



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



Centro Interdisciplinario de Investigación para
el Desarrollo Integral Regional
CIIDIR MICHOACÁN

CONTENIDO FENÓLICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRACTOS DE *Asclepias linaria* Cav.
(APOCYNACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE

PRESENTA:

JOSÉ ALEJANDRO SÁNCHEZ GUTIÉRREZ

DIRECTORES:

DRA. DIOSELINA ÁLVAREZ BERNAL

DR. JOSÉ ROBERTO MEDINA MEDRANO

Jiquilpan, Michoacán, México. Noviembre de 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Octubre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

“Contenido fenólico, actividad antioxidante y antiproliferativa de extractos de *Asclepias linaria* Cav. (Apocynaceae)”.

Presentada por el alumno:

Sánchez	Gutiérrez	José Alejandro
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre
Con registro: B 1 7 1 1 4 5		

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis

Dra. Dioselina Álvarez Bernal

Dr. José Roberto Medina Medrano

Dra. Dafné Linda Moreno Lorenzana

Dr. Luis Fernando Ceja Torres

Dr. José Luis Montañez Soto

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U- MICH.

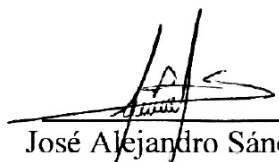


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 29 del mes de octubre del año 2019, el (la) que suscribe **José Alejandro Sánchez Gutiérrez** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable**, con número de registro **B171145**, adscrito(a) al **CIIDIR IPN Unidad Michoacán**, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Dioselina Álvarez Bernal** y del **Dr. José Roberto Medina Medrano** y cede los derechos del trabajo titulado “**Contenido fenólico, actividad antioxidante y antiproliferativa de extractos de *Asclepias linaria* Cav. (Apocynaceae)**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones jasg94_7@hotmail.com, dalvarezb@ipn.mx, y jrmedina@conacyt.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


José Alejandro Sánchez Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Dr. José Roberto Medina Medrano, agradezco mucho el aprendizaje, la paciencia y apoyo que formo parte importante de la consumación de este trabajo de investigación. Por su gran amistad.

Dra. Dioselina Álvarez Bernal, agradezco enfáticamente por su apoyo en todos los aspectos, por todo aquello que me permitió aprender y conocer con el objetivo de alcanzar este gran logro.

Agradezco a la Dra. Dafné Linda Moreno Lorenzana, al Dr. José Luis Montañez Soto y al Dr. Luis Fernando Ceja Torres por formar parte de esta investigación, por cada comentario que me permitió desarrollarme en el aspecto académico y personal.

Dra. Monserrat Vázquez Sánchez por su contribución en la identificación de la especie de este trabajo de investigación, por sus consejos y valiosa amistad.

Con todo el corazón agradezco a mis abuelos María Elena Alfaro Barrera y José Luis Sánchez Merino, por su apoyo incondicional, su confianza en mí y el amor con el que me apoyaron para dar paso firme a lograr mis objetivos.

A mis padres Evangelina Gutiérrez Suárez y José Luis Sánchez Alfaro porque con amor, consejos y motivación me ayudaron a mantener mi fuerza y deseo de seguir luchando contra toda circunstancia.

A Josselin Estefani Torres Contreras por siempre estar firme a mi costado apoyándome a recobrar mi motivación y aconsejarme positivamente para conseguir mis sueños.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Instituto Politécnico Nacional (IPN), por brindándome el apoyo económico para llevar a cabo todas las etapas de este trabajo de investigación.

Agradezco bastante a mis profesores y compañeros de posgrado.

Gracias a Dios por permitirme lograr este gran objetivo y llegar hasta este valioso día.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES	3
1.2.1 Familia Apocynaceae	3
1.2.2 Subfamilia Asclepiadoideae	3
1.2.3 Género <i>Asclepias</i>	4
1.2.3.1 Morfología	4
1.2.3.2 Distribución	5
1.2.4 <i>Asclepias linaria</i> Cav.	6
1.2.5 <i>Asclepias linaria</i> , distribución en México	7
1.2.6 Técnica de cromatografía líquida de alta presión o HPLC	7
1.2.7 Compuestos fenólicos	8
1.2.7.1 Flavonoides	9
1.2.8 Radical libre	10
1.2.9 Efectos de los radicales libres en biomoléculas	11
1.2.10 Pruebas de citotoxicidad celular	12
1.3 JUSTIFICACIÓN	13
1.4 HIPÓTESIS	13
1.5 OBJETIVOS	13
1.5.1 Objetivo general	13
1.5.2 Objetivos específicos	13
II. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Colecta	15
2.2 Secado	17
2.3 Molienda	17
2.4 Preparación de los extractos	17
2.5 Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)	17
2.6 Cuantificación de flavonoides totales	18

2.7 Cuantificación de taninos condensados.....	18
2.8 Análisis de compuestos fenólicos mediante UPLC-MS.....	19
2.8.1 Proceso de concentración y liofilizado de los extractos para el análisis de compuestos fenólicos mediante UPLC-MS.....	19
2.8.2 La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos mediante UPLC-MS.....	19
2.9 Análisis se la actividad bloqueadora del radical libre DPPH	21
2.10 Determinación de la actividad bloqueadora del radical ABTS.....	21
2.11 Análisis de la actividad antioxidante total.....	22
2.12 Pruebas celulares	22
2.12.1 Pruebas de viabilidad celular	22
2.12.2 Ensayo de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	23
2.13 Análisis estadístico.....	24
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1 Contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).....	25
3.2 Contenido de flavonoides totales (CFLT).....	26
3.3 Contenido de taninos condensados (CTC)	28
3.4 Perfiles fenólicos mediante ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS)	30
3.5 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH.....	34
3.5.1 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos etanólicos al 100% de hojas de <i>A. linaria</i>	34
3.5.2 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos etanólicos al 50% de hojas de <i>A. linaria</i>	35
3.5.3 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos metanólicos al 100% de hojas de <i>A. linaria</i>	36
3.5.4 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos metanólicos al 50% de hojas de <i>A. linaria</i>	38
3.6 Actividad bloqueadora del radical ABTS	39
3.6.1 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos etanólicos al 100% de hojas de <i>A. linaria</i>	40
3.6.2 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos etanólicos al 50% de hojas de <i>A. linaria</i>	41
3.6.3 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos metanólicos al 100% de hojas de <i>A. linaria</i>	43

3.6.4 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos metanólicos al 50% de hojas de <i>A. linaria</i>	44
3.7 Capacidad antioxidante total (CAT)	46
3.8 Efecto citotóxico sobre líneas celulares	49
3.8.1 Efecto citotóxico de extractos alcohólicos de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica K562	50
3.8.2 Efecto citotóxico de extractos alcohólicos de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica HL60	56
3.8.3 Efecto citotóxico de extractos alcohólicos de <i>A. linaria</i> sobre cultivos primarios de CMN de individuos sanos.....	63
3.9 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	69
VIII. CONCLUSIONES	75
IX. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Condiciones para la adquisición de los compuestos fenólicos en el detector Xevo micro TQ-S.	20
2	Composición fenólica de extractos metanólicos al 100% de hojas de <i>Asclepias linaria</i> identificada mediante ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS).	32
3	Composición fenólica de extractos metanólicos al 50% de hojas de <i>Asclepias linaria</i> identificada mediante ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS).	33
4	Contenido fenólico total (CFT), flavonoides totales (CFLT) y taninos condensados (CTC), capacidad antioxidante total (CAT) y actividad bloqueadora de radicales libres (DPPH y ABTS) de extractos etanólicos y metanólicos de hojas de poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> .	73
5	Valores de concentración inhibitoria media (IC ₅₀) obtenidos de los tres tipos celulares evaluados contra los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> e índices de selectividad.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Distribución de la especie <i>Asclepias linaria</i> en México y Estados Unidos de América.	7
2	Planta silvestre de <i>A. linaria</i> .	15
3	Distancia y ubicación de la localidad de Fray Domínguez, Pajacuarán, en el Estado de Michoacán.	16
4	Hojas de <i>A. linaria</i> colectadas y almacenadas en bolsas de plástico marcadas por sitio de colecta.	16
5	Contenido fenólico total (CFT) de extractos etanólicos y metanólicos de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	26
6	Contenido de flavonoides totales (CFLT) de extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	28
7	Contenido de taninos condensados (CTC) de extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	30
8	Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos etanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	35
9	Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos etanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	36
10	Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos metanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	37
11	Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos metanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	38
12	Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos etanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	41
13	Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos etanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	44

14	Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos metanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i>	44
15	Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos metanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	45
16	Capacidad antioxidante total de extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de <i>Asclepias linaria</i> .	49
17	Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica K562.	50
18	Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica K562.	51
19	Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica K562.	52
20	Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica K562.	54
21	Valores de IC ₅₀ de extractos alcohólicos de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica K562.	56
22	Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica HL60.	57
23	Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica HL60.	58
24	Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica HL60.	59
25	Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica HL60.	60

26	Valores de IC ₅₀ de extractos alcohólicos de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre línea celular leucémica HL60.	62
27	Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre células CMN.	64
28	Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre células CMN.	65
29	Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre células CMN.	66
30	Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre células CMN.	67
31	Valores de IC ₅₀ de extractos alcohólicos de hojas de 7 poblaciones silvestres de <i>A. linaria</i> sobre cultivo celular CMN.	69
32	Valores del efecto sobre las ROS intracelular generado por la exposición de las células HL60 a los extractos metanólicos al 50% y 100% de <i>A. linaria</i> por 1 h.	70
33	Valores del efecto sobre las ROS intracelular generado por la exposición de las células HL60 a los extractos metanólicos al 50% y 100% de <i>A. linaria</i> por 3 h.	71

RESUMEN

Estudios químicos han demostrado la presencia de metabolitos con potencial anticarcinogénico en la planta *Asclepias linaria* Cav. (Apocynaceae), sin embargo, a pesar de las investigaciones realizadas, no hay una que determine la capacidad antioxidante, los perfiles fenólicos y el efecto antiproliferativo de *A. linaria*. Por estas razones, se realizó la presente investigación con el objetivo de determinar la composición fenólica, la actividad antioxidante, y la actividad antiproliferativa ante células neoplásicas de extractos obtenidos a partir de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria*. La metodología consistió en determinar el contenido fenólico, de flavonoides y taninos totales, determinar la actividad bloqueadora de radicales libres (ABTS y DPPH), y la capacidad antioxidante total (CAT), determinar los perfiles fenólicos mediante UPLC-MS, y evaluar el efecto antiproliferativo ante células cancerígenas (K562 y HL60) de extractos etanólicos y metanólicos de hojas de *A. linaria*. Las concentraciones del contenido fenólico variaron desde 5.01 hasta 10.56 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra seca (MS), los valores de flavonoides se mostraron en un rango de 1.52 hasta 4.16 mg equivalentes de catequina (EC)/g MS, y para taninos condensados, desde 0.41 hasta 3.16 mg EC/g MS. Se observó una alta correlación entre el contenido de fenoles y flavonoides ($r=0.679$, $p<0.01$). Los extractos de hojas de las siete poblaciones evaluadas de *A. linaria*, a excepción de los etanólicos al 100%, mostraron actividad bloqueadora de radical libre DPPH significativa, logrando así valores de IC_{50} considerables (desde 0.122 ± 0.001 hasta 0.206 ± 0.001 mg/mL de extracto). Respecto a la actividad bloqueadora de radical libre ABTS los valores fueron de 0.512 ± 0.003 hasta 0.867 ± 0.015 mg/mL de extracto. La capacidad antioxidante total de los extractos se mostró con valores de 17.96 ± 1.47 hasta 175.16 ± 0.62 mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/g MS. A pesar de lo anterior, se mostró una correlación moderada entre el contenido de fenoles y flavonoides con la capacidad antioxidante ($r=0.410$ y $r=0.412$, $p<0.01$, respectivamente). Los extractos mostraron la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides como ác. *p*-cumárico, ác. ferúlico, quercetina y rutina, de interés en el área farmacéutica y alimentaria, así como un elevado efecto antiproliferativo ante células neoplásicas (K562 y HL60), obteniendo valores de IC_{50} desde 8.94 hasta > 200 μ g/mL y de 11.86 hasta > 200 μ g/mL, respectivamente.

ABSTRACT

Chemical studies have demonstrated the presence of metabolites with anticarcinogenic potential in the plant *Asclepias linaria* Cav. (Apocynaceae), however, no study has determined the antioxidant capacity, phenolic profiles and antiproliferative effect of *A. linaria*. For these reasons, the present investigation was carried out with the objective of determining the phenolic composition, the antioxidant activity, and the antiproliferative activity of extracts over neoplastic cells obtained from leaves of wild populations of *A. linaria*. The methodology consisted of determining the phenolic content, flavonoids and total tannins, determining the free radical scavenging activity (ABTS and DPPH), and the total antioxidant capacity (CAT), determining the phenolic profiles using UPLC-MS, and assessing the antiproliferative effect against cancer cells (K562 and HL60) of extracts of ethanolic and methanolic leaves of *A. linaria*. Phenolic content concentrations ranged from 5.01 to 10.56 mg equivalent of gallic acid (GAE)/g of dry sample (DS), flavonoid values were shown in a range of 1521.86 to 4168.75 mg equivalent of catechin (CE)/g DS, and for condensed tannins from 0.41 to 3.16 mg CE/g DS. A high correlation was observed between the content of phenols and flavonoids ($r= 0.679$, $p < 0.01$). Leaf extracts from the seven evaluated populations of *A. linaria*, with the exception of 100% ethanolics, showed significant DPPH free radical scavenging activity, thus achieving considerable IC_{50} values (from 0.122 ± 0.001 to 0.206 ± 0.001 mg/mL of abstract). Regarding the ABTS free radical scavenging activity, the values were 0.512 ± 0.003 to 0.867 ± 0.015 mg/mL of extract. The total antioxidant capacity of the extracts was shown with values of 17.96 ± 1.47 to 175.16 ± 0.62 mg equivalent of ascorbic acid (AAE)/g DS. Despite the above, a moderate correlation was shown between the content of phenols and flavonoids with the antioxidant capacity ($r= 0.410$ and $r= 0.412$, $p < 0.01$, respectively). The extracts showed the presence of phenolic acids and flavonoids as ac. *p*-cumaric, ac. ferulic, quercetin, and rutin, compounds of interest in the pharmaceutical and food area, as well as a high antiproliferative effect against neoplastic cells (K562 and HL60), obtaining IC_{50} values from 8.94 to >200 μ g/mL and 11.86 to >200 μ g/mL, respectively.

I. INTRODUCCIÓN

La familia Apocynaceae está constituido por 5 subfamilias, que incluyen alrededor de 395 géneros y 5000 especies. Esta es una de las 15 familias más diversas presentes en México. La mayoría de sus integrantes están provistos de laticíferos constituidos por células individuales o ramificadas que producen látex lechoso, rojizo o transparente (Juárez-Jaimes *et al.*, 2007). Una de las 5 subfamilias pertenecientes a la familia Apocynaceae es Asclepiadoideae. Dentro de esta subfamilia se encuentra el género *Asclepias* ampliamente distribuido en el territorio mexicano y además se encuentran algunas especies de plantas de gran interés como lo son: *Asclepias curassavica*, *Asclepias albicans*, *Asclepias subulata*, *Asclepias quinquedentata* y *Asclepias linaria*. Estas especies tienen importancia ecológica como antropocéntrica, siendo algunos de sus usos como: comestible, forrajero, ornamental y textil. Algunas investigaciones en varias especies de *Asclepias* han demostrado la presencia de compuestos con diversas propiedades benéficas (Fernández *et al.*, 2008).

La especie *A. linaria* en el territorio mexicano, del cual es endémica, es conocida con los nombres comunes: patito, romerillo, hierba del pavo, venenillo, algodoncillo, entre otros. Es una planta de 1.0 m de altura aproximadamente, sus hojas son alternas muy delgadas y sus flores son de color blanco las cuales se dan en racimos. Tiene una amplia distribución en el territorio mexicano con abundancia en el estado de: Michoacán, Distrito Federal, Durango, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, entre muchos otros sitios. Se le han atribuido diversas propiedades benéficas como: dermatológicas, purgantes, analgésicas, tratamiento de diabetes, diuréticas y para el tratamiento de picaduras (Fernández *et al.*, 2008; Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009). Estas propiedades pueden obtenerse de diversas formas, ya sea, ingiriendo el cocimiento de las hojas; aplicación directa del látex en heridas; elaborando cataplasmas con las hojas, entre otras (García-Alvarado *et al.*, 2001). Es importante mencionar que entre las únicas investigaciones realizadas con *A. linaria* se encuentra la que llevó a cabo Abbott *et al.* (1990) en la cual determinaron la presencia de diversos compuestos químicos como: alcoholes de triterpenos, ésteres, ceras, goma natural, glucósidos cardiacos y saponinas. Asimismo,

Rodríguez-Hahn y Fonseca (1991), aislaron compuestos cardenólidos (calactina, calotoxina, procerosido, entre otros) de partes aéreas de esta misma especie. Por último, Knudsen (2011) obtuvo un extracto oleoso a partir de semillas de *Asclepias*, el cual contiene aceites con propiedades terapéuticas, que son empleadas en el tratamiento de cefalea bovina. Cabe mencionar que en ninguna de las investigaciones anteriores se determina el contenido fenólico, la actividad antioxidante y biológica que estos compuestos pueden tener.

El término compuestos fenólicos engloba a todas aquellas sustancias que poseen varios grupos fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas (Gimeno, 2004). Los componentes fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, que forman parte importante de la dieta humana. Dentro de la clasificación general se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y propiedades, siendo la principal la función antioxidante (Bravo, 1998). Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y cáncer (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009). Dentro de la clasificación general se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, en su mayoría derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina (Bravo, 1998).

Basado en la literatura revisada y lo anteriormente mencionado, es importante resaltar que no existe investigación alguna que describa los perfiles fenólicos, contenido fenólico, actividad antioxidante, el efecto citotóxico y proliferativo ante células cancerígenas de los compuestos presentes en la especie de interés (*A. linaria*). Por lo cual se considera pertinente e importante determinar el contenido fenólico, la actividad antioxidante y antiproliferativa de extractos de hoja de *A. linaria*.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae está subdividida en 5 subfamilias, las cuales incluyen en total alrededor de 395 géneros y 5000 especies. Son plantas de tipo anual o perenne, primordialmente hierbas erectas o trepadoras, menormente árboles y arbustos. En su mayoría las especies que constituyen esta familia están provistas de células lactíferas las cuales sintetizan un látex lechoso, rojizo (*Aspidosperma*) o transparente (*Thenardia*), en el cual se pueden encontrar glucósidos y ciertos alcaloides con efectos altamente tóxicos (*A. linaria*). Las hojas son simples, persistentes o caducas, opuestas o a veces alternas, rara vez verticiladas, acompañadas por glándulas conocidas como coléteres; las cuales pueden estar ubicadas en las axilas, en la base o por arriba del pecíolo o el haz a lo largo del nervio medio, inclusive en la base de las brácteas y de los sépalos. En la familia se presentan tanto flores solitarias, surgiendo de la parte terminal de las ramas o en las axilas de las hojas (*Mandevilla*), como una variedad muy amplia de inflorescencias, sobre todo racimosas o racemosas; por ejemplo, umbelas (*Asclepias*), corimbos (*Cascabela*), racimos (*Mandevilla*) o panículas. Las flores contienen ambos aparatos reproductores (hermafroditas), actinomorfas o ligeramente zigomorfas, pentámeras, vistosas o de tamaño pequeño (*Orthosia*, *Metastelma*, *Rauvolfia*); el cáliz es gamosépalo, pero dividido casi hasta su base, la corola es gamopétala, hipocraterimorfa, infundibuliforme o con menos frecuencia tubular o urceolada; el limbo presenta una prefloración detrocontorta o sinistrocontorta (Juárez-Jaimes *et al.*, 2007).

1.2.2 Subfamilia Asclepiadoideae

La subfamilia Asclepiadoideae es una de las 5 subfamilias incluidas en la familia Apocynaceae. Las cuales son hierbas perennes, sufrútices erectos o trepadores con látex. Hojas simples, enteras, opuestas, raramente verticiladas, a veces reducidas, frecuentemente con apéndices glandulares en la base de la lámina o del pecíolo. Inflorescencias cimosas, terminales o laterales e interpeciolares, generalmente umbeliformes o racemiformes, a veces reducidas a flores solitarias. Flores perfectas,

pentámeras, actinomorfas. Cáliz pentapartido, a veces con glándulas en la base interna. Corola gamopétala, pentalobada, de prefloración contorta, con una corona en la base interna, tubulosa o de 5 lóbulos simples o dobles. Estambres 5, soldados al gineceo formando un ginostegio, con los filamentos cortos y aplanados y las anteras sagitadas y con dos sacos polínicos cada una; polen aglutinado en polinios, cada uno del par conectado con el del lóculo de la antera vecina por un trasladador con dos brazos, las caudículas, unidas a un pequeño cuerpo cónico, el retináculo situado sobre la cabeza estigmática (el retináculo se adhiere a los insectos polinizantes y junto con el par de polinios es transportado a otra flor). Ovario súpero, de 2 carpelos separados, estilo dividido, y cabeza estigmática única, dilatada en forma de disco grueso, a veces con apéndices apicales de forma variada; óvulos numerosos en cada carpelo. Fruto folículo ovoide o fusiforme, de dehiscencia sutural ventral, con el exocarpo liso u ornamentado con espinas, escamas o tubérculos, a veces con costillas o alas longitudinales. Semillas comprimidas, de contorno ovado, con penachos de pelos sedosos (comosas) en la región micropilar; embrión grande y endosperma escaso (Hechem y Ezcurra, 2006).

1.2.3 Género *Asclepias*

1.2.3.1 Morfología

Subarbustos–hierbas, generalmente perennes, en especies extraibéricas–con látex blanco, frecuentemente con órganos subterráneos de reserva. Tallos generalmente glabros, a veces laxamente pubescentes. Hojas opuestas, rara vez verticiladas o alternas, concoloras, subsentadas o cortamente pecioladas, de lineares a oblongas, redondeadas o cuneadas en la base, agudas o acuminadas, con haz y envés glabros o pubescentes. Inflorescencia terminal o axilar, pauciflora o multiflora, pedunculada. Cáliz de menos de la mitad de la longitud de la corola, soldado en la base, con lóbulos lanceolados u ovados, agudos. Corola contorta, rotada, con lóbulos ovados u oblongos, agudos, reflejos en la antesis, de coloración variable, con una corona de origen estaminal de coloración variable, formada por 5 apéndices estaminales libres entre sí que se sueldan justo por debajo de las anteras o a lo largo del tubo formado por los filamentos estaminales, con una parte erecta cuculada y otra corniculada.

Estambres con los filamentos soldados entre sí y que forman un tubo que recubre al estilo y a parte del ginostegio; anteras rectangulares, aladas, con el conectivo prolongado en un apéndice ovoide, fuertemente inflexo, con margen entero o ciliado, que recubre el estigma; polinias péndulas, clavadas, apicalmente unidas a las caudículas. Ginostegio sobre una columna expuesta por encima de la corola. Fruto en 1(2) folículos, horizontales o formando un ángulo agudo entre sí, sobre pedicelos erectos o recurvados, espinosos o inermes, a veces inflados. Semillas ovoides, aladas o ápteras, con vilano apical (Arista y Ortiz, 2012).

1.2.3.2 Distribución

Asclepias es un género americano con alrededor de 150 especies, 68 de éstas se distribuyen en México, siendo San Luis Potosí el estado que presenta el mayor número de especies con más de 23, seguido de Oaxaca con 21, Michoacán y Veracruz con 20, y los estados con menor número de especies son Campeche, Tabasco y Yucatán con dos. Este género suele encontrarse por lo general en la mayoría de tipos de vegetación, pero la mayor diversidad y abundancia se observa en el bosque de pino-encino con 34 especies, bosque de encinos con 25, bosque tropical caducifolio con 20 y bosque de pinos con 19; en pastizal y vegetación secundaria con 17, matorral xerófilo y bosque mesófilo de montaña con 15, con sólo siete representantes en la vegetación riparia y dos en el bosque tropical perennifolio y subperennifolio (Fernández *et al.*, 2008)

De las 68 especies que incluye el género *Asclepias* en México, 17 tienen como mínimo un uso. El más importante es el medicinal con 14 especies, y en menor proporción los usos como el comestible, forrajero, ornamental o textil (Fernández *et al.*, 2008).

Por otra parte, estudios químicos de varias especies de *Asclepias* han demostrado la presencia de glicósidos cardíacos (cardenólidos) y diversos tipos de alcaloides derivados del indol, de la piridina o de la fenantroindolizidina, así como algunos flavonoides y ocasionalmente taninos (Fernández *et al.*, 2008).

1.2.4 *Asclepias linaria* Cav.

En el territorio mexicano a esta especie se le reconoce con los nombres comunes como: patito, romerillo, hierba del pavo, venenillo, algodoncillo, romero de monte, talayote de coyote, ali okaga (tepehuano), atusihuats (purépecha), entre otros. Es una hierba erecta, hasta de 1.0 m alto. Tallos puberulentos. Hojas alternas, sésiles; láminas 1.4-4.0 cm largo, 1-0 mm ancho, lineares, base aguda, ápice mucronado, membranáceas, haz y envés puberulento a glabrescente. Inflorescencias umbeliforme, laterales; pedúnculos 1.0-1.5 cm largo, vilosos; brácteas lineares, puberulentas; pedicelos 1.0-1.5 cm largo, vilosos. Flores blanco-verdosas, con matices morados; cáliz lobulado, lóbulos ca. (Aproximadamente) 3.0 mm largo, ca.1.0 mm ancho, angostamente ovados, ápices agudos, pilulosos adaxial y abaxialmente; corola reflexa, tubo ca. 0.5 mm largo, lóbulos 4.5 mm largo, 2.5 mm ancho, elípticos, ápice obtuso, pilulosos adaxialmente, glabros abaxialmente; ginostegio estipitado, 2.0 mm largo, columna 1.0 mm largo, capuchones 3.0-4.0 mm largo, oblongo-erectos, no divergentes, cornículos ampliamente adnatos. Folículos 2.5-4.5 cm largo, 2.0 cm ancho, atenuado-napiformes, glabrescentes, sobre pedicelos deflexos (Pérez, 2003; Fernández *et al.*, 2008).

A esta especie se le han atribuido propiedades dermatológicas utilizando el látex presente en los tallos para tratar heridas, infecciones y quitar verrugas (Fernández *et al.*, 2008); purgantes, ingiriendo el cocimiento de las hojas, una sola vez, cuando hay problemas estomacales por comer alimentos en mal estado; otros de las propiedades que se le atribuyen a esta especie son quitar el dolor de muelas, antidiabético y diurético (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009). Otras investigaciones reiteran estos usos y aplicaciones mencionadas de *A. linaria*, y estas propiedades y usos se han obtenido principalmente a los compuestos químicos presentes en raíces, frutos, y látex de esta especie, asimismo, se realizan extractos etanólicos y metanólicos de estas estructuras vegetales para su aplicación local en zonas que presentan dolor o picaduras (García-Alvarado *et al.*, 2001).

1.2.5 *Asclepias linaria*, distribución en México

La especie tiene una amplia distribución en el territorio mexicano con abundancia en el estado de: Aguascalientes, Distrito Federal, Durango, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Figura 1). Según Fernández *et al.* (2008) se distribuye en hábitat como: bosque mesófilo de montaña, pastizal, bosque tropical caducifolio, bosque de *Quercus*, bosque de *Pinus-Quercus*, matorral subtropical, vegetación secundaria (acahual), ruderal, bosque de *Pinus*, matorral xerófilo, chaparral. Observada a altitud desde los 400 a los 2 580 m.s.n.m.

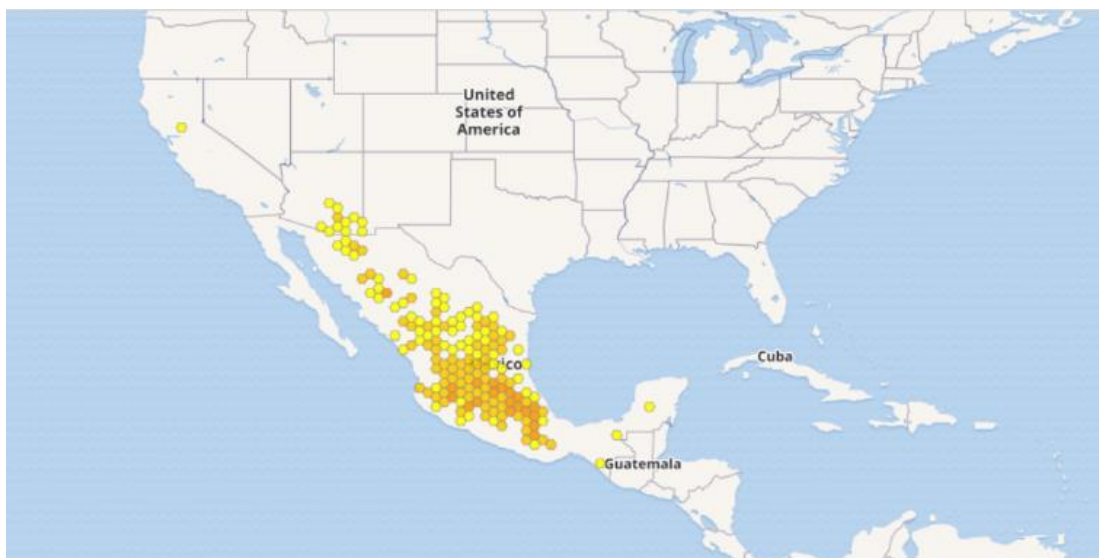


Figura 1. Distribución de la especie *Asclepias linaria* en México y Estados Unidos de América (imagen tomada de gbif.org).

1.2.6 Técnica de cromatografía líquida de alta presión o HPLC

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC), es una herramienta que permite separar los componentes químicos presentes en una mezcla dependiendo las interacciones químicas que estos compuestos tengan con la columna (fase estacionaria). Esta técnica consiste en dos fases; fase móvil y fase estacionaria no polar. Cuando se introduce una mezcla de sustancias en la corriente de la fase móvil, cada compuesto presente en la sustancia avanzará a lo largo del sistema con cierta velocidad que cambia dependiendo de la afinidad que presenta cada compuesto con

la fase móvil, y con la fase estacionaria con que se rellena la columna. Cuando las muestras hayan concluido el recorrido por la columna, se asume que los compuestos que constituían la mezcla estarán separados y serán detectados por el equipo con un tiempo específico de cada molécula o compuesto químico (Ozores, 2014).

Ozores (2014) comenta que la columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, debido a que en ella se lleva a cabo la separación de los compuestos. Cabe mencionar que es importante saber seleccionar correctamente la columna a utilizar, ya que con el uso de una columna inadecuada o de mala calidad es probable que los resultados esperados no sean buenos o considerados poco fiables, esto a pesar de contar con la mejor equipo o material de laboratorio.

1.2.7 Compuestos fenólicos

Cuando se abordan el término compuestos fenólicos, según Gimeno (2004), se hace referencia en general a las sustancias químicas que en su estructura poseen varios grupos fenol o mejor conocido como hidroxibenceno, el cual se encuentra unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Los compuestos fenólicos son sustancias químicas portadoras de un anillo aromático, un anillo benceno, enlazados a uno o más grupos hidróxilos, que a su vez interactúan con derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) (Tsimidou, 1998). Actualmente se considera que los compuestos fenólicos forman parte de los micronutrientes necesarios en la dieta humana, y que estos se encuentran ampliamente distribuido en gran cantidad de especies del reino vegetal. Estos compuestos químicos poseen diferentes estructuras químicas y propiedades y son considerados parte del metabolismo secundario de las plantas, se encuentran clasificados en: fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides. En su mayoría derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos, y a otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998).

Algunos autores como Porrás-Loaiza y López-Malo (2009) comentan que estos compuestos químicos actúan de manera natural como antioxidantes en los alimentos, y por esta razón, la industria alimenticia enfoca su interés en la obtención y preparación de productos con elevados contenidos de este tipo de compuestos, con la finalidad de evitar o reducir el uso excesivo de aditivos químicos que cumplen esta misma función antioxidante. Desde otro punto de vista, este tipo de compuestos se han sumado a la lista de alimentos funcionales, debido a las diferentes propiedades benéficas que trae su consumo en la salud humana. El papel primordial de estas moléculas está asociada a la protección del cuerpo contra diversas enfermedades, como ejemplo de ellas están las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Actualmente se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos.

La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Butler, 1992).

1.2.7.1 Flavonoides

Dentro de los compuestos fenólicos se encuentra un grupo de compuestos químicos llamado flavonoides, los cuales se presentan en los vegetales como pigmentos y brindan al organismo protección contra distintos tipos de daños o agentes oxidantes (radical), como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, la presencia de algunas sustancias químicas, entre otras. El cuerpo humano es incapaz de producir este tipo de compuestos químicos, por lo que debe obtenerlos mediante una dieta amplia y rica en verduras, frutas, bebidas enriquecidas o con la ingesta de suplementos alimenticios con elevado contenido de este tipo de compuestos. Estos compuestos representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Aherne y O'Brien, 2002).

El científico Szent-György quien ganó el premio nobel de química al descubrir y aislar un compuesto llamado citrina de la cascara de limón, dicha sustancia tiene funciones regulatorias en la permeabilidad de los capilares. En un principio los flavonoides fueron denominados como vitamina P, debido a la función de permeabilidad en capilares de

casaca de limón y de igual forma se le dio el nombre de vitamina C2, debido a que presentaba propiedades similares a la vitamina C (ácido ascórbico). A pesar de la similitud de propiedades con las vitaminas en 1950 se abandonó esta afirmación, debido a la ausencia de evidencia que confirmara que en verdad fueran vitaminas (Aherne y O'Brien, 2002).

La estructura de los flavonoides está constituida por un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales permiten la propiedad de quelación de algunos metales de transición y del hierro, esta propiedad les aporta a los flavonoides una gran actividad antioxidante estabilizadora de radicales libre (Havsteen, 1983; Peres, 1994). Por esta razón, estos compuestos juegan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, además, se les han atribuido un elevado uso terapéutico para el tratamiento de un elevado número de patologías, como cardiopatía isquémica, aterosclerosis y el cáncer (Pace-Asciak, *et al.*, 1995; Jang, *et al.*, 1997).

1.2.8 Radical libre

Se conoce como radical libre a todas aquellas moléculas químicas que se encuentran cargadas o no, que en su átomo presentan una inestabilidad debido a la ausencia de uno o más electrones apareados o impares en su orbital más externo, dando como resultado alteraciones a nivel atómico, provocando que la molécula inestable busque su equilibrio electrónico tomando el electrón faltante de otros compuestos o biomoléculas próximas a esta a través de proceso de oxidación (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013). Los radicales libres poseen una estructura birradicálica, suelen ser muy reactivos, con una vida media corta, por esta razón interactúan con las moléculas que se encuentran cercanas al sitio en donde se originaron (Cheesman, 1998; Basaga, 1989). Desde el punto de vista molecular son moléculas de tamaño diminuto presente en todo organismo vivo y tiene la capacidad de distribuirse con gran facilidad, producidos por diferentes mecanismos como: la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal (reacciones enzimáticas en el retículo endoplásmico), en cloroplastos y la gran cantidad de reacciones de oxidación. Todos estos procesos generan daños celulares

(específicamente oxidativos) al tener ciertas interacciones específicas con las principales biomoléculas de los organismos vivos (Maldonado *et al.*, 2010).

Sin embargo, a pesar de lo antes mencionado, algunos radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ERO), mismos que suelen ser generadas por el propio organismo debido a procesos metabólicos celulares, muestran efectos benéficos en bajas concentraciones. Estos forman parte importante de reacciones fisiológicas de las células; siendo estas una defensa contra diversos agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos, etc.) algunos procesos de señalización celular (mitosis), fagocitosis, contribuyendo en la síntesis de colágeno, prostaglandinas, activación de algunas enzimas presentes en la membrana celular, reduciendo la producción de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, en la modificaciones de la biomembrana y favorecen la quimiotaxis (Naqui *et al.*, 1986; Beckman y Koppenal, 1996; Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

1.2.9 Efectos de los radicales libres en biomoléculas

Según Venereo (2002), el daño celular producido por las especies reactivas de oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

Lípidos. En estas biomoléculas se produce uno de los daños más graves, ya que se genera un proceso llamado peroxidación lipídica. Este proceso consiste en un daño a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, lo cual altera la permeabilidad de la membrana celular, y como consecuencia, se forman edemas o la muerte celular.

Proteínas. La presencia de radicales aumenta la oxidación de algunos aminoácidos como: fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Además, favorece los entre cruzamientos de cadenas peptídicas y la adición de grupos carbonilos.

Ácidos desoxirribonucleicos (ADN). Alteración de la estabilidad de la secuencia normal de ADN (mutación) y carcinogénesis, y como resultado de lo mencionado existe una pérdida en la expresión o síntesis de ciertas proteínas debido al daño de o modificaciones que genera la oxidación en la secuencia nucleotídica de un gen, ya sea por delección, fragmentación, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamiento

cromosómico o desmetilación de citosinas que tienen funciones regulatorias en la expresión de los genes.

1.2.10 Pruebas de citotoxicidad celular

Las pruebas citotóxicas o de citotoxicidad son técnicas que se implementan para conocer el efecto que tienen ciertos compuestos o sustancias en diferentes tipos celulares. Existen diversas metodologías que permiten determinar efectos citotóxicos de un compuesto o agente sobre líneas celulares tumorales o cultivos primarios de células normales, esto con la finalidad de conocer daños o beneficios que pueden tener los compuestos o extractos que se desean analizar (Muñoz, 2013).

Dentro de estas pruebas celulares se utilizan gran variedad de marcadores fluorescentes o compuestos químicos que permiten, según sea el interés del investigador, conocer diversas características de las células y el efecto que generó la exposición de las células a los extractos o compuestos puros directamente. Esto puede ser: daño al material genético (ADN), desintegración de la membrana celular, desequilibrio o fallo metabólico, apoptosis celular, entre otras. Algunos de los marcadores fluorescentes más utilizados en citometría de flujo para conocer las características celulares antes mencionadas son: YO-PRO, 7-ADD (7-aminoactinomicina), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), anexina V, entre otros (Martínez, 2009).

1.3 JUSTIFICACIÓN

Posterior a una amplia búsqueda y recopilación de información sobre las especies del género *Asclepias*, específicamente *A. linaria*, no existe literatura alguna o investigaciones de esta especie que hable sobre la composición fenólica, la actividad antioxidante, ni sobre la actividad antiproliferativa que tienen los extractos de esta planta. Por ello, se considera pertinente realizar una investigación que permita conocer qué tipo de compuestos fenólicos están presentes en las hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria*, y si dichos compuestos presentan actividad antioxidante, además de determinar su efecto sobre la proliferación de las líneas neoplásicas K562 y HL60.

1.4 HIPÓTESIS

Los extractos hidroalcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria* presentan compuestos fenólicos con actividad antioxidante y efecto antiproliferativo en células cancerígenas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Determinar el contenido fenólico, la actividad antioxidante y antiproliferativa de extractos de *A. linaria*.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el contenido fenólico y la actividad antioxidante en extractos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria*.
2. Determinar los perfiles fenólicos mediante UPLC-MS de extractos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria*.

3. Definir la actividad antiproliferativa y el efecto citotóxico de extractos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre líneas celulares leucémicas (Leucemia Mieloide Crónica (K562), Leucemia Mieloide Aguda (HL60)).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Colecta

La colecta de las plantas de la especie *A. linaria* (Figura 2) se realizó el 26 de octubre de 2017 en la localidad de Fray Domínguez, ubicado en el municipio de Pajacuarán, el cual se encuentra ubicado al noreste del estado de Michoacán. La distancia desde el lugar donde se realizó esta investigación a dicha población es de 27.9 Km. En la Figura 3 se puede apreciar con mayor precisión la distancia recorrida y el tiempo aproximado de llegada. Las muestras colectadas se colocaron en bolsas de plástico con cierre en una hielera para evitar el daño (Figura 4).



Figura 2. Planta silvestre de *A. linaria*

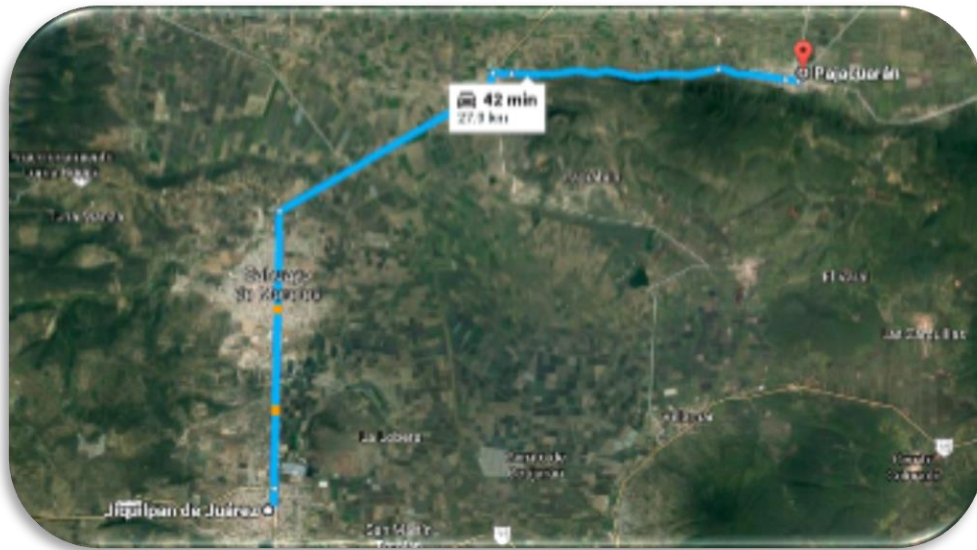


Figura 3. Distancia y ubicación de la localidad de Fray Domínguez, Pajacuarán, en el Estado de Michoacán



Figura 4. Hojas de *A. linaria* colectadas y almacenadas en bolsas de plástico marcadas por sitio de colecta

2.2 Secado

Las muestras colectadas se colocaron en bolsas de papel estraza y se realizó el secado en una estufa de laboratorio, a una temperatura de 50°C durante 48 h.

2.3 Molienda

Se tomaron las muestras previamente secadas, se colocaron en un mortero de tamaño mediano, y con ayuda de un pistilo se molieron hasta obtener un tamaño de partícula pequeño. Posteriormente se utilizó un tamiz del número 60 con el objetivo de homogeneizar el tamaño de partícula a 250 μm . Las muestras obtenidas se almacenaron en bolsas Ziploc® en un lugar oscuro y seco.

2.4 Preparación de los extractos

La extracción se realizó utilizando la metodología descrita por Medina-Medrano *et al.* (2016). Se tomó 1 g de tejido secado previamente, molido y tamizado, en un tubo Falcon de 50 mL y se agregan 20 mL de los respectivos solventes a utilizar, los cuales fueron: etanol al 50%, etanol al 100%, metanol al 50% y metanol al 100%. Los tubos se cubrieron con papel aluminio para protegerlos de la luz. Posteriormente se dejaron en agitación 24 h a 100 rpm. Pasadas las 24 h se centrifugaron las muestras por 10 min a 4000 rpm y el sobrenadante se recuperó en otro tubo Falcon. Al precipitado de las muestras se le añadieron 20 mL más del respectivo solvente utilizado para cada muestra y se dejó en agitación durante 3 h a 100 rpm. Después, se centrifugó por 10 min a 4000 rpm y el sobrenadante se recuperó de nuevo. Ambos extractos se filtraron con un papel filtro (Whatman de 150 mm de diámetro, tipo 1001-150) evitando la presencia de partículas no deseadas. El extracto total obtenido tuvo un volumen final de 40 mL.

2.5 Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

La cuantificación de fenoles totales se determinó usando la metodología de Folin-Ciocalteu (Nurmi *et al.*, 1996). Para estimar la concentración se realizó una curva estándar de ácido gálico (AG, a ocho concentraciones entre 20 y 230 $\mu\text{g/mL}$). A 250

μL de cada solución se agregó 2.5 mL de agua destilada. Se agregó 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se agitó con la finalidad de homogenizar la mezcla. Finalmente, se añadió 375 μL de una solución de Na_2CO_3 al 20 % y se dejó reposar en la oscuridad por 2 h a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de microplaca UV visible, marca BioTek Instruments Inc., a una longitud de onda de 760 nm, utilizando el solvente correspondiente de cada muestra como blanco en lugar de extracto de la muestra. La determinación de los compuestos fenólicos en los extractos de *A. linaria* se tomó 250 μL del mismo y se analizó como se describió para el estándar. Para la obtención de la ecuación de la línea de tendencia se generó una gráfica donde se colocaron las concentraciones y las absorbancias obtenidas de los extractos de la muestra, con la finalidad de conocer las concentraciones a las que estaban los volúmenes a utilizar. El contenido de fenoles totales se expresó en miligramos equivalentes de AG por gramo de muestra seca (mg equivalentes AG/g de MS).

2.6 Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides se estimó mediante el método AlCl_3 (Lamaison y Carnat, 1990): 1 mL de solución de extracto se le añadió a 1 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ etanólico al 2 %. La absorbancia se midió 10 min después a 430 nm. Para estimar la concentración de flavonoides en la muestra se realizó una curva estándar con catequina (C, a seis concentraciones entre 50 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tratada en las mismas condiciones. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de C/g de MS (mg EC/g MS).

2.7 Cuantificación de taninos condensados

El método que se utilizó para determinar el contenido de procianidinas en los extractos de *A. linaria* fue descrito por Seabra *et al.* (2012). A 250 μL de cada muestra se le agregaron 250 μL de vainillina al 1% (p/v, disuelta en metanol absoluto) seguido de 250 μL de la solución de ácido sulfúrico al 25% (v/v, disuelto en metanol absoluto) y se incubó a una temperatura de 30° C por 15 min. Para estimar la concentración de taninos se realizó una curva de calibración con catequina a distintas concentraciones entre 10 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La absorbancia a la que se leyeron las muestras fue a 500 nm

y los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina (EC)/g de muestra seca (MS).

2.8 Análisis de compuestos fenólicos mediante UPLC-MS

2.8.1 Proceso de concentración y liofilizado de los extractos para el análisis de compuestos fenólicos mediante UPLC-MS

El proceso de concentración y liofilizado de los extractos se realizó bajo las siguientes condiciones: se tomaron 2.5 mL de cada uno de los extractos y se colocaron en tubos de vidrio especiales que utiliza el equipo para el proceso de concentración. Se estableció una temperatura de -50°C utilizando gas nitrógeno grado industrial, una presión constante de 12 psi durante un tiempo de 1h y 16 min, todo esto utilizando un equipo TurboVap® Classic LV (Biotage, Charlotte, NC, USA). Posteriormente se resuspendieron individualmente cada uno de los 14 extractos en 2 mL de agua destilada y se congelaron a -20°C por un tiempo de 48 h. Una vez lograda la congelación, los extractos se sometieron al proceso de liofilización utilizando un equipo Labconco modelo 7753022 con las siguientes condiciones: valor de vacío: 0.014 mBar, colector a -56°C , condición de cámara a 21°C por un tiempo de 72 h. Una vez obtenidos los extractos concentrados y liofilizados se almacenaron en tubos Eppendorf de 2 mL en refrigeración a 4°C y aislados de la luz.

2.8.2 La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos mediante UPLC-MS

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó únicamente a los extractos que mostraron los porcentajes de inhibición de células leucémicas más sobresalientes y, además, una concentración considerable de compuestos fenólicos. La técnica se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: veinte μL de extracto fueron inyectados en un equipo UPLC ACQUITY I-Class (Waters Corporation Milford, MA, USA.) acoplado a un espectrómetro de masas Xevo TQ-S micro Waters (Milford, EUA), con una columna Waters BECH C18 (100 mm x 2.1 mm) (Waters, Irlanda, Europa) empacada con $1.7\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula. La temperatura de la columna se

mantuvo a 30°C. Las fases móviles fueron ácido fórmico al 0.3% (A) y metanol (B) con un flujo de 0.3 mL/min. El gradiente de elución fue el siguiente: 90% A como condición inicial, 30% de A al min 11 y 90% de A en el min 15. Las condiciones del TQ-S micro fueron las siguientes: voltaje capilar de 3 kV, la fuente de ionización fue en modo de electrospray (ESI- y ESI+), la temperatura de desolvatación fue de 500°C, el flujo de gas de desolvatación se fijó en 1000 L/h y la temperatura de fuente fue de 150°C.

Los estándares utilizados fueron: apigenina, ácido *p*-cumárico, naringina, catequina, ácido clorogénico, ácido cinámico, ácido cafeico, rutina, quercetina, ácido ferúlico, ácido gálico y vainillina. La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo usando una curva de calibración en el rango de 0.25–5 µg/mL. La concentración se expresó como microgramos por mililitro de extracto (µg/mL de extracto) de *A. linaria*. El análisis de datos se desarrolló usando el software Mass Lynx y el para la cuantificación el software Targetlynx (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Los estándares de los compuestos fenólicos analizados se muestran en la Tabla 1 con los valores de transición, voltaje de cono, energía de coalición y tiempo de retención de cada uno de los compuestos.

Tabla 1. Condiciones para la adquisición de los compuestos fenólicos en el detector Xevo micro TQ-S.

Compuesto	TR (min)	MI*	MRM	Voltaje de cono (V)	Energía Coalición (eV)
Vainillina	5.46	+	153.01>125.03	40	0
(+)-Catequina	3.97	+	291.15>123.10 291.15>165.10	13 13	13 10
Ácido <i>p</i> -cumárico	5.84	-	163.10>119.00	20	10
Ácido gálico	1.45	-	169.10>125.00	15	12
Ácido cafeico	4.61	-	179.10>135.00	20	10
Ácido ferúlico	6.53	-	193.07>133.90 193.07>178.04	10 10	13 17
Quercetina	8.86	-	301.02>150.99 301.02>178.98	20 20	10 10
Naringina	9.11	+	273.20>147.10 273.20>153.05	35 35	20 20
Apigenina	9.97	-	269.15>117.00 269.15>151.00	30 30	37 23

Compuesto	TR (min)	MI*	MRM	Voltaje de cono (V)	Energía Coalición (eV)
Rutina	7.15	-	609.10 >300.0	80	28
Ácido clorogénico	4.26	-	353.05 >191.03	20	15
Ácido cinámico	9.01	-	146.80 >103.00	10	10

TR, tiempo de retención; MI, ion molecular; MRM, monitorización de múltiples reacciones.

2.9 Análisis se la actividad bloqueadora del radical libre DPPH

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó el método de DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) descrito por Barriada-Bernal *et al.* (2014). Para ello, se preparó una solución de DPPH^{*} (9.8 µg/mL en etanol absoluto). Para determinar la actividad bloqueadora, 90 µL de reactivo de DPPH^{*} se mezclaron con 10 µL de extracto (concentración incrementada gradualmente (0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.175, 0.200, 0.225 y 0.250 mg/mL) y después se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Después, la absorbancia se midió a 523 nm, utilizando etanol absoluto como blanco. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Actividad bloqueadora del radical DPPH (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Donde A_{blanco} es la absorbancia del blanco (DPPH^{*} más 50 µL de etanol absoluto), A_{muestra} es la absorbancia de la muestra (DPPH^{*} más 100 µL de muestra) y A_{control} es la absorbancia del control (solución de DPPH^{*}). La concentración inhibitoria media (IC₅₀) que representa la concentración de antioxidante que se requiere para obtener un 50 % de actividad inhibitoria se calculó mediante un gráfico construido con la actividad bloqueadora del radical DPPH (%) y las concentraciones de extracto utilizadas.

2.10 Determinación de la actividad bloqueadora del radical ABTS

El ensayo del ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]) se llevó cabo de acuerdo a Lee *et al.* (2015). El radical catiónico ABTS^{•+} fue generado a partir de la reacción de oxidación con 1 mL de ABTS^{•+} (7 mmol/L) y 17.6 µL de solución de persulfato de potasio (140 mmol/L), la mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente por 16 h. La solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol absoluto para obtener

una absorbancia de 0.700 ± 0.01 a 734 nm. Cuando se forme el radical, una alícuota del extracto (50 μ L) se mezcló con 50 μ L de solución de ABTS^{•+}, la absorbancia se registró a 734 nm después de 6 min. El ensayo se realizó con nueve concentraciones de extracto (0.125, 0.250, 0.375, 0.500, 0.625, 0.875, 1.00, 1.113, 1.250 mg/mL). El porcentaje de actividad se calculó con la fórmula:

$$\text{Actividad bloqueadora del radical ABTS (\%)} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}}] \times 100$$

Donde A_{blanco} es la absorbancia del blanco (ABTS^{•+} más 50 μ L de solvente correspondiente), A_{muestra} es la absorbancia de la muestra (ABTS^{•+} más 50 μ L de muestra). La concentración de extracto que proporcione una inhibición del 50 % del radical ABTS^{•+} (IC_{50}) se calculó a partir de un gráfico construido con los valores del porcentaje de inhibición contra la concentración de extracto.

2.11 Análisis de la actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total se realizó de acuerdo al método reportado por Prieto *et al.* (1999). Para ello, 100 μ L de cada extracto de *A. linaria* se combinaron con 1 mL de una solución preparada con ácido sulfúrico 0.6 M, fosfato de sodio 28 mM, y molibdato de amonio 4 mM. Las muestras se incubaron en un termoblock a 95°C durante 90 min. Después, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, la absorbancia de cada una se midió a 695 nm contra un blanco formado por todos los componentes de la mezcla de reacción y agregando etanol absoluto en vez de extracto. La actividad antioxidante de las muestras se expresó como mg equivalentes de ácido ascórbico por mL de extracto (mg EAA/g MS), calculados a partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración.

2.12 Pruebas celulares

2.12.1 Pruebas de viabilidad celular

Para evaluar el efecto que tiene los extractos sobre la viabilidad sobre células leucémicas por citometría de flujo, se implementó la técnica descrita por Moreno-Lorenzana *et al.* (2016). Las células de neoplasia hematológica utilizadas fueron K562

y HL60, obtenidas en American Type Culture Collection (ATCC) y como células control, para conocer el efecto tóxico de los extractos, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica obtenidas de individuos sanos (CMN). Las células mencionadas se mantuvieron en medio de cultivo RPMI adicionado con 10% SFB (suero fetal bovino) y 1% antibiótico (estreptomicina/penicilina) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Los tres cultivos celulares fueron expuestos *in vitro* a distintas concentraciones de los extractos (25, 50, 75, 100, 150 µg/mL), utilizando como control negativo en los tres casos el solvente dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el solvente con el cual se resuspendieron los extractos previamente liofilizados, y como control positivo el fármaco imatinib a 2.5 µM de concentración. Después de 48 h de incubación se lavaron las células con 1 mL de sustancia FACSFlow, y se centrifugaron a 1500 rpm por 6 min. Después, se decantó el sobrenadante y se agregaron nuevamente 200 µL de sustancia FACSFlow más 200 µL de marcador fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (2 µL/mL) (Sigma-Aldrich) como indicador de viabilidad celular, el cual tiene la capacidad de incorporarse a las células dañadas o no viables, y se incubó por 15 min. Finalmente se evaluó la viabilidad en un citómetro de flujo BD FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A partir de este ensayo se calculó el valor de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) con los datos obtenidos de la citometría de flujo con el software FlowJo 10V.

Las figuras que se elaboraron a partir de los datos obtenidos de las pruebas celulares se estarán expresando, en el eje x, el valor obtenido del logaritmo base 10 de cada concentración aplicada, mencionada anteriormente, (0, 1.4, 1.7, 1.88, 2.00 y 2.18, respectivamente). Esto se realizó con la finalidad de normalizar los datos obtenidos y obtener gráficos más interpretables.

2.12.2 Ensayo de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para llevar a cabo el ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno se utilizaron exclusivamente las células HL60 y 9 extractos que mostraron tener el potencial más elevado de los 28 extractos evaluados. Para escoger los extractos utilizados se aplicó un filtro de discriminación que consistía en identificar aquellos extractos que tuvieran un índice de selectividad ≥ 5 , una concentración de moderada

a elevada de compuestos fenólicos (7 a 10 mg EAG/g MS), concentración de moderada a elevada de compuestos flavonoides (2.5 a 4.0 mg EC/g MS), y aquellos que tuvieran un valor de $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$. Lo anteriormente mencionado se realizó de acuerdo a los datos previamente obtenidos de las técnicas realizadas. El ensayo consistió en aplicar el valor de IC_{50} obtenido con las células HL60 correspondiente a cada uno de los extractos seleccionados e incubarlos a 37°C con 5% de CO_2 a dos tiempos diferentes de evaluación: 1 y 3 h. Seguido a la espera de los tiempos determinados se le agregó el reactivo DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) (Sigma-Aldrich) el cual se oxida y fluoresce cuando reacciona con especies reactivas de oxígeno. La producción de especies reactivas se evaluó por citometría de flujo. Los datos obtenidos de la citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo 10V y se expresaron como intensidad media de fluorescencia (IMF).

2.13 Análisis estadístico

Las técnicas de contenido fenólico, flavonoides, actividad antioxidante total, actividad inhibitoria de radicales ABTS y DPPH, y el poder reductor (FRAP), cada una de estas técnicas implementadas se realizó por triplicado. A los resultados correspondientes se les aplicó a un análisis estadístico (ANOVA). Las diferencias entre los valores con $p < 0.05$ se consideraron significativas. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey, mientras que para medir correlación entre las determinaciones se utilizó la prueba de Pearson, utilizando el programa IBM SPSS versión 25.0. Para el caso de los análisis estadísticos (comparación de medias de Dunnett y correlación de Pearson) de las pruebas celulares se utilizó el mismo software antes mencionado (IBM SPSS versión 25.0).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

Los valores obtenidos de la cuantificación de fenoles totales presentes en extractos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria* se registraron en un intervalo comprendido de 5.01 ± 0.29 hasta 10.56 ± 0.66 mg EAG/g MS, siendo la población 6 (P6), extractada con etanol absoluto la de menor contenido, y la población con mayor contenido fue la población 3 (P3) extractada con etanol al 50% (Figura 5 y Tabla 4). Las muestras mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo al análisis estadístico.

Se observó que las poblaciones y extractos que mostraron tener mayor concentración de compuestos fenólicos fueron los extractados con los solventes etanol y metanol al 50%, caso contrario para los extractos utilizando concentraciones absolutas de solvente, esto coincide con las investigaciones de Carbonell-Capella *et al.* (2016) y Muñoz *et al.* (2015) quienes reportan un mayor contenido de compuestos fenólicos al utilizar solventes hidroalcohólicos (etanol al 50% y 70%, respectivamente), atribuyendo esto a que la combinación de agua con etanol permite una mayor solubilidad de la membrana celular y como efecto mayor extracción de compuestos del interior de la célula. En la única investigación publicada sobre el contenido de fenoles totales para la especie *A. linaria* reportan concentraciones de 9.95 mg EAG/g MS en extractos etanólicos de follaje, los cuales muestran bastante similitud con los obtenidos en esta investigación (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2018). Es de gran importancia mencionar que las concentraciones encontradas de compuestos fenólicos en los extractos estudiados pueden mostrar elevado efecto antioxidante y, de igual forma, verse reflejado este potencial de los compuestos en la inhibición de células leucémicas.

Por otra parte, Ignat *et al.* (2013), determinaron el contenido polifenólico de extractos etanólicos (etanol al 80%) y acuosos de partes aéreas de *Asclepias syriaca*, obteniendo como resultado una baja concentración de compuestos fenólicos en los extractos acuosos, con un contenido de 2.87 ± 0.1 mg EAG/g MS, mientras que los extractos etanólicos (etanol al 80%) mostraron una concentración de 11.79 ± 0.18 mg

EAG/g MS, contenido similar a los reportados en los extractos metanólicos y etanólicos (al 50%) de hojas de *A. linaria*, analizados en esta investigación. De igual manera, Raja *et al.*, (2005) evaluaron el contenido fenólico total de extractos hidroalcohólicos (etanol al 70%) de partes aéreas de *Asclepias curassavica* reportando una concentración de 0.0495 mg equivalentes de pirocatecol (PE)/g MS, valores menores a los reportados para *A. linaria*. Por otra parte, otros autores reportan contenidos de 54.11, 105.67 y 122.67 mg EAG/g MS para extractos de la especie *A. curassavica*, extractadas con hexano, cloroformo y metanol, respectivamente (Das *et al.*, 2015), siendo todos estos contenidos mayores a los reportados para *A. linaria* en esta investigación.

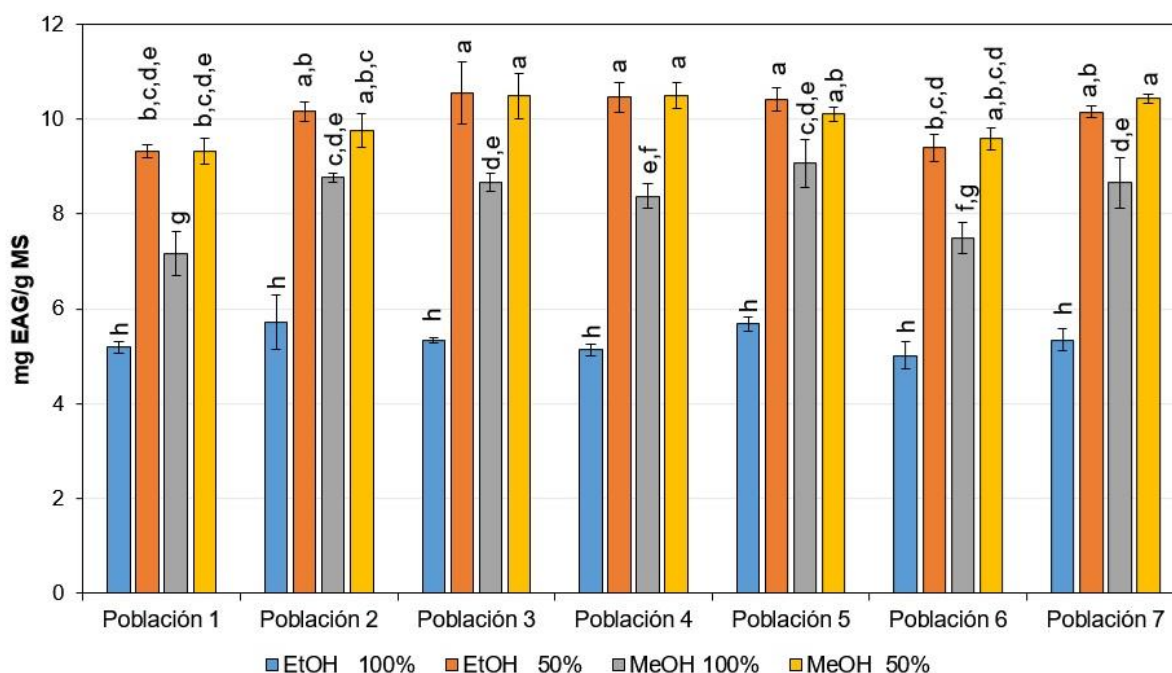


Figura 5. Contenido fenólico total (CFT) de extractos etanólicos y metanólicos de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.2 Contenido de flavonoides totales (CFLT)

La técnica de cuantificación de flavonoides totales por el método AlCl_3 demostró la presencia de flavonoides en los extractos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria*. Como resultado se obtuvieron valores en un intervalo que va de 1.52 ± 0.06 hasta 4.16 ± 0.30 mg equivalentes de catequina (EC)/g MS, correspondiendo el valor

inferior a la población 7 (P7) extractada con etanol absoluto, y el valor más alto del rango para la población 5 (P5) extractada con metanol absoluto, como se muestra en la Figura 6 y en la Tabla 4. Se observó una mayor tendencia de extracción de flavonoides en todas las poblaciones extractadas con metanol al 100%, seguido de etanol al 50%, y por último etanol al 100% y metanol al 50%. Esta tendencia de extracción también fue reportada por Amzad *et al.* (2013) quienes mencionan que los extractos metanólicos mostraron mayor contenido de flavonoides comparado con los extractos butanólicos, clorofórmicos, y de acetato de etilo realizados en la misma investigación. Esta tendencia de extracción puede deberse a que como lo indica , Cartaya y Inés (2001), los compuestos de tipo flavonoides que poseen gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, tienden a ser moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, butanol, acetona, DMSO o metanol, tal como se observó en esta investigación. De igual forma, Henry *et al.* (2016) mencionan que el proceso de extracción de flavonoides tiene un mayor efecto cuando se utilizan concentraciones elevadas del disolvente, asumiendo que estas concentraciones pueden disolver con mayor facilidad los constituyentes estructurales de algunas moléculas, conduciendo a un aumento del rendimiento de extracción. Por otra parte, Vázquez-Sánchez *et al.* (2018) reportaron en extractos etanólicos de follaje de la especie *A. linaria* valores de 95.53 mg EC/g MS, los cuales mostraron ser mayores a los reportados en esta investigación. Otros investigadores (Ignat *et al.*, 2013) reportaron la presencia de flavonoides en extractos acuosos y etanólicos (etanol al 80%) de partes aéreas de *A. syriaca*, reportando valores de 0.08 ± 0.01 y 0.70 ± 0.09 mg equivalentes de rutina (RE)/g MS, respectivamente, siendo estos valores reportados considerablemente menores a los obtenidos en esta investigación. Por otra parte, Hernández (2013), logró determinar la presencia o ausencia de diversos compuestos con actividad antioxidante como son: flavonoides, taninos, y otro tipo de compuestos químicos como; alcaloides, naftoquinonas, esteroides, triterpenos, saponinas, glucósidos cardíacos, cumarinas, y lactonas sesquiterpénicas en extractos hidroalcohólicos (etanol al 70%) de tallos, hojas y flores de *A. curassavica*. Dichos autores no reportan la presencia de flavonoides en dos de las tres estructuras (tallo, hoja) utilizadas para extracción, a excepción, de los extractos de flor que mostraron

una elevada concentración de flavonoides. Dicha investigación solo reportó la presencia o ausencia de los compuestos, no la cantidad presente en los extractos.

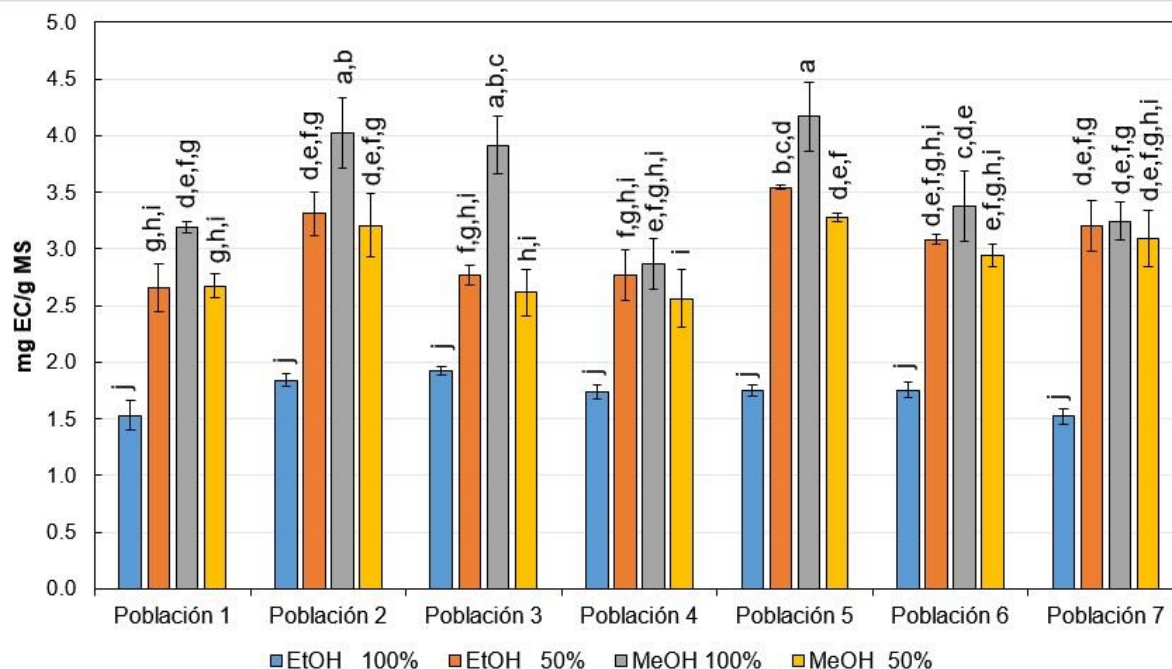


Figura 6. Contenido de flavonoides totales (CFLT) de extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.3 Contenido de taninos condensados (CTC)

La técnica implementada para la cuantificación de taninos condensados indicó la presencia de compuestos de esta naturaleza en distintas concentraciones en los extractos de las siete poblaciones evaluadas, mostrando valores desde 0.41 ± 0.03 hasta 3.16 ± 0.16 mg equivalentes de catequina (EC)/g MS (Figura 7 y Tabla 4). La menor concentración de taninos se observó en el extracto etanol al 50% de la población 1 (P1E50) y la mayor concentración para el extracto metanol al 100% de la población 4 (P4M100).

Relacionando los valores obtenidos de la cuantificación de taninos condensados (CTC) con los obtenidos para la cuantificación de fenoles totales (CFT), se puede resaltar que el valor de concentración obtenido por el extracto P1E50, el cual indicó tener la menor concentración de taninos condensados, corresponde aproximadamente a un

4.3% del contenido de compuestos fenólicos totales presentes en el mismo extracto y 37.7% para el caso del extracto que indicó tener la mayor concentración (P4M100). De igual manera, se logró apreciar una mayor capacidad de extracción de taninos condensados con metanol al 100%, seguido de etanol al 100%, y por último, los solventes que mostraron el menor potencial de extracción fueron los hidroalcohólicos (metanol al 50% y etanol al 50%). En la investigación realizada por Fernández *et al.* (2008), se indican que algunas especies del género *Asclepias* son utilizadas en la medicina tradicional mexicana y poseen propiedades para el tratamiento de diversas infecciones cutáneas, estomacales, respiratorias, etc., y estas propiedades se atribuyen principalmente a la presencia de taninos en las estructuras de las plantas utilizadas en el tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, en dicha investigación no se reportó, la presencia de taninos en la especie *A. linaria*. Hernández (2013), realizó un análisis de presencia o ausencia en extractos etanólicos al 70% de diversos compuestos (cumarinas, flavonoides, saponinas, etc.), entre ellos taninos, en tallos, hojas y flores de la especie *Asclepias curassavica*, en la cual no logró identificar en ninguna de las estructuras analizadas compuestos de tipo taninos. Por otra parte, Ignat *et al.* (2013) reportaron valores de 1.59 ± 0.01 y 4.0 ± 0.03 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g MS, para extractos acuosos y etanólicos al 80% respectivamente, de partes aéreas, la especie *Asclepias syriaca*, siendo el valor de los extractos acuosos menor a los obtenidos por los extractos metanólicos de hojas de *A. linaria* (Figura 7), y similares para el caso de los extractos etanólicos al 80% analizados en esta investigación.

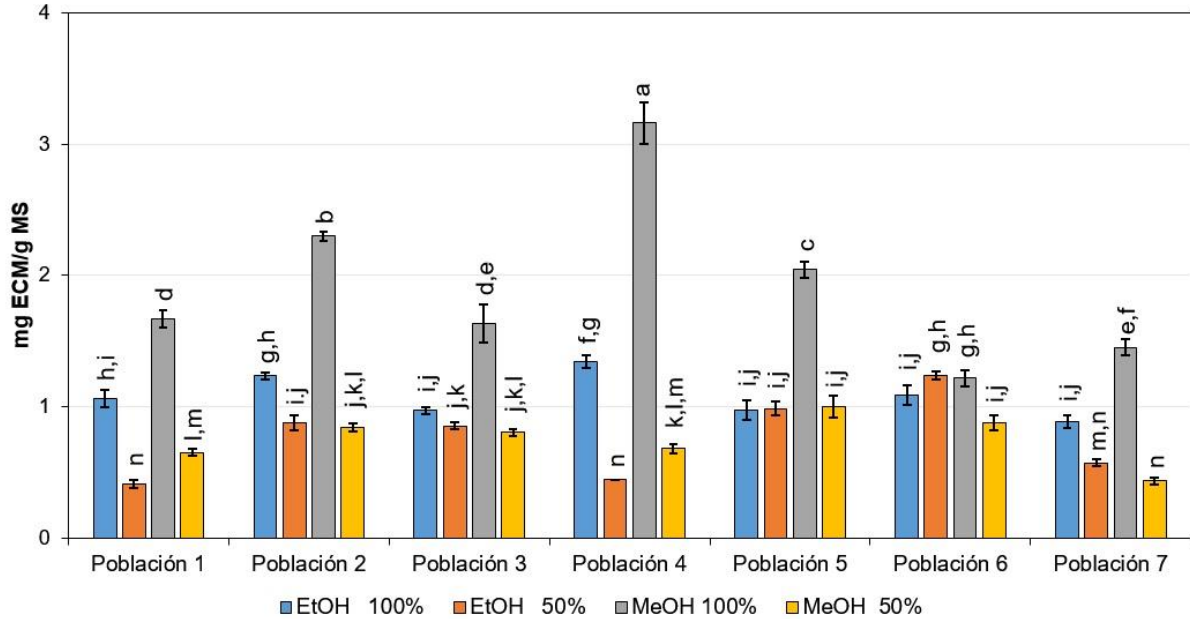


Figura 7. Contenido de taninos condensados (CTC) de extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.4 Perfiles fenólicos mediante ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS)

La determinación de los perfiles fenólicos se realizó únicamente a 14 extractos seleccionados (extractos metanólicos al 100% y metanólicos al 50% de 7 poblaciones) debido a que mostraron una concentración considerable de compuestos fenólicos. Los resultados de los perfiles fenólicos de los 14 extractos obtenidos mediante UPLC-MS revelaron la presencia de cuatro compuestos fenólicos en la mayoría de las poblaciones y extractos analizados: dos ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (ác. *p*-cumárico y ácido ferúlico) y dos flavonoides (rutina y quercetina), compuestos que se mostraron como los más abundantes en ambos extractos evaluados. Las concentraciones y compuestos identificados en los extractos metanólicos al 100% y al 50% se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Los datos obtenidos no indicaron la presencia de apigenina, naringina, catequina, vainillina, ácido clorogénico, cinámico, gálico y cafeico, como se puede apreciar en las Tablas 2 y 3. La ausencia o no detección de los compuestos mencionados puede

deberse a que el solvente de extracción utilizado no tenía la polaridad necesaria; las concentraciones de estos compuestos eran muy bajas para lograrse detectar con las curvas de calibración utilizadas; los compuestos no se lograron extraer debido a que se encontraban en su forma glicosida y no se analizaron más estándares en su forma glicosida, o la especie estudiada no produce estos compuestos.

Por otra parte, se observó que la concentración y composición fenólica de los extractos fue notoriamente afectada por el solvente de extracción utilizado ya que los extractos metanol al 100% mostraron mayor concentración de compuestos fenólicos. La presencia de ác. *p*-cumárico se identificó en dos de las siete poblaciones (4 y 5), caso contrario fue el observado en los extractos metanol al 50%, ya que en ninguna de las poblaciones evaluadas se identificó la presencia de este compuesto (Tabla 2 y 3). Esta diferencia de comportamiento (presencia o ausencia de ác. *p*-cumárico) puede deberse a la solubilidad y naturaleza polar del compuesto, mostrando tener mayor afinidad al solvente metanol al 100%. La presencia del ácido *p*-cumárico es de suma importancia debido a que es el precursor del compuesto *p*-cumaril CoA el cual es, según Rodríguez (2008), la principal molécula de la ruta biosintética de flavonoides, y elevadas concentraciones de este pueden contribuir a un contenido elevado de compuestos de tipo flavonoide.

Desde otro punto, algunas investigaciones reportan la presencia de ác. vainillínico, siríngico y *p*-cumárico, en extractos acuosos de partes aéreas de la especie *Asclepias syriaca* y los ácidos: gálico, vainillínico, siríngico, *p*-cumárico y los flavonoides: rutina, quercetina y canferol, en los extractos etanólicos al 80% de la misma especie (Ignat *et al.*, 2013). Sikorska *et al.* (2000) identificaron la presencia de compuestos fenólicos de interés indicando específicamente la presencia de los ácidos resorcílico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico, cafeico, cumárico, férulico y clorogénico y el flavonoide vainillina en extractos etanólicos de hojas y flores de dicha especie.

Tabla 2. Composición fenólica de extractos metanólicos al 100% de hojas de *Asclepias linaria* identificada mediante ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS).

		Compuesto fenólico				
		Ác. <i>p</i> -cumárico	Ác. ferúlico	Rutina	Quercetina	Total
Población 1	TR (min)	ND	6.29±0.01	7.15±0.01	8.90±0.00	
	µg/mL MS	ND	0.49±0.02	37.53±1.10	11.33±0.23	49.35
Población 2	TR (min)	ND	6.29±0.01	7.15±0.01	8.91±0.01	
	µg/mL MS	ND	0.82±0.06	49.33±0.57	6.00±0.00	56.15
Población 3	TR (min)	ND	6.28±0.01	7.15±0.00	8.90±0.00	
	µg/mL MS	ND	0.96±0.00	28.00±0.00	5.17±0.58	34.13
Población 4	TR (min)	5.9±0.01	6.27±0.01	7.14±0.00	8.90±0.01	
	µg/mL MS	1.0±0.00	0.75±0.00	51.50±0.00	6.72±0.96	59.97
Población 5	TR (min)	5.89±0.00	6.29±0.03	7.15±0.00	8.91±0.01	
	µg/mL MS	0.25±0.01	0.68±0.10	61.33±4.50	9.00±1.00	71.26
Población 6	TR (min)	ND	6.28±0.01	7.15±0.01	8.90±0.01	
	µg/mL MS	ND	1.13±0.01	72.33±1.52	6.33±0.58	79.79
Población 7	TR (min)	ND	6.31±0.02	7.16±0.01	8.99±0.00	
	µg/mL MS	ND	1.90±0.12	79.67±2.51	10.67±0.58	92.24

Los valores expresados representan la media ± desviación estándar.
TR, tiempo de retención; MS, muestra seca; ND, no determinado.

Tabla 3. Composición fenólica de extractos metanólicos al 50% de hojas de *Asclepias linaria* identificada mediante ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS).

		Compuesto fenólico				
		Ác. <i>p</i> -cumárico	Ác. ferúlico	Rutina	Quercetina	Total
Población 1	TR (min)	ND	6.27±0.01	7.15±0.00	8.87±0.06	
	µg/mL MS	ND	0.40±0.00	30.00±0.40	13.47±0.61	43.87
Población 2	TR (min)	ND	6.29±0.01	7.15±0.00	8.91±0.01	
	µg/mL MS	ND	0.72±0.06	41.33±1.52	10.00±1.00	52.05
Población 3	TR (min)	ND	6.28±0.01	7.15±0.01	8.91±0.00	
	µg/mL MS	ND	0.34±0.02	25.67±.70	8.40±0.69	34.41
Población 4	TR (min)	ND	6.28±0.02	7.15±0.01	8.91±0.01	
	µg/mL MS	ND	0.49±0.00	37.67±0.76	13.00±0.50	51.16
Población 5	TR (min)	ND	ND	7.15±0.00	8.90±0.00	
	µg/mL MS	ND	ND	16.53±1.00	15.00±0.60	31.53
Población 6	TR (min)	ND	ND	7.16±0.01	ND	
	µg/mL MS	ND	ND	0.73±0.05	ND	0.73
Población 7	TR (min)	ND	6.28±0.01	7.16±0.01	8.91±0.00	
	µg/mL MS	ND	1.58±0.04	76.67±3.51	15.67±1.53	93.92

Los valores expresados representan la media ± desviación estándar.
TR, tiempo de retención; MS, muestra seca; ND, no determinado.

3.5 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH

Los resultados obtenidos de la determinación de la actividad bloqueadora del radical libre DPPH indicaron que tres de los cuatro extractos evaluados de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria* presentaron una elevada actividad bloqueadora contra radicales libres (Figura 8 - 11, Tabla 4). Los valores obtenidos de porcentaje de inhibición e IC₅₀ se presentan a continuación por orden de evaluación.

3.5.1 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos etanólicos al 100% de hojas de *A. linaria*

Los extractos etanólicos al 100% de las siete poblaciones evaluadas no lograron generar relevante actividad bloqueadora ante el radical libre DPPH, debido a que ninguno de los extractos de las siete poblaciones logró alcanzar el 50% de inhibición del radical en el intervalo de concentraciones aplicadas, lo cual no permitió determinar el valor de la concentración inhibitoria 50 ó IC₅₀, por lo que los resultados obtenidos para estos extractos se expresaron como porcentaje máximo de inhibición. Los porcentajes de inhibición máximos alcanzados por los extractos etanólicos variaron desde 33.52±0.86 hasta 48.60±0.62%, correspondiendo el porcentaje más bajo al extracto P1E100 y el más elevado al extracto P7E100, respectivamente (Figura 8, Tabla 4). Los resultados y comportamientos obtenidos concuerdan con las determinaciones del contenido fenólico total (CFT, CFLT, CTC) debido a que los extractos etanólicos al 100%, en general, tuvieron bajas concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides, esto siendo comparados con las concentraciones obtenidas para los otros 3 tipos de extractos (etanol al 50%, metanol al 100%, y metanol al 50%) (Tabla 4). Debido a la baja concentración de compuestos fenólicos se pudo deducir que los extractos tendrían de baja a nula actividad bloqueadora de radicales, tal como se observó en este caso, específicamente con el radical libre DPPH. De igual manera, cabe resaltar que los extractos etanólicos al 100% tuvieron la menor capacidad antioxidante total, como se puede confirmar en la Figura 16 y Tabla 4.

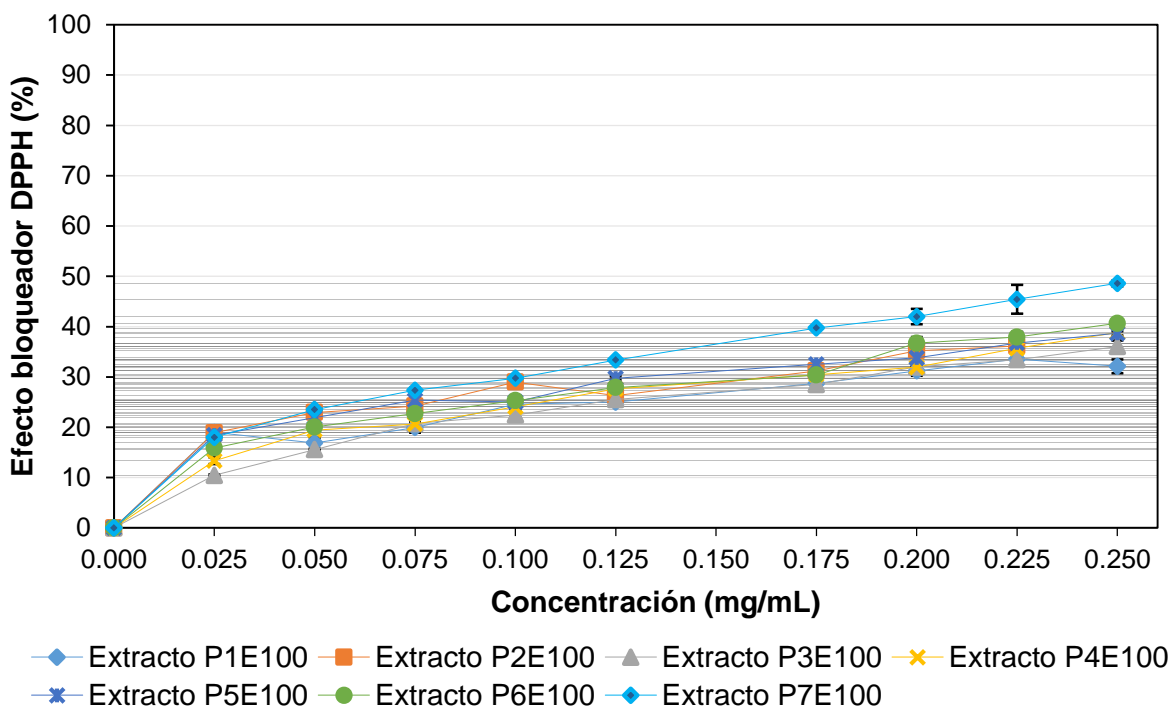


Figura 8. Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos etanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones.

3.5.2 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos etanólicos al 50% de hojas de *A. linaria*

Respecto a los resultados obtenidos con los extractos etanólicos al 50%, se apreció mayor actividad bloqueadora del radical libre DPPH logrando porcentajes de inhibición del radical DPPH superiores al 50%, permitiendo así obtener los valores de IC_{50} respectivamente para cada extracto. El intervalo de valores de IC_{50} obtenidos en los extractos fueron desde 0.149 ± 0.006 hasta 0.206 ± 0.001 mg/mL de extracto (equivalentes a 149 y 206 μ g/mL), valores que corresponden a los extractos P5E50 y P1E50, respectivamente (Figura 9, Tabla 4). Los extractos que mostraron tener los menores valores de IC_{50} y, por consecuencia, la mayor actividad bloqueadora de radicales fueron P2E50, P5E50 y P7E50 (0.154 ± 0.004 , 0.149 ± 0.006 y 0.151 ± 0.001 mg/mL, respectivamente), dichos extractos también mostraron altas concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides con elevada actividad antioxidante (Figura 5, 6, y 16, Tabla 4) lo cual indica que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de estas poblaciones podrían tener mayor habilidad de ceder los átomos de hidrógeno

(H⁺) de los grupos hidroxilo que constituyen los anillos aromáticos de la estructura de estos compuestos y , así, estabilizar con mayor agilidad el radical DPPH (Raja *et al.*, 2005; Mercado-Mercado *et al.*, 2013). Caso contrario sucedió con los extractos P1E50, P3E50, P4E50 y P6E50, los cuales a pesar de que alguno de ellos mostraba un considerable contenido de compuestos fenólicos, no lograron el mismo efecto que los anteriormente mencionados (Tabla 4), esto como se enfatizó anteriormente, puede deberse a que a pesar de tener altas concentraciones de compuestos polifenólicos, no poseen la misma estructura molecular, composición estructural, y capacidad donadora de átomos de H⁺.

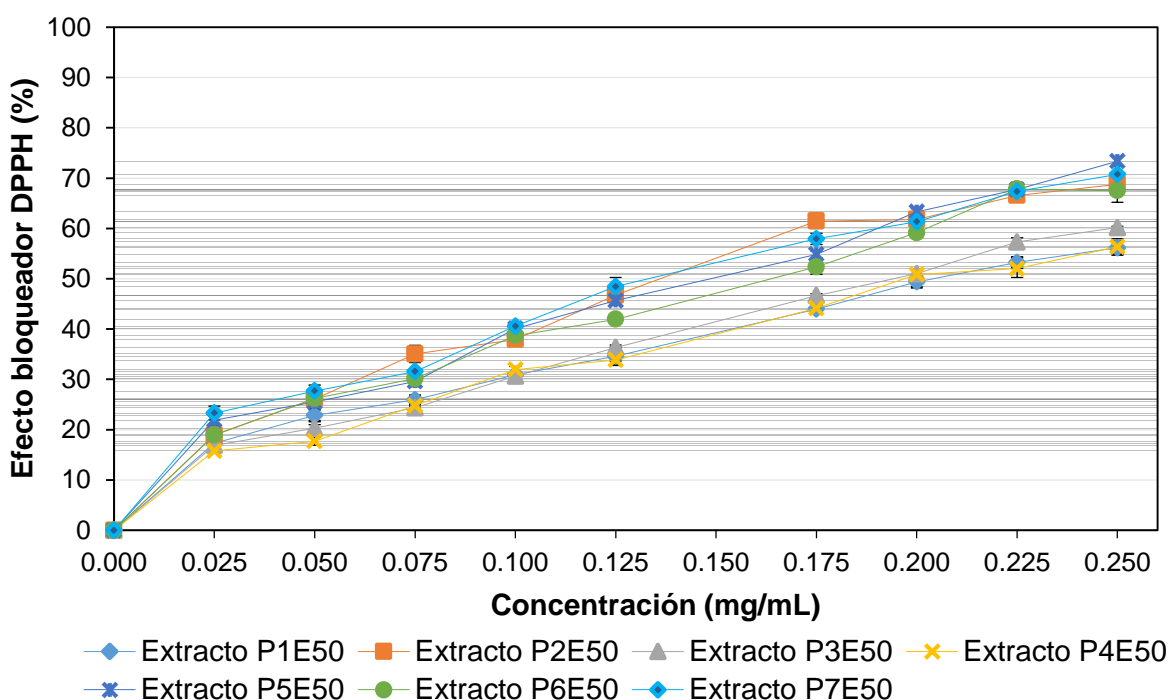


Figura 9. Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos etanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones.

3.5.3 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos metanólicos al 100% de hojas de *A. linaria*

Por otro lado, los extractos metanólicos al 100% indicaron tener mayor actividad bloqueadora del radical DPPH que los extractos etanólicos al 100% y 50% previamente evaluados, ya que los valores de IC₅₀ obtenidos fueron, en su mayoría, menores que

los obtenidos para los extractos etanólicos al 50%, y los porcentajes de inhibición superiores a los obtenidos por los extractos etanólicos al 100% (Figura 10 y Tabla 4). El intervalo de valores obtenidos para los extractos metanólicos al 100% varió de 0.147 ± 0.000 hasta 0.191 ± 0.001 mg/mL de extracto (equivalentes a 147 y 191 $\mu\text{g/mL}$). Los extractos que mostraron los menores valores de IC_{50} fueron P5M100 y P7M100, ambos extractos mostraron tener un importante contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos condensados, siendo el extracto P5M100 el cual mostró concentraciones superiores a las de P7M100 y, de igual manera, ambos tuvieron valores elevados de capacidad antioxidante total, como se muestra en la Tabla 4. Adicionalmente, ambos extractos presentaron compuestos de tipo flavonoide con relevantes antecedentes antioxidantes, esto basado en los resultados de los perfiles fenólicos obtenidos mediante ultra cromatografía líquida acoplada a masas o UPLC-MS (Tablas 2 y 3).

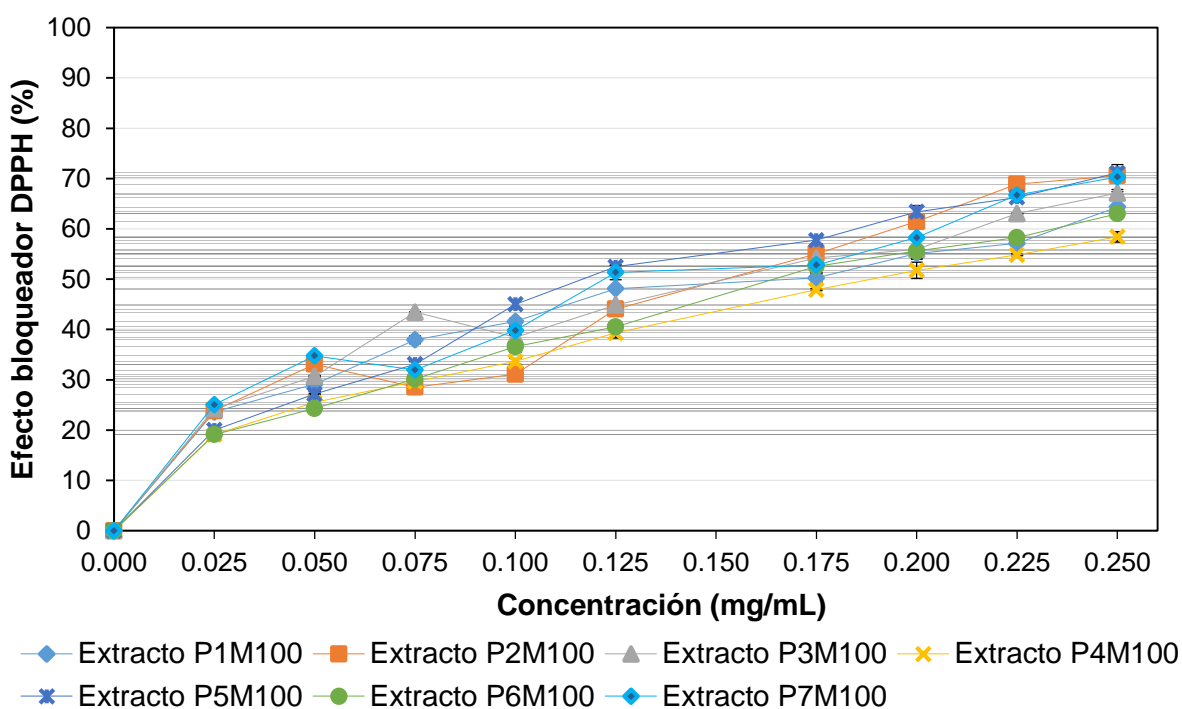


Figura 10. Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos metanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones.

3.5.4 Actividad bloqueadora del radical libre DPPH de extractos metanólicos al 50% de hojas de *A. linaria*

Por último, con relación a los resultados obtenidos por los extractos metanólicos al 50%, se observó un comportamiento similar a los extractos metanólicos al 100%, ya que mostraron valores de IC₅₀ similares, sin embargo, estos extractos mostraron generar porcentajes de inhibición mayores que todos los anteriores evaluados (Figura 11 y Tabla 4). El intervalo de valores de IC₅₀ de los extractos metanólicos al 50% fue desde 0.122±0.001 hasta 0.177±0.002 mg/mL (equivalentes a 122 y 177 µg/mL). El extracto que obtuvo el menor valor IC₅₀ corresponde a P1M50 el cual obtuvo un elevado contenido fenólico pero una baja concentración de flavonoides y taninos condensados, asimismo mostró el menor valor de capacidad antioxidante total de todos los extractos evaluados (Tabla 4). Este comportamiento puede deberse a que a pesar de no tener un elevado contenido de compuestos fenólicos sus compuestos fenólicos principales fueron los flavonoides quercetina y rutina, los cuales se sabe que poseen una elevada actividad contra radicales libres comportándose como los secuestradores más fuertes de radicales O₂, según diversas investigaciones (Zavaleta *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008) como se observa en la Tabla 2.

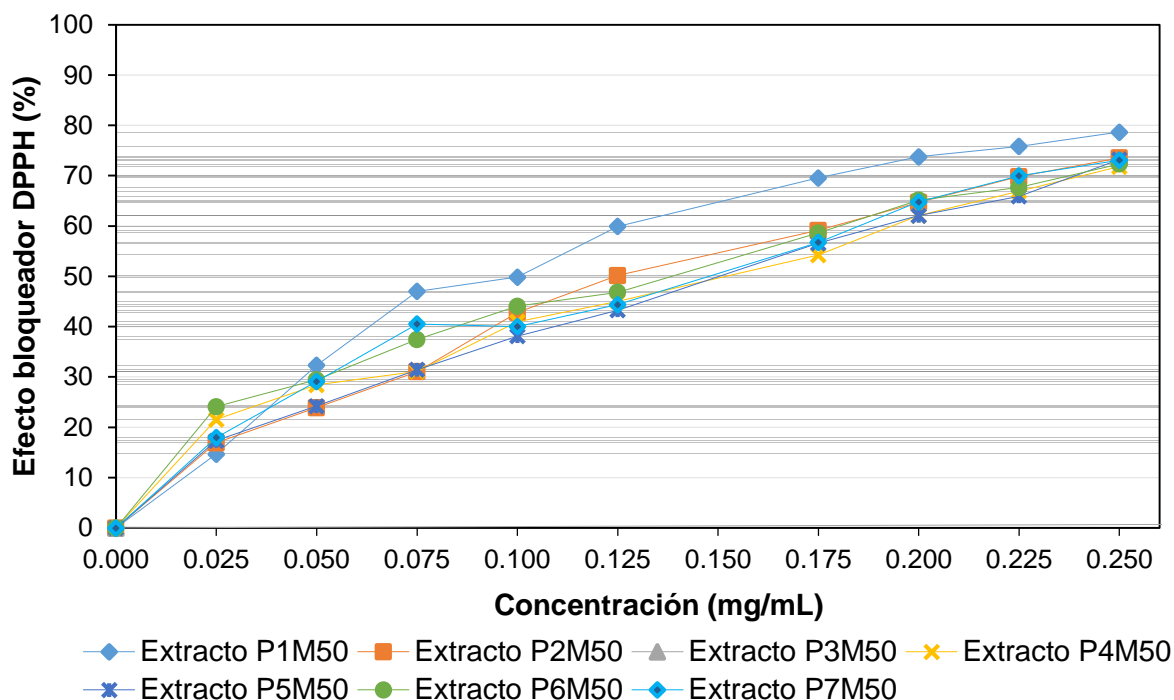


Figura 11. Efecto bloqueador de radical libre DPPH de extractos metanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones.

Dicho en forma breve, los extractos etanólicos al 50%, metanólicos al 100% y metanólicos al 50% mostraron decremento en la absorbancia del radical DPPH al incrementar la concentración de cada extracto. El intervalo de valores IC_{50} de los extractos de hojas de siete poblaciones de *A. linaria* fue desde 0.122 ± 0.001 hasta 0.206 ± 0.001 mg/mL (122 hasta 206 μ g/mL) con efectos de inhibición máximos en el intervalo de 33.52 ± 0.86 hasta 78.65 ± 1.38 . Otros autores reportan en extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de la planta completa de *A. curassavica* valores máximos de inhibición del radical libre DPPH de 52.5%, 93.8%, y 84.6%, respectivamente (Das *et al.*, 2015). De igual manera, Raja *et al.* (2005) reportan para extractos hidroalcohólicos (etanol: agua 70/30) de partes aéreas de la misma especie (*A. curassavica*) valores de IC_{50} de 8.7 μ g/mL de extracto, los cuales fueron 14 veces menores a los reportados para *A. linaria* en esta investigación. Por otra parte, en la investigación realizada por Ignat *et al.* (2013) evaluaron de la misma manera la actividad bloqueadora del radical DPPH de extractos acuosos y alcohólicos de partes aéreas de la especie *A. syriaca* y reportan valores de EC_{50} de 212.45 ± 4.31 y 303.1 ± 5.12 μ g/mL de extracto, dichos valores son aproximadamente dos veces superiores a los obtenidos por los extractos de *A. linaria*. La diferencia entre porcentajes máximos de inhibición y valores de IC_{50} puede estar relacionada directamente por la diferencia de especies, estructuras de las plantas utilizadas para la extracción de los compuestos, solvente de extracción, y tipo y concentración de compuestos de naturaleza fenólica determinados.

3.6 Actividad bloqueadora del radical ABTS

Con respecto a los resultados logrados en el análisis de la actividad bloqueadora del radical catiónico ABTS se observó un efecto dependiente de la concentración aplicada y que los cuatro extractos evaluados de hojas de *A. linaria* mostraron tener elevada actividad contra este radical, teniendo en general un comportamiento muy similar entre extractos (Figuras 11-14, Tabla 4). Los resultados obtenidos son los siguientes.

3.6.1 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos etanólicos al 100% de hojas de *A. linaria*

En relación a la actividad bloqueadora lograda por los extractos etanólicos al 100% se observó un elevado efecto contra el radical catiónico ABTS logrando en todos los casos más del 50% de inhibición, permitiendo calcular el valor de concentración inhibitoria media (IC_{50}) para cada extracto. El intervalo de valores de IC_{50} obtenido en este caso fue desde 0.512 ± 0.003 hasta 0.762 ± 0.008 mg/mL de extracto (512 a 762 μ g/mL) valores obtenidos en los extractos P4E100 y P3E100 respectivamente (Tabla 4). El extracto que mostró ser diferente estadísticamente a los demás extractos del mismo solvente fue P4E100 el cual logró mayor efecto bloqueador en el intervalo de concentraciones aplicadas, esto puede deberse a que este extracto presentó la concentración más elevada de taninos condensados en la técnica de CTC (Figura 7). Investigaciones como la de Gomes *et al.* (2010) hacen referencia a diversos estudios que enfatizan la gran actividad antioxidante que tienen los compuestos de tipo tanino y la importancia que han obtenido estos en la prevención de diversas enfermedades que involucran un desequilibrio interno en la concentraciones de radicales libres producidos por el metabolismo celular. De igual manera, Oszmianski *et al.* (2007) resalta que la actividad antioxidante de los compuestos de tipo tanino dependerá de los monómeros que constituyen la molécula de tanino, la estructura del mismo y su grado de polimerización.

Por otra parte, los extractos que mostraron tener los valores más elevados de IC_{50} y ser iguales estadísticamente corresponden a P1E100 y P3E100 (0.761 ± 0.002 y 0.762 ± 0.008 , respectivamente) en los cuales se observó concentraciones bajas de compuestos fenólicos totales, contenido de flavonoides y concentraciones medias de taninos condensados (Tabla 4). Esta disminución en la actividad bloqueadora de radical ABTS puede deberse a que, a pesar de tener presencia de compuestos fenólicos, la mayor parte taninos condensados, los compuestos no siempre poseen la capacidad de reducir de igual manera la actividad del radical catiónico ABTS debido a su naturaleza y capacidad donadora de átomos de H^+ o electrones, siendo estos

últimos el principal mecanismo por el cual se estabiliza el radical catiónico ABTS (Ivanova *et al.*, 2005).

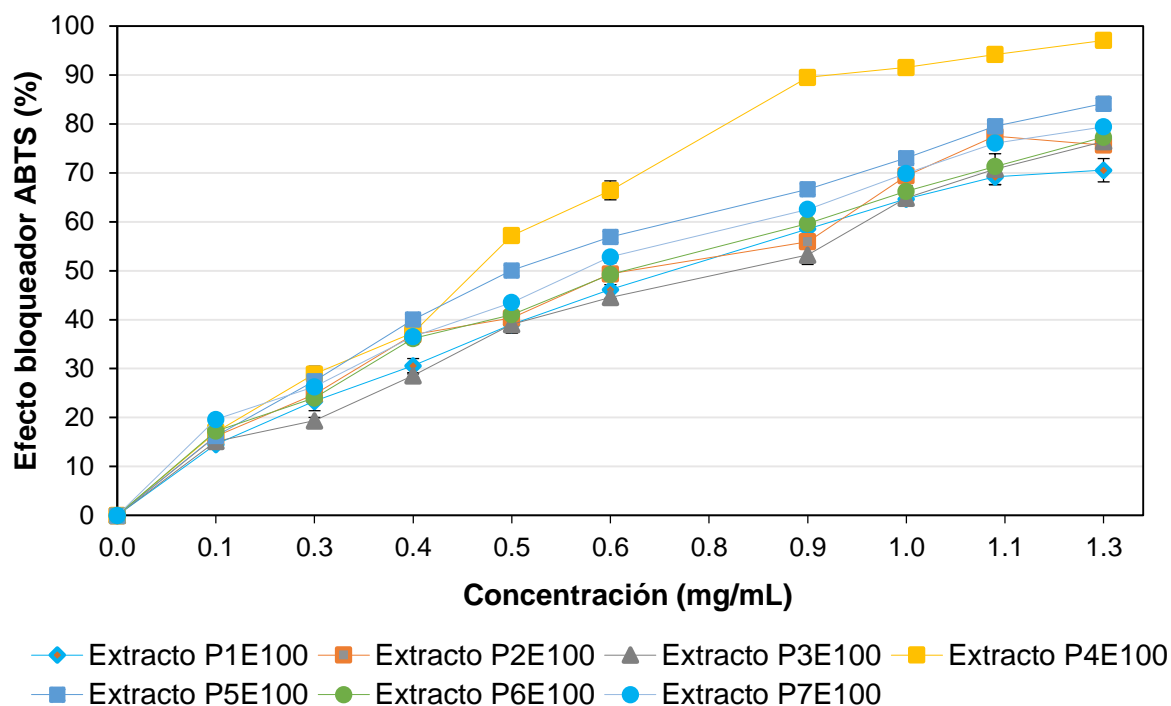


Figura 12. Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos etanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones.

3.6.2 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos etanólicos al 50% de hojas de *A. linaria*

Respecto a los resultados obtenidos con los extractos etanólicos al 50% se observó que estos lograron tener mayor actividad bloqueadora del radical catiónico ABTS y como consecuencia de dicha actividad valores menos de IC₅₀ en la mayoría de los casos (Figura 13, Tabla 4). El intervalo de valores obtenidos en estos extractos fue desde 0.533±0.003 hasta 0.608±0.006 mg/mL de extracto (533 hasta 608 µg/mL) siendo el menor valor el obtenido por el extracto P6E50 y el mayor para el extracto P2E50. Como ya se mencionó anteriormente, el extracto que logró la menor IC₅₀ fue P6E50 y se asume que este efecto bloqueador del radical ABTS puede deberse a que este extracto presentó considerables concentraciones de compuestos fenólicos en general (compuestos fenólicos, flavonoides y taninos condensados), una elevada

capacidad antioxidante total, y un notable efecto donador de iones hidronio (H^+) bloqueadores del radical DPPH (Tabla 4). Cabe resaltar que debido a las concentraciones de compuestos fenólicos, en mayor cantidad flavonoides y taninos, puede verse beneficiado el efecto de la actividad bloqueadora del radical ABTS. Autores como Mercado-Mercado *et al.* (2013) mencionan que el principal mecanismo de neutralización del radical ABTS es por transferencia de electrones, sin embargo, otros como Aseervatham *et al.* (2012) mencionan que el radical ABTS puede ser neutralizado también por la captación de iones hidronio (H^+) de los compuestos polifenólicos, como se asume sucedió en este caso.

Por otro lado, el extracto que mostró el mayor valor de IC_{50} corresponde a P2E50. La disminución en el efecto neutralizador del radical ABTS obtenido por este extracto puede deberse que a pesar de que el extracto mostró concentraciones considerables de fenoles y flavonoides, y elevada capacidad antioxidante total, y actividad bloqueadora de radical libre DPPH, no logró tener el mismo efecto contra el radical ABTS, comportamiento que pudo ocurrir porque los compuestos polifenólicos presentes en los extractos no tienen la capacidad de neutralizar con la misma facilidad el radical ABTS que el radical DPPH, esto por la naturaleza del compuesto extraído con el solvente utilizado y la capacidad de los mismos para ceder e^- o iones hidronio (H^+) (Ivanova *et al.*, 2005).

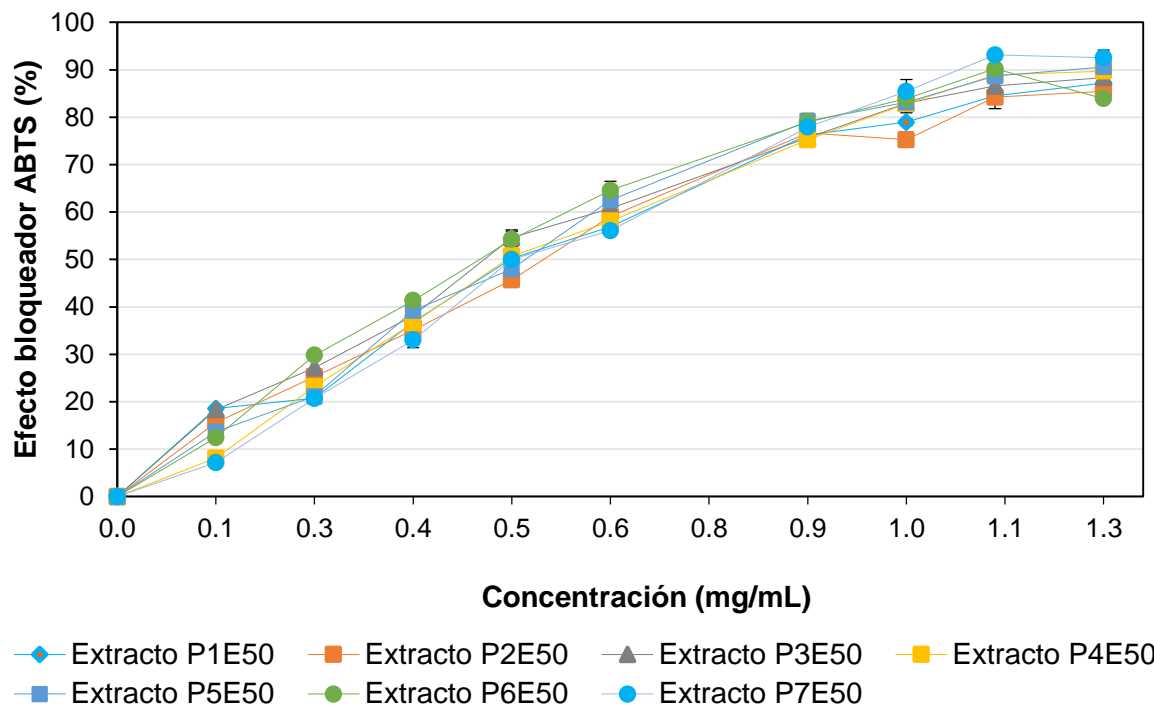


Figura 13. Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos etanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones.

3.6.3 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos metanólicos al 100% de hojas de *A. linaria*

Por otro lado, en la evaluación de los extractos metanólicos al 100% se obtuvo como resultados que los extractos mostraron ser, en la mayoría de los casos, los de menor efecto inhibitor del radical ABTS esto comparando los valores de IC_{50} obtenidos con los demás extractos. Sin embargo, todos los extractos lograron alcanzar porcentajes de inhibición del radical superiores al 50% (Figura 15). El intervalo de valores de IC_{50} obtenido fue desde 0.600 ± 0.006 hasta 0.867 ± 0.015 mg/mL de extracto (600 a 867 μ g/mL). El extracto que logró el menor valor IC_{50} corresponde a P5M100 el cual basado en las técnicas anteriormente implementadas mostró tener una elevada concentración de compuestos fenólicos, la mayor concentración de flavonoides de todos, elevada concentración de taninos condensados, considerable capacidad antioxidante total y valores de IC_{50} con el radical DPPH bajos. Además, cabe resaltar que en el perfil fenólico de este extracto se logró determinar la presencia de los compuestos ác. *p*-cumárico, ác. ferúlico, flavonoide rutina y quercetina (Tabla 2), compuestos que han

sido reportados como potentes compuestos antioxidantes (Vidal *et al.*, 2001; Zavaleta *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Zapata *et al.*, 2013). La concentración de los compuestos fenólicos y la capacidad de donar electrones iones hidronio (H^+) de estos permitió el efecto neutralizador del radical ABTS. Caso contrario, el extracto con menor actividad y valor de IC_{50} más alto fue P3M100, en el cual, a pesar de tener concentraciones considerables de fenoles, flavonoides, taninos condensados, buena actividad antioxidante total, y valores de IC_{50} bajos con el radical DPPH (Tabla 4), la concentración de los compuestos presentes en este extracto, las cuales fueron las más bajas, no demostraron tener la capacidad para neutralizar el radical ABTS (Tabla 2).

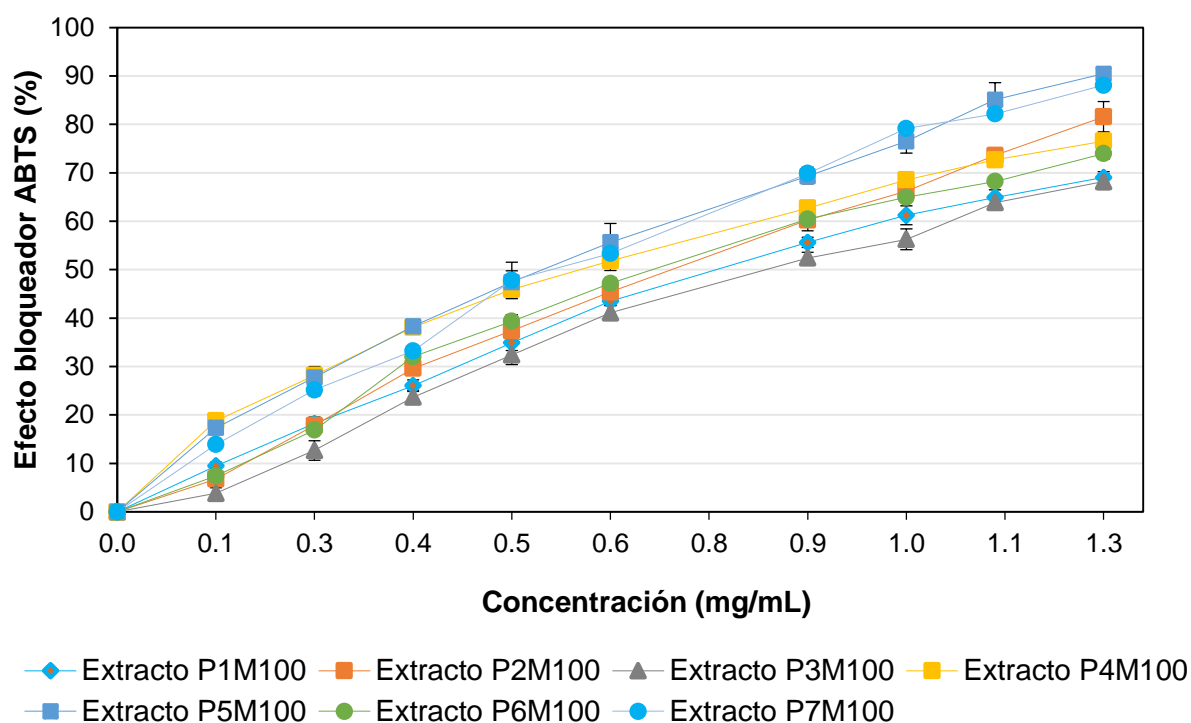


Figura 14. Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos metanólicos al 100% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones.

3.6.4 Actividad bloqueadora del radical libre ABTS de extractos metanólicos al 50% de hojas de *A. linaria*

Por último, los extractos metanólicos al 50%, al igual que los extractos anteriormente evaluados, lograron porcentajes de inhibición del radical catiónico ABTS superiores al 50% en el intervalo de concentraciones aplicadas (Figura 15), demostrando que el

efecto bloqueador era dependiente de la concentración de extracto aplicada. Para este caso, el intervalo de valores obtenidos de IC_{50} fue desde 0.513 ± 0.002 hasta 0.669 ± 0.005 mg/mL de extracto (513 hasta 669 μ g/mL). El valor de IC_{50} más bajo fue obtenido por el extracto P3M50, y este efecto puede deberse que a pesar que el extracto no mostró tener elevadas concentraciones de flavonoides, taninos condensados y elevada capacidad antioxidante comparada con los demás extractos, los compuestos que más abundaron en este extracto fueron el flavonoide rutina y quercetina (Tabla 3), compuestos a los que se les atribuyen elevada actividad antioxidante (Vidal *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2008). Pérez y Martínez (2001) indican que dicho efecto de la quercetina es debido a la presencia de dos potentes sustituyentes dihidroxílicos en las posiciones 3' y 4' en el anillo B y este efecto es aumentado por un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en el anillo C. En cambio, el extracto que obtuvo el valor de IC_{50} más elevado corresponde a P2M50, el cual a pesar de mostrar concentraciones de compuestos polifenólicos, no lograron inhibir con la misma capacidad el radical, esto puede deberse, como ya mencionó en casos similares anteriormente, a la capacidad de donar electrones o iones hidronio (H^+) de los compuestos antioxidantes que constituyen el extracto al radical ABTS.

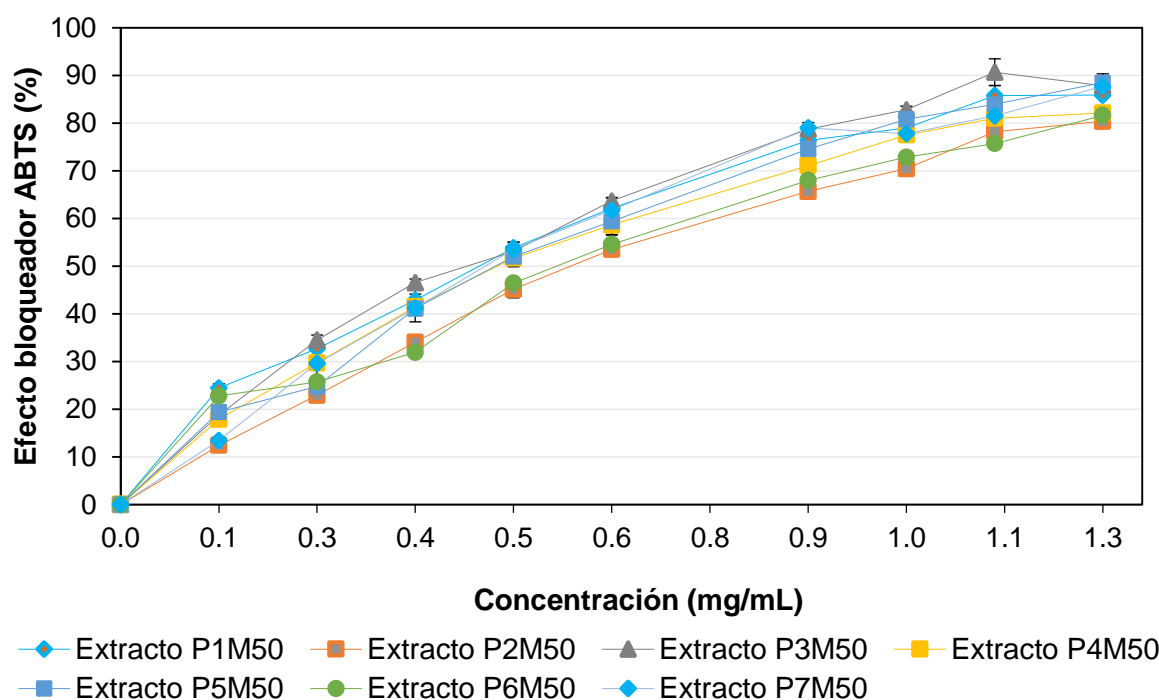


Figura 15. Efecto bloqueador de radical libre ABTS de extractos metanólicos al 50% de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media de tres repeticiones

En conjunto, los extractos que mostraron tener la mayor habilidad para neutralizar el radical catiónico ABTS, con los valores de IC₅₀ más bajos, y mostraron ser iguales, según al análisis estadístico realizado, fueron los extractos P3M50 y P4E100. Caso contrario para los extractos P1E00, P1M100, P3E100 y P6M100 quienes tuvieron los valores de IC₅₀ más altos. Cabe mencionar que se observó un mayor efecto bloqueador del radical con los extractos etanólicos al 50% y metanólicos al 50%, seguido de los etanólicos al 100%, y, por último, los metanólicos al 50%.

Fundamentado en la búsqueda en diversas fuentes de información y literatura se percibe la inexistencia de investigaciones (publicadas), que evalúen la actividad bloqueadora de extractos obtenidos de alguna especie perteneciente al género *Asclepias* contra el radical catiónico ABTS, sin embargo, investigaciones realizadas a otras especies pertenecientes a esta subfamilia se encuentra la de Wetwitayaklung *et al.* (2008), en la cual realizaron un estudio sobre la capacidad antioxidante que tienen diversos extractos metanólicos de flores comestibles, dentro de las cuales se encontraba la especie *Telosma minor*, la cual logró un valor de IC₅₀ de 747.64 µg de muestra, lo cuales fueron inferiores a los reportados para los extractos metanólicos de *A. linaria*. Por otro lado, Khasawneh *et al.* (2011) determinaron la capacidad antioxidante de extractos hidroalcohólicos y sus fracciones de partes aéreas de la especie *Calotropis procera*, y reportaron valores de IC₅₀ con el radical ABTS de 107.90±3.01, 61.36±0.43, 165.00±5.00 y 173.56±5.40 µg/mL en extracto etanólico, etil acetato, n-butanólicas y acuosas, respectivamente. Siendo todos los valores obtenidos inferiores a los reportados para *A. linaria*, lo cual puede deberse al tipo de moléculas extraídas con el solvente implementado y por la cantidad y tipo de materia vegetal utilizado en la extracción.

3.7 Capacidad antioxidante total (CAT)

El análisis de la capacidad antioxidante total de los extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de las siete poblaciones de *A. linaria* mostraron valores en un intervalo de 17.96±1.47 hasta 175.16±0.62 mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/g MS (Figura 16). Los extractos que mostraron tener la mayor capacidad

antioxidante fueron los etanólicos al 50%, seguidos de los metanólicos al 100%, los cuales fueron superiores a los metanólicos al 50% y, por último, los etanólicos al 100%, esto basado en los valores obtenidos para cada extracto. Basado en el análisis estadístico no se observó diferencia entre algunos de los extractos etanólicos al 100% y metanólicos al 50% con relación a su CAT. La tendencia observada en los extractos coincide con los resultados del contenido de CFT, CFLT y CTC, debido a que los extractos etanólicos al 50% mostraron tener la mayor concentración de fenoles totales, y para el caso de los extractos metanólicos al 50% mostraron tener la mayor concentración de flavonoides y taninos condensados. Por otra parte, los extractos etanólicos al 100%, los cuales mostraron la menor capacidad antioxidante, tuvieron la menor concentración tanto de fenoles totales y flavonoides totales, por lo cual, se puede sugerir que a mayor concentración de compuestos polifenólicos en los extractos etanólicos al 50% y metanólicos al 100%, mayor será la capacidad antioxidante, aunque según Zavaleta *et al.* (2005), la capacidad antioxidante no siempre dependerá de la concentración de compuestos fenólicos, sino más bien del tipo de compuesto antioxidante, la cantidad de grupos hidroxilo y la posición que estos tengan dentro de la molécula antioxidante que constituyen.

Los extractos metanólicos al 100% de la población 6 y 7 (P6M100 y P7M100) revelaron tener la mayor capacidad antioxidante de las siete poblaciones extractadas con este mismo solvente, esto puede deberse a que ambos extractos tuvieron elevadas concentraciones individuales de compuestos fenólicos (sino es que las más elevada), como: ácido ferúlico, rutina y quercetina, esto basado en los perfiles fenólicos obtenidos mediante UPLC-MS, los cuales se muestran en la Tabla 2. Por otra parte, los extractos metanólicos al 50% de las poblaciones 2, 4 y 7 (P2M50, P4M50 y P7M50), fueron los de mayor capacidad antioxidante, comparado contra los extractos del mismo solvente de las siete poblaciones, al igual que los extractos P6M100 y P7M100, extractados con metanol al 100%, los cuales presentaron la mayor concentración de ác. ferúlico, rutina, y quercetina (Tabla 2). Zavaleta *et al.* (2005) mencionan que la actividad de los compuestos dependerá de la combinación de dos propiedades: la capacidad de quelación de hierro y la capacidad de secuestrar radicales libres. En ese sentido, el flavonoide rutina (el cual es considerado un potente antioxidante) y el

flavonoide quercetina, son considerados como los secuestradores más fuertes de radical O_2^- (superóxido) y además, ambas moléculas están constituidas por una considerable cantidad de grupos hidroxilo (Yang *et al.*, 2008). Lo anterior puede ayudar a deducir la notable capacidad antioxidante que mostraron los extractos con mayor concentración de estos dos flavonoides. Por otra parte, Vidal *et al.* (2001), establecen que la capacidad antioxidante del ácido ferúlico puede llegar a ser similar a la del ácido ascórbico por lo que esto también pudo tener un efecto positivo al aumentar la capacidad antioxidante de los extractos de *A. linaria* de dichas poblaciones.

Debido a la ausencia de literatura que evidencie el potencial antioxidante de las especies más cercanas a *A. linaria* mediante la técnica capacidad antioxidante total usando el reactivo fosfomolibdato, se optó por hacer la comparación con parte de la literatura existente de la subfamilia *Asclepiadaceae*, a la cual pertenece la especie analizada en esta investigación. En el estudio realizado por Marwah *et al.* (2007) se analizó la capacidad antioxidante de fracciones etanólicas al 20% de extractos de las plantas de las especies *Caralluma flava* y *C. quadrangula*, reportando valores de 335 ± 0.5 y 899 ± 29.2 mg EAG/g de extracto etanólico, respectivamente, siendo estos superiores a los obtenidos por los extractos de *A. linaria*. La diferencia de concentraciones entre estas dos especies y *A. linaria* puede deberse principalmente a la diferencia de especies analizadas, a las estructuras utilizadas para la extracción y a la polaridad del solvente utilizado en la extracción. Por otro lado, Rachh *et al.* (2009) realizaron el mismo análisis de capacidad antioxidante a extractos metanólicos al 55% de hojas de la especie *Gymnema sylvestre*, y se reportan un valor de 17.54 mg EAA/g de muestra fresca (MF), siendo los valores reportados para extractos etanólicos al 100% y metanólicos al 50% de *A. linaria* similares al reportado por Rachh *et al.* (2009). Caso contrario, se observó comparando los valores obtenidos en los extractos etanólicos al 50% y metanólicos al 100% de *A. linaria* los cuales llegaron a ser 9 y 5 veces superiores, respectivamente, a los reportados para *G. sylvestre*.

En la Tabla 4 se muestran los resultados generales obtenidos del contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria*.

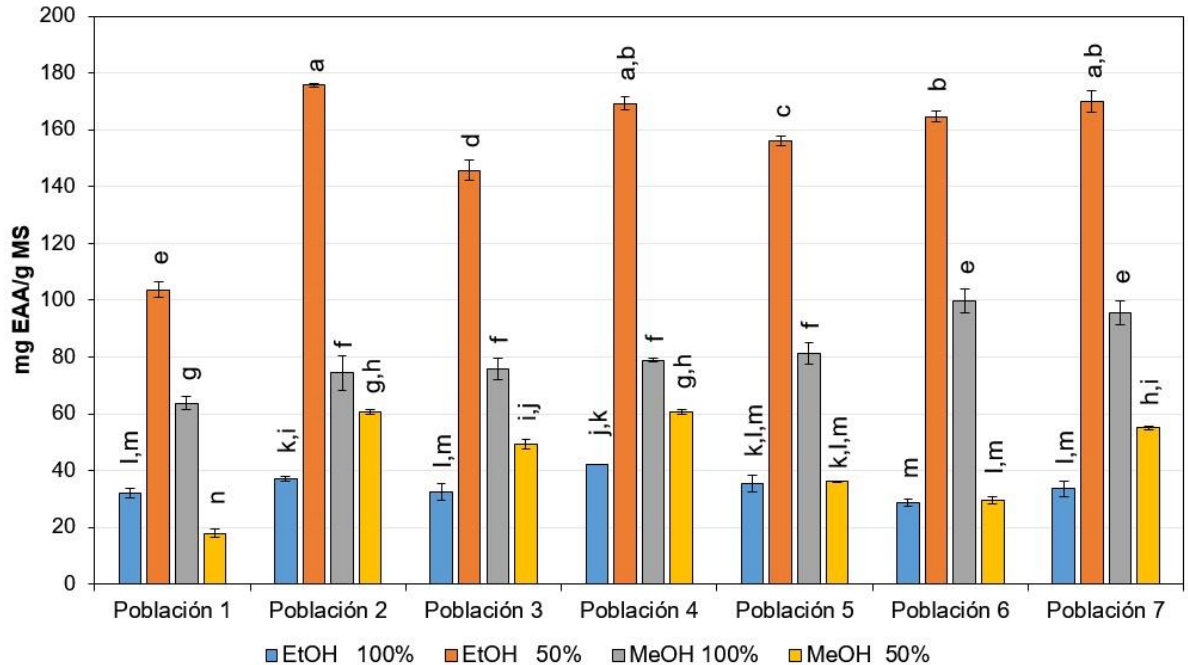


Figura 16. Capacidad antioxidante total de extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de *Asclepias linaria*. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.8 Efecto citotóxico sobre líneas celulares

Se determinó el efecto citotóxico de los extractos alcohólicos foliares de *A. linaria* contra tres líneas celulares, de las cuales, dos fueron líneas celulares cancerígenas (K562 y HL60) y, como no cancerígena, células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos (CMN). Los extractos de todas las poblaciones presentaron efecto citotóxico significativo, principalmente contra células cancerígenas, en la mayoría de los casos, desde la concentración más baja (25 $\mu\text{g/mL}$), a excepción de algunos otros casos que no mostraron este mismo efecto, como se aprecia en las figuras que se presentan enseguida. A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada línea celular, ordenados por tipo de solvente de extracción y orden de evaluación.

3.8.1 Efecto citotóxico de extractos alcohólicos de *A. linaria* sobre línea celular leucémica K562

En relación al efecto citotóxico obtenido por los extractos foliares etanólicos al 100% de las siete poblaciones de *A. linaria*, se observó que los extractos de las poblaciones 2, 5 y 7 (P2E100, P5E100 y P7E100) tuvieron un elevado efecto sobre la viabilidad de las células después de ser expuestas a la concentración de extracto mínima aplicada (25 $\mu\text{g/mL}$), obteniendo valores de 49.7%, 80.2% y 90.8% de células no viables, respectivamente, siendo el valor más alto el obtenido por el extracto P2E100. Caso contrario, se observó en los extractos de las poblaciones 3, 4 y 6 (P3E100, P4E100 y P6E100) los cuales generaron un porcentaje máximo de 34.5%, 15.2% y 16.9% de células no viables respectivamente, en el rango de concentraciones de extracto de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$. El mayor efecto alcanzado por estos últimos extractos se observó con la concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ de extracto, obtenido por el extracto P3E100, con un porcentaje de células no viables de 46.5%. Lo mencionado anteriormente se representa en la Figura 17 y Tabla 5.

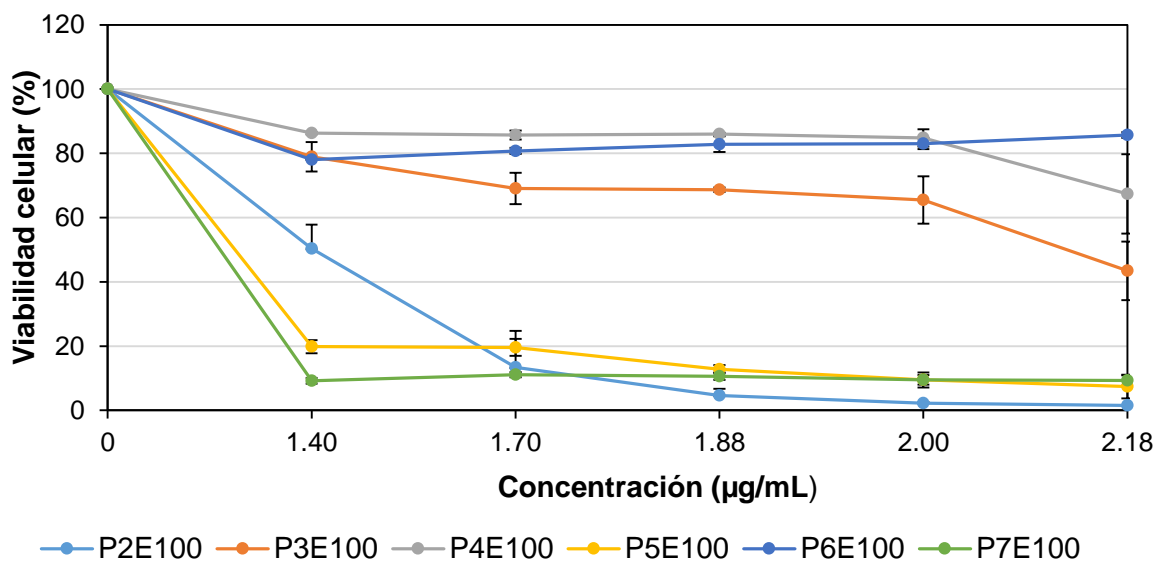


Figura 17. Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica K562. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$) evaluando el efecto por citometría de flujo y utilizando marcador fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol).

Por otra parte, el efecto citotóxico más alto obtenido por los extractos etanólicos al 50%, como se puede apreciar en la Figura 18, fue alcanzado por los extractos P1E50, P3E50 y P7E50, logrando porcentajes de células no viables de 61.5%, 54.5% y 89.5%, respectivamente, desde la menor concentración de extracto aplicada (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Asimismo, alcanzando porcentajes máximos de inhibición de 94%, 56.4% y 93.2% respectivamente, aplicando la concentración de extracto más elevada (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cabe mencionar que el extracto P3E50 al igual que los extractos P2E50, P4E50 y P5E50, no presentaron generar mayor efecto citotóxico al aumentar la concentración inicial de extracto, sino que, lo observado para estos extractos fue que al aplicar la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostraron su máximo efecto citotóxico (56.4%, 15.3%, 14.7% y 17.2%, respectivamente), para posteriormente presentar un efecto citostático, manteniendo estos porcentajes de inhibición hasta llegar a la concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto.

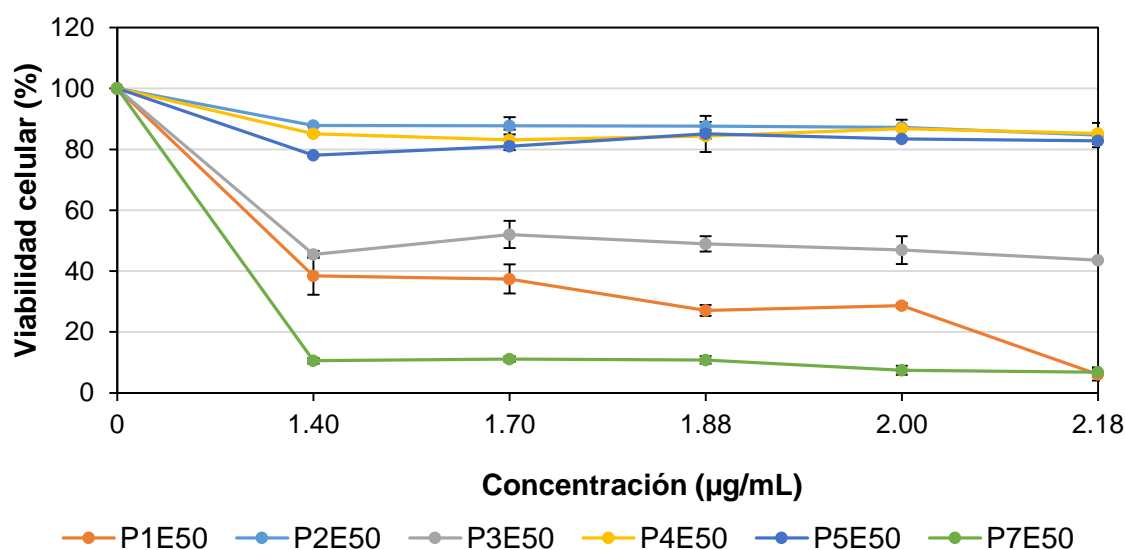


Figura 18. Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica K562. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

Para el caso de los extractos metanólicos al 100% se observó que los extractos P1M100, P2M100, P3M100, P4M100 y P5M100 mostraron tener un efecto citotóxico similar a la concentración de extracto más baja analizada, obteniendo porcentajes de

inhibición en un intervalo desde 37.1% hasta 55.4% de células no viables (Figura 19). Este mismo comportamiento inhibitorio se mantuvo en todo el rango de concentraciones utilizadas en los extractos P1M100, P2M100 y P5M100. Caso contrario se observó para el extracto P3M100 el cual logró un porcentaje de inhibición de 71.9%, al aplicarse la concentración máxima de extracto. De igual manera, el extracto P4M100 aumentó su efecto inhibitorio en gran cantidad al verse incrementada la concentración de 25 µg/mL, logrando alcanzar un porcentaje de 95.5% de células no viables al aplicar la mayor concentración de extracto (150 µg/mL), siendo este el extracto que mostró tener el mayor efecto de todos, al aplicarse dicha concentración. Los extractos P6M100 y P7M100 lograron generar mayor efecto inhibitorio desde la aplicación de la concentración de 25 µg/mL, obteniendo valores de células no viables de 87.3% y 86.7%, respectivamente. Estos últimos dos extractos mencionados no mostraron causar mayor efecto inhibitorio al aumentar la concentración de los extractos, por el contrario, al verse incrementada la concentración de extracto aplicada se aumentaba levemente el porcentaje de células viables.

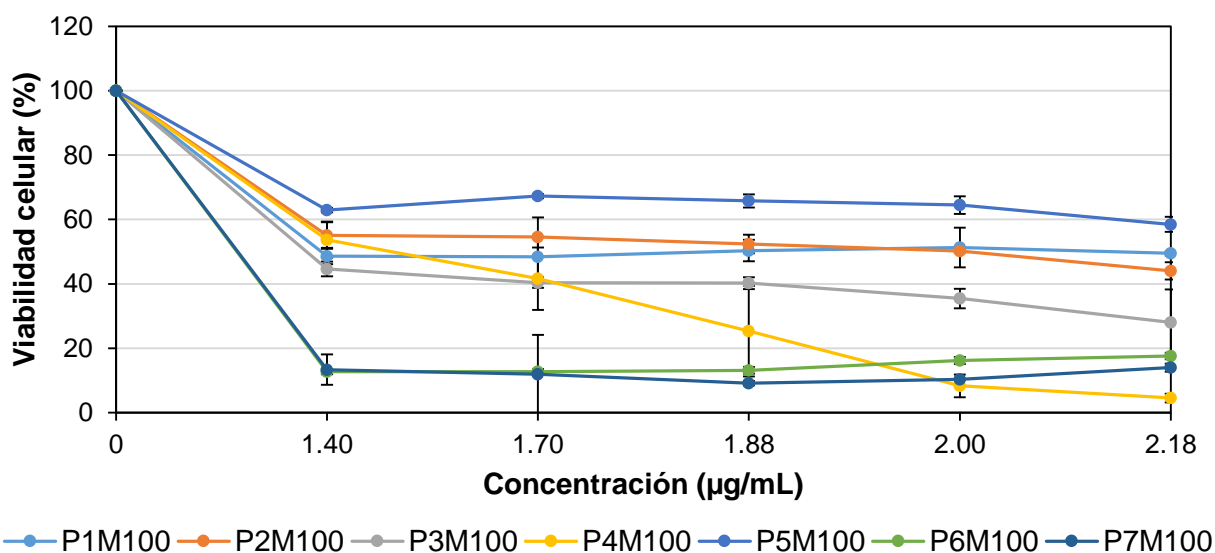


Figura 19. Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica K562. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

Con respecto al efecto citotóxico de los extractos metanólicos al 50%, se apreció que los extractos P3M50, P4M50 y P7M50 fueron los que tuvieron el menor efecto inhibitorio, ya que, desde la aplicación de la concentración mínima alcanzaron porcentajes inhibitorios similares (40.4%, 46.6% y 45.9%, respectivamente), manteniendo este comportamiento en todo el intervalo de concentraciones aplicadas. Al igual que algunos de los casos anteriormente mencionados, se observó un efecto citostático posterior al aumentar la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de extracto. Por otra parte, los extractos P1M50, P2M50, P5M50 y P6M50 fueron los que causaron un mayor efecto citotóxico desde la concentración mínima aplicada, obteniendo porcentajes de células no viables de 61.2%, 60.7%, 76.2% y 88.6%, respectivamente. El porcentaje de inhibición celular se vio aumentado, para el caso de los extractos P2M50 y P6M50, al incrementar las concentraciones de extracto, logrando porcentajes máximos de inhibición de 96.9% y 92.2%, respectivamente, al aplicar la concentración más alta de cada extracto. Caso contrario se observó en los extractos P1M50 y P5M50, los cuales no mostraron tener un mayor efecto inhibitorio al aplicarse concentraciones en un intervalo de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$, comportándose con un efecto citostático. En el caso del extracto P1M50 se observó un mayor efecto inhibitorio al aplicar la concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$, mostrando un porcentaje de 72.3% de células no viables (Figura 20).

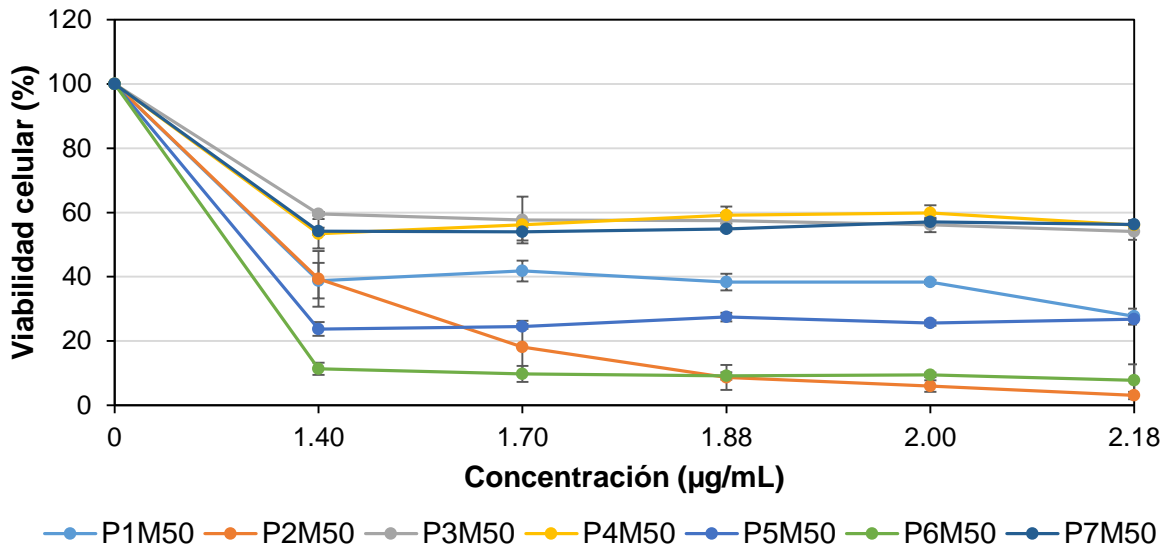


Figura 20. Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica K562. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

Englobando los resultados observados en la línea celular K562, se obtuvo que los extractos que tuvieron mayor efecto sobre la viabilidad de las células, basado en los valores de IC_{50} , corresponden a la población 7 extractada con etanol al 100% (P7E100), etanol al 50% (P7E50), y metanol al 100% (P7M100), con valores de IC_{50} de 9.44, 8.94 y 9.52 µg/mL de extracto, respectivamente, siendo la IC_{50} de menor valor la obtenida por el extracto P7E50, como se puede apreciar en la Figura 21 y Tabla 5. Por otra parte, el extracto que mostró tener el menor efecto citotóxico ante esta misma línea celular corresponde a la población 2, extractada con etanol al 50% (P2E50), con un valor de IC_{50} superior a 400 µg/mL, no graficado debido al elevado valor de la IC_{50} obtenido (Figura 21). Los extractos P7E50 Y P7M100 mostraron concentraciones elevadas de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados (Tabla 4) y, además, se logró determinar la presencia de compuestos como ácido ferúlico, flavonoide rutina y quercetina específicamente en esta población (Tabla 2). Dichos compuestos y algunos otros posibles presentes que no se lograron determinar, pueden tener una relación directa con el efecto antiproliferativo y citotóxico contra las células K562, por medio de diversos mecanismos, según se reporta en la literatura (Ren *et al.*, 2003; Jing-Pin *et al.*, 2010; Carochó y Ferreira, 2013) para compuestos fenólicos los cuales son:

inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa (encargada de reducir los desoxirribonucleótidos a ribonucleótidos); inhibición de la proteína tirosina cinasa BCR/ABL, NF-KB y COX-2; inducción de apoptosis celular por activación de caspasas 9 y 3; incremento de proteína Bax (proteína pro-apoptótica); arresto de crecimiento tumoral o incluso inducción de apoptosis por incremento intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS). Dichos efectos dependerán de la dosis y concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos.

Respecto al efecto de los flavonoides quercetina y rutina, Wei *et al.* (1994); Martínez *et al.* (2005) y Frauzino *et al.* (2013), indicaron que estos compuestos son considerados como uno de los más activos contra el cáncer, incluso, utilizando bajas concentraciones, y que los mecanismos característicos de estos compuestos son: condensación de la cromatina nuclear; fragmentación del material genético (DNA); arresto del ciclo celular; inhibición de enzima tirosina quinasa e inducción de apoptosis en células en fase G₁ y S del ciclo celular. Estos mecanismos han sido reportados en distintas líneas celulares entre ellas K562. De igual manera, Tomás-Barberán (2003), menciona que la combinación de dos o más de estos mecanismos pueden ser los responsables del carácter quimioterapéutico o preventivo de los compuestos polifenólicos.

Por otra parte, el extracto P7E100 no mostró concentraciones relevantes de fenoles totales y flavonoides, no obstante, mostró concentraciones moderadas de taninos condensados, compuestos que pudieron darle las propiedades antineoplásicas como reportan Ching-Chiung *et al.* (2000). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estén presentes en los extractos compuestos de distinta naturaleza, posibles glucósidos cardíacos o cardenólidos, que puedan tener efecto directo o indirecto sobre la citotoxicidad y efecto antiproliferativo (Plakke y Pfeiffer, 1964; Al-Snafi, 2015; Rascón *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2015).

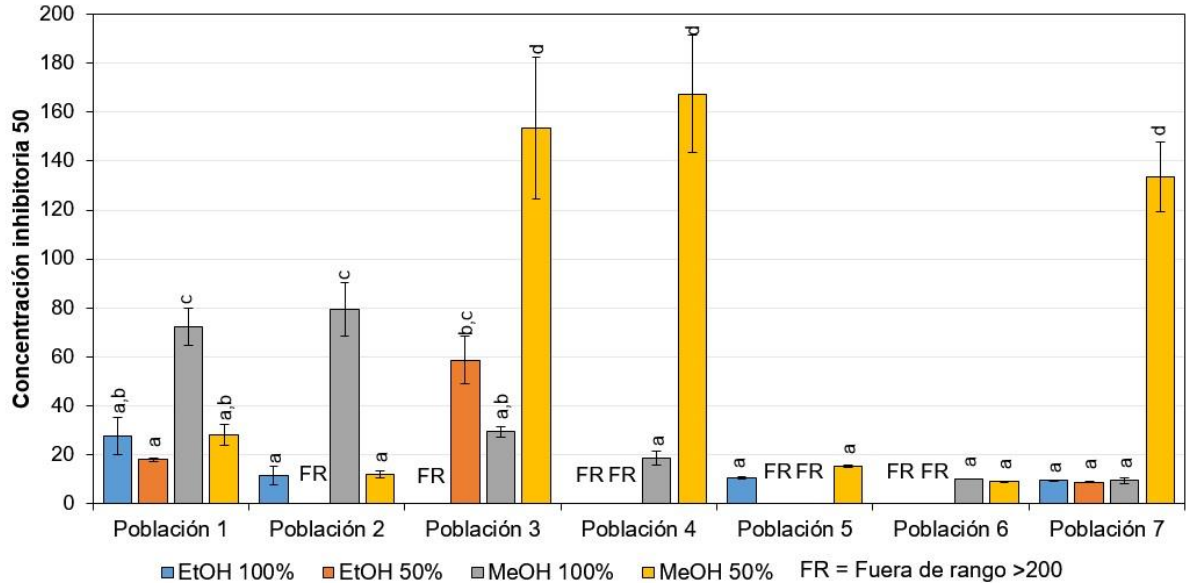


Figura 21. Valores de IC₅₀ de extractos alcohólicos de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica K562. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.8.2 Efecto citotóxico de extractos alcohólicos de *A. linaria* sobre línea celular leucémica HL60

Respecto al efecto citotóxico observado con los extractos etanólicos al 100%, en este caso, con la línea celular HL60, todos los extractos en general desde P1E100 hasta P7E100 mostraron tener gran efecto inhibitor desde la aplicación de la concentración mínima de extracto (25 µg/mL), obteniendo porcentajes de inhibición celular de 75.5%, 85%, 74%, 73.6%, 73.2%, 84.1% y 84.5%, respectivamente. De igual forma se notó, para el caso de los extractos P1E100, P2E100, P3E100, P4E100, P5E100 y P6E100, que al verse incrementada la concentración de extracto no se lograba un mayor efecto inhibitor, sino que, se mantuvieron porcentajes inhibitorios similares en todas las concentraciones mayores a 25 µg/mL, presentando un efecto citostático. Caso contrario se vio en el extracto P7E100, el cual mostró un decremento de 67.8% en el efecto inhibitorio al incrementar la concentración de extracto de 25 a 50 µg/mL generando únicamente 16.7% de células no viables con dicha concentración. Este mismo porcentaje de inhibición se observó en el intervalo de concentraciones 50-150

µg/mL, comportándose de igual manera que los extractos anteriormente mencionados como citostático (Figura 22).

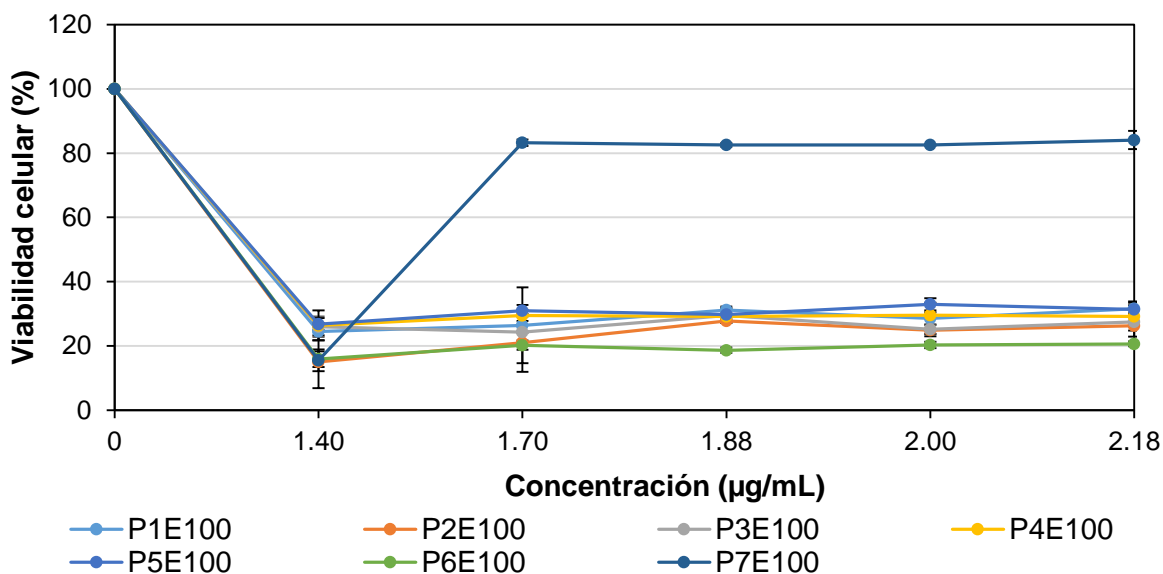


Figura 22. Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica HL60. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

Para el caso de los extractos etanólicos al 50%, los resultados obtenidos, como se muestra en la Figura 23, indicaron que los extractos P1E50, P2E50, P3E50, P4E50, P5E50 y P6E50 tuvieron un elevado efecto citotóxico desde la exposición de las células a la concentración mínima de extracto aplicada, logrando porcentajes de inhibición celular de 68.1%, 69.9%, 68.2%, 74%, 69.7% y 79.2%, respectivamente. Los extractos mencionados mantuvieron los mismos efectos y porcentajes de inhibición al incrementar las concentraciones de extracto hasta la máxima aplicada, concluyendo que el mayor potencial de inhibición fue alcanzado desde la concentración mínima de cada uno de los extractos (25 µg/mL) y mostrando un potencial citostático al verse incrementada dicha concentración. Caso contrario fue el comportamiento observado para el extracto P7E50 el cual mostró un efecto citotóxico bajo en el intervalo de concentraciones de 25 a 100 µg/mL, con porcentajes de inhibición cercanos a 15.7%, pero al aplicarse la concentración máxima de 150 µg/mL de este extracto mostró un

aumento de 63% con respecto a los valores anteriormente alcanzados, logrando así, un porcentaje total de inhibición de 78.7%.

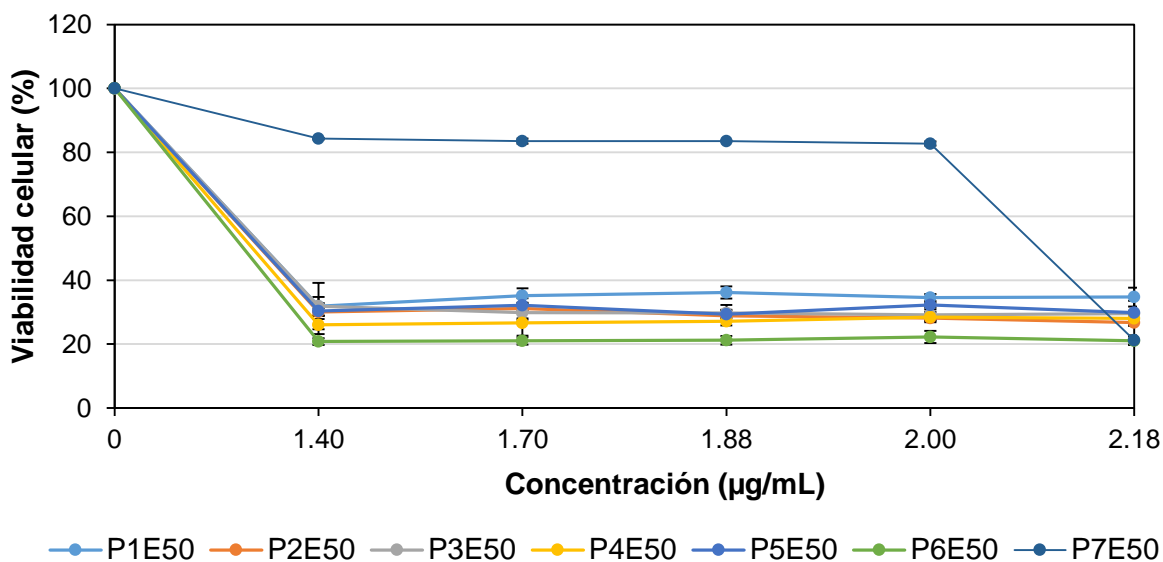


Figura 23. Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica HL60. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

En referencia a los resultados logrados por los extractos metanólicos al 100%, se apreció que todos los extractos, desde P1M100 hasta P7M100, mostraron tener un efecto significativo desde la aplicación más baja de extracto alcanzando porcentajes de inhibición celular de 77.5%, 79.4%, 76.3%, 73.3%, 75.8%, 72.7% y 86.9%, respectivamente. Los extractos, como en algunos de los casos anteriormente explicados, mostraron un comportamiento negativo sobre el efecto citotóxico al aumentar la concentración de extracto, tal fue el caso de los extractos P1M100, P2M100, P4M100, P5M100, P6M100 y P7M100, los cuales disminuyeron su efecto un 7%, 4%, 1%, 3.5%, 6.4% y 10%, respectivamente, en el rango de concentraciones de 50 a 150 µg/mL. Dicho comportamiento fue observado para el extracto P3M100, el cual adquirió un reducido aumento de 4.1% al incrementar la concentración de extracto, logrando así, un porcentaje de 80.4% de células no viables al aplicar la mayor concentración de extracto, como se muestra en la Figura 24.

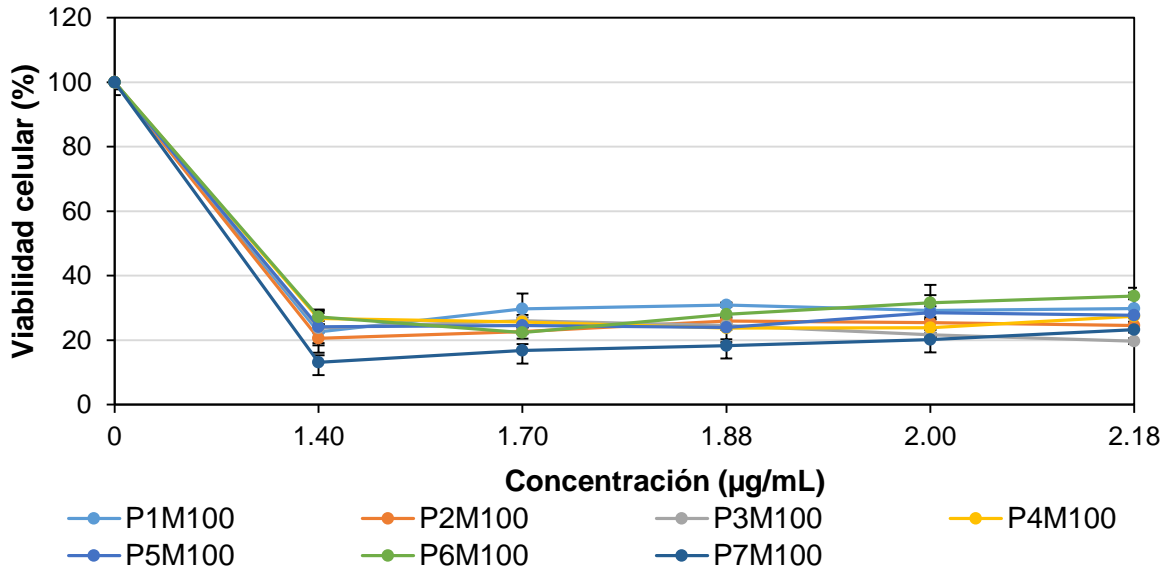


Figura 24. Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica HL60. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

Por último, respecto a los extractos metanólicos al 50%, los valores obtenidos indicaron que las células fueron altamente vulnerables a la primera concentración de extracto aplicada, donde todos los extractos desde P1M50 hasta P7M50 mostraron los siguientes porcentajes de inhibición: 71.5%, 82.3%, 72.3%, 70.4%, 65.6%, 75.9% y 87.6% respectivamente. De igual manera se observó en los extractos P1M50, P2M50, P3M50, P4M50, P5M50 y P6M50, que al incrementar la concentración aplicada de cada extracto en el intervalo 50 a 150 µg/mL, no se obtuvo un aumento significativo en los porcentajes de inhibición, con un comportamiento citostático a concentraciones superiores a 25 µg/mL. Por el contrario, para el caso del extracto P7M50, mostró un efecto negativo al incrementar la concentración a 150 µg/mL, disminuyendo su efecto un 7.3%, obteniendo un porcentaje final de 80.3%. Lo anterior mencionado se puede apreciar en la Figura 25.

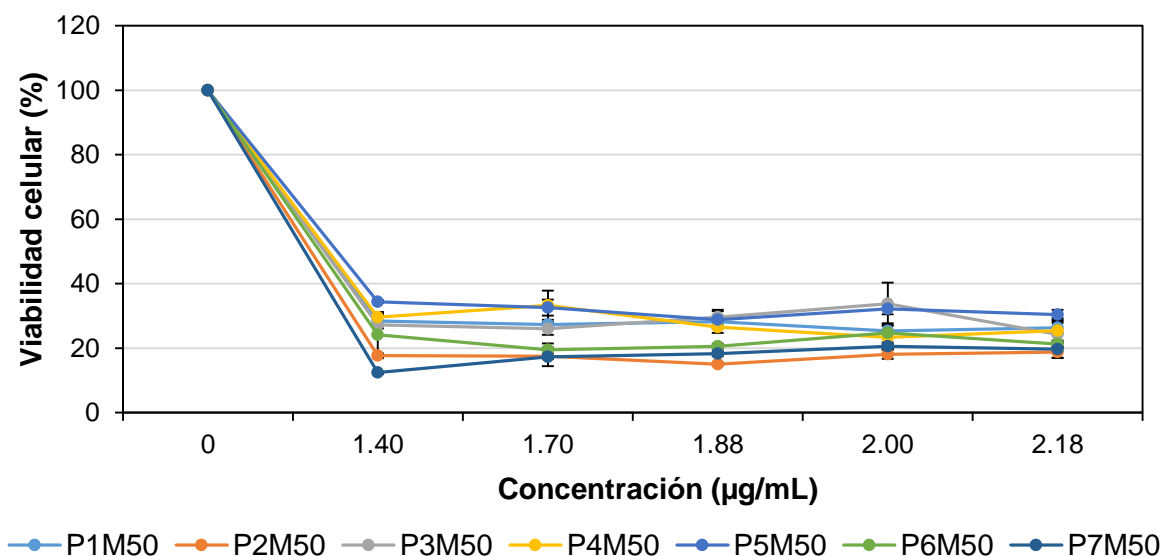


Figura 25. Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica HL60. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

En general, los cuatro extractos de la población 6 (P6E100, P6E50, P6M100 y P6M50) mostraron ser de los extractos con mayor efecto inhibitor obteniendo valores de IC_{50} de 11.86, 13.02, 17.45 y 13.52 µg/mL de extracto, respectivamente, sin embargo, los extractos P7M100, P7M50 y P2M50 obtuvieron valores de IC_{50} inferiores a los obtenidos por los extractos de la población 6, siendo estos de 11.27, 11.10, 11.31 µg/mL de extracto, respectivamente. Por lo contrario, el extracto que mostró el menor efecto inhibitor de las células HL60 fue el extracto etanólico 100% de la población 7 (P7E100), con un valor de IC_{50} superior a los 200 µg/mL de extracto (Figura 26, Tabla 5). Los extractos que lograron tener el mayor efecto inhibitor de las células HL60 anteriormente mencionados (P7M100, P7M50 y P2M50) mostraron tener concentraciones considerables de compuestos fenólicos, flavonoides, y moderadas de taninos condensados, dichas concentraciones son a las que se le atribuye el efecto citotóxico y antiproliferativo observado ante esta línea celular (Tabla 4). De igual importancia, cabe resaltar que estos extractos mostraron concentraciones notables de compuestos fenólicos como: ác. ferúlico, rutina y quercetina, compuestos ampliamente estudiados y probados para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Asimismo, se menciona que los compuestos

fenólicos son considerados potentes compuestos bioactivos que ejercen su función por medio de diversos mecanismos, como se mencionó anteriormente, los cuales son: inhibición de enzimas nucleares y enzimas cinasas; incremento de proteínas encargadas de inducir apoptosis (caspasas); arresto del crecimiento tumoral; lisis de material genético; arresto del ciclo celular e incremento de ROS (Wei *et al.*, 1994; Duthie *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2003; Tomás-Barberán, 2003; Carocho y Ferreira, 2013), siendo este último mecanismo el observado en esta investigación, exponiendo las células HL60 a los extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hoja de *A. linaria* por un tiempo de 1 h y 3 h (Figura 32 y 33). Se asume que el mecanismo más probable por el cual los extractos de *A. linaria* lograron la inhibición de las células cancerígenas fue por incremento de ROS, y como resultado de este incremento del daño o lisis del material genético, sin embargo, es pertinente analizar más a detalle el mecanismo.

En otro aspecto, Martínez *et al.* (2005) indica el potencial antiproliferativo que ha mostrado el tratamiento de diversos cánceres con el flavonoide rutina, el cual ha logrado inhibir la viabilidad celular de líneas neoplásicas celulares, entre ellas: melanoma corioideo ocular-1 (OCM-1), cáncer de colon (caco-2 y HT-29), carcinoma de células escamosas humanas (A431), y leucemia (HL60). De igual manera, Frauzino *et al.* (2013) resalta el considerable potencial que tiene este compuesto (rutina) y su parte aglicona (quercetina) a bajas concentraciones contra la línea de leucemia HL60, indicando ser estos altamente citotóxicos contra esta línea celular. Asimismo, Ren *et al.* (2003) mencionaron el efecto que han tenido diversos flavonoides (apinenina, quercetina, miricetina y chalconas) en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, y entre ellos resalta el efecto observado con el flavonoide quercetina, el cual presentó mostrar efecto antiproliferativo contra las células HL60, K562 y Juncat, esto por medio de la perturbación de células en el estado G1/S y G2/M del ciclo celular induciéndolas a apoptosis según lo reportan en dicha investigación. Por otra parte, Wei *et al.* (1994), indican que el flavonoide quercetina es considerado como uno de los más activos contra el cáncer, y gran parte del efecto que mostraron los extractos contra las células HL60 puede deberse a las concentraciones y combinación de distintos compuestos bioactivos que aumentan el efecto antiproliferativo. Adicionalmente, Duthie *et al.* (2000), revelan que bajas concentraciones del flavonoide quercetina tienen potencial

inhibidor de la síntesis de DNA y crecimiento en células HL60. Por último, Jing-Pin *et al.* (2010) evaluaron el efecto de diversas concentraciones de compuestos polifenólicos, entre ellos rutina, sobre tumores inducidos con células HL60 en ratones y logrando como resultado una reducción considerable en el peso y masa del tumor comparada con el control, indicando que los compuestos tienen la capacidad de arrestar el ciclo celular de dichas células, reducir la hiperplasia, e inducir apoptosis.

Caso contrario se logró apreciar en el extracto P7E100, el cual alcanzó el valor más alto de IC₅₀, mostrando concentraciones de fenoles, flavonoides muy bajas y medias de taninos condensados, los cuales pudieron dar el efecto inhibitor obtenido. De igual forma como en el caso anterior con las células K562, no se descarta la posibilidad que exista la presencia de otros compuestos reportados como citotóxicos (cardenólidos) en los extractos de *A. linaria* y especies pertenecientes al mismo género (Plakke y Pfeiffer, 1964; Al-Snafi, 2015; Rascón *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2015).

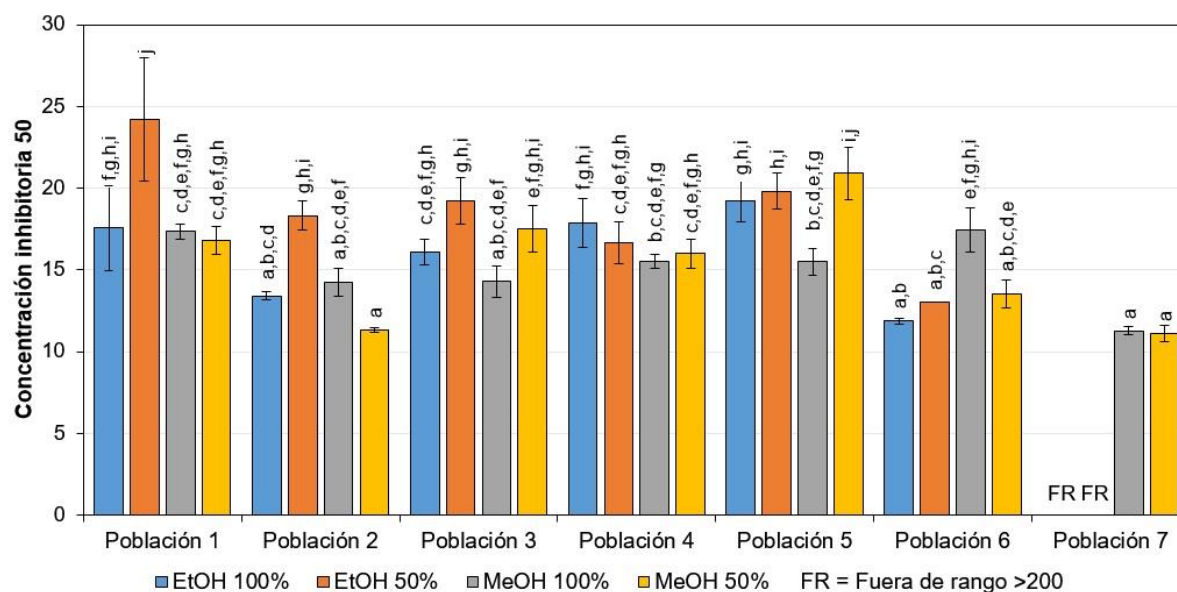


Figura 26. Valores de IC₅₀ de extractos alcohólicos de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre línea celular leucémica HL60. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.8.3 Efecto citotóxico de extractos alcohólicos de *A. linaria* sobre cultivos primarios de CMN de individuos sanos.

Para el análisis del efecto citotóxico en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos (CMN) se seleccionaron únicamente aquellos extractos que mostraron haber tenido un valor de $IC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ de extracto en ambas líneas celulares (K562 y HL60). Cabe mencionar, que el método de evaluación no se vio alterado, debido a que se mantuvieron las mismas condiciones y concentraciones que con las otras dos líneas celulares evaluadas.

Como primera evaluación, se utilizaron los extractos etanólicos al 100% de las poblaciones P1E100, P2E100 y P5E100, los cuales mostraron tener efecto inhibitor desde la mínima concentración de extracto aplicada ($25 \mu\text{g/mL}$), generando porcentajes de 62.7%, 51.3% y 49.5%, respectivamente. Asimismo, los extractos P1E100 y P2E100 mostraron un aumento en los porcentajes de inhibición celular al incrementar la concentración de extracto aplicada en el rango de 50 a $150 \mu\text{g/mL}$ logrando porcentajes máximos de 91.8% para el extracto P1E100 y 91.3% para P2E100. Caso contrario, el extracto P5E100 no mostró tener mayor efecto inhibitor al aumentar la concentración de extracto, por lo que alcanzó un porcentaje máximo de inhibición de 57.4%, con la concentración más alta aplicada, lo cual fue un ligero aumento en la inhibición del 7.9%, comparado con el efecto obtenido con la concentración mínima de este mismo extracto.

Basado en los resultados observados del extracto P5E100, representados en la Figura 27, se asume tuvo un efecto citostático debido a que no se apreció una disminución considerable en los porcentajes de viabilidad al incrementar la concentración de extracto aplicada, como se apreció en otros casos, sino por el contrario, se mantenían los porcentajes de células viables.

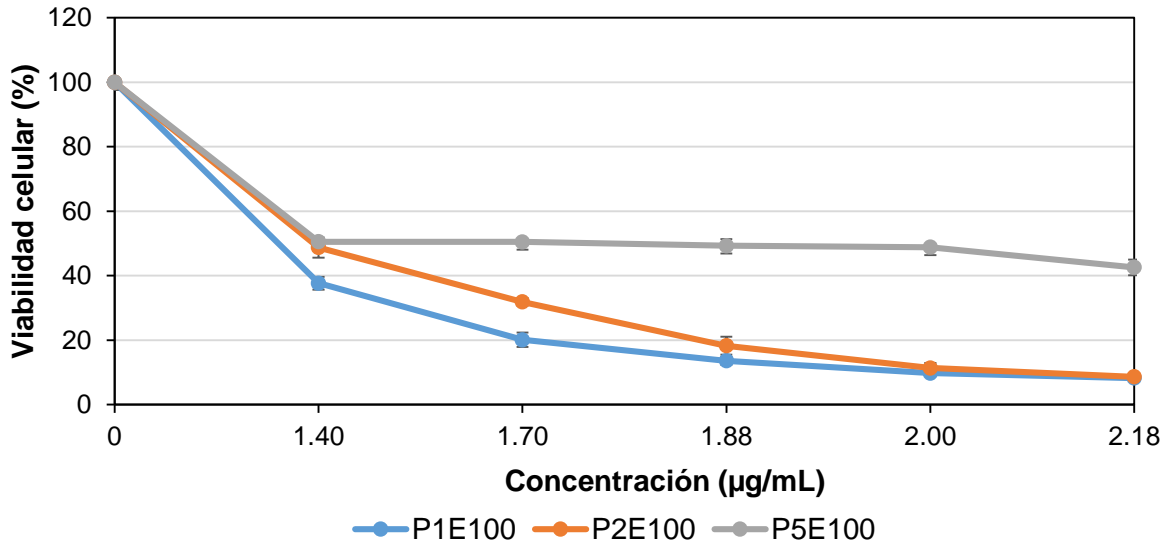


Figura 27. Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre células CMN. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

En relación a la actividad inhibidora de los extractos etanólicos al 50%, se observó que los tres extractos evaluados (P1E50, P3E50 y P6E50) mostraron una actividad inhibitoria semejante, ya que en los tres casos se obtuvieron porcentajes de 46.2%, 39.5% y 41.9%, respectivamente, desde la aplicación de la concentración mínima (25 µg/mL). El efecto obtenido con la aplicación de la mínima concentración del extracto aplicada se conservó a lo largo de todas las concentraciones de extracto evaluadas, alcanzando un porcentaje máximo de inhibición con la concentración de 150 µg/mL de 47.8%, 37.5% y 41.8%, respectivamente. Al igual que con algunos casos mencionados con anterioridad, se logró observar un comportamiento citostático, inhibiendo el crecimiento y desarrollo de las células (Figura 28).

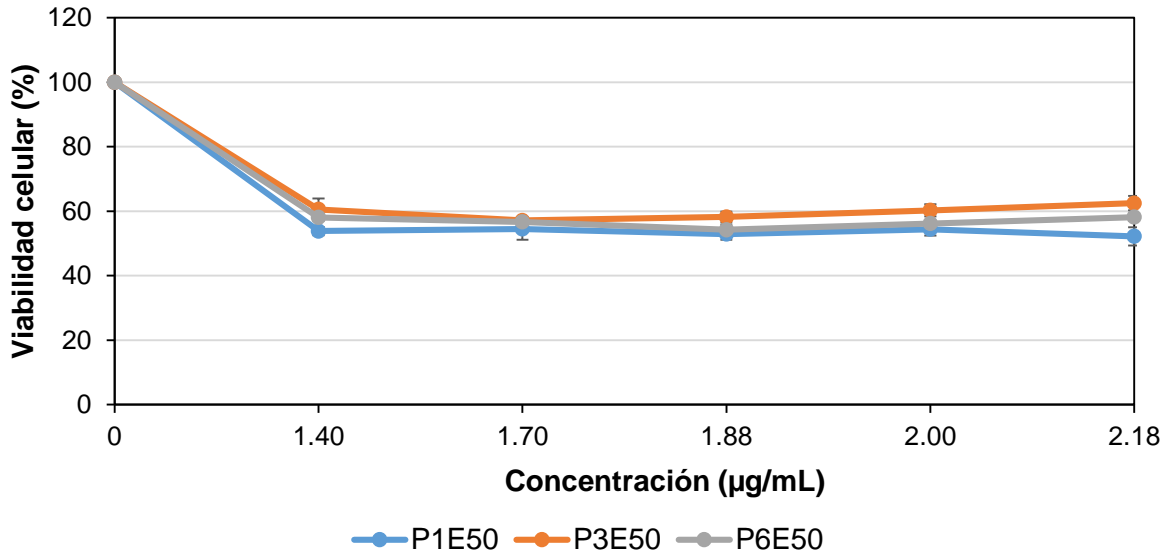


Figura 28. Efecto citotóxico de extractos etanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre células CMN. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

En lo que respecta a los resultados de los extractos metanólicos al 100% evaluados (P1M100, P2M100, P3M100, P4M100, P6M100 y P7M100), se observó que mostraban un efecto inhibitor similar en todo el rango de concentraciones de extracto aplicadas, alcanzando porcentajes desde 47.4%, 42.9%, 47.0%, 45.1%, 44.3%, y 40.0%, respectivamente, aplicando la concentración de 25 µg/mL de extracto y valores de 43.6%, 42.9%, 58.1%, 47.9%, 49.0%, y 43.8%, respectivamente, con la concentración de 150 µg/mL de extracto, respectivamente. Cabe resaltar que el único extracto que mostró un aumento considerable del 11% de inhibición celular, con la aplicación de la concentración de 150 µg/mL, fue el extracto P3M100, los demás extractos mantuvieron un efecto citostático similar a los extractos etanólicos al 100% y 50% previamente evaluados (Figura 29).

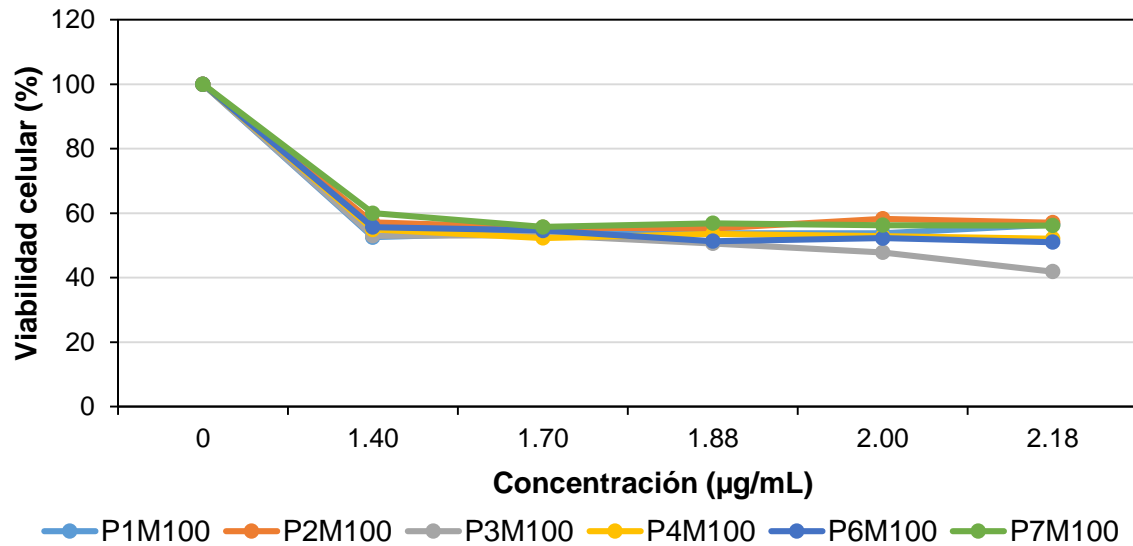


Figura 29. Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 100% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre células CMN. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

Por último, se evaluaron los extractos metanólicos al 50% de todas las poblaciones, como se muestra en la Figura 30, y se observó que la mayoría los extractos, a excepción de P6M50, mostraron tener un efecto significativo desde la aplicación de la concentración mínima (25 µg/mL) con porcentajes de inhibición de 49.3%, 53.3%, 39.3%, 44.4%, 48.2%, y 42.2%, respectivamente. El extracto P6M50 inhibió únicamente 10.4% con esta misma concentración. Al aumentar la concentración de extracto en el intervalo de 50 a 150 µg/mL, los extractos P3M50, P4M50, P5M50 y P7M50 no mostraron tener mayor daño celular, sino por el contrario, mantuvieron o disminuyeron levemente sus porcentajes de inhibición comportándose entonces como citostático. Por otra parte, el porcentaje de inhibición observado con el extracto P1M50 fue de 62.5%, 76.3%, 84.6%, y 90.1%, respectivamente, al incrementar la concentración de extracto (50 a 150 µg/mL). Asimismo, el extracto P2M50 logró porcentajes homogéneos de inhibición en el rango de 50 a 100 µg/mL (55.8%, 58.9% y 60.6%, respectivamente) y un valor de 72.1% de células no viables con la concentración más elevada (150 µg/mL). Por último, se observó que el extracto P6M50 al verse aumentada la concentración en el rango de 50 a 100 µg/mL generó

porcentajes similares (39.2%, 39.8%, y 41.2%, respectivamente) y un porcentaje de 59.6% de inhibición, aplicando la concentración de 150 µg/mL de extracto.

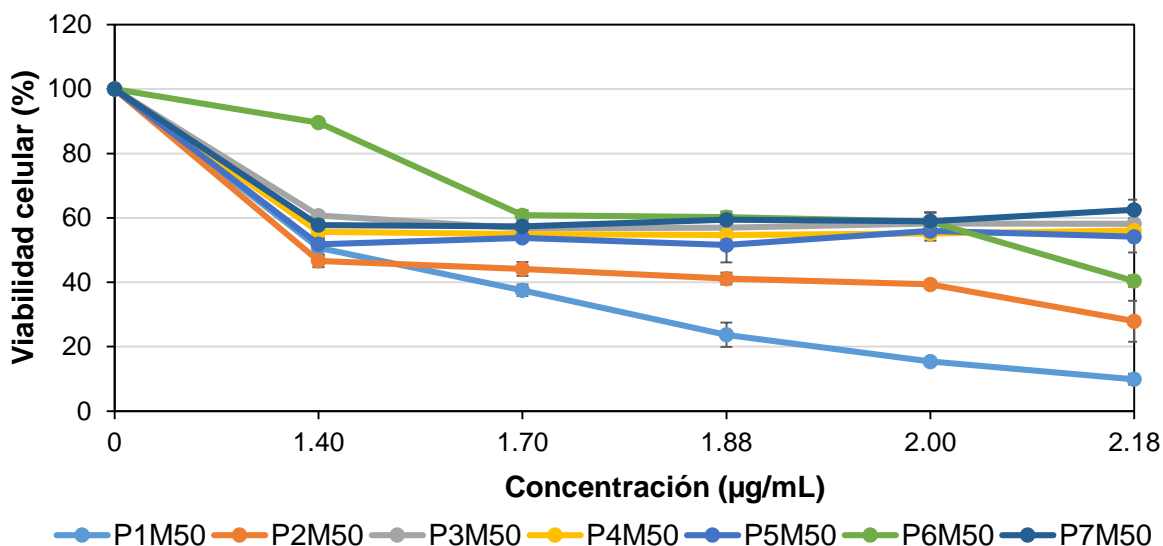


Figura 30. Efecto citotóxico de extractos metanólicos al 50% de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre células CMN. Los extractos se evaluaron a 5 concentraciones diferentes (25, 50, 75, 100 y 150 µg/mL) evaluando el efecto por citometría de flujo utilizando marcador fluorescente DAPI.

Integrando las cuatro figuras mencionadas previamente (Figuras 27, 28, 29, y 30), de los 19 extractos evaluados contra las CMN, los extractos que mostraron tener el mayor efecto sobre la viabilidad celular fueron los cuatro incluidos en la población 1 (P1E100, P1E50, P1M100 y P1M50), siendo el extracto P1E100 el de menor valor de IC_{50} (12.8 µg/mL) y estadísticamente distinto. De manera contraria, los extractos que mostraron el menor efecto (lo cual es lo que se desea en este caso) ante las células sanas o normales, fueron P3E50 y P7M50, con valores de IC_{50} de 241.4 y 244.9 µg/mL de extracto respectivamente (Figura 31, Tabla 5). Respecto a los resultados observados con el extracto P1E100, este mostró pertenecer al grupo de extractos que tenía las menores concentraciones de fenoles totales y flavonoides, sin embargo, también reportó concentraciones moderadas de taninos condensados (Tabla 4), compuestos que pudieron otorgarle dicho efecto citotóxico, debido a la concentraciones y tipo de tanino condensado, aunque existen autores que mencionan que ciertos tipos de taninos condensados tienen elevado efecto citotóxico contra células cancerígenas y menor o nulo efecto contra células sanas dependiendo la concentración aplicada de

estos (Carocho y Ferreira, 2013), pero para asegurar esto, es necesario determinar los tipos de taninos condensados que constituyen el extracto. No obstante, dicho efecto citotóxico en células sanas puede deberse a la presencia de compuestos de distinta naturaleza en los extractos, como cardenolidos o glucosidos cardiacos los cuales han sido reportados en el género *Asclepias* y han mostrado tener potencial citotóxico en células cancerígenas pero también a elevadas concentraciones en células normales o sanas (Plakke y Pfeiffer, 1964; Al-Snafi, 2015; Rascón *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2015)

Por otra parte, los extractos que obtuvieron los mayores valores de IC₅₀ evidenciaron tener elevadas concentraciones de fenoles totales y flavonoides totales, con buena capacidad antioxidante e inhibición de radicales libres DPPH y ABTS, sin embargo, el extracto P7M50 no mostró concentraciones importantes de taninos condensados (Tabla 4). Gibellini *et al.* (2013) y Frauzino *et al.* (2013), señalan que los compuestos fenólicos, en especial el flavonoide quercetina que se logró determinar en los extractos de *A. linaria*, tiene la capacidad de generar citotoxicidad en células sanas (linfocitos de sangre periférica) por el incremento de las especies reactivas de oxígeno intracelular que como consecuencia alteran el buen funcionamiento mitocondrial, la estabilidad del material genético y, como consecuencia, generar la activación de proteínas encargadas de llevar la célula a apoptosis, esto se ha observado cuando son aplicadas concentraciones superiores a 100 µM del compuesto. Sin embargo, Gibellini *et al.* (2013) señalan que, por lo general, las concentraciones necesarias para inducir citotoxicidad en células sanas son mucho mayores que las necesarias con células cancerígenas. Se hipotetiza que las concentraciones de los compuestos fenólicos que se lograron determinar en los extractos tuvieron un efecto directo en el efecto citotóxico generado en células normales, principalmente por los compuestos rutina y quercetina (Tabla 2 y 3). Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, no se descarta la posibilidad de la presencia de compuestos de distinta naturaleza que tengan relación con el efecto citotóxico directa o indirectamente.

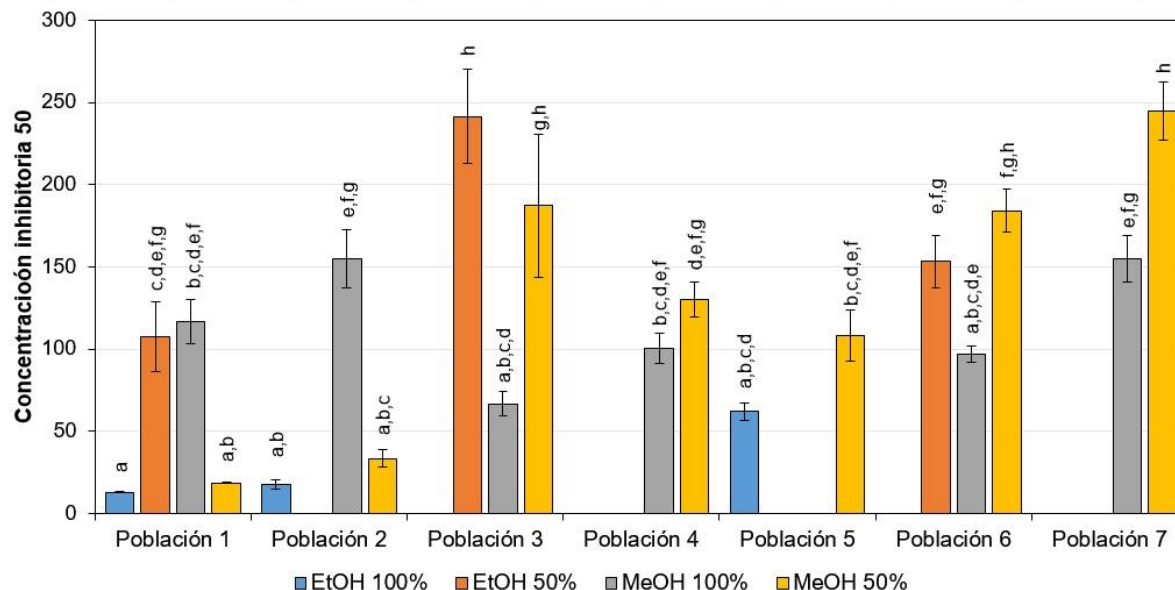


Figura 31. Valores de IC_{50} de extractos alcohólicos de hojas de 7 poblaciones silvestres de *A. linaria* sobre cultivo celular CMN. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.9 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Con la intención de dilucidar y proponer un posible mecanismo de acción mediante el cual los extractos de hojas de poblaciones silvestres de la especie *A. linaria* indujeron la citotoxicidad y afectaron la proliferación en las células cancerígenas, se decidió evaluar el efecto sobre la producción intracelular de ROS, ocasionado por la exposición de las células, específicamente HL60, a los extractos a dos diferentes tiempos: 1 y 3 h. Los resultados obtenidos se presentan por orden de evaluación a continuación (Figura 32 y 33).

Los resultados obtenidos de la primera evaluación mostraron que la exposición de las células HL60 posterior a 1 h, 7 de los 9 extractos evaluados tuvieron un efecto pro-oxidante considerable, debido a que los extractos de la población 3 a la 7 lograron aumentar el valor de intensidad media de fluorescencia (IMF) inicial de las células control, generado por las ROS basales que caracterizan a las células HL60, en un intervalo desde 0.03 hasta 1.13 IMF (Figura 32). Los extractos que lograron el mayor efecto pro-oxidante y se comportaron estadísticamente similares fueron P4M100,

P4M50, P5M50, P6M100, P6M50 y P7M100, caso contrario se observó con el extracto P3M50, el cual, a pesar de mostrar diferencia significativa con respecto al control, no es tan relevante como la producción de ROS generados por los extractos anteriormente mencionados. Cabe resaltar que estos 7 extractos mostraron tener concentraciones de CFT, CFLT, CTC considerables y buen efecto bloqueador de radicales (Tabla 4), siendo sus principales compuestos fenólicos identificados en los extractos ác. *p*-cumárico, ác. ferúlico, rutina y quercetina, siendo estos dos últimos los de mayor abundancia (Tabla 2 y 3). Los extractos P2M100 y P2M50 no mostraron ser estadísticamente diferentes al grupo control, por lo tanto, no mostraron efecto pro-oxidante.

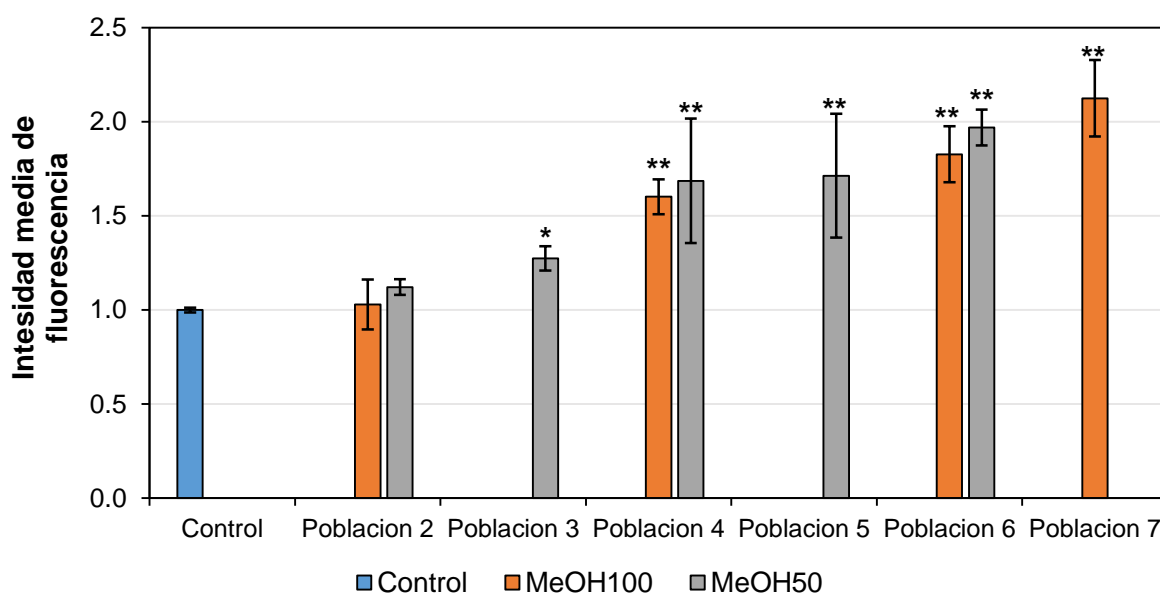


Figura 32. Valores del efecto sobre las ROS intracelular generado por la exposición de las células HL60 a los extractos metanólicos al 50% y 100% de *A. linaria* por 1 h. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres repeticiones. Un asterisco (*) indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Dunnett ($p < 0.05$), (**) diferencia $p < 0.01$.

Como resultados de la segunda evaluación, se apreció que sólo dos de los nueve extractos evaluados mantuvieron el efecto pro-oxidante después de 3 h de exposición, los otros siete no mostraron ser diferentes estadísticamente al tratamiento control (Figura 33). Posiblemente esta disminución de ROS (posterior a las 3 h) fue debido a que las enzimas antioxidantes y sistemas de defensa propios de las células como: enzima superóxido dismutasa, catalasas, glutatión peroxidasa, etc., lograron

estabilizar con éxito las elevadas concentraciones de ROS generadas por los extractos (Maldonado *et al.*, 2010). De igual modo, la presencia en los extractos de ciertos compuestos antioxidantes diferentes a los identificados por UPLC-MS tuvieron cierto efecto disminuyendo dichos radicales. Los extractos P6M50 y P7M100 que mantuvieron el efecto pro-oxidante mostraron concentraciones elevadas de compuestos fenólicos en general, como se puede apreciar en la Tabla 4, siendo para el caso del extracto P7M100 los compuestos rutina y quercetina los de mayor abundancia (Tabla 2). Caso contrario se observó en el extracto P6M50, el cual no reportó concentraciones considerables de ninguno de los 12 estándares analizados por UPLC-MS. Existe la posibilidad de que la composición fenólica de este extracto sea completamente distinta a los demás extractos analizados (Tabla 2).

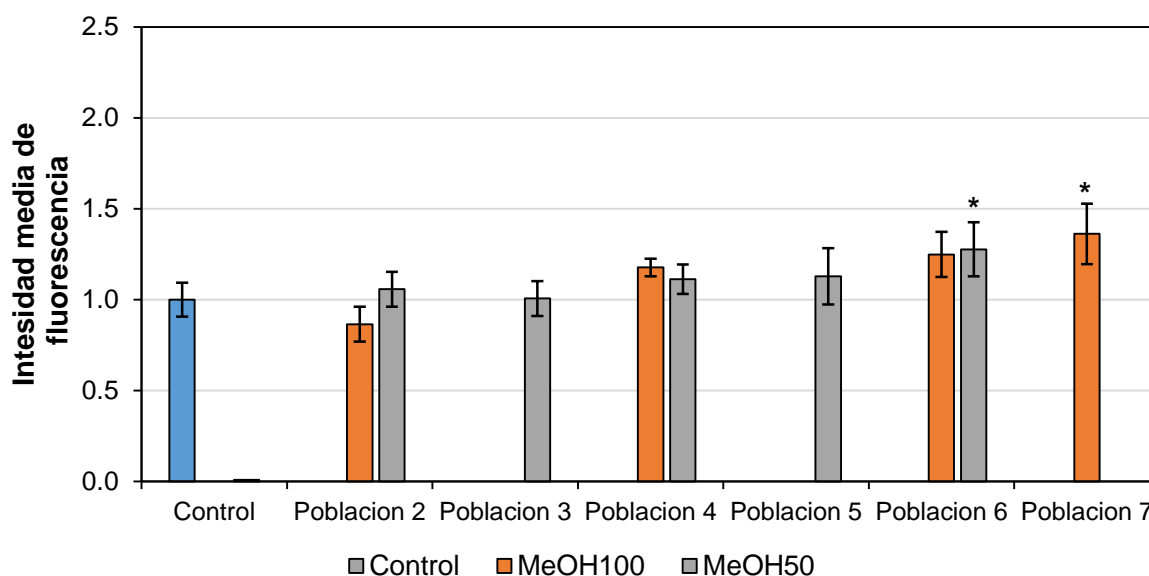


Figura 33. Valores del efecto sobre las ROS intracelular generado por la exposición de las células HL60 a los extractos metanólicos al 50% y 100% de *A. linaria* por 3 h. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres repeticiones. Un asterisco (*) indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Dunnett ($p < 0.05$), (**) diferencia $p < 0.01$.

Los resultados observados se pueden considerar contradictorios, ya que el principal mecanismo que se les ha atribuido a los compuestos fenólicos es funcionar como moléculas antioxidantes, sin embargo, existen diversas investigaciones que indican que los compuestos fenólicos, específicamente flavonoides como rutina y quercetina,

tienen la capacidad de comportarse como pro-oxidantes, esto dependiendo de la concentración, estructura, grupos funcionales, y ubicación de los mismos, dentro de la molécula y, de suma importancia, las condiciones en las que estos compuestos llevan a cabo la reacción de óxido-reducción (Laughton *et al.*, 1989 ; Cao *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2002; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009). Kessler *et al.* (2002), indican que las propiedades antioxidantes de los flavonoides están directamente relacionadas con la cantidad de grupos OH⁻ (grupo pirogalol o catecol) que constituyen la molécula y que a mayor presencia de estos grupos favorecerá la capacidad antioxidante y disminuirá la capacidad de comportarse como pro-oxidante. Además, este efecto se ha observado con mayor frecuencia cuando las dosis o concentraciones de flavonoides son elevadas, como en este caso (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). De igual manera, se menciona que la capacidad pro-oxidante de estos compuestos dependerá de la labilidad que tengan los radicales fenoxilo o arilo, resultante de la oxidación del compuesto flavonoide, y además que la presencia de grupos pirogalol o catecol en estos compuestos inducen la producción de radicales de tipo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) altamente citotóxicos, aclarando este efecto no se presenta para todos los flavonoides (Miura *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2002).

El efecto generado por los extractos en esta investigación fue considerado en parte benéfico, debido a que los extractos mostraron efectos citotóxicos de gran relevancia y se consideraron como posible alternativa de nuevas investigaciones y obtención de compuestos anticancerígenos. Azad *et al.* (2009), mencionan que desde ya hace algunos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de compuestos con potencial quimioterapéuticos que induzcan la producción de ROS intracelular en las células cancerígenas, y así, mediante diversos mecanismos, activar distintas rutas de señalización apoptóticas, necrosis celular, alteración en la autofagia celular o incluso generar directamente daños al material genético de las células (DNA), generar la muerte de las células problema. Basado en la literatura, se deduce que los extractos que mostraron mayores concentraciones de flavonoides, aumentan la posibilidad de comportarse como pro-oxidantes, esto bajo las condiciones fisiológicas que establecen las células cancerígenas.

Tabla 4. Contenido fenólico total (CFT), flavonoides totales (CFLT) y taninos condensados (CTC), capacidad antioxidante total (CAT) y actividad bloqueadora de radicales libres (DPPH y ABTS) de extractos etanólicos y metanólicos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria*.

Muestra	CFT (mg EAG/g MS)	CFLT (mg EC/g MS)	CTC (mg EC/g MS)	CAT (mg EAA/g MS)	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	% máximo inhibición DPPH	ABTS IC ₅₀ (mg/mL)
P1 E100	5.18±0.13 ^h	1.53±0.128 ^j	1.06±0.07 ^{h,i}	32.20±1.66 ^{l,m}	ND	33.52±0.86 ^o	0.761±0.002 ^{j,k}
P1 E50	9.33±0.15 ^{b,c,d,e}	2.66±0.209 ^{g,h,i}	0.41±0.03 ⁿ	103.69±2.83 ^e	0.206±0.001 ^g	56.14±1.26 ^j	0.597±0.006 ^{b,c,d}
P1 M100	7.16±0.46 ^g	3.19±0.048 ^{d,e,f,g}	1.67±0.06 ^d	63.78±2.23 ^g	0.160±0.013 ^d	63.01±0.36 ^{f,g}	0.821±0.017 ^{k,l}
P1 M50	9.32±0.27 ^{b,c,d,e}	2.68±0.108 ^{g,h,i}	0.65±0.03 ^{l,m}	17.96±1.47 ⁿ	0.122±0.001 ^a	72.34±0.60 ^a	0.529±0.009 ^{a,b}
P2 E100	5.72±0.58 ^h	1.84±0.056 ^j	1.24±0.03 ^{g,h}	37.27±0.80 ^{k,i}	ND	36.15±0.73 ^{n,o}	0.703±0.004 ^{g,h,i,j}
P2 E50	10.16±0.20 ^{a,b}	3.32±0.192 ^{d,e,f,g}	0.88±0.05 ^{i,j}	175.66±0.62 ^a	0.154±0.004 ^{b,c,d}	68.77±0.43 ^{c,d,e}	0.608±0.006 ^{c,d,e,f}
P2 M100	8.77±0.09 ^{c,d,e}	4.02±0.313 ^{a,b}	2.30±0.03 ^b	74.47±6.08 ^f	0.156±0.001 ^{c,d}	70.56±0.83 ^{b,c,d,e}	0.740±0.008 ^{i,j}
P2 M50	9.76±0.36 ^{a,b,c}	3.21±0.281 ^{d,e,f,g}	0.84±0.03 ^{j,k,l}	60.56±0.78 ^{g,h}	0.147±0.000 ^{b,c}	73.54±0.69 ^b	0.669±0.005 ^{e,f,g,h}
P3 E100	5.33±0.05 ^h	1.92±0.038 ^j	0.97±0.03 ^{i,j}	32.47±2.88 ^{l,m}	ND	36.03±1.19 ^{m,n}	0.762±0.008 ^{j,k}
P3 E50	10.56±0.66 ^a	2.77±0.086 ^{f,g,h,i}	0.85±0.03 ^{j,k}	145.73±3.44 ^d	0.193±0.002 ^f	60.14±0.25 ^{h,i}	0.565±0.007 ^{a,b,c}
P3 M100	8.68±0.19 ^{d,e}	3.92±0.256 ^{a,b,c}	1.63±0.14 ^{d,e}	75.90±3.85 ^f	0.157±0.002 ^{c,d}	67.09±0.27 ^{e,f}	0.867±0.015 ^l
P3 M50	10.49±0.47 ^a	2.62±0.207 ^{h,i}	0.81±0.03 ^{j,k,l}	49.29±1.55 ^{i,j}	0.177±0.002 ^e	63.42±1.08 ^{g,h}	0.513±0.002 ^a
P4 E100	5.13±0.12 ^h	1.74±0.061 ^j	1.35±0.05 ^{f,g}	42.06±0.00 ^{j,k}	ND	38.81±0.84 ^{l,m}	0.512±0.003 ^a
P4 E50	10.46±0.30 ^a	2.77±0.224 ^{f,g,h,i}	0.45±0.00 ⁿ	169.25±2.23 ^{a,b}	0.206±0.004 ^g	56.33±1.60 ^j	0.594±0.007 ^{b,c,d}
P4 M100	8.38±0.26 ^{e,f}	2.87±0.222 ^{e,f,g,h,i}	3.16±0.16 ^a	78.75±0.62 ^f	0.191±0.001 ^f	58.42±0.99 ^{i,j}	0.676±0.008 ^{f,g,h,i}
P4 M50	10.49±0.28 ^a	2.56±0.257 ⁱ	0.68±0.03 ^{k,l,m}	60.81±0.81 ^{g,h}	0.153±0.001 ^{b,c,d}	71.79±0.90 ^{b,c}	0.594±0.003 ^{b,c,d}
P5 E100	5.68±0.15 ^h	1.75±0.049 ^j	0.97±0.08 ^{i,j}	35.40±3.03 ^{k,l,m}	ND	38.67±0.43 ^{l,m}	0.620±0.003 ^{c,d,e,f}
P5 E50	10.42±0.24 ^a	3.54±0.019 ^{b,c,d}	0.99±0.05 ^{i,j}	156.07±1.85 ^c	0.149±0.006 ^{b,c}	73.36±0.95 ^b	0.577±0.010 ^{a,b,c,d}
P5 M100	9.07±0.51 ^{c,d,e}	4.17±0.307 ^a	2.05±0.06 ^c	81.24±3.85 ^f	0.147±0.000 ^{b,c}	71.13±0.71 ^{b,c}	0.600±0.006 ^{b,c,d,e}
P5 M50	10.10±0.14 ^{a,b}	3.28±0.043 ^{d,e,f}	1.00±0.08 ^{i,j}	36.08±0.39 ^{k,l,m}	0.155±0.000 ^{c,d}	73.24±0.89 ^b	0.576±0.007 ^{a,b,c,d}
P6 E100	5.01±0.29 ^h	1.76±0.071 ^j	0.97±0.08 ^{i,j}	28.74±1.22 ^m	ND	40.64±0.20 ^l	0.712±0.008 ^{g,h,i,j}
P6 E50	9.39±0.28 ^{b,c,d}	3.08±0.041 ^{d,e,f,g,h,i}	1.24±0.03 ^{g,h}	164.62±1.85 ^b	0.162±0.001 ^d	67.50±2.31 ^{d,e,f}	0.533±0.003 ^{a,b}
P6 M100	7.49±0.33 ^{f,g}	3.38±0.313 ^{c,d,e}	1.22±0.06 ^{g,h}	99.77±4.32 ^e	0.176±0.002 ^e	58.26±0.34 ^{g,h}	0.760±0.008 ^{j,k}
P6 M50	9.59±0.22 ^{a,b,c,d}	2.94.0±0.099 ^{e,f,g,h,i}	0.88±0.05 ^{i,j}	29.61±1.25 ^{l,m}	0.144±0.001 ^b	72.34±0.60 ^b	0.644±0.008 ^{d,e,f,g}
P7 E100	5.34±0.23 ^h	1.52±0.067 ^j	0.89±0.05 ^{i,j}	33.53±2.57 ^{l,m}	ND	48.60±0.62 ^k	0.667±0.004 ^{h,i,j}
P7 E50	10.15±0.12 ^{a,b}	3.20±0.227 ^{d,e,f,g}	0.57±0.03 ^{m,n}	169.96±3.70 ^{a,b}	0.151±0.001 ^{b,c,d}	70.73±1.69 ^{b,c,d}	0.574±0.007 ^{a,b,c,d}
P7 M100	8.66±0.53 ^{d,e}	3.24±0.0168 ^{d,e,f,g}	1.45±0.06 ^{e,f}	95.49±4.32 ^e	0.152±0.001 ^{b,c,d}	70.32±2.47 ^{b,c,d,e}	0.622±0.004 ^{c,d,e,f}
P7 M50	10.44±0.09 ^a	3.09±0.249 ^{d,e,f,g,h,i}	0.44±0.03 ⁿ	54.99±0.59 ^{h,i}	0.147±0.001 ^{b,c}	73.09±0.51 ^b	0.574±0.003 ^{a,b,c,d}

Los valores representan la media±D.E. de tres repeticiones.

Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p<0.05$).

MS, muestra seca; ND, no determinada.

Tabla 5. Valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) obtenidos de los tres tipos celulares evaluados contra los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de hojas de poblaciones silvestres de *A. linaria* e índices de selectividad.

Muestra	K562 IC ₅₀ (µg/mL)	HL60 IC ₅₀ (µg/mL)	CMN IC ₅₀ (µg/mL)	Índice selectividad K562	Índice selectividad HL60
P1 E100	27.66±7.43 ^{a,b}	17.55±2.57 ^{f,g,h,i}	12.8±0.4 ^a	0.46	0.73
P1 E50	18.06±0.86 ^a	24.17±3.77 ^j	107.6±21.43 ^{c,d,e,f,g}	5.94	4.45
P1 M100	72.13±7.59 ^c	17.33±0.43 ^{c,d,e,f,g,h}	116.7±13.57 ^{b,c,d,e,f}	1.61	6.73
P1 M50	28.22±4.09 ^{a,b}	16.79±0.86 ^{c,d,e,f,g,h}	18.7±0.48 ^{a,b}	0.66	1.11
P2 E100	11.51±3.92 ^a	13.39±0.24 ^{a,b,c,d}	17.6±1.53 ^{a,b}	1.53	1.31
P2 E50	> 400 ^e	18.32±0.87 ^{g,h,i}	-	-	-
P2 M100	79.57±10.98 ^c	14.25±0.85 ^{a,b,c,d,e,f}	155±1.94 ^{e,f,g}	1.94	10.88
P2 M50	12.05±1.60 ^a	11.31±0.15 ^a	33.6±5.07 ^{a,b,c}	2.77	2.97
P3 E100	327.35±61.74 ^c	16.09±0.79 ^{c,d,e,f,g,h}	-	-	-
P3 E50	58.71±9.66 ^{b,c}	19.20±1.43 ^{g,h,i}	241.4±28.8 ^h	4.11	12.57
P3 M100	29.40±2.03 ^{a,b}	14.28±0.94 ^{a,b,c,d,e,f}	66.8±7.14 ^{a,b,c,d}	2.27	4.68
P3 M50	153.47±28.77 ^d	17.53±1.41 ^{e,f,g,h,i}	187.3±43.56 ^{g,h}	1.22	10.68
P4 E100	> 400 ^e	17.86±1.52 ^{f,g,h,i}	-	-	-
P4 E50	> 400 ^e	16.68±1.27 ^{c,d,e,f,g,h}	-	-	-
P4 M100	18.78±2.95 ^a	15.54±0.42 ^{b,c,d,e,f,g}	100.4±8.95 ^{b,c,d,e,f}	5.34	6.46
P4 M50	167.42±24.03 ^d	16.00±0.89 ^{c,d,e,f,g,h}	130.3±10.74 ^{d,e,f,g}	0.77	8.14
P5 E100	10.65±0.44 ^a	19.19±1.24 ^{g,h,i}	62.2±5.27 ^{a,b,c,d}	5.86	3.24
P5 E50	> 400 ^e	19.82±1.12 ^{h,i}	-	-	-
P5 M100	> 400 ^e	15.50±0.83 ^{b,c,d,e,f,g}	-	-	-
P5 M50	15.45±0.56 ^a	20.89±1.59 ^{i,j}	108.3±15.49 ^{b,c,d,e,f}	7.0	5.18
P6 E100	> 400 ^e	11.86±0.17 ^{a,b}	-	-	-
P6 E50	> 400 ^e	13.02±0.02 ^{a,b,c}	153.2±15.89 ^{e,f,g}	-	11.77
P6 M100	10.07±0.08 ^a	17.45±1.34 ^{e,f,g,h,i}	96.8±4.88 ^{a,b,c,d,e}	9.58	5.55
P6 M50	8.96±0.29 ^a	13.52±0.87 ^{a,b,c,d,e}	184.2±13.19 ^{f,g,h}	20.46	13.62
P7 E100	9.44±0.26 ^a	> 400 ^l	-	-	-
P7 E50	8.94±0.06 ^a	> 400 ^k	-	-	-
P7 M100	9.52±1.28 ^a	11.27±0.27 ^a	155±13.91 ^{e,f,g}	16.31	13.75
P7 M50	133.55±14.36 ^d	11.10±0.48 ^a	244.9±17.6 ^h	1.80	22.06

Los valores representan la media±D.E. de tres repeticiones.

Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

> 400, valor de IC₅₀ superior a 400 µg/mL de extracto; -, no evaluada.

VIII. CONCLUSIONES

Basado en los datos obtenidos y analizados en esta investigación se identificó que la especie *Asclepias linaria* tiene el potencial de ser una buena fuente de extracción de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante relevante, aplicables en múltiples campos de investigación como: agronómicas, alimentarias, médicas, farmacéuticas e incluso, ecológicas. Asimismo, se corrobora que la especie es candidata para futuras investigaciones con mayor especificidad en el área de la salud; debido a la presencia de compuestos con considerables propiedades antiproliferativas y citotóxicas, que se demostró ante distintas líneas celulares leucémicas y menor efecto ante células sanas.

IX. REFERENCIAS

- Abbott, T.P., Petterson, R.E., Tjarks, L.W., Palmer, D.M. y Bagb, M.O. (1990). Major Extractable Components in *Asclepias linaria* (Asclepiadaceae) and *Ilex verticillata* (Aquifoliaceae), Two Potential Hydrocarbon Crops, *Economic Botany*, 44(2), 278-284.
- Aherne, S.A. y O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81.
- Al-Snafi, A. E. (2015). Chemical constituents and pharmacological effects of *Asclepias curassavica* – A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 83-87.
- Amzad, M., Al-Raqmi K. A., AL-Mijizy, Z. H., Mohammed, A. y Al-Riyami, Q. (2013). Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9), 705-710.
- Arista, M. y Ortiz, P.L. (2012). *Asclepias*. En: S. Talavera *et al.* (Eds.) Flora iberica Vol (111-114). Madrid. España. 111-114.
- Aseervatham, S. B., Sasikumar, J. M. y Kumar, D. (2012). Studies on *in vitro* free radical scavenging activity of bixa Orellana L. bark extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 719-727.
- Barriada-Bernal, L.G., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E.A., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J.A., Torres-Morán, M.I., González-Elizondo, M.S. y Herrera-Arrieta, Y. (2014). Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *Ciencia y Tecnología en los Alimentos Journal of Food*, 12, 104-115.
- Basaga, H.S. (1989). Biomedical aspects of free radicals. *Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 68, 980-989.
- Beckman, J.S. y Koppenal, W.H. (1996). Nitric oxide superoxide, and peroxynitrite- the good, the bad, and the ugly. *J Physiol*, 40, 24-37.
- Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. (2009). Asclepiadaceae. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado de:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Asclepias%20linaria&id=7454>

- Bravo, L. (1998). Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Butler, L.G. (1992). Protein polyphenol interactions: nutritional aspects. Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol, 16(2), 11- 18.
- Cao, G., Sofic, E. y Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 749-760.
- Carbonell-Capella, J. M., Zlabur, J., Rimac Brncić, S., Barba, F. J., Grimi, N., Koubaa, M., Brncić, M. y Vorobiev, E. (2016). Electrotechnologies, microwaves, and ultrasounds combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(5), 1-8.
- Carocho, M. y Ferreira, I. C. F. R. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cáncer- A review. *Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry*, 13, 1236-1258.
- Cartaya, O. y Inés, R. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 2 (22), 5-14.
- Cheesman, K.H., Slater, T.F. (1998). Free Radicals in Medicine. *British Medical Bulletin*, 49, 18-21.
- Ching-Chiung, W., Lih-Geeng, C. y Ling-Ling, Y. (2000). Cuphiin D₁, the macrocyclic hydrolyzable tannin induced apoptosis in HL-60 cell line. *Cancer Letters*, 149, 77-83.
- Das, S., Chandrashekar, K. y Venkateswara, Y. (2015). Antioxidant evaluation and cytotoxic activity of *Asclepias curassavica* Linn. *International Journal of Bioassays*, 4(1), 3697-3701.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J. y Kyle, A. M. (2000). Plant polyphenols in cáncer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13, 79-106.

- Escamilla, C. I., Cuevas, E. Y. y Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52(2), 73-75.
- Fernández, A. M., Juárez, V. y Cortés, L. (2008). Usos de las especies del género *Asclepias* L. (Apocynaceae, Asclepiadoideae), información del Herbario Nacional de México, MEXU. *Polibotánica*, 1(25), 155-171.
- Frauzino, K. C., Costa, E. M. de M. B., Pazini, F., Campos, M. y de Oliveira, V. (2013). Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 93-96.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., Bertocelli, L., Cooper, E. L. y Cossarizza, A. (2010). Quercetin and cáncer chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 1-15.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. *Revista Ámbito Farmacéutico*, 23(6), 80-84.
- Gomes, J., de Sousa, T. A., Nobre, M. D., Vasconcelos, D. L., do Desterro, M., Carneiro, S., Cavalcanti, E. L. y de Albuquerque, U. P. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, 15, 8534-8542.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32:1141-1148.
- Hechem, V. y Ezcurra, C. (2006). Flora Del Valle De Lerma. *Aportes Botánicos De Salta*, 7(13), 1-61.
- Henry, Y., Salomón, I., Acosta, J., Romero, A., López, M y Mercado, J. (2016). Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de *Annona muricata* L. leaves. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21 (3), 298-308.
- Hernández, P. (2013). *Actividad antioxidante de Asclepias curassavica L., en un modelo de cáncer* (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Ignat, I., Radu, D. G., Volf, I., Pag, A. I. y Popa, V. I. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of some natural polyphenols. *Cellulose Chemistry and Technology*, 47 (5-6), 387-399.

- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T. y Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Ethno-pharmacology*, 96(2005), 145-150.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. T., Moon, R. C. y Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-221.
- Jing-Pin, L., Jai-Sing, Y., Jen-Jyh, L., Kuang-Chi, L., Hsu-Feng, L., Chia-Yu, M., Sai-Chuen, R., King-Chuan, W. Fu-Shin, C., Gibson, W. y Jing-Gung, C. (2010). Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murin xenograft model *in vivo*. *Environmetal Toxicology*, 1, 1-5.
- Juárez-Jaimes, V., Alvarado-Cárdenas, L. O. y Villaseñor, J. L. (2007). La familia *Apocynaceae sensu lato* en México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78(2), 459-482.
- Kessler, M., Ubeaud, G. y Jung, L. (2002). Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *Pharmacy and Pharmacology*, 55, 131-142.
- Khasawneh, M. A., Mohamed, H., Mohamed, N., Hamza, A. A., Raheem, A. y Hassan, A. H. (2011). Antioxidant activity, lipoxygenase, inhibitory effect and polyphenolic compounds from *Calatropis procera* (Ait.) R. Br. *Journal of Phytochemistry*, 5(2), 80-88.
- Knudsen, H. D. (2011). Estados Unidos Patente nº 854.513.
- Lamaison, J.L. y Carnat, A. (1990). Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegeus monogyna* Jacq et de *Crataegeus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 65, 315–320.
- Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J. y Houlst, J. R. S. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolic quercetin, gossypol and myrecetin. *Biochemical Pharmacology*, 38(17), 2859-2865.
- Lee, K.J., Oh, Y.C., Cho, W.K. y Ma, J.Y. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using

offline and online screening HPLC assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2015/165457.

- Maldonado, O., Jiménez, E. N., Guapillo, M. R., Ceballos, G. M. y Méndez, E. (2010). Radicales libres y sus papel en las enfermedades crónicas-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad de Veracruzana*, 10(2), 32-39
- Martínez, C., Ortega, V. V., Yañez, M. J., Alcaraz, M., Canteras, M., Benavente-García, O. y Castillo, J. (2005). Treatment of metastatic melanoma B16F10 by flavonoids tangeretin, rutin and diosmin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6791-6797.
- Martínez, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 152-166.
- Martínez-Flórez, S. González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Las flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Marwah, R. G., Fatope, M. O., Mahrooqi, R. A., Varma, G. B., Abadi, H. A. y Al-Burtamani, S. K. S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry*, 101, 465-470.
- Medina-Medrano, J. R., Vázquez-Sánchez, M., Villar-Luna, E., Cortez-Madrigal, H., Angoa-Pérez, M. V. y Cázares-Álvarez, E. E. (2016). Total phenolic content, total flavonoids and antioxidant capacity of methanolic extracts from *Solanum ferrugineum* Jacq. (Solanaceae). *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 6: 1135-1144.
- Mercado-Mercado, G., de la Rosa, L., Wall-Medrano, A., López, J. A. y Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 36-46.
- Miura, Y. H., Tomita, I., Watanabe, T., Hirayama, T. y Fukui, S. (1998). Active oxygens generation by flavonoids. *Biology and Pharmaceutical Bulletin*, 21(2), 93-96.
- Moreno-Lorenzana, D., Avilés-Vázquez, S., Sandoval, M. A., Alvarado-Moreno, A., Ortiz-Navarrete, V., Torres-Martínez, H., Ayala-Sánchez, M., Mayani, H. y

- Chavez-Gonzalez, A. (2016). CDKIs p18^{INK4c} and p57^{Kip2} are involved in quiescence of CML leukemic stem cells after treatment with TKI. *Cell Cycle*, 15 (9), 1276–1287.
- Muñoz, C. W., Chavez, R. W., Pabón, L. C., Rendón, F. M. R., Patricia-Chaparro, M., Otálvaro-Álvarez, A. M. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 46, 38-46.
- Muñoz, D. C. (2013). Evaluación de la actividad citotóxica y antiproliferativa de fracciones metanólicas y actividad citotóxica de compuestos puros de la esponja marina *Ectyoplasia ferox* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Naqui, A., Britton, C. y Cadenas, E. (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 137-166.
- Nurmi, K., Ossipov, V., Haukioja, E. y Pihlaja, K. (1996). Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp.tortuosa). *Journal of Chemical Ecology*, 22, 2033-2050.
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska y Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Roseaceae plant roots. *Food Chemistry*, 100(2007), 579-583.
- Ozores, M. (2014). Cromatografía de líquidos HPLC. Laboratorio de Técnicas instrumentales. (En línea). Disponible en: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analsisi-químicos/cromatografía-de-líquidos-hplc>
- Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis, E.P., Soleas, G. y Goldberg, D.M. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 235:207-219.
- Peres, W. (1994). Radicais Livres em níveis biológicos. Río Grande del Sur, *Brasil: Educat*

- Pérez, G. y Martínez, G. (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 20 (4), 297-306.
- Pérez, T. M. (2003) Asclepiadaceae. En Juárez-Jaimes, V.; Lozada, L. (2003). *Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán* (pp. 1-57). D.F, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Plakke, R. K. y Pfeiffer, E. W. (1964). Calotropin, a cytotoxic principle isolated from *Asclepias curassavica* L. *Science*, 146, 1685-1686.
- Porrás-Loaiza, A.P. y López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 3(1), 121-134.
- Prieto, P., Pineda, M. y Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Rachh, P. R., Patel, S. R., Hirpara, H. V., Rupareliya, M. Y., Rachh, M. R., Bhargava, A. S., Patel, N. M. y Modi, D. C. (2009). *In vitro* evaluation of antioxidant activity of *Gymnema sylvestre* R. BR. Leaf extract. *Romanian Journal of Biology - Plant Biology*, 54(2), 141-148.
- Raja, S., Nazeer, K. F. H., Kumar, V., Mukherjee, K. Bandyopadhyay y Mukherjee, P. K. (2005). Antioxidant potential of aerial part of *Asclepias curassavica*. Linn (Family-Asclepiadaceae). *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 5(2), 92-99.
- Rascón, L. A., Jiménez, M., Velázquez, C. A., Garibay, A., Medina, L. A., Gámez, N. y Robles, R. (2015). Antiproliferative and apoptotic activities of extracts of *Asclepias subulata*. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1741-1751.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. y Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medical Research Reviews*, 23(4), 519-534.
- Rodríguez, R. (2008). Caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) (Tesis de maestría). Instituto potosino de investigación científica y tecnológica, San Luis Potosí, México.

- Seabra, I. J., Dias, A. M. A., Braga, M. E. M., y De Sousa, H. C. (2012). High pressure solvent extraction of maritime pine bark: Study of fractionation, solvent flow rate and solvent composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 62, 135-148.
- Sikorska, M., Matlawska, I., Glowniak, K. y Zgórk, G. (2000). Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Asclepias syriaca* L. *Polish Pharmaceutical Society*, 57(1), 69-72.
- Tomás-Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud*, 10(2), 41-53.
- Tsimidou, M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 2(10), 99-116.
- Vázquez-Sánchez, M. Medina-Medrano, J. R., Cortez-Madrigal, H., Angoa-Pérez, M. V., Muñoz-Ruiz, C. V. y Villar-Luna, E. (2018). Nematicidal activity of wild plant extracts against second-stage juveniles of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*, 48(2), 136-144.
- Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 51(2), 126-133.
- Vidal, A., Motidome, M., Mancini-Filho, J., Fallarero, A., Midori, T., Brandao, L. M. y Lapa, A. J. (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos de alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3), 373-382.
- Wei, Y., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. y Uchida, A. (1994). Induction of apoptosis by quercetin: involvement of Heat Shock Protein. *Cancer Research*, 54, 4952-4957.
- Wetwitayaklung, P., Phaechamud, T., Limmatvapirat, C. y Keokitichai, S. (2008). The study of antioxidant activities of edible flower extracts. *Acta horticulturae*, 786(786), 185-192.
- Yang, J., Guo, J. y Yuan, J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *Food Science and Technology*, 41, 1060-1066.

- Zapata, K., Cortes, F. B. y Rojano, B. A. (2013). Polifenoles y actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*Psidium araca*). *Información tecnológica*, 24(5), 103-112.
- Zavaleta, J., Muñoz, A. M., Blanco, T., Alvarado-Ortíz, C. y Loja, B. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Horizonte Médico*, 5 (2), 1-13.