



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**“Compuestos fenólicos del fruto de cirrián (*Crescentia alata*) y evaluación
in vitro de su potencial actividad antihipertensiva”**

ÁREA TEMÁTICA:

Biotecnología Alimentaria

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Maestro en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

Q.F.B. José Miguel Morales Ventura

DIRECTOR:

D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores

CO-DIRECTOR:

D.C. José Juan Virgen Ortiz

Morelia, Michoacán

Junio 2023

LUGARES DE TRABAJO

La presente tesis se llevó a cabo en las siguientes instalaciones:

- Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos.

- Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán.

Laboratorio de Análisis Bioquímicos de Alimentos.

DEDICATORIAS

A mis padres: Alicia y Miguel

Por su incondicional apoyo.

Este trabajo va por ellos, por lo que valen y significan para mi.

A mi hermana: Gaby.

Por tener la fortuna de contar con ella en todo momento.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡que importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”.

- Marie Curie.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de la beca mensual durante la duración del posgrado.

Mi más sincero y profundo agradecimiento a mis asesores de tesis.

Al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores por brindarme su apoyo, confianza y la oportunidad de ingresar al posgrado, además de pertenecer a su equipo de trabajo en el laboratorio.

Al Dr. José Juan Virgen Ortiz por la confianza y apoyo durante estos años de trabajo. En los cuales me transmitió y me mostró el gusto por la academia e investigación. Lo que aprendí con el doctor Juan se quedará siempre presente en mi vida profesional.

Le agradezco a la Dra. Citlali Colín Chávez por ser una de mis mentoras en estos últimos años. Por brindarme su apoyo, confianza y consejos durante mi estancia en el CIDAM.

Agradezco a mi comité de sinodales: Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo, Dra. Martha Estrella García Pérez y a la Dra. María Carmen Bartolomé Camacho por su apoyo en la lectura y correcciones del presente trabajo, así como brindarme sus consejos durante los seminarios de investigación.

A mis amigos que me acompañaron durante este camino, les agradezco no solo por estar presentes aportando cosas valiosas a mi vida, sino por los grandes momentos de felicidad y emociones que siempre me han causado.

A todos ... ¡Gracias totales!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
1.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Crescentia alata</i>	4
1.2. INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS FOSFODIESTERASAS POR EFECTO DE FITOQUÍMICOS	4
1.3. LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA POR EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	5
2. JUSTIFICACIÓN / PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVOS	9
4.1. OBJETIVO GENERAL	9
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
5. MARCO TEÓRICO	10
5.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL SISTÉMICA	10
5.1.1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA (SRAA)	11
5.1.2. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA)	12
5.1.3. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL	13
5.1.4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS.....	13
5.1.5. INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA ECA.....	14
5.1.6. TRATAMIENTOS NO FARMACOLÓGICOS	15

5.1.7.	COMPUESTOS BIOACTIVOS INHIBIDORES DE LA ECA	16
5.2.	HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR	16
5.2.1.	LAS ENZIMAS FOSFODIESTERASAS EN LA HAP	17
5.2.2.	ENZIMAS FOSFODIESTERASAS	18
5.2.3.	TRATAMIENTOS PARA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR.....	20
5.2.4.	INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA	20
5.2.5.	INHIBIDORES NATURALES DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA.....	22
5.3.	COMPUESTOS FENÓLICOS: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	23
5.4.	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS	26
5.5.	QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS	26
5.6.	EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	28
5.6.1.	TECNICAS DE EXTRACCIÓN	28
5.6.2.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	30
5.7.	PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	31
5.8.	MÉTODOS PARA EVALUAR LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES	32
5.9.	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO	34
5.10.	RADICALES LIBRES Y SU IMPLICACION EN DIVERSAS ENFERMEDADES.	36
5.11.	INFLAMACIÓN PULMONAR ASOCIADO A LOS RADICALES LIBRES	36
5.12.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Crescentia alata</i>	37
5.12.1.	USO MEDICINAL DE CIRIÁN	38
5.12.2.	<i>Crescentia alata</i> COMO ALTERNATIVA NATURAL CONTRA LA HIPERTENSIÓN	39
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1.	PLANTEAMIENTO GENERAL DE TRABAJO	40
6.2.	MATERIAL BIOLÓGICO	40
6.3.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	41
6.4.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS	42

6.4.1. EXTRACCIÓN ACUOSA DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE CALENTAMIENTO.....	42
6.5. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU	42
6.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL ENSAYO DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILLO	43
6.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DEL RADICAL ÁCIDO 2,2'-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-SULFONICO).....	44
6.8. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE INHIBICIÓN DEL RADICAL HIDROXILO.....	45
6.9. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE CIRIÁN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	45
6.10. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS PARA SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	47
6.11. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA POR EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	48
6.12. ENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA POR EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	48
6.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	51
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN EXPERIMENTAL	52
7.1. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS DEL CIRIÁN	52
7.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES FENÓLICAS DEL CIRIÁN	54
7.3. CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL RADICAL HIDROXILO DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS DE CIRIÁN.....	56
7.4. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE CIRIÁN	59
7.5. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA.....	63

7.6.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE CIRIÁN	66
7.7.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE CIRIÁN	70
8.	CONCLUSIONES	76
9.	RECOMENDACIONES	77
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
11.	ANEXOS	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorías de la presión arterial para adultos mayores de 18 años de acuerdo a la ESC y ESH	10
Tabla 2. Inhibidores selectivos de las fosfodiesterasas.	21
Tabla 3. Usos tradicionales de <i>Crescentia alata</i> a través de diferentes regiones	38
Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación del perfil de ácidos fenólicos	46
Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación de la actividad ECA49	
Tabla 6. Evaluación de capacidad antioxidante en extractos fenólicos de fruto de cirrián	55
Tabla 7. Concentración media inhibitoria (IC_{50}) de los extractos fenólicos de cirrián sobre el radical hidroxilo	57
Tabla 8. Concentración de ácidos fenólicos encontrados en extractos de fruto de cirrián.	61
Tabla 9. Datos cromatográficos de los compuestos de reacción de la ECA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funcionamiento del SRRA en la regulación de la presión arterial.....	12
Figura 2. Estructura tridimensional de la enzima convertidora de angiotensina.....	13
Figura 3. Sitio activo de unión de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con el IECA captopril.....	14
Figura 4. Estructura química del captopril.....	15
Figura 5. Ejemplo de la estructura tridimensional de la enzima fosfodiesterasa (PDE-5).....	18
Figura 6. Estructura general de las enzimas fosfodiesterasas	19
Figura 7. Ejemplo de acoplamiento molecular entre naftoquinona (aislada de <i>Heterophragma</i> <i>adenophyllum</i>) y la enzima fosfodiesterasa.	23
Figura 8. Vinculación del metabolismo primario y secundario en plantas.	24
Figura 9. Ejemplificación de compuestos polifenoles según su clasificación química.....	25
Figura 10. Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos.....	27
Figura 11. Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos.	28
Figura 12. Procedimientos de extracción de compuestos fitoquímicos en plantas y frutos medicinales.....	29
Figura 13. Sitios de generación de ROS y radicales libres en la célula.	35
Figura 14. Frutos de <i>Crescentia alata</i>	37
Figura 15. Esquema general de trabajo.	40
Figura 16. Frutos maduros de cirán.....	41
Figura 17. Liofilizador (LABCONCO – FreeZone, USA).	41
Figura 18. HPLC Agilent Technologies 1200 Infinity Series.	46
Figura 19. Ejemplo de espectro de absorción del ácido 4-hidroxibenzoico en detector DAD.....	47
Figura 20. Concentrador de vacío (SpeedVac™ SPD 120, Vacuum Concentrator, USA).....	47
Figura 21. Contenido de fenoles totales en extractos de fruto de cirán.	52
Figura 22. Cromatograma de la mezcla de los estándares analíticos de ácidos fenólicos.....	59
Figura 23. Cromatograma de la mezcla de los estándares analíticos de ácidos fenólicos.....	60

Figura 24. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción metanólica del cirián.....	60
Figura 25. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción metanólica del cirián.....	60
Figura 26. Espectro de absorción del Ácido hipúrico en detector DAD.	63
Figura 27. Espectro de absorción del Hipuril-histidil-leucina en detector DAD.	64
Figura 28. Espectro de absorción del captopril comercial en detector DAD	64
Figura 29. Cromatograma del producto (HA) y sustrato (HHL) de la ECA en detector DAD.....	65
Figura 30. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del captopril	65
Figura 31. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del extracto metanólico de cirián	66
Figura 32. Porcentaje de inhibición de la ECA del extracto EtOH 80% de cirián.....	67
Figura 33. Porcentaje de inhibición de la ECA del extracto EtOH 70% de cirián.....	67
Figura 34. Porcentaje de inhibición de la ECA del extracto acuoso de cirián	68
Figura 35. Concentración media inhibitoria (IC_{50}) de los extractos fenólicos de cirián sobre la actividad ECA.	69
Figura 36. Porcentaje de inhibición de la PDE del inhibidor EDTA	71
Figura 37. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto MeOH 80% de cirián	72
Figura 38. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto EtOH 80% de cirián	72
Figura 39. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto EtOH 70% de cirián	73
Figura 40. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto acuoso de cirián.....	73
Figura 41. Concentración media inhibitoria (IC_{50}) de los extractos fenólicos de cirián sobre la actividad PDE.....	74

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Siglas y abreviaturas	Descripción
OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
ESC	Sociedad Europea de Cardiología
ESH	Sociedad Europea de Hipertensión
ECV	Enfermedades Cardio Vasculares
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
HAP	Hipertensión Arterial Pulmonar
HA	Hipertensión Arterial
PA	Presión Arterial
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
PDE	Enzima Fosfodiesterasa
IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IPDE	Inhibidor de la Enzima Fosfodiesterasa
HHL	Hipuril Histidil Leucina
HA	Ácido Hipúrico
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria
cAMP	Adenosin Monofosfato Ciclico
cGMP	Guanosín Monofosfato Ciclico
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
Radical OH	Radical Hidroxilo
ABTS	Ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
Ph ⁻	Grupo fenilo
OH ⁻	Grupo Hidroxilo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ON	Óxido Nítrico
TLC	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DAD	Detector de diodos
MS	Espectrofotometría de masas
GC	Cromatografía de gases
GAE	Ácido gálico
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
<i>et al</i>	Colaboradores

Unidades	Descripción
%	Porcentaje
Mm Hg	Milímetros de mercurio
PAPm	Presión arterial pulmonar media
h	Hora
min	Minutos
m	Metros
cm	Centímetros
mm	Milímetros
mBar	Milibares
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
g	Gramo
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
μ m	Micrometro
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
N	Normalidad
mU	Miliunidades
nm	Nanometros
rpm	Revoluciones por minuto
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
r	Coefficiente de correlación de Spearman

RESUMEN

La hipertensión arterial (HA) y la hipertensión arterial pulmonar (HAP) son patologías crónicas que incrementan el riesgo de padecer un gran número de enfermedades cardiovasculares. En México, de acuerdo a la última encuesta nacional de salud, se calcula que el 30% de la población adulta presentan algún problema de salud ocasionados por la hipertensión.

En este contexto, ha surgido el interés en encontrar nuevas alternativas naturales que mejoren la prevención y tratamiento de estos padecimientos. Por tal razón, el uso de compuestos fitoquímicos ha tomado gran relevancia en la medicina tradicional. Uno de estos grupos de interés biológico son los compuestos fenólicos a los que se les atribuye propiedades antihipertensivas.

Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar *in vitro* la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales y perfil de ácidos fenólicos del fruto de cirrián. Esto con la finalidad de evaluar su capacidad de inhibición *in vitro* de las enzimas fosfodiesterasa (PDE) y convertidora de angiotensina (ECA) asociadas a enfermedades hipertensivas. Los extractos fenólicos se extrajeron mediante sonicación y ebullición, utilizando diferentes solventes polares (MeOH 80%, EtOH 80%, EtOH 70% y agua).

Posteriormente los fitoquímicos se evaluaron con los métodos espectrofotométricos considerando su contenido en fenoles totales y actividad antioxidante (inhibición del radical OH, ABTS y DPPH), dando como resultado una mayor actividad antioxidante en los extractos metanólicos. Por su parte, el perfil de ácidos fenólicos se determinó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), logrando identificar la presencia de los ácidos fenólicos: 4-hidroxibenzoico, vanílico, trans-cinámico, cafeico y ferúlico.

En cuanto a la actividad biológica, el extracto metanólico demostró tener una mayor actividad inhibitoria sobre la ECA y la enzima PDE que el resto de los extractos analizados. Estos resultados sugieren que los principales responsables de la inhibición enzimática pudieran ser los ácidos fenólicos de polaridad media como el cafeico y ferúlico.

Palabras clave: métodos cromatográficos, capacidad antioxidante, inhibición enzimática, actividad biológica, perfil antioxidante.

SUMMARY

Arterial hypertension (HA) and pulmonary arterial hypertension (PAH) are chronic pathologies that increase the risk of suffering from a large number of cardiovascular diseases. In Mexico, according to the latest national health survey, it is estimated that 30% of the adult population have some health problem caused by hypertension.

In this context, interest has arisen in finding new natural alternatives that improve the prevention and treatment of these conditions. For this reason, the use of phytochemical compounds has gained great relevance in traditional medicine. One of these groups of biological interest are phenolic compounds to which antihypertensive properties are attributed.

Due to the above, the objective of this work was to determine in vitro the antioxidant activity, total phenolics and phenolic acid profile of the cirrián fruit. This in order to evaluate its in vitro inhibition capacity of phosphodiesterase (PDE) and angiotensin converting (ACE) enzymes associated with hypertensive diseases. The phenolic extracts were extracted by sonication and boiling, using different polar solvents (MeOH 80%, EtOH 80%, EtOH 70% and water).

Subsequently, the phytochemicals were evaluated with spectrophotometric methods (total phenols, OH radical inhibition, ABTS and DPPH), resulting in a higher antioxidant activity in the methanolic extracts. For its part, the profile of phenolic acids was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), managing to identify the presence of phenolic acids: 4-hydroxybenzoic, vanillic, trans-cinnamic, caffeic and ferulic.

Regarding the biological activity, the methanolic extract demonstrated to have a greater inhibitory activity of the ACE and the PDE enzyme than the rest of the phenolic extracts. According to the literature, it suggests that the main agents responsible for enzyme inhibition are medium polarity phenolic acids such as caffeic and ferulic.

Keywords: chromatographic methods, antioxidant capacity, enzyme inhibition, biological activity, antioxidant profile.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de patologías causantes de un gran número de muertes a nivel mundial. Se estima que anualmente mueren alrededor de 17 millones de personas por este problema de salud pública. Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tasa de mortalidad ocasionada por las ECV representa el 31% del total de las muertes registradas en todo el mundo (Singh *et al.*, 2023). Sin embargo, la mayoría de estos padecimientos se pueden prevenir abordando las diferentes causas que las ocasionan. Se han llevado a cabo diversos estudios desde mediados del siglo XX, en los cuales se identificaron como los factores de riesgo más comunes, la hipertensión, diabetes, obesidad, hiperlipidemia, tabaquismo, sedentarismo y falta de actividad física. Estos factores presentan el 90% del riesgo de infarto de miocardio en la población de todos los grupos étnicos, sociales y regiones geográficas (Teo & Rafiqn, 2021).

Diversos estudios señalan a la hipertensión como el principal factor de riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular. Los casos más comunes de este padecimiento se pueden presentar como hipertensión arterial sistémica (HAS) y como hipertensión arterial pulmonar (HAP). El primer caso se caracteriza por una presión arterial (PA) persistentemente alta en las arterias sistémicas ($\geq 140 / 90$ mm Hg) (Oparil *et al.*, 2018). Mientras que en la HAP se reportan niveles de presión arterial pulmonar media (PAPm) > 20 mm Hg en reposo. La fatiga, la disnea de esfuerzo y una reducción progresiva de las actividades de la vida diaria son sus principales síntomas (Malenfant *et al.*, 2021).

Se estima que más de 30 millones de mexicanos viven con problemas de salud provocados por la hipertensión. Los datos señalan que 24.9% de los hombres y 26.1% de las mujeres padecen esta enfermedad, ocasionando cerca de 50 mil fallecimientos anualmente (Secretaría de salud, 2022).

De acuerdo con diversas publicaciones la reducción de tabaco, la disminución en la ingesta de alcohol y el aumento de actividad física, pueden ayudar a reducir los niveles de presión arterial en los pacientes. Aunado a esto, es importante evaluar el estado clínico del paciente y aplicar el tratamiento médico basado en fármacos de primera línea como, antagonistas de los receptores de la angiotensina, bloqueadores de canales de calcio, beta bloqueadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y

fosfodiesterasa, siendo estos dos últimos los de mayor importancia médica y los más utilizados (Iza Stoll, 2006; James *et al.*, 2014).

Sin embargo, el prolongado tratamiento farmacológico con estos inhibidores enzimáticos produce efectos secundarios como hipotensión, tos seca, síntomas gastrointestinales y daño renal. Por tal motivo, durante las últimas décadas se han buscado nuevas alternativas que sean seguras y de fácil obtención para las personas hipertensas (Oparil *et al.*, 2018).

Debido a lo anterior, existe una diversidad de reportes que señalan el importante papel que desempeña el consumo de frutos y plantas medicinales, sobre la salud de las personas hipertensas. Estos estudios demuestran el potencial antihipertensivo de los compuestos fitoquímicos provenientes de estas fuentes vegetales (Odukoya *et al.*, 2022). Se estima que entre el 70 y 95% de la población mundial, sobre todo en países en desarrollo recurren a estas opciones medicinales para atender sus necesidades de salud (Robinson & Zhang, 2011).

Una de estas alternativas es el fruto de cirián (*Crescentia alata*), también conocido como cuatecomate, gua, ciriani y tocomate. Según los reportes de este fruto señalan, que es una importante alternativa en la medicina tradicional, y es utilizado para tratar enfermedades respiratorias (bronquitis, asma, tos y gripe), golpes, dolores (actividad antiinflamatoria), tumores (cáncer), problemas digestivos, erupciones cutáneas, hipertensión y estimulante del sistema inmunológico, siendo el fruto el componente más utilizado para estos fines (Aumeeruddy *et al.*, 2020; Olivares-Pérez *et al.*, 2018). Actualmente, se han descrito las características espectroscópicas de los pigmentos del cirián, estos metabolitos secundarios no corresponden a los que se han encontrado en otras frutas, como lo son: antocianinas, carotenoides y clorofilas, por lo que representan fuentes potenciales de melaninas y otros compuestos fenólicos (Cuevas-Juárez *et al.*, 2014).

El uso de compuestos fenólicos como una alternativa antihipertensiva ha tomado gran interés durante los últimos años. Esto se debe a la evidencia de reportes, en los que señalan el importante papel que desempeñan los frutos y plantas en la dieta, así como sus efectos benéficos relacionados a los problemas de hipertensión, provenientes por su gran variedad de compuestos fitoquímicos (Jáuregui & Escudero, 2007).

A pesar de que el cirián es muy utilizado para tratar enfermedades respiratorias, actualmente no existen estudios enfocados en conocer el posible mecanismo de acción

de su probada acción terapéutica, ni se ha documentado la composición y perfil de sus compuestos fenólicos. Por tal motivo, el presente trabajo se enfocó en evaluar la posible inhibición de las enzimas fosfodiesterasa y ECA por efecto de los compuestos fenólicos del fruto de cirrián, y la caracterización de los ácidos fenólicos que cuentan con reportes de actividad biológica.

1. ANTECEDENTES

1.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Crescentia alata*

En la familia Bignoniaceae existen un gran número de especies vegetales. Sin embargo, sólo seis son ampliamente cultivadas debido a su valor ornamental y herbolario. Dentro de estas especies se encuentran *Crescentia cujete* y *Crescentia alata*, esta última presente en México. En la medicina tradicional ambas especies son muy importantes debido a su alto contenido fitoquímico. A pesar de su relevancia en la herbolaria tradicional, su actividad biológica a nivel científico es poco conocido, por lo que ha surgido en los últimos años un gran interés en el estudio de sus metabolitos secundarios (da Silva Lima *et al.*, 2020).

Los fitoquímicos de *C. alata* han sido estudiados por sus propiedades antiinflamatorias y actividad biológica, en los que destacan algunos derivados de flavonoides (Arenas, 2004). En otra investigación utilizaron la pulpa madura del cirián, con el fin de analizar las propiedades fenólicas, en la cual, cuantificaron los fenoles totales y la capacidad antioxidante, provenientes en su mayoría de las melaninas solubles extraídas del fruto. El resultado fue un alto contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante, así como una actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa (Cuevas-Juárez *et al.*, 2014).

Por su parte, Autore *et al.* (2001) evaluaron la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto metanólico proveniente del fruto de cirián, sobre edemas inducidos en ratas, así como la actividad *in vitro* en la producción de óxido nítrico inducido por lipopolisacáridos de *Escherichia coli* y por la enzima óxido sintasa, en líneas celulares de macrófagos, reportando que el extracto ejerció *in vivo* presento una menor actividad sobre la expresión de la enzima óxido sintasa.

1.2. INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS FOSFODIESTERASAS POR EFECTO DE FITOQUÍMICOS

En los últimos años, se ha incrementado el uso de terapias alternativas naturistas que ayuden a tratar un gran número de enfermedades inflamatorias, así se ha recurrido a las plantas

medicinales, tomando infusiones o ingiriendo frutas, verduras, vino tinto y alimentos ricos en polifenoles (Ayala-Mata *et al.*, 2019). Uno de los múltiples efectos benéficos que otorgan estos metabolitos, es la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas. Esta actividad biológica es reportada por Cervantes-Paz *et al.* (2018), quienes en su revisión mencionan los beneficios atribuidos de los compuestos fenólicos, tales como ácidos fenólicos, flavonoles y flavonas provenientes del fruto de tejocote (*Crataegus* spp).

Rauf *et al.*, (2021) evaluaron la actividad biológica de los extractos metanólicos obtenidos del fruto jambul (*Syzygium cumini*), así como su composición fitoquímica. Los resultados mostraron que la planta es una rica fuente de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos. Además, los autores mencionan que las fracciones de los extractos vegetales lograron inhibir significativamente las enzimas ureasa, α -glucosidasa y fosfodiesterasa.

Shah *et al.* (2020) aislaron tres formas de naftoquininas a partir de *Heterophragma adenophyllum* perteneciente a la familia Bignoniaceae. Los compuestos evaluados mostraron un alto potencial de inhibición contra la fosfodiesterasa-1 (PDE-1) con un porcentaje promedio del 93%, siendo este mayor que el obtenido por el inhibidor control (EDTA). Los autores concluyeron que *H. adenophyllum* puede usarse para el tratamiento de vasoconstricción y en diversas afecciones inflamatorias.

1.3. LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA POR EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La ECA es un regulador muy importante de la función cardiovascular y renal. Por lo tanto, se ha propiciado el desarrollo de inhibidores que sean capaces de mantener sus niveles normales para que realice su actividad biológica. Sin embargo, el uso de inhibidores sintéticos de esta enzima ha provocado efectos secundarios negativos en el organismo a largo plazo. Por lo cual, se han realizado investigaciones que ayuden a encontrar nuevos inhibidores de la ECA provenientes de fuentes naturales, particularmente de origen vegetal (Goncalves & Romano, 2017).

Una de estas alternativas es descrita por Field & Newton (2013), donde identificaron que los granos de cacao son una rica fuente de compuestos fenólicos. Específicamente de

flavonoides, que actúan de manera positiva en la regulación del óxido nítrico a través de una serie de vías metabólicas. Provocando la vasodilatación en el cuerpo y ejerciendo un efecto antihipertensivo. Este beneficio metabólico, se vio reflejado por la actividad antioxidante y la inhibición de la ECA por efecto de los fenólicos.

Kessy *et al.*, (2018) evaluaron los extractos fenólicos obtenidos a partir del fruto de *Litchi chinensis*. El método de extracción fue por hidrolisis enzimática, logrando un mayor rendimiento y biotransformación de los metabolitos. Estas fracciones metabólicas, fueron caracterizadas y evaluadas *in vitro* contra la ECA. Los resultados reflejaron el alto contenido antioxidante de los fenólicos, además de una inhibición significativamente alta de la ECA. Estos resultados sugieren que los extractos fenólicos obtenidos por la extracción enzimática, pueden ser una alternativa prometedora en el desarrollo de alimentos funcionales y en la producción de fármacos de origen natural, que ayuden a disminuir los niveles de hipertensión en el organismo.

2. JUSTIFICACIÓN / PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Históricamente la investigación científica ha buscado alternativas que ayuden a enfrentar las enfermedades crónico-degenerativas como la hipertensión arterial y los problemas de inflamación en las vías respiratorias. Utilizando en su mayoría fármacos de origen sintético y en menor medida alternativas de origen natural. Uno de estos métodos naturales es el uso de los compuestos fenólicos del cirrián, el cual, a pesar de su gran uso en la medicina tradicional, carece de investigaciones científicas sobre su acción biológica en el organismo humano. Por tal motivo, en la presente investigación se estudió la composición de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y su probable actividad biológica relacionada con la inhibición *in vitro* de las enzimas fosfodiesterasa y ECA asociadas con enfermedades hipertensivas.

3. HIPÓTESIS

El fruto de cirián tiene alta actividad antioxidante y compuestos fenólicos, particularmente ácidos fenólicos con capacidad de inhibir parcialmente la actividad de las enzimas fosfodiesterasa y convertidora de angiotensina, asociadas con enfermedades hipertensivas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales y perfil de ácidos fenólicos de frutos de cirián, y evaluar su capacidad de inhibitoria *in vitro* de las enzimas fosfodiesterasa y convertidora de angiotensina.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos provenientes del fruto de cirián.
- Evaluar su capacidad antioxidante *in vitro*.
- Identificar y cuantificar el contenido de ácidos fenólicos en el fruto de cirián.
- Evaluar su capacidad inhibitoria *in vitro* sobre la actividad de las enzimas fosfodiesterasa y convertidora de angiotensina.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL SISTÉMICA

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es un trastorno grave que incrementa de manera significativa el riesgo de padecer un gran número de enfermedades cardiovasculares, principalmente en las personas adultas (Palomo-Piñón *et al.*, 2022). Según la organización mundial de la salud (OMS), la Ha se define como la tensión que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias, que son grandes vasos por los que circula la sangre en el organismo (WHO, 2022). Se considera HA cuando una persona presenta cifras de presión arterial sistólica ≥ 140 mm Hg o presión arterial diastólica ≥ 90 mm Hg. En la Tabla 1 se reportan los valores de presión arterial tanto normales como elevados de acuerdo a la sociedad europea de cardiología (ESC) y a la sociedad europea de hipertensión (ESH) (Jordan *et al.*, 2018).

Tabla 1. Categorías de la presión arterial para adultos mayores de 18 años de acuerdo a la ESC y ESH.

Categoría	Niveles de presión arterial sistólica (mm Hg)	Niveles de presión arterial diastólica (mm Hg)
Optima	< 120	< 80
Normal	120 - 129	< 80
Pre – Hipertensión	130 - 139	80 – 89
Hipertensión (Grado I)	140 -159	90 – 99
Hipertensión (Grado II)	160 - 179	100 – 109
Hipertensión (Grado III)	≥ 180	≥ 110

Durante las últimas décadas la HA continúa siendo un problema de salud pública en todo el mundo, ya que se ha estimado que aproximadamente 626 a 652 millones de mujeres y hombres, respectivamente, padecen esta enfermedad. En México, de acuerdo a la última encuesta nacional de salud y nutrición, se estima que el 30% de la población adulta son hipertensos (Palomo-Piñón *et al.*, 2022). El estrés oxidativo se ha establecido como el

principal factor en el desarrollo de una amplia gama de enfermedades cardiovasculares, incluida la hipertensión arterial (Siti *et al.*, 2015).

5.1.1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA (SRAA)

Uno de los mecanismos de regulación de la presión arterial, es el sistema renina-angiotensina-aldosterona, relacionado con la hemodinámica y la homeostasis de agua y electrolitos, produciendo vasoconstricción, elevación del ritmo cardiaco y retención de agua y sodio. Este sistema se lleva a cabo de manera normal en personas sanas y de manera acelerada en personas hipertensas (Contra *et al.*, 2008; Manrique *et al.*, 2009).

En la Figura 1 se muestra el funcionamiento del SRAA, iniciando con la biosíntesis de la renina proveniente de las células yuxtaglomerulares de la nefrona, producida por una detección de hipotensión arterial. Ejerciendo su acción proteolítica sobre el angiotensinógeno (sintetizado en el hígado) para formar la angiotensina I (forma biológicamente inactiva) (Manrique *et al.*, 2009). Posteriormente, este decapeptido inactivo cumple la función como sustrato de la ECA para formar la angiotensina II (forma biológicamente activa), el cual es un potente vasoconstrictor que produce un incremento en la presión arterial sistólica y diastólica. Una excesiva producción de esta forma activa, puede resultar en una serie de contracciones aceleradas y relajación limitada en el sistema cardiovascular, lo cual genera una elevada presión arterial (hipertensión). Los lugares anatómicos donde se realiza esta conversión son las células endoteliales y epiteliales encontradas en el corazón, riñón, vasos sanguíneos y pulmón, así como en el plasma (Udenigwe *et al.*, 2012).

La angiotensina II producto de la conversión anterior se transporta en el torrente sanguíneo y activa la corteza adrenal para secretar aldosterona y otros mineralocorticoides que actúan sobre los riñones. Este efecto metabólico provoca el incremento de potasio, retención de sales y agua, y elevando la presión arterial (Te Riet *et al.*, 2015).

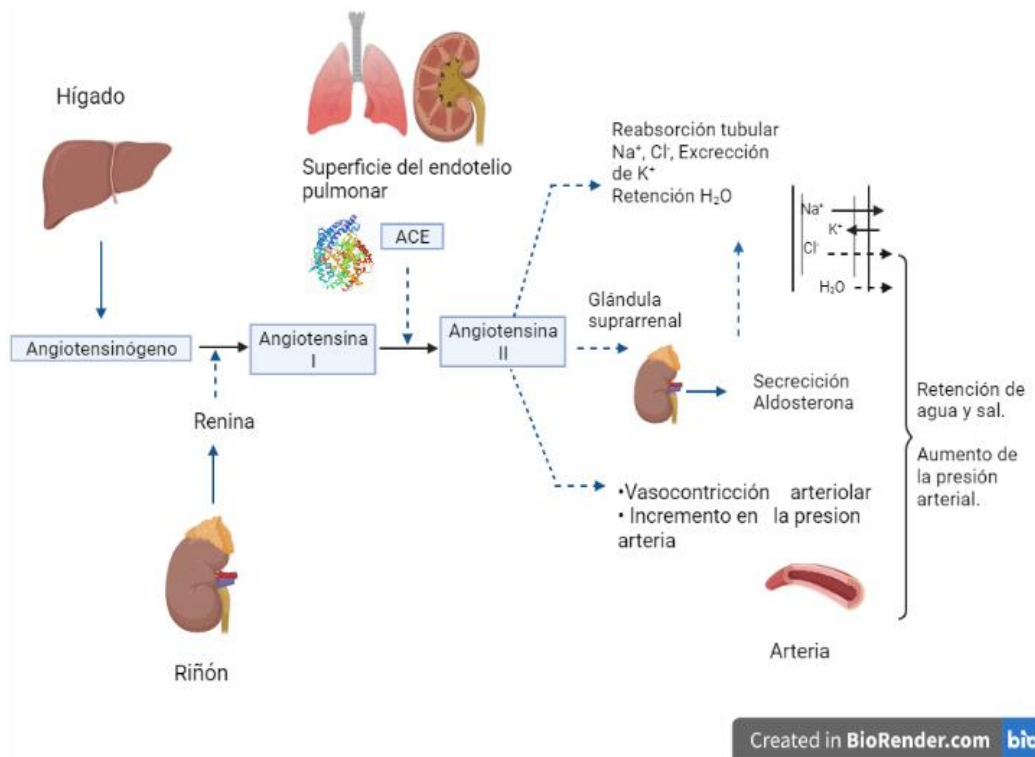


Figura 1. Funcionamiento del SRAA en la regulación de la presión arterial.
Elaboración propia.

Con base a lo anterior, el SRAA es considerado como un punto clave en la regulación de la presión arterial, y, durante los últimos años la mayoría de las investigaciones dirigidas al tratamiento de la hipertensión están basados en este sistema enzimático y en especial sobre la actividad de la ECA, siendo esta el principal componente (Ferrario & Mullick, 2017).

5.1.2. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA)

La ECA (EC 3.4.15.1), también llamada dipeptidil carboxipeptidasa, es una metalopeptidasa de zinc encargada de escindir el dipéptido His-Leu terminal de la angiotensina I para producir un potente vasopresor, la angiotensina II. La ECA humana cuenta con dos dominios funcionales N y C, cada uno con un sitio activo con uniones de iones de zinc (Figura 2) (Aydin *et al.*, 2021; Natesh *et al.*, 2003).

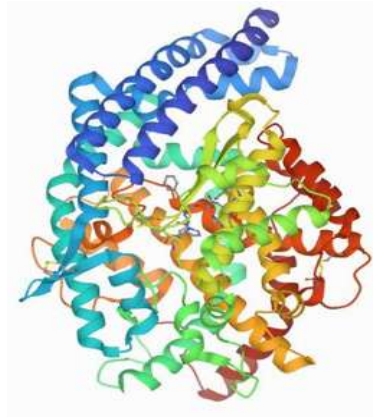


Figura 2. Estructura tridimensional de la enzima convertidora de angiotensina. Obtenida de PROTEIN DATA BANK.

La ECA utiliza varios sustratos como la angiotensina I, la bradiquinina, además del impórtate péptido hemoregulador, Acetyl-Ser-Asp-LysPro, siendo este último un sustrato específico del sitio activo N de la ECA humana (Aydin *et al.*, 2021; Rousseau *et al.*, 1995).

La ECA es una proteína de membrana de alto peso molecular situada en la superficie del sistema endomembranoso de la membrana celular. Existen dos formas de ECA: la forma somática, misma que abunda en la superficie endotelial de los vasos pulmonares, y una forma germinal más pequeña que se encuentra en los testículos (Santeliz *et al.*, 2008).

5.1.3. CONTROL Y PREVENCION DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Durante las últimas dos décadas los conceptos de hipertensión controlada han variado significativamente. Actualmente se acepta que un paciente hipertenso tiene control de la HA, cuando presenta cifras de presión arterial menores de 140 mm Hg de presión arterial sistólica y menos de 90 mm Hg de presión diastólica (Pérez Caballero *et al.*, 2011). Por este motivo, se utilizan tratamientos farmacológicos y no farmacológicos que ayuden a regular los niveles de presión arterial (Oksuz, 2005).

5.1.4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

La farmacoterapia antihipertensiva ha evolucionado durante las últimas décadas gracias al desarrollo de varias clases de medicamentos y ensayos que demuestran sus beneficios en la

morbilidad y mortalidad de las enfermedades cardiovasculares (Oparil *et al.*, 2018). Actualmente, los médicos se enfrentan a una abundancia excesiva de medicamentos antihipertensivos de diferentes clases y una variedad de combinaciones de dosis. Por lo general, estos tratamientos comienzan con medicamentos antihipertensivos de primera línea, ya sea en una sola dosis o en combinación (Garjón *et al.*, 2017). Los medicamentos antihipertensivos de primera línea incluyen inhibidores de la ECA, bloqueadores de los receptores de angiotensina II (también conocidos como sartanes), bloqueadores de los canales de calcio y diuréticos tiazídicos (Oparil *et al.*, 2018).

Sin embargo, algunos antihipertensivos de primera línea, como los inhibidores de la ECA y los bloqueadores de los receptores de angiotensina II, están contraindicados debido a la generación de efectos secundarios como tos seca, hipotensión y alto riesgo de insuficiencia renal (Iskedjian *et al.*, 2002).

5.1.5. INHIBIDORES FARMACOLOGICOS DE LA ECA

Los inhibidores de la ECA (IECA) juegan un papel vital en el SRAA al regular la producción del potente vasoconstrictor angiotensina II y mantener los niveles normales de presión arterial. Todos los IECA son análogos de 2-metilpropionil-L-prolina, pero se diferencian por sus estructuras químicas. Estos inhibidores ejercen su efecto sobre la ECA al formar un ligando de zinc tal como se esquematiza en la Figura 3. El grupo funcional que se une a la ECA a través del zinc es la principal diferencia estructural de estos agentes farmacológicos (Piepho, 2000).

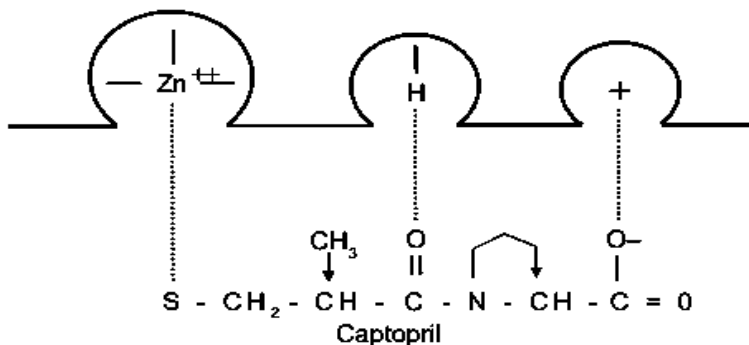


Figura 3. Sitio activo de unión de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con el IECA captopril.

La mayoría de los IECA (benazepril, enalapril, perindopril y lisinopril), tienen en su estructura química un grupo carboxilo. Mientras que el captopril es el único inhibidor de la ECA que cuenta con un grupo sulfhidrilo en su estructura química (Figura 4) (Laurent, 2017; Piepho, 2000). Asimismo, todos los inhibidores excepto el captopril y lisinopril, son esteres de profármacos y deben ser sometidos a una biotransformación hepática (hidrolisis del éster) para convertirse en la forma activa. Una característica importante de los IECA es su afinidad de unión por la ECA tisular, que depende de su unión a tejidos, potencia y lipofilia. Por esa razón, cuanto mayor sea la lipofilia de un agente farmacológico, mayor será su penetración en las membranas celulares (Laurent, 2017).

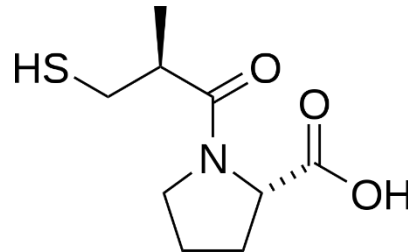


Figura 4. Estructura química del captopril.

Por su parte, la potencia de los inhibidores de la ECA generalmente se determina midiendo la concentración del fármaco que ocasiona el 50% (IC_{50}) de la inhibición de la actividad de la enzima plasmática. La alta potencia de inhibición de estos medicamentos permite su uso a dosis muy bajas, lo que minimiza a largo plazo su toxicidad (Laurent, 2017).

5.1.6. TRATAMIENTOS NO FARMACOLÓGICOS

Se ha demostrado que una variedad de intervenciones no farmacológicas es eficaz para reducir la presión arterial y prevenir la hipertensión. Las intervenciones más efectivas son la pérdida de peso, reducción de la ingesta de Na^+ , dieta balanceada, aumento de la ingesta de potasio y de la actividad física y reducción en consumo de alcohol (Oparil *et al.*, 2018).

Por consiguiente, una dieta equilibrada que contenga los principales nutrientes y en las cantidades necesarias, es un punto clave para mantener una buena salud física. Por esa

razón, en los últimos años se han reportado una gran diversidad de compuestos nutraceuticos que presentan un efecto antihipertensivo en el organismo humano (Borghi & Cicero, 2017).

5.1.7. COMPUESTOS BIOACTIVOS INHIBIDORES DE LA ECA

Se han reportado metabolitos vegetales que actúan como inhibidores de la ECA y cuentan con diferentes estructuras químicas, como son los terpenos, péptidos y compuestos fenólicos (Gao *et al.*, 2022; Reddy *et al.*, 2022; Cañetas *et al.*, 2015).

En estudios recientes, el grupo de los compuestos fenólicos aislados de diferentes plantas han tenido un especial interés debido a su actividad IECA. Este efecto ha sido atribuido a su capacidad antioxidante y a las interacciones entre los grupos hidroxilo con los iones de zinc del sitio activo de la ACE (Ojeda *et al.*, 2010; Actis-Goretta *et al.*, 2006).

Dentro de los compuestos fenólicos de los que se ha reportado una elevada actividad IECA se encuentran algunos ácidos fenólicos como: ácido gálico, vainílico, siríngico, ferúlico y cafeico, además de otros polifenoles como catecol y pirogalol. Estos últimos inhiben la ECA mediante interacciones con los aminoácidos en el sitio activo de la enzima (Al Shukor *et al.*, 2013).

5.2. HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es otro trastorno considerable de padecer alguna enfermedad cardiovascular. Se define como una presión arterial pulmonar media en reposo (PAPm) de 25 mm Hg o superior. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la HAP en cinco grupos: grupo 1: hipertensión pulmonar debida a enfermedad vascular pulmonar; grupo 2: hipertensión pulmonar debida a enfermedad del corazón; grupo 3: hipertensión pulmonar debida hipoxia; grupo 4: hipertensión pulmonar debida a enfermedad tromboembólica crónica; y el grupo 5: causado por trastornos como anemias hemolíticas (Mayeux *et al.*, 2021; Thenappan *et al.*, 2018).

La HAP no es infrecuente, por el contrario, probablemente afecta a alrededor del 1 % de la población mundial. En personas mayores de 65 años, se estima que la prevalencia de hipertensión pulmonar es de alrededor del 10%. Sin embargo, las diversas formas de

hipertensión pulmonar difieren considerablemente en el número de casos (Hoepfer *et al.*, 2017).

La fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar se caracteriza por fenómenos de vasoconstricción, trombosis e hiperproliferación celular ocasionados por un estado de disfunción endotelial vascular aparecido al inicio de la enfermedad. Este problema de la unidad cardiopulmonar, afecta a la circulación arterial y venosa pulmonar, así como al ventrículo derecho. La vasoconstricción de esta patología está asociada con el desequilibrio entre factores vasodilatadores derivados del endotelio (óxido nítrico, prostaciclina) y los vasoconstrictores (endotelial-1, tromboxano) ocasionado por el endotelio vascular disfuncional (Thenappan *et al.*, 2018; Beltrán-Gámez *et al.*, 2015).

La disfunción endotelial es promovida por estimulantes como la hipoxia, la acidosis, los radicales libres (ROS/RNS), los mediadores inflamatorios y la presión arterial alta provocada por un aumento en el flujo sanguíneo. La disfunción endotelial y la remodelación vascular son dos procesos importantes que explican el desarrollo de la HAP. El abordaje terapéutico de esta condición ha progresado rápidamente en los últimos años, sin embargo, aún no se cuenta con un tratamiento ideal para esta serie de patologías inflamatorias (Benavides-Luna. 2017).

En su fisiopatología, se ha señalado entre otros mecanismos, una disminución del óxido nítrico a causa de la oxidación por los radicales libres y un aumento en la expresión y actividad de la enzima fosfodiesterasa-5 (PDE-5) (Beltrán-Gámez *et al.*, 2015).

5.2.1. LAS ENZIMAS FOSFODIESTERASAS EN LA HAP

La enzima fosfodiesterasa es un blanco terapéutico muy importante relacionado en una de las vías patogénicas de la HAP. En este mecanismo de regulación actúa principalmente el óxido nítrico como un potente vasodilatador pulmonar que activa la enzima guanilato ciclasa para generar el cGMP, provocando una relajación celular del musculo liso de la arteria pulmonar. Sin embargo, los pacientes con HAP cuentan con una expresión pulmonar reducida de la óxido nítrico sintasa endotelial misma que sintetiza el óxido nítrico, así como el aumento en la expresión y actividad de la enzima fosfodiesterasa que degrada el cGMP. La disminución de este monofosfato cíclico, está implicada en la disminución vascular

y vasodilatación pulmonar (Thenappan *et al.*, 2018). Es por esto que la inhibición de la enzima fosfodiesterasa, se ha convertido en parte del armamento terapéutico contemporáneo para tratar la hipertensión arterial pulmonar (Van Duin *et al.*, 2017).

5.2.2. ENZIMAS FOSFODIESTERASAS

Las enzimas fosfodiesterasas (PDE, por sus siglas en inglés) son una superfamilia de enzimas compuesta de 11 isoenzimas (PDE-1 a PDE-11) que inactivan al adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y guanosin monofosfato cíclico (cGMP), los segundos mensajeros de la prostaciclina y del óxido nítrico, respectivamente. Las fosfodiesterasas tienen diferente afinidad de sustrato y distribución tisular. Dentro de estas 11 isoformas, las fosfodiesterasas 4, 7 y 8 hidrolizan selectivamente el cAMP; las formas 5, 6 y 9 son enzimas selectivas de cGMP y mientras que el resto (1,2,3,10 y 11) presentan afinidad por ambos nucleótidos (Figura 5) (Beltrán-Gómez *et al.*, 2015; Francis *et al.*, 2001).

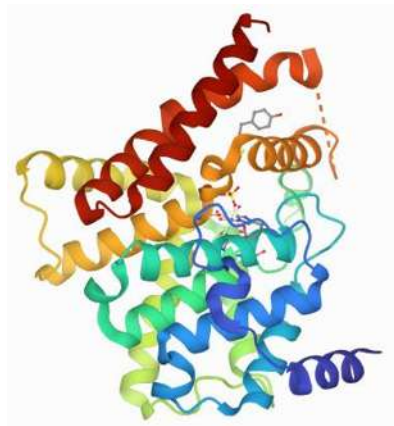


Figura 5. Ejemplo de la estructura tridimensional de la enzima fosfodiesterasa (PDE-5). Obtenida de PROTEIN DATA BANK.

Las familias de PDEs comparten la misma estructura general (Figura 6). Todas ellas presentan un dominio catalítico relativamente conservado próximo al extremo C-terminal de la proteína, mientras que el dominio o región N-terminal presenta mayor diversidad estructural. La combinación de estos dominios estructurales, les otorga la especificidad a los diferentes sustratos (Brandon & West, 2014; Lee *et al.*, 2002).

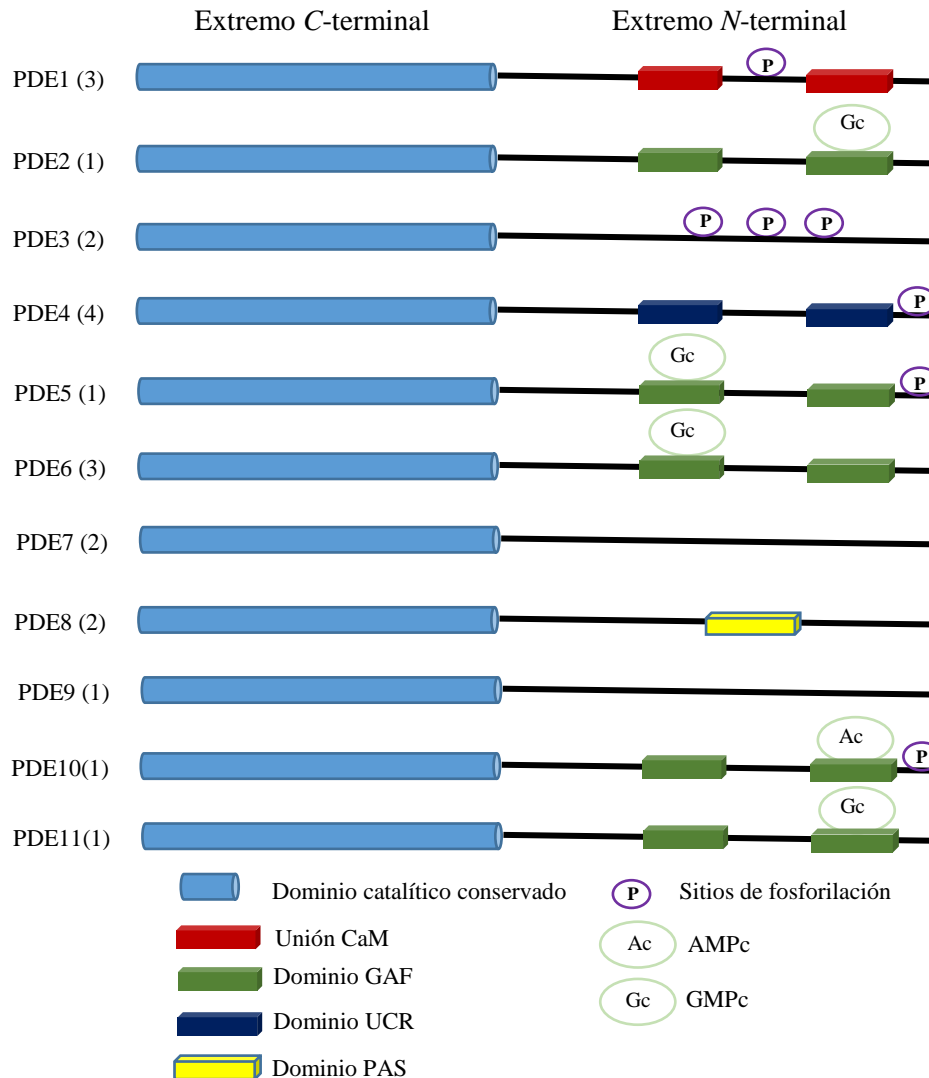


Figura 6. Estructura general de las enzimas fosfodiesterasas (el número de isoformas de cada PDE se indica en el paréntesis). Adaptado de Brandon & West, (2014).

Diversas investigaciones se han enfocado en estudiar el mecanismo de reconocimiento de los sustratos en cada una de las isoformas enzimáticas. Aunque hasta el momento sigue siendo desconocida la razón exacta de la afinidad de los sustratos AMPc y cGMP en gran parte de las isoformas. Con base en las estructuras cristalinas de los complejos de PDE4 y PDE5 con sus productos de hidrólisis AMP y GMP, respectivamente, un grupo de investigadores propusieron un mecanismo conocido como *glutamine switch*. En el cual, el grupo amino de la glutamina puede mantener una rotación de 180° de acuerdo al nucleótido que se una, permitiendo así explicar dicha selectividad (Zhang *et al.*, 2004).

Por su parte, el dominio central catalítico de las PDEs es una región formada por alrededor de 300 aminoácidos plegados formando 14 α – hélices, siendo la hélice 3 el comienzo del centro catalítico de todas las isoformas de las PDEs. En este sitio activo contienen dos iones metálicos divalentes: zinc y magnesio, mismos que ayudan en la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster (Ke & Wang, 2007).

5.2.3. TRATAMIENTOS PARA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR

En los últimos años se han probado diferentes terapias para el control de la HAP, teniendo una mejoría en la tasa de supervivencia del 84%. Los objetivos de las terapias son lograr un estado asociado con una buena calidad de vida bajando el riesgo de mortalidad y manteniendo la buena función del ventrículo derecho. La disfunción endotelial de las arterias pulmonares en la HAP del grupo 1 permite el uso de tratamientos específicos que promueven la vasorrelajación y la supresión de la proliferación celular en la pared de la arteria pulmonar. Dentro de estos tratamientos se incluye el óxido nítrico, los inhibidores de la enzima fosfodiesterasa particularmente la PDE-5 y los bloqueadores de canales de calcio (McLaughlin *et al.*, 2009).

Sin embargo, el uso de estas terapias puede ser contraproducente y ocasionar efectos negativos en la salud de los pacientes. Un claro ejemplo de este daño se lleva a cabo cuando los altos niveles de óxido nítrico inhalado provocan estrés oxidativo, daño tisular, daño por reperfusión y una reacción inflamatoria pulmonar (Barnes *et al.*, 2019).

5.2.4. INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA

Los estudios sobre las PDEs destacan su importancia como reguladores esenciales en las concentraciones de nucleótidos cíclicos intracelulares. Es por ello la importancia de regular esta enzima con el uso de inhibidores. Los primeros ensayos farmacológicos relacionados con las fosfodiesterasas se hicieron con los derivados de la xantina, incluida la teofilina y la cafeína. Estos broncodilatadores (tratamiento de asma), diuréticos y agentes inotrópicos, se les considero como inhibidores no selectivos de las fosfodiesterasas. Sin embargo, su relación

riesgo – beneficio desfavorable y sus perfiles de efectos secundarios impidieron considerablemente su éxito terapéutico (Maurice *et al.*, 2014; Woodcock & Chan, 2019).

En la actualidad existen pocos inhibidores de la PDE que cuentan con uso clínico generalizado. La Tabla 2 muestra algunos inhibidores que se han logrado posicionar en el mercado para el tratamiento de diferentes enfermedades.

Tabla 2. Inhibidores selectivos de las fosfodiesterasas.

Inhibidor selectivo	Fosfodiesterasa	Posibles aplicaciones terapéuticas
Oxidol	PDE 2	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia cardiaca • Trombosis • Inflamación
Cilostamida Milrinona	PDE 3	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia cardiaca • Hipertensión • Trombosis
Rolipram Cilomilast Roflumilast Apremilast	PDE 4	<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación • Alzheimer • Parkinson • Inflamación pulmonar • Asma • EPOC
Sildenafil Vardenafil Tadalafil Avanadilo	PDE 5	<ul style="list-style-type: none"> • EPOC • Insuficiencia cardiaca • Disfunción eréctil • Hipertensión arterial pulmonar

Durante la década de 1980, la PDE3 y PDE4 fueron los principales objetivos terapéuticos al descubrir que los inhibidores de la PDE3 exhiben actividades cardiotónicas, inotrópicas, broncodilatadoras y vasodilatadoras. Y los inhibidores de la PDE4 presentaron actividades antidepressivas y antiinflamatorias, siendo usados para tratar la enfermedad obstructiva crónica Pulmonar (EPOC) y el asma (Rabe, 2011). Desafortunadamente las esperanzas que surgieron de los estudios preclínicos no se cumplieron por completo en los ensayos clínicos, por lo que fueron desaprobados debido a su baja eficacia y efectos secundarios intolerables (Maurice *et al.*, 2014).

Sin embargo, en los últimos años se han encontrado inhibidores favorables y prometedores para su uso en diversas enfermedades. Tal es el caso de los inhibidores de la

PDE5 usados en el tratamiento de la disfunción eréctil y, más recientemente en la HAP. Estos logros farmacológicos se deben en gran parte al estudio de las estructuras cristalinas de las fosfodiesterasas mediante rayos X. Se ha reportado que, en todas las familias de las PDE, el sitio activo forma una región hidrofóbica específica, así como los iones metálicos esenciales para su función catalítica. De los residuos estructurales en el sitio activo, se ha propuesto que la His160 funciona como aminoácido esencial para dicha catálisis. Además, se la presencia de otros residuos como la glutamina, que forma enlaces de hidrogeno con los sustratos e inhibidores. El análisis de estructuras cristalinas de los complejos PDE-inhibidor, sugieren que estos residuos son esenciales para la unión y orientación de los inhibidores farmacológicos (Maurice *et al.*, 2014; Card *et al.*, 2005).

El enorme éxito de estos fármacos ha sido un factor importante que ha contribuido a mantener y expandir el interés farmacéutico en las PDE como objetivos terapéuticos prometedores para muchas enfermedades (Beltrán-Gámez *et al.*, 2015; Maurice *et al.*, 2014).

5.2.5. INHIBIDORES NATURALES DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA

Las enzimas fosfodiesterasas están presentes en cada célula del cuerpo, por lo tanto, se consideran como potenciales dianas moleculares para un gran grupo de enfermedades inflamatorias. Las terapias basadas en plantas medicinales están ganando popularidad con el paso del tiempo tanto en países en vías de desarrollo, como en países desarrollados. La eficacia, seguridad y fácil disponibilidad de estas medicinas alternativas, son las principales causas de dicho aumento. Sin embargo, la población ha utilizado estos remedios terapéuticos sin ningún sustento científico. Por tal motivo, los investigadores enfocados en esta área de estudio están desarrollando nuevos métodos, para proporcionar los antecedentes científicos necesarios que ayuden en el correcto uso de los compuestos fitoquímicos (Shah *et al.*, 2020).

Los compuestos fitoquímicos como los flavonoides, polifenoles, alcaloides terpenoides y esteroides suelen ser responsables de las actividades antiinflamatorias. Estos metabolitos secundarios actúan sobre diferentes dianas implicadas es los procesos de inflamación como las enzimas fosfodiesterasas (Ribeiro *et al.*, 2018). Algunos compuestos fenólicos en los que se ha reportado una elevada actividad inhibitoria de la PDE son los ácidos; ferúlico, gálico, fumárico y clorogénico, y polifenoles como quercetina y catequina.

Las concentraciones medias inhibitorias (IC_{50}) de estos ensayos *in vitro* mostraron que, a concentraciones pequeñas los fenólicos son capaces de inhibir la PDE1 (Rauf *et al.*, 2017).

De acuerdo con los autores anteriormente citados, la inhibición de la enzima fosfodiesterasa se debe principalmente a la estrecha interacción química entre los compuestos fitoquímicos y algunos aminoácidos de la proteína. Según los estudios de acoplamiento molecular, los compuestos fitoquímicos forman un enlace de hidrogeno con algunos aminoácidos como: Tyr 300, Phe 186 y Tyr 269, estos últimos encontrados en el sitio catalítico de la enzima (Figura 7) (Shah *et al.*, 2020).

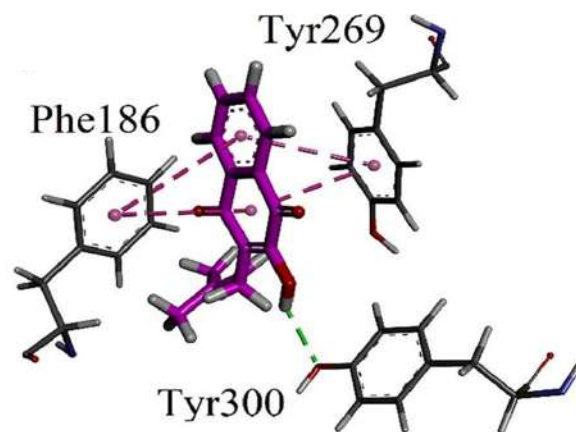


Figura 7. Ejemplo de acoplamiento molecular entre naftoquinona (aislada de *Heterophragma adenophyllum*) y la enzima fosfodiesterasa.

Cabe destacar, que la energía de unión (kcal/mol) calculada en la mayoría de estos ensayos, resultó ser mayor en los complejos fitoquímico-PDE en comparación con los reportados en los inhibidores farmacológicos. Los datos en términos de valores de energía de unión obtenidos en estos estudios de acoplamiento molecular, concuerdan con las inhibiciones (IC_{50}) experimentales encontradas en las pruebas *in vitro* (Rauf *et al.*, 2022; Shah *et al.*, 2020).

5.3. COMPUESTOS FENÓLICOS: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Existen aproximadamente más de 200,000 sustancias químicas aisladas e identificadas con diversas estructuras y funciones, provenientes de variedades vegetales. Estos compuestos se

dividen en dos grupos principales: metabolitos primarios y secundarios (Chikezie *et al.*, 2015). Los metabolitos primarios son esenciales para el mantenimiento celular, entre estos se encuentran los ácidos grasos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Mientras que los metabolitos secundarios, no participan directamente en el metabolismo fotosintético o respiratorio. Estos últimos son esenciales para la supervivencia de las plantas ayudando y desempeñando un papel importante en el mecanismo de defensa (Chikezie *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios se clasifican de acuerdo con sus rutas biosintéticas y estructura y se dividen en 3 grupos principales: 1) flavonoides, ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico) y compuestos polifenólicos; 2) terpenoides y 3) alcaloides que contienen nitrógeno y azufre en su estructura (Figura 8) (Vuolo *et al.*, 2019).

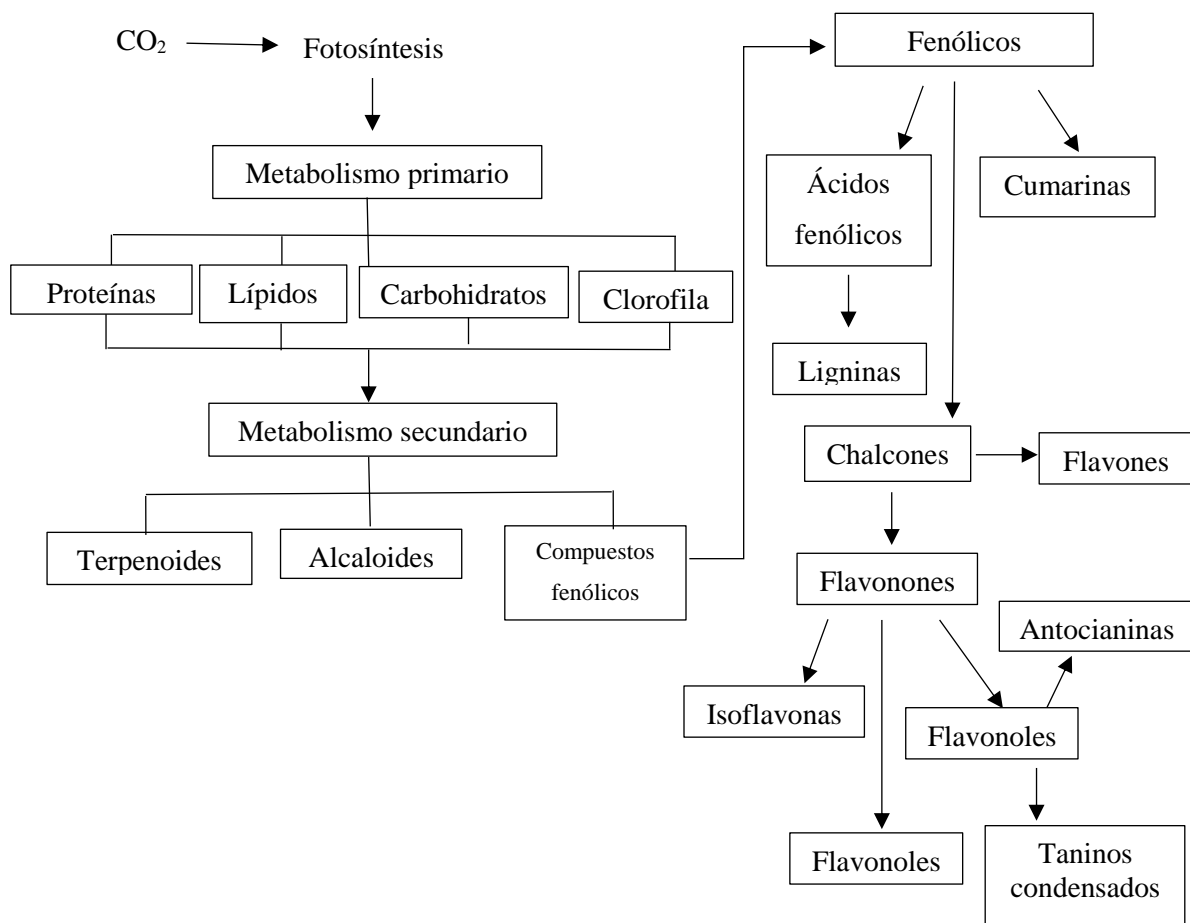


Figura 8. Vinculación del metabolismo primario y secundario en plantas. Adaptado de Vuolo *et al.*, (2019).

La estructura de los compuestos fenólicos comprende un grupo fenilo (Ph-) con uno o más constituyentes hidroxilos (-OH), si un grupo fenilo tiene más de un hidroxilo se llama polifenol (Ayala-Mata *et al.*, 2019) (Figura 9). En la naturaleza se encuentran naturalmente conjugados con mono y polisacáridos, asociados con uno o más grupos fenólicos (Vuolo *et al.*, 2019).

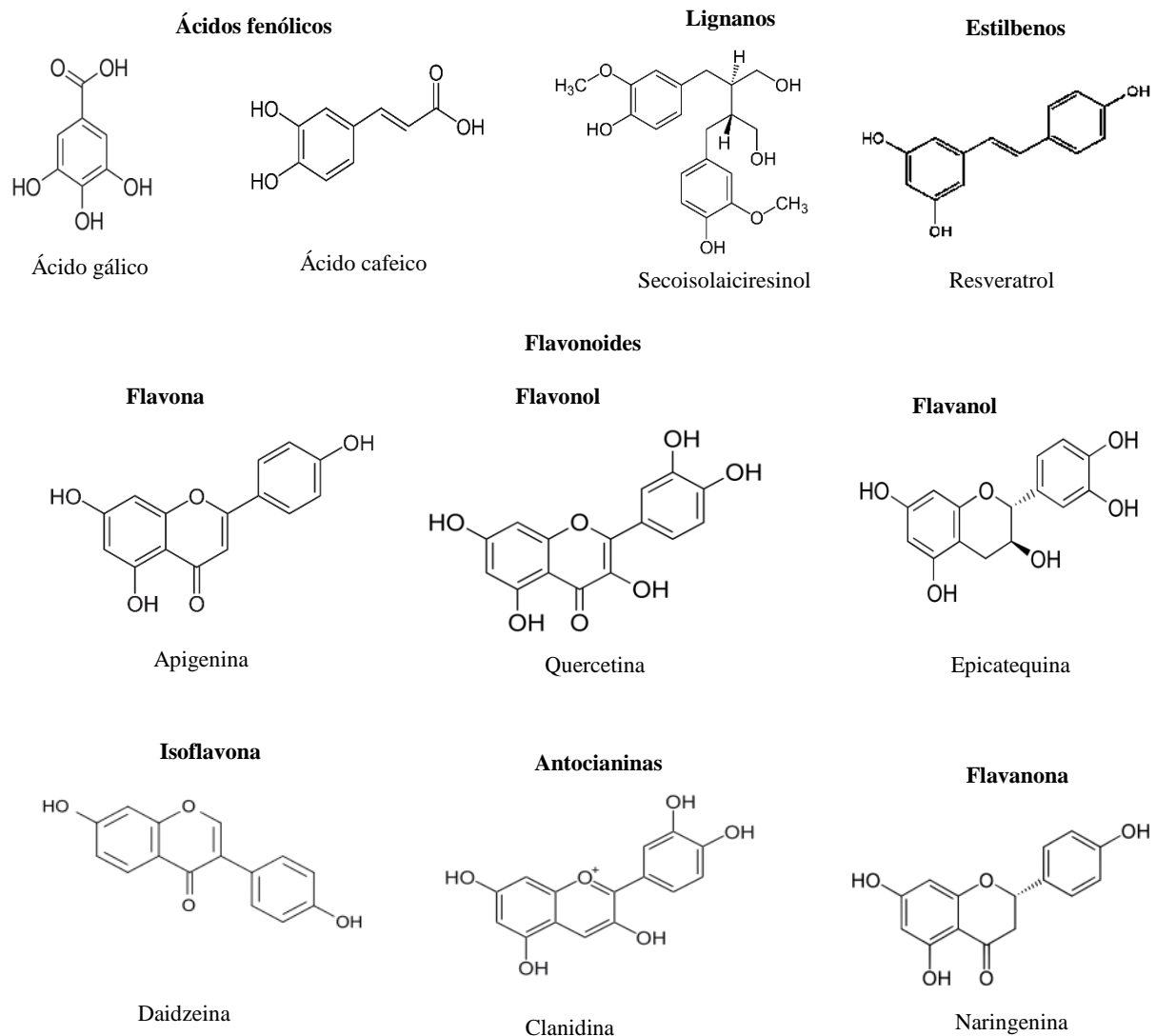


Figura 9. Ejemplificación de compuestos polifenoles según su clasificación química. Editado de Ayala-Mata *et al.*, (2019).

5.4. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos pertenecen a un grupo diversificado de fitoquímicos presente en todos los alimentos vegetales y poseen gran cantidad de beneficios a la salud como actividades antiinflamatorias, antibacterianas, anticancerígenas, antioxidantes y vasodilatadoras (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016). La evidencia de estudios epidemiológicos sugiere que los compuestos fenólicos a través de sus propiedades antioxidantes ejercen beneficios a la salud, mejorando los síntomas de las enfermedades crónicas asociadas con el daño oxidativo (Arts & Hollman, 2005).

En general, el perfil fenólico de un alimento vegetal es específico de cada especie. Sin embargo, el nivel de los compuestos de un individuo a otro puede cambiar. Esto depende de una serie de factores como el cultivo, las condiciones ambientales, prácticas poscosecha, así como de las condiciones de procesamiento y almacenamiento (Vuolo *et al.*, 2019).

5.5. QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS

El término de ácidos fenólicos generalmente describe los compuestos fenólicos que tienen en su estructura química un grupo carboxílico. Los ácidos fenólicos o también llamados fenolcarboxílicos, son una de las principales clases de compuestos fenólicos vegetales. Estos se encuentran en una gran variedad de alimentos de origen vegetal, tanto en semillas, frutos, y hojas en grandes concentraciones. De manera natural, están unidos con amidas, ésteres o glucósidos y en algunos casos en forma libre (Pereira *et al.*, 2009).

Los ácidos fenólicos se biosintetizan a partir de aminoácidos aromáticos producidos a través de la vía del shikimato. En este punto, el ácido shikímico se convierte en L-fenilalanina al reaccionar con el intermediario de ácido corismico. La L-fenilalanina posteriormente se convierte en los ácidos *p*-cumárico, salicílico y *p*-hidroxibenzoico, mismos que actúan como precursores de otros derivados de los ácidos fenólicos. Así mismo, la hidroxilación y metilación de su anillo aromático dan como resultado la biosíntesis de otros ácidos hidroxicinámicos o ácidos hidroxibenzoicos (Heleno *et al.*, 2015).

Los ácidos hidroxicinámicos derivados del ácido cinámico, se encuentran comúnmente en los alimentos como ésteres simples con ácido quínico o glucosa. Los ácidos más comunes de

este subgrupo son los ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumárico y sináptico (Figura 10). Por el contrario, los ácidos hidroxibenzoicos poseen una estructura común de C₆ – C₁ y derivan del ácido benzoico. Estos se encuentran en forma soluble, conjugados ya sea con azúcares o ácidos orgánicos y unidos a las fracciones de la pared celular como la lignina (Khoddami *et al.*, 2013). Sin embargo, en comparación con los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos generalmente se encuentran en bajas concentraciones en la mayoría de los frutos rojos y en algunas variedades de vegetales. Por consiguiente, los cuatro ácidos hidroxibenzoicos más comunes son los ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico y siríngico (Figura 11) (Kumar & Goel, 2019; Chandrasekara, 2018). En ambos subgrupos de ácidos fenólicos, los grupos hidroxilo y otros grupos funcionales unidos al anillo aromático determinan las propiedades bioactivas y la eficacia contra el tratamiento y prevención de un gran número de enfermedades (Valanciene *et al.*, 2020).

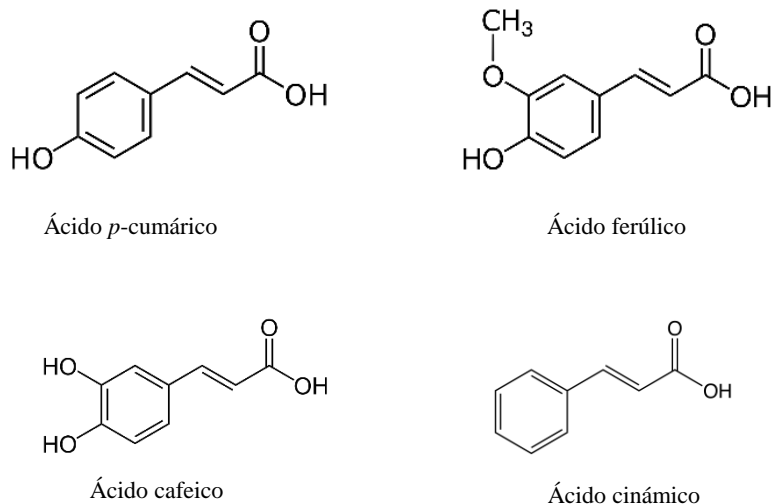


Figura 10. Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos.

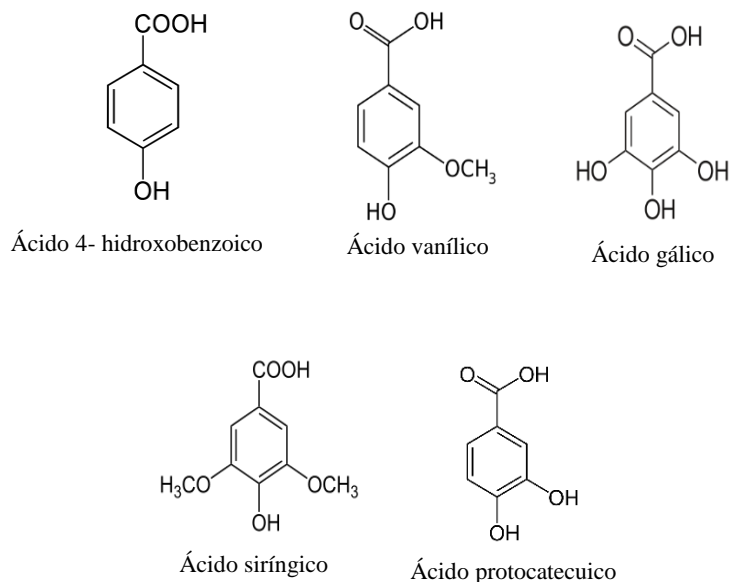


Figura 11. Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos.

5.6. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

5.6.1. TECNICAS DE EXTRACCIÓN

La extracción es el tratamiento con disolventes selectivos sobre el tejido vegetal para disolver los constituyentes fitoquímicos activos, mientras que la mayor parte de la materia permanece sin disolverse. Los procesos de extracción de los compuestos bioactivos, es el primer paso de análisis de las plantas y frutos medicinales, así como desempeñar un papel crucial en su posterior separación y caracterización. Actualmente, se dispone de una amplia gama de técnicas de extracción tanto convencionales y modernas (Figura 12) (Manousi *et al.*, 2019).

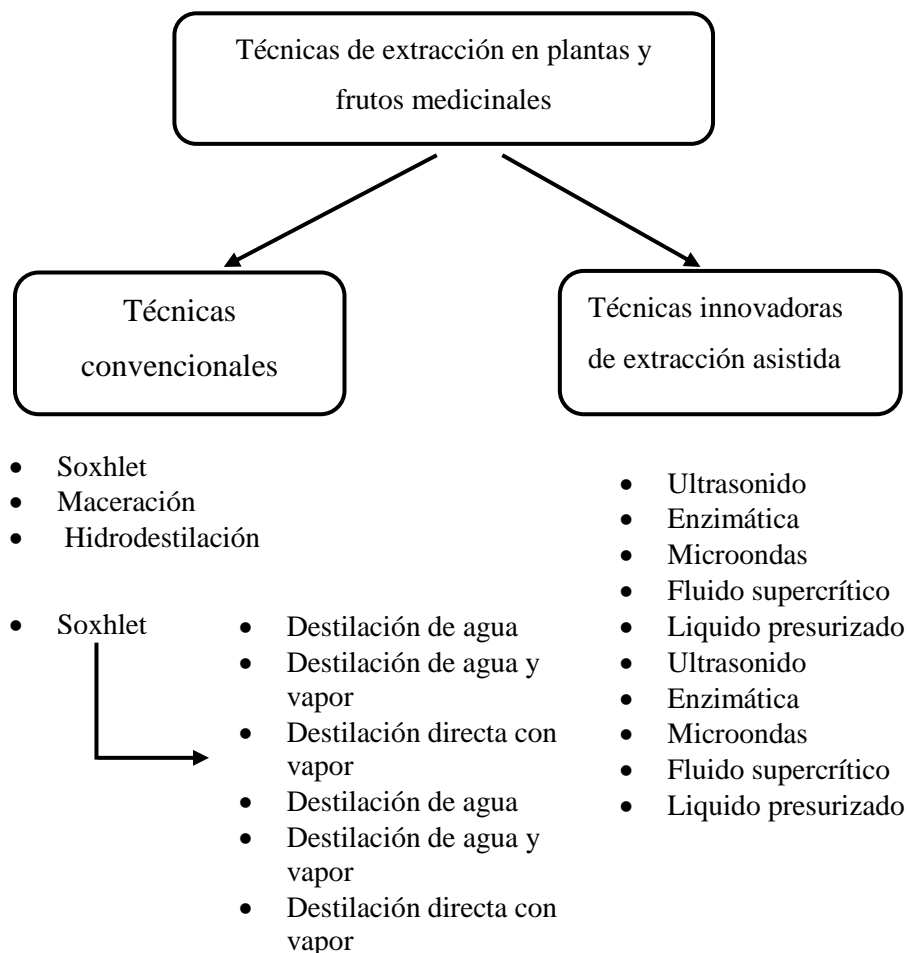


Figura 12. Procedimientos de extracción de compuestos fitoquímicos en plantas y frutos medicinales. Adaptado de (Manousi *et al.*, 2019).

Para llevar a cabo dichos métodos de extracción, es importante tomar en cuenta algunos parámetros fisicoquímicos como la naturaleza del metabolito bioactivo, características químicas del disolvente, concentración del producto y estabilidad del fitoquímico. En términos generales, entre los procedimientos convencionales de extracción, la maceración es uno de los más utilizados por su fácil accesibilidad (Manousi *et al.*, 2019).

En el caso de los compuestos fenólicos, estos se pueden obtener a partir de las plantas y frutos, aplicando enfoques clásicos, como la maceración, hidrodestilación y extracción Soxhlet o también conocida como extracción con agua caliente. Estos procesos de extracción se consideran como métodos convencionales y se utilizan ampliamente para extraer la amplia diversidad de compuestos fitoquímicos. Sin embargo, estas técnicas tienen algunos

inconvenientes como lo son: el tiempo de extracción significativamente alto, generación mayores gastos de insumos y contaminación en el medio ambiente. Así mismo, existe baja selectividad de extracción y descomposición térmica utilizando tiempos prolongados y altas temperaturas (Costa *et al.*, 2015).

Para solucionar estos problemas, durante los últimos años han surgido nuevas alternativas de extracción. Logrando disminuir el impacto negativo hacia el medio ambiente debido al menor uso de disolventes y otros compuestos químicos. De igual manera, los tiempos de operación han sido significativamente menores en comparación con los métodos convencionales, obteniendo además un mayor rendimiento y calidad de los extractos fitoquímicos (Manousi *et al.*, 2019).

5.6.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En el mayor de los casos los extractos fitoquímicos obtenidos, se pueden encontrar combinados con otros tipos de compuestos bioactivos. Por lo que es necesario, separarlos y concentrarlos para su identificación y cuantificación. Una de las técnicas utilizadas para la cuantificación de fenoles como fracción total, es mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999; Tranquilino-Rodríguez *et al.*, 2020).

En los procesos de separación, existen dos categorías principales de técnicas. En primer lugar, se encuentran los ensayos cromatográficos como la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), la cromatografía en columna, cromatografía ultrarrápida, cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) y la cromatografía líquida de alta precisión con detector de arreglo de diodos o espectrofotometría de masas (HPLC-DAD, LC-MS, por sus siglas en inglés). Mientras que, en segundo lugar, se encuentran las técnicas no cromatográficas como el inmunoensayo, que utiliza anticuerpos monoclonales (Mab), ensayo de cribado fitoquímico y espectrofotometría infrarroja. Todas estas técnicas analíticas actualmente son muy utilizadas para aislar y mejorar la identificación de los miles de compuestos bioactivos encontrados en la naturaleza (Sasidharan *et al.*, 2011).

Entre las técnicas cromatográficas TLC (cromatografía en capa fina) y HPLC son los métodos más utilizados en el análisis fitoquímico. La TLC es una técnica sencilla, rápida y económica que se puede utilizar para conocer un análisis cualitativo sobre el número de

componentes del extracto. Por su parte, la HPLC es una técnica clásica, versátil, robusta y ampliamente utilizada para el aislamiento de productos naturales, así como la identificación de sus componentes naturales. Se ha reportado que la HPLC preparativa es una de las herramientas analíticas más eficientes tanto para el aislamiento como para la purificación de compuestos más complejos (Sasidharan *et al.*, 2011). En cuanto a los detectores, los más utilizados para la identificación de los compuestos bioactivos después de la separación cromatográfica son los detectores ultravioletas, detectores de arreglo de diodos (DAD) que pueden medir la absorbancia de la muestra a diferentes longitudes de onda y los espectrómetros de masas (MS). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), es una técnica ampliamente utilizada para el aislamiento e identificación de los compuestos con mayor precisión y sensibilidad (Manousi *et al.*, 2019).

5.7. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

En la ciencia de los alimentos, el antioxidante se define como una sustancia que al encontrarse en concentraciones altas en comparación con las de un sustrato oxidable, disminuye significativamente o previene los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), sobre la función fisiológica del organismo (Karadag *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos cuentan con importantes propiedades biológicas y farmacológicas que son utilizadas por sus beneficios en salud humana y animal. Estos metabolitos secundarios, son componentes importantes de la dieta, por su potencial en la capacidad antioxidante y por disminuir el daño tisular inducido por el estrés oxidativo proveniente de las enfermedades crónicas (Harris *et al.*, 2007). Esta excelente actividad biológica de los compuestos fenólicos, se le atribuye a la capacidad donadora de electrones del grupo hidroxilo, así como a los diversos mecanismos de acción sobre los radicales libres o especies oxidantes. Algunos de los mecanismos que se han dilucidado son los siguientes (Cadenas, 1997; Rawson *et al.*, 2014):

- Previenen la iniciación de la cadena de reacciones de oxidación mediante la combinación de radicales iniciadores, tales como el anión superóxido.

- Descomponen peróxidos al convertirlos en especies no radicales o altamente reactivas.
- Actúan como secuestradores de radicales libres. Cada grupo de fenólicos cuenta con distinta especificidad por las distintas especies oxidantes o radicales libres que se producen en el organismo.
- Funcionan de manera indirecta como agentes quelantes de iones de metales de transición como el Fe^{2+} . Evitando así, la producción de radicales libres.
- Cuentan con la capacidad de inducir, inhibir y activar determinadas enzimas que regulan la producción de los radicales libres.

Según sus mecanismos de acción los antioxidantes se clasifican en primarios o rompedores de cadena y secundarios o preventivos. Los primarios son eliminadores activos de radicales libres o donantes de hidrógeno. Por lo tanto, estos detienen las reacciones en cadena de los radicales libres y evitan su iniciación o propagación. Mientras que, los antioxidantes secundarios, son los responsables de descomponer los peróxidos, inhibiendo la formación de oxidantes altamente reactivos y radicales libres (Karadag *et al.*, 2009).

Se ha reportado, que la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos que contienen grupos OH y carbonilos no unidos directamente al anillo bencénico o también denominados ácidos cinámicos, es mayor que la de los derivados hidroxibenzoicos (Rawson *et al.*, 2014).

5.8. MÉTODOS PARA EVALUAR LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES

Tras varios estudios sobre la importancia de los antioxidantes en los sistemas biológicos al contrarrestar el estrés oxidativo que causa un gran número de enfermedades, ha surgido un gran interés en cuantificar y determinar las capacidades antioxidantes de una serie de compuestos alimentarios y fitoquímicos específicos (Karadag *et al.*, 2009).

Es por esta razón, que se han desarrollado y probado muchos métodos reportados en la literatura. Sin embargo, se siguen discutiendo las ventajas y desventajas de estos ensayos, por lo que no parece haber un consenso para concluir cual es el más conveniente como análisis de referencia. Estas discrepancias se deben principalmente a diversos factores analíticos como la polaridad del antioxidante, la sensibilidad a la luz, posibles interferencias

al iniciar las reacciones, el estado físico del sustrato oxidable y el uso de diferentes estándares analíticos para expresar los resultados de la inhibición del radical (Karadag *et al.*, 2009).

La mayoría de los métodos utilizados, se basan principalmente en dos mecanismos de inactivación del antioxidante sobre la especie oxidante: 1) reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés) y 2) métodos basados en la reacción de transferencia de electrones (ET, por sus siglas en inglés). Además, es importante señalar que la energía de disociación de enlaces y el potencial de ionización son dos factores que determinan el mecanismo y la eficiencia de los compuestos antioxidantes. Los mecanismos ET y HAT, casi siempre ocurren simultáneamente en la mayoría de las muestras estudiadas, por lo que es complicado diferenciarlos (Karadag *et al.*, 2009).

Los diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante se pueden realizar ya sea *in vivo* o *in vitro*. Una de las estrategias más empleadas de los ensayos *in vitro* consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; obteniendo una pérdida de color proporcional a la concentración del antioxidante. No obstante, las determinaciones realizadas *in vitro*, ayudan a obtener resultados preliminares de lo que puede ocurrir en ensayos *in vivo* más complejos. Además, es necesario considerar que los experimentos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo, causando una mayor variabilidad en los resultados reportados (Kuskoski *et al.*, 2005).

Dentro de los diversos compuestos cromógenos, se pueden emplear: el radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, por sus siglas en inglés), dihidrocloruro de N, N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) y FRAP. Sin embargo, gracias a su gran estabilidad los métodos más utilizados son ABTS y DPPH. Este último, es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa al ensayo, mientras que el ABTS debe ser generado tras una reacción química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobina), o electroquímica (Re *et al.*, 1999; Kuskoski *et al.*, 2005). En cuanto a sus ventajas, el ABTS puede medir la actividad tanto de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (Kuskoski *et al.*, 2005).

5.9. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno, generadas del metabolismo celular. Los ROS pueden ser radicales libres o moléculas que cuentan con la capacidad de seguir produciéndose en mayores concentraciones. Estos radicales libres, consisten en átomos o moléculas que químicamente contienen uno o más electrones desapareados en su última capa orbital, lo que los hace altamente inestables y reactivos hacia otras biomoléculas (Shields *et al.*, 2021). Así mismo, los radicales libres tienen una vida muy corta y a menudo, no pueden abandonar la ubicación subcelular donde se generan sin primero reducirse. En algunos ejemplos de ROS que son radicales libres se incluyen, el anión superóxido (O_2^-), hidroxilo (HO^-), peroxilo (RO_2^-), hidroxiperoxilo (HO_2^-) y radicales alcoxilo ($RO\cdot$) (Phaniendra *et al.*, 2015). Mientras que los ROS que no son radicales libres no tienen electrones desapareados y, por lo tanto, son menos reactivos permitiéndoles abandonar la ubicación subcelular pasando a través de las membranas celulares. Los ejemplos de estos últimos ROS que no son radicales libres incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión hidroxilo (HO^-) y los peróxidos orgánicos (ROOH) (Phaniendra *et al.*, 2015).

Sin embargo, los ROS que no son radicales libres aún se pueden reducir de manera incompleta, ocasionando una producción en cadena de radicales libres. Un claro ejemplo de esto, ocurre con el peróxido de hidrogeno, ya que, si se encuentra con un ion de metal de transición, como el hierro ferroso (Fe^{2+}) o el cobre cuproso (Cu^+), se producirá la reacción de Fenton, dando como resultado la aparición del radical hidroxilo que actúa como un potente oxidante (Figura 13) (Shields *et al.*, 2021).

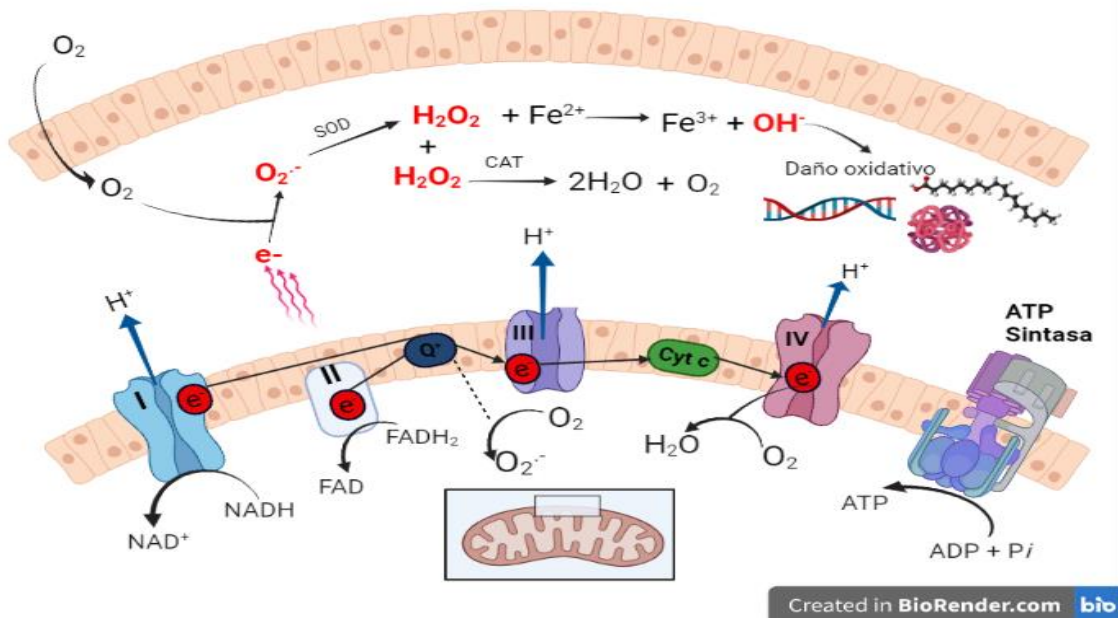


Figura 13. Sitios de generación de ROS y radicales libres en la célula. Elaboración propia adaptado de Shields *et al.*, (2021).

La respiración mitocondrial es una fuente importante de ROS dentro de la célula. Esto surge a medida que los electrones se transfieren entre los complejos de la cadena transportadora de electrones, algunos de estos electrones pueden filtrarse para reaccionar directamente con el oxígeno y formar superóxidos. La mayor parte de la fuga de electrones ocurre cuando estos pasan del complejo I o II al complejo III a través de la ubiquinona (Figura 11) (Shields *et al.*, 2021).

Es importante señalar que además de los ROS, los organismos también generan especies reactivas de nitrógeno (RNS) a partir del óxido nítrico (NO) producido de la L-arginina. Este óxido nítrico puede reaccionar con superóxido para producir peroxinitrito, mismo que puede dañar directamente los componentes celulares o reaccionar para generar otros tipos de RNS. El daño celular de los RNS es llamado daño nitrosativo y pueden funcionar como especies de señalización celular y de defensa contra patógenos (Shields *et al.*, 2021).

5.10. RADICALES LIBRES Y SU IMPLICACION EN DIVERSAS ENFERMEDADES

En los últimos años ha surgido un gran interés en la comunidad científica por estudiar el papel que desempeñan los radicales libres en la biología, debido a su mecanismo de acción en diversas condiciones fisiológicas, así como a su participación sobre una amplia gama de enfermedades (Phaniendra *et al.*, 2015). Estas patologías, se deben en gran parte al estrés oxidativo ocasionado por el desequilibrio entre los radicales libres y el sistema antioxidante endógeno. Lo que ocasiona daños en la integridad de varias biomoléculas, incluidas los lípidos, proteínas y el ADN. Entre las enfermedades comunes están las neurodegenerativas, cardiovasculares, respiratorias, diabetes mellitus, artritis reumatoide, y aceleración en el proceso de envejecimiento (Shields *et al.*, 2021).

5.11. INFLAMACIÓN PULMONAR ASOCIADO A LOS RADICALES LIBRES

El pulmón es un órgano altamente especializado que facilita la captación de oxígeno y liberación de dióxido de carbono. Debido a su estructura y función única, hace que sea altamente vulnerable a una amplia gama de patógenos, contaminantes, compuestos oxidantes, gases y sustancias tóxicas que se inhalan continuamente del aire. Provocando que el pulmón sea susceptible a diversos grados de daño oxidativo (Azad *et al.*, 2008). La inhalación de contaminantes tóxicos y microorganismos facilita la aparición de lesiones pulmonares y la generación de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS), ocasionando el inicio de una cascada de señalización que desencadena la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Emmendoerffer *et al.*, 2000). Durante el proceso de inflamación se estimula la entrada de algunas células de defensa inmunológica pulmonar, destacando los macrófagos alveolares fagocíticos, los leucocitos polimorfonucleares y los eosinófilos. Estas células desempeñan un papel muy importante en la eliminación de los patógenos o daño biológico, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno.

Sin embargo, a pesar de los efectos beneficiosos de defensa, la inhalación constante de patógenos invasores o agentes tóxicos puede provocar una producción excesiva de especies oxidantes, induciendo la inhibición de la apoptosis y daños recurrentes en el ADN.

Por lo tanto, es concebible que la producción de ROS/RNS inducida por la inflamación crónica en el pulmón predispone a las personas al cáncer de pulmón (Azad *et al.*, 2008).

5.12. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Crescentia alata*

El árbol de *Crescentia - alata* está distribuido en toda América intertropical, desde Florida hasta Brasil, pertenece a la familia *Bignoniaceae*, siendo originario de América; crece de 3 a 8 m de altura, teniendo una copa amplia e indefinida, ramas gruesas y muy flexibles. Los frutos de cirrián son de forma esférica, ovalados, y semicilíndricos con un tamaño que fluctúa entre los 3 y 40 cm de diámetro, dependiendo de la variedad (Figura 14). El pericarpio es de textura dura y su pulpa tiende a ser carnosa de color negro en el estado de maduración, además de un alto contenido de semillas (Olivares-Pérez *et al.*, 2018; Arenas, 2004).

En cuanto a su distribución en México, *C. alata* es un elemento constitutivo de selvas bajas subperennifolias y caducifolias, se encuentra en lugares secos y con temperaturas altas en los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Tabasco, Veracruz, Oaxaca y Yucatán. El uso de esta especie es reportado desde tiempos prehispánicos, siendo de gran utilidad hasta la fecha (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2018; Villaseñor, 2016; Arenas, 2004).



Figura 14. Frutos de *Crescentia alata*.

En algunas regiones del territorio nacional se ha reportado dos periodos de floración, el primero entre junio y julio (81.4%) al inicio del periodo de lluvias, y durante septiembre y

octubre (18.6%). Por lo que del mismo modo los periodos de producción de los frutos comienzan de noviembre a enero y de marzo a abril. Generalmente, el árbol del cirián inicia su producción de frutos a una edad aproximada de 5 a 6 años (Olivares-Pérez *et al.*, 2018).

5.12.1. USO MEDICINAL DE CIRIÁN

A partir del conocimiento tradicional se utilizan todos los componentes de árbol del cirián como una alternativa medicinal. El fruto es el más utilizado, seguido de la flor, la corteza y la hoja. Se utiliza principalmente para tratar enfermedades del sistema respiratorio (tos y asma) y como un agente antiinflamatorio. Además, de curar problemas estomacales, padecimientos hepáticos, insomnio, y como antídoto para mordeduras de serpientes. El modo de preparación y el uso de la planta con fines medicinales varía según la región o cultura (Tabla 3). Por lo general, en algunos lugares la pulpa de la fruta se deja reposar en alcohol para controlar varias enfermedades, mientras que en otras regiones se realizan extracciones con agua para los mismos fines medicinales (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2018; Balogun *et al.*, 2021).

Tabla 3. Usos tradicionales de *Crescentia alata* a través de diferentes regiones

Parte utilizada	Usos medicinales	País o región
Fruto (pulpa) maduro	Padecimientos respiratorios (asma).	Brasil
Hojas	Hipertensión	Trinidad y Tobago
Hojas y fruto maduro	Abscesos internos, hipertensión, enfermedades respiratorias.	México
Fruto inmaduro	Mordeduras de serpiente	Colombia.
Fruto maduro	Inflamación, diarrea e hipertensión.	Filipinas
Toda la planta	Gripe	Bolivia
Toda la planta	Resfriados, asma, parásitos intestinales.	Cuba

La elaboración de productos medicinales con los componentes del cirián son de importancia económica para las familias originarias de dichas regiones por la venta de frutos, hojas, flores, y artesanías elaboradas con las diferentes partes del árbol (Olivares-Pérez *et al.*, 2018).

5.12.2. *Crescentia alata* COMO ALTERNATIVA NATURAL CONTRA LA HIPERTENSIÓN

Según el conocimiento empírico de los pobladores de la región de tierra caliente en el estado de Michoacán, el uso del cirián es una alternativa viable ante los problemas derivados por la hipertensión y inflamación en el sistema respiratorio. La pulpa cruda es la parte de la planta mayormente usada por las personas en forma de infusiones o agregando alguna bebida alcohólica para su posterior consumo. En la literatura se documenta el uso del cirián, así como otras especies de la misma familia *Bignoniaceae* contra la hipertensión, proporcionando información básica a la comunidad científica sobre el uso de los compuestos bioactivos de este fruto. Sin embargo, se han identificado dudas en la investigación que merecen estudios futuros para conocer de mejor manera sus mecanismos de acción (Aumeeruddy *et al.*, 2020; Odukoya *et al.*, 2022).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. PLANTEAMIENTO GENERAL DE TRABAJO

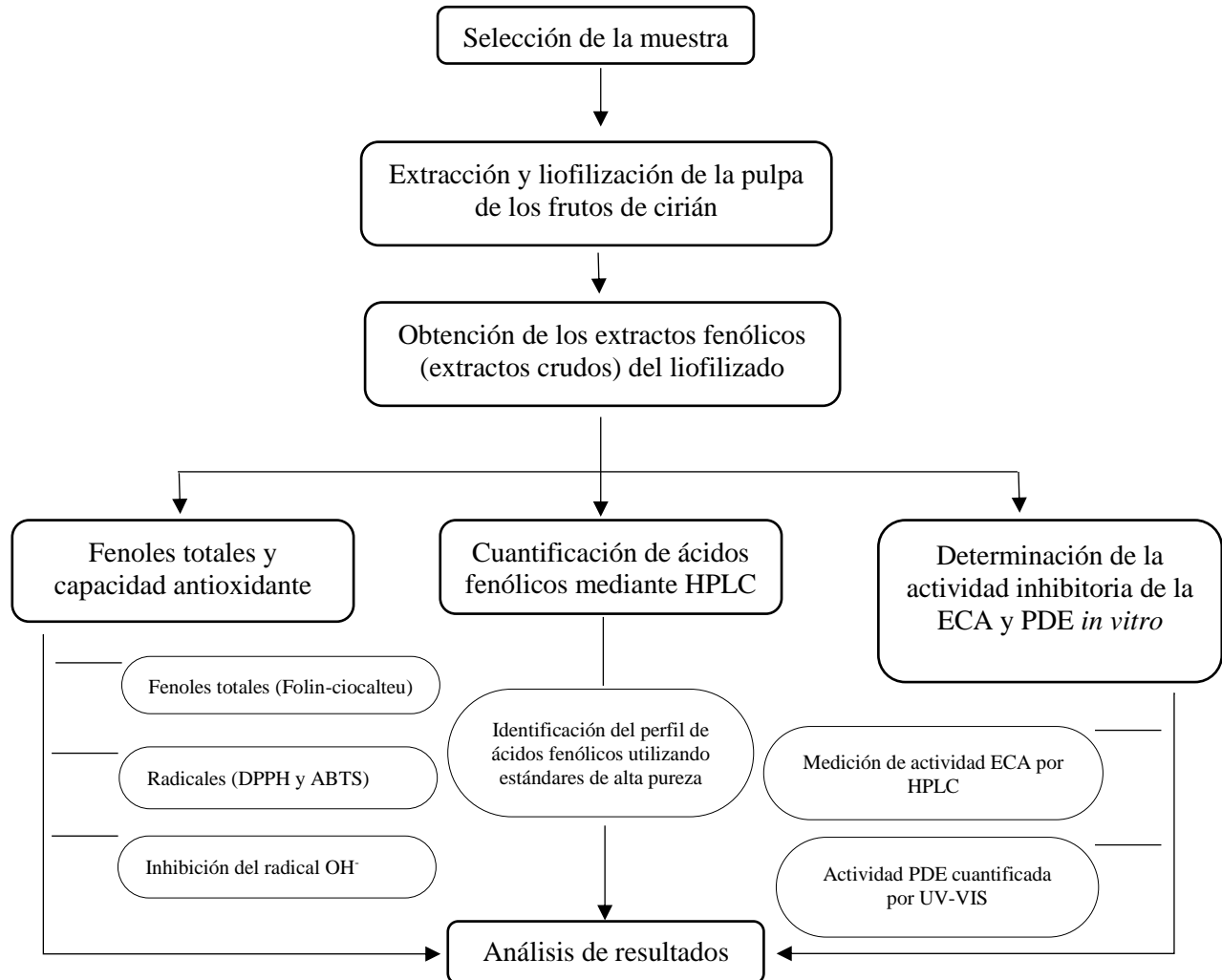


Figura 15. Esquema general de trabajo.

6.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron frutos maduros de cirrián recolectados en el municipio de Carácuaro de Morelos ubicado en la región de tierra caliente en el estado de Michoacán. La madurez se determinó de acuerdo con las recomendaciones de uso de las personas de la región, la cual coincide con una coloración marrón en el exterior y negro en el interior del fruto (Figura 16).



Figura 16. Frutos maduros de cirán.

6.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los frutos recolectados se partieron por la mitad para la separación de la pulpa y semillas. La pulpa obtenida se almacenó en condiciones de ultracongelación a -80°C durante 24 h previo a su secado. El proceso de deshidratación se realizó por liofilización, de acuerdo por el método de Hamid *et al.*, (2020) con ligeras modificaciones. Para esto, se utilizó un liofilizador (LABCONCO – FreeZone, USA) (Figura 17) a una temperatura constante de -80°C y presión de vacío de 0.0420 mBar. Las muestras secas fueron molidas y el polvo resultante se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.



Figura 17. Liofilizador (LABCONCO – FreeZone, USA).

6.4. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS

Para llevar a cabo la caracterización fenólica y evaluación biológica de los extractos del cirrián se llevó a cabo una extracción previa utilizando solventes de diferente polaridad (MeOH 80%, EtOH 80%, EtOH 70%). El método se efectuó siguiendo el protocolo reportado por Nowicka *et al.* (2019) con cambios menores. Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones controladas de extracción asistida por sonicación a 4 °C y en ausencia de luz. Para esto, se pesó 1 g del liofilizado de cirrián y se homogenizó con 8 mL de solvente. La mezcla se sometió en un baño ultrasónico por 30 min en agua fría. Pasando el tiempo de sonificado los extractos se centrifugaron por 15 min a 10,000 rpm y 4 °C para lograr la separación del sobrenadante (extracto fenólico) y el precipitado. La pastilla resultante después de separar el sobrenadante se resuspendió nuevamente en 8 mL del mismo solvente, repitiendo los pasos anteriores de extracción. Por último, se mezclaron los dos sobrenadantes y se llevaron a un volumen final de 20 mL con el mismo solvente. El proceso de extracción se realizó con todos los solventes de manera individual y por triplicado.

6.4.1. EXTRACCIÓN ACUOSA DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE CALENTAMIENTO

El método de extracción se llevó a cabo mediante el protocolo reportado por García-Pérez *et al.* (2010) con ligeras modificaciones. Se pesaron 2 g del liofilizado de cirrián y se homogenizó en 40 mL de agua destilada, llevando a ebullición por 1 h. El sobrenadante se separó de los sólidos usando papel filtro Whatman no. 4 y se almacenó en refrigeración a 4 °C en ausencia de luz hasta su análisis. El proceso de extracción se realizó por triplicado.

6.5. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU

El contenido fenólico total se determinó de acuerdo con el ensayo Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999; Tranquilino-Rodríguez *et al.*, 2020). Comenzando con la preparación de dos mezclas. La mezcla uno se conformó por 125 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N

(SIGMA-ALDRICH) más 3.125 mL de H₂O destilada, dando como volumen final 3.250 mL, siendo este el volumen que se agregó a cada uno de los tubos de reacción. Por su parte, la mezcla dos se completó mezclando 750 µL de Na₂CO₃ 20% (p/v) más 950 µL de H₂O destilada, dando como volumen final 1.7 mL. Enseguida, se tomaron 50 µL del extracto de la fracción fenólica a evaluar y se agregaron al volumen de la mezcla uno, dejando en reposo por 5 min. Para concluir la reacción se adicionó el volumen de la mezcla dos a cada uno de los tubos que contenía la mezcla uno más los 50 µL del extracto fenólico. Se incubó a temperatura ambiente y en total oscuridad, por 30 min, y luego se midió la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de 765 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de peso en base seca. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado con cada uno de los extractos fenólicos del cirían.

6.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL ENSAYO DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL

La capacidad de eliminación de radicales se evaluó según el método de Floegel *et al.* (2011), y actualizado por Virgen-Ortiz *et al.* (2020) con cambios menores. Para este ensayo, se preparó una solución del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a una concentración de 1 mM en metanol puro. Ajustando su absorbancia inicial a 0.700 ± 0.02 usando metanol o pequeñas trazas del reactivo de ser necesario. Seguido de esto, se mezclaron 100 µL de muestra (extracto fenólico a evaluar) más 3.90 mL de solución de DPPH para incubar a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad. Después de este periodo, la absorbancia se cuantificó a 517 nm en el espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición de DPPH se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs blanco}} \times 100$$

Donde: *Abs blanco* corresponde a la absorbancia del blanco (0.700 ± 0.020) y *Abs muestra* indicará la absorbancia de la muestra.

La actividad antioxidante DPPH de los extractos del fruto se reportó como la concentración de compuestos fenólicos (mg/mL) equivalentes de ácido gálico que producen

la IC₅₀, y se comparó con los resultados obtenidos con el Trolox (control positivo). Las mediciones se efectuaron por triplicado con cada uno de los extractos fenólicos a evaluar.

6.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DEL RADICAL ÁCIDO 2,2'-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-SULFONICO)

Este método se cuantificó la capacidad de los antioxidantes para neutralizar el radical catiónico azul / verde a una forma incolora. El análisis se efectuó según lo descrito por Re *et al.* (1999) y Virgen-Ortiz *et al.* (2020) con ligeras modificaciones. El catión radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) se preparó haciendo reaccionar una solución de ABTS 7 mM con persulfato potásico 2.45 mM en total oscuridad durante 16 h antes de su uso. Pasando el tiempo de reposo del radical, la absorbancia inicial se ajustó a 0.700 ± 0.005 utilizando metanol o pequeñas trazas del reactivo. Para evaluar la actividad antioxidante de los extractos fenólicos del cirrián, se mezclaron 30 μ L de muestra (extracto fenólico a evaluar) con 2.970 mL de solución ABTS⁺, dejando en total reposo durante 5 min en total oscuridad. El porcentaje de inhibición del extracto se midió por espectrofotometría a 734 nm y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs inicial} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

Donde: *Abs inicial* se refiere a la absorbancia del radical y *Abs muestra* a la absorbancia de la muestra.

Los resultados se expresaron como la concentración de compuestos fenólicos (mg/mL) equivalentes de ácido gálico que producen la IC₅₀, y se compararon con los datos obtenidos con el Trolox (control positivo). Las mediciones se realizaron por triplicado con cada uno de los extractos fenólicos a evaluar.

6.8. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE INHIBICIÓN DEL RADICAL HIDROXILO

La actividad de inhibición del radical hidroxilo producido por la reacción de Fenton, se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Valencia *et al.* (2018) con ligeras modificaciones. Para iniciar con el ensayo, se añadió 1 mL del extracto fenólico a 600 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO) puro, seguido de 200 μ L de FeSO_4 (8 mM), y 167 μ L de H_2O_2 (20 mM). La reacción comenzó mediante la adición de 600 μ L de la solución de ácido salicílico (3 mM) y llevando a un período de incubación de 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, el porcentaje de inhibición del extracto fenólico se cuantificó por espectrofotometría a 510 nm y empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs blanco}} \times 100$$

Donde: *Abs blanco* se refiere a la absorbancia del radical y *Abs muestra* a la absorbancia de la muestra.

Se calculó la concentración de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) equivalentes de ácido gálico que producen la IC_{50} , y se comparó con la correspondiente al polifenol utilizado como control positivo (Oligopin[®], extracto comercial). Las mediciones se realizaron por triplicado con cada uno de los extractos fenólicos a evaluar.

6.9. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE CIRIÁN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Para este análisis de caracterización, se consultó la metodología reportada por Colin-Chávez *et al.* (2020), utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) (Agilent Technologies 1200 Infinity Series) equipado con automuestreador, bomba cuaternaria, columna analítica ultrabase C18 Ascentis Express 250 \times 4.6 mm, 5 μm a 35 °C y detector de arreglo de diodos (DAD) (Figura 18). El ensayo se efectuó usando una fase móvil isocrática con flujo de 0.8 mL/min, la cual fue conformada por metanol puro y ácido fórmico al 1%.

Se utilizaron como soluciones analíticas los estándares de alta pureza de ácido gálico (> 99%, Sigma), ácido 4-hidroxibenzoico (\geq 99%, Aldrich), ácido cafeico (\geq 98%, Sigma), ácido siríngico (\geq 99%, Aldrich), ácido elágico (\geq 99%, Aldrich), ácido trans-cinámico (\geq 99%, Aldrich), ácido vanílico (> 97%, Sigma Aldrich), ácido clorogénico (> 99%, Sigma), ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico (> 99%, Aldrich), ácido sináptico (\geq 98%, Sigma Aldrich), y mangiferina (> 98%, Sigma Aldrich), (1–20 μ g/mL).

Para obtener un mejor separación y resolución de los picos cromatográficos, se utilizó una elución en gradiente de la fase móvil durante el tiempo de inyección (Tabla 4).



Figura 18. HPLC Agilent Technologies 1200 Infinity Series.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación del perfil de ácidos fenólicos

Condiciones cromatográficas	
Columna:	Ultrabase C18 Ascentis Express 250×4.6 mm, 5 μ m
Temperatura de columna:	35 °C
Volumen de inyección:	10 μ L
Flujo:	0.8 mL/min
Fase móvil:	A: Metanol puro, B: Ácido fórmico 1%
Elución en gradiente	
Tiempo de inyección (minutos)	Composición de fase móvil
0 - 5	2% A - 98% B
5 - 15	15% A – 85% B
15 - 30	25% A – 75% B
30 - 35	35% A – 65% B
45 - 50	55% A – 45% B
50 - 55	55% A – 45% B
55 - 60	2% A - 98% B
	Post-time: 5 minutos
Detector DAD:	260, 270, 322 nm

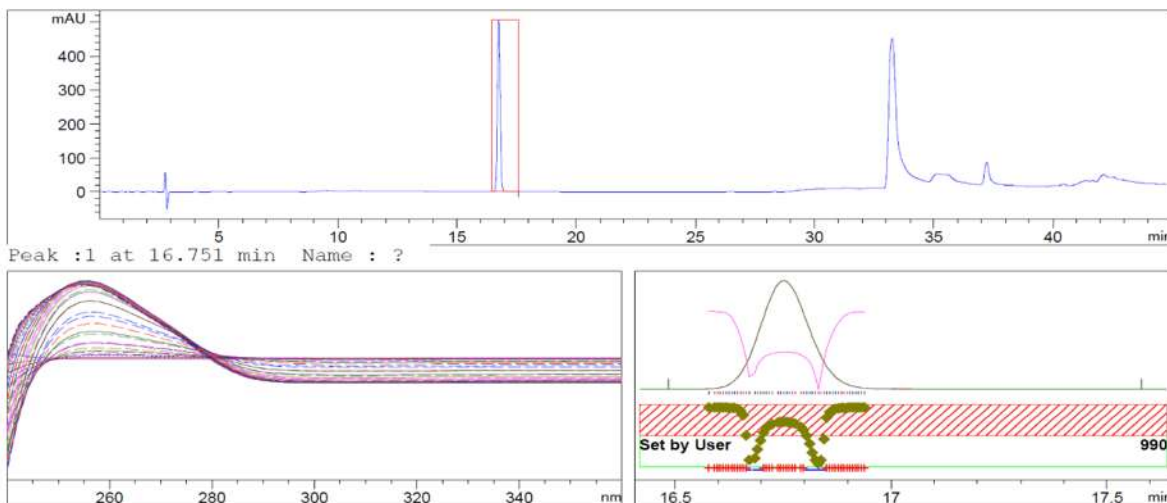


Figura 19. Ejemplo de espectro de absorción del ácido 4-hidroxibenzoico en detector DAD.

Cabe señalar, que se realizó un monitoreo mediante un barrido cromatográfico con cada uno de los estándares analíticos. Esto con la finalidad de conocer la forma del pico cromatográfico, tiempo de retención y espectro de absorción (Figura 19).

6.10. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS PARA SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos del cirrián sobre las enzimas fosfodiesterasa y convertidora de angiotensina, las cuatro fracciones fenólicas se sometieron a evaporación para eliminar el solvente de extracción. El proceso de evaporación se realizó en una centrifuga de evaporación al vacío (SpeedVacTM SPD 120, Vacuum Concentrator, USA) durante 2 h a 40 °C (Figura 20). Pasado el tiempo de evaporación los concentrados fenólicos se resuspendieron en el buffer de reacción enzimático para su posterior ensayo.



Figura 20. Concentrador de vacío (SpeedVacTM SPD 120, Vacuum

6.11. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA POR EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo de Shah *et al.* (2020) y Rauf *et al.* (2017) con cambios menores. Se uso como sustrato enzimático el bis (4-nitrofenil) fosfato y la actividad enzimática se monitorio por espectrofotometría UV-VIS a 410 nm, midiendo la concentración de 4-nitrofenol liberado por la hidrólisis enzimática mediada por la fosfodiesterasa sobre el sustrato.

Para esto, se agregaron 800 μL del buffer Tris-HCl (pH 8.8.) en la celda de reacción más 200 μL de acetato de magnesio 30 mM. Seguido de esta mezcla se adicionaron a la misma celda 100 μL del extracto fenólico a evaluar con 300 μL de la enzima fosfodiesterasa (2.2 U/mL). Se llevó a pre-incubación por 10 min a 37 °C, y luego se adicionaron 600 μL del sustrato bis bis (4-nitrofenil) fosfato 5 mM.

Para concluir la con reacción, se incubó nuevamente a las mismas condiciones por 30 min y se agregaron 500 μL de NaOH 0.5 M. La capacidad de inhibición se calculó como porcentaje de inhibición de los extractos evaluados con respecto de la reacción control (sin extracto fenólico) utilizando la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de la PDE} = [1 - (A. \textit{inhibidor} / A. \textit{control})] \times 100$$

Donde: *A. inhibidor* es la absorbancia del extracto fenólico (inhibidor) y *A. control* corresponde a la absorbancia del control sin extracto (sin inhibidor).

Posterior a esto, se calculó la concentración de compuestos fenólicos (μM) equivalente de ácido gálico que produce la IC_{50} , y se comparó con el correspondiente inhibidor ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) utilizado como control positivo. Las mediciones se efectuaron por triplicado con cada uno de los extractos fenólicos a evaluar.

6.12. ENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA POR EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

El protocolo se efectuó siguiendo el método reportado por Amrani-Allalou *et al.* (2021) con ligeras modificaciones. La reacción se basó en la hidrólisis del sustrato Hipuril-Histidil-Leucina (HHL, por sus siglas en inglés) por la ECA para producir ácido hipúrico (HA, por sus siglas en inglés). Para iniciar la reacción, se adicionaron 20 μ L de la ECA purificada (100 mU/mL) disuelta en buffer de boratos 0.1 M adicionado con 0.3 M de NaCl (pH 8.3), 50 μ L del extracto fenólico a evaluar, llevando a pre-incubación durante 10 min a 37 °C. Seguido de este periodo de adaptación, se añadió 30 μ L del sustrato HHL (5mM) y se incubó nuevamente a las mismas condiciones durante 30 min. Pasando este tiempo, la reacción se detuvo agregando 220 μ L de HCl 1 M y se microfiltro para su posterior análisis.

Para poder seleccionar con mayor confiabilidad los resultados obtenidos a partir de la reacción, se preparó un blanco el cual consistió en la adición de buffer en lugar de la enzima, así como un control positivo conteniendo buffer en lugar del extracto (inhibidor).

El HA generado por la reacción se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) utilizando el mismo equipo y columna cromatográfica descritos anteriormente (apartado 6.8). Como fase móvil se empleó un buffer de KH_2PO_4 5 mM (pH 2.6) y metanol puro con un flujo constante de 0.7 mL/min.

Del mismo modo que en el método del perfil de ácidos fenólicos descrito previamente, se usó una elución en gradiente de la fase móvil durante el tiempo de inyección para obtener una mejor separación y resolución de los picos cromatográficos (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación de la actividad ECA

Condiciones cromatográficas	
Columna:	Ultrabase C18 Ascentis Express 250×4.6 mm, 5 μ m
Temperatura de columna:	40 °C
Volumen de inyección:	10 μ L
Flujo:	0.7 mL/min
Fase móvil:	A: KH_2PO_4 , C: Metanol puro grado HPLC
Elución en gradiente	
Tiempo de inyección (minutos)	Composición de fase móvil
0 - 5	80% A - 20% C
5 - 15	50% A – 50% C
15 - 20	50% A – 50% C
20 - 25	80% A – 20% B
	Post-time: 5 minutos
Detector DAD:	214, 220, 228 nm

La evaluación de la inhibición de la ECA se calculó, en la comparación entre la concentración de producción de HA con el extracto como inhibidor y sin el extracto como control. Se utilizó la siguiente ecuación para sustituir el área de los picos cromatográficos de ambos casos:

$$\% \text{ Inhibición de la ECA} = \left[1 - \left(\text{A. inhibidor} / \text{A. control} \right) \right] \times 100$$

Donde: A. inhibidor y A. control son las áreas de los picos de HA del ensayo con el extracto fenólico (inhibidor) y el control sin extracto respectivamente.

Se calculó la concentración de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) equivalentes de ácido gálico que producen la IC_{50} , y se comparó con la correspondiente al fármaco usado como control positivo (captopril) (Blaszczak *et al.*, 2021; Salem *et al.*, 2020; Akomolafe *et al.*, 2018).

6.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Todos los resultados obtenidos se procesaron mediante la estadística descriptiva utilizando medias de tendencia central (media y desviación estándar). Los datos generados de las variables de respuesta (fenoles totales, capacidad antioxidante, perfil fenólico y actividad biológica *in vitro*), fueron evaluados mediante un arreglo factorial completamente al azar de un ANOVA de una vía para cada uno de los ensayos, donde los factores fueron las fracciones fenólicas obtenidas con los diferentes solventes. Las diferencias significativas se compararon por la prueba de Tukey al 95% de confianza, utilizando el paquete estadístico Minitab 18 Statistical Software. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN EXPERIMENTAL

7.1. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS DEL CIRIÁN

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en muchas familias de plantas, incluidas las pertenecientes a la familia Bignoniaceae. Sin embargo, los extractos fitoquímicos del género *Crescentia* o cirián han sido poco estudiados tanto de manera individual como en fracción total, siendo esto una limitante para la comparación con otros autores. En el presente trabajo, se cuantificaron los fenoles totales de los diferentes extractos obtenidos a partir de la pulpa liofilizada del fruto. Como se muestra en la Figura 21, el contenido de fenoles totales varía de acuerdo al nivel de polaridad de los extractos utilizados. Curiosamente el extracto metanólico exhibió un contenido fenólico significativamente mayor ($p < 0.05$) que el resto de los extractos a excepción del extracto etanólico al 70%.

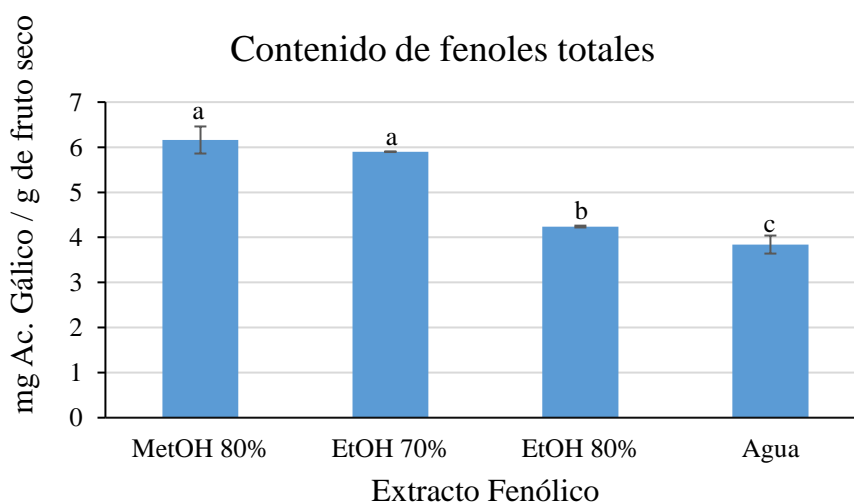


Figura 21. Contenido de fenoles totales en extractos de fruto de cirián.

Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. Los valores que no comparten las mismas letras son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

El contenido de fenoles totales se calculó utilizando la siguiente ecuación lineal basada en la curva de calibración del ácido gálico como estándar de referencia; $y = 0.906x + 0.0426$, $R^2 = 0.9991$. La concentración fenólica del extracto metanólico fue de 6.16 ± 0.4 mg de ácido

gálico/g de peso seco. La variación de resultados puede atribuirse a la polaridad de los compuestos fitoquímicos extraídos, debido que estos son mayormente de carácter hidrofóbico o de una polaridad media a baja. Dentro de esta clasificación, se encuentran los taninos condensados, ligninas y ácidos hidroxicinámicos, los cuales están unidos a la pared celular de las células vegetales (Valencia-Avilés *et al.*, 2017).

Del mismo modo, Cuevas-Juárez *et al.* (2014) estudiaron las propiedades antioxidantes de *Crescentia alata* reportando una concentración de 4.51 ± 0.37 mg de ácido gálico/g de peso fresco en el extracto fenólico de los frutos. Existen reportes en los cuales se le atribuye diversas actividades biológicas al alto contenido de fenoles de *Crescentia cujete*. Tal es el caso del ensayo documentado por Parvin *et al* (2015), quienes reportaron un alto contenido fenólico en extractos etanólicos de las hojas y corteza de esta especie utilizada en la medicina popular.

Bajo este principio de extracción de polaridad creciente, Sagrin *et al.* (2019) demostraron que la mayor concentración de fenólicos en el liofilizado de cirián, se presentó en los extractos etanólicos y menor proporción los extractos acuosos. Es importante señalar que los resultados publicados por estos investigadores se asemejan a los obtenidos en el presente trabajo, respaldando así, el potencial terapéutico de este fruto en la medicina tradicional.

Aunado a lo correlación anterior de polaridad y extracción fenólica, se han examinado compuestos fitoquímicos de otras plantas medicinales, dando como resultado una tendencia similar a la del presente trabajo. En estas pruebas *in vitro* se han cuantificado el contenido de fenoles totales en raíz, hojas, corteza y frutos de diversas plantas. Algunos de los solventes de extracción utilizados han sido orgánicos como; éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, etanol, metanol y agua, estos en orden creciente de polaridad. Los resultados han revelado que el metanol es el mejor solvente seguido por el etanol para la extracción de compuestos fitoquímicos, particularmente en el contenido de fenoles totales (Zreen *et al.*, 2022; Herrera-Pool *et al.*, 2021).

Es evidente que la polaridad del solvente desempeña un papel muy importante en el proceso de extracción. En la mayoría de los casos, el etanol y metanol al mezclarse con el agua, crea un medio más polar lo que favorece la extracción tanto de compuestos de polaridad media como de características hidrofílicas o altamente polares. Bajo este principio, Onivogui

et al. (2015) cuantificaron el contenido de fenoles totales en la pulpa de *Anisophyllea* en extractos con etanol, metanol, acetato de etilo y agua. Los autores concluyeron que el etanol y metanol mezclados con agua (80/20) fueron los solventes más eficaces para la extracción de los compuestos bioactivos.

Recapitulando lo mencionado previamente, los resultados expuestos del presente ensayo cumplen con lo reportado por los autores citados. Siendo el extracto metanólico y etanólico al 70% las mejores opciones para obtener los mayores rendimientos en la extracción de los compuestos fitoquímicos del fruto de cirrián. Esto sugiere que posiblemente los extractos presentes en el fruto sean de características mayormente de polaridad media como polifenoles poco solubles en agua y ácidos hidroxicinámicos.

7.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES FENÓLICAS DEL CIRIÁN

Los modelos de eliminación de los radicales DPPH y ABTS son métodos ampliamente utilizados para evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de compuestos fitoquímicos. El grado de decoloración indica el potencial de eliminación del radical por efecto del extracto antioxidante, que se debe a la capacidad de donación de hidrógenos. Los datos experimentales del presente trabajo se muestran en la Tabla 6. De acuerdo con el análisis ANOVA, se encontró una tendencia similar en ambos métodos. La fracción fenólica que presentó mayor potencial antioxidante sobre ambos radicales, fue con el metanol 80% dando como resultado una IC_{50} de 0.161 ± 0.004 mg/mL para DPPH. Mientras que para el radical ABTS fue de 0.093 ± 0.004 mg/mL equivalentes de ácido gálico.

Por el contrario, el extracto fenólico que presentó menor actividad para el radical DPPH fue la fracción acuosa con una IC_{50} de 0.34 ± 0.01 mg/mL y en el caso del radical ABTS las fracciones etanólicas y acuosa no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cabe resaltar que el extracto metanólico en ambos ensayos presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) que el resto de los extractos evaluados, incluso mostró una mejor IC_{50} que el trolox utilizado como control positivo. Posiblemente, estos resultados de inhibición se deben a las características de polaridad de los compuestos fenólicos extraídos.

Tabla 6. Evaluación de capacidad antioxidante en extractos fenólicos de fruto de cirrián

Solvente de extracción	IC ₅₀ (mg/mL) equivalentes de ácido gálico	
	DPPH	ABTS
Agua	0.34 ± 0.01 a	0.16 ± 0.003 c
EtOH 80%	0.239 ± 0.007 b	0.169 ± 0.001 b
Trolox [®]	0.185 ± 0.002 c	0.3 ± 0.002 a
EtOH 70%	0.172 ± 0.009 d	0.164 ± 0.003 bc
MeOH 80%	0.161 ± 0.005 d	0.0963 ± 0.004 d

Los datos corresponden a las medias ± desviación estándar de tres repeticiones. Los valores que no comparten las mismas letras son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

De manera similar, Das *et al.* (2014) reportaron una mayor IC₅₀ en extractos etanólicos provenientes de *Crescentia cujute* sobre la inhibición del radical DPPH. Estos autores, resaltaron la diferencia significativa en el poder antioxidante del extracto etanólico en comparación con los obtenidos con solventes de media y baja polaridad. Otro estudio mencionó que los extractos metanólicos obtenidos de las hojas de *Crescentia cujute*, exhibieron un buen potencial antioxidante por los métodos DPPH y ABTS, obteniendo una IC₅₀ a concentraciones muy bajas de 34.01 ± 4.97 y 3.80 ± 0.20 µg/mL respectivamente. La importante concentración de compuestos fenólicos en la evaluación fitoquímica y el contenido de fenoles totales pudo ser la principal causa de la actividad antioxidante de dicha fracción (Parente *et al.*, 2016).

Así mismo, Sagrin *et al.* (2019) estudiaron el efecto inhibitorio del radical DPPH de los extractos etanólicos (100%, 50%) obtenidos de las hojas y corteza de *Crescentia cujute*, mostrando valores de inhibición muy similares a los obtenidos en este trabajo. La concentración inhibitoria más baja que encontraron fue de 261.97 ± 0.57 µg/mL en la fracción etanólica al 100% del extracto de la hoja. Estos resultados indicaron que las hojas y la corteza del cirrián contienen compuestos fitoquímicos con polaridad media que pueden ser extraídos de manera eficiente con etanol y metanol.

Otra investigación que coincide con los rangos de inhibición encontrados en este trabajo de tesis, fue lo reportado por Anwuchaepe *et al.* (2017). Los autores obtuvieron extractos metanólicos a partir de la hoja de *Crescentia cujute* y cuantificaron un rango de

IC₅₀ (15.22 a 569.22 µg/mL) para el radical DPPH, corroborando así, el potencial antioxidante de los compuestos fitoquímicos de esta especie medicinal.

Por otro lado, según con lo encontrado en la literatura, una de las variables que se deben tomar en cuenta para llevar a cabo estas pruebas de evaluación *in vitro*, es la interacción de los radicales utilizados y los fenoles a evaluar. Munteanu & Apetrei. (2021) mencionaron que el radical ABTS es soluble en agua y disolventes orgánicos, lo que permite determinar la capacidad antioxidante tanto de compuestos lipofílicos como hidrofílicos. Por el contrario, el radical DPPH es soluble en diferentes disolventes orgánicos, pero no en agua. Este último generalmente, se disuelve en metanol y etanol, permitiendo una mejor interacción con los compuestos fenólicos de características hidrofóbicas (Munteanu & Apetrei., 2021; Stasko *et al.*, 2007). Bajo este principio químico, los resultados obtenidos en este trabajo respaldan la interacción entre los radicales y contenido fenólico, debido a que los cambios en la actividad ABTS estuvieron relacionados medianamente bajos con el contenido fenólico total (coeficiente de correlación de Spearman: $r = -0.402$, $p = 0.211$). Mientras que para DPPH se presentó una alta correlación entre el cambio en la actividad del radical y las concentraciones de fenoles encontradas en los extractos evaluados (coeficiente de correlación de Spearman: $r = -0.973$, $p = 0.001$).

Con base a lo anterior, se puede evidenciar que la mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en el fruto de cirrián, posiblemente son de características hidrofóbicas. Por lo tanto, la extracción a base de metanol / agua (80 / 20 %) es la mejor alternativa para obtener fitoquímicos con mejor actividad antioxidante.

7.3. CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL RADICAL HIDROXILO DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS DE CIRIÁN

Entre las diferentes especies reactivas de oxígeno el radical hidroxilo es el más reactivo que puede atravesar fácilmente las membranas celulares y ocasionar daño irreversible en las principales biomoléculas o incluso muerte celular. Por tal motivo, eliminar estos radicales es de suma importancia para la protección de los sistemas biológicos (Xu *et al.*, 2012).

En la tabla 7 se muestra la concentración media inhibitoria (IC_{50}) del radical OH ocasionada por los extractos fenólicos del cirián a diferentes concentraciones (129.78 – 400.93 $\mu\text{g/mL}$) equivalentes de ácido gálico. De acuerdo al análisis ANOVA, los resultados expresaron que la extracción con metanol al 80% fue más efectiva en la inhibición del radical dando como resultado una IC_{50} de 119.09 ± 0.002 ($\mu\text{g/mL}$) equivalentes de ácido gálico.

Tabla 7. Concentración media inhibitoria (IC_{50}) de los extractos fenólicos de cirián sobre el radical hidroxilo

Extracto fenólico	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) equivalentes de ácido gálico
Oligopin [®]	1033.5 ± 18.50 a
Agua	400.93 ± 4.53 b
EtOH 70%	342.23 ± 3.73 c
EtOH 80%	152.55 ± 4.14 d
MeOH 80%	129.78 ± 6.56 d

Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. Los valores que no comparten las mismas letras son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

Los resultados de inhibición mostraron que los extractos fenólicos de cirián fueron diferentes estadísticamente, incluso mejores que la IC_{50} encontrada en el ensayo del Oligopin[®] (control positivo). Asimismo, este último presentó una concentración de inhibición muy similar a lo reportado por otros autores con un valor de IC_{50} 1271 ± 72 $\mu\text{g/mL}$ (Valencia *et al.*, 2018).

Este ensayo proporcionó información acerca de la reactividad química de los extractos fenólicos del cirián, para la inhibición de los radicales libres. Los valores de IC_{50} mostraron que los extractos fitoquímicos obtenidos con metanol 80% y etanol 80%, cuentan con mayor capacidad de capturar los radicales hidroxilos. Si bien, es cierto que los extractos fenólicos de esta especie presentan una alta actividad antioxidante. Actualmente no se han encontrado reportes sobre la actividad inhibitoria del radical hidroxilo por acción de los fitoquímicos de *Crescentia alata*. La mayoría de los trabajos publicados solo hacen mención de la actividad antioxidante sobre algunos radicales como DPPH y ABTS, mismos que se discutieron en el numeral anterior del presente trabajo (Balogun *et al.*, 2021).

Por su parte, la determinación en la inhibición del radical hidroxilo también ha sido evaluada en otros compuestos fitoquímicos de otras plantas medicinales como: corteza de diferentes especies del árbol *Quercus*, hojas de *Flacourtia sepiaria*, raíz de *Acalypha indica* y hojas de *Brachychiton populneus*, por mencionar algunas (Sahukari *et al.*, 2021; Batool *et al.*, 2019; Valencia *et al.*, 2018; Sreejith *et al.*, 2013). De acuerdo con lo reportado por estos autores, los extractos fenólicos presentaron buena actividad antioxidante sobre este radical. Esta actividad inhibitoria se vio reflejada en las IC₅₀ encontradas, las cuales coinciden con el mismo rango de concentración evaluadas en el presente trabajo de los extractos del cirrián.

Además de los ejemplos anteriores, también se han probado extractos fenólicos provenientes de frutos utilizados en la medicina tradicional con actividad antioxidante. Algunos de los ejemplos de estos ensayos *in vitro* han sido probados en los frutos como: *Mallotus philippenensis*, bayas de *Juniperus communis*, *Phyllanthus acidus*, *Coccinia grandis*, estos frutos han sido muy utilizados como una alternativa medicinal en cada una de las regiones de donde son originarios (Fejér *et al.*, 2020; Kondhare & Lade, 2017; Moniruzzaman *et al.*, 2015; Gangwar *et al.*, 2014). Con respecto a la extracción de los fitoquímicos, los autores utilizaron solventes de polaridad media – alta, en los que destacan el metanol, etanol y agua. Los resultados arrojaron una alta correlación entre el contenido fenólico y la capacidad de inhibición del radical hidroxilo. Las concentraciones medias inhibitorias de estos ensayos, oscilaron en el mismo rango de concentración (µg/mL) que los encontrados en este trabajo.

De acuerdo con lo establecido por Valencia *et al.* (2018), el contenido fenólico presentó una alta correlación con la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de la corteza de *Quercus*, generando un aumento en el coeficiente de correlación de Spearman. Bajo esta misma línea de interacción, el coeficiente de correlación de Spearman entre el contenido fenólico y la capacidad de inhibición del radical hidroxilo del presente trabajo fue de $r = -0.782$ ($p = 0.003$). Esta correlación significativa pudo deberse a la extracción en mayor concentración de compuestos fenólicos de características hidrofóbicas, obtenidos a partir del metanol al 80%. Por lo tanto, se requirió una concentración más baja de estos extractos para inhibir los radicales hidroxilo y a su vez generó una relación inversa entre ambas variables.

Por consiguiente, se ha informado que posiblemente al tamaño molecular y proximidad de grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, son de suma importancia en la actividad de eliminación de radicales libres (Loganayaki *et al.*, 2013). Este mecanismo de reacción hasta el momento es poco claro, sin embargo, se estima que podrían actuar como donantes de hidrógeno, rompiendo la cadena de generación de los radicales libres (Gori *et al.*, 2016).

7.4. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE CIRIÁN

La cuantificación de los compuestos fenólicos de los extractos del cirián, se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siendo esta una de las técnicas más empleadas para esta finalidad. De acuerdo con la literatura este método es muy sensible y altamente específico, además de permitir la separación de las moléculas que son estructuralmente similares (Bueno-Herrera & Pérez-Magariño, 2020; Colin-Chávez *et al.*, 2020; Kumar, 2017).

Los estándares de ácidos fenólicos inyectados en el sistema HPLC – DAD fueron los previamente mencionados, siendo estos los reportados como los compuestos encontrados en mayor abundancia en los extractos fenólicos. Las figuras 22 y 23 muestran los cromatogramas obtenidos con la mezcla de los estándares analíticos explorados.

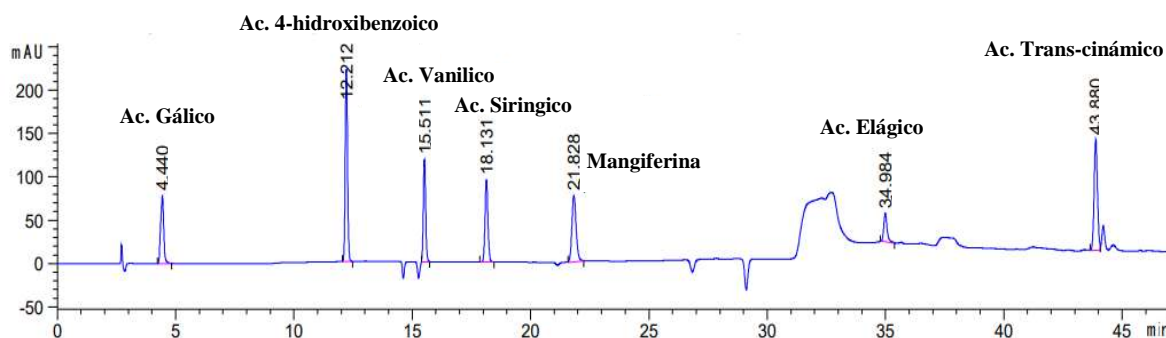


Figura 22. Cromatograma de la mezcla de los estándares analíticos de ácidos fenólicos. Absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm en detector DAD.

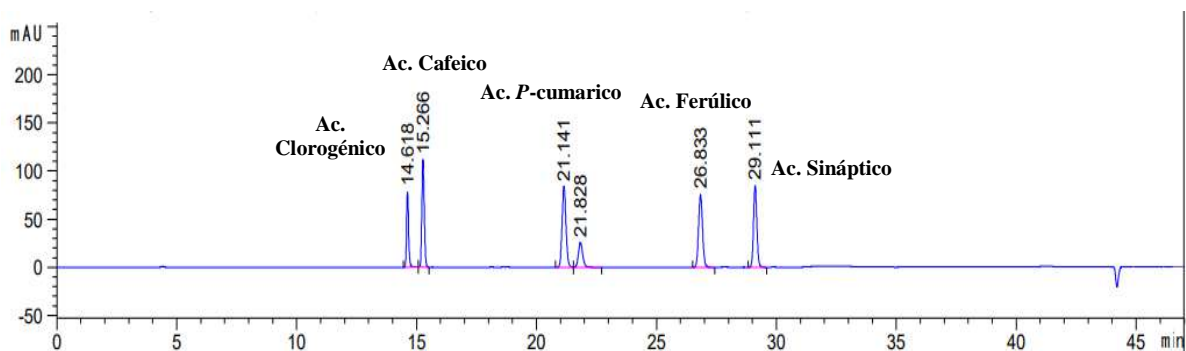


Figura 23. Cromatograma de la mezcla de los estándares analíticos de ácidos fenólicos. Absorbancia medida a una longitud de onda de 322 nm en detector DAD.

Para la identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos presentes en el fruto de cirrián, se inyectaron los cuatro extractos fenólicos. Estos se midieron con las longitudes de onda obtenidas a partir de cada espectro de absorción. En las figuras 24 y 25 se muestran los ácidos fenólicos encontrados en la fracción metanólica del cirrián. El resto de los cromatogramas de los extractos se muestran en la sección de anexos.

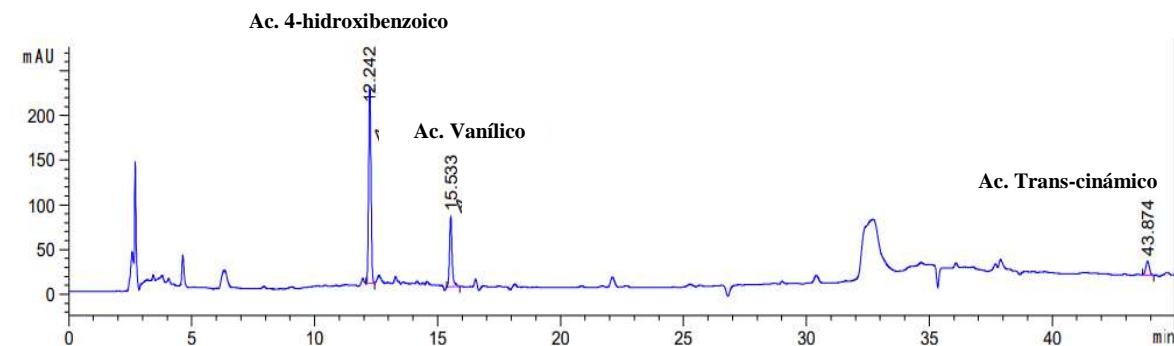


Figura 24. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción metanólica del cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm en detector DAD.

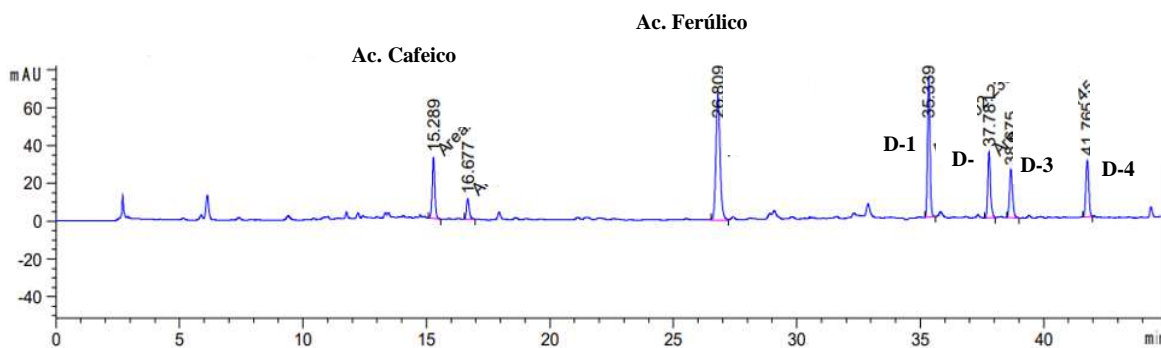


Figura 25. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción metanólica del cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 322 nm en detector DAD. *Los compuestos fenólicos identificados con la letra D, se desconoce su composición química.

En la Tabla 8 se presentan las concentraciones de los ácidos fenólicos encontrados en las distintas fracciones fenólicas del fruto de cirrián. De manera general, el extracto metanólico presentó la mayor concentración de ácidos hidroxibenzoicos (4-hidroxibenzoico, vanílico) y ácidos hidroxicinámicos (trans-cinámico, cafeico, ferúlico). Comparando los cromatogramas, se observó que todos los extractos mostraron el mismo perfil cromatográfico variando en las concentraciones, donde el ácido 4-hidroxibenzoico y ácido ferúlico fueron los fenólicos predominantes.

Tabla 8. Concentración de ácidos fenólicos encontrados en extractos de fruto de cirrián.

Solvente de extracción	Compuestos fenólicos identificados ($\mu\text{g} / \text{g}$ peso seco)				
	Ácido 4-hidroxibenzoico (TR: 12.24 min)	Ácido Vanílico (TR: 15.53 min)	Ácido Trans-cinámico (TR: 43.87 min)	Ácido Cafeico (TR: 15.28 min)	Ácido Ferúlico (TR: 26.80 min)
MeOH 80%	502.38 \pm 1.26 a	369.801 \pm 0.3 b	69.82 \pm 0.2 a	167.22 \pm 0.3 a	498.33 \pm 0.7 a
EtOH 70%	488.74 \pm 0.91 b	389.562 \pm 0.6 a	70.63 \pm 0.6 a	156.81 \pm 0.7 b	458.94 \pm 0.1 b
EtOH 80%	452.57 \pm 2.95 c	335.82 \pm 0.2 c	60.95 \pm 0.1 b	145.10 \pm 0.6 c	432.94 \pm 0.6 c
Agua	439.62 \pm 0.85 d	315.15 \pm 0.6 d	60.80 \pm 0.3 b	75.80 \pm 1.1 d	294.62 \pm 0.8 d

Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. Los valores que no comparten las mismas letras son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). TR= tiempo de retención del ácido fenólico.

De acuerdo con el análisis de varianza, se determinó que tanto el tipo de solvente utilizado, como el método de extracción especialmente en el extracto acuoso, influyeron en la concentración, presentado una diferencia significativa en los cinco ácidos fenólicos encontrados. Cabe mencionar, que en todos los extractos fenólicos del cirrián se encontraron cuatro compuestos desconocidos. En la figura 25 se pueden apreciar los picos cromatográficos de estos analitos identificados con la letra D, apareciendo a partir del minuto 35 al 42 a la longitud de onda de 322 nm. De acuerdo con la composición de la fase móvil durante ese tiempo de inyección (35% MeOH, 65% ácido fórmico), las características químicas de estos fenólicos son mayormente hidrofóbicas. Por lo que posiblemente, se trate de compuestos fenólicos de mayor tamaño molecular.

Es importante mencionar que actualmente no se han encontrado reportes en la literatura sobre el perfil fenólico de *Crescentia alata*, por lo que podría ser una limitante en la comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, lo más

cercano en cuanto al análisis cromatográfico en *C. alata*, fue reportado por Corrales *et al.* (2017) con un estudio fisicoquímico de las semillas del fruto. De acuerdo con sus resultados obtenidos, lograron identificar y aislar diferentes compuestos volátiles responsables del olor clave de la semilla del fruto.

Por otra parte, se han mencionado algunos trabajos sobre la caracterización fitoquímica de los extractos fenólicos de *Crescentia cujute*, especie muy similar a *C. alata*. Anwuchaepe *et al.* (2017) evaluaron el perfil fenólico de los extractos de las hojas de *C. cujute*, logrando revelar la presencia de compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, ácido protocatecuico y varios derivados de la quercetina.

Del mismo modo, se ha analizado la pulpa del fruto de *crescentia cujute*, logrando identificar un gran número de ácidos fenólicos a partir de extractos metanólicos (como los derivados del ácido trans-cinámico y hidroxibenzoico), además de una gran diversidad de flavonoides y otros metabolitos secundarios (Jose *et al.*, 2020; Rivera-Mondragón *et al.*, 2020).

Con relación a otras especies de plantas medicinales utilizadas en otras regiones del mundo, se han reportado las caracterizaciones de sus compuestos fenólicos, obtenidos principalmente con mezclas hidrometanólicas como solventes de extracción. Estos análisis cromatográficos se han llevado a cabo en plantas y frutos como: *Justicia secunda*, *Juglas regia*, *Eugenia dysenterica*, *Campomanesia pubescens*, *Euphorbia cuneata*, *Asclepias linaria*, la mayoría de estos extractos han sido utilizados desde épocas pasadas como alternativas naturales en la medicina tradicional. La mayoría de los compuestos fenólicos que se lograron identificar, fueron un gran número de flavonoides y ácidos fenólicos como; gálico, vanílico, cafeico, *p*-cumárico, siringico y ferúlico. De acuerdo con los autores, los extractos fitoquímicos presentaron gran actividad antioxidante, así como una actividad biológica en la inhibición de enzimas clave en el desarrollo de diversas enfermedades. (Świątek *et al.*, 2023; Bourais *et al.*, 2022; Arruda *et al.*, 2022; Soliman *et al.*, 2021; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2019; Guedes *et al.*, 2017).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el perfil de ácidos fenólicos del fruto del cirian, puede ser interesante desde el punto de vista terapéutico. Esto gracias a las altas concentraciones y a los principales ácidos fenólicos encontrados. Según la literatura, algunos de estos ácidos fenólicos como el ferúlico, gálico, vainílico, siringico y cafeico, cuentan con

actividades biológicas en la inhibición de enzimas o blancos terapéuticos relacionados a un gran número de enfermedades cardiovasculares (Rauf *et al.*, 2017; Al Shukor *et al.*, 2013).

7.5. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

La estandarización del método de la inhibición de la ECA incluyó la identificación de los compuestos de reacción: ácido hipúrico (producto de reacción), HHL (sustrato de reacción) y captopril (inhibidor farmacológico). En la Tabla 9 se presentan los datos del tiempo de retención y longitud de onda óptima de cada molécula.

Tabla 9. Datos cromatográficos de los compuestos de reacción de la ECA

Estándar	Tiempo de retención (minutos)	DAD (nm)
Ácido hipúrico	8.205	228
Hipuril-histidil-leucina	15.785	220
Captopril	20.470	214

En las Figuras 26, 27 y 28 se presentan los cromatogramas de los compuestos empleados en la reacción enzimática, así como sus respectivos espectros de absorción.

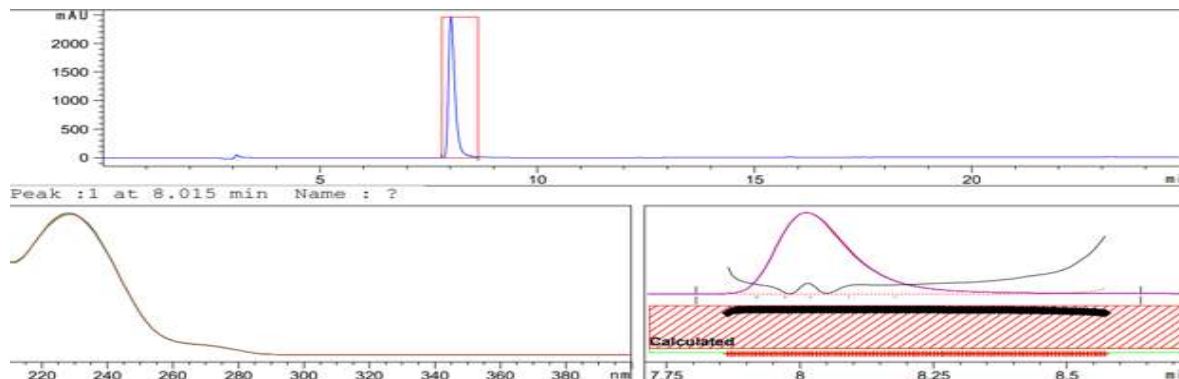


Figura 26. Espectro de absorción del Ácido hipúrico en detector DAD.

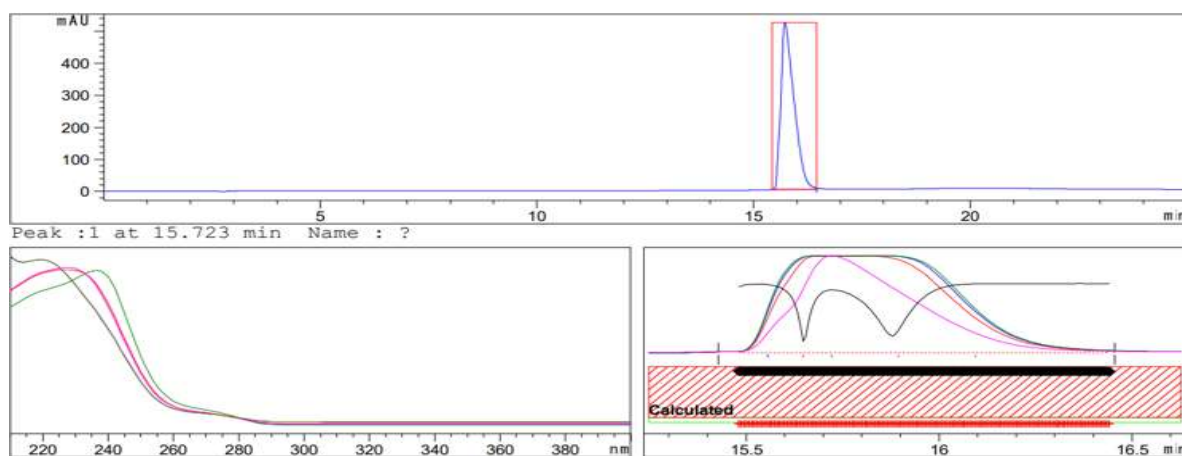


Figura 27. Espectro de absorción del Hipuril-histidil-leucina en detector DAD.

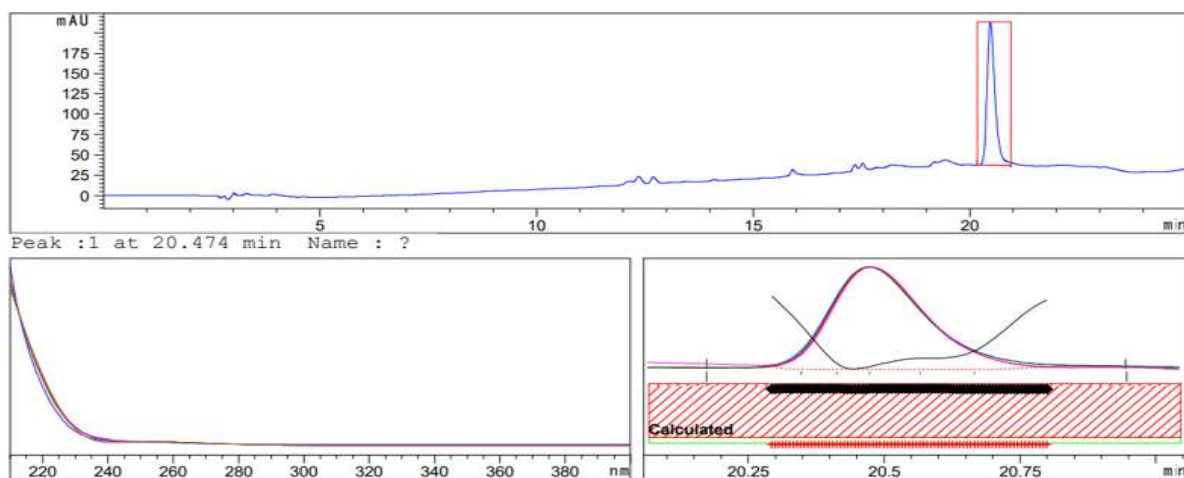


Figura 28. Espectro de absorción del captopril comercial en detector DAD

Para corroborar que las condiciones de reacción fueran las indicadas, se llevó a cabo una reacción (control positivo) añadiendo todos los componentes a excepción del inhibidor (Figura 29). Los picos cromatográficos encontrados se compararon con los estándares previamente identificados. El área generada del ácido hipúrico, se tomó en cuenta para realizar los cálculos de inhibición correspondientes.

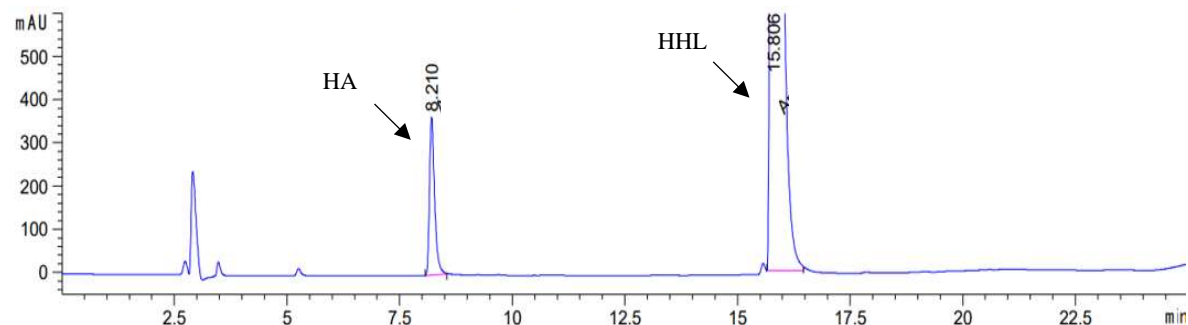


Figura 29. Cromatograma del producto (HA) y sustrato (HHL) de la ECA en detector DAD

De manera simultánea se utilizó el captopril (Sigma-Aldrich) como control positivo de inhibición, calculando la concentración necesaria para obtener el 50% de inhibición de la ECA, dicho ensayo dio como resultado un valor de IC_{50} de $0.217 \pm 0.002 \mu\text{g/mL}$ (Figura 30).

Los datos de % IECA de este estudio, reafirma y concuerda con lo reportado por otros autores, señalando la potente actividad inhibitoria del captopril, misma que se encuentra en los rangos (0.05 – 0.5 $\mu\text{g/mL}$) (Blaszczak *et al.*, 2021; Salem *et al.*, 2020; Akomolafe *et al.*, 2018).

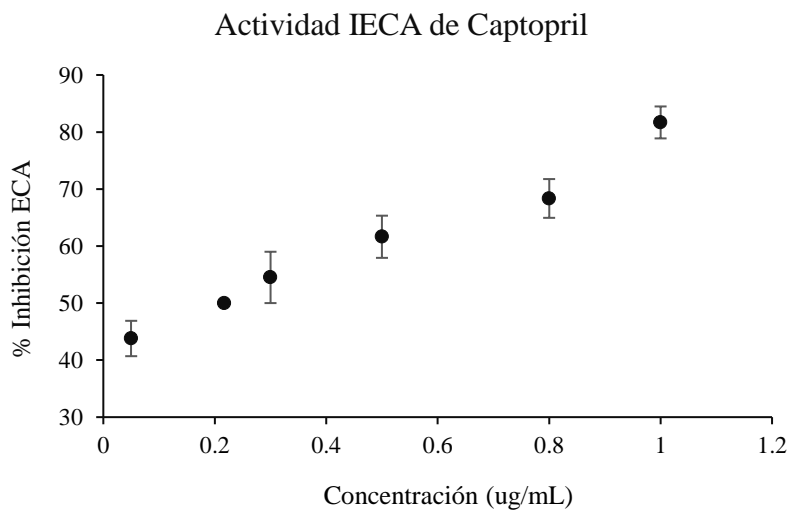


Figura 30. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del captopril

Al mismo tiempo, durante la estandarización de la técnica, se llevaron a cabo pruebas preliminares con los solventes de extracción (mismos porcentajes de extracción) para probar la ausencia de inhibición de la enzima a causa de dichos solventes. Para esto, se sometieron al mismo proceso de evaporación utilizado en los extractos fenólicos. De acuerdo con los resultados en ningún ensayo se generó inhibición de la ECA. Mientras que en concentraciones altas de solvente (sin evaporar), si se presentó la inhibición de la enzima (datos no mostrados).

7.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE CIRIÁN

Este ensayo de inhibición enzimática se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de los extractos fenólicos desde 0.05 a 0.5 mg/mL equivalentes de ácido gálico. En las Figuras 31 – 34 se muestran los gráficos con el porcentaje de inhibición obtenidos de cada extracto fenólico.

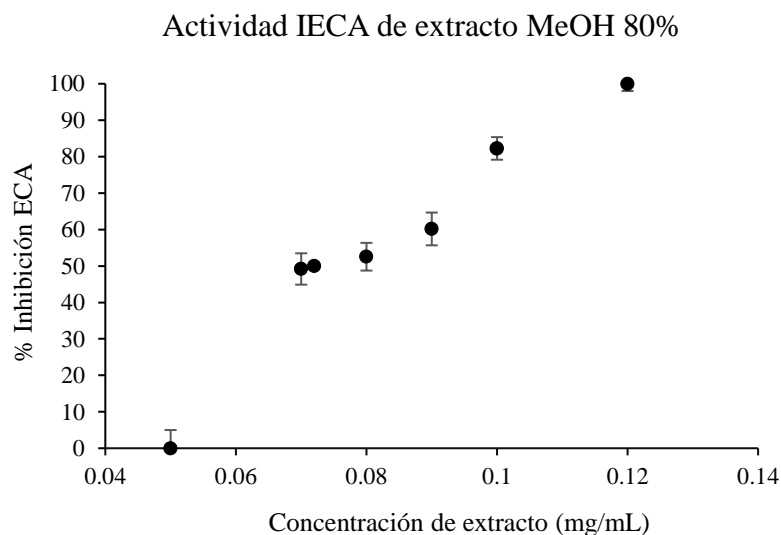


Figura 31. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del extracto metanólico de cirrián

Actividad IECA de extracto EtOH 80%

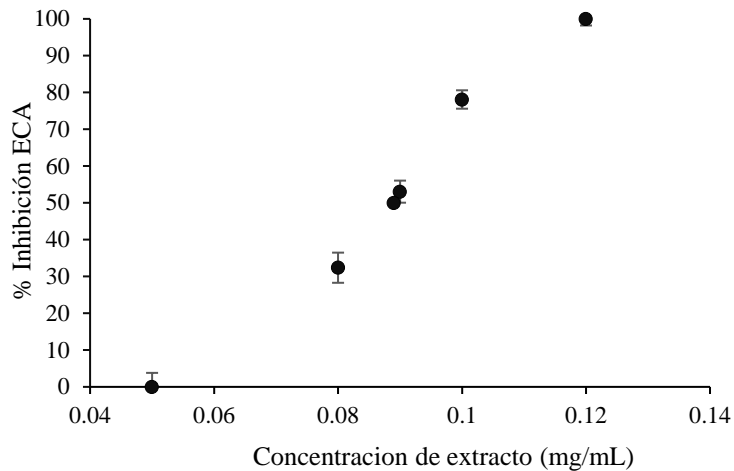


Figura 32. Porcentaje de inhibición de la ECA del extracto EtOH 80% de cirián

Actividad IECA de extracto EtOH 70%

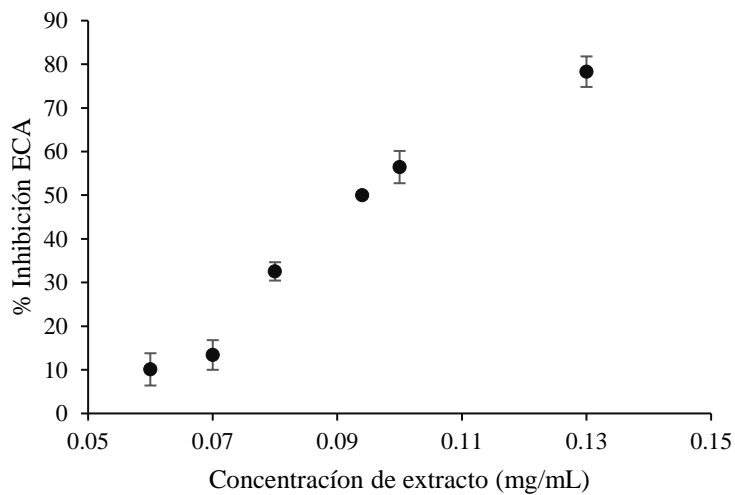


Figura 33. Porcentaje de inhibición de la ECA del extracto EtOH 70% de cirián

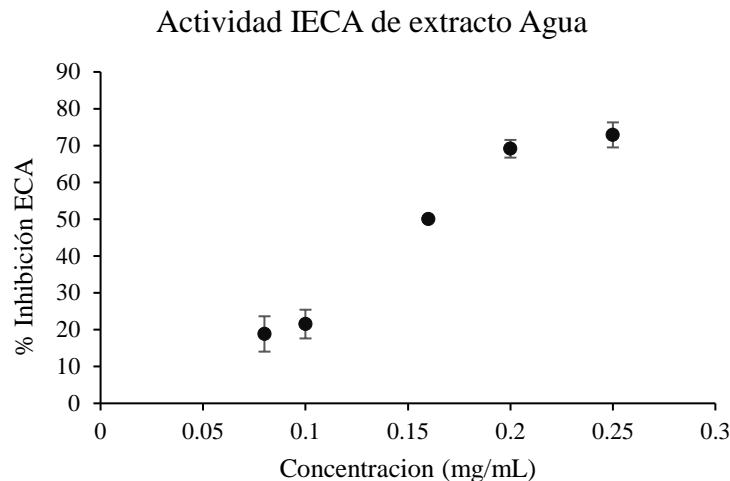


Figura 34. Porcentaje de inhibición de la ECA del extracto acuoso de cirián

Según los datos de inhibición obtenidos por interpolación de los valores de las gráficas concentración-respuesta y por el análisis de varianza, se observó una ligera mayor inhibición por el extracto metanólico. De acuerdo con el análisis estadístico, el extracto hidrometanólico, mostro diferencias significativas con el resto de los extractos evaluados.

Esto se debe posiblemente a la capacidad de interacción entre los grupos hidroxilo con los iones de zinc del sitio activo de la ECA. Los extractos metanólicos o de polaridad media cuentan con un mayor número de estos grupos funcionales (Ojeda *et al.*, 2010; Actis-Goretta *et al.*, 2006). Esta afirmación se comprobó con la correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad de inhibición de estos sobre la actividad de la ECA. De acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman ($r = -0.779$, $p = 0.003$) existe una relación alta entre estas dos variables. Por lo tanto, el alto contenido de fenoles del extracto metanólico propiciaron una mayor inhibición de la ECA con una IC_{50} más baja que el resto de los extractos fenólicos.

Los resultados comparativos de inhibición de la ECA se presentan en la Figura 35.

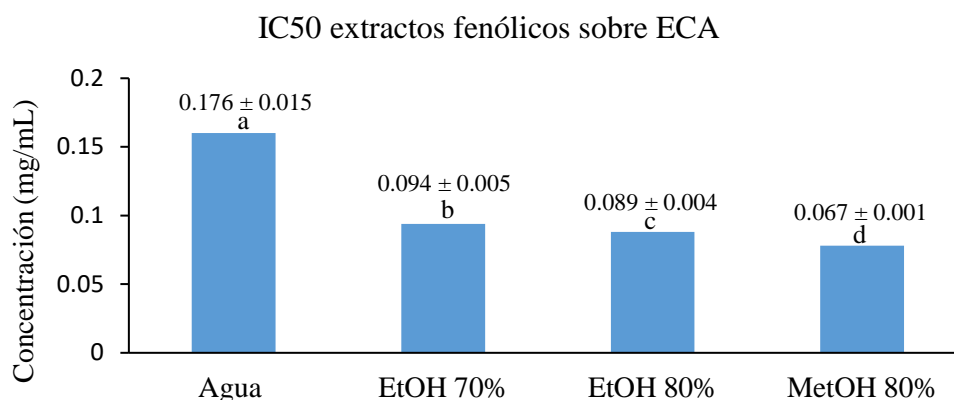


Figura 35. Concentración media inhibitoria (IC₅₀) de los extractos fenólicos de cirrián sobre la actividad ECA.

Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. Los valores que no comparten las mismas letras son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

De manera similar la determinación de la actividad inhibitoria de la ECA, también ha sido evaluada en otras plantas como: agrecejo (*Berberis vulgaris*), estrellada espinosa (*Pallenis spinosa*), kenaf (*Hibiscus cannabinus*), jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), ortosifon (*Orthosiphon stamineus*) y una diversidad de flores comestibles. La gran mayoría de estas alternativas terapéuticas se han utilizado y han generado un gran interés como uso medicinal desde antiguas generaciones. Es importante resaltar que no todas estas opciones naturales son de consumo diario o habitual. Los resultados reportados en estos ensayos *in vitro* indican que la actividad IECA se le atribuye principalmente a los compuestos fenólicos (Gao *et al.*, 2022; Amrani-Allalou *et al.*, 2021; Sensu *et al.*, 2021; Salem *et al.*, 2020; Shafaei *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2013).

Aunado a lo anterior, también se han reportado extractos vegetales provenientes de frutos comestibles con actividad IECA. Algunos de los ejemplos de estos ensayos *in vitro* han sido probados en los frutos como: litchi (*Litchi chinensis*), kiwiberry (*Actinidia arfuta*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus limon*), pitanga roja (*Eugenia uniflora*), arandano (*Solanum lycopersicum*) y kiwi silvestre (*Actinidia macrosperma*). Esta actividad biológica se atribuye en gran medida a los metabolitos secundarios que incluyen polifenoles, carotenoides, terpenoides, alcaloides, entre otros. Lo que exhibe efectos antioxidantes,

antiinflamatorios, antimicrobianos y cardioprotectores (Blaszczak *et al.*, 2021; Figueira *et al.*, 2021; Camara *et al.*, 2020; Hettihewa *et al.*, 2018; Kessy *et al.*, 2018).

El porcentaje de inhibición de la ECA de este trabajo se logró utilizando concentraciones menores de extractos fenólicos, en comparación a los obtenidos por otros autores (Mayasankaravalli *et al.*, 2020; Kessy *et al.*, 2018; Simaratanamongkol *et al.*, 2014; Park & Jhon 2010), quienes reportan IC₅₀ mayores de 0.5 mg/mL de extractos fenólicos.

Este criterio puede ser fundamentado debido a las variaciones en los métodos de extracción de los compuestos fenólicos, a la naturaleza del material biológico y la presencia de otros metabolitos afines al solvente de extracción.

Es importante señalar que actualmente no existen reportes sobre la actividad inhibitoria de la ECA en los extractos fenólicos de cirrián. Sin embargo, con relación a otras especies de la familia *Bignoniaceae*, Akomolafe *et al.* (2018), evaluaron el efecto que ejerce el extracto acuoso de la parte área del árbol (hojas) de *Newbouldia laevis* sobre la actividad de la ECA, y reportaron una inhibición del 50 % a una concentración de 0.130 mg/mL de extractos fenólicos. Esta actividad IECA se encuentra en los mismos rangos de concentración obtenidos de *Crescentia alata* de esta investigación. Lo que sugiere que ambas especies contienen niveles apreciables de flavonoides y ácidos fenólicos. Se ha demostrado que estos compuestos tienen múltiples efectos biológicos y desempeñan un papel fundamental en el tratamiento y control de enfermedades degenerativas como las cardiovasculares (Rahman *et al.*, 2021).

7.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA FOSFODIESTERASA DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE CIRIÁN

La enzima fosfodiesterasa es un blanco terapéutico muy importante en las farmacoterapias actuales aprobadas por la FDA (administración de alimentos y medicamentos, por sus siglas en inglés) para tratar la hipertensión arterial pulmonar. El uso de fármacos para inhibir la actividad de esta enzima son una de las alternativas más utilizadas durante las últimas décadas (Zolty, 2021). Estos tratamientos farmacológicos inhiben la acción de la PDE (reduciendo la degradación de cAMP y cGMP) ejerciendo así una acción terapéutica sobre el corazón y pulmones. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, el uso prolongado

de estos fármacos afecta directamente algunos órganos vitales como los riñones e hígado, ocasionando múltiples efectos secundarios (Hoeper *et al.*, 2017; Rauf *et al.*, 2017; Maurice *et al.*, 2014).

Diversas investigaciones han propuesto el uso de compuestos fenólicos como potenciales inhibidores de la enzima fosfodiesterasa y por ende como una alternativa prometedora en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar.

En la prueba de inhibición enzimática de la PDE de este trabajo, se utilizaron los extractos fenólicos de cirrián con las concentraciones de 0.08 – 1 mg/mL equivalentes de ácido gálico y como control positivo de inhibición el EDTA de 1 – 6 mM. En las Figuras 36 – 40 se presentan los gráficos con el porcentaje de inhibición de la PDE obtenidos en cada ensayo.

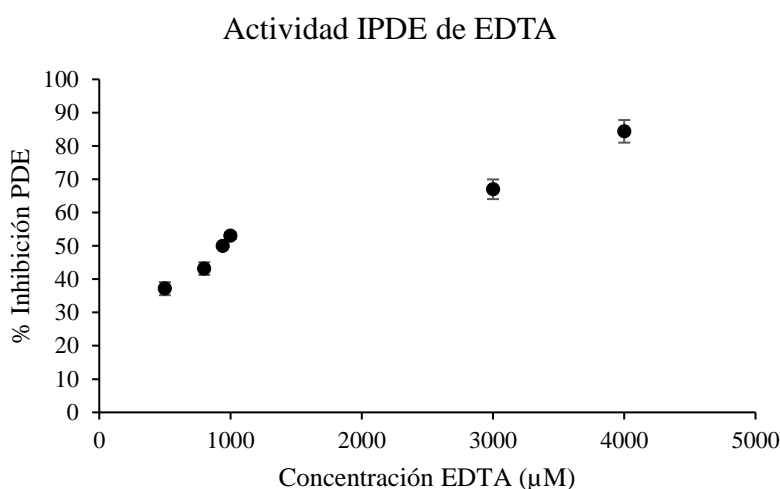


Figura 36. Porcentaje de inhibición de la PDE del inhibidor EDTA

Por otra parte, para confirmar que las condiciones de reacción fueran las indicadas, se llevó a cabo una reacción (control positivo) añadiendo todos los componentes a excepción del inhibidor (EDTA). La absorbancia obtenida del producto final de la reacción (4-nitrofenol), se tomó en cuenta para realizar los cálculos de inhibición de los extractos fenólicos evaluados.

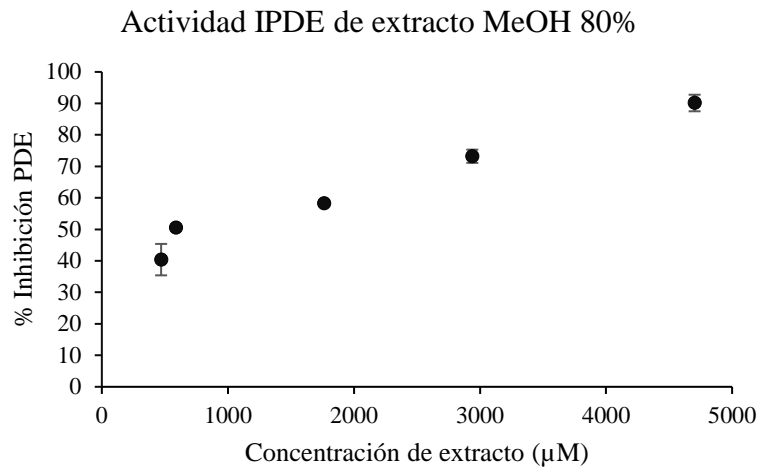


Figura 37. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto MeOH 80% de cirián

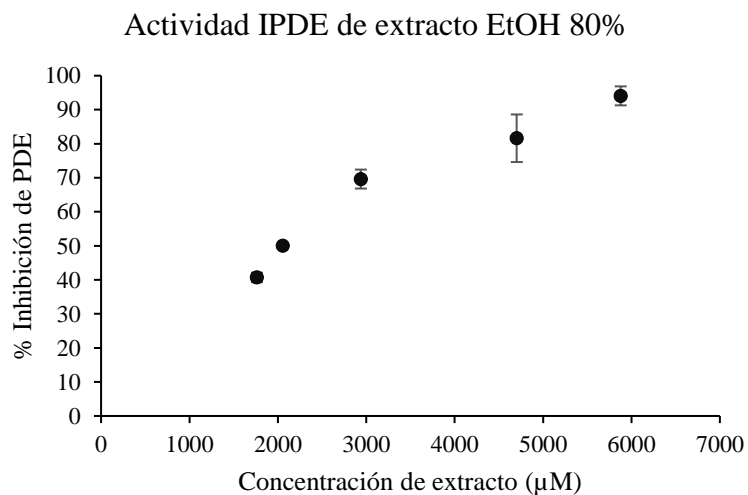


Figura 38. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto EtOH 80% de cirián

Al igual que el ensayo anterior de la inhibición de la ECA, se llevaron a cabo pruebas preliminares con los solventes de extracción evaporados y sin evaporar. En los solventes evaporados, no se presentó inhibición alguna, mientras que, en los solventes sin evaporar se generó una inhibición de la enzima fosfodiesterasa (datos no mostrados).

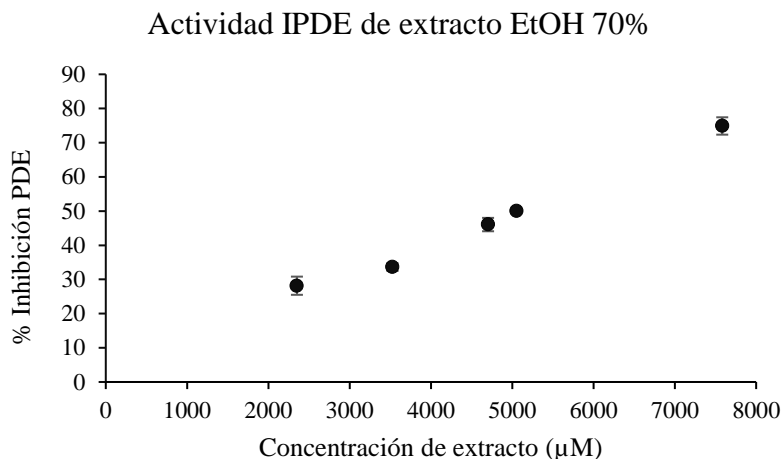


Figura 39. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto EtOH 70% de cirrián

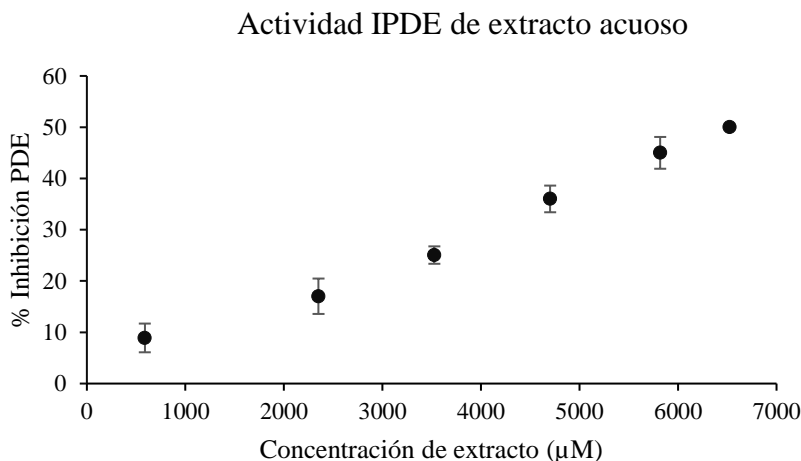


Figura 40. Porcentaje de inhibición de la PDE del extracto acuoso de cirrián

La concentración de los extractos de estudio se reportó en μM con la finalidad de comparar con los resultados obtenidos con el inhibidor EDTA y lo reportado por otros autores en trabajos similares.

De acuerdo con los datos de inhibición obtenidos, el extracto metanólico presentó una mayor inhibición enzimática. Esto se corroboró mediante el análisis ANOVA, el cual estableció que el extracto hidrometanólico, mostró diferencias significativas con el resto de los extractos evaluados (Figura 41). La concentración media inhibitoria (IC_{50}) de dicho

extracto fue de $574.17 \pm 29.1 \mu\text{M}$ equivalentes de ácido gálico, siendo incluso más baja que la encontrada en la prueba del inhibidor EDTA. Estos resultados resaltan el potencial terapéutico que puede tener el consumo de los extractos fenólicos del cirrián en personas con problemas de inflamación en el sistema respiratorio o con hipertensión pulmonar.

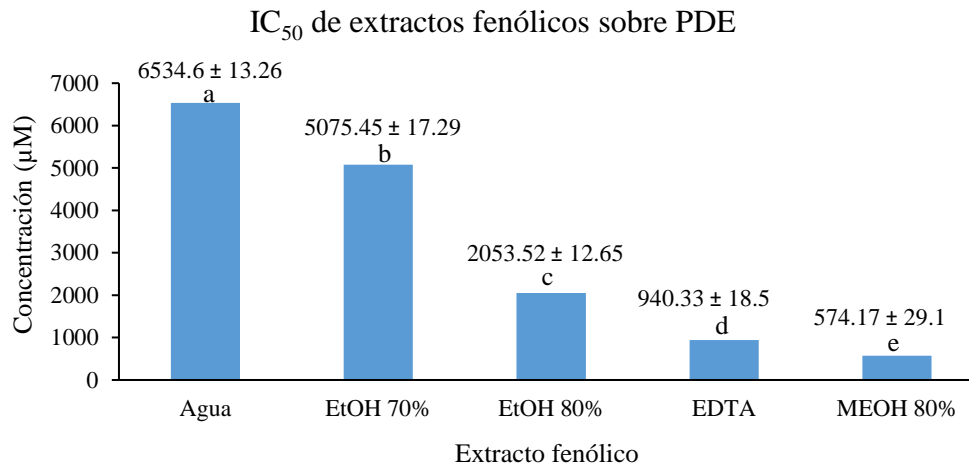


Figura 41. Concentración media inhibitoria (IC₅₀) de los extractos fenólicos de cirrián sobre la actividad PDE.

Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. Los valores que no comparten las mismas letras son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

De manera similar la determinación de la actividad inhibitoria de la enzima fosfodiesterasa ha sido evaluada en diversas plantas como *Pistacia integerrima*, *Ilex pubescens*, *Heterophragma adenophyllum*, *Terminalia catappa*. La mayoría de estas especies vegetales han sido investigadas debido al uso medicinal empleado por las personas de sus respectivas regiones. Es importante mencionar que los extractos obtenidos fueron en su mayoría a partir de extracciones metanólicas y acuosas utilizando diferentes partes de las plantas como tallos, raíces, hojas y frutos (Rauf *et al.*, 2022; Shah *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2017; Oyeleye *et al.*, 2018).

Los resultados reportados en el presente ensayo, en especial del extracto metanólico, se encuentra en los mismos valores publicados por los autores anteriormente mencionados en especial Shah *et al.* (2020) y Oyeleye *et al.* (2018). Estos últimos mencionan el importante uso de la almendra (*Terminalia catappa*) en la medicina tradicional nigeriana. Según lo reportado por este grupo de investigadores, la capacidad de inhibición de la enzima

fosfodiesterasa se le atribuye a los altos niveles de compuestos fenólicos de la hoja y corteza del almendro.

En este trabajo la actividad inhibitoria de la enzima fosfodiesterasa puede estar asociada a la acumulación de compuestos fenólicos, especialmente de características hidrofóbicas como el ácido cafeico y ferúlico. En cuanto a la relación entre el contenido de fenoles totales y la actividad inhibitoria de la PDE, fue similar a la presentada en el ensayo anterior. Según con el coeficiente de correlación de Spearman ($r = -0.774$, $p = 0.004$) existe una relación alta entre estas dos variables evaluadas. De modo que, el alto contenido de fenoles que se obtuvo en la extracción con el solvente hidrometanólico, generó una mayor inhibición de la PDE con una IC_{50} más baja que el resto de los extractos fenólicos.

De manera general, los fenólicos del fruto de cirrián pueden ser inhibidores de la PDE, lo que conduciría a identificar nuevos candidatos a fármacos contra los trastornos asociados a este blanco terapéutico.

8. CONCLUSIONES

El mayor contenido de fenoles totales se extrajo con el metanol al 80%. Por su parte, la fracción fenólica que presentó menor contenido fenólico fue la acuosa esto posiblemente por la ausencia de fenólicos de características hidrofílicas.

En la capacidad antioxidante *in vitro* evaluada por DPPH, ABTS e inhibición del radical hidroxilo se presentó el mismo comportamiento anterior, dando como resultado una mayor capacidad antioxidante en el extracto metanólico.

Los ácidos fenólicos predominantes en el fruto de cirián fueron de polaridad alta a media de acuerdo con el análisis cromatográfico, destacándose los ácidos 4-hidroxibenzoico, vanílico, trans-cinámico, cafeico y ferúlico. En los cuatro extractos fenólicos se mostró el mismo perfil cromatográfico, siendo el extracto metanólico el que mostró mayor concentración en los cinco ácidos fenólicos encontrados.

En cuanto a la actividad biológica, el extracto metanólico demostró tener una actividad inhibitoria tanto de la enzima convertidora de angiotensina como de la fosfodiesterasa significativamente mayor que el resto de los extractos fenólicos. Esto sugiere tal y como lo indica la literatura que los principales responsables de las inhibiciones enzimáticas sean los compuestos fenólicos de una polaridad media.

9. RECOMENDACIONES

Es de mencionar que los ácidos fenólicos encontrados en el análisis cromatográfico, mostraron un perfil interesante y concentraciones altas. Es por esto, que se recomienda realizar un estudio fitoquímico completo que ayude a identificar todos los compuestos fenólicos presentes en la pulpa del cirrián.

En esta investigación se mostró que la actividad biológica de los extractos fenólicos fue muy alta al inhibir ambas enzimas. Por lo tanto, sería interesante probar un sistema de separación por cromatografía en columna, llevando a cabo una purificación de los ácidos fenólicos encontrados y probar su actividad biológica de cada uno por separado.

Así mismo, con relación a los parámetros que se encontraron en la inhibición de las enzimas, podría evaluarse la actividad biológica de los extractos fenólicos en un sistema *in vivo*. Para esto, se utilizaría un roedor como un sistema de prueba, induciendo algún tipo de hipertensión y posteriormente evaluando el efecto hipotensor de los extractos fenólicos sobre el animal.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., & Fraga, C. G. (2006). Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(1), 229-234.
- Akomolafe, S. A., Oyeleye, S. I., Olasehinde, T. A., & Oboh, G. (2018). Phenolic characterization, antioxidant activities, and inhibitory effects of *Physalis angulata* and *Newbouldia laevis* on enzymes linked to erectile dysfunction. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 645-654.
- Al Shukor, N., Van Camp, J., Gonzales, G. B., Staljanssens, D., Struijs, K., Zotti, M. J., Raes, K., & Smagghe, G. (2013). Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: a study of structure activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(48), 11832-11839.
- Ambriz-Pérez, DL, Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, EP y Heredia, JB (2016). Compuestos fenólicos: Alternativa natural en el tratamiento de la inflamación. Una revisión. *Cogent Food & Agriculture*, *2* (1).
- Amrani-Allalou, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Izzo, L., Arkoub-Djermoune, L., Freidja, M. L., Mouhoubi, K., Madani, K., & Tenore, G. C. (2021). Phenolic compounds from an Algerian medicinal plant (*Pallenis spinosa*): Simulated gastrointestinal digestion, characterization, and biological and enzymatic activities. *Food & Function*, *12*(3), 1291-1304.
- Anwuchaepe, A. U., Onyegbule, F. A., Ajaghaku, D., Nwafor, F., & Okoye, F. B. C. (2017). Evaluation of the in vivo antioxidant, toxicological and chromatographical profiling of leaf extract and fractions of *Crescentia cujete* Linn. (Bignoniaceae). *Asian Pacific Journal of Health Sciences*, *4*(3), 43-54.
- Arenas, F. S. (2004). Etnobotánica y usos potenciales del Cirián (*Crescentia alata*, HBK) en el estado de Morelos. *Polibotánica*, (18), 13-31.
- Arruda, H. S., Araújo, M. V. L., & Marostica Junior, M. R. (2022). Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. *Food Chem (Oxf)*, *5*, 100148.

- Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(1), 317S-325S.
- Aumeeruddy, M. Z., & Mahomoodally, M. F. (2020). Traditional herbal therapies for hypertension: A systematic review of global ethnobotanical field studies. *South African Journal of Botany*, *135*, 451-464.
- Autore, G., Rastrelli, L., Lauro, M. R., Marzocco, S., Sorrentino, R., Sorrentino, U., . . . Aquino, R. (2001). Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sciences*, *70*(5), 523-534.
- Ayala-Mata, F., Barrera-Mendoza, C. C., Cortés-Rojo, C., Montoya-Pérez, R. D. C., García-Pérez, M. E., & Rodríguez-Orozco, A. R. (2019). Antioxidants in asthma: Polyphenols. *Medicina Interna de México*, *35*(2), 223-234.
- Aydin, F., Turkoglu, V., & Bas, Z. (2021). Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme (ACE) from sheep lung. *Mol Biol Rep*, *48*(5), 4191-4199.
- Azad, N., Rojanasakul, Y., & Vallyathan, V. (2008). Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *Journal of Toxicology and Environ Health B Crit Rev*, *11*(1), 1-15.
- Balogun, F. O., & Sabiu, S. (2021). A Review of the Phytochemistry, Ethnobotany, Toxicology, and Pharmacological Potentials of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Evid Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 6683708.
- Barbosa-Filho, J. M., Martins, V. K., Rabelo, L. A., Moura, M. D., Silva, M. S., Cunha, E. V., ... & Medeiros, I. A. (2006). Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE): A review between 1980-2000. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *16*(3), 421-446.
- Barnes, H., Brown, Z., Burns, A., & Williams, T. (2019). Phosphodiesterase 5 inhibitors for pulmonary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *1*(1), Cd012621.
- Batool, R., Khan, M. R., Sajid, M., Ali, S., & Zahra, Z. (2019). Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R.Br. *BMC Chemistry*, *13*(1), 32.

- Beltrán-Gámez, M. E., Sandoval-Zárate, J., & Pulido, T. (2015). Inhibidores de fosfodiesterasa-5 para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. *Archivos de cardiología de México*, 85(3), 215-224.
- Benavides-Luna, H. M. (2017). Fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar. *Revista Colombiana de Cardiología*, 24, 11-15.
- Benjakul, S., Kittiphattanabawon, P., Sumpavapol, P., & Maqsood, S. (2014). Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3026-3037.
- Blaszczak, W., Latocha, P., Jeż, M., & Wiczowski, W. (2021). The impact of high-pressure processing on the polyphenol profile and anti-glycaemic, anti-hypertensive and anti-cholinergic activities of extracts obtained from kiwiberry (*Actinidia arguta*) fruits. *Food Chemistry*, 343, 128421.
- Borghi, C., & Cicero, A. F. G. (2017). Nutraceuticals with a clinically detectable blood pressure-lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 163-171.
- Bourais, I., Elmarrkechy, S., Taha, D., Badaoui, B., Mourabit, Y., Salhi, N., Alshahrani, M. M., Al Awadh, A. A., Bouyahya, A., Goh, K. W., Tan, C. S., El Hajjaji, S., Dakka, N., & Iba, N. (2022). Comparative Investigation of Chemical Constituents of Kernels, Leaves, Husk, and Bark of *Juglans regia* L., Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis and Evaluation of Their Antioxidant, Antidiabetic, and Anti-Inflammatory Activities. *Molecules*, 27(24).
- Brandon, N.J. & West, A.R. (2014). Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in the CNS” en “Cyclic-nucleotide phosphodiesterases in the central nervous system, editado por Wiley, New Jersey (EE.UU.), pp 1-45.
- Bueno-Herrera, M., & Pérez-Magariño, S. (2020). Validation of an extraction method for the quantification of soluble free and insoluble bound phenolic compounds in wheat by HPLC-DAD. *Journal of Cereal Science*, 93, 102984.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors*, 6(4), 391-397.
- Camara, J. S., Albuquerque, B. R., Aguiar, J., Corrêa, R. C. G., Gonçalves, J. L., Granato, D., Pereira, J. A. M., Barros, L., & Ferreira, I. (2020). Food Bioactive Compounds

- and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. *Foods*, 10(1).
- Card, G. L., Blasdel, L., England, B. P., Zhang, C., Suzuki, Y., Gillette, S., Fong, D., Ibrahim, P. N., Artis, D. R., Bollag, G., Milburn, M. V., Kim, S. H., Schlessinger, J., & Zhang, K. Y. (2005). A family of phosphodiesterase inhibitors discovered by cocrystallography and scaffold-based drug design. *Nature Biotechnology*, 23(2), 201-207.
- Cervantes-Paz, B., Ornelas-Paz, J. D. J., Gardea-Béjar, A. A., Yahia, E. M., Rios-Velasco, C., Zamudio-Flores, P. B., ... & Ibarra-Junquera, V. (2018). Compuestos fenólicos de tejocote (*Crataegus spp.*): su actividad biológica asociada a la protección de la salud humana. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(3), 339-349.
- Chandrasekara, A. (2018). Ácidos fenólicos. Módulo de referencia en ciencia de los alimentos. Department of Applied Nutrition, Wayamba University of Sri Lanka, Makandura, Gonawila, Sri Lanka.
- Cheng, W. J., Amal, K. G., Lan, W., Ming, L. X., Jing, P. P., & Dong, H. C. (2013). Far infrared assisted kenaf leaf tea preparation and its effect on phenolic compounds, antioxidant and ACE inhibitory activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(17), 1121-1128.
- Chikezie, P. C., Ibegbulem, C. O., & Mbagwu, F. N. (2015). Bioactive principles from medicinal plants. *Research Journal of Phytochemistry*, 9(3), 88-115.
- Colín-Chávez, C., Virgen-Ortiz, J. J., Serrano-Rubio, L. E., Martínez-Téllez, M. A., & Astier, M. (2020). Comparison of nutritional properties and bioactive compounds between industrial and artisan fresh tortillas from maize landraces. *Current Research in Food Science*, 3, 189-194.
- Contra, H. S., Estrada, L. R., Chávez, A. G., & y Hernández, H. H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, 19(1), 21-29.
- Corrales, C. V., Fliedel, G., Perez, A. M., Servent, A., Prades, A., Dornier, M., . . . Vaillant, F. (2017). Physicochemical characterization of jicaro seeds (*Crescentia alata* H.B.K.): A novel protein and oleaginous seed. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 84-92.

- Corrales, C. V., Lebrun, M., Vaillant, F., Madec, M. N., Lortal, S., Pérez, A. M., & Fliedel, G. (2017). Key odor and physicochemical characteristics of raw and roasted jicaro seeds (*Crescentia alata* K.H.B.). *Food Research International*, 96, 113-120.
- Costa, D. C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Ramos, F., Castilho, M. C., & Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 336-354.
- Cú-Cañetas, T., Betancur Ancona, D., Gallegos Tintoré, S., Sandoval Peraza, M., & Chel Guerrero, L. (2015). Estudios de inhibición in vitro de la enzima convertidora de angiotensina-I, efectos hipotensor y antihipertensivo de fracciones peptídicas de *V. unguiculata*. *Nutrición Hospitalaria*, 32, 2117-2125
- Cuevas-Juárez, E., Yuriar-Arredondo, K. Y., Pío-León, J. F., Montes-Avila, J., López-Angulo, G., Páz Díaz-Camacho, S., & Delgado-Vargas, F. (2014). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *Journal of Functional Foods*, 9, 78-88.
- da Silva Lima, V., da Conceição Santos, R., Ramos, MLH, da Silva, RE, do Nascimento Nunes, JV, Ramos, RM, ... & da Silva, GC (2020). Aspectos fitoquímicos y potencial biológico de *Crescentia*: una revisión narrativa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 12 (9), e3886-e3886.
- Das, N., Islam, M. E., Jahan, N., Islam, M. S., Khan, A., Islam, M. R., & Parvin, M. S. (2014). Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 45.
- Dzau, V. J. (2001). Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*, 37(4), 1047-1052.
- Emmendoerffer, A., Hecht, M., Boeker, T., Mueller, M., & Heinrich, U. (2000). Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. *Toxicol Letters*, 112-113, 185-191.
- Fejér, J., Kron, I., Grul'ová, D., & Eliašová, A. (2020). Seasonal Variability of *Juniperus communis* L. Berry Ethanol Extracts: 1. In Vitro Hydroxyl Radical Scavenging Activity. *Molecules*, 25(18).

- Ferrario, C. M., & Mullick, A. E. (2017). Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacol Research*, 125(Pt A), 57-71.
- Field, D. & Newton, G. (2013). Las acciones antihipertensivas de los polifenoles de cacao - una revisión. *Temas Actuales en la Investigación Nutraceutica*, 11 (4).
- Figueira, J. A., Porto-Figueira, P., Berenguer, C., Pereira, J. A. M., & Câmara, J. S. (2021). Evaluation of the Health-Promoting Properties of Selected Fruits. *Molecules*, 26(14).
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., I. Koo, S., & Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US Foods (Vol. 24).
- Francis, S. H., Turko, I. V., & Corbin, J. D. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 65, 1-52.
- Gangwar, M., Gautam, M. K., Sharma, A. K., Tripathi, Y. B., Goel, R. K., & Nath, G. (2014). Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippinensis* fruit extract on human erythrocytes: an in vitro study. *The Scientific World Journal*, 2014, 279451.
- Gao, Y., Liu, X., Yang, W., Li, X., Li, M., & Li, F. (2022). Dual inhibition of the renin and angiotensin converting enzyme activities of aqueous extracts of 22 edible flower petals. *RSC Advances*, 12(7), 4191-4198.
- García-Pérez, M.-E., Royer, M., Duque-Fernandez, A., Diouf, P. N., Stevanovic, T., & Pouliot, R. (2010). Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 251-258.
- Garjón, J., Saiz, L. C., Azparren, A., Elizondo, J. J., Gaminde, I., Ariz, M. J., & Erviti, J. (2017). First-line combination therapy versus first-line monotherapy for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Reviews*, 1(1), Cd010316.
- Goleniowski M., Bonfill M., Cusido R., & Palazón J. (2013) Ácidos fenólicos. En: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) *Productos naturales*. Springer, Berlín, Heidelberg.
- Goncalves, S. y Romano, A. (2017). Propiedades inhibitoras de compuestos fenólicos frente a enzimas relacionadas con enfermedades humanas. *Compuestos Fenólicos-Actividad Biológica*, 40 (5), 100-120.

- Gori, A., Ferrini, F., Marzano, M. C., Tattini, M., Centritto, M., Baratto, M. C., Pogni, R., & Brunetti, C. (2016). Characterisation and Antioxidant Activity of Crude Extract and Polyphenolic Rich Fractions from *C. incanus* Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8).
- Guedes, M. N. S., Rufini, J. C. M., Marques, T. R., Melo, J. O. F., Ramos, M. C. P., & Viol, R. E. (2017). Minerals and phenolic compounds of cagaita fruits at different maturation stages (*Eugenia dysenterica*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39.
- Hamid., Thakur, N, S., & Thakur, A. (2020). Microencapsulation of wild pomegranate flavado phenolics by lyophilization: Effect of maltodextrin concentration, structural morphology, functional properties, elemental composition and ingredient for development of functional beverage. *LWT- Food Science and Technology*, 133, 110077.
- Harris, CS, Mo, F., Migahed, L., Chepelev, L., Haddad, PS, Wright, JS, ... & Bennett, SA (2007). Los fenólicos vegetales regulan el crecimiento y la supervivencia de las células neoplásicas: una estructura-actividad cuantitativa y un análisis bioquímico. *Revista Canadiense de Fisiología y Farmacología*, 85 (11), 1124-1138.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501-513.
- Herrera-Pool, E., Ramos-Díaz, A. L., Lizardi-Jiménez, M. A., Pech-Cohuo, S., Ayora-Talavera, T., Cuevas-Bernardino, J. C., García-Cruz, U., & Pacheco, N. (2021). Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. *Ultrason Sonochem*, 76, 105658.
- Hettihewa, S. K., Hemar, Y., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Flavonoid-Rich Extract of *Actinidia macrosperma* (A Wild Kiwifruit) Inhibits Angiotensin-Converting Enzyme In Vitro. *Foods*, 7(9).
- Hoepfer, M. M., Ghofrani, H. A., Grünig, E., Klose, H., Olschewski, H., & Rosenkranz, S. (2017). Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl International*, 114(5), 73-84.
- Iskedjian, M., Einarson, T. R., MacKeigan, L. D., Shear, N., Addis, A., Mittmann, N., & Ilersich, A. L. (2002). Relationship between daily dose frequency and adherence to

- antihypertensive pharmacotherapy: evidence from a meta-analysis. *Clin Ther*, 24(2), 302-316.
- Iza Stoll, A. (2006). Tratamiento de la hipertensión arterial primaria. *Acta Médica Peruana*, 23(2), 93-99.
- James, P. A., Oparil, S., Carter, B. L., Cushman, W. C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., Lackland, D. T., LeFevre, M. L., MacKenzie, T. D., Ogedegbe, O., Smith, S. C., Jr., Svetkey, L. P., Taler, S. J., Townsend, R. R., Wright, J. T., Jr., Narva, A. S., & Ortiz, E. (2014). 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*, 311(5), 507-520.
- Jáuregui, A. M. M., & Escudero, F. R. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Horizonte Médico*, 7(1), 23-31.
- Jordan, J., Kurschat, C., & Reuter, H. (2018). Arterial Hypertension. *Dtsch Arztebl International*, 115(33-34), 557-568.
- Jose, J. C., Oyong, G., Ajero, M. D., Chiong, I., Cabrera, E., & Tan, M. C. S. (2020). Insights on the chemical constituents and hydrothermal carbonization of crescentia cujete l. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 24(1), 134-145.
- Juárez-Pérez, J. C., & Cabrera-Luna, J. A. (2019). Plantas para afecciones respiratorias comercializadas en tres mercados de la ciudad de Santiago de Querétaro. *Polibotánica*, 167-178.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.
- Ke, H., & Wang, H. (2007). Crystal structures of phosphodiesterases and implications on substrate specificity and inhibitor selectivity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(4), 391-403.
- Kessy, H. N., Wang, K., Zhao, L., Zhou, M., & Hu, Z. (2018). Enrichment and biotransformation of phenolic compounds from litchi pericarps with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition activity. *LWT-Food Science and Technology*, 87, 301-309.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.

- Kondhare, D., & Lade, H. (2017). Phytochemical profile, aldose reductase inhibitory, and antioxidant activities of Indian traditional medicinal *Coccinia grandis* (L.) fruit extract. *3 Biotech*, 7(6), 378.
- Kumar, B. R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349-364.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732.
- Laurent, S. (2017). Antihypertensive drugs. *Pharmacol Res*, 124, 116-125.
- Lee, M. E., Markowitz, J., Lee, J.-O., & Lee, H. (2002). Crystal structure of phosphodiesterase 4D and inhibitor complex1. *FEBS Letters*, 530(1-3), 53-58.
- Liu, Z., Lin, Z., Chen, S., Wang, L., & Xian, S. (2017). Rapid Screening of Potential Phosphodiesterase Inhibitors from the Roots of *Ilex pubescens* Hook. et Arn. Using a Combination of Ultrafiltration and LC-MS. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2749643.
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. (2013). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 687-695.
- Malenfant, S., Lebret, M., Breton-Gagnon, É., Potus, F., Paulin, R., Bonnet, S., & Provencher, S. (2021). Exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension: insight into central and peripheral pathophysiological mechanisms. *European Respiratory Review*, 30(160).
- Manousi, N., Sarakatsianos, I., & Samanidou, V. (2019). 10 - Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Engineering Tools in the Beverage Industry* (pp. 283-314). Woodhead Publishing.
- Manrique, C., Lastra, G., Gardner, M., & Sowers, J. R. (2009). The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *The Medical clinics of North America*, 93(3), 569-582.

- Maurice, D. H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., & Manganiello, V. C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(4), 290-314.
- Mayasankaravalli, C., Deepika, K., Esther Lydia, D., Agada, R., Thagriki, D., Govindasamy, C., Chinnadurai, V., Othman Gatar, O. M., Khusro, A., Kim, Y. O., & Kim, H.-J. (2020). Profiling the phyto-constituents of Punica granatum fruits peel extract and accessing its in-vitro antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3228-3234.
- Mayeux, J. D., Pan, I. Z., Dechand, J., Jacobs, J. A., Jones, T. L., McKellar, S. H., Beck, E., Hatton, N. D., & Ryan, J. J. (2021). Management of Pulmonary Arterial Hypertension. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 15(1), 2.
- McLaughlin, V. V., Archer, S. L., Badesch, D. B., Barst, R. J., Farber, H. W., Lindner, J. R., Mathier, M. A., McGoon, M. D., Park, M. H., Rosenson, R. S., Rubin, L. J., Tapson, V. F., & Varga, J. (2009). ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(17), 1573-1619.
- Moniruzzaman, M., Asaduzzaman, M., Hossain, M. S., Sarker, J., Rahman, S. M., Rashid, M., & Rahman, M. M. (2015). In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of methanolic fruit extract of Phyllanthus acidus. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 15, 403.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7).
- Natesh, R., Schwager, S. L., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551-554.

- Nowicka, A., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., & Fecka, I. (2019). Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch. *Food Chemistry*, 270, 32-46.
- Odukoya, J. O., Mmutlane, E. M., & Ndinteh, D. T. (2022). Ethnopharmacological Study of Medicinal Plants Used for the Treatment of Cardiovascular Diseases and Their Associated Risk Factors in sub-Saharan Africa. *Plants (Basel)*, 11(10).
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., & Alvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 7-10.
- Oksuz, E. (2005). Screening and treatment for high blood pressure. *SENDROM*, 17, 71-85.
- Olivares-Pérez, J. R.-H., S. Quiroz-Cardozo, F. Camacho-Díaz, L.M. Cipriano-Salazar, M. Damián-Valdéz, M.A. Ávila-Morales, B. Villa-Mancera, A. (2018). Diagnóstico de los usos, la distribución y características dasométricas del árbol cirrián (*Crescentia alata* Kunth) en el municipio de Pungarabato, Guerrero, México. *Polibotánica*, 191-204.
- Onivogui, G., Letsididi, R., Diaby, M., Wang, L., & Song, Y. (2016). Influence of extraction solvents on antioxidant and antimicrobial activities of the pulp and seed of *Anisophyllea laurina* R. Br. ex Sabine fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 20-25.
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifková, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A., & Whelton, P. K. (2018). Hypertension. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18014.
- Oyeleye, I., Adebayo, A., Ogunsuyi, O., Dada, F. A., & Oboh, G. (2018). Phenolic profile and Enzyme Inhibitory activities of Almond (*Terminalia catappa*) leaf and Stem bark. *International Journal of Food Properties*, 20, 1-12.
- Palomo-Piñón, S., Antonio-Villa, N. E., García-Cortés, L. R., Álvarez-Aguilar, C., González-Palomo, E., Bertadillo-Mendoza, O. M., Figueroa-Suárez, M. E., Vargas-Hernández, F., Herrera-Olvera, I. G., Cruz-Toledo, J. E., Cruz-Arce, M. A., Serafín-Méndez, B., Muñoz-Cortés, G., & Morfin-Macias, C. J. (2022). Prevalence and characterization

- of undiagnosed arterial hypertension in the eastern zone of Mexico. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)*, 24(2), 131-139.
- Parente, F. G. G., de Oliveira, A. P., Rodrigues, C., Junior, R., Paulo, I. M. M., Nunes, X., Delange, D., & Almeida, J. (2016). Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(2), 231-236.
- Park, E.-J., & Jhon, D.-Y. (2010). The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 655-659.
- Parvin, M. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M. A., Nahar, L., & Islam, M. E. (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Research Notes*, 8(1), 412.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. In (Vol. 14, pp. 2202-2211): *Molecular Diversity Preservation International*.
- Pérez Caballero, M. D., León Álvarez, J. L., & Fernández Arias, M. A. (2011). El control de la hipertensión arterial: un problema no resuelto. *Revista Cubana de Medicina*, 50, 311-323.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical Biochemistry: IJCB*, 30(1), 11-26
- Piepho, R. W. (2000). Overview of the angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *American Journal of Health System Pharmacy*, 57 Suppl 1, S3-7.
- Rabe, K. F. (2011). Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *British Journal Pharmacology*, 163(1), 53-67
- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. B., & Uddin, M. S. (2021). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*, 27(1).

- Rauf, A., Bawazeer, S., Herrera-Bravo, J., Raza, M., Naz, H., Gul, S., Muhammad, N., Almarhoon, Z. M., Mabkhot, Y. N., & Ramadan, M. F. (2022). Potent In Vitro Phosphodiesterase 1 Inhibition of Flavone Isolated from Pistacia integerrima Galls. *BioMed research international*, 2022.
- Rauf, A., Bawazeer, S., Herrera-Bravo, J., Raza, M., Naz, H., Gul, S., Muhammad, N., Almarhoon, Z. M., Mabkhot, Y. N., Ramadan, M. F., Setzer, W. N., Daştan, S. D., Mahmud, S., & Sharifi-Rad, J. (2022). Potent In Vitro Phosphodiesterase 1 Inhibition of Flavone Isolated from Pistacia integerrima Galls. *Biomed Research International*, 2022, 6116003.
- Rauf, A., Khan, IA, Muhammad, N., Al-Awthan, YS, Bahattab, O., Israr, M. y Mubarak, MS (2021). Composición fitoquímica, ureasa in vitro, potencia inhibidora de α -glucosidasa y fosfodiesterasa de frutos de *Syzygium cumini* (Jamun). *Revista Sudafricana de Botánica*.
- Rauf, A., Orhan, I. E., Ertas, A., Temel, H., Hadda, T. B., Saleem, M., Raza, M., & Khan, H. (2017). Elucidation of Phosphodiesterase-1 Inhibitory Effect of Some Selected Natural Polyphenolics Using In Vitro and In Silico Methods. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(4), 412-417.
- Rawson, A., Patras, A., Oomah, BD, Campos-Vega, R. & Hossain, MB (2014). Actividad antioxidante de los fitoquímicos y su método de análisis. *Avances en la Ciencia de los Alimentos y la Nutrición*, 153-256.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Reddy, R., Baijnath, S., Moodley, R., Moodley, J., Naicker, T., & Govender, N. (2022). South African medicinal plants displaying angiotensin-converting enzyme inhibition: Potential use in the management of preeclampsia. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 13(2), 100562.
- Ribeiro, V. P., Arruda, C., Abd El-Salam, M., & Bastos, J. K. (2018). Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 253-268.

- Rivera-Mondragón, A., Tuentler, E., Ortiz, O., Sakavitsi, M. E., Nikou, T., Halabalaki, M., Caballero-George, C., Apers, S., Pieters, L., & Foubert, K. (2020). UPLC-MS/MS-based molecular networking and NMR structural determination for the untargeted phytochemical characterization of the fruit of *Crescentia cujete* (Bignoniaceae). *Phytochemistry*, *177*, 112438.
- Robinson, M. M., & Zhang, X. (2011). The world medicines situation 2011, traditional medicines: Global situation, issues and challenges. *World Health Organization, Geneva*, 1-2.
- Rocchetti, G., Pagnossa, J. P., Blasi, F., Cossignani, L., Hilsdorf Piccoli, R., Zengin, G., Montesano, D., Cocconcelli, P. S., & Lucini, L. (2020). Phenolic profiling and in vitro bioactivity of *Moringa oleifera* leaves as affected by different extraction solvents. *Food Research International*, *127*, 108712.
- Rousseau, A., Michaud, A., Chauvet, M. T., Lenfant, M., & Corvol, P. (1995). The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(8), 3656-3661.
- Sagrin, M. S., Lasano, N. F., Shukri, R., & Ramli, N. S. (2019). Antioxidant properties and toxicity assessment of the *Crescentia cujete* extracts in Brine shrimp (*Artemia salina*). *Sains Malaysiana*, *48*(4), 831-840.
- Sahukari, R., Punabaka, J., Bhasha, S., Ganjikunta, V. S., Kondeti Ramudu, S., Kesireddy, S. R., Ye, W., & Korivi, M. (2021). Phytochemical Profile, Free Radical Scavenging and Anti-Inflammatory Properties of *Acalypha Indica* Root Extract: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules*, *26*(20).
- Salem, M. A., Michel, H. E., Ezzat, M. I., Okba, M. M., El-Desoky, A. M., Mohamed, S. O., & Ezzat, S. M. (2020). Optimization of an Extraction Solvent for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors from *Hibiscus sabdariffa* L. Based on Its UPLC-MS/MS Metabolic Profiling. *Molecules*, *25*(10).
- Sánchez-Gutiérrez, J. A., Moreno-Lorenzana, D., Álvarez-Bernal, D., Rodríguez-Campos, J., & Medina-Medrano, J. R. (2019). Phenolic Profile, Antioxidant and Anti-Proliferative Activities of Methanolic Extracts from *Asclepias linaria* Cav. Leaves. *Molecules*, *25*(1).

- Santeliz, H., Romano, L., Gonzáles, A., & Hernández, H. H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista mexicana de Cardiología*, *19*(1), 21-29.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, *8*(1), 1-10.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2018). El árbol de las jícaras fortalece nuestros campos. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/el-arbol-de-las-jicaras-fortalece-nuestros-campos> [Consulta: 12 septiembre 2022].
- Secretaria de Salud (2022). En México, más de 30 millones de personas padecen hipertensión arterial: Secretaría de Salud. Disponible en: [https://www.gob.mx/salud/articulos/en-mexico-mas-de-30-millones-de-personas-padecen-hipertension-arterial-secretaria-desalud#:~:text=Se%20estima%20que%20en%20M%C3%A9xico,46%20por%20ciento%20lo%20desconoce](https://www.gob.mx/salud/articulos/en-mexico-mas-de-30-millones-de-personas-padecen-hipertension-arterial-secretaria-desalud#:~:text=Se%20estima%20que%20en%20M%C3%A9xico,46%20por%20ciento%20lo%20desconoce.). [Consulta: 30 noviembre 2022].
- Sensu, E., Kasapoğlu, K. N., Gültekin-Özğüven, M., Demircan, E., Arslaner, A., & Özçelik, B. (2021). Orange, red and purple barberries: Effect of in-vitro digestion on antioxidants and ACE inhibitors. *LWT-Food Science and Technology*, *140*, 110820.
- Shafaei, A., Sultan Khan, M. S., A, F. A. A., Abdul Majid, A. M., Hamdan, M. R., Mordi, M. N., & Ismail, Z. (2016). Flavonoids-Rich Orthosiphon stamineus Extract as New Candidate for Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition: A Molecular Docking Study. *Molecules*, *21*(11)
- Shah, Z. A., Abu-Izneid, T., Rauf, A., Rashid, U., Nizam, M., Muhammad, N., & Rengasamy, K. R. R. (2020). Phosphodiesterase 1 inhibition and molecular docking study of phytochemicals isolated from stem heartwood of *Heterophragma adenophyllum* Seem. *South African Journal of Botany*, *135*, 274-279.
- Shields, H. J., Traa, A., & Van Raamsdonk, J. M. (2021). Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(181).

- Simaratanamongkol, A., Umehara, K., Noguchi, H., & Panichayupakaranant, P. (2014). Identification of a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor from Thai edible plants. *Food Chemistry*, *165*, 92-97.
- Singh, A., Singh, B., & Navneet. (2023). Role of medicinal plants and their bioactive compounds in obesity, hypertension, and cardiovascular diseases. In (pp. 469-515).
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods in Enzymology*.
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, *71*, 40-56.
- Soliman, M. S. M., Abdella, A., Khidr, Y. A., Hassan, G. O. O., Al-Saman, M. A., & Elsanhoty, R. M. (2021). Pharmacological Activities and Characterization of Phenolic and Flavonoid Compounds in Methanolic Extract of *Euphorbia cuneata* Vahl Aerial Parts. *Molecules*, *26*(23).
- Sreejith, M., Kannappan, N., Santhiagu, A., & Mathew, A. P. (2013). Phytochemical, antioxidant and Anthelmintic activities of various leaf extracts of *Flacourtia sepriaria* Roxb. *Asian Pacific Journal of Trop Biomedicine*, *3*(12), 947-953.
- Stasko, A., Brezová, V., Biskupic, S., & Misík, V. (2007). The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radic Res*, *41*(4), 379-390.
- Świątek, Ł., Sieniawska, E., Sinan, K. I., Zengin, G., Boguszevska, A., Hryć, B., Bene, K., Polz-Dacewicz, M., & Dall'Acqua, S. (2023). Chemical Characterization of Different Extracts of *Justicia secunda* Vahl and Determination of Their Anti-Oxidant, Anti-Enzymatic, Anti-Viral, and Cytotoxic Properties. *Antioxidants (Basel)*, *12*(2).
- Te Riet, L., van Esch, J. H., Roks, A. J., van den Meiracker, A. H., & Danser, A. J. (2015). Hypertension: renin–angiotensin–aldosterone system alterations. *Circulation Research*, *116*(6), 960-975.
- Teo, K. K., & Rafiq, T. (2021). Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries. *Canadian Journal of Cardiology*, *37*(5), 733-743.

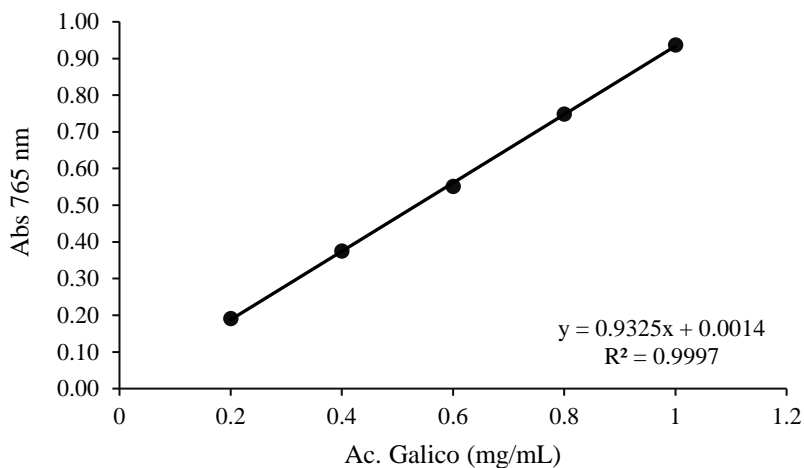
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *British Medical Journal*, *360*, j5492.
- Tranquilino-Rodríguez, E., Martínez-Flores, H. E., Rodiles-López, J. O., Dios Figueroa-Cárdenas, J. D., & Pérez-Sánchez, R. E. (2020). Optimization in the extraction of polyphenolic compounds and antioxidant activity from *Opuntia ficus-indica* using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(6), e14485.
- Udenigwe, CC & Aluko, RE (2012). Péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias: producción, procesamiento y posibles beneficios para la salud. *Revista de Ciencia Alimentaria*, *77* (1), R11-R24.
- Valanciene, E., Jonuskiene, I., Syrpas, M., Augustiniene, E., Matulis, P., Simonavicius, A., & Malys, N. (2020). Advances and Prospects of Phenolic Acids Production, Biorefinery and Analysis. *Biomolecules*, *10*(6).
- Valencia, E., García-Pérez, M., Garnica Romo, M. G., Figueroa, J., Melendez, E., Salgado-Garciglia, R., & Martínez-Flores, H. (2018). Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from *Quercus Laurina*, *Quercus Crassifolia*, and *Quercus Scytophylla* Bark. *Antioxidants*, *7*, 81.
- Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M.-E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas* (16), 15-29.
- Valladares, M. G., & Rios, M. Y. (2007). Iridoids from *Crescentia alata*. *Journal of Natural Products*, *70*(1), 100-102.
- Van Duin, R., Houweling, B., Uitterdijk, A., Duncker, D., & Merkus, D. (2017). Pulmonary vasodilation by phosphodiesterase 5-inhibition is enhanced and nitric oxide-independent in early pulmonary hypertension after myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *314*, ajpheart.00370.02017.
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *87*(3), 559-902.

- Virgen-Ortiz, JJ, Morales-Ventura, JM, Colín-Chávez, C., Esquivel-Chávez, F., Vargas-Arispuro, I., Aispuro-Hernández, E., y Martínez-Téllez, MA (2020). Aplicación poscosecha de péctico-oligosacáridos sobre los atributos de calidad, las actividades de las enzimas relacionadas con la defensa y la acumulación de antocianinas en la fresa. *Revista de Ciencia de la Alimentación y la Agricultura*, 100 (5), 1949-1961.
- Vuolo, MM, Lima, VS y Junior, MRM (2019). Compuestos fenólicos: estructura, clasificación y poder antioxidante. En *Compuestos bioactivos* (págs. 33-50). Woodhead Publishing.
- Weschenfelder Magrini, D., & Gue Martini, J. (2012). Hipertensión arterial: principales factores de riesgo modificables en la estrategia salud de la familia. *Enfermería Global*, 11, 344-353.
- WHO, 2022. World Health Organization. Hipertensión. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension> [consulta: 05 abril 2022].
- Woodcock, C. C., & Chan, S. Y. (2019). The Search for Disease-Modifying Therapies in Pulmonary Hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 24(4), 334-354.
- Xu, R. B., Yang, X., Wang, J., Zhao, H. T., Lu, W. H., Cui, J., Cheng, C. L., Zou, P., Huang, W. W., Wang, P., Li, W. J., & Hu, X. L. (2012). Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14262-14277.
- Yasuko, K., Tomohiro, N., Sei-Itsu, M., Ai-Na, L., Yasuo, F., & Takashi, T. (1984). Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 792(1), 92-97.
- Yoshie-Stark, Y., Bez, J., Wada, Y., & Wäsche, A. (2004). Functional Properties, Lipoxygenase Activity, and Health Aspects of Lupinus albus Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7681-7689.
- Zhang, K. Y. J., Card, G. L., Suzuki, Y., Artis, D. R., Fong, D., Gillette, S., Hsieh, D., Neiman, J., West, B. L., Zhang, C., Milburn, M. V., Kim, S.-H., Schlessinger, J., & Bollag, G. (2004). A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Molecular cell*, 15(2), 279-286.

- Zhao, P., Chen, S.-K., Cai, Y.-H., Lu, X., Li, Z., Cheng, Y.-K., Zhang, C., Hu, X., He, X., & Luo, H.-B. (2013). The molecular basis for the inhibition of phosphodiesterase-4D by three natural resveratrol analogs. Isolation, molecular docking, molecular dynamics simulations, binding free energy, and bioassay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(10), 2089-2096.
- Zolty, R. (2021). Novel Experimental Therapies for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of Experimental Pharmacology*, 13, 817-857.
- Zreen, Z., Hameed, A., Kiran, S., Farooq, T., & Zaroog, M. S. (2022). A Comparative Study of Diospyros malabarica (Gaub) Extracts in Various Polarity-Dependent Solvents for Evaluation of Phytoconstituents and Biological Activities. *Biomed Research Internatioal*, 2022, 4746223.
- Zuo, H., Cattani-Cavaliere, I., Musheshe, N., Nikolaev, V. O., & Schmidt, M. (2019). Phosphodiesterases as therapeutic targets for respiratory diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 197, 225-242.

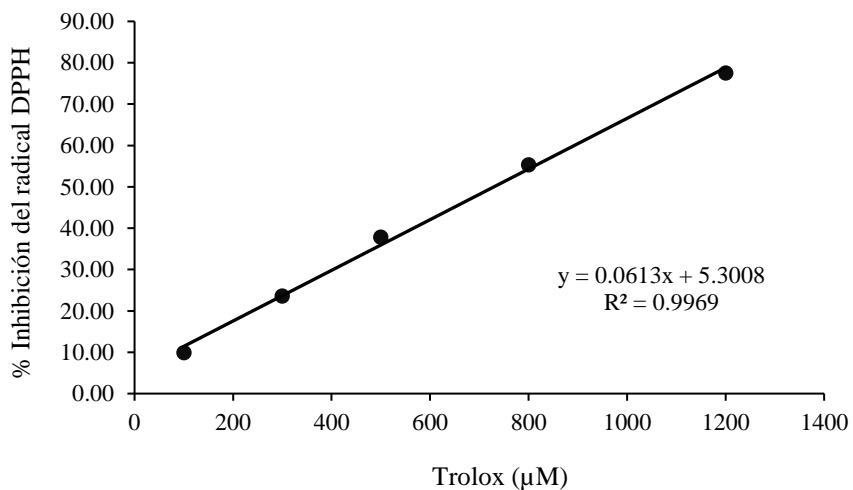
11. ANEXOS

Anexo 1: Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu



La solución stock de ácido gálico (Sigma-Aldrich, cat. G7384) se preparó a 1 mg / mL en H₂O destilada.

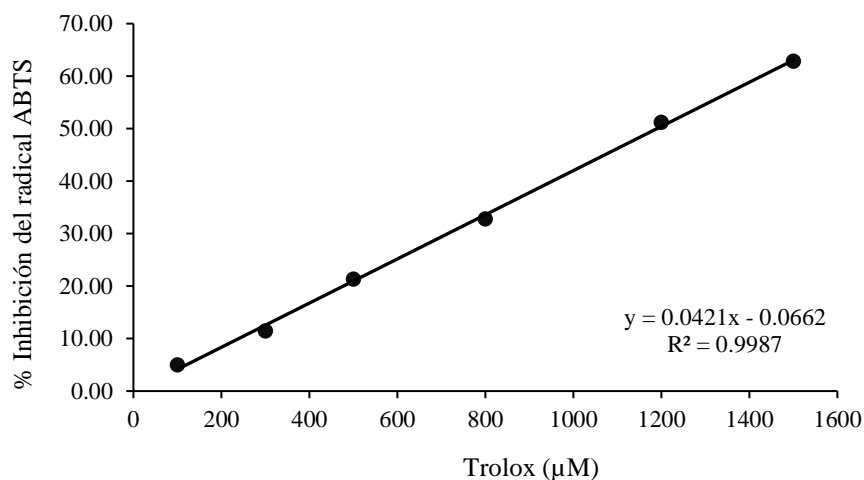
Anexo 2: Curva de calibración para evaluación de capacidad antioxidante mediante el método DPPH



La solución stock de Trolox ((±)-6-Ácido hidroxil-2,5,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) Aldrich, cat. 238813 se preparó a 2.65 mM en 25 mL de metanol al 80%. Mientras que el

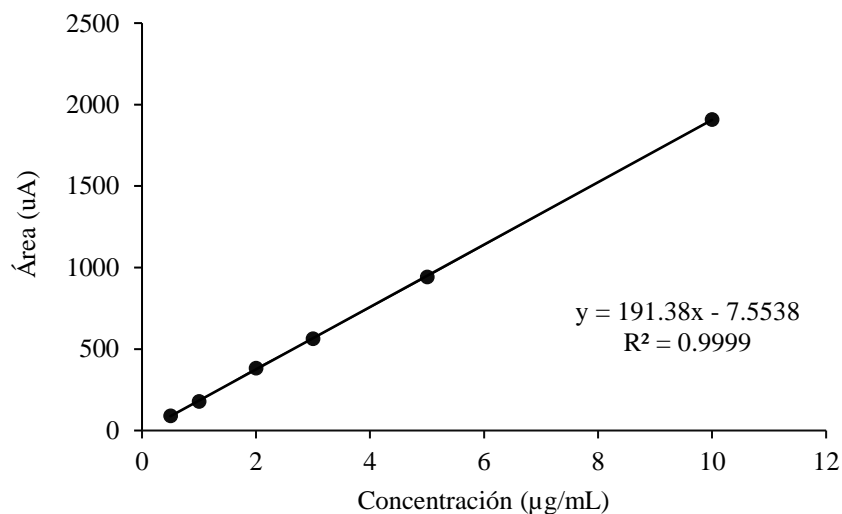
radical DPPH (2,2 Difetil-1-picrilhidrazilo) Aldrich, cat. D9132 se ajustó a una absorbancia inicial de 0.700 ± 0.02 .

Anexo 3. Curva de calibración para determinación de capacidad antioxidante mediante el método ABTS



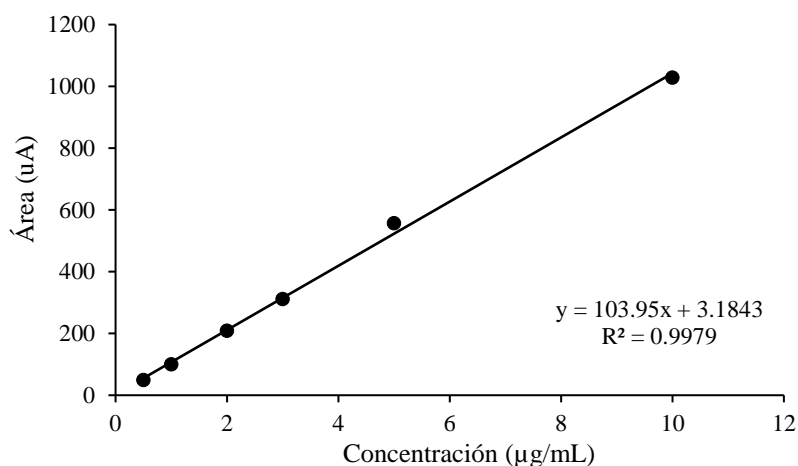
La solución stock de Trolox ((\pm)-6-Ácido hidroxil-2,5,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) Aldrich, cat. 238813 se preparó a 2.65 mM en 25 mL de metanol al 80%. Mientras que el radical ABTS [(ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] Sigma, cat. 11557 se ajustó a una absorbancia inicial de 0.700 ± 0.02 .

Anexo 4. Curva de calibración del ácido fenólico 4-hidroxibenzoico



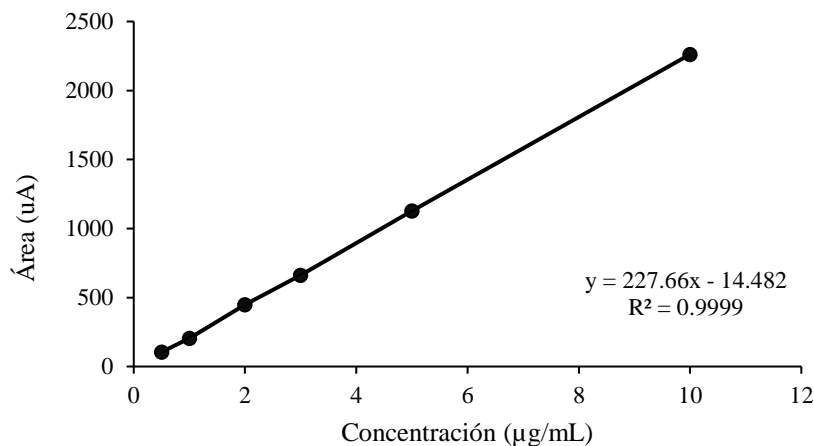
La solución stock de ácido 4-hidroxibenzoico (Aldrich) se preparó a 1 mg / mL en metanol 80%, realizando diluciones hasta llegar a las concentraciones requeridas (0.5 – 10 µg/mL).

Anexo 5. Curva de calibración del ácido vanílico

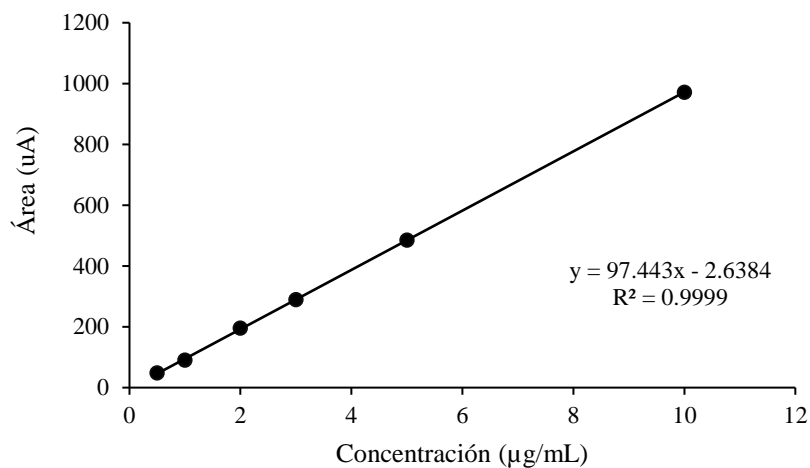


La solución stock de ácido vanílico (Sigma Aldrich), se preparó a 1 mg / mL en metanol 80%, realizando diluciones hasta llegar a las concentraciones requeridas (0.5 – 10 µg/mL).

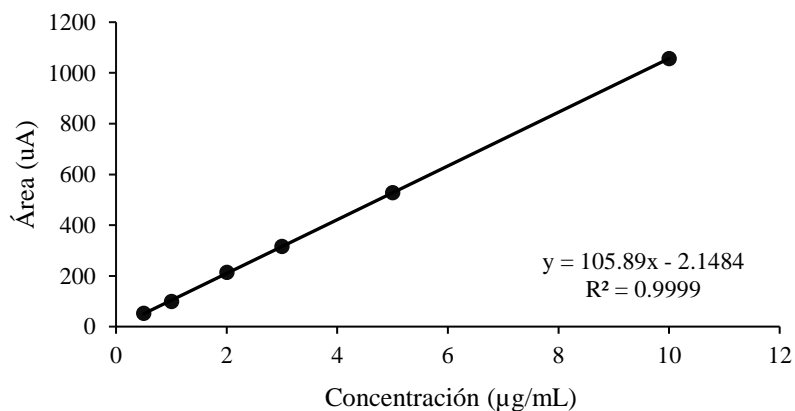
Anexo 6. Curva de calibración del ácido trans-cinámico



La solución stock de ácido trans-cinámico (Aldrich), se preparó a 1 mg / mL en metanol 80%, realizando diluciones hasta llegar a las concentraciones requeridas (0.5 – 10 µg/mL).

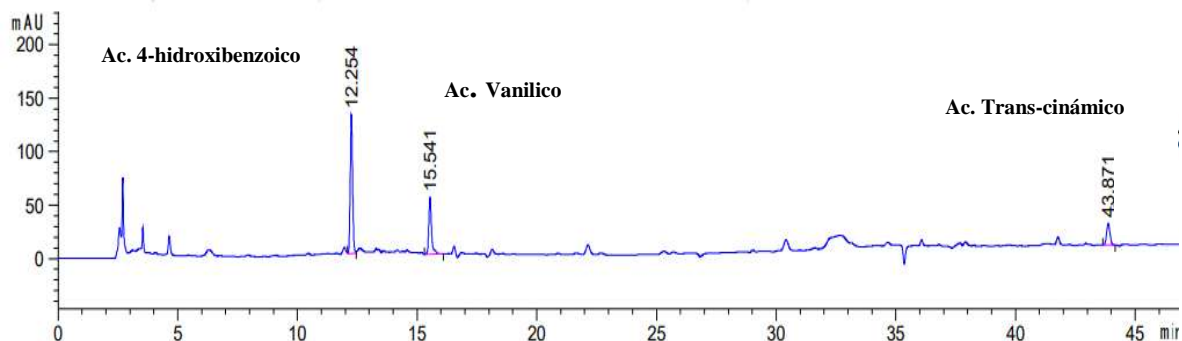
Anexo 7. Curva de calibración del ácido cafeico

La solución stock de ácido cafeico (Sigma), se preparó a 1 mg / mL en metanol 80%, realizando diluciones hasta llegar a las concentraciones requeridas (0.5 – 10 $\mu\text{g/mL}$).

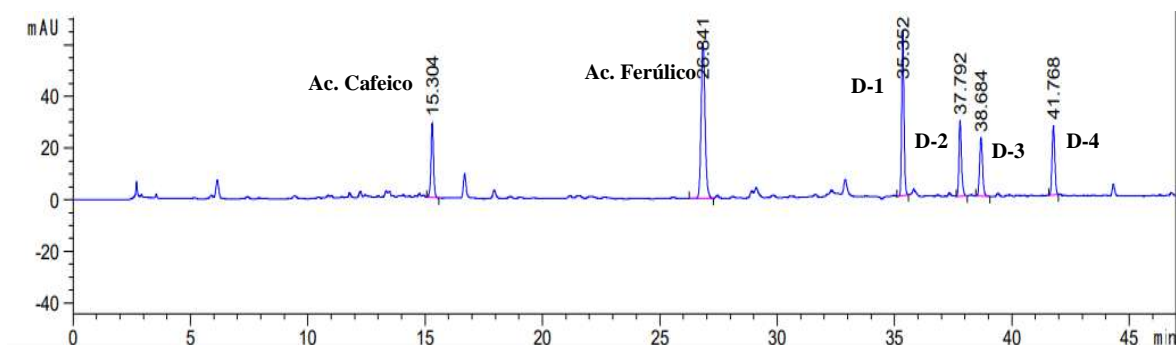
Anexo 8. Curva de calibración del ácido ferúlico

La solución stock de ácido ferúlico (Aldrich), se preparó a 1 mg / mL en metanol 80%, realizando diluciones hasta llegar a las concentraciones requeridas (0.5 – 10 $\mu\text{g/mL}$).

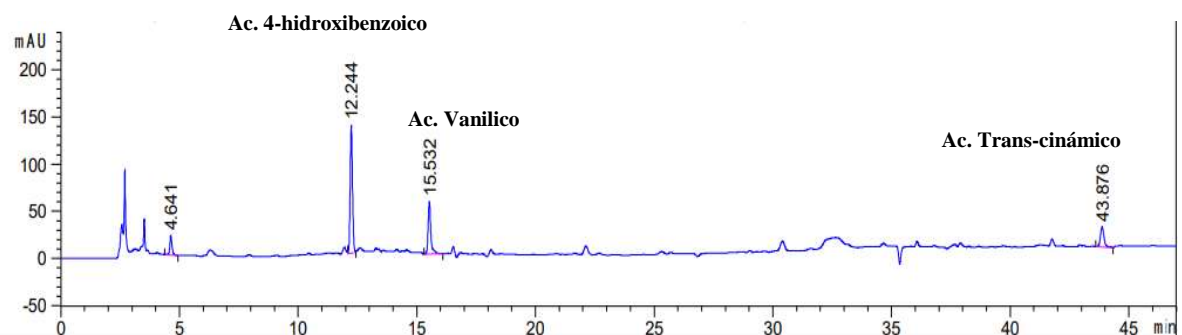
Anexo 9. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción etanólica 80% en el fruto de cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm en detector DAD.



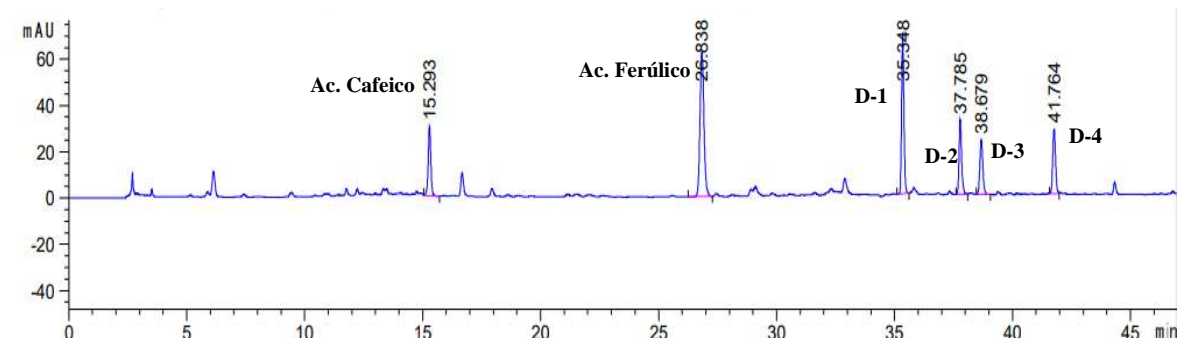
Anexo 10. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción etanólica 80% en el fruto de cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 322 nm en detector DAD.



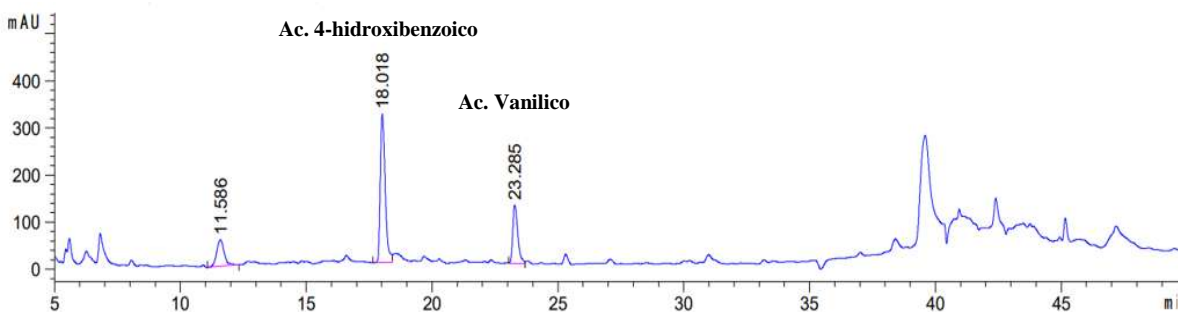
Anexo 11. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción etanólica 70% en el fruto de cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm en detector DAD.



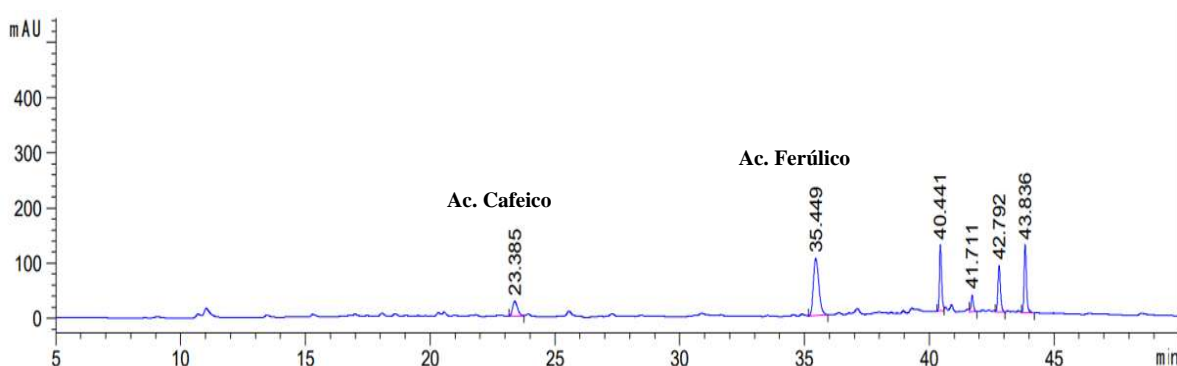
Anexo 12. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción etanólica 70% en el fruto de cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 322 nm en detector DAD.



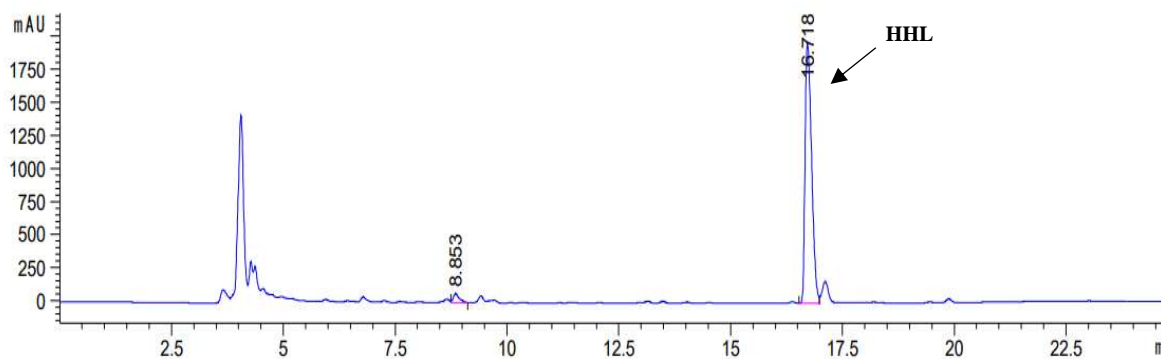
Anexo 13. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción acuosa del fruto de cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm en detector DAD.



Anexo 14. Cromatograma de los de ácidos fenólicos encontrados en la fracción acuosa del fruto de cirrián. Absorbancia medida a una longitud de onda de 322 nm en detector DAD.



Anexo 15. Cromatograma de la reacción ECA con extracto fenólico como inhibidor (0.1 mg/mL). Absorbancia medida a una longitud de onda de 228 nm en detector DAD.



Anexo 16. Cromatograma de la reacción ECA con extracto fenólico como inhibidor (50 µg/mL). Absorbancia medida a una longitud de onda de 228 nm en detector DAD.

