloride (0.2 g), monobasic potassium phosphate (0.2 g), dibasic sodium phosphate (2.16 g), 7.2 – 7.4 pH (SIGMA, CHEM, St. Louis, U.S.A.). The mixture was centrifuged at 500 g during 5 min (Hermle-Labortechnik, Germany). Supernatants were filtered in order to obtain a stock of 14.24 mg per every 600 μL of PBS; this was diluted to concentrations of 0, 0.047, 0.23, 0.47, 1.18, 2.37 mg mL^{-1} . L-929 and HeLa lines were re-sown in plates

como cultivos en monocapa, en IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen, USA) suplementado con 10 % de SFB (suero fetal bovino) desactivado (Gibco BRL, USA), a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ y 95 % de humedad en incubadora (Thermo Forma científica, Marietta, USA), a una densidad de 1×10⁶ células·mL⁻¹. Tanto el extracto alcohólico como las fracciones (71.2 mg de cada una) se solubilizaron en 40 µL de etanol absoluto y 960 µL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS: cloruro de sodio (8 g), cloruro de potasio (0.2 g), fosfato de potasio monobásico (0.2 g), fosfato de sodio dibásico (2.16 g), pH 7.2-7.4 (SIGMA, CHEM, St. Louis, USA). La mezcla se centrifugó a 500 g durante 5 min (Hermle-Labortechnik, Alemania). Los sobrenadantes se filtraron para obtener un stock de 14.24 mg por cada 600 µL de PBS; éste se diluyó a concentraciones de 0, 0.047, 0.23, 0.47, 1.18, 2.37 mg·mL⁻¹. Las líneas L-929 y HeLa se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 2×10⁴ células·mL⁻¹ de medio de cultivo, adicionando el extracto o las fracciones en las concentraciones indicadas y se co-cultivaron por 72 h. Posteriormente, las células adheridas al pozo se fijaron con glutaraldehído al 1 % durante una hora, después se adicionó la solución de cristal violeta (Sigma, St. Louis Missouri, USA) para colorear el núcleo celular (Kueng *et al.*, 1989), como método indirecto para cuantificar el número celular (Gillies *et al.*, 1986); las placas se agitaron por 10 min (Labnet International Inc. Woodbridge, USA) y se retiró el exceso de colorante con agua destilada. En seguida se agregaron 50 µL·pozo⁻¹ de ácido acético al 10 %, agitándolo durante 20 min para solubilizar el colorante. La densidad óptica de las células fue evaluada a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Spectra Tecan Image, Austria). Los bioensayos se realizaron en dos ocasiones, con tres repeticiones.

Evaluación de la citotoxicidad

Los sobrenadantes de los ensayos de proliferación celular se emplearon para evaluar la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), encontrada en el citoplasma celular (Tejió *et al.*, 2006). La enzima LDH es empleada para cuantificar el daño a la membrana celular mediante la liberación del lactato de deshidrogenasa en el sobrenadante (Fischer *et al.*, 2002). La actividad de LDH es medida por una prueba enzimática para la cual, primero el NAD⁺ es reducido a NADH/H⁺ por tanto el LDH catalizado es convertido a lactato de piruvato. En la segunda etapa de catálisis se transfieren H/H⁺ y se convierte en sal de tetrazolio que es reducida a formazan que puede ser identificada colorimétricamente (Abe y Matsuki *et al.*, 2000). Los sobrenadantes se co-cultivaron a temperatura ambiente (22±2 °C) por 30 min con el kit de detección de LDH (Roche^{MR}, México). Para determinar el porcentaje de citotoxicidad se requiere de un control positivo el cual permite

of 96 wells at 2×10⁴ cells mL⁻¹ of culture medium density, adding extract or fractions in the indicated concentrations and co-cultivating them for 72 hours. Subsequently, the cells adhered to the well were fixed with 1% glutaraldehyde during one hour, afterwards the violet glass solution (Sigma, St. Louis Missouri USA) was added in order to color the cell nucleus (Kueng *et al.*, 1989) as an indirect method for quantifying cell number (Gillies *et al.*, 1986); the plates were shaken for 10 min (Labnet International Inc. Woolbridge, USA) and the excess of color was removed with distilled water. Next, 50 µL well⁻¹ of acetic acid at 10 % were added shaking during 20 min in order to solubilize the color. Optical cell density was assessed at 570 nm using a plate spectrophotometer (Spectra Tecan Image, Austria). The bioassays were carried out on two occasions with three replications.

Cytotoxicity Assessment

Supernatants of cell proliferation assays were utilized to evaluate the presence of lactate dehydrogenase enzyme (LDH) found in cell cytoplasm (Tejió *et al.*, 2006). The LDH enzyme is utilized to quantify damage to cell membrane by release of dehydrogenase lactate in the supernatant (Fischer *et al.*, 2002). LDH activity is measured by enzymatic test for which first NAD⁺ is reduced to NADH/H⁺, therefore the catalyzed LDH is turned to pyruvate lactate. In the second phase of catalysis, H/H⁺ are transferred and turned into tetrazolium salt, which is reduced to formazan which may be identified colorimetrically (Abe and Matsuki *et al.*, 2000). The supernatants were co-cultivated at environmental temperature (22±2 °C) for 30 min with the LDH detection kit (Roche^{MR}, Mexico). In order to determine cytotoxicity percentage a positive control is required, which allows obtaining absolute cell toxicity; to this purpose, 30 min before concluding culturing time, a Triton X-100 solution at 2 % (Sigma, USA) with culture medium, in relation 1:1, was added; the culturing time having passed, cytotoxicity was assessed, using the Cytotoxicity Detection (LHD) kit (Roche, Diagnostics, Germany). The tests were read at optical density of 490 nm on a plate reader (Image, Tecan-Spectra, Austria). Three controls per assay were established: one in depth with 200 µL well⁻¹ of 10 % SFB medium, the negative one with 100 µL medium in 100 µL of cells; and the positive one with 100 µL of cells and 100 µL of Triton X-100 (Sigma, USA) at 2 % culture medium. In order to determine cytotoxicity percentage absorbance readings were utilized; the difference between the value of negative control and the value obtained experimentally was divided between the difference of positive and negative control. The resulting quotient was multiplied by 100. In order to eliminate the effect of absorbance of the culture medium, the mean value of the

obtener la toxicidad celular absoluta; para ello, 30 min antes de concluir el tiempo de cultivo se adicionó una solución de Tritón X-100 al 2 % (Sigma, USA) con medio de cultivo, en relación 1:1; transcurrido el tiempo de cultivo se evaluó la citotoxicidad con el kit Cytotoxicity Detection (LDH) (Roche, Diagnostics, Germany). Las muestras fueron leídas a una densidad óptica de 490 nm en un lector de placas (Image, TECAN-SPECTRA, Austria). Por cada ensayo se establecieron tres controles: el de fondo con 200 μ L-pozo-1 de medio al 10 % de SFB; el negativo con 100 μ L de medio en 100 μ L de células; y el positivo con 100 μ L de células y 100 μ L de Tritón X-100 (Sigma, USA) al 2 % de medio de cultivo. Para determinar el porcentaje de citotoxicidad, se emplearon las lecturas de absorbancia; la diferencia entre el valor del control negativo y el valor experimental obtenido se dividió entre la diferencia del control positivo y el negativo. El cociente resultante se multiplicó por 100. Para eliminar el efecto de la absorbancia del medio de cultivo, se restó el valor promedio del control de fondo a los valores experimentales, el control positivo y el negativo (Mora-García *et al.*, 2006).

Identificación de las fracciones activas y análisis estadístico

Las fracciones activas fueron sometidas al análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H NMR) a 200 MHz y a cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) usando un espectrómetro JMS-AX 505HA (JEOL) acoplado al cromatógrafo GC Hewlett Packard 5890 series II, equipado con una columna capilar (25 m \times 20 mm i. d. \times 0.33 μ m de espesor), con fenil-metil polisiloxano como fase estacionaria. La columna se mantuvo a 100 °C por un min y luego se calentó a 260 °C a 10 °C por min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y se operó en modo Split en una relación 70:1. El análisis de las masas separadas se hizo por impacto electrónico de 69.9 eV con la fuente de ionización a 230 °C. El análisis estadístico fue realizado considerando los valores de absorbancia (570 nm) obtenidos en los ensayos de proliferación, como forma indirecta de cuantificar el número celular de cada cultivo. Dichos valores fueron sometidos a un análisis de varianza, con un nivel de significancia de α 0.05, α 0.01 y prueba de Tukey. Se empleó el software SAS[®], versión 9.0 (SAS Institute Inc., USA), teniendo como variables al extracto, las fracciones y las concentraciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera fase de bioensayos se realizó con el extracto crudo y se observó que las actividades antiproliferativa y citotóxica fueron de tipo dosis dependiente. La inhibición de la proliferación

control in depth was subtracted from the experimental values, the positive and the negative control (Mora-García *et al.*, 2006).

Identification of Active Fractions and Statistical Analysis

The active fractions were submitted to analysis of hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) at 200 MHz and to gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS) using a JMS-AX 505HA (JEOL) spectrometer connected with a GC Hewlett Packard 5890 chromatograph series II, equipped with a capillary column (25 m \times 20 mm i. d. \times 0.33 μ m thickness), with phenyl-methyl polysiloxane as stationary phase. The column was kept at 100 °C for 1 min and then heated to 260 °C at 10 °C per min. The injector temperature was 250 °C and operated in the way of Split in a 70:1 relation. Masses analysis was made by electronic impact of 69.9 eV with ionization source at 230 °C. The statistical analysis was conducted considering the absorbance values (570 nm) obtained in proliferation assays, as an indirect way of quantifying the cell number of each culture. These values were submitted to analysis of variance with significance level α 0.05, α 0.01, and Tukey test. SAS software version 9.0 (SAS Institute Inc., USA) was employed, taking the fractions and concentrations as extract variables.

RESULTS AND DISCUSSION

The first phase of bioassays was carried out using raw extract, and it was observed that antiproliferative and cytotoxic activities were of dose-dependent type. Inhibition of cell proliferation was higher in L-929 than in HeLa starting from intermediate doses, recording inhibiting mean concentration (IC_{50}) of 1.54 and 1.82 mg mL^{-1} , respectively, in other words, the amount of extract (inhibiting agent), needed to inhibit the biological process of cell proliferation to 50 %. Related to cytotoxic mean concentration (CC_{50}) or effective maximum mean concentration (EC_{50}), values of 2.22 and 2.68 mg mL^{-1} for L-929 and HeLa, respectively (Figure 1), and in both cases, dose-response curves were recorded. It has been demonstrated that raw extracts of species like *Syzygium samarangense* (Blume) and *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thw., are cytotoxic on cancer lines of human colon (SW-480 and SW-620) with IC_{50} of 35 μ M and 6.1 μ g mL^{-1} , respectively, (Simirgiotis *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2008); as well *Terminalia catappa* L., and *Pinus massoi* Lamb., prevented lung (A549) and breast cancer (MCF-7 and HELF) proliferation in concentrations of 100 and 500 μ g mL^{-1} , respectively (Chu *et al.*, 2007; Yu

celular fue mayor en L-929 que en HeLa desde dosis intermedias, registrando una concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 1.54 y 1.82 $mg \cdot mL^{-1}$ respectivamente, es decir, cuánto extracto (agente inhibidor) fue necesario para inhibir el proceso biológico de proliferación celular al 50 %. En relación a la concentración citotóxica media (CC_{50}), o concentración media máxima efectiva (EC_{50}), se registraron valores de 2.22 y 2.68 $mg \cdot mL^{-1}$ para L-929 y HeLa, respectivamente (Figura 1), y en ambos caso, se registraron curvas dosis respuesta. Se ha demostrado que extractos crudos de especies como *Syzygium samarangense* (Blume) y *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thw., son citotóxicas sobre líneas de cáncer de colon humano (SW-480 y SW-620), con IC_{50} de 35 μM y 6.1 $\mu g \cdot mL^{-1}$, respectivamente (Simirgiotis *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2008); también *Terminalia catappa* L., y *Pinus massoinana* Lamb., inhibieron la proliferación de cáncer de pulmón (A549) y pecho (MCF-7 y HELF) en concentraciones de 100 y 500 $\mu g \cdot mL^{-1}$ respectivamente (Chu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008). Aun cuando las concentraciones evaluadas del extracto crudo de *S. edule var. nigrum spinosum* fueron mayores a las referidas, los resultados permiten establecer en principio la potencialidad del extracto crudo como agente antineoplásico. A este respecto, Wu *et al.* (1998) demostraron que la proteína sechiumina de *S. edule*, inhibió la síntesis protéica en células HeLa y concluyeron que ésta

et al., 2008). Even though the evaluated raw extract concentrations of *S. edule var. nigrum spinosum* were higher than those referred to, the results in principle allow establishing the potential of raw extract as antineoplastic agent. Regarding this, Wu *et al.* (1998) proved that sechiumine protein of *S. edule* inhibited proteinaceous synthesis in HeLa cells and concluded that it may be used in the preparation of immunotoxins with chemotherapeutic potential. Cadena-Iñiguez *et al.* (2007b) reported antiproliferative activity of raw extracts of eight fruits of *S. edule* varieties in P-388 and L-929. Therefore, it is expected that *S. edule var. nigrum spinosum* alcoholic extract may contain metabolites, able to impede the carcinogenesis process, fractioning of raw extract being needed.

Based on CC_{50} , four main fractions were obtained, used to direct the second phase of bioassays. The first fraction 5-7 (215 mg) was of liquid oily consistence, yellow colored, obtained from hexane-ethyl acetate system (9:1). The second fraction 18-20 (35.4 mg) was sticky, of coffee-brown color, from ethyl hexane-ethyl acetate system (8:2); fraction 35 (18 mg) of sticky consistence showed light yellow color, was obtained from ethyl acetate-methanol (9:1), and fraction 39 (24 mg) was from ethyl acetate-methanol system (8.2). The bioassay results of antiproliferative activity showed dose-dependent inhibiting effect for fractions 5-7, 18-20, and 39, on which the bio-guided study was based. Fraction 35 did not present

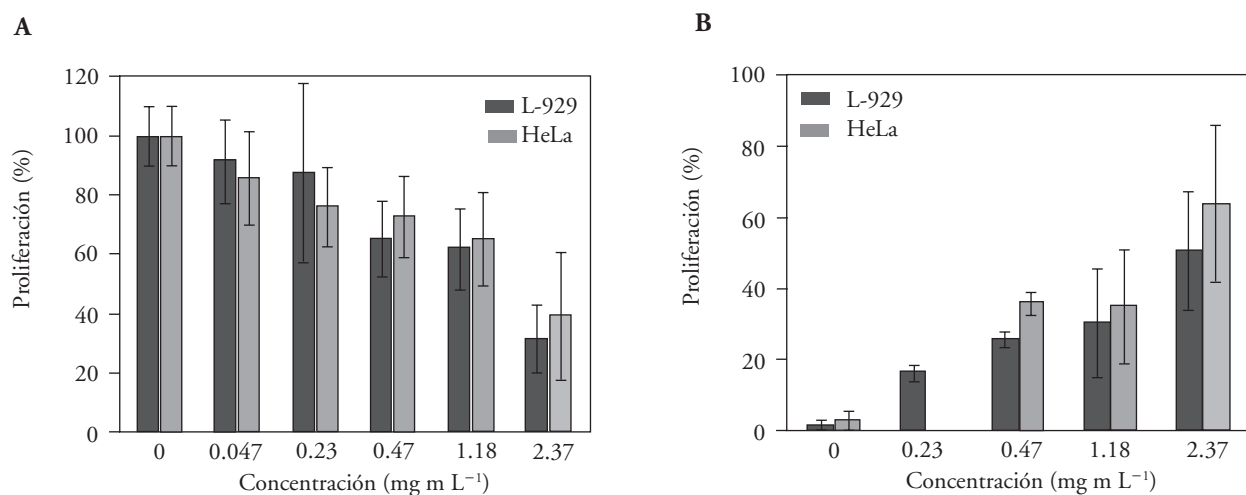


Figura 1. Efecto del extracto alcohólico (crudo) de frutos de *S. edule var. nigrum spinosum* sobre las líneas tumorales L-929 y HeLa. A: efecto antiproliferativo, B: efecto citotóxico. Los valores son producto de dos bioensayos con tres repeticiones por tratamiento, las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar.

Figure 1. Effect of alcoholic extract (raw) of *S. edule var. nigrum spinosum* on L-929 and HeLa tumoral lines. A: antiproliferative effect, B: cytotoxic effect. The values are the product of two bioassays with three replications per treatment; the lines above the bars indicate \pm standard deviation.

puede emplearse en la preparación de inmunotoxinas con potencial quimioterapéutico. Cadena-Iñiguez *et al.* (2007b) reportaron la actividad antiproliferativa de extractos crudos de frutos de ocho variedades de *S. edule* en P-388 y L-929. Por ello, se espera que el extracto alcohólico de *S. edule* var. *nigrum spinosum*, contenga metabolitos capaces de inhibir el proceso de carcinogénesis, haciendo necesario el fraccionamiento del extracto crudo.

Con base en la CC_{50} , se obtuvieron cuatro fracciones principales con las cuales se dirigió la segunda fase de ensayos biológicos. La primera fracción 5-7 (215 mg), fue de consistencia líquida oleosa color amarillo obtenida en sistema hexano-acetato de etilo (9:1). La segunda fracción 18-20 (35.4 mg) de consistencia pegajosa, color café marrón a partir del sistema hexano-acetato de etilo (8:2), la fracción 35 (18 mg), de consistencia pegajosa, color amarillo claro obtenida con el sistema acetato de etilo-metanol (9:1), y la fracción 39 (24 mg) del sistema acetato de etilo-metanol (8:2). Los resultados de los bioensayos de la actividad antiproliferativa, mostraron un efecto inhibitorio de tipo dosis dependiente para las fracciones 5-7, 18-20 y 39, con las cuales se siguió el estudio biodirigido. La fracción 35 no mostró actividad alguna y fue eliminada. La fracción 5-7 tuvo el mayor efecto antiproliferativo en ambas líneas, desde dosis intermedias (0.23 y 0.47 mg·mL⁻¹) para L-929 y desde dosis bajas (0.047 mg·mL⁻¹) para HeLa, lo cual permite sugerir especificidad sobre esta última. Respecto a la fracción 18-20, el mayor efecto se dio en la concentración más alta (2.37 mg·mL⁻¹) sobre L-929 y en HeLa en dosis intermedias (0.23, 0.47 y 1.18 mg·mL⁻¹) (Figura 2).

Los valores medios de esta fracción fueron significativamente diferentes en HeLa, lo que permite sugerir mayor especificidad para la misma, según la dosis. La fracción 39 mostró efecto significativo en la dosis más alta (2.37 mg·mL⁻¹) en ambas líneas. El Cuadro 1 muestra la comparación de medias de los valores de absorbancia, indicando diferencias significativas entre las concentraciones; sin embargo, los valores más altos en todos los casos correspondieron biológicamente a los valores de menor actividad antiproliferativa, ya que a menor absorbancia del sobrenadante de células tumorales, menor proliferación de éstas.

El análisis de varianza (ANOVA), mostró diferencia significativa a una $\alpha=0.05$ y altamente significativa con $\alpha=0.01$ para las fuentes de

any activity and was eliminated. Fraction 5-7 had the highest antiproliferative effect on both lines from intermediate doses (0.23 and 0.47 mg mL⁻¹) for L-929 and from low doses (0.047 mg mL⁻¹) for HeLa, which suggests specificity with respect to the latter. Regarding fraction 18-20, the greatest effect was reached in the highest concentration (2.37 mg mL⁻¹) on L-929 and HeLa in intermediate doses (0.23, 0.47, and 1.18 mg mL⁻¹) (Figure 2)

The mean values of this fraction were significantly different in HeLa, which suggests its higher specificity according to the dose. Fraction 39 showed considerable effect in the highest dose (2.37 mg mL⁻¹) on both lines. The Table 1 presents comparison of means of absorbency values, indicating significant differences among the concentrations; the highest values in all the cases, however, corresponded, biologically, to the values of lower antiproliferative activity, since the lower the absorbency of supernatant of tumoral cells, the lower their proliferation.

The variance analysis (ANOVA) showed significant difference to $\alpha=0.05$ and highly significant difference with respect to $\alpha=0.01$ for sources of variation (line, fraction and concentration) as well as for interactions line-fraction and fraction-concentration, from which it can be deduced that the response of antiproliferative activity on tumoral lines is strongly affected by the fraction and its concentration.

Since fraction 5-7 was the one of highest antiproliferative effect on both lines, the study was directed to the structural elucidation of its components. The ¹H MNR spectrum demonstrated that this fraction refers to a mixture of compounds whose structural base is the aliphatic chain. Subsequent chromatographic fractioning permitted isolation and identification of the principal components, which were: methyl ester of 9-oxo-nonanoic acid, methyl ester of hexadecanoic acid, ethyl ester of hexadecanoic acid, methyl ester of 10-octadecenoic acid, methyl ester of octadecanoic acid, and octyl ester of octadecenoic acid (Table 2). At separating these compounds from the mixture by CG (Figure 3), these structures were confirmed through fragmentation pattern analysis of their mass spectra.

The constituents of fraction 5-7 corresponded to fatty acid esters; it is known, that high concentrations of these metabolites cause cell mortality by apoptosis, and when the concentrations increase, cells die by necrosis due to inhibition of DNA synthesis

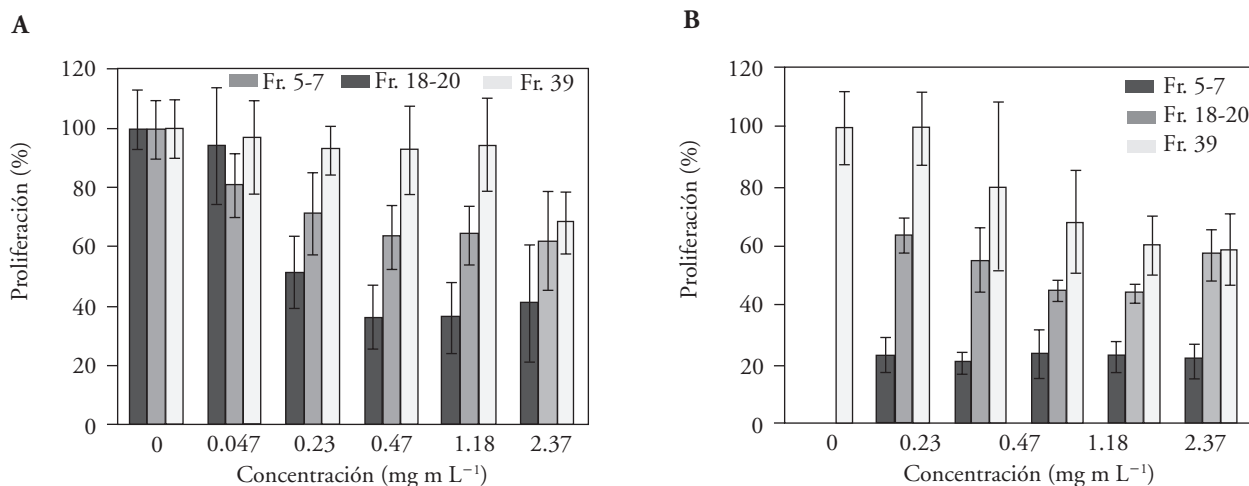


Figura 2. Actividad antiproliferativa de tres fracciones del extracto alcohólico (crudo) de frutos de *S. edule* var. *nigrum spinosum*. A: línea tumoral L-929, B: línea tumoral HeLa. Los valores son producto de dos bioensayos con tres repeticiones por tratamiento. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar.

Figure 2. Antiproliferative activity of three fractions of alcoholic extract (raw) of *S. edule* var. *nigrum spinosum* fruits. A: L-929 tumoral line, B: HeLa tumoral line. The values are the product of two bioassays with three replications per treatment; the lines above the bars indicate \pm standard deviation.

variación (línea, fracción y concentración) así como para las interacciones línea-fracción y fracción-concentración, de lo cual se desprende que la respuesta de la actividad antiproliferativa sobre las líneas tumorales, está fuertemente afectada por la fracción y la concentración de ésta.

(Kharroubi *et al.*, 2004; Benzaria *et al.*, 2007; Takeara *et al.*, 2007). De Lima *et al.* (2006) proved that these compounds increase the loss of cell membrane integrity and DNA fragmentation in macrophages. Furthermore, they may cause mitochondrial depolarization in leukemic lines (Otton and Curi,

Cuadro 1. Efecto del extracto alcohólico y tres fracciones químicas de frutos de *S. edule* var. *nigrum spinosum*, sobre la proliferación de L-929 y HeLa. Valores promedio de densidad óptica de los cultivos expresados en absorbancia, dos bioensayos con tres repeticiones por tratamiento.

Table 1. Effect of alcoholic extract and three chemical fractions of *S. edule* var. *nigrum spinosum* fruits on proliferation of L-929 and HeLa. Mean values of culture optical density expressed in absorbance, two bioassays with three replications per treatment.

	Concentración (mg·mL ⁻¹)					
	0	0.047	0.23	0.47	1.18	2.36
L-929 [†]	Absorbancia (570 nm)					
Extracto	1.02 a [‡]	1.80 ab	0.71 ab	0.56 abc	0.51 bcd	0.23 defgh
5-7	0.266 cdefg	0.251 cdefgh	0.141 efgh	0.100 efgh	0.100 efgh	0.106 efgh
18-20	0.101 efgh	0.081 fgh	0.070 gh	0.063 gh	0.064 gh	0.061 h
39	0.325 cde	0.316 cde	0.304 cdef	0.305 cdef	0.309 cdef	0.224 defgh
HeLa [§]						
Extracto	1.37 a	1.16 ab	1.03 bc	0.98 bc	0.89 c	0.52 d
5-7	0.309 de	0.074 gh	0.066 gh	0.077 gh	0.072 gh	0.069 gh
18-20	0.108 fgh	0.079 gh	0.068 gh	0.056 h	0.055 h	0.082 gh
39	0.242 ef	0.243 ef	0.190 efg	0.163 efg	0.152 efg	0.149e fgh

[†] Fibrosarcoma de pulmón de ratón ♦ Rat lung fibrosarcome.

[‡] Medias con distinta letra entre tratamientos por línea tumoral son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) ♦ Means with different letter among treatments per tumoral line are statistically different (Tukey $p \leq 0.05$).

[§] Cáncer cérvico uterino humano ♦ Human cervical cancer.

Dado que la fracción 5-7 fue la de mayor efecto antiproliferativo en ambas líneas, el estudio se dirigió a la elucidación estructural de sus componentes. El espectro ^1H MNR mostró que dicha fracción está referida a una mezcla de compuestos cuya base estructural es la cadena alifática. El fraccionamiento cromatográfico posterior permitió el aislamiento e identificación de los componentes mayoritarios, los cuales fueron: esteres del tipo metílico del ácido 9-oxo-nonanoico, metílico del ácido hexadecanoico, etílico del ácido hexadecanoico, metílico del ácido 10-octadecenoico, metílico del ácido octadecanoico y octílico del ácido octadecanoico (Cuadro 2). Estos compuestos al separarse de la mezcla por CG (Figura 3), por medio del análisis del patrón de fragmentación de sus espectros de masas confirmaron dichas estructuras.

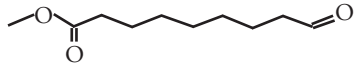
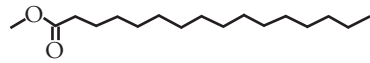
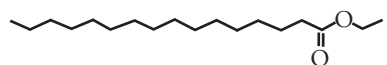
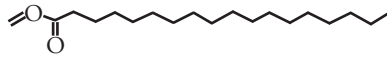
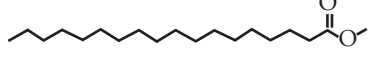
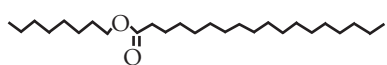
Los constituyentes de la fracción 5-7 correspondieron a esteres de ácidos grasos; se sabe que altas concentraciones de estos metabolitos causan muerte celular por apoptosis, y cuando las concentraciones se incrementan, la muerte celular ocurre por necrosis debido a inhibición de síntesis de ADN (Kharroubi *et al.*, 2004; Benzaria *et al.*, 2007; Takeara *et al.*, 2007). De Lima *et al.* (2006)

2005). Several authors have demonstrated that some fatty acids, mainly unsaturated ones, are toxic for various human tumoral cell lines, such as prostate cancer (Pandalai *et al.*, 1996), breast and bladder (Davies *et al.*, 1999), lung cancer (Schonberg and Skorpen, 1997), and leukemia (Siddiqui *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2002; Pompeia *et al.*, 2002). Related to saturate fatty acids, toxicity for tumoral cells has been reported (Ostrander *et al.*, 2001; Mu *et al.*, 2001; De Sousa Andrade *et al.*, 2005). Ohashi *et al.* (2003) demonstrated that C18 fatty acids at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration inhibited cell proliferation by 99.4 % of rat lung cancer cell lines. Recently, Yoo *et al.* (2007) recorded that palmitic (Z)-9-octadecenoic and octadecenoic fatty acids have apoptotic properties in colon tumoral lines, due to damage in DNA and caspasa-3 activation.

Conventionally, antineoplastic activity of many cucurbitaceae has been attributed to the presence of cucurbitacins (Dantas *et al.*, 2006; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007b; Li *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). However, with the results of the present study it is proved that also the esters of saturate fatty acids of *S. edule* fruits have such activity; this extends the range of sources of chemical principles

Cuadro 2. Componentes mayoritarios de la fracción 5-7 del extracto alcohólico de frutos de *S. edule* var. *nigrum spinosum* identificados por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Table 2. Principal components of fraction 5-7 of alcoholic fruit extract of *S. edule* var. *nigrum spinosum* identified by gas chromatography and mass spectrometry.

Compuesto	{M} [†] ‡	Fórmula	R _t (min) [†]	Estructura química
Ester metílico del ácido 9-oxo-nonanoico	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	17.49	
Ester metílico del ácido hexadecanoico	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	24.82	
Ester etílico del ácido hexadecanoico	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	25.66	
Ester metílico del ácido 10-octadecenoico	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	27.01	
Ester metílico del ácido octadecanoico	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	27.28	
Ester octílico del ácido octadecanoico	396	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	33.47	

[†] Tiempo de retención en minutos en el cromatógrafo de gases ♦ Time retention in gas chromatograph in minutes.

[‡] Peso molecular g·mol⁻¹ determinados de CG-SM ♦ Molecular g·mol⁻¹ weight of CG-SM.

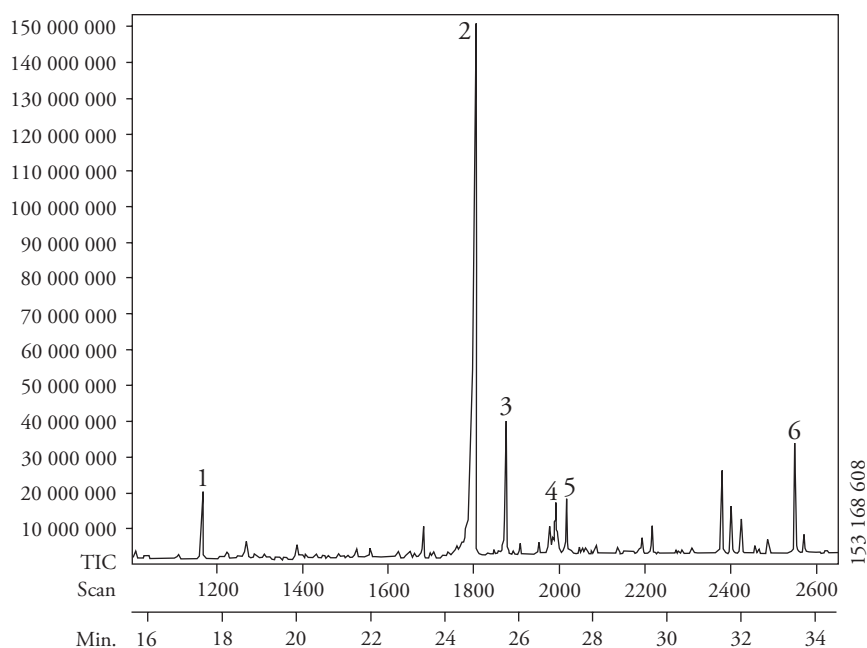


Figura 3. Cromatograma de gases de la fracción 5-7 del extracto alcohólico de frutos de *S. edule* var. *nigrum spinosum*: Ester (1) metílico del ácido 9-oxo-nonanoico (2) metílico del ácido hexadecanoico (3) etílico del ácido hexadecanoico (4) metílico del ácido 10-octadecenoico (5) metílico del ácido octadecanoico (6) octílico del ácido octadecanoico.

Figure 3. Gas chromatogram of fraction 5-7 of alcoholic fruit extract of *S. edule* var. *nigrum spinosum*: (1) methyl ester of 9-oxo nonanoic acid (2) methyl ester of hexadecanoic acid (3) ethyl ester of hexadecanoic acid (4) methyl ester of 10-octadecenoic acid (5) methyl ester of octadecanoic acid (6) octyl ester of octadecanoic acid.

demonstraron que dichos compuestos incrementan la pérdida de integridad de la membrana celular y la fragmentación de ADN en macrófagos. Además, pueden causar despolarización mitocondrial en líneas leucémicas (Otton y Curi, 2005). Diversos autores han comprobado que algunos ácidos grasos, principalmente los insaturados, son tóxicos para varias líneas celulares tumorales humanas como cáncer de próstata (Pandalai *et al.*, 1996), pecho y vejiga (Davies *et al.*, 1999), pulmón (Schonberg y Skorpen, 1997) y leucemia (Siddiqui *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2002; Pompeia *et al.*, 2002). Con relación a los ácidos grasos saturados, se ha reportado toxicidad para células tumorales (Ostrander *et al.*, 2001; Mu *et al.*, 2001; De Sousa Andrade *et al.*, 2005). Ohashi *et al.* (2003) demostraron que los ácidos grasos C18 a una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibieron la proliferación celular en un 99.4 % de líneas celulares cancerígenas de rata. Recientemente Yoo *et al.* (2007), registraron que los ácidos grasos palmítico (Z)-9-octadecenoico y octadecenoico tienen propiedades apoptóticas en líneas tumorales de colon debido a daño en el AND y activación de la caspasa-3.

De manera convencional la actividad antineoplásica de muchas cucurbitáceas, ha sido atribuida a la presencia de cucurbitacinas (Dantas *et al.*, 2006; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007b; Li *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Sin embargo,

for their potential use as antineoplastic agents, which in principle allow suggesting new research lines. It is important to point out that México is the second exporter of chayote worldwide, and that *nigrum spinosum* is the second variety in economic importance as high-valley crop within the Middle American zone of México (Cadena *et al.*, 2001; Bancomext, 2004). Chayote being an important food resource in rural zones, under backyard conditions, and considering the promising results described in previous paragraphs, its re-valuation as a functional food with higher benefits than the strictly nutritious ones, may be suggested. Even though in the present study there is no reference to the continuance of antiproliferative activity after cooking the fruits, which is the common way of their intake (Lira-Saade, 1996), recent laboratory results (unpublished) indicate that the metabolites involved in these properties do not lose their antiproliferative and cytotoxic effectiveness *in vitro*.

CONCLUSIONS

The alcoholic extract of *Sechium edule* fruits var. *nigrum spinosum* presented antiproliferative and cytotoxic activity of dose-dependent type on L-929 and HeLa cell lines, showing greater specificity for the latter in high doses. Three of the four main fractions of the extract had antiproliferative activity

con los resultados del presente estudio se demuestra que también los ésteres de ácidos grasos saturados de frutos de *S. edule*, tienen dicha actividad; esto amplía la gama de fuentes de principios químicos para su potencial uso como agentes antineoplásicos, los cuales en principio permiten sugerir nuevas líneas de investigación. Es relevante apuntar que México es el segundo exportador mundial de chayote y que *nigrum spinosum* es la segunda variedad en importancia económica como cultivo en zonas de valles altos dentro de la zona Mesoamericana de México (Cadena *et al.*, 2001; Bancomext, 2004), lo cual aunado a que es un recurso alimentario importante en áreas rurales bajo condiciones de traspatio y a los resultados prometedores descritos en párrafos anteriores, se puede sugerir su revalorización como un alimento funcional con mayores beneficios que el estrictamente nutritivo. Aun cuando en el presente trabajo no se hace referencia a la permanencia de la actividad antiproliferativa después de la cocción de los frutos, que es la forma común de su ingesta (Lira-Saade, 1996), resultados recientes de laboratorio (no publicados) indican que los metabolitos involucrados en estas propiedades, no pierden su efectividad antiproliferativa y citotóxica *in vitro*.

CONCLUSIONES

El extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, presentó actividad antiproliferativa y citotóxica de tipo dosis dependiente sobre las líneas celulares L-929 y HeLa, mostrando mayor especificidad para ésta última en dosis altas. De las cuatro fracciones principales del extracto, tres mostraron actividad antiproliferativa en ambas líneas, siendo la 5-7 la de mayor actividad y especificidad sobre HeLa desde dosis bajas. Los componentes químicos de la fracción 5-7 correspondieron al grupo de ésteres de ácidos grasos saturados. Estadísticamente, cinco de siete fuentes de variación involucradas en el presente estudio fueron altamente significativas, atribuible a que la respuesta de la actividad inhibitoria sobre las líneas tumorales está fuertemente influida por la fracción química y la concentración de ésta. El contenido de ácidos grasos saturados en los frutos comestibles de *S. edule* var. *nigrum spinosum*, amplía la gama de metabolitos y fuentes de especies vegetales con actividad antineoplásica y su revalorización como un alimento funcional.

in both lines, 5-7 presenting the highest activity and specificity on HeLa from low doses. The chemical components of fraction 5-7 corresponded to the group of saturate fatty acid esters. Statistically, five of seven sources of variation involved in the present study were highly significant, attributable to the fact that the response of inhibiting activity on tumoral lines is strongly influenced by the chemical fraction and its concentration. The content of saturate fatty acids in edible fruits of *S. edule* var. *nigrum spinosum* extends the range of metabolites and sources of vegetal species with antineoplastic activity and its revaluation as functional food.

—End of the English version—

-----*-----

LITERATURA CITADA

- Abe K., and N. Matsuki. 2000. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Res.* 38:325-329.
- Affi, M. S., S. A. Ross, M. A. Sohly, Z. E. Naeem, and F. T. Halaweish. 1999. Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *J. Chem. Ecol.* 25(4): 847-859.
- Anónimo. 1996. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals. Twelfth Edition, Merck & CO., Inc. USA. pp: 442-443
- Aung L. H., C. M. Harris, R. E. Rij, and J. W. Brown. 1996. Postharvest storage temperature and film wrap effects on quality of chayote, *Sechium edule* Sw. *J. Hort. Sci.* 71: 297-304.
- Bancomext SNC. 2004. Exportaciones de México al mercado hispano de E.U.A. Periódico El Financiero, México, D. F. Sección Economía, 8 de junio. 18 p.
- Benzaria, A., N. Meskini, M. Dubois, G. Némoy, M. Lagarde, and A.-F. Prigent. 2007. Phospholipase D as a potential target for the antiproliferative effects of polyunsaturated fatty acids in rat thymocytes. *Journal Nutr. Biochem.* 18: 228-235.
- Bye, R., E. Estrada L., and E. Linares. 1992. Recursos genéticos en plantas medicinales de México. *In: Plantas medicinales de México, introducción a su estudio.* 4ª edición. Estrada L., E. (ed). Universidad Autónoma Chapingo, México pp. 362-370.
- Cadena-Íñiguez J, L. M. Ruiz-Posadas, C. Trejo-López, P. Sánchez-García, J. F. Aguirre-Medina. 2001. Intercambio de gases y relaciones hídricas del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Rev. Chapingo, Serie Hort.* 7. 21-35.
- Cadena-Íñiguez, J. 2005. Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. México 156 p.

- Cadena-Iñiguez, J., L. Arévalo-Galarza, L. M. Ruiz-Posadas, J. F. Aguirre-Medina, M. Soto-Hernández, M. Luna-Cavazos, H. A. Zavaleta-Mancera. 2006. Quality evaluation and influence of 1-MCP on *Sechium edule* (Jacq.) Sw. fruit during postharvest. *Postharvest Biol. Tech.* 40: 170-176.
- Cadena-Iñiguez, J., C. H. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L. M. Ruiz-Posadas, J. F. Aguirre-Medina, and L. Arévalo-Galarza. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, México. *Genetic Resource Crop Evolution.* 55:835-847.
- Cadena-Iñiguez, J., L. Arévalo-Galarza, C. H. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L. M. Ruiz-Posadas, E. Santiago-Osorio, M. Acosta-Ramos, V. M. Cisneros-Solano, J. F. Aguirre-Medina, and D. Ochoa-Martínez. 2007b. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh produce* 1: 41-53.
- Che, C., X. Fang, C. H. Phoebe, A. D. Kiunghorn, and N. R. Farnsworth 1985. High-field ¹H-NRM spectral analysis of some cucurbitacins. *J. Natural Products* 48: 429-434.
- Chen, J., R. Tian, M. Qiu, L. Lu, Y. Zheng, and Z. Zhang. 2008. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. *Phytochemistry* 69: 1043-1048.
- Chu, S.-C., S.-F. Yang, S.-J. Liu, W.-H. Kuo, Y.-Z. Chang, and Y.-S. Hsieh. 2007. In vitro and in vivo antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. leaves on lung cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 45: 1194-1201.
- Dantas, I.N., G.C.M. Gadelha, D.C. Chaves, F.J.Q. Monte, C. Pessoa, M.O. de Moraes, and L.V. Costa-Corúfo. 2006. Studies on the cytotoxicity of cucurbitacins isolated from *Cayaponia racemosa* (Cucurbitaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(9-10): 643-646.
- Davies, C. L., M. Loizidou, and Y. Taylor. 1999. Effect of linolenic acid on cellular uptake of structurally related anthracyclines in human drug sensitive and multidrug resistant bladder and breast cancer cell lines. *Euro. J. Cancer* 35: 1534-1540.
- De Lima, T. M., L. de Sa Lima, C. Scavone, and R. Curi. 2006. Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. *FEBS Letters* 580: 3287-3295.
- De Sousa Andrade, L. N., T. M. de Lima, R. Curi, and A. M. Castrucci. 2005. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicol. in vitro* 19: 553-660.
- Farnsworth, N. R., O. Akerele, A. S. Bingel, D. D. Soejarto, and Z. Guo. 1992. Las plantas medicinales en la terapéutica. *In: Plantas Medicinales de México, introducción a su estudio.* 4ª edición. Estrada L., E. (ed.). Universidad Autónoma Chapingo. México. 295-312 p.
- Fischer D., Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel. 2002. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24: 1121-1131.
- Flores, E. M. 1989. El chayote, *Sechium edule* Swartz (Cucurbitaceae). *Rev. Biol. Trop.* 37:1-54.
- González-Laredo, R. F., M. G. Reyes-Navarrete, A. M. Preza, J. Morales-Castro, J. A. Gallegos-Infante, y N. E. Rocha-Guzmán. 2007. Evaluación del efecto antioxidante y quimioprotector de extractos fenólicos de semillas de manzana. *Grasas y Aceites* 58: 5-9.
- Gordon E. A., Guppy L. J., and Nelson M. 2000. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Ind. Med. J.* 49(1): 27-31.
- Gillies R., N. Didier, M. Dentosn. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochem.* 159:109-113.
- Hostettmann, K., A. Marston, and J. L. Wolfender. 1995. Strategy in the Search for New Biologically Active Plant Constituents. *In: Phytochemistry of plants used in traditional medicine.* Hostettmann, K.A., A. Marston, and M. Millard (eds) Oxford Science Publications 37: 17-45.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI]. 2007. Estadísticas a propósito del día de muertos. Datos nacionales. Disponible en línea: [www.inegi.gob.mx] enero 3-2008.
- Jensen, L.P., and A.R. Lai. 1986. Chayote (*Sechium edule*) causing hypokalemia in pregnancy. *Am. J. Obst. and Gynecol.* 155: 1048-1049.
- Kharroubi, I., L. Ladrie, A. K Cardozo, Z. Dogusan, M. Cnop, and A. D. Eizirik. 2004. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic β -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor- κ B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145: 5087-5096.
- Kueng, W., E. Silver, and V. Eppnberg. 1989. Quantification of cell cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochem.* 186: 16-19.
- Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega. Barcelona pp. 32-45.
- Li, D., T. Ikeda, T. Nohara, J. Liu, Y. Wen, T. Sakamoto, and G. Nonaka. 2007. Cucurbitane glycosides from unripe fruits of *Siraitia grosvenori*. *Chem. Pharmaceutical Bull.* 55:1082-1086.
- Lima, T. M., C. C. Kanufre, C. Pompeia, R. Verlengia, and R. Curi. 2002. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicology in vitro* 16:741-747.
- Lira-Saade, R. 1996. *Chayote Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Report No. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 58 p.
- Lira-Saade, R., and J. Caballero. 2002. Ethnobotany of the wild mexican Cucurbitaceae. *Econ. Bot.* 56: 380-398.
- Mans, D. R. A., A. B. da Rocha, and G. Schwartzmann. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 5: 185-198.
- Modgil, M., R. Modgil, and R. Kumar. 2004. Carbohydrate and mineral content of Chayote (*Sechium edule*) and Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*). *J. Human Ecol.* 15:157-159.
- Mora-García, M. L., A. Dueñas-González, J. Hernández-Montes, E. Cruz-Hernández, E. Pérez-Cárdenas, B. Weiss-Steider, E. Santiago-Osorio, V. F. Ortíz-Navarrete, V. H. Rosales, D. Cantú, M. Lizano-Soberón, M. P. Rojo-Aguilar and A. Monroy-García. 2006. Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *J. Trans. Med.* 4:55.

- Mu, Y. M., T. Yanase, Y. Nishi, A. Tanaka, M. Saito, C.H. Jin, C. Mukasa, T. Okabe, M. Nomura, K. Goto, and H. Nawata. 2001. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology* 142: 3590-3597
- National Cancer Institute [NCI]. 2009. El cáncer: preguntas y respuestas. Hoja informativa 6.7s. Disponible en línea [<http://www.cancer.gov/publications>]. Fecha de consulta 3 agosto, 2009.
- Newstrom, L. E. 1991. Evidence for the origin of chayote, *Sechium edule* (Cucurbitaceae). *Econ. Bot.* 453: 410-428.
- Ohashi, K., H. Winarno, M. Mukai, and H. Shibuya. 2003. Preparation and cancer cell invasion inhibitory effects of C16-alkynic fatty acids. *Chem. Pharmaceutical Bull.* 51: 463-466.
- Ordoñez A. A. L., J. D. Gómez, N. M. Cudmani, M. A. Vattuone, and M. I. Isla. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Microbial Ecol. in Health and Dis.* 15: 33-39.
- Ordoñez, A. A. L., J. D. Gomez, M. A. Vattuone, and M. I. Isla. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem.* 97: 452-458.
- Ostrander, D. B., G. C. Sparagna, A. A. Amoscato, J. B. McMillin, and W. Dowhan. 2001. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 41: 38061-38067.
- Otton, R., and R. Curi. 2005. Toxicity of a mixture of fatty acids on human blood lymphocytes and leukemia cell lines. *Toxicology in vitro* 19: 749-755.
- Pandalai, P. K., M. J. Pilat, K. Yamazaki, and K. J. Pienta. 1996. The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. *Anticancer Res.* 16: 815-820.
- Pezzuto, J.M. 1997. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharma.* 53: 121-133.
- Pompeia, C., J. J. Freitas, J. S. Kim, S. B. Zyngier, and R. Curi. 2002. Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implications of oxidative stress and eicosanoid synthesis. *Biol. Cellulaire* 94: 251-265.
- Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas [RHNM]. 2001. La situación epidemiológica en México. En línea: [<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>]. enero 3. 2008.
- Salama, A. M., A. E. Polo, C.R. Conretras, y L. Maldonado. 1986. Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. *Rev. Colombiana Cien. Quím.-Farm.* 15: 79-82.
- Salama, A. M., H. Achenbach, M. Sánchez, y M. Gutiérrez. 1987. Aislamiento e identificación de glicósidos antiinflamatorios de los frutos de *Sechium edule*. *Rev. Colombiana Cien. Quím.-Farm.* 16: 15-16.
- Schonberg, S. A., and F. Skorpen. 1997. Paracetamol counteracts docosahexaenoic acid-induced growth inhibition of A-427 lung carcinoma cells and enhances tumor cell proliferation *in vivo*. *Anticancer Res.* 17: 2443-2448.
- Setzer, W. N., and M. C. Setzer. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini reviews Rev. Med. Chem.* 3:540-556.
- Siciliano, T., N. de Tommasi, I. Morelli, and A. Braca. 2004. Study of Flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6510-6515.
- Siddiqui, R. A., L. J. Jensi, K. Neff, K. Harvey, R. J. Kovacs, and W. Stillwell. 2001. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochim. et Biophys. Acta* 1499: 265-275.
- Simirgiotis, M. J., S. Adachi, S.To, H. Yang, K. A. Reynertson, M. J. Basile, R. R. Gil, I. B. Weinstein, and E. J. Kennelly. 2008. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chem.* 107: 813-819.
- Takeara R., P. C. Jimenez, D. Veras W., M. O. de Moraes, C. Pessoa, N. Peoporine L., J. L. Callegari L., T. M. da Cruz L., and C. L. Veras 2007. Antileukemic effects of *Didemnum psammotodes* (Tunicata: Ascidiacea) constituents. *Comparative biochemistry and physiology, part A: Molecular & integrative physiology* DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.02.011.
- Tejón A., A. Garrido, M. Blanco, C. Villaverde, C. Mendoza, J. Ramírez. 2006. *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*. Ed. Tebar: 18-30.
- Verma, M., S. K. Singh, S. Bhushan, V. K. Sharma, P. Datt, B. K. Kapahi, and A. K. Saxena. 2008. In vitro cytotoxic potential of *Polyalthia longifolia* on human cancer cell lines and induction of apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HL-60 cells. *Chemico-biological Interactions* 171: 45-56.
- Wang D-C., H. Xiang, D. Li, H. Gao, H. Cai, L.-J. Wu, and X.-M. Deng. 2008. Purine-containing cucurbitane triterpenoids from *Cucurbita pepo* cv. *dayangua*. *Phytochemistry* DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.01.019.
- Wu, T. H., L. P. Chow, and J. Y. Lin. 1998. Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, *Sechium edule* Swartz-purification, characterization, molecular cloning and expression. *Chem. Pharma. Bull.* 255: 400-408.
- Yoo, Y.-C., B.-H. Shin, J.-H. Hong, J. Lee, H.-Y. Chee, K.-S. Song, and K.-B. Lee. 2007. Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetia brevitarsis* larva. *Arch. Pharm. Res.* 30: 361-365.
- Yu, L., M. Zhao, J. Wang, C. Cui, B. Yang, Y. Jiang, and Q. Zhao. 2008. Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana* Lamb) bark. *Innovative Food Sci. & Emerging Technologies* 9: 122-128.