



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

T E S I S

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS DE ZAPOTE NEGRO (*Diospyros nigra*) EN LA
LÍNEA CELULAR 3T3-L1.**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
QFB. ARTURO ARIAS ALCALÁ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL ZAMORA VEGA**

**CODIRECTORA DE TESIS:
DRA. LORENA MARTÍNEZ ALCANTAR**



MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. MAYO DEL 2026.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Desarrollo de Alimentos y en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA) de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (QFB-UMSNH), bajo la dirección del Dr. Rafael Zamora Vega y la Dra. Lorena Martínez Alcántar. Adicionalmente, se valió de la colaboración del Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB-UMSNH) de la misma institución, así como de la Universidad Politécnica de Uruapan.





Programa Institucional
de Maestría en
**Ciencias
Biológicas**

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DRA. ROSA ELVIRA NÚÑEZ ANITA
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de zapote negro (*Diospyros nigra*) en la línea celular 3T3-L1" presentado por el QFB. Arturo Arias Alcalá con Número de Matrícula 1800337H, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestría en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 19 de mayo de 2026

COMITÉ SINODAL

Dr. Rafael Zamora Vega
Director de Tesis

Dra. Lorena Martínez Alcantar
Co directora

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores
Presidente

Dr. Rafael Salgado Garciglia
Vocal I

Dra. Martha Estrella García Pérez
Vocal 2

DEDICATORIA

Ofrezco el fruto de este esfuerzo a Dios, con profunda gratitud por permitirme llegar a este momento tal como lo imaginé. Hoy culmino una de las etapas más importantes de mi vida, con el corazón lleno de emoción, en completa salud y en compañía de muchas de las personas que más amo. Gracias por no desampararme cuando sentí que no podía más, por apartarme del mal camino y guiarme con sabiduría incluso cuando no entendía el rumbo; por permitirme nuevas puertas, darme perseverancia y nuevas oportunidades e iluminar mi camino que hoy se refleja en este logro.

A mis padres, Gerardo A. Arias y Elizabeth Alcalá, a quienes agradezco infinitamente, porque es por su ejemplo, apoyo incondicional, valiosos consejos y oraciones que he sido capaz de superarme y que, junto a sus principios, me han convertido en la persona que soy, espero estén orgullosos de mí. Además, incluyo a mi hermana, Anette Arias y a nuestra gatita Kitty, que se han vuelto el pilar que ha guiado mi vida y mi formación. Nada de esto habría sido posible sin su cálida compañía en momentos de tristeza y cansancio, por escucharme con paciencia y por creer en mí incluso cuando yo mismo dudé. No me alcanzará la vida para agradecer todo lo que me han dado y continúan dándome, los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estudios, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y a la Facultad de Químico Farmacobiología, por abrirme sus puertas y permitirme cursar mis estudios de posgrado, siendo parte de un pilar fundamental en mi formación académica y profesional.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico que financió mis estudios de maestría y que permitió lograr esta investigación.

A mi director de Tesis, el Dr. Rafael Zamora Vega, a quien aprecio y respeto mucho, por su amplio conocimiento en el tema, además de todo su apoyo incondicional, por su paciencia y confianza plena en mí, le agradezco muchísimo por darme la oportunidad de crecer y dirigirme durante esta tesis.

A mi codirectora de Tesis, la Dra. Lorena Martínez Alcántar, por su guía paciente y generosa durante el proyecto, por compartir su experiencia y facilitarme en gran medida en lo respectivo a su área, fue una pieza clave en mi crecimiento profesional y personal sin la que este proyecto no sería posible.

A los integrantes de mi Comité Sinodal, la Dra. Martha E. García Pérez, el Dr. Héctor E. Martínez Flores y el Dr. Rafael Salgado Garciglia, por su implicación por medio de sus comentarios tan acertados y valiosas sugerencias para mejorar, así como por el tiempo dedicado para enriquecer este proyecto.

Al Dr. Héctor E. Martínez Flores por permitirme usar el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos como segunda área de trabajo, por facilitarme el uso de materiales y equipo. Asimismo, a su increíble equipo de trabajo, la Dra. Eunice Tranquilino Rodríguez, el Dr. Osvaldo Álvarez Cortés, el Dr. Rafael Contreras Chávez, la Dra. Gabriela M. Ochoa Manzo y al QFB. Miguel Ángel Gómez Ayala, por su gran apoyo, compartirme su experiencia y orientarme en todo lo relacionado a lo experimental.

Al Dr. José O. Rodiles López, por sus valiosas sugerencias y consejos para que mi trabajo cumpla los requisitos de ser una investigación de calidad, le agradezco por su orientación y por brindarme su tiempo.

A la Dra. Eréndira Valencia Avilés, perteneciente a la Universidad Politécnica de Uruapan, que por medio de esta colaboración se me permitió caracterizar los tratamientos de mis ensayos por HPLC-MS.

A la Biól. Norma P. Reyes Martínez, del Herbario de la Facultad de Biología (EBUM), por facilitarme la determinación y clasificación taxonómica de mi ejemplar colectado.

A mis amigos y colegas del laboratorio -Bedollita, Lenin, Sam, Astrid, Xoranne, Lulú, Zahid, Arturo, Daniela, Aarón, Galilea, Erick, Chío y recientemente, Julieta- por su compañía, apoyo moral, cariño, consejos y la ayuda concreta con mi proyecto en los momentos en los que más lo necesité.

A Estefanía Ruiz, por su gran amor, comprensión y tranquilidad, por motivarme a dar lo mejor de mí, escucharme y darme su apoyo, tiempo y entera confianza durante ese tiempo.

A mis familiares y amigos más cercanos, por su cariño incondicional, por compartirme su tiempo y darme ánimos de seguir adelante, a pesar de que eso ha significado estar lejos y ausente.

Agradezco infinitamente a todas las personas que ayudaron directa o indirectamente en la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Generalidades del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>)	2
2.1.1. Descripción botánica y taxonomía	2
2.1.1.1. Morfología de árbol, fruto y semillas	3
2.1.1.2. Ecología y requerimientos agroclimáticos.....	4
2.1.2. Producción e importancia en México	5
2.1.3. Composición nutrimental y valor alimenticio	6
2.2. Radicales libres	6
2.2.1. Estrés oxidativo	7
2.3. Antioxidantes	7
2.3.1. Compuestos fenólicos.....	8
2.3.2. Balance oxidativo	9
2.3.3. Clasificación de los antioxidantes según su origen	10
2.3.4. Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción química	10
2.3.5. Antioxidantes caracterizados de Ebanaceae	11
2.3.6. Métodos de extracción.....	11
2.3.6.1. Maceración	11
2.4. Evaluación de compuestos antioxidantes	12
2.5. Modelo celular y evaluación del efecto biológico.....	13
2.5.1. Líneas celulares como modelo de estudio	13
2.5.2. Fibroblastos murinos 3T3-L1: características y aplicaciones.....	13
2.5.3. Ensayo MTT para evaluación de la viabilidad celular	15
2.5.4. Evaluación del efecto protector frente a H ₂ O ₂	15
2.5.5. Evaluación de daño oxidativo y estado redox celular (TBARS y GSH)	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
V. HIPÓTESIS.....	18

VI. OBJETIVOS	18
6.1. <i>Objetivo general</i>	18
6.2. <i>Objetivos específicos</i>	18
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	20
8.1. <i>Colecta del material vegetal e identificación botánica</i>	20
8.1.1. <i>Deshidratado del fruto y obtención del polvo</i>	20
8.2. <i>Análisis químico proximal</i>	22
8.2.1. <i>Determinación de humedad y curva de secado</i>	22
8.2.2. <i>Determinación de cenizas (residuo mineral)</i>	22
8.2.3. <i>Determinación de proteína</i>	23
8.2.4. <i>Determinación de extracto etéreo</i>	23
8.2.5. <i>Determinación de fibra alimentaria total</i>	23
8.3. <i>Extracción por maceración</i>	23
8.4. <i>Análisis fisicoquímico</i>	25
8.4.1. <i>Determinación del pH</i>	25
8.4.2. <i>Determinación de la acidez titulable</i>	25
8.4.3. <i>Determinación del color</i>	25
8.5. <i>Análisis antioxidante</i>	26
8.5.1. <i>Contenido antioxidante general</i>	26
8.5.1.1. <i>Determinación de fenoles totales</i>	26
8.5.1.2. <i>Determinación de flavonoides totales</i>	27
8.5.1.3. <i>Determinación de ácido ascórbico</i>	27
8.5.2. <i>Evaluación de la capacidad antioxidante</i>	27
8.5.2.1. <i>Capacidad de eliminación de DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)</i>	27
8.5.2.2. <i>Capacidad de eliminación de OH• (radical hidroxilo)</i>	28
8.6. <i>Cultivo y mantenimiento de la línea celular 3T3-L1</i>	28
8.6.1. <i>Evaluación de la citotoxicidad de extractos mediante ensayo MTT en células 3T3-L1</i>	29
8.6.2. <i>Análisis del efecto protector frente a estrés oxidativo</i>	29
8.6.3. <i>Determinación de marcadores de estrés oxidativo (glutatión y TBARS) en homogenados celulares</i>	30
8.6.3.1. <i>Determinación de TBARS -Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico-</i>	30
8.6.3.2. <i>Determinación de Glutatión</i>	30
8.7. <i>Análisis estadístico</i>	31
8.8. <i>Consideraciones de bioseguridad y normatividad</i>	31
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
9.1. <i>Colecta del material vegetal e identificación botánica</i>	33
9.2. <i>Análisis químico proximal</i>	34
9.2.1. <i>Análisis químico proximal de la pulpa de <i>Diospyros nigra</i></i>	34
9.2.2. <i>Análisis químico proximal de la cáscara de <i>Diospyros nigra</i></i>	36
9.2.3. <i>Análisis químico proximal de la semilla de <i>Diospyros nigra</i></i>	37
9.3. <i>Extracción por maceración</i>	38

9.4. Análisis fisicoquímico.....	39
9.4.1. Análisis fisicoquímico en extractos de pulpa de <i>Diospyros nigra</i>	39
9.4.2. Análisis fisicoquímico en extractos de cáscara de <i>Diospyros nigra</i>	41
9.4.3. Análisis fisicoquímico en extractos de semilla de <i>Diospyros nigra</i>	43
9.5. Análisis antioxidante	46
9.5.1. Diseño experimental para extractos de pulpa de <i>Diospyros nigra</i>	46
9.5.1.1. Modelo polinomial de segundo grado para extractos de pulpa	46
9.5.1.2. Influencia de las variables experimentales en el modelo.....	47
9.5.1.3. Correlación entre variables de respuesta del modelo	48
9.5.1.4. Selección de extractos de pulpa de <i>Diospyros nigra</i>	49
9.5.2. Diseño experimental para extractos de cáscara de <i>Diospyros nigra</i>	50
9.5.2.1. Modelo polinomial de segundo grado para extractos de cáscara.....	51
9.5.2.2. Influencia de las variables experimentales en el modelo.....	52
9.5.2.3. Correlación entre variables de respuesta del modelo	53
9.5.2.4. Selección de extractos de cáscara de <i>Diospyros nigra</i>	54
9.5.3. Diseño experimental para extractos de semilla de <i>Diospyros nigra</i>	55
9.5.3.1. Modelo polinomial de segundo grado para extractos de semilla.....	55
9.5.3.2. Influencia de las variables experimentales en el modelo.....	56
9.5.3.3. Correlación entre variables de respuesta del modelo	57
9.5.3.4. Selección de extractos de semilla de <i>Diospyros nigra</i>	58
9.6. Caracterización de la actividad citotóxica, antioxidante y citoprotectora de extractos de <i>Diospyros nigra</i> en fibroblastos 3T3-L1	59
9.6.1. Efecto de los extractos de pulpa de <i>Diospyros nigra</i> sobre la viabilidad celular en 3T3-L1	60
9.6.1.1. Efecto protector de los extractos de pulpa de <i>Diospyros nigra</i> frente a estrés oxidativo	61
9.6.2. Efecto de los extractos de cáscara de <i>Diospyros nigra</i> sobre la viabilidad celular en 3T3-L1	62
9.6.2.1. Efecto protector de los extractos de cáscara de <i>Diospyros nigra</i> frente a estrés oxidativo	64
9.6.3. Efecto de los extractos de semilla de <i>Diospyros nigra</i> sobre la viabilidad celular en 3T3-L1.....	65
9.6.3.1. Efecto protector de los extractos de semilla de <i>Diospyros nigra</i> frente a estrés oxidativo	66
9.6.4. Evaluación del efecto de los extractos de <i>Diospyros nigra</i> sobre la peroxidación lipídica.....	67
9.6.5. Evaluación del efecto de los extractos de <i>Diospyros nigra</i> sobre los niveles de GSH.....	69
9.6.6. Efecto citoprotector de los extractos de <i>Diospyros nigra</i> sobre la morfología celular.....	71
X. CONCLUSIONES	73
XI. REFERENCIAS	73

LISTA DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Clasificación taxonómica del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) (Orceña, 2023).	2
Tabla 2. Trabajos actuales que respaldan la extracción de compuestos antioxidantes.....	12
Tabla 3. Optimización experimental por metodología de superficie de respuesta (Diseño Box-Behnken) para extractos de pulpa, cáscara y semilla de <i>Diospyros nigra</i>	24
Tabla 2. Clasificación taxonómica del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) y su registro en la base de datos de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM.....	33
Tabla 3. Análisis químico proximal (% base seca) de pulpa de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>).	34
Tabla 4. Análisis químico proximal (% base seca) de cáscara de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>).	36
Tabla 5. Análisis químico proximal (% base seca) de semilla de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>).	37
Tabla 6. Variables fisicoquímicas para extractos de pulpa de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>).	40
Tabla 7. Variables fisicoquímicas para extractos de cáscara de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>).	42
Tabla 8. Variables fisicoquímicas para extractos de semilla de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>).	44
Tabla 9. Valores experimentales del diseño Box-Behnken para extractos de pulpa de zapote negro.	46
Tabla 10. Modelo de regresión cuadrático para extractos de pulpa de <i>Diospyros nigra</i>	47
Tabla 11. Análisis de varianza para extractos de pulpa de zapote negro.....	48
Tabla 12. Correlación entre variables de respuesta en extracto de pulpa de zapote negro.	48
Tabla 13. Valores experimentales para extractos seleccionados de pulpa de zapote negro.	49
Tabla 14. Valores experimentales del diseño Box-Behnken para extractos de cáscara de zapote negro.	51
Tabla 15. Modelo de regresión cuadrático para extractos de cáscara de <i>Diospyros nigra</i>	51
Tabla 16. Análisis de varianza para extracto de cáscara de zapote negro.	52
Tabla 17. Correlación entre variables de respuesta en extracto de cáscara de zapote negro.	53
Tabla 18. Valores experimentales para extractos seleccionados de cáscara de zapote negro.	54
Tabla 19. Valores experimentales del diseño Box-Behnken para extractos de semilla de zapote negro.	55
Tabla 20. Modelo de regresión cuadrático para extractos de semilla de <i>Diospyros nigra</i>	56
Tabla 21. Análisis de varianza para extracto de semilla de zapote negro.	57

Tabla 22. Correlación entre variables de respuesta en extracto de semilla de zapote negro.	57
Tabla 23. Valores experimentales para extractos seleccionados de semilla de zapote negro.....	58

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. Morfología vegetal. A) Árbol, B) frutos y C) flores del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>). Nota. Adaptado de Red de Viveros de Biodiversidad (s.f.) y del Instituto de Derecho Ambiental de la República Dominicana (IDARD) (s.f.) en zapote negro.....	3
Figura 2. Fracciones vegetales A) cáscara, B) pulpa y C) semillas del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>). Nota. Adaptado de <i>La cocina prehispánica mexicana</i> , por Curis (2014) y de <i>El zapote negro: las otras frutas tropicales de México</i> , por López y González (2024).....	4
Figura 3. Distribución geográfica de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) en México mostrando las entidades federativas con presencia de la especie. Nota. Adaptado de <i>Mexico's Geopolitics Timeline</i> , por Arcos y Bustamante (s.f.).....	6
Figura 4. Estructuras químicas y ejemplos de algunos metabolitos secundarios generales. Nota. Tomado de <i>Bioaccesibilidad, cambios en potencial antioxidante y estabilidad de los compuestos bioactivos presentes en dos extractos ricos en fibra sometidos a un proceso de digestión in vitro</i> , López (2016).....	9
Figura 5. Funciones clave del fibroblasto en la homeostasis tisular Nota. Adaptado de <i>Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease</i> , Plikus et al. (2021).	14
Figura 6. Representación esquemática del papel de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en fibroblastos, mostrando la activación de las vías MAPK, NF-κB y Nrf2/Keap1, y sus efectos en daño celular, respuesta antioxidante, senescencia y apoptosis. Nota. Adaptado de <i>Antioxidant Properties of Plant-Derived Phenolic Compounds and Their Effect on Skin Fibroblast Cells</i> , por Merecz-Sadowska et al. (2021).	17
Figura 7. Diagrama de flujo del diseño experimental realizado	19
Figura 8. Localización geográfica (latitud 19°24'12.9" N, longitud 101°55'38.8" O) del municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, como sitio de colecta del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>). Imagen realizada con apoyo del Marco Geoestadístico 2024 de México-INEGI en Quantum GIS LTR 3.40 (QGIS).	20
Figura 9. Frutos en solución de hipoclorito de sodio 1% (A), cáscara y semillas dispuestas por separado (B) y pulpa distribuida en bandejas de aluminio previo a secado (C).	21
Figura 10. Material vegetal separado en bandejas (pulpa, cáscara y semillas) en un horno a 50 °C (A), que tras el secado fue triturado (B) y tamizado en una malla #40 (C). Almacenado temporalmente en bolsas herméticas (D).	21
Figura 11. Bolsas herméticas cubiertas con papel aluminio como almacén temporal (A), antes de transferir los diferentes polvos en frascos de vidrio ámbar (B) y llevarlos a refrigeración.	22
Figura 12. Obtención de extractos por maceración (A), proceso de filtrado al vacío (B) y almacenamiento (C)..	25

Figura 13. Diagrama cromático del sistema CIE-Lab*	Nota.
Tomado de <i>Entendiendo el espacio de color CIE Lab</i> , por Konica Minolta Sensing Americas, Inc, s.f.,.....	26
Figura 14. Colecta del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. Localización geográfica (A), árbol frondoso de colecta del zapote negro (B y C).	33
Figura 15. Curva de secado a 50 °C durante 48 h de la pulpa del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>).	35
Figura 16. Extractos hidroalcohólicos de pulpa (A), cáscara (B) y semilla (C) de <i>Diospyros nigra</i>	38
Figura 17. Cultivo celular 3T3-L1 (A) y tratamientos de pulpa, cáscara y semilla de <i>Diospyros nigra</i> (B).....	60
Figura 18. Gráfica del efecto de los extractos de pulpa del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 mediante MTT	60
Figura 19. Gráfica del efecto protector de los extractos de pulpa del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 tras inducción de estrés oxidativo con H ₂ O ₂ [300 µM] .62	
Figura 20. Gráfica del efecto de los extractos de cáscara del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 mediante MTT	63
Figura 21. Gráfica del efecto protector de los extractos de cáscara del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 tras inducción de estrés oxidativo con H ₂ O ₂ [300 µM] .64	
Figura 22. Gráfica del efecto de los extractos de semilla del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 mediante el ensayo MTT.....	65
Figura 23. Gráfica del efecto protector de los extractos de semilla del zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 tras inducción de estrés oxidativo con H ₂ O ₂ [300 µM] .67	
Figura 24. Gráfica concentración de MDA (µM) tras inducción de estrés oxidativo utilizando diversos extractos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro.	68
Figura 25. Gráfica concentración de GSH (µM) tras inducción de estrés oxidativo utilizando diversos extractos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro.....	70
Figura 26. Efecto protector de los extractos evaluados sobre la morfología celular 3T3-L1.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

3T3-L1 = Línea celular de fibroblastos murinos

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

ATCC = American Type Culture Collection

BS = Base seca

CAT = Catalasa

DAP = Diámetro a la altura del pecho

DIP = 2,6-diclorofenolindofenol o reactivo de Tillman

DMEM = Medio Eagle modificado de Dulbecco

DPPH• = 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DTNB = ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico o reactivo de Ellman

EAG = Equivalentes de ácido gálico

EQ = Equivalentes de quercetina

EROs = Especies Reactivas de Oxígeno (Del inglés ROS: Reactive Oxygen Species)

GPx = Glutación peroxidasa

GSH = Glutación reducido -en forma activa-

GSSG = Disulfuro de glutación (oxidado) -en forma inactiva-

GSTNB = Disulfuro mixto (GSH y TNB)

H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno

HNE = 4-Hidroxinonenal

HPLC-MS = Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

IC₅₀ = Concentración Inhibitoria Media

QRC = Quercetina

MDA = Malondialdehído

MMPs = Metaloproteinasas de matriz

m.s.n.m = Metros sobre el nivel del mar

MSR = Metodología de Superficie de Respuesta

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato reducido

OH• = Radical hidroxilo

TBARS = Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

TNB = ácido 5-tio-2-nitrobenzoico

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante y el efecto citoprotector de extractos obtenidos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*). Se empleó un diseño experimental Box-Behnken para optimizar las condiciones de extracción mediante la variación de la proporción agua-etanol, temperatura y tiempo. Los extractos fueron caracterizados con la cuantificación de fenoles totales, flavonoides y ácido ascórbico, así como por su capacidad antioxidante frente a los radicales DPPH• y OH•-. Además, se evaluó su efecto citotóxico y citoprotector en fibroblastos murinos 3T3-L1 mediante ensayos de viabilidad celular (MTT), peroxidación lipídica (TBARS), niveles de glutatión reducido (GSH) y análisis morfológico celular. Los resultados mostraron que las condiciones de extracción influyen significativamente en la recuperación de compuestos bioactivos, destacando mezclas intermedias de agua-etanol y temperaturas cercanas a 80°C, las cuales favorecieron la extracción de fenoles y flavonoides, incrementando la actividad antioxidante, principalmente en semilla. Se observó una correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante, mientras que la pulpa presentó el mayor contenido de vitamina C. Todos los extractos mostraron baja citotoxicidad en el rango de 25-200 µg/mL, manteniendo viabilidades superiores al 80%. Bajo estrés oxidativo inducido con H₂O₂, los extractos incrementaron significativamente la viabilidad celular, redujeron la peroxidación lipídica y propiciaron la recuperación de GSH intracelular. Los extractos de pulpa (14P), cáscara (15C) y semilla (13S), destacaron por su capacidad citoprotectora, siendo el extracto de semilla (13S) el de mayor efecto antioxidante a 200 µg/mL, comparable al estándar quercetina. Los extractos del zapote negro (*Diospyros nigra*) constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos con propiedad antioxidante y citoprotectora, siendo la semilla la de mayor potencial. Estos hallazgos sugieren su aprovechamiento como residuo infravalorado para el desarrollo de productos funcionales y nutraceuticos orientados a disminuir el estrés oxidativo y preservar la integridad celular.

Palabras clave: estrés oxidativo, citoprotección, compuestos fenólicos, fibroblastos murinos, nutraceuticos.

ABSTRACT

This study evaluated the antioxidant activity and cytoprotective effect of extracts obtained from the pulp, peel, and seeds of the black sapote (*Diospyros nigra*). A Box-Behnken experimental design was used to optimize extraction conditions by varying the water-ethanol ratio, temperature, and time. The extracts were characterized by quantifying total phenols, flavonoids, and ascorbic acid, as well as by their antioxidant capacity against DPPH• and OH•- radicals. In addition, their cytotoxic and cytoprotective effects on murine 3T3-L1 fibroblasts were evaluated using cell viability (MTT) assays, lipid peroxidation (TBARS) assays, reduced glutathione (GSH) levels, and cellular morphological analysis. The results showed that extraction conditions significantly influence the recovery of bioactive compounds, with intermediate water-ethanol mixtures and temperatures near 80°C standing out, as they favored the extraction of phenols and flavonoids, increasing antioxidant activity, mainly in the seed. A correlation was observed between phenolic content and antioxidant activity, while the pulp had the highest vitamin C content. All extracts exhibited low cytotoxicity in the range of 25–200 µg/mL, maintaining cell viability above 80%. Under H₂O₂-induced oxidative stress, the extracts significantly increased cell viability, reduced lipid peroxidation, and promoted the recovery of intracellular GSH. The extracts from the pulp (14P), peel (15C), and seed (13S) stood out for their cytoprotective capacity, with the seed extract (13S) exhibiting the greatest antioxidant effect at 200 µg/mL, comparable to the quercetin standard. Black sapote (*Diospyros nigra*) extracts constitute an important source of bioactive compounds with antioxidant and cytoprotective properties, with the seed showing the greatest potential. These findings suggest their use as an underutilized byproduct for the development of functional and nutraceutical products aimed at reducing oxidative stress and preserving cellular integrity.

Keywords: Oxidative stress, cytoprotection, phenolic compounds, murine fibroblasts, nutraceuticals.

I. INTRODUCCIÓN

El zapote negro (*Diospyros nigra*), un fruto tropical originario de México y otras regiones de América Central, ha sido utilizado tradicionalmente en la dieta local, pero en las últimas décadas ha captado la atención científica por sus propiedades nutraceuticas y su potencial como fuente de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes (Merino *et al.*, 2022), que pueden tener efectos positivos sobre la salud humana al contrarrestar el daño causado por radicales libres y reducir el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y desórdenes metabólicos (Ribeiro *et al.*, 2023).

Dentro de los estudios más recientes, se ha observado que el fruto de esta especie tiene una elevada concentración de compuestos fenólicos como el ácido sináptico, ácido ferúlico y la catequina, así como de carotenoides como el β -caroteno y la luteína, los cuales están asociados con su actividad antioxidante global y propiedades funcionales, lo cual es comparable a otros frutos tropicales subexplotados pero reconocidos como el mamey, el zapote blanco o el chicozapote (Yahia *et al.*, 2011; Moo *et al.*, 2014). Asimismo, estudios en la pulpa del zapote negro han revelado un contenido significativo de vitamina C y tocoferoles, que aumentan su capacidad de eliminación de radicales libres (Merino *et al.*, 2022)

A pesar de su potencial como fuente de antioxidantes, la investigación en torno al zapote negro ha estado mayormente enfocada en su pulpa, dejando un vacío en el conocimiento acerca de la distribución de estos compuestos en otras partes del fruto, como la cáscara y las semillas. Sin embargo, esto representa una gran oportunidad para profundizar en la caracterización de sus fracciones vegetales y de su potencial uso en aplicaciones biológicas. Subproductos como la cáscara y la semillas, a menudo descartadas, podrían actuar como una importante fuente de compuestos antioxidantes no explorados previamente (Arana y Cevallos, 2016; Jiménez y Guerrero, 2021).

Además de su potencial antioxidante, la capacidad de los extractos del zapote negro para modular respuestas celulares podría tener implicaciones importantes en el desarrollo de nuevas estrategias de tipo terapéutico. Estudios en otras especies pertenecientes al género *Diospyros* han mostrado que los extractos de estos frutos pueden ejercer efectos inmunomoduladores y antiproliferativos, lo que sugiere que *Diospyros nigra* podría demostrar aplicaciones no sólo como antioxidante, sino también como agente en el manejo de enfermedades crónicas como el cáncer o trastornos inflamatorios (Adu *et al.*, 2022; Díaz *et al.*, 2023)

La extracción y caracterización de metabolitos secundarios como los fenoles y flavonoides de fuentes vegetales es una prioridad en la investigación actual debido a sus múltiples propiedades antioxidantes y antiinflamatorias; en donde métodos como la maceración han demostrado ser efectivos para maximizar su recuperación desde matrices complejas y evaluar su actividad en diferentes sistemas de prueba *in vitro* (Adu *et al.*, 2022). En particular, el uso de estos métodos en el zapote negro podría facilitar la obtención de extractos ricos en antioxidantes, que puedan ser evaluados para determinar su efecto sobre modelos biológicos como líneas celulares establecidas.

Por lo tanto, este proyecto se justifica en la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la diversidad de los componentes bioactivos del zapote negro en sus diferentes fracciones, así como en la aplicación de técnicas de extracción para evaluar su potencial antioxidante y efecto protector en sistemas celulares.

Esto permitiría entender mejor el efecto sinérgico de estos compuestos sobre modelos biológicos complejos, un aspecto clave para su aprovechamiento en aplicaciones nutracéuticas y farmacéuticas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades del zapote negro (*Diospyros nigra*)

Diospyros es el género más representativo de la familia Ebenaceae, con alrededor de 500 especies distribuidas en todo el mundo, en el continente americano se encuentran 100, de las cuales 20 especies se localizan en territorio mexicano (Hiern, 1873). Esta especie se distribuye principalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Wallnöfer, 2001). En México, la especie más aprovechada, con mayor distribución silvestre y cultivada es *Diospyros nigra*, siendo a su vez la especie nativa con mayor relevancia entre los zapotes estudiados en la actualidad (Probanche *et al.*, 2013; García *et al.*, 2015; Merino *et al.*, 2022).

El zapote negro (*Diospyros nigra*), es un fruto tropical originario del sur de México y Centroamérica. Este destaca por tener un sabor dulce y textura suave, así como por presentar una vida útil limitada; por lo que son ingeridos en fresco, así como materia prima en la industria de repostería y elaboración de conservas como jugos, mermeladas y helados (Lazcano *et al.*, 2011; Del Juncal, 2016; Matos, 2019; Palacios y Luna, 2023).

Además de su relevancia alimentaria, el zapote negro posee un importante valor cultural. Su presencia ha sido documentada en diversas lenguas indígenas de México, según el Gran Diccionario Náhuatl de la UNAM, la palabra para referirse a este fruto era “tliltzapotl”, mientras que en maya se le denomina “taúch” y en totonaco “biaqui”; reflejando su integración histórica en la dieta y tradiciones locales (López *et al.*, 2024; Lara *et al.*, 2024).

2.1.1. Descripción botánica y taxonomía

Tabla 1. Clasificación taxonómica del zapote negro (*Diospyros nigra*) (Orceña, 2023).

Nombre científico	<i>Diospyros nigra</i> (J.F. Gmel) Perr.	
Reino	Plantae	
División	Magnoliophyta	
Clase	Magnoliopsida	
Orden	Ericales	
Familia	Ebenaceae	
Subfamilia	Ebenoideae	
Género	<i>Diospyros</i>	
Especie	<i>Diospyros nigra</i>	

El nombre científico *Diospyros nigra* proviene del griego *Dios* (Διός, "de Zeus" o "divino") y *pyros* (πυρός, "trigo" o "fruto"), lo que puede interpretarse como “fruto divino” o “fruto de los dioses”; mientras

que *nigra*, del latín niger (“negro”), hace referencia al color oscuro característico de la pulpa en estado maduro (Borges *et al.*, 2021).

Cabe mencionar que, pese a compartir el nombre común de “zapote” con diversas frutas tropicales, esta especie pertenece a una familia botánica completamente distinta (Arana y Cevallos, 2016; Bernita y Pérez, 2020). Mientras que otros zapotes como el mamey (*Pouteria sapota*) y el zapote blanco (*Casimiroa edulis*), están clasificados en las familias Sapotaceae y Rutaceae respectivamente, el zapote negro forma parte de la familia Ebenaceae, que también incluye al ébano y al caqui (Arellano *et al.*, 2005). Esta coincidencia en la nomenclatura puede llevar a confusiones, pero taxonómicamente estas especies no están emparentadas (Arana y Cevallos, 2016).

2.1.1.1. Morfología de árbol, fruto y semillas

El árbol de *Diospyros nigra* es una especie perennifolia que puede alcanzar alturas imponentes que oscilan entre 6 y 25 m, aunque en condiciones óptimas puede superar los 30 m (Figura 1). Cuenta con troncos rectos que presentan diámetros de hasta 1-2.5 m y una corteza de tonalidad gris oscura o negruzca, ligeramente agrietada con la edad. La copa es densa y con forma redondeada, característica que le permite generar una gran sombra en ecosistemas tropicales (Morton, 1987; Crane y Balerdi, 2016).

Las hojas son simples y alternas, de forma elíptica a lanceolada, exponen márgenes enteros y ápice acuminado, alcanzando longitudes de 10 a 30 cm; muestran una coloración verde brillante en el haz y más clara en el envés, con una textura flexible que contribuye a su tolerancia a condiciones de alta radiación y humedad relativa. Desde el punto de vista anatómico, estas hojas muestran una organización clásica de dicotiledóneas con una cutícula desarrollada, lo que influye en procesos fisiológicos como la transpiración y el intercambio gaseoso (Ribeiro *et al.*, 2023).

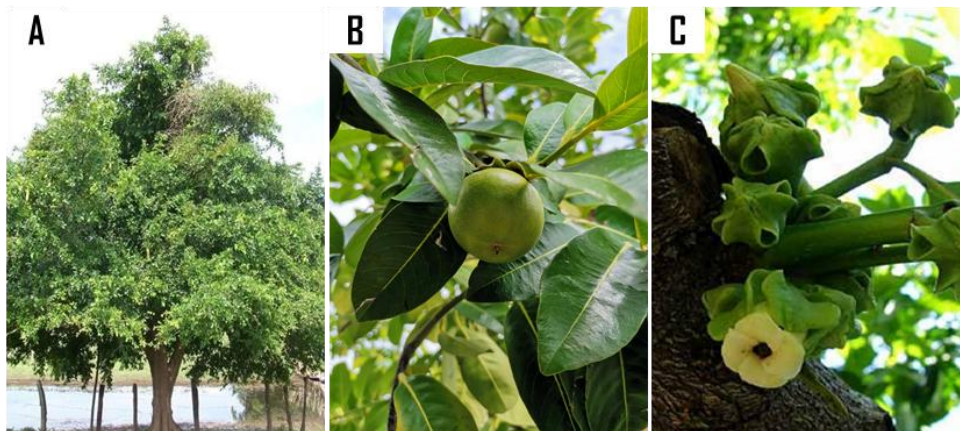


Figura 1. Morfología vegetal. A) Árbol, B) frutos y C) flores del zapote negro (*Diospyros nigra*).

Nota. Adaptado de Red de Viveros de Biodiversidad (s.f.) y del Instituto de Derecho Ambiental de la República Dominicana (IDARD) (s.f.) en zapote negro.

Las flores son generalmente unisexuales, pequeñas y de color blanco a crema, dispuestas en las axilas foliares. La especie cuenta con un sistema reproductivo que varía entre dioico y polígamo, lo cual tiene implicaciones directas en la producción de frutos y en la variabilidad genética de las poblaciones (Wallnöfer, 2001).

Por su parte, el fruto corresponde a una baya esférica con diámetros que varían entre 5 y 12 cm, que se distingue por la presencia de un cáliz persistente en la base, rasgo característico del género *Diospyros* (Figura 2). Desde el punto de vista estructural, el fruto está constituido por:

- Epicarpio (cáscara): delgado, liso y brillante, de color verde intenso en estado inmaduro, que se torna oscuro al avanzar el proceso de maduración (Del Juncal, 2016).
- Mesocarpio (pulpa): carnosos, de textura suave y cremosa, que experimenta una transición notable de color claro (blanquecino o amarillento) a un marrón oscuro o negro en su madurez fisiológica, asociado a procesos de oxidación y acumulación de compuestos fenólicos (Matos, 2019).
- Endocarpio: poco diferenciado, típico de frutos tipo baya.

Dicha transformación en color y textura de la pulpa, está relacionada con cambios bioquímicos durante la maduración, incluyendo la degradación de almidones, acumulación de azúcares solubles y la modificación de compuestos fenólicos, factores que determinan su aceptabilidad sensorial y su potencial funcional (Yahia *et al.*, 2019).

En el interior del fruto generalmente se encuentran entre 1 y 10 semillas, aunque existen ciertos frutos partenocárpicos que pueden carecer de ellas. Las semillas son grandes, aplanadas, de corteza dura y color marrón claro, envueltas en una membrana viscosa que facilita su dispersión (Jiménez y Guerrero, 2021; Merino *et al.*, 2022).

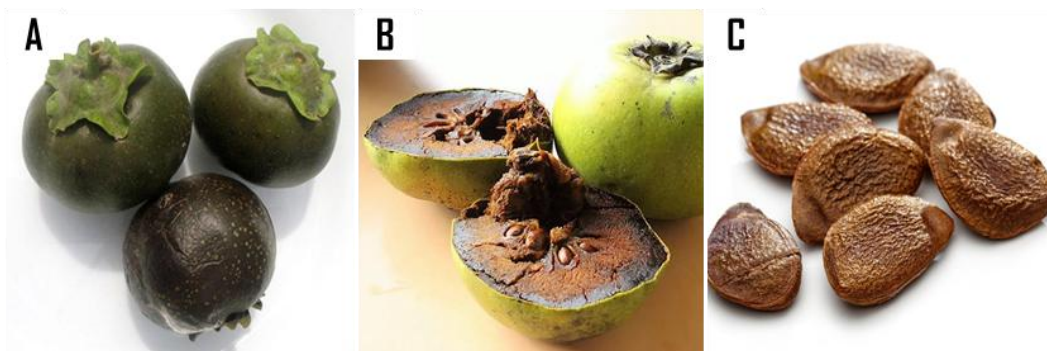


Figura 2. Fracciones vegetales A) cáscara, B) pulpa y C) semillas del zapote negro (*Diospyros nigra*).

Nota. Adaptado de *La cocina prehispánica mexicana*, por Curis (2014) y de *El zapote negro: las otras frutas tropicales de México*, por López y González (2024).

Los frutos de esta especie son altamente climatéricos y de vida útil limitada, por lo que siguen madurando tras la cosecha y requieren cuidados especiales para su manejo. Su temporada de producción ocurre entre los meses de agosto y enero (Palacios y Luna, 2023).

2.1.1.2. Ecología y requerimientos agroclimáticos

El cultivo de *Diospyros nigra* se distribuye principalmente a regiones tropicales y subtropicales de México y Centroamérica, donde las condiciones climáticas permiten su crecimiento y fructificación. Pese a que se considera una especie típica de climas cálidos, con rangos óptimos de entre 20 y 30 °C, presenta cierta tolerancia a condiciones subóptimas, incluyendo descensos ocasionales de temperatura cercanos a 0 °C, aunque exposiciones prolongadas pueden afectar negativamente su desarrollo. Asimismo, requiere

una precipitación anual aproximada de 1000 a 2000 mm, bien distribuida, aunque puede tolerar periodos cortos de sequía gracias a su sistema radicular profundo (Morton, 1987; Crane y Balerdi, 2016)

Desde el punto de vista edáfico, esta especie presenta una amplia adaptabilidad, desarrollándose en suelos de textura franca a arcillosa, con buen drenaje y alto contenido de materia orgánica. No obstante, se ha reportado que su crecimiento es óptimo en suelos ligeramente ácidos a neutros (pH 5.5-7.5), donde la disponibilidad de nutrientes favorece el desarrollo fisiológico del árbol (Ribeiro *et al.*, 2023).

En cuanto a su distribución altitudinal, *Diospyros nigra* puede encontrarse desde el nivel del mar hasta alturas máximas que rondan los 1500 m.s.n.m., lo que refleja su capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales dentro de regiones tropicales (Crane y Balerdi, 2016; Del Juncal, 2016). Esta plasticidad ecológica ha favorecido su establecimiento tanto en sistemas silvestres como en sistemas agroforestales tradicionales en México y Centroamérica.

Desde una perspectiva productiva, las condiciones agroclimáticas influyen directamente en la calidad del fruto, particularmente en atributos como tamaño, contenido de azúcares y composición de compuestos bioactivos. Factores como la disponibilidad hídrica, la radiación solar y la temperatura durante el desarrollo del fruto pueden modular procesos fisiológicos y metabólicos, impactando su valor nutricional y funcional (Alós *et al.*, 2019).

2.1.2. Producción e importancia en México

El fruto del zapote negro es una especie nativa de gran importancia que, a pesar de su adaptación, no ha logrado consolidarse como uno de los preferidos en la dieta mexicana. De acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la producción nacional del zapote ha ido disminuyendo con el pasar de los años, con 18,482.31 toneladas en 2021; 12,222.10 toneladas en 2023 y únicamente 7,915.71 toneladas en 2024. Sin embargo, dicha producción se reporta de forma agregada, puesto que los registros agrícolas agrupan distintas especies bajo la denominación general de “zapote”; lo que dificulta estimar con precisión el volumen específico correspondiente a *Diospyros nigra*, con una fracción menor del grupo, reflejando su carácter de cultivo subutilizado y de baja presencia en el mercado nacional (SIAP, 2022; SIAP, 2023; SIAP, 2024).

Su limitada producción no necesariamente responde a restricciones agronómicas, sino a factores relacionados con su baja comercialización, como a su escasa tecnificación del cultivo y limitada vida útil postcosecha, que dificulta su distribución en mercados formales (Alós *et al.*, 2019; FAO, 2020). En particular, su naturaleza climatérica acelera los procesos de maduración y fermentación, lo que aumenta las pérdidas durante su traslado y almacenamiento (Jiménez y Guerrero, 2021).

A nivel regional, la producción de zapote negro se concentra en estados con condiciones tropicales y subtropicales, destacando Campeche, Veracruz, Yucatán, Oaxaca, Chiapas y Michoacán como las zonas con mayor participación relativa en esta especie (Figura 3). En menor proporción, se reporta su cultivo en entidades como Puebla, Jalisco, Guerrero y Morelos, donde puede establecerse tanto en sistemas de temporal como bajo riego (García, 2014; Del Juncal, 2016; Merino *et al.*, 2022).



Figura 3. Distribución geográfica de zapote negro (*Diospyros nigra*) en México mostrando las entidades federativas con presencia de la especie.

Nota. Adaptado de *Mexico's Geopolitics Timeline*, por Arcos y Bustamante (s.f.).

2.1.3. Composición nutrimental y valor alimenticio

El fruto de *Diospyros nigra* se caracteriza por presentar un perfil nutrimental que lo posiciona como un alimento de interés dentro de los frutos tropicales, principalmente por su contenido de carbohidratos, fibra dietética y micronutrientes esenciales. Desde el punto de vista proximal, la pulpa se compone en su mayoría por agua (70-80%), seguida de carbohidratos totales capaces de representar entre el 15 y el 25% del peso fresco, que contribuyen a su sabor dulce distintivo (Rauf *et al.*, 2017).

Siguiendo con los macronutrientes, el zapote negro muestra un contenido moderado de fibra dietética, la cual se asocia con efectos benéficos en la salud digestiva; así como bajas concentraciones de lípidos y proteínas, cualidades comunes entre frutos tropicales (Jiménez y Guerrero, 2021; Merino *et al.*, 2021).

Uno de los aspectos más interesantes de su composición química es su contenido de vitamina C (ácido ascórbico), que puede alcanzar valores comparables o superiores a otros frutos tropicales, contribuyendo a su valor como fuente dietética de antioxidantes hidrosolubles. Además, se ha reportado la presencia de otras vitaminas, incluyendo vitamina A (carotenoides), vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina y niacina) y vitamina E en menores proporciones (Ribeiro *et al.*, 2023); asimismo, minerales esenciales como el calcio, fósforo y hierro (Jiménez y Guerrero, 2021; Jiménez 2023).

Asimismo, posee una gran variedad de propiedades nutraceuticas y farmacológicas derivadas de la actividad biológica de metabolitos fitoquímicos con actividad antioxidante, que se evidencian tanto en la cáscara como en la pulpa (Arana y Cevallos, 2016; Merino *et al.*, 2022). Algunos de estos compuestos son las antocianinas, flavonoides y taninos; pertenecientes a los compuestos del grupo fenólico y carotenoides, responsables del distintivo tono marrón oscuro del fruto (Navarrete, 2019; Jiménez, 2023).

2.2. Radicales libres

Los radicales libres (RL) son especies químicas que contienen uno o más electrones no apareados en su órbita externa, lo que los vuelve extremadamente reactivos y propensos a tomar electrones de moléculas estables para alcanzar su estabilidad electroquímica o neutralizarse (Gutiérrez *et al.*, 2014; Mariaca *et al.*, 2016; Guija y Guija, 2023). Su vida media es muy corta, durando sólo microsegundos, lo

que les permite interactuar rápidamente con su entorno e iniciar una reacción en cadena que puede afectar hasta 1 millón de moléculas (Coronado *et al.*, 2015), causando daños significativos a membranas celulares y tejidos (Llacuna y Mach, 2012; Mora *et al.*, 2019; Mejía *et al.*, 2021)

Los radicales libres de relevancia biológica se clasifican según el tipo de átomo del que provienen, incluyendo los radicales libres del oxígeno, nitrógeno, azufre y cloro, siendo los RL de oxígeno los más abundantes. Además, existen otras moléculas no radicales que actúan como agentes oxidantes o se convierten fácilmente en radicales, conocidas como especies reactivas del oxígeno (Gutiérrez *et al.*, 2014; Mariaca *et al.*, 2016; Mejía *et al.*, 2021; Guija y Guija, 2023).

Los RL se generan a través de tres mecanismos principales: 1) transferencia de electrones, en la que un electrón se transfiere de una molécula a otra; 2) la pérdida de un electrón por parte de una molécula, lo que da lugar a la formación de un radical; y finalmente, la 3) ruptura homolítica de un enlace covalente, en la cual cada fragmento resultante retiene uno de los electrones previamente compartidos en el enlace (Gutiérrez *et al.*, 2014; Mora *et al.*, 2019).

Sin embargo, cuando el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) dentro de la célula supera las defensas antioxidantes se genera estrés oxidativo. Este proceso provoca daño oxidativo a moléculas biológicamente importantes, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y produce compuestos finales con potencial mutagénico y citotóxico, como el malondialdehído (MDA) (García *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2019; Mejía *et al.*, 2021).

2.2.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo surge cuando hay un desequilibrio entre la producción y la desintoxicación de especies reactivas, lo que satura a la célula con radicales altamente oxidantes que derivan en la activación de la apoptosis, o muerte celular programada (Gutiérrez *et al.*, 2014; Mejía *et al.*, 2021). Este proceso está presente en varias condiciones patológicas donde se afecta la funcionalidad celular, contribuyendo al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes, obesidad, hipertensión arterial, síndrome metabólico, cáncer, aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades circulatorias y cardiovasculares, autoinmunes, trastornos neurológicos y neurodegenerativos como Parkinson y Alzheimer, al igual que se asocia con el envejecimiento e infertilidad (Valencia *et al.*, 2017; Mejía *et al.*, 2021; Dorantes *et al.*, 2023; Guija y Guija, 2023).

El creciente número de agentes oxidativos puede superar la capacidad de los sistemas biológicos para equilibrar de forma autónoma los oxidantes y antioxidantes, volviendo imprescindible el consumo de antioxidantes para contrarrestar estos efectos adversos (Mejía *et al.*, 2021).

2.3. Antioxidantes

Estas son sustancias que en cantidades reducidas son capaces de contrarrestar o retardar el efecto oxidante de los radicales libres sobre un sustrato como pueden ser lípidos, proteínas y DNA (Merino, 2011; Del Juncal, 2016). Los antioxidantes desempeñan un papel crucial en el sistema de defensa celular del organismo, salvaguardándolo de los daños causados por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno generados durante el proceso de respiración de las células aeróbicas, que contribuyen al proceso de envejecimiento y al desarrollo de diversas enfermedades, como cáncer y afecciones cardíacas (Merino, 2011; Arana y Cevallos, 2016; Murillo, 2022).

Estos se encuentran presentes en frutas y vegetales, la mayor parte de la capacidad antioxidante proviene de la presencia de la vitamina E, vitamina C, carotenoides y diversos polifenoles (Rioja *et al.*, 2018). Estas sustancias pueden encontrarse de manera natural en los alimentos, ser incorporados intencionalmente o surgir durante el proceso de elaboración (Arana y Cevallos, 2016). Sin embargo, es preferible consumirlos de fuentes naturales, dado que exhiben una potencia y eficacia superiores en comparación con aquellos derivados de fuentes sintéticas (Del Juncal, 2016).

2.3.1. Compuestos fenólicos

Los metabolitos secundarios corresponden a moléculas químicas capaces de ser sintetizadas de forma natural por las plantas, los cuales no son indispensables para su crecimiento y/o desarrollo (Figura 4); no obstante, son esenciales debido a que les confieren protección frente a factores bióticos (insectos, maleza, microorganismos patógenos -hongos, virus y bacterias-) y abióticos (rayos UV, sequía, temperaturas). Dentro de ellos forman parte los compuestos fenólicos, metabolitos secundarios sintetizados por las plantas a partir de la vía del shikimato; éstos pueden encontrarse en la mayoría de estructuras vegetales, desde raíces, corteza, tallo, hojas, frutos y en subproductos como la cáscara y la semilla (Robards, 2003; Dalbem *et al.*, 2012).

Estos compuestos tienen como estructura un anillo fenólico con uno o más grupos hidroxilo. Se clasifican principalmente como fenoles simples, ácidos fenólicos -que a su vez se subdividen en los derivados del ácido benzoico (ácido gálico, ácido vainílico, ácido salicílico, ácido protocatecuico y ácido p-hidroxibenzoico) y los derivados del ácido hidroxicinámico (ácido cafeico, p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido clorogénico), flavonoides, estilbenos, taninos hidrolizables y condensados, así como los lignanos (Llacuna y Mach, 2012).

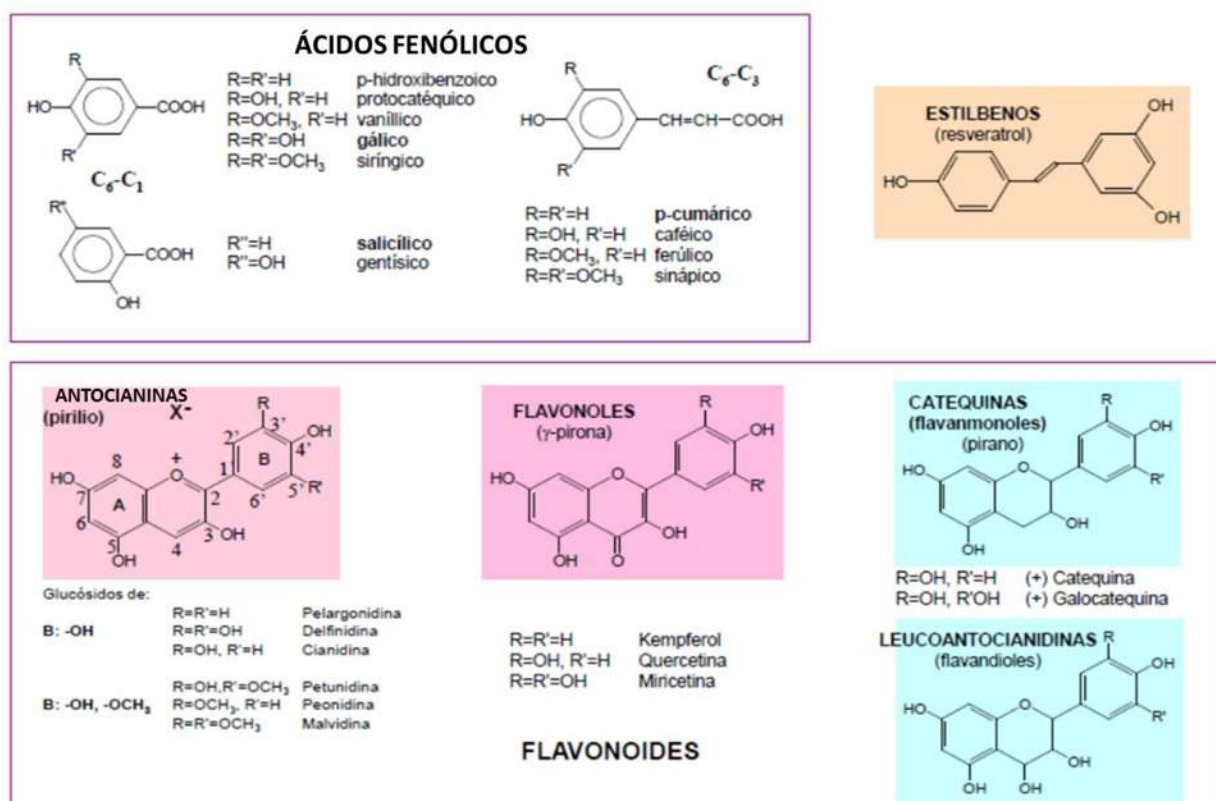


Figura 4. Estructuras químicas y ejemplos de algunos metabolitos secundarios generales.

Nota. Tomado de *Bioaccesibilidad, cambios en potencial antioxidante y estabilidad de los compuestos bioactivos presentes en dos extractos ricos en fibra sometidos a un proceso de digestión in vitro*, López (2016).

Los fenoles simples se representan por una estructura C6 formada por un anillo aromático y sus derivados. Dentro de este subgrupo se encuentra el orcinol, pirocatecol y el resorcinol. Las estructuras C6-C1, que se conforman por un anillo bencénico unido a un átomo de carbono, son típicas de ácidos fenólicos considerados bioactivos como los ácidos gálico y salicílico (Stevanovic *et al.*, 2009). Mientras que los derivados del ácido hidroxicinámico poseen una estructura C6-C3 y han sido ampliamente reconocidos por sus propiedades antioxidantes y de tipo antiinflamatorias, grupo en el que se encuentran los ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico (Škerget *et al.*, 2005; Dalbem *et al.*, 2012)

Los flavonoides son metabolitos secundarios con una estructura de 15 carbonos, donde el esqueleto se constituye por dos anillos de fenilo (anillo A y B) conectados por un puente de tres carbonos (anillo C). Los flavonoides pueden dividirse en varios grupos; como las antocianinas, flavonas, flavonoles, chalconas, auronas y proantocianidinas, entre otros (Panche *et al.*, 2016).

Las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados, son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas en forma de oligómeros o de polímeros constituidos por unidades de flavan-3-ol y flavan-3,4-diol. Las proantocianidinas se sintetizan a partir de la ruta metabólica de los fenilpropanoides y de los flavonoides (He *et al.*, 2008).

2.3.2. Balance oxidativo

Las reacciones de oxidación y reducción son fundamentales en los sistemas biológicos. En los seres vivos, el oxígeno del aire se utiliza en procesos oxidativos que generan energía en forma de ATP (Mejía *et al.*, 2021). Habitualmente, los niveles de radicales de oxígeno y nitrógeno son muy bajos, rara vez alcanzando concentraciones que puedan dañar moléculas cercanas (Gutiérrez *et al.*, 2014). Este equilibrio se mantiene gracias al balance entre la producción y eliminación de estos radicales mediante el sistema antioxidante (AOX), que regula las reacciones de óxido-reducción y la supervivencia celular, contrarrestando los efectos nocivos del oxígeno y eliminando sus productos tóxicos (Sánchez y Méndez, 2013; Mora *et al.*, 2019).

El equilibrio entre los efectos beneficiosos y dañinos de los radicales de oxígeno y nitrógeno es vital para los seres vivos, manifestándose en el "balance redox" u oxidativo, un mecanismo crucial para la regulación metabólica general, protegiendo a las células del estrés oxidativo y manteniendo la homeostasis al controlar el estado oxidativo-reductor del organismo (Gutiérrez *et al.*, 2014).

Dado que la defensa antioxidante del organismo es fácilmente sobrepasada por la formación de radicales libres, es necesario aumentar el consumo de alimentos ricos en antioxidantes que fortalezcan estos sistemas de protección. Una dieta rica en productos vegetales como frutas y hortalizas, proporciona compuestos que neutralizan los efectos relacionados al daño oxidativo y protegen eficazmente a las células (Llacuna y Mach, 2012; Mejía *et al.*, 2021; Guija y Guija, 2023).

2.3.3. Clasificación de los antioxidantes según su origen

a) Antioxidantes endógenos: Son compuestos sintetizados por el organismo como un mecanismo de defensa contra los radicales libres (Mejía *et al.*, 2021; Dorantes *et al.*, 2023; Guija y Guija, 2023). Este sistema antioxidante biológico incluye una variedad de enzimas, moléculas y agentes secuestradores que se dividen en dos categorías: enzimáticos y no enzimáticos (Sánchez y Méndez, 2013).

Los antioxidantes enzimáticos son moléculas complejas con alto peso molecular que actúan como sistemas de desintoxicación dentro de las células, constituyendo la primera línea de defensa contra el daño oxidativo (Sánchez y Méndez, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2014). Estas enzimas incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa y tioredoxina reductasa (López *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2014; Mejía *et al.*, 2021).

Los antioxidantes no enzimáticos, que son de menor tamaño y peso molecular, ayudan a inhibir la oxidación al unirse a metales como el hierro y el cobre, protegiendo contra el daño celular y evitando la propagación de radicales libres mediante la donación de protones o electrones (Sánchez y Méndez, 2013; Mejía *et al.*, 2021). Entre estos antioxidantes se encuentran las vitaminas E y C, el glutatión reducido (GSH), el ácido úrico, la bilirrubina, la ferritina, la mioglobina, la melatonina, la coenzima Q10 y los ácidos lipoicos (Llacuna y Mach, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2014; Galano, 2017; Mejía *et al.*, 2021; Guija y Guija, 2023).

b) Antioxidantes exógenos: Son aquellos incorporados a través de la dieta o suplementos alimenticios (Galano, 2017; Guija y Guija, 2023). Estas moléculas son conocidas como depuradores de radicales libres, ya que retrasan la producción y acción de estos radicales al neutralizarlos (López *et al.*, 2012) y su reposición mediante alimentos, principalmente frutas y verduras, debe ser constante (Mora *et al.*, 2019). Se han identificado polifenoles, vitaminas E y C, carotenoides y algunos minerales como antioxidantes naturales, además de antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA), los galatos, la N-acetilcisteína y la etoxiquina, empleados como aditivos para retardar la oxidación de lípidos y aceites comestibles (Galano, 2017; Mejía *et al.*, 2021; Dorantes *et al.*, 2023; Guija y Guija, 2023).

2.3.4. Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción química

a) Antioxidantes primarios o tipo I: Estos antioxidantes previenen la formación de radicales libres y evitan la oxidación al capturar directamente los radicales libres, creando especies mucho más estables o interrumpiendo la reacción en cadena mediante la donación de hidrógeno. En inglés, son conocidos como "free radical scavengers" o "captadores de radicales libres" (Galano, 2017). Algunos de estos antioxidantes incluyen enzimas como catalasas, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, transferrina y ceruloplasmina, así como tocoferoles y compuestos fenólicos (Huet, 2017; Mejía *et al.*, 2021).

b) Antioxidantes secundarios o tipo II: Estos antioxidantes retrasan la oxidación a través de acciones indirectas, como la quelación de metales, la regeneración de antioxidantes primarios, la descomposición de hidroperóxidos en especies no radicalarias, la eliminación de oxígeno y la absorción de luz ultravioleta (Galano, 2017). Asimismo, inactivan los radicales libres ya formados e inhiben el inicio de la cadena redox y detienen su propagación, eliminando los promotores de la oxidación, como los iones metálicos, el oxígeno singlete, las enzimas prooxidantes y otros oxidantes. Entre estos antioxidantes se encuentran

las vitaminas A, C y E, la coenzima Q10, los flavonoides y los polifenoles (Huet, 2017; Mejía *et al.*, 2021).

c) Antioxidantes terciarios o tipo III: Estos antioxidantes reparan el daño oxidativo, especialmente el que afecta al ADN, y se ocupan de la reconstrucción de membranas y eliminación de moléculas dañadas. Incluyen enzimas de reparación del ADN, proteasas y transferasas (Huet, 2017).

2.3.5. Antioxidantes caracterizados de Ebanaceae

Diospyros es el género más representativo y grande dentro de la familia Ebanaceae, el cual incluye alrededor de 700 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales que presentan abundantes cantidades de antioxidantes como proantocianidinas, antocianidinas, flavonoides, carotenoides, taninos, catequina y vitamina A y C (Rauf, 2017).

Diospyros nigra, nombre científico del zapote negro, posee una gran variedad de propiedades nutraceuticas y farmacológicas derivadas de la actividad biológica de metabolitos fitoquímicos con actividad antioxidante, que se evidencian tanto en la cáscara como en la pulpa (Arana y Cevallos, 2016; Merino *et al.*, 2022), donde se han determinado compuestos fenólicos como flavonoides, antocianinas, taninos, cumarinas; entre los que destacan el ácido sinápico, miricetina, ácido ferúlico y catequina. Asimismo, contiene otros compuestos bioactivos como carotenoides (luteína, β -caroteno y zeaxantina), quinonas, sapogeninas y tocoferoles; es una fuente importante de vitamina A y C, siendo ésta última mayor a la de los cítricos (Lazcano, 2011; Merino, 2011; Arana y Cevallos, 2016; Matos, 2019; Navarrete, 2019).

Diospyros kaki L., también es una fruta dotada de una fuerte actividad antioxidante. En las hojas y frutos del caqui, predominan algunos componentes particulares de tipo fenólico como proantocianidinas, oligómeros de flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, catequina, así como carotenoides (Butt *et al.*, 2015).

Otros frutos como *Diospyros mespiliformis* presentan en su composición fitoquímica la presencia de flavonoides, saponinas, taninos, fenoles, esteroides, triterpenoides, antraquinonas, antocianinas, alcaloides, cardenólidos, cumarinas y saponinas (Ramadwa y Meddows, 2023).

Por su parte, *Diospyros anisandra* contiene principalmente dos tipos de compuestos, clasificados en términos fitoquímicos como quinonas (que le dan el sabor amargo a esta especie) y terpenos (compuestos conocidos por sus propiedades aromáticas y presentes en diversas plantas). Hasta el momento, se han identificado más de 20 compuestos químicos en dicha especie, siendo la raíz la parte menos estudiada (Borges *et al.*, 2021).

2.3.6. Métodos de extracción

Existen diferentes métodos para la extracción de compuestos bioactivos. Sin embargo, la metodología tradicional es mediante maceración usando diferentes solventes.

2.3.6.1. Maceración

También conocida como extracción sólido-líquido, la maceración implica dejar reposar el material vegetal en algún disolvente, con la posibilidad de agitarlo para favorecer la difusión de compuestos solubles, ya sea a temperatura ambiente o tras la aplicación de calor; no obstante, aunque este factor

puede acelerar la extracción, existe el riesgo de comprometer la integridad de los metabolitos (Naranjo, 2016; Jaime, 2021; Jiménez, 2023).

El método se basa en la creación de enlaces entre el disolvente y el compuesto deseado, que será extraído de la materia orgánica. Aunque el disolvente mejora la solubilidad del soluto, en algunas instancias es necesario repetir el proceso para elevar el rendimiento (Jiménez, 2023).

La maceración se emplea de manera frecuente como el estándar para extraer metabolitos que son solubles en agua, como las betalaínas y antocianinas; o solubles en lípidos, como los carotenoides y clorofilas (Flores, 2017; Jiménez, 2023).

Tabla 2. Trabajos actuales que respaldan la extracción de compuestos antioxidantes

Fruto	Compuestos fenólicos	Fracción	Efecto biológico reportado	Autor
 Granada (<i>Punica granatum</i>)	Punicalagina, elagitaninos, punicalina, pedunculagina, quercetina, catequina, epicatequina, ácido elágico	Cáscara (mayor concentración)	Antioxidante, antiinflamatorio, antiproliferativo, anticancerígeno, antimicrobiano (<i>in vitro</i>)	Singh <i>et al.</i> , 2018
 Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Resveratrol, quercetina, ácido gálico, ácido p-cumárico, procatecuico, catequina, epicatequina, luteolina, proantocianidinas, antocianinas, flavonoles	Piel, semilla, hollejo	Antimicrobiano (incl. MRSA), cardioprotector, neuroprotector, antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno (<i>in vitro</i>), modulador de microbiota, antidiabético	Lima <i>et al.</i> , 2019 Averilla <i>et al.</i> , 2019 Sochorova <i>et al.</i> , 2020
 Aguacate (<i>Persea americana</i>)	Catequina, epicatequina, kaempferol, ácido procatecuico, entre otros.	Cáscara y semilla	Antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, antiproliferativo (Caco-2), anticancerígeno	Velderrain <i>et al.</i> , 2021
 Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Mangiferina, galotaninos, catequina, quercetina	Pulpa, cáscara, semilla	Antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, anticancerígeno (<i>in vitro</i>)	Tacias <i>et al.</i> , 2022
 Dátiles (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Ácido procatecuico, vanílico, cafeico, p-hidroxibenzoico, fumárico y ferúlico, quercetina, catequina, procianidina.	Semilla y pulpa	Antioxidante, antidiabético, antiinflamatorio, anticancerígeno, antidiabético, cardioprotector, antimutagénico, promueve la cicatrización, pigmento	Salih <i>et al.</i> , 2025

Este método de extracción presenta ciertas ventajas, como su simplicidad, bajo costo de implementación, y la opción de llevarlo a cabo a bajas temperaturas. A pesar de ello, exhibe limitaciones como la extensa duración del proceso, uso significativo de disolvente, escasa selectividad; así como la necesidad de filtrar el extracto, repetir el proceso y de evaporar el disolvente, con el riesgo de que los compuestos lábiles se vean afectados (Naranjo, 2016; Jaime, 2021; Jiménez, 2023).

2.4. Evaluación de compuestos antioxidantes

Actualmente, persiste una falta de consenso sobre cuáles son los métodos más apropiados para evaluar la actividad antioxidante, lo cual dificulta las comparaciones e interpretaciones de los resultados (Mejía *et al.*, 2021). Se distinguen principalmente dos tipos de modelos: los modelos *in vitro* y los modelos *in*

vivo, ambos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de diversas moléculas, compuestos o plantas (Mex *et al.*, 2023).

Los métodos *in vitro*, que utilizan técnicas espectrofotométricas a través de ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la transferencia de un solo electrón (SET), han sido estandarizados para medir la eficacia de recursos naturales antioxidantes (Benítez *et al.*, 2020; Dorantes *et al.*, 2023). Aunque son útiles para comparar la actividad antioxidante entre diferentes muestras de alimentos, tienen limitaciones desde el punto de vista nutricional al no reproducir condiciones fisiológicas extrapolables (Fernández *et al.*, 2006).

2.5. Modelo celular y evaluación del efecto biológico

2.5.1. Líneas celulares como modelo de estudio

Los métodos experimentales que evalúan la actividad biológica de compuestos antioxidantes incluyen enfoques *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*, cada uno con distintos niveles de complejidad y control. Los estudios *in vivo* permiten analizar respuestas integrales en organismos completos; aunque, entre sus limitaciones, están las asociadas a costos, variabilidad biológica y consideraciones éticas. En contraste, los métodos *in vitro*, particularmente los cultivos celulares, ofrecen sistemas controlados y reproducibles que permiten evaluar los mecanismos específicos a nivel celular y molecular (Halliwell y Gutteridge, 2015; Pamplona y Costantini, 2017).

Los modelos celulares representan una unidad de ensayo esencial en la investigación biomédica y nutracéutica, puesto que su implementación permite desglosar la dinámica de interacción molecular entre compuestos bioactivos y sistemas biológicos. Estos modelos experimentales resultan determinantes para cuantificar la homeostasis redox, mediante el análisis de la proliferación metabólica, la inducción de procesos citotóxicos y la modulación de defensas enzimáticas frente a especies reactivas de oxígeno (EROs), parámetros indispensables para establecer el potencial terapéutico y la seguridad biológica de los extractos vegetales (Mosmann, 1983; Stockert *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2020).

Entre las metodologías más utilizadas en estudios celulares destacan los ensayos de viabilidad celular, como el ensayo MTT, basado en la reducción de sales de tetrazolio por enzimas mitocondriales en células metabólicamente activas, lo que permite estimar la integridad funcional de la célula (Riss *et al.*, 2016; Stockert *et al.*, 2018). Además, la evaluación del estrés oxidativo a nivel celular incluye la cuantificación de EROs, la medición de biomarcadores de daño oxidativo y la determinación del estado redox intracelular, que brinda una aproximación más fisiológica en comparación con los ensayos químicos *in vitro* como DPPH o ABTS, los cuales no consideran la complejidad del entorno celular (Prior *et al.*, 2005; Apak *et al.*, 2016).

2.5.2. Fibroblastos murinos 3T3-L1: características y aplicaciones

Los fibroblastos son células mesenquimáticas claves en el mantenimiento de la homeostasis tisular, ya que participan activamente en la síntesis y remodelación de la matriz extracelular mediante la producción de colágeno, elastina y proteoglicanos que confieren soporte estructural a los tejidos (Figura 5). Además de su función estructural, estas células desempeñan un papel clave en la regulación del microambiente tisular a través de la secreción de factores de crecimiento, citocinas y mediadores redox,

lo que les permite responder dinámicamente a estímulos fisiológicos y patológicos (Sorrell y Caplan, 2004; Darby y Hewitson, 2007; Kendall y Feghali-Bostwick, 2014).

En ese contexto, los fibroblastos actúan como sensores y moduladores del estado redox celular, donde la producción controlada de especies reactivas de oxígeno (EROs) cumple funciones de señalización intracelular. No obstante, la exposición a niveles elevados de estas especies, como los inducidos por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pueden desencadenar daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN, promoviendo procesos como senescencia celular, apoptosis o disfunción metabólica (Sies *et al.*, 2017; Liguori *et al.*, 2018).

En condiciones de estrés oxidativo, los fibroblastos modulan su propio sistema de defensa, expresando enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y el sistema glutatión (glutatión reducido-glutatión peroxidasa), lo que les permite neutralizar EROs y preservar su función (Yu *et al.*, 2023). Sin embargo, existe cierta discrepancia en la literatura sobre la eficacia de dichos antioxidantes: mientras algunos estudios reportan que compuestos como la curcumina o el resveratrol prolongan la supervivencia y el ciclo replicativo de fibroblastos humanos (Bosch-Morell *et al.*, 2010), otros demuestran que altas concentraciones de los mismos pueden inducir estrés adicional al degradarse y generar peróxido de hidrógeno en el medio (Taddei *et al.*, 2012).

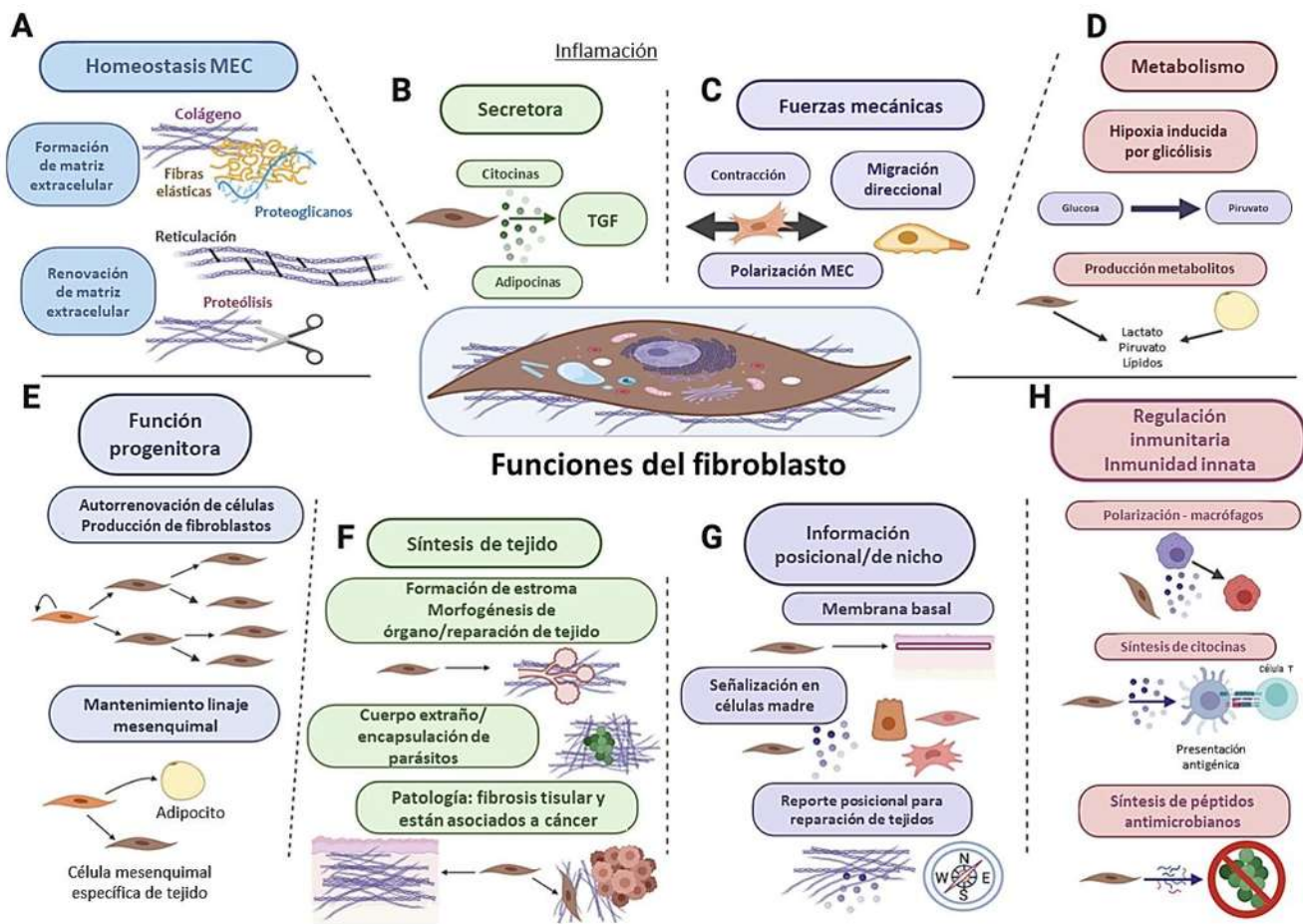


Figura 5. Funciones clave del fibroblasto en la homeostasis tisular

Nota. Adaptado de *Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease*, Plikus *et al.* (2021).

La línea celular murina 3T3-L1, derivada de fibroblastos embrionarios, se ha consolidado como un modelo experimental ampliamente utilizado en estudios de estrés oxidativo y evaluación de compuestos bioactivos. Aunque es reconocida por su capacidad de diferenciación a adipocitos, en su estado no diferenciado mantiene características típicas de fibroblastos, lo que la hace adecuada para analizar respuestas celulares frente a agentes prooxidantes y antioxidantes (Green y Kehinde, 1975; Zebisch *et al.*, 2012).

Una de las principales ventajas de esta línea celular es su alta reproducibilidad, facilidad de cultivo y estabilidad fenotípica, lo que permite evaluar de forma consistente parámetros como la viabilidad celular, estrés oxidativo y respuesta antioxidante. Por ello, el uso de 3T3-L1 permite estudiar la citotoxicidad de compuestos mediante ensayos como MTT, así como su capacidad citoprotectora frente a estrés inducido por H₂O₂, estableciendo relaciones dosis-respuesta en condiciones controladas (Riss *et al.*, 2016; Stockert *et al.*, 2018).

2.5.3. Ensayo MTT para evaluación de la viabilidad celular

La evaluación de la viabilidad celular constituye un paso fundamental en estudios *in vitro* orientados a determinar la citotoxicidad y el potencial citoprotector de compuestos bioactivos. De modo que, los ensayos colorimétricos basados en sales de tetrazolio se emplean ampliamente debido a su sensibilidad, reproducibilidad y facilidad de ejecución (Riss *et al.*, 2016; Stockert *et al.*, 2018).

El uso del ensayo MTT en modelos como 3T3-L1 permite evaluar tanto la citotoxicidad intrínseca de extractos vegetales como su efecto citoprotector frente a agentes prooxidantes. En este sentido, la disminución de la viabilidad celular tras la exposición a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se asocia con daño oxidativo y disfunción mitocondrial, mientras que la recuperación de la viabilidad en presencia de compuestos antioxidantes sugiere un efecto protector sobre la integridad celular (Wang *et al.*, 2018).

No obstante, es importante considerar que el ensayo MTT evalúa principalmente la actividad metabólica mitocondrial, por lo que sus resultados deben interpretarse con cuidado, ya que cambios en el metabolismo celular no siempre reflejan directamente la muerte celular. Además, algunos compuestos pueden interferir con la reducción del MTT o con la absorbancia del formazán, lo que resalta la necesidad de complementar este ensayo con otros indicadores de daño celular y estrés oxidativo (Stockert *et al.*, 2018; Rai *et al.*, 2018).

2.5.4. Evaluación del efecto protector frente a H₂O₂

Como se definió anteriormente, el estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad de los sistemas antioxidantes celulares para neutralizarlas, lo que conduce a daño en biomoléculas y alteraciones en la función celular (Sies, 2017; Liguori *et al.*, 2018). En modelos celulares, este fenómeno puede ser inducido de forma controlada mediante agentes prooxidantes, siendo el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) uno de los más utilizados debido a su capacidad de difundir a través de membranas celulares y generar radicales altamente reactivos como el radical hidroxilo (OH•) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El H₂O₂ actúa como una molécula clave en la señalización redox a bajas concentraciones; sin embargo, a concentraciones elevadas puede desencadenar un daño oxidativo significativo, incluyendo peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño al ADN, comprometiendo la viabilidad celular (Sies

et al., 2017; Circu y Aw, 2010). Cuyos efectos se manifiestan como disfunción mitocondrial, alteraciones en la morfología celular y activación de rutas asociadas a apoptosis o senescencia (Liu *et al.*, 2015)

La línea celular 3T3-L1 representa un modelo adecuado para evaluar el daño inducido por H₂O₂ y la capacidad protectora de compuestos antioxidantes. La exposición a concentraciones micromolares de H₂O₂, típicamente en el rango de 100 a 500 µM, ha sido ampliamente utilizada para inducir estrés oxidativo moderado a severo, permitiendo evaluar la respuesta celular en términos de viabilidad, producción de ROS y daño oxidativo (Wang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017). En específico, concentraciones cercanas a 300 µM han demostrado ser efectivas para inducir una reducción significativa en la viabilidad celular sin provocar necrosis, lo que resulta ideal para estudios de citoprotección.

2.5.5. Evaluación de daño oxidativo y estado redox celular (TBARS y GSH)

La evaluación del daño oxidativo en sistemas celulares requiere el análisis de biomarcadores que reflejen tanto el deterioro de biomoléculas como la capacidad de respuesta antioxidante endógena. Por lo que la cuantificación de la peroxidación lipídica y del glutatión reducido (GSH) constituyen una estrategia sólida para caracterizar el estado redox celular frente a condiciones de estrés oxidativo (Sies, 2017; Ayala *et al.*, 2014)

La peroxidación lipídica es uno de los principales mecanismos de daño inducido por especies reactivas de oxígeno (EROs), particularmente en membranas celulares ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Este proceso conduce a la formación de productos secundarios reactivos, entre los cuales destaca el malondialdehído (MDA), un compuesto utilizado como indicador de daño oxidativo (Ayala *et al.*, 2014). La determinación de estas especies se realiza comúnmente mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que permite estimar indirectamente los niveles de MDA a través de su reacción con el ácido tiobarbitúrico, generando un complejo coloreado capaz de ser cuantificable por medio de espectrofotometría (Ohkawa *et al.*, 1979).

En modelos celulares, el incremento en los niveles de TBARS tras la exposición a agentes prooxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se asocia con daño estructural en membranas, alteración de la permeabilidad celular y pérdida de funcionalidad, lo que impacta directamente en la viabilidad celular (Liguori *et al.*, 2018). Por lo tanto, la disminución de TBARS en presencia de compuestos antioxidantes se interpreta como un efecto protector frente a la peroxidación lipídica.

Particularmente, la línea 3T3-L1 facilita estudios comparativos de eficacia antioxidante entre extractos vegetales (Figura 6), al presentar marcadores de estrés oxidativo bien caracterizados (como inducción de MMPs (metaloproteinasas de matriz), activación de MAPK/p38) (Sorrell y Caplan, 2004; Darby y Hewitson, 2007). Asimismo, permiten estudiar la influencia de moduladores redox endógenos en los procesos de daño celular, senescencia y apoptosis, brindando información valiosa para el desarrollo de agentes terapéuticos basados en productos naturales, como los extraídos de *Diospyros nigra*, en la protección contra el daño oxidativo (Yu *et al.*, 2023).

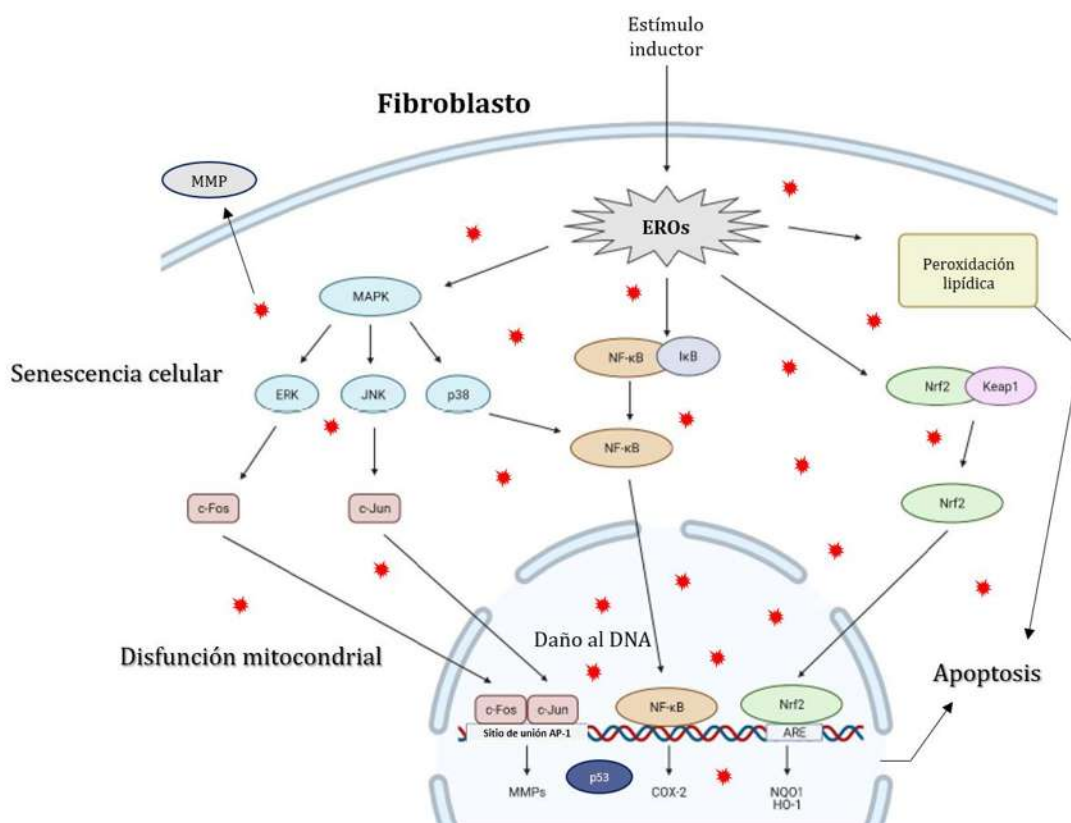


Figura 6. Representación esquemática del papel de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en fibroblastos, mostrando la activación de las vías MAPK, NF- κ B y Nrf2/Keap1, y sus efectos en daño celular, respuesta antioxidante, senescencia y apoptosis.

Nota. Adaptado de *Antioxidant Properties of Plant-Derived Phenolic Compounds and Their Effect on Skin Fibroblast Cells*, por Merez-Sadowska et al. (2021).

Por otro lado, el glutatión reducido (GSH) representa uno de los principales sistemas antioxidantes intracelulares. Este tripéptido participa activamente en la neutralización de EROs, en la detoxificación de peróxidos mediante la acción de la glutatión peroxidasa (GPx) y en el mantenimiento del equilibrio redox celular (Forman et al., 2009; Lu, 2013). La disminución de los niveles de GSH es un indicador temprano de estrés oxidativo, mientras que su recuperación o incremento en presencia de compuestos bioactivos refleja la activación o protección de los sistemas antioxidantes endógenos.

La evaluación conjunta de ambos indicadores -TBARS y GSH- permite obtener una visión integral del estado redox celular, puesto que integra tanto daño oxidativo a nivel de membrana como la capacidad de defensa antioxidante de la célula; por lo que, su aplicación en la línea 3T3-L1 permite correlacionar la actividad citoprotectora de compuestos con mecanismos específicos de protección frente al estrés oxidativo inducido.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe un interés creciente a nivel mundial por el consumo de compuestos antioxidantes provenientes de alimentos de origen natural y funcional que, además de su valor nutricional, aporten metabolitos secundarios que puedan ejercer efectos benéficos directos a la salud del consumidor. El zapote negro (*Diospyros nigra*) destaca como un fruto tropical aún poco estudiado, reconocido principalmente por su elevado contenido de carbohidratos, fibra y vitamina C. No obstante, la investigación científica se ha centrado mayormente en su pulpa, lo que evidencia un vacío en el conocimiento y representa una valiosa oportunidad para profundizar en el estudio de otras partes del fruto, como la cáscara y las semillas, que con frecuencia son descartadas. Estas estructuras vegetales, además de la pulpa, podrían constituir fuentes relevantes de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, susceptibles de ser evaluados *in vitro* para identificar sus posibles efectos biológicos. En ese contexto, el presente estudio busca contribuir a la caracterización integral de dichas fracciones, con evidencia suficiente que permita revalorizar estos subproductos, impulsar su consumo y promover al zapote negro como una fuente natural de compuestos antioxidantes con un amplio potencial de aplicación en sectores como la industria alimentaria y farmacéutica.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los extractos del zapote negro (*Diospyros nigra*) tendrán actividad antioxidante sobre la línea celular 3T3-L1?

V. HIPÓTESIS

Los extractos del zapote negro (*Diospyros nigra*) presentan efecto antioxidante sobre la línea celular 3T3-L1.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*) sobre la línea celular 3T3-L1.

6.2. Objetivos específicos

- a. Establecer las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes de la pulpa, cáscara y semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*).
- b. Cuantificar el contenido de fenoles totales y flavonoides, así como la capacidad antioxidante de los extractos del zapote negro (*Diospyros nigra*).

- c. Evaluar el efecto antioxidante de los extractos del zapote negro (*Diospyros nigra*) en la línea celular murina 3T3-L1.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de cumplir los objetivos planteados, se diseñó una estrategia experimental que inició con la colecta y determinación taxonómica del zapote negro, seguida del procesamiento de su pulpa, cáscara y semilla hasta alcanzar polvos deshidratados para el análisis de composición proximal. Posteriormente, se obtuvieron extractos con MSR por maceración y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas, además del contenido y actividad antioxidante. Con base en esos resultados, se seleccionaron tres extractos para su evaluación en la línea celular 3T3-L1, donde se analizó su citotoxicidad y la respuesta de estos frente a estrés oxidativo; cuyos extractos más efectivos se caracterizaron mediante HPLC-MS (Figura 7).

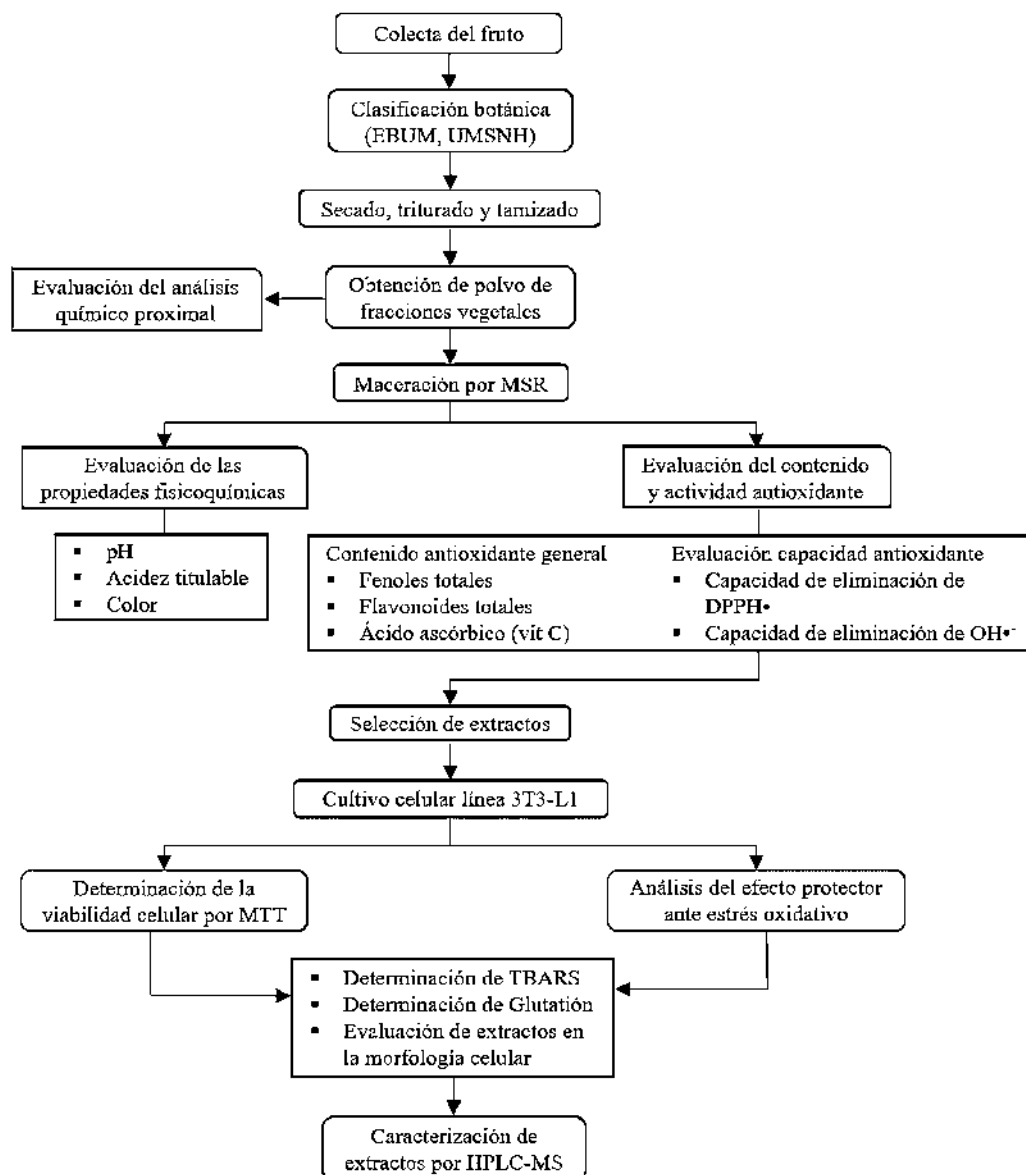


Figura 7. Diagrama de flujo del diseño experimental realizado

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Colecta del material vegetal e identificación botánica

Se colectaron frutos maduros de zapote negro (*Diospyros nigra*) a orillas del municipio de Ziracuaretiro, perteneciente al estado de Michoacán de Ocampo, México; a finales de marzo del año 2024. Localizado en la parte central del estado, con coordenadas de 19°24'12.9" de latitud norte y 101°55'38.8" de longitud oeste, de una huerta de nombre “El Mango” (Figura 8). Todas las muestras provinieron del mismo árbol y fueron conservadas a 4 °C hasta su uso.

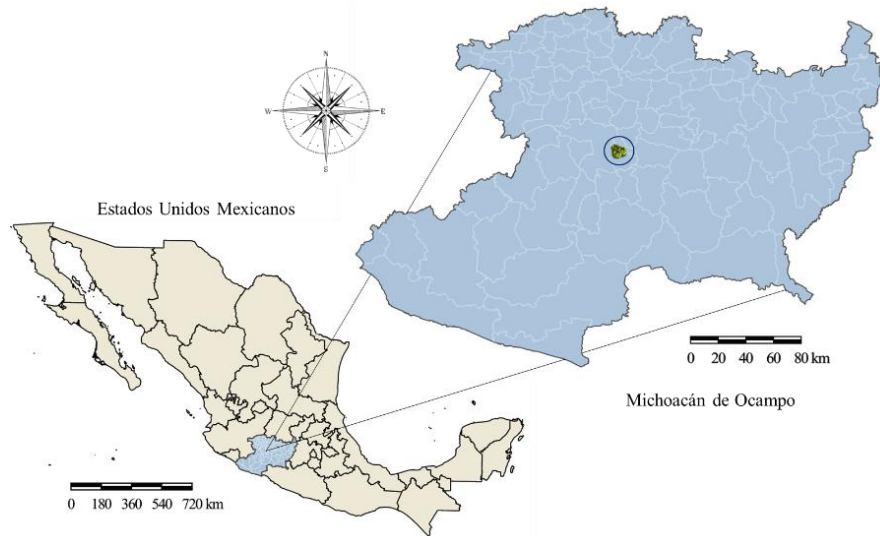


Figura 8. Localización geográfica (latitud 19°24'12.9" N, longitud 101°55'38.8" O) del municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, como sitio de colecta del zapote negro (*Diospyros nigra*). Imagen realizada con apoyo del Marco Geoestadístico 2024 de México-INEGI en Quantum GIS LTR 3.40 (QGIS).

Los ejemplares colectados fueron identificados taxonómicamente a través del Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (EBUM); que además del fruto maduro, se requirió de la colecta de ramas con hojas y flores, así como las dimensiones del árbol.

8.1.1. Deshidratado del fruto y obtención del polvo

a. Proceso de selección inicial

Los frutos de zapote negro fueron colectados en su punto de maduración fisiológica como de consumo, que tuvieran un tamaño aproximado de entre 6 a 10 cm de diámetro y una coloración verde olivo, además de firmeza estructural. Se omitieron aquellos ejemplares que presentaron deterioro físico o rupturas en la cáscara, presencia de plagas, señales de inmadurez, deshidratación, fermentación evidente o texturas blandas excesivamente acuosas.

b. Lavado y fraccionamiento

Los frutos fueron introducidos en una tina con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 min y se enjuagaron con agua potable o destilada para descartar todo posible residuo de la solución.

Posteriormente, se retiró la pulpa por medio de una cuchara, apartándola de la cáscara y las semillas, mismas que se dispusieron en bandejas distintas cubiertas de plástico o papel encerado. La pulpa se repartió uniformemente en la bandeja, adoptando un grosor de alrededor de 0.5 cm; mientras que la cáscara se cortó en pequeños fragmentos y se distribuyó junto con las semillas, esto con la finalidad de amplificar la superficie de contacto y así permitir la eliminación de agua (Figura 9).

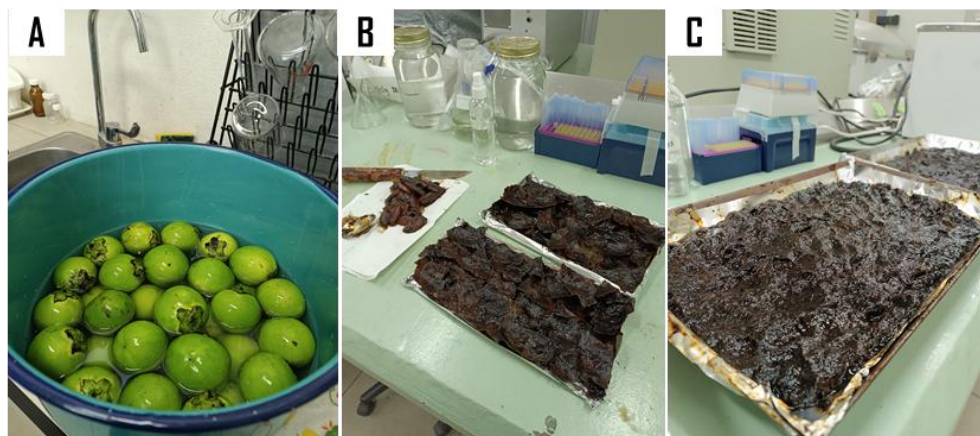


Figura 9. Frutos en solución de hipoclorito de sodio 1% (A), cáscara y semillas dispuestas por separado (B) y pulpa distribuida en bandejas de aluminio previo a secado (C).

c. Secado, molienda y tamizado

El material vegetal del fruto separado en bandejas (pulpa, cáscara y semillas) se secó en un horno (ECOSHEL 9053A, USA) a 50 °C durante 48 h. Cada una de las fracciones deshidratadas se trituró por separado en una licuadora convencional (Oster, USA) y se pasaron por un tamiz en una malla #40 para obtener una harina con un tamaño de partícula cercano a 400 μm (Figura 10).

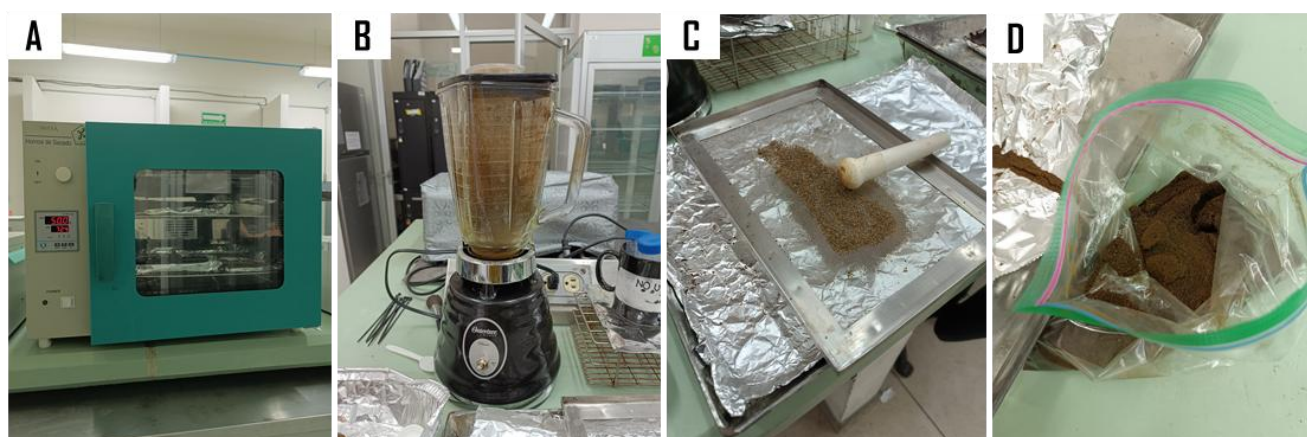


Figura 10. Material vegetal separado en bandejas (pulpa, cáscara y semillas) en un horno a 50 °C (A), que tras el secado fue triturado (B) y tamizado en una malla #40 (C). Almacenado temporalmente en bolsas herméticas (D).

d. Almacenamiento

El polvo resultante, obtenido de cada fracción vegetal del fruto, se almacenó por separado en frascos herméticos de vidrio tipo ámbar a 4 °C y a resguardo de la luz directa (Figura 11).



Figura 11. Bolsas herméticas cubiertas con papel aluminio como almacén temporal (A), antes de transferir los diferentes polvos en frascos de vidrio ámbar (B) y llevarlos a refrigeración.

8.2. Análisis químico proximal

La composición proximal del polvo de las distintas fracciones vegetales del zapote negro se determinó siguiendo las metodologías estándar de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists). En ese contexto, se evaluaron los contenidos de humedad, cenizas, proteína, fibra dietética -fibra soluble e insoluble- y extracto etéreo (lípidos). Asimismo, la porción de carbohidratos se calculó de manera indirecta, obteniéndola por diferencia al sustraer del 100% los porcentajes correspondientes a los análisis antes mencionados (humedad, proteína, cenizas, fibra dietética y extracto etéreo).

8.2.1. Determinación de humedad y curva de secado

El contenido de humedad se obtuvo mediante el método de secado en estufa descrito por la AOAC (925.10). Para ello, aproximadamente 3 g de la muestra fresca se colocaron en cápsulas previamente llevadas a peso constante, que se introdujeron en una estufa (Felisa, México) a 100 °C durante 3 h. Tras el tiempo de secado, las cápsulas se llevaron a un desecador para enfriar antes de volver a pesarlas. Este ciclo se repitió hasta que no se observaron variaciones en el peso, lo que permitió determinar la pérdida de agua a partir de la diferencia entre el peso inicial y el peso final.

Además, se definió el tiempo adecuado para deshidratar la muestra fresca, mediante la elaboración de una curva de secado de la pulpa en un horno (ECOSHEL 9053A, USA), empleando una temperatura de 50 °C durante 48 h. Este proceso se llevó a cabo teniendo especial cuidado en conservar la mayoría de compuestos bioactivos de interés y prevenir su degradación por efecto del calor.

8.2.2. Determinación de cenizas (residuo mineral)

La cuantificación del contenido de cenizas se realizó conforme al método AOAC 923.03, el cual se basa en la eliminación de la materia orgánica por incineración a alta temperatura. Para ello, se pesaron 3 g de muestra seca en un crisol y se sometieron a una etapa de carbonización inicial a baja temperatura (a la flama) en un manto calefactor (CIVEQ, México). Luego, los crisoles se trasladaron a una mufla (Felisa, México) y se mantuvieron entre 550 y 600 °C durante cerca de 3 h, hasta obtener un residuo blanco

correspondiente a la fracción mineral. Tras la incineración, los crisoles se enfriaron en un desecador y se pesaron repetidamente hasta asegurar un valor de peso constante.

8.2.3. Determinación de proteína

El contenido de proteína se determinó utilizando el método Kjeldahl (AOAC 2001.11), basado en la conversión del nitrógeno presente de la muestra en amoníaco (NH_3). Para el análisis, se tomaron 0.7 g de muestra seca y previamente desgrasada, a la que se le añadió una mezcla catalizadora de sales integrada por 8 g de K_2SO_4 y 0.7 g de CuSO_4 , en un digestor de calor (VELP Scientifica DK6, Italia), además de 10 mL de H_2SO_4 concentrado y el catalizador. El proceso se mantuvo durante aproximadamente 1 h, hasta obtener una solución clara.

Una vez enfriado el digestor, se diluyó con agua destilada para evitar salpicaduras violentas y se procedió a alcalinizar la muestra con NaOH concentrado en una unidad de destilación (VELP Scientifica UDK 129, Italia), capturando el NH_3 liberado en una solución de H_3BO_3 . Finalmente, se cuantificó el NH_3 retenido mediante una titulación con HCl 0.1 N y se calculó el valor estimado de proteína total a partir del nitrógeno aplicando un factor de conversión (6.25).

8.2.4. Determinación de extracto etéreo

La cuantificación de lípidos se efectuó empleando el método Soxhlet de acuerdo a la AOAC 920.39, el cual permite separar la fracción grasa mediante extracción con un disolvente orgánico, en este caso, éter etílico. Para el análisis, se colocaron 3 g de muestra seca dentro de un cartucho de extracción, mismo que se alojó en el aparato Soxhlet y se sometió a un proceso continuo de reflujo durante 4 a 6 h. Una vez finalizada la extracción, el disolvente se eliminó por evaporación en un rotavapor y el residuo se llevó a secado a 105 °C en estufa (Felisa, México) hasta peso constante, tras su enfriamiento en un desecador.

8.2.5. Determinación de fibra alimentaria total

La fibra dietética total fue determinada mediante un método enzimático-gravimétrico, utilizando un kit comercial (Total Dietary Fiber Assay Kit Item No. TDF100A, Supelco, Sigma-Aldrich) basado en el procedimiento estándar AOAC 991.43, el cual constituye una versión optimizada del método original descrito por Lee *et al.* (1992). El análisis consistió en la digestión enzimática secuencial de la muestra seca con α -amilasa termoestable (pH ~6.0, 95-100 °C), proteasa (pH ~7.5, 60 °C) y amiloglucosidasa (pH ~4.5, 60 °C), con el fin de simular las condiciones principales del tracto digestivo. Tras la hidrólisis, el material remanente se filtró y se llevó a un proceso de secado y desengrasado.

Por último, se realizaron correcciones con el contenido residual de proteínas y cenizas no digeridas, lo que permitió cuantificar la fibra dietética total -tanto la fracción soluble como la insoluble- por diferencia gravimétrica.

8.3. Extracción por maceración

La recuperación de compuestos con actividad antioxidante de las fracciones vegetales del zapote negro (*Diospyros nigra*) se valió de utilizar la maceración como método de extracción, bajo una estrategia de optimización experimental por metodología de superficie de respuesta (MSR), un diseño Box-Behnken (Tabla 1). Este modelo permitió evaluar el efecto de tres factores de respuesta claves: la proporción del

solvente (mezclas agua-etanol), la temperatura y el tiempo de extracción, cada una desglosada en tres niveles, en 17 corridas experimentales que integraron 5 repeticiones como puntos centrales.

Las soluciones extractantes consistieron en mezclas hidroalcohólicas con proporciones volumétricas de 25:75, 50:50 y 75:25 (agua-etanol 96%). Las temperaturas implicadas fueron 40, 60 y 80 °C, mientras que los periodos de contacto entre material vegetal y el solvente se fijaron en 30, 60 y 90 min; utilizando como equipo un baño de agua con termostato (CIVEQ HH-2, México). Además, se mantuvo una relación constante de 1:10 entre la masa de muestra y el volumen de solvente (1g/10mL), así como breves intervalos de agitación para favorecer la transferencia de compuestos bioactivos hacia la fase líquida.

Tabla 3. Optimización experimental por metodología de superficie de respuesta (Diseño Box-Behnken) para extractos de pulpa, cáscara y semilla de *Diospyros nigra*.

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH• (IC ₅₀ mg/mL)	OH• (IC ₅₀ mg/mL)
1	25	40	60	-	-	-	-
2	25	60	30	-	-	-	-
3	25	60	90	-	-	-	-
4	25	80	60	-	-	-	-
5	50	40	30	-	-	-	-
6	50	40	90	-	-	-	-
7	50	60	60	-	-	-	-
8	50	60	60	-	-	-	-
9	50	60	60	-	-	-	-
10	50	60	60	-	-	-	-
11	50	60	60	-	-	-	-
12	50	80	30	-	-	-	-
13	50	80	90	-	-	-	-
14	75	40	60	-	-	-	-
15	75	60	30	-	-	-	-
16	75	60	90	-	-	-	-
17	75	80	60	-	-	-	-

CE = Corrida experimental, Temp = temperatura, EAG = equivalentes de ácido gálico, EQ = equivalentes de quercetina, IC₅₀ = Concentración Inhibitoria Media. Los datos de fenoles totales, flavonoides, DPPH• y OH• son el promedio de los triplicados.

Los extractos generados bajo cada conjunto de condiciones experimentales se filtraron al vacío en papel filtro de poro abierto o cerrado, además de en papel Whatman (No. 42) en caso de ser necesario. Finalmente, se conservaron en tubos Falcon cubiertos de aluminio a -4 °C hasta su análisis (Figura 12).

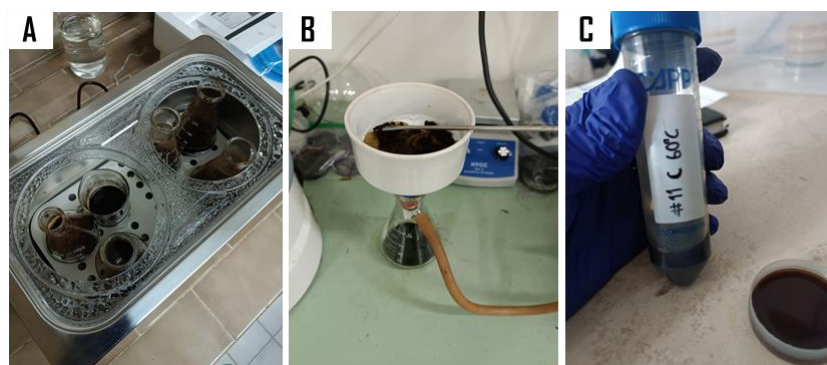


Figura 12. Obtención de extractos por maceración (A), proceso de filtrado al vacío (B) y almacenamiento (C).

8.4. Análisis fisicoquímico

A los extractos obtenidos, producidos a partir de la pulpa, cáscara y semilla del zapote negro, se les evaluaron diversas propiedades fisicoquímicas. Entre ellas se midió el pH, se determinó la acidez titulable mediante alcalimetría y se registraron los parámetros de color.

8.4.1. Determinación del pH

La medición del pH de los extractos se determinó empleando un potenciómetro digital (OHAUS Aquasearcher AB23PH, USA), previamente ajustado con soluciones tampón estándar de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Cada muestra se analizó por triplicado a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), sumergiendo el electrodo en alícuotas de extracto previamente homogeneizado. Antes de cada medición, el electrodo se enjuagó con agua destilada y se secó con cuidado para evitar interferencias entre las lecturas. Los valores obtenidos se reportaron como promedio $\pm$ desviación estándar.

8.4.2. Determinación de la acidez titulable

La acidez titulable se cuantificó mediante una titulación ácido-base utilizando una solución de NaOH 0.01 N como titulante y fenolftaleína como indicador (2-3 gotas). Para ello, se preparó una dilución 1:10 del extracto original, titulándose 10 mL de dicha solución hasta el viraje del indicador. La valoración se realizó adicionando NaOH gota a gota, con agitación constante, hasta observar un tono rosado tenue que permaneciera por al menos 30 s, señal del punto final.

El porcentaje de acidez se calculó tras considerar el volumen de NaOH consumido, su normalidad y el peso equivalente del ácido cítrico (64.04 g/eq), corrigiendo por el factor de dilución y la masa inicial de muestra empleada en la obtención del extracto, por medio de la fórmula:

$$\text{Acidez titulable (\%)} = \left(\frac{\text{mL NaOH} \times N \times \text{equiv. ácido} \times 100}{\text{mL de muestra}} \right)$$

Donde la acidez titulable se expresó como gramos de ácido cítrico por 100 gramos de muestra seca (g Ac/100 g de muestra), igual que lo reportado en estudios previos en extractos vegetales, con el fin de facilitar la comparación de resultados. Si bien el ácido ascórbico es uno de los ácidos predominantes del fruto, este ensayo es una medida global de los ácidos orgánicos presentes, por lo que su determinación se realizó de forma independiente utilizando un método colorimétrico.

8.4.3. Determinación del color

La evaluación de color de los extractos se realizó empleando un colorímetro manual (BYK Gardner, USA), bajo el sistema de coordenadas CIE-Lab* (Figura 13). Previo a cada conjunto de mediciones, el equipo se ajustó mediante un patrón blanco siguiendo las especificaciones del fabricante. Para cada determinación, se transfirió una porción del extracto a una celda óptica transparente y se efectuaron las lecturas bajo condiciones de iluminación controladas.

El equipo proporcionó los parámetros de L* (luminosidad), a* (tono en verde-rojo) y b* (tono en azul-amarillo), donde a partir de las coordenadas a* y b* se calcularon el croma (C*) y el ángulo de tono (h°),

con el fin de describir la intensidad y el matiz de color de los extractos evaluados. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron como valores medios $\pm$ desviación estándar.

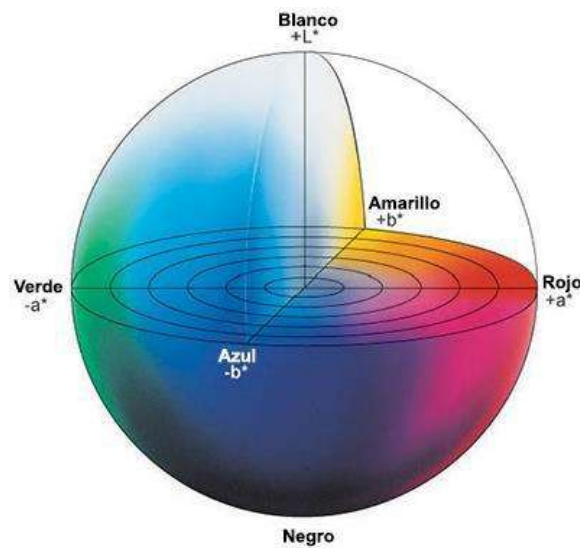


Figura 13. Diagrama cromático del sistema CIE-Lab*

Nota. Tomado de *Entendiendo el espacio de color CIE Lab*, por Konica Minolta Sensing Americas, Inc, s.f.,

8.5. Análisis antioxidante

Con el fin de valorar el potencial antioxidante de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de la pulpa, cáscara y semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*), se determinaron tres componentes clave: el contenido de fenoles totales, de flavonoides y la concentración de vitamina C (ácido ascórbico). Asimismo, la capacidad antioxidante *in vitro* se evaluó mediante dos ensayos complementarios: la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) y del radical hidroxilo (OH•).

8.5.1. Contenido antioxidante general

8.5.1.1. Determinación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se efectuó con base en los procedimientos descritos por Taga *et al.* (1984) y Singleton *et al.* (1999), con algunas modificaciones. Para ello, se mezclaron 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu en agua destilada [1:1] con una alícuota de 100 μ L del extracto, cuya dilución se ajustó dependiendo del material vegetal analizado y su posible interferencia de color. Tras agitar suavemente, la mezcla se dejó durante 2 min en reposo antes de incorporar 2 mL de una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% (m/v). La solución resultante se agitó nuevamente y se mantuvo por 30 min en oscuridad total. La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro UV-vis (SHIMADZU UV-1601, Japón) a una longitud de onda de 750 nm (A_{750} nm).

Los resultados obtenidos por triplicado se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g de muestra). La curva de calibración se preparó con una solución de ácido gálico [0-20 μ g/mL] como elemento estándar.

8.5.1.2. Determinación de flavonoides totales

El análisis cuantitativo de flavonoides totales se evaluó adaptando la metodología propuesta por Dewanto *et al.* (2002). Para ello, se mezclaron 0.5 mL de una solución de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% con 2 mL del extracto, previamente diluido según el material vegetal y su interferencia cromática. La mezcla se agitó y se dejó reposar en oscuridad total durante 30 min. Tras la incubación, la absorbancia se midió a 415 nm (A_{415} nm) utilizando un espectrofotómetro UV-vis (SHIMADZU UV-1601, Japón).

Los resultados obtenidos por triplicado se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra (mg EQ/g de muestra). La curva de calibración se elaboró con una solución de quercetina [0-20 $\mu\text{g/mL}$] como elemento estándar.

8.5.1.3. Determinación de ácido ascórbico

La cuantificación de ácido ascórbico (vitamina C) se realizó utilizando un método colorimétrico basado en la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DIP) o reactivo de Tillman a su forma incolora. Cabe señalar que, aunque se utiliza el mismo principio químico que el método oficial AOAC 967.21, la versión utilizada en este ensayo fue una adaptación espectrofotométrica de Yen y Chen (1996) que presenta una mayor sensibilidad en matrices vegetales.

Para el análisis, se agregaron 500 μL del extracto a analizar junto a 500 μL de una solución extractora de ácido metafosfórico (HPO_3) al 1% (m/v), con el fin de evitar la oxidación del ácido ascórbico durante la reacción; mezcla de la cual se tomó una alícuota de 100 μL y que, tras añadir 900 μL de una solución DIP [300 μM], se agitó e inmediatamente se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis (SHIMADZU UV-1601, Japón) a 515 nm (A_{515} nm). De manera paralela, se realizó un blanco de color sustituyendo el volumen de la solución DIP por agua destilada y se midió en conjunto con el resto.

Los resultados obtenidos por triplicado se expresaron como miligramos de ácido ascórbico por gramo de muestra (mg AA/g de muestra), tras ser interpolados en una curva de calibración construida con una solución de ácido ascórbico [0-140 mg/mL] como elemento patrón.

8.5.2. **Evaluación de la capacidad antioxidante**

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*) se determinó mediante ensayos espectrofotométricos, evaluando su capacidad para neutralizar tanto radicales libres de uso analítico como DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), como especies reactivas de importancia biológica, específicamente el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$).

8.5.2.1. Capacidad de eliminación de DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

El potencial de captación del radical DPPH• se evaluó mediante una modificación del protocolo descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Para ello, se mezclaron 100 μL del extracto o de la solución estándar (ácido gálico) con 1.9 mL de una solución de DPPH• [0.091 mM] en metanol puro (ajustada a 0.93 ± 0.02), hasta obtener un volumen de 2 mL, donde el blanco (metanol) se preparó simultáneamente. Tras una breve agitación, las mezclas se incubaron en ausencia de luz durante 30 min para permitir el desarrollo de la reacción. Una vez transcurrido el tiempo, se registró la absorbancia a 515 nm (A_{515} nm) en un espectrofotómetro UV-vis (SHIMADZU UV-1601, Japón).

Los resultados obtenidos por triplicado se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto (mg EAG/mL) tras su comparación con una curva de calibración construida con el mismo patrón [0-40 µg/mL]. Adicionalmente, se determinó el porcentaje de inhibición del radical DPPH• de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_c - A_m}{A_c} * 100$$

Donde A_c fue la absorbancia del control o estándar de referencia y A_m es la absorbancia de la muestra. A partir de dicha fórmula, se calculó el valor de IC_{50} , correspondiente a la concentración requerida para reducir en un 50% la señal asociada al radical.

8.5.2.2. Capacidad de eliminación de OH•⁻ (radical hidroxilo)

La actividad de captación del radical hidroxilo (OH•⁻) se determinó mediante un ensayo basado en las adaptaciones de los métodos descritos por Smirnoff y Cumbes (1989) y Zhang *et al.* (2012). Para ello, se prepararon soluciones de sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) a 8 mM, ácido salicílico ($C_7H_6O_3$) a 3 mM y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2% en agua destilada.

La reacción se inició mezclando 667 µL del extracto o de la solución patrón (ácido gálico) a diferentes concentraciones con 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de la adición de 200 µL de $FeSO_4$, 667 µL de $C_7H_6O_3$ y 167 µL de H_2O_2 . La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min en un baño de agua (CIVEQ HH-2, México) para favorecer la formación del radical. Paralelamente, se realizó un blanco de color del extracto sustituyendo el volumen restante de la solución con agua destilada y se midió. Al concluir el periodo de incubación, se adicionaron 299 µL de agua destilada y la absorbancia (A_1) se midió a 510 nm (A_{510} nm) en un espectrofotómetro UV-vis (SHIMADZU UV-1601, Japón).

Los resultados obtenidos por triplicado se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto (mg EAG/mL) tras su comparación con una curva de calibración construida con el mismo patrón [0-40 µg/mL]. Además, se determinó el porcentaje de eliminación del radical OH•⁻ de los extractos mediante la siguiente fórmula empleada por Fu *et al.*:

$$HO \% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

En donde A_0 es la absorbancia del grupo de control (la solución de muestra se reemplazó con dilución de solvente) y A_2 es la absorbancia del blanco como corrección de color (H_2O y solución de muestra). A partir de dicha fórmula, se calculó el valor de IC_{50} , correspondiente a la concentración requerida para reducir en un 50% la actividad asociada al radical.

8.6. Cultivo y mantenimiento de la línea celular 3T3-L1

Este apartado se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del IIQB de la UMSNH.

Se utilizó la línea celular 3T3-L1 provista por la ATCC, la cual exhibe morfología de fibroblastos murinos (*Mus musculus*), aislada originalmente de embriones de ratón suizo (Swiss albino). Los fibroblastos se descongelaron e incubaron con medio de cultivo DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino al 10% y solución antibiótica-antimicótica 100x al 1%,

en una atmósfera húmeda a 37°C con una concentración de 5% de CO₂. Después de tres pases celulares y al alcanzar una confluencia mayor al 90%, se despegaron con tripsina, se centrifugaron (2500 rpm/10 min), y se resuspendieron para finalmente ser contadas. Se sembraron 20,000 células por pozo en placas de 96 pozos (CORNING), en presencia de los extractos seleccionados (con base en su actividad frente al radical hidroxilo).

Los extractos de cada fracción vegetal de pulpa, cáscara y semilla de *Diospyros nigra*, se evaporaron previamente en un concentrador al vacío de ADN (Labconco CentriVap, USA) y se resuspendieron en una mezcla estéril de PBS y DMSO hasta su completa disolución.

8.6.1. Evaluación de la citotoxicidad de extractos mediante ensayo MTT en células 3T3-L1

La posible citotoxicidad de los extractos fue evaluada mediante la determinación de la actividad metabólica celular, utilizando el ensayo colorimétrico de MTT en células de la línea 3T3-L1. Las células se sembraron (20,000 células por pozo) en placas de 96 pozos.

Una vez sembradas las células, se incubaron a 37 °C durante 24 h a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 200 µg/mL) de los extractos preseleccionados en una atmósfera controlada con 5 % de CO₂.

Transcurrido el periodo de exposición, se adicionaron 20 µL de reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) al 0.5 % disuelto en PBS estéril. Las placas nuevamente se incubaron por 2 a 4 h en las mismas condiciones, permitiendo la producción de formazán en las células viables. Transcurrido el tiempo, se añadió una solución de HCl:isopropanol (1:19 v/v) para disolver los cristales, dejando reposar durante 20 min a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia una longitud de onda de 570 nm (A_{570} nm) utilizando un espectrofotómetro de microplacas (BioTek Epoch, USA).

Los resultados obtenidos realizados por triplicado permitieron calcular el nivel relativo de viabilidad celular y la citotoxicidad inducida en relación a su concentración por cada tratamiento.

8.6.2. Análisis del efecto protector frente a estrés oxidativo

De manera paralela, se evaluó la capacidad antioxidante protectora de los extractos mediante la determinación de su viabilidad o actividad metabólica celular, frente a condiciones de estrés oxidativo utilizando H₂O₂ como estímulo inductor. Para ello, se empleó el ensayo colorimétrico MTT.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente, se sembraron 20,000 células por pozo. Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂, en presencia de los extractos seleccionados a diferentes concentraciones (25, 50, 100 y 200 µg/mL). Posteriormente, se expuso cada pozo a una solución de H₂O₂ [300 µM] durante 3 h. Transcurrido el tiempo la solución se retiró, se realizó un lavado con PBS y se procedió con el ensayo MTT, mediante la adición de 20 µL de reactivo MTT al 0.5 % (disuelto en PBS estéril) a cada pozo, incubando de 2 a 4 h bajo las mismas condiciones. Tras esta etapa, se disolvió el formazán con una solución de HCl:isopropanol (1:19 v/v) y se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 570 nm (A_{570} nm) con un lector de microplacas (BioTek Epoch, USA).

Este ensayo permitió determinar la viabilidad celular tras la exposición a estrés oxidativo, en presencia y ausencia de los extractos. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado para asegurar reproducibilidad y la validez estadística de los resultados.

8.6.3. Determinación de marcadores de estrés oxidativo (glutación y TBARS) en homogenados celulares

A continuación, se procedió con ensayos de mayor especificidad, como la determinación de MDA para valorar la peroxidación lipídica y de GSH dentro de la respuesta antioxidante endógena; para ello, un nuevo proceso de selección fue requerido, partiendo de los resultados obtenidos tras evaluar el efecto protector de los tratamientos vegetales del apartado anterior, destacando los tratamientos: 14P (pulpa), 6C, 14C y 15C (cáscara), así como el 13S (semilla).

Nuevamente, se repitió la metodología del ensayo anterior sobre los cultivos de la línea 3T3-L1, con los nuevos extractos seleccionados a la concentración máxima [200 µg/mL] seguido de su inducción a estrés oxidativo con H₂O₂ [300 µM] durante 1 h. Transcurrido el tiempo, las células se despegaron, se sonicaron (amplitud 60) por 30 s (sumergidos en baño frío) y finalmente se centrifugaron -a 5000 rpm/10 min, descartando la pastilla y conservando el sobrenadante- manteniendo en congelación hasta su uso.

8.6.3.1. Determinación de TBARS -Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico-

La peroxidación lipídica se evaluó a través de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando un kit comercial (TBARS Assay Kit Item No. 10009055, Cayman Chemical Company). Este ensayo se basa en la reacción del malondialdehído (MDA), uno de los principales productos finales en la oxidación de lípidos, con el ácido tiobarbitúrico (TBA), bajo condiciones ácidas y a alta temperatura (90-100 °C), lo que lleva a la formación de un aducto MDA-TBA de color rosa intenso. Para ello, se añadieron 100 µL de muestra o estándar, 100 µL de solución SDS (Dodecilsulfato sódico) y 800 µL de reactivo cromogénico en un microtubo para centrífuga, que se calentó en un baño seco a 95 °C por 1 h, la reacción se detuvo atemperando en un baño de hielo. Posteriormente, los microtubos se centrifugaron a 1600 g durante 10 min a temperatura ambiente y se recuperaron 200 µL de sobrenadante, que se transfirieron por triplicado a una microplaca. El complejo formado se cuantificó mediante su lectura en un lector de microplacas (BioTek Epoch, USA) a una absorbancia de 535 nm (A_{535} nm).

La concentración de TBARS, se determinó tras su comparación con una curva de calibración elaborada a partir de estándares de malondialdehído (MDA) incluidos en el kit, y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de MDA (µM MDA) del lisado celular de la línea 3T3-L1.

8.6.3.2. Determinación de Glutación

La determinación de glutación (GSH) se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en reciclaje enzimático, utilizando un kit comercial (Glutathione Assay Kit Item No. 703002, Cayman Chemical Company). El ensayo se fundamenta en la capacidad del glutatión reducido (GSH) para reaccionar con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico o reactivo de Ellman) generando el cromóforo amarillo TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico). De manera simultánea, se forma un disulfuro mixto GSTNB (GSH y TNB), el cual es reducido nuevamente a GSH para producir más TNB por la acción del glutatión reductasa (GR) y NADPH como cofactor. Para ello, se agregaron 50 µL de muestra o estándar en los pozos designados de la placa y 150 µL de un cóctel de ensayo (Buffer MES + mezcla de cofactores y enzimas reconstituidos + agua + DTNB) preparado al momento, utilizando una pipeta multicanal. La placa se incubó durante 25 min en oscuridad y agitación constante y la medición de su absorbancia se realizó en un espectrofotómetro de microplacas (BioTek Epoch, USA) a 414 nm (A_{414} nm).

La concentración de glutatión (GSH) se determinó tras su comparación en una curva de calibración construida a partir de estándares proporcionados por el kit, y los resultados se expresaron como micromoles de glutatión (μM de GSH) del lisado celular de la línea 3T3-L1. Las muestras requirieron de un proceso de desproteinización previo a ensayo para evitar interferencias analíticas.

8.7. Análisis estadístico

La estrategia de optimización experimental para la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante por maceración de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*), se abordó mediante metodología de superficie de respuesta (MSR), empleando un diseño experimental tipo Box-Behnken, gracias al software Statgraphics Centurion XVII. Este modelo incluyó 17 tratamientos experimentales para cada matriz vegetal, incorporando 5 réplicas en el punto central con el fin de evaluar la reproducibilidad del sistema y estimar el error experimental. Se consideraron tres variables de proceso independientes, con tres niveles cada una: proporción de agua-etanol 96° (25, 50, 75 %), temperatura de extracción (40, 60, 80 °C) y tiempo de contacto (30, 60, 90 min); que se analizaron en función de su influencia sobre las variables de respuesta: fenoles totales, flavonoides totales y la capacidad antioxidante determinada por la captura de los radicales DPPH• y OH•.

Cada variable de respuesta se describió mediante un modelo polinómico de segundo orden, el cual permitió establecer su relación con las variables independientes evaluadas. La expresión general del modelo se presenta a continuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2$$

Donde Y representa el valor estimado de respuesta β_0 corresponde al término constante (intercepto); β_1 , β_2 y β_3 como los coeficientes asociados a los efectos lineales de las variables independientes; β_{12} , β_{13} y β_{23} describen las interacciones binarias entre los factores; y β_{11} , β_{22} y β_{33} representan los efectos cuadráticos. Las variables del proceso fueron codificadas asignándoles una letra de la siguiente manera: (A) proporción de agua, (B) temperatura y (C) tiempo. La significancia del modelo de regresión se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA), considerando un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

Adicionalmente, los datos obtenidos se trataron mediante los programas GraphPad Prism v 8.0.2 (263) y JMP 6.0.0, donde la comparación entre grupos se efectuó utilizando un análisis de varianza (ANOVA one-way), seguido de un análisis post-hoc de Tukey (Tukey HSD), con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se siguió el mismo procedimiento para evaluar el efecto de los extractos en los cultivos celulares.

La normalidad de las variables se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la igualdad de varianzas fue igualmente comprobada. La relación entre el contenido fitoquímico y la capacidad antioxidante de los extractos se determinó por medio del coeficiente de correlación de Spearman. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (SD). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p \leq 0.05$.

8.8. Consideraciones de bioseguridad y normatividad

El desarrollo experimental del presente estudio se realizó siguiendo estrictamente las disposiciones institucionales en materia de bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio, con el fin de garantizar el manejo seguro de reactivos y material biológico. El uso, almacenamiento y eliminación de sustancias

químicas se efectuó conforme a la normativa vigente de seguridad e higiene, valorando la identificación de riesgos, el etiquetado correcto y la consulta de hojas de seguridad, de acuerdo con lo establecido con la NOM-005-STPS-1998 y NOM-018-STPS-2015.

Los procedimientos de cultivo celular se llevaron a cabo bajo condiciones controladas y técnicas de asepsia, empleando equipo de protección personal y cabinas de bioseguridad cuando fue requerido. La línea 3T3-L1 (fibroblastos murinos) es una línea celular establecida y considerada no patógena, que se clasifica generalmente en el nivel de bioseguridad 1 (BSL-1), por lo que su manipulación no implica un riesgo biológico relevante al seguir las prácticas estándar de laboratorio.

La gestión de residuos biológico-infecciosos generados durante el estudio experimental se realizó conforme a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, asegurando su adecuada separación, inactivación y disposición final. Dado que la investigación se desarrolló únicamente con una línea celular establecida y no involucró animales vivos ni muestras humanas, no fue necesario someter el protocolo a evaluación por el Comité de Ética en Investigación, Investigación y Bioseguridad (UMSNH); sin embargo, se respetaron los principios de bioseguridad y responsabilidad en el manejo del material biológico.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Colecta del material vegetal e identificación botánica

Los frutos del zapote negro (*Diospyros nigra*) fueron obtenidos de una huerta de nombre “El Mango”, localizada a orillas del municipio de Ziracuaretiro, Michoacán de Ocampo, México (latitud 19°24’12.9” N, longitud 101°55’38.8” O, altitud 1380 m.s.n.m.); en donde abundan árboles frondosos de alrededor de 12 m de largo y 1.80 m de diámetro a la altura del pecho (Figura 14).

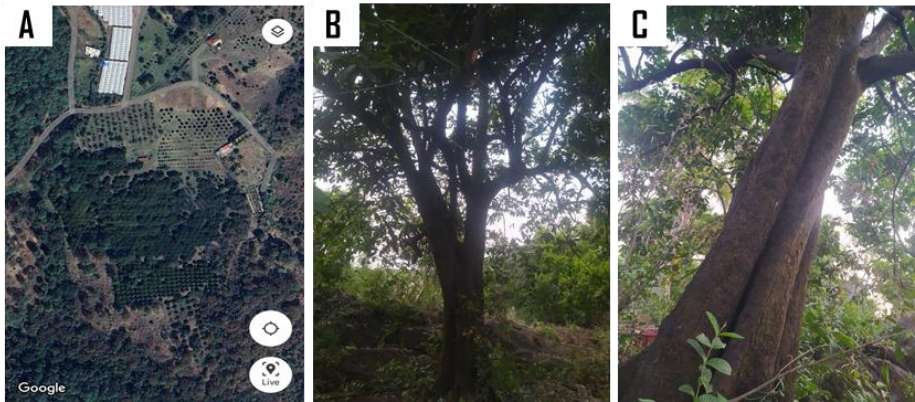


Figura 14. Colecta del zapote negro (*Diospyros nigra*) en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. Localización geográfica (A), árbol frondoso de colecta del zapote negro (B y C).

Una vez realizada la determinación y clasificación taxonómica del ejemplar botánico y sus duplicados por la Biól. Norma Patricia Reyes Martínez, se concluyó que estos reunían las características necesarias para formar parte de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM (No. Folio 3651), en donde se muestra su análisis particular (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del zapote negro (*Diospyros nigra*) y su registro en la base de datos de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM.

Familia	Ebenaceae Gürke	
Genero	<i>Diospyros</i> L.	
Especie	<i>Diospyros nigra</i> (J.F. Gmel) Perr.	
Latitud	19°24’12.9” N	
Longitud	101°55’38.8” O	
Altitud	1380 m.s.n.m.	
Localidad	Ziracuaretiro, municipio de Ziracuaretiro	
Estado	Michoacán	
Hábitat	Huerta “El Mango”	
Fecha de colecta	28 de marzo del 2024	
Colecta	A. Arias Alcalá	
Observaciones	Árbol de 12 m con un DAP de 1.80 m, flor de color blanquecina, fruto verde olivo del tipo comestible de 6-8 cm de diámetro.	

Registro en la base de datos de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM (No. Folio 3651). Ejemplar botánico y sus duplicados, hojas, flores y frutos herborizados (A). DAP = Diámetro a la altura del pecho.

El total de la colecta fue de alrededor de 8 kg de fruto fresco, que correspondió a 42 frutos maduros con un peso promedio de 190.39 ± 36.46 g. En donde el peso fresco promedio de la pulpa recuperada del fruto fue de 152.31 ± 29.15 g (80%); mientras que el peso fresco de las cáscaras y parte del cáliz fue de 19.99 ± 3.83 g (10.5%) y las semillas tuvieron un peso promedio de 18.09 ± 1.5 g (9.5%). Esto resulta consistente con lo reportado por Moo *et al.* (2014), cuyo rendimiento de fracción comestible para este fruto fue de $80.0\% \pm 1.0$; mientras que Ramírez-Briones *et al.* (2019) obtuvieron porcentajes de entre $58.8 \pm 11\%$ y $66.5 \pm 8.0\%$ en su pulpa y del 4.52 a 7.14% en semillas. Palacios y Luna (2023) mencionan un análisis ponderal del $10.02\% \pm 1.01$ correspondiente a la fracción de semillas de la misma especie.

9.2. Análisis químico proximal

Se determinó la composición proximal de las fracciones de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro. La humedad se evaluó en muestras frescas y se expresó en base húmeda; en tanto, los contenidos de cenizas, proteína, lípidos, fibra dietética total en su porción soluble e insoluble y los carbohidratos, se expresaron en base seca. Para ello, las muestras destinadas al análisis fueron previamente deshidratadas (50 °C, 48 h) y molidas, obteniendo un polvo con una humedad residual del 8.35% en el caso de pulpa.

9.2.1. Análisis químico proximal de la pulpa de *Diospyros nigra*

El análisis proximal del polvo obtenido a partir de la pulpa del zapote negro reveló que, en su base seca, los carbohidratos (69.93%), seguidos de la fibra dietética total ($18.07\% \pm 0.71$) y el valor de proteína ($7.69\% \pm 0.25$), constituyeron los principales componentes en la muestra (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis químico proximal (% base seca) de pulpa de zapote negro (*Diospyros nigra*).

Parámetro	Valor estimado
Humedad (%)	83.71 ± 0.10
Materia seca (%)	16.29 ± 0.10
Contenido mineral (% b.s.)	3.57 ± 0.02
Proteína total (% b.s.)	7.69 ± 0.25
Extracto etéreo (% b.s.)	0.75 ± 0.05
Fibra dietética total (% b.s.)	18.07 ± 0.71
-Fibra insoluble	8.03 ± 0.06
-Fibra soluble	10.64 ± 0.65
*Carbohidratos (% b.s.)	69.93

b.s.= Base seca. Valor promedio de 3 repeticiones $\pm$ desviación estándar. *Resultado obtenido por diferencia.

El porcentaje de humedad por el método de secado establecido por la AOAC (método 925.10) para la pulpa fresca del zapote negro fue de $83.71\% \pm 0.10$, mismo que coincide con los resultados obtenidos por Morton (1987) y Del Juncal (2016) con 79.46-83.1%; así como por Moo *et al.* (2014) con $75.72\% \pm 0.45$, Navarrete (2019) con 80.62% y la revisión de Jiménez y Guerrero (2021) con 71-87%.

Se evaluó el tiempo de secado de la pulpa del zapote negro a 50 °C (Figura 15), donde se observa cómo, al inicio del estudio, la pulpa presentó un contenido de humedad de $83.71\% \pm 0.10$ que disminuyó progresivamente durante el proceso de secado; con la mayor pérdida entre las 12 y 36 h, asociada a la eliminación de agua en su fracción libre. A las 36 h se alcanzó una humedad de 14.61% y se redujo de forma gradual la velocidad de deshidratación, hasta obtener una humedad final de $8.35\% \pm 0.02$ a las 48 h y se almacenó en frascos de vidrio herméticos.

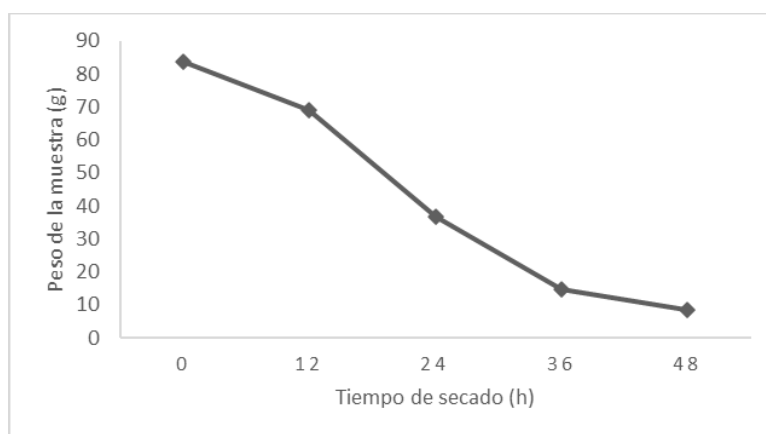


Figura 15. Curva de secado a 50 °C durante 48 h de la pulpa del zapote negro (*Diospyros nigra*).

En cuanto al contenido mineral, representado en base seca por el porcentaje de cenizas ($3.57\% \pm 0.02$), la pulpa presentó un valor similar al rango aportado por Morton (1987) con 1.80-3.55%, así como por Jiménez y Guerrero (2021) con 2.85-5.28%; mientras que Yahia *et al.* (2011) reporta un valor inferior de 1.1%, cercano al 0.85% de Navarrete (2019) para la misma especie en frutos no partenocárpicos.

Respecto a su contenido proteico total, el valor obtenido en base seca fue de $7.69\% \pm 0.25$, el cual resultó más alto y difiere levemente al rango reportado por Morton (1987) de 3.02-4.08% y por Jiménez y Guerrero con 3.45-4.62%. Por otro lado, Navarrete (2019) obtuvo un valor menor de 2.24%.

El nivel de lípidos fue el más bajo entre todos los componentes, con apenas $0.75\% \pm 0.05$ en base seca; sin embargo, fue superior al 0.05-0.06% reportado por Morton (1987) y al 0.1% de Yahia *et al.* (2011), pero cercano a lo obtenido por Navarrete (2019) con 0.48% y en el rango aceptable de Jiménez y Guerrero (2021) de 0.08-4.14%.

Por otro lado, la fibra dietética total alcanzó un valor de $18.07\% \pm 0.71$ en base seca, correspondiendo el segundo componente mayoritario en pulpa, similar a lo reportado por Yahia *et al.* (2011) con 16%, Moo *et al.* (2014) con $20.44\% \pm 1.86$ y en el rango de 16-21% propuesto por Jiménez y Guerrero (2021). El perfil químico proximal realizado mostró que la fracción soluble (10.64 ± 0.65) predominó sobre la fracción insoluble (8.03 ± 0.06); esto resulta coherente con los estudios de Moo *et al.* (2014), que obtuvieron $10.17\% \pm 0.98$ de fibra soluble y $10.27\% \pm 0.88$ de fibra insoluble. Por el contrario, Del Juncal (2016) calculó 9.88% de fracción soluble y 23.29% del tipo insoluble. Navarrete (2019) únicamente reportó el valor de fibra cruda, como estimación de la fibra insoluble (5.35%).

Finalmente, como componente principal de la pulpa del fruto y obtenidos por diferencia de peso, los carbohidratos registraron un valor en base seca de 69.93%, consistente con lo mencionado por Morton

(1987) con 62.60-89.40% y por Jiménez y Guerrero (2021) con 51.7-92.3%. Por su parte, Yahia *et al.* (2011) y Navarrete (2019) reportaron un valor de 82% y 91.8% de azúcares totales, respectivamente.

9.2.2. Análisis químico proximal de la cáscara de *Diospyros nigra*

De la misma forma, el análisis proximal del polvo obtenido a partir de cáscara del zapote negro reveló que la fibra dietética (58.48 ± 0.69), seguida por los carbohidratos (30.18%) y las proteínas (6.48 ± 0.03), constituyeron los principales componentes presentes en la muestra (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis químico proximal (% base seca) de cáscara de zapote negro (*Diospyros nigra*).

Parámetro	Valor estimado
Humedad (%)	65.51 ± 0.56
Materia seca (%)	34.49 ± 0.56
Contenido mineral (% b.s.)	2.36 ± 0.12
Proteína total (% b.s.)	6.48 ± 0.03
Extracto etéreo (% b.s.)	2.50 ± 0.35
Fibra dietética total (% b.s.)	58.48 ± 0.69
-Fibra insoluble	40.77 ± 0.08
-Fibra soluble	17.71 ± 0.61
*Carbohidratos (% b.s.)	30.18

b.s.= Base seca. Valor promedio de 3 repeticiones $\pm$ desviación estándar. *Resultado obtenido por diferencia.

La humedad obtenida para la cáscara del zapote negro una vez retirada la pulpa fue de $65.51\% \pm 0.56$ que, ante la falta de estudios en otros frutos del género *Diospyros*, tuvo que compararse con la cáscara del mamey zapote (*Pouteria sapota*), en donde Solís *et al.* (2015) reportaron un valor de $44.25\% \pm 0.06$.

En el apartado de cenizas, expresado en base seca como $2.36\% \pm 0.12$, la cáscara presentó un valor similar pero inferior al registrado por Yaqub *et al.* (2013) en cáscara liofilizada de caqui o palosanto (*Diospyros kaki*) con 3.64%. De la misma forma, Solís *et al.* (2015) mencionan un valor de $3.89\% \pm 0.07$ utilizando cáscara de frutos maduros de mamey zapote (*Pouteria sapota*).

El contenido de proteína total ($6.48\% \pm 0.03$), como tercer componente principal del polvo de cáscara, resultó ser casi del doble al propuesto por Yaqub *et al.* (2013) con 3.58% en cáscara liofilizada de caqui o palosanto (*Diospyros kaki*); mientras que Solís *et al.* (2015) reportaron un valor idéntico, en cáscara de frutos de mamey zapote (*Pouteria sapota*) con $6.48\% \pm 0.43$.

Respecto al contenido de lípidos, expresado en base seca como porcentaje de extracto etéreo ($2.50\% \pm 0.35$) fue superior al resto de partes del fruto (pulpa y semilla), debido a su riqueza de pigmentos extraídos en el aparato Soxhlet más que a su contenido de grasas; con un valor en común a Yaqub *et al.* (2013) con 2.30% en cáscara liofilizada de caqui (*Diospyros kaki*), y bastante bajo a lo registrado por Solís *et al.* (2015) con $6.30\% \pm 0.024$ en frutos de mamey zapote (*Pouteria sapota*).

Como componente mayoritario de la cáscara, se obtuvo un valor en base seca de fibra dietética total del $58.48\% \pm 0.69$, que difiere con lo reportado por Yaqub *et al.* (2013) en la cáscara liofilizada de caqui

(*Diospyros kaki*) con 39.01%. Este mismo estudio señala un valor de 37.46% en la fracción insoluble (especificado en celulosa, hemicelulosa y lignina, como parte de la pared vegetal) y 1.04% de fracción soluble restante. La composición química mostró que la fracción insoluble ($40.77\% \pm 0.08$) fue mayor a la soluble ($17.71\% \pm 0.61$). Por su parte Solís *et al.* (2015), mencionaron un valor de $81.32\% \pm 0.62$ como fibra cruda, estimación a la fibra insoluble en mamey zapote (*Pouteria sapota*).

Los carbohidratos como segundo componente principal, registraron un valor de 30.18% obtenido por diferencia, muy alejado a lo que reporta Solís *et al.* (2015) en frutos de mamey zapote (*Pouteria sapota*) con 1.96 ± 0.49 como elementos libres de nitrógeno (NFE).

9.2.3. Análisis químico proximal de la semilla de *Diospyros nigra*

El análisis proximal del polvo obtenido a partir de las semillas de zapote negro reveló que la fibra dietética total ($80.75\% \pm 0.71$), seguida por los carbohidratos (9.46%) y las proteínas ($8.13\% \pm 0.10$), constituyen los principales componentes presentes en la muestra (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis químico proximal (% base seca) de semilla de zapote negro (*Diospyros nigra*).

Parámetro	Valor estimado
Humedad (%)	26.14 ± 0.25
Materia seca (%)	73.86 ± 0.25
Contenido mineral (% b.s.)	1.42 ± 0.14
Proteína total (% b.s.)	8.13 ± 0.10
Extracto etéreo (% b.s.)	0.230 ± 0.03
Fibra dietética total (% b.s.)	80.75 ± 0.71
-Fibra insoluble	76.19 ± 0.70
-Fibra soluble	4.56 ± 0.003
*Carbohidratos (% b.s.)	9.47

b.s.= Base seca. Valor promedio de 3 repeticiones $\pm$ desviación estándar. *Resultado obtenido por diferencia.

El contenido de humedad de las semillas frescas fue de $26.14\% \pm 0.25$, valor que contrasta con lo reportado por Palacios y Luna (2023) para semillas del mismo fruto ($15.79\% \pm 0.29$) y con Ilouno *et al.* (2018) para semillas del ébano africano o baya de chacal (*Diospyros mespiliformis*), fruto del mismo género ($9.00\% \pm 0.00$). Las diferencias observadas pueden atribuirse al estado fisiológico de la muestra, ya que los estudios citados analizan semillas previamente secadas, lo que conduce a valores de humedad drásticamente menores. Otros autores como Solís *et al.* (2015) informan un contenido mayor ($36.46\% \pm 0.36$) al determinarla en fresco utilizando semillas de mamey zapote (*Pouteria sapota*).

En cuanto al contenido mineral expresado en base seca ($1.42\% \pm 0.14$), las semillas presentaron un valor ligeramente inferior al obtenido por Palacios y Luna (2023) con $2.74\% \pm 0.06$ en semillas del mismo fruto; así como la mitad de lo registrado por Ilouno *et al.* (2018) con $4.75\% \pm 1.06$, en semillas del ébano africano (*Diospyros mespiliformis*) y por Solís *et al.* (2015), con $3.87\% \pm 0.11$ en semillas de frutos de mamey zapote (*Pouteria sapota*).

Ahora bien, para su contenido proteico, el valor obtenido en base seca fue de $8.13\% \pm 0.10$, tercer componente mayoritario como lo mencionan también Palacios y Luna (2023), con un $14.68\% \pm 0.07$. Por su parte, Ilouno *et al.* (2018) presentaron un valor más cercano ($5.44\% \pm 0.88$) en semillas del ébano africano (*Diospyros mespiliformis*); mientras que Solís *et al.* (2015) registraron $11.34\% \pm 0.05$, contenido igual de elevado en semillas de mamey zapote (*Pouteria sapota*).

El nivel de lípidos fue el más bajo entre todos los componentes, con apenas $0.230\% \pm 0.03$, similar a lo obtenido por Palacios y Luna (2023) con $0.43\% \pm 1.34$ en semillas del zapote negro, y menor a lo que Ilouno *et al.* (2018) identificaron en semillas del ébano africano (*Diospyros mespiliformis*) con $2.22\% \pm 0.37$. Solís *et al.* (2015) y Kanthavelkumaran *et al.* (2023) reportaron valores de $44.41\% \pm 1.66$ y $24-32\%$, cantidades destacables en semillas de frutos de mamey zapote (*Pouteria sapota*) y de chicozapote (*Manilkara zapota*), respectivamente.

Se obtuvo un valor en base seca de fibra dietética total del $80.75\% \pm 0.71$, correspondiendo al componente predominante de las semillas. El análisis composicional efectuado señaló que la fracción soluble ($4.56\% \pm 0.003$) tuvo una proporción considerablemente inferior a la fracción insoluble ($76.19\% \pm 0.70$), valor igualmente amplio al compararlo con los resultados de fibra cruda de diversos autores, como Palacios y Luna (2023) con $56.11\% \pm 2.60$ en semillas del mismo fruto, Ilouno *et al.* (2018) con $2.67\% \pm 0.76$ en semillas del ébano africano (*Diospyros mespiliformis*) y Solís *et al.* (2015) con $25.69\% \pm 0.53$ en semillas de mamey zapote (*Pouteria sapota*).

Por último, como segundo componente principal de las semillas de zapote negro, se registró un contenido de carbohidratos del 9.47% , que resulta casi un tercio de lo reportado por Palacios y Luna (2023) con 26.04% en las semillas del mismo fruto y similar a lo obtenido por Solís *et al.* (2015) en semillas de mamey zapote (*Pouteria sapota*), con $14.45\% \pm 2.11$. Por el contrario, Ilouno *et al.* (2018) determinaron un valor de $76.35\% \pm 0.58$ en semillas del ébano africano (*Diospyros mespiliformis*).

9.3. Extracción por maceración

A partir del diseño experimental por MSR para cada fracción vegetal pulpa, cáscara y semilla del zapote negro, se obtuvieron extractos a diversas condiciones de concentración, temperatura y duración del proceso, que se almacenaron en tubos Eppendorf de 50 mL, tal como se observa en la Figura 16.

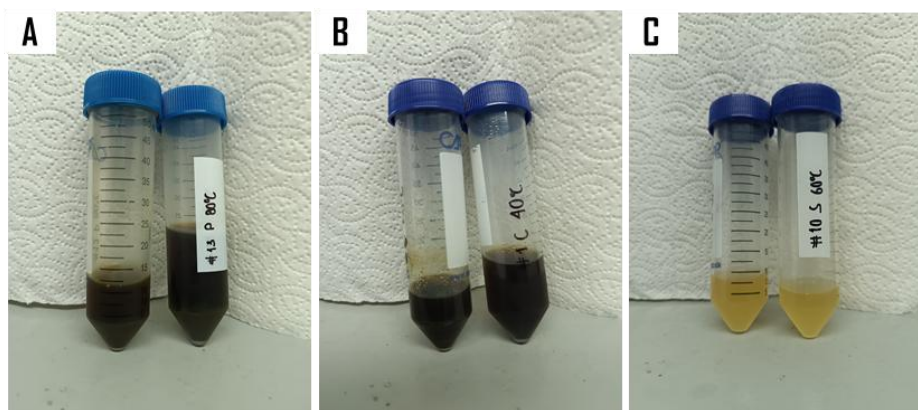


Figura 16. Extractos hidroalcohólicos de pulpa (A), cáscara (B) y semilla (C) de *Diospyros nigra*.

En la extracción de compuestos antioxidantes, un factor relevante e importante a considerar fue la polaridad del disolvente, ya que tiene un gran impacto en el tipo de compuestos que pueden solubilizarse y en el rendimiento de extracción. Estudios previos han demostrado que disolventes con mayor polaridad como el agua, el etanol o sus mezclas hidroalcohólicas son ideales para una extracción más eficiente de polifenoles y flavonoides (Sulaiman *et al.*, 2015; Gnagne *et al.*, 2022).

9.4. Análisis fisicoquímico

A partir del diseño experimental tipo Box-Behnken para cada tejido vegetal obtenido del zapote negro, se evaluaron diversos parámetros con el fin de correlacionar el pH, la acidez titulable (expresada en % ácido cítrico) y el color, este último por medio del sistema de coordenadas CIE-Lab*, del cual se calcularon el croma o la saturación (C*) y el matiz o ángulo de tono (h°).

9.4.1. Análisis fisicoquímico en extractos de pulpa de *Diospyros nigra*

Los resultados obtenidos a partir de los extractos producidos a partir de pulpa evidencian que las variables de proceso evaluadas proporción agua-etanol 96°, temperatura y tiempo de contacto influyen de manera diferenciada sobre las variables de respuesta fisicoquímicas, particularmente en el pH, la acidez titulable y los parámetros de color del sistema CIE-Lab* (Tabla 6).

En relación con la proporción del solvente, se observó que los extractos obtenidos con una mayor fracción de etanol 96° (es decir, menor porcentaje de agua) presentaron, en general, una mayor intensidad cromática, reflejada en valores más altos de a*, b* y Croma (C*). Este patrón podría sugerir que los compuestos responsables del color del extracto muestran afinidad por mezclas hidroalcohólicas menos polares, condición descrita en numerosos estudios para diversos metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos y pigmentos no polares, cuya solubilidad aumenta en mezclas con proporciones intermedias o altas de etanol (Dai y Mumper, 2010; Do *et al.*, 2014; Sai-Ut *et al.*, 2023). Por lo tanto, los resultados muestran que la polaridad del solvente es una de las variables que más influyen en la extracción de compuestos cromóforos de la pulpa del zapote negro.

Respecto a la temperatura del proceso, los valores indican una tendencia a la reducción de la intensidad cromática conforme aumenta la temperatura, especialmente en el nivel más alto (80 °C). Pese a que la temperatura favorece los procesos de difusión y solubilización, también aporta a la degradación térmica u oxidativa de compuestos termolábiles, como ciertos polifenoles y la vitamina C, que aportan directa o indirectamente al color del extracto (Essodolom *et al.*, 2020). Esto es consistente con la literatura, donde se reporta que existe una sinergia correcta entre eficiencia de extracción y estabilidad de los compuestos bioactivos a temperaturas moderadas (50-60 °C); mientras que, por el contrario, temperaturas elevadas pueden ocasionar pérdidas drásticas del color y actividad antioxidante (Cacace y Mazza, 2003; Spigno *et al.*, 2007; ElGamal *et al.*, 2023).

De igual forma, el tiempo de contacto tuvo un efecto sobre las variables de color, aunque menos evidente en comparación con los factores antes mencionados. Se observó una ligera tendencia al aumento del Croma (C*) a mayores tiempos de extracción, que puede deberse a una mayor difusión de compuestos solubles a medida que se prolongó la interacción sólido-líquido. No obstante, este efecto actúa como un factor secundario frente a los cambios inducidos por la naturaleza del solvente, que coincide con reportes

en donde el tiempo responde como un factor limitado de ajuste más que como una variable determinante del rendimiento durante la extracción (Azmir *et al.*, 2013).

Tabla 6. Variables fisicoquímicas para extractos de pulpa de zapote negro (*Diospyros nigra*).

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	pH	Acidez (g Ac/100 g)	Color				
						L*	a*	b*	C*	h°
1	25	40	60	6.35	0.3202	4.86 ± 0.10	9.63 ± 0.21	7.69 ± 0.30	12.33 ± 0.34	38.61
2	25	60	30	6.24	0.3842	2.05 ± 0.09	5.25 ± 0.24	3.22 ± 0.12	6.16 ± 0.25	31.52
3	25	60	90	6.29	0.4483	1.97 ± 0.01	5.14 ± 0.06	2.90 ± 0.09	5.90 ± 0.06	29.43
4	25	80	60	6.06	1.0887	0.27 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.003 ± 0.04	0.68 ± 0.01	0.25
5	50	40	30	6.18	0.2562	2.05 ± 0.12	5.69 ± 0.32	2.95 ± 0.15	6.41 ± 0.29	27.40
6	50	40	90	6.15	0.3202	1.54 ± 0.02	4.57 ± 0.06	2.28 ± 0.02	5.11 ± 0.06	26.51
7	50	60	60	6.14	1.2168	0.33 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02	65.77
8	50	60	60	6.16	1.2808	0.18 ± 0.01	0.04 ± 0.03	-0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.02	345.96
9	50	60	60	6.15	1.2168	0.27 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.56 ± 0.01	11.51
10	50	60	60	6.15	1.2808	0.16 ± 0.01	0.02 ± 0.02	-0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	288.43
11	50	60	60	6.14	1.2168	0.32 ± 0.01	0.59 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.62 ± 0.02	17.85
12	50	80	30	5.89	1.0246	0.49 ± 0.02	1.09 ± 0.03	0.46 ± 0.03	1.18 ± 0.04	22.88
13	50	80	90	6.07	0.3202	3.34 ± 0.02	6.79 ± 0.02	5.22 ± 0.02	8.57 ± 0.01	37.55
14	75	40	60	5.89	0.4483	1.03 ± 0.01	3.19 ± 0.02	1.37 ± 0.02	3.47 ± 0.01	23.24
15	75	60	30	5.74	0.3842	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.11 ± 0.01	11.31
16	75	60	90	5.71	0.3202	0.32 ± 0.01	0.72 ± 0.03	0.17 ± 0.05	0.74 ± 0.03	13.28
17	75	80	60	5.7	0.3202	0.30 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.39 ± 0.02	22.62

CE = Corrida Experimental, Temp = Temperatura, Ac = Ácido cítrico, L* = Luminosidad, a* = Eje verde-rojo, b* = Eje azul-amarillo, C* = Croma, h° = Ángulo de tono. Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

De manera general, los valores de pH obtenidos para los extractos de zapote negro se ubicaron en un intervalo ligeramente ácido a casi neutro (5.7-6.35), con variaciones atribuibles en primera instancia a la composición del solvente. Merino *et al.* (2022) reportaron un rango de pH de entre 5.7 ± 0.02 y 6.48 ± 0.50 durante la semana 10 de maduración del mismo fruto en el árbol. Se observó que los extractos con mayor proporción de etanol (25% agua) tendieron a presentar valores de pH más bajos, probablemente debido a la mayor difusión de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos con carácter ácido leve en los medios de extracción (Dai y Mumper, 2010).

En cuanto a la acidez titulable, los valores mostraron una dispersión mayor que el pH, registrando los valores más altos en condiciones cercanas al punto central del diseño experimental (50% agua-etanol, 60° y 60 min). Esto sugiere que, bajo estas condiciones intermedias, el medio permite la extracción de una mayor cantidad de ácidos titulables, muy aparte de su acidez individual o valores obtenidos de pH. A modo comparativo, Jiménez y Guerrero (2021) exponen que la pulpa del zapote negro presenta una acidez titulable que ronda 0.008–0.910 g de ácido cítrico por 100 g de muestra seca.

Respecto a las propiedades de color, los resultados señalan que la mayoría de extractos presentó una coloración poco intensa, medida en valores bajos de Croma (C*), que sugiere una limitada concentración de compuestos cromóforos extraíbles bajo varias de las condiciones evaluadas. Los tonos variaron desde rojizo-amarillentos de baja saturación hasta tonalidades apagadas o ligeramente azuladas, reflejando una transición hacia colores poco saturados y cercanos al eje neutro del espacio CIE-Lab*. Lo obtenido es consistente con lo expuesto por Del Juncal (2016) para el jugo de zapote negro, una muestra oscura ($L^* 2.52 \pm 0.14$), de poca saturación (2.29 ± 0.56) con tonos amarillo-anaranjados (53.9 ± 1.19).

El análisis de pH y acidez titulable mostró relaciones complejas con el color. Se observó que en los extractos hubo una relación entre valores de pH ligeramente más altos y una mayor intensidad cromática (C*), mientras que la acidez titulable presentó una relación inversa con el Croma. Los resultados muestran que la respuesta cromática del extracto no responde exclusivamente al de antocianinas típicas, que suelen exhibir mayor estabilidad y color intenso a pH ácido. Por el contrario, la evidencia sugiere la contribución de diversos compuestos cromóforos, que podrían incluir fenoles no antociánicos, productos de oxidación y metabolitos secundarios, cuyo color puede verse reducido en medios con mayor acidez total (Giusti y Wrolstad, 2001; Patras *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2024).

Las réplicas en el punto central del diseño permitieron estimar la reproducibilidad del sistema y el error experimental. La dispersión observada en los parámetros de color, especialmente en condiciones donde la intensidad cromática fue baja, denota la existencia de una variabilidad propia del sistema de extracción, así como a una baja concentración de compuestos cromóforos en estas condiciones. Esta respuesta resalta la importancia de incluir réplicas e interpretar con cuidado las pequeñas diferencias entre tratamientos cercanos al punto central.

9.4.2. Análisis fisicoquímico en extractos de cáscara de *Diospyros nigra*

De manera general, se detectó una amplia variabilidad en las respuestas obtenidas para los extractos de cáscara de zapote negro, lo que refleja tanto la complejidad química de esta fracción como de la sensibilidad del diseño experimental respecto a cambios en la polaridad del solvente y a las condiciones térmicas del proceso de maceración (Tabla 7).

La proporción del solvente (agua-etanol 96°), se identificó como la variable más influyente sobre la intensidad cromática, puesto que los extractos con mayor contenido de etanol exhibieron valores más elevados de a^* , b^* y C^* , lo que sugiere que los compuestos responsables del color en la cáscara de *Diospyros nigra* presentan afinidad por solventes orgánicos menos polares. Dicha respuesta respalda los estudios previos para diversos fenoles y pigmentos asociados a tejidos externos de frutos, cuya extracción se ve favorecida por mezclas hidroalcohólicas con proporciones moderadas a altas de etanol (Do, 2014; Sai-Ut *et al.*, 2023).

Por el contrario, el incremento en la temperatura de extracción mostró una tendencia a disminuir la intensidad de color en los niveles más altos (80 °C). Esto señala que, aunque a temperaturas elevadas se facilita la difusión y ruptura de las estructuras celulares vegetales, también se puede inducir cierta degradación térmica u oxidativa de compuestos cromóforos y antioxidantes, como polifenoles y el ácido ascórbico, expresado en extractos menos coloreados (Cacace y Mazza, 2003; Spigno *et al.*, 2007). De tal manera que, temperaturas medias proporcionan un mejor balance entre eficiencia de extracción y estabilidad de compuestos extraídos responsables del color.

Tabla 7. Variables fisicoquímicas para extractos de cáscara de zapote negro (*Diospyros nigra*).

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	pH	Acidez (g Ac/100 g)	Color				
						L*	a*	b*	C*	h°
1	25	40	60	5.92	0.1601	9.55 ± 0.05	7.61 ± 0.04	15.36 ± 0.15	17.14 ± 0.12	63.64
2	25	60	30	5.71	0.1921	6.62 ± 0.05	11.46 ± 0.50	10.85 ± 0.18	15.79 ± 0.24	43.43
3	25	60	90	5.88	0.2241	9.57 ± 0.13	10.74 ± 0.07	15.50 ± 0.19	18.85 ± 0.15	55.28
4	25	80	60	5.52	0.3202	4.16 ± 0.13	8.89 ± 0.14	6.83 ± 0.25	11.21 ± 0.17	37.53
5	50	40	30	5.89	0.1601	3.83 ± 0.02	8.67 ± 0.04	6.05 ± 0.01	10.57 ± 0.03	34.91
6	50	40	90	5.73	0.1921	0.65 ± 0.01	1.26 ± 0.01	0.58 ± 0.02	1.39 ± 0.01	24.72
7	50	60	60	5.77	0.1921	1.27 ± 0.03	3.15 ± 0.08	1.66 ± 0.02	3.57 ± 0.08	27.79
8	50	60	60	5.77	0.1921	0.77 ± 0.01	1.72 ± 0.04	0.84 ± 0.02	1.91 ± 0.03	26.03
9	50	60	60	5.75	0.1921	1.44 ± 0.01	4.12 ± 0.04	2.00 ± 0.03	4.58 ± 0.02	25.89
10	50	60	60	5.76	0.1921	0.56 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.71 ± 0.01	32.35
11	50	60	60	5.75	0.1921	1.11 ± 0.02	2.60 ± 0.02	1.27 ± 0.01	2.90 ± 0.01	26.03
12	50	80	30	5.79	0.2241	3.50 ± 0.12	8.35 ± 0.05	5.50 ± 0.30	10.00 ± 0.18	33.37
13	50	80	90	5.65	0.2562	0.72 ± 0.01	1.31 ± 0.01	0.69 ± 0.02	1.48 ± 0.01	27.78
14	75	40	60	5.59	0.1921	1.00 ± 0.01	2.45 ± 0.02	1.19 ± 0.02	2.72 ± 0.02	25.91
15	75	60	30	5.52	0.1601	0.86 ± 0.03	0.76 ± 0.04	0.60 ± 0.02	0.96 ± 0.04	38.29
16	75	60	90	5.37	0.2241	0.71 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.59 ± 0.004	41.55
17	75	80	60	5.46	0.2241	0.82 ± 0.02	1.25 ± 0.02	0.66 ± 0.04	1.42 ± 0.02	27.83

CE = Corrida Experimental, Temp = Temperatura, Ac = Ácido cítrico, L* = Luminosidad, a* = Eje verde-rojo, b* = Eje azul-amarillo, C* = Croma, h° = Ángulo de tono. Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

De manera similar a la pulpa, el tiempo de contacto presentó un efecto secundario sobre las variables de color, donde únicamente se observaron leves aumentos del Croma a mayores periodos de extracción, que se relaciona con una mayor difusión de compuestos solubles a medida que se prolonga la interacción

soluto-solvente. Sin embargo, este efecto fue menor que al del resto de factores mencionados, lo que resulta consistente con estudios que señalan al tiempo como una variable de ajuste más que un factor determinante para la extracción (Azmir *et al.*, 2013).

En relación con el pH, los extractos se encontraron mayormente dentro de un rango ácido moderado, en donde se observó una coincidencia entre valores de pH ligeramente menores en aquellos tratamientos con mayor contenido etanólico. Este efecto puede atribuirse a la mayor solubilización de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos ácidos de sistemas hidroalcohólicos abundantes en etanol, fenómeno descrito en matrices vegetales ricas en metabolitos secundarios (Dai y Mamper, 2010). No obstante, no se reflejó de forma proporcional en la acidez titulable, lo que muestra que ambas variables se relacionan con diferentes aspectos del equilibrio ácido del sistema.

Continuando con la acidez titulable, ésta mostró un comportamiento no lineal respecto a las variables del proceso, alcanzando valores relativamente altos en condiciones intermedias del diseño, es decir, cerca del punto central (50% agua-etanol, 60 °C y 60 min). Esto implica que dichas condiciones permiten la extracción de un mayor número de especies ácidas, lo que puede amplificar la acidez titulable sin tener un impacto proporcional en disminuir el pH, debido a la presencia de ácidos débiles parcialmente disociados y compuestos amortiguadores (Patras *et al.*, 2010).

Respecto a las propiedades de color, la mayoría de extractos presentaron valores bajos de Croma (C*), reflejando una coloración poco intensa en las condiciones evaluadas. Los tonos registrados variaron desde matices rojizos-amarillentos de baja saturación -valores positivos de a^* y b^* -, hasta tonos cercanos al eje neutro o ligeramente azulados en tratamientos donde estos parámetros se acercaron a cero. Una respuesta que resulta típica de extractos con baja concentración de cromóforos, que coincide con lo reportado para matrices ricas en compuestos fenólicos no antociánicos, que suelen contribuir con colores débiles o apagados (Giusti y Wrolstad, 2001).

El análisis conjunto de las variables de respuesta pH, acidez titulable y parámetros de color, señala que la respuesta cromática de los extractos no puede demostrarse por la actividad de un único tipo de compuestos como al de las antocianinas típicas, que usualmente exhiben mayor estabilidad e intensidad de color en medios fuertemente ácidos. Los resultados sugieren la presencia de una mezcla compleja de diversos compuestos cromóforos, cuya expresión cromática depende tanto de la polaridad del solvente como de las condiciones térmicas del proceso (Giusti y Wrolstad, 2001; Xue *et al.*, 2024).

La variabilidad de las réplicas correspondientes al punto central del diseño permitió estimar el error asociado al sistema y evidenció una consistencia limitada en los extractos con una intensidad cromática reducida, donde la dispersión puede atribuirse a la naturaleza heterogénea de la cáscara y a la escasa presencia de metabolitos cromóforos bajo estas condiciones.

9.4.3. Análisis fisicoquímico en extractos de semilla de *Diospyros nigra*

Los extractos de semilla muestran un comportamiento diferencial respecto a las variables del proceso evaluadas, con resultados que revelan la naturaleza particular de esta fracción del fruto. Las respuestas (pH, acidez titulable y color CIE-Lab*) reflejan que la semilla aporta compuestos solubles de diferente polaridad y estabilidad térmica, lo que influye en la dirección y magnitud de los efectos observados (Tabla 8).

En lo referente a la proporción de solvente, los resultados muestran que, en general, las mezclas con mayor contenido de etanol al 96° (menor porcentaje de agua) favorecen la obtención de extractos de semilla con mayor intensidad cromática en los ejes a* y b*, así como valores de C* más elevados respecto a tratamientos más acuosos. Esta observación se alinea con estudios previos, en los que se ha demostrado que diversas especies fenólicas de semillas presentan una extracción mayor en mezclas hidroalcohólicas moderadas a altas, donde la proporción de agua-etanol debe ajustarse a la matriz vegetal para maximizar la recuperación de compuestos no polares (Dulyanska, 2022; Sai-Ut *et al.*, 2023).

La temperatura jugó un papel dual en la semilla: por un lado, temperaturas moderadas promovieron la extracción, ya que existió una mayor liberación de cromóforos y compuestos solubles; por el otro, la temperatura máxima (80 °C) tiende a reducir la intensidad de color en ciertos tratamientos, lo que sugiere que la degradación térmica u oxidativa es más fuerte que las ganancias por difusión a esa temperatura. Esa tendencia sobre la ganancia hasta un extremo térmico y su posterior pérdida por degeneración, se ha descrito en múltiples matrices y cobra relevancia en fracciones ricas de compuestos termosensibles, como fenoles libres o conjugados presentes en las semillas (Dulyanska, 2022; Zalidis *et al.*, 2025).

Tabla 8. Variables fisicoquímicas para extractos de semilla de zapote negro (*Diospyros nigra*)

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	pH	Acidez (g Ac/100 g)	Color				
						L*	a*	b*	C*	h°
1	25	40	60	5.74	0.0961	22.11 ± 0.11	0.54 ± 0.07	4.06 ± 0.04	4.10 ± 0.03	82.42
2	25	60	30	5.45	0.0961	24.50 ± 0.08	0.03 ± 0.11	7.46 ± 0.24	7.46 ± 0.24	89.77
3	25	60	90	5.81	0.0961	24.31 ± 0.13	0.49 ± 0.09	7.25 ± 0.27	7.27 ± 0.26	86.13
4	25	80	60	5.35	0.0961	24.42 ± 0.19	0.68 ± 0.06	1.36 ± 0.40	1.53 ± 0.38	63.43
5	50	40	30	5.92	0.1281	27.53 ± 0.14	0.54 ± 0.32	7.55 ± 0.06	7.57 ± 0.08	85.91
6	50	40	90	5.9	0.0961	25.41 ± 0.08	0.45 ± 0.03	4.01 ± 0.37	4.03 ± 0.37	83.60
7	50	60	60	5.89	0.0961	24.42 ± 0.09	0.36 ± 0.14	10.75 ± 0.19	10.76 ± 0.19	88.08
8	50	60	60	5.87	0.0961	27.20 ± 0.07	0.44 ± 0.22	7.62 ± 0.16	7.63 ± 0.15	86.70
9	50	60	60	5.88	0.0961	25.42 ± 0.17	0.40 ± 0.03	5.92 ± 0.17	5.93 ± 0.16	86.14
10	50	60	60	5.87	0.0961	27.33 ± 0.40	0.41 ± 0.06	11.40 ± 0.26	11.40 ± 0.26	87.94
11	50	60	60	5.87	0.0961	23.73 ± 0.03	0.30 ± 0.04	10.15 ± 0.04	10.16 ± 0.04	88.31
12	50	80	30	5.79	0.1281	29.04 ± 0.02	0.53 ± 0.07	12.50 ± 0.01	12.51 ± 0.01	87.57
13	50	80	90	5.89	0.1281	23.87 ± 0.04	0.37 ± 0.11	7.64 ± 0.03	7.65 ± 0.03	87.23
14	75	40	60	5.91	0.0961	22.06 ± 0.05	0.30 ± 0.03	3.06 ± 0.10	3.08 ± 0.10	84.41
15	75	60	30	5.88	0.0640	24.74 ± 0.05	0.27 ± 0.03	5.50 ± 0.22	5.50 ± 0.22	87.19
16	75	60	90	5.94	0.0640	28.74 ± 0.38	0.38 ± 0.07	4.82 ± 0.13	4.84 ± 0.12	85.50

CE = Corrida Experimental, Temp = Temperatura, Ac = Ácido cítrico, L* = Luminosidad, a* = Eje verde-rojo, b* = Eje azul-amarillo, C* = Croma, h° = Ángulo de tono. Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Por su parte, el tiempo de contacto presentó un efecto auxiliar observable en semilla, en donde tiempos más prolongados mostraron, en general, un aumento ligero en C*, que corresponde a una mayor difusión de metabolitos; no obstante, el tiempo no compensó la pérdida de C* a altas temperaturas ni reemplazó la influencia de la polaridad del solvente. Dicho de otro modo, el tiempo actuó como una variable de optimización secundaria, útil para mejorar el rendimiento dentro de un rango de temperatura y solvente, como ha sido reportado en estudios de optimización en matrices de semillas (Azmir *et al.*, 2013; Sai-Ut *et al.*, 2023).

De manera general, los valores obtenidos de pH para los extractos se ubicaron dentro de un intervalo ligeramente ácido, con variaciones moderadas entre tratamientos, donde se observó una tendencia de valores de pH más bajos en los extractos con mayor contenido etanólico (25% agua). Al igual que en la pulpa y la cáscara, esta respuesta propone que los solventes menos polares permiten la solubilización de compuestos con carácter ácido en matrices complejas como la semilla, desde ácidos orgánicos libres a compuestos fenólicos (Dai y Mamper, 2010).

En la acidez titulable, los resultados mostraron una dispersión superior en comparación con el pH, sin una relación lineal clara con la composición del solvente. De forma general, los valores más elevados de este parámetro se situaron en las condiciones cercanas al punto central (50% agua-etanol, 60 °C y 60 min), que favorecieron la mayor extracción de especies titulables sin importar su grado de disociación, como sistemas tampón o compuestos ionizables (Patras *et al.*, 2010).

Sobre las propiedades de color, los resultados muestran que la mayoría de los extractos exhibieron una coloración poco intensa, evidenciada en valores bajos de Croma (C*), lo que sugiere un contenido limitado de compuestos cromóforos bajo las condiciones evaluadas. En términos globales, los valores de L* indicaron extractos parcialmente claros, mientras que los parámetros a* y b* fueron bajos, colocando los colores en el eje neutro del espacio CIE-Lab*. Los matices observados presentaron una coloración principalmente amarilla clara, de baja saturación y una contribución mínima de tonalidades rojizas o verdosas. En ese sentido, la semilla se comporta una matriz cromáticamente menos expresiva que la pulpa, con respuestas sutiles y fuertemente dependientes de las condiciones de extracción.

Al analizar de forma conjunta el pH, la acidez titulable y el color, se observa que los extractos con un pH ligeramente más alto tendieron a presentar valores de Croma mayores, mientras que la acidez titulable no necesariamente se relacionó con un color más intenso. Esto refuerza la idea de que la respuesta cromática de los extractos de semilla no depende exclusivamente de un grupo de pigmentos sensibles al pH, como las antocianinas, sino de una mezcla compleja de compuestos cuya ionización, solubilidad y susceptibilidad a la degradación varían en función de la composición del solvente y la temperatura (Giusti y Wrolstad, 2001; Xue *et al.*, 2024).

El análisis de las réplicas realizadas en el punto central del diseño mostró una dispersión apreciable en C* tanto en los ejes a* y b*. Esa variabilidad indicó que, bajo condiciones de baja intensidad cromática o en rangos próximos al centro del diseño, la reproducibilidad se reduce y el error experimental aumenta.

9.5. Análisis antioxidante

De igual forma, se realizó un estudio de las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos y evaluación de la actividad antioxidante de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro.

9.5.1. Diseño experimental para extractos de pulpa de *Diospyros nigra*

Los resultados del modelo experimental Box-Behnken para la extracción de compuestos de pulpa y su actividad antioxidante se presentan en la Tabla 9. A continuación se observa que el tratamiento 12 obtuvo la mayor extracción de fenoles totales, con 23.782 ± 0.10 mg EAG/g y de flavonoides, con 14.394 ± 0.24 mg EQ/g; mientras que la mayor capacidad antioxidante expresada en inhibición de los radicales DPPH• y OH• se dio en los tratamientos 4 y 14, con valores de IC₅₀ de 6.405 ± 0.07 mg/mL y 4.229 ± 0.09 mg/mL, respectivamente. De manera general, hay mayor arrastre de compuestos fenólicos en los tratamientos con mayor polaridad (menor contenido de etanol) a temperaturas superiores de las condiciones de los puntos centrales (60-80 °C).

Tabla 9. Valores experimentales del diseño Box-Behnken para extractos de pulpa de zapote negro.

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH• (IC ₅₀ mg/mL)	OH• (IC ₅₀ mg/mL)
1	25	40	60	3.001 ± 0.25	3.165 ± 0.03	16.099 ± 0.10	6.973 ± 0.05
2	25	60	30	3.929 ± 0.05	4.453 ± 0.07	11.066 ± 0.04	7.087 ± 0.07
3	25	60	90	4.486 ± 0.15	6.276 ± 0.03	10.487 ± 0.15	6.433 ± 0.02
4	25	80	60	9.916 ± 0.38	8.366 ± 0.10	6.405 ± 0.07	6.434 ± 0.03
5	50	40	30	4.057 ± 0.26	4.574 ± 0.03	9.567 ± 0.02	4.742 ± 0.16
6	50	40	90	5.101 ± 0.30	4.015 ± 0.07	20.282 ± 0.28	5.051 ± 0.00
7	50	60	60	10.462 ± 0.26	7.369 ± 0.14	7.047 ± 0.09	8.620 ± 0.30
8	50	60	60	10.009 ± 0.28	7.151 ± 0.10	6.998 ± 0.11	8.932 ± 0.01
9	50	60	60	9.742 ± 0.30	7.248 ± 0.24	7.737 ± 0.05	10.133 ± 0.26
10	50	60	60	9.916 ± 0.08	7.321 ± 0.21	7.245 ± 0.12	10.111 ± 0.30
11	50	60	60	10.543 ± 0.18	7.199 ± 0.10	7.760 ± 0.07	9.012 ± 0.38
12	50	80	30	23.782 ± 0.10	14.394 ± 0.24	10.389 ± 0.16	5.517 ± 0.00
13	50	80	90	9.777 ± 0.35	4.356 ± 0.41	12.538 ± 0.04	5.838 ± 0.03
14	75	40	60	11.784 ± 0.16	13.349 ± 0.34	15.299 ± 0.10	4.229 ± 0.09
15	75	60	30	8.025 ± 0.13	7.977 ± 0.17	10.966 ± 0.09	5.131 ± 0.00
16	75	60	90	11.935 ± 0.08	9.168 ± 0.07	18.469 ± 0.23	5.125 ± 0.01
17	75	80	60	12.864 ± 0.18	12.498 ± 0.03	10.417 ± 0.02	7.403 ± 0.10

CE = Corrida experimental, Temp = temperatura, EAG = equivalentes de ácido gálico, EQ = equivalentes de quercetina, IC₅₀ = Concentración Inhibitoria Media. Los datos de fenoles totales, flavonoides, DPPH• y OH• son el promedio de los triplicados.

9.5.1.1. Modelo polinomial de segundo grado para extractos de pulpa

Los modelos de regresión cuadráticos presentados en la Tabla 10 describen de manera integral la relación entre las variables del proceso y las respuestas analizadas, permitiendo identificar el efecto individual, combinado y no lineal de las condiciones de extracción. A partir de los coeficientes estimados, se evaluó la influencia de cada factor experimental sobre la recuperación de fenoles totales y flavonoides, así como el efecto antioxidante de los extractos, por la inhibición de los radicales DPPH• y OH•.

Tabla 10. Modelo de regresión cuadrático para extractos de pulpa de *Diospyros nigra*.

Término	Fenoles totales	Flavonoides	DPPH•	OH•
Intercepto	-33.0546	-17.7670	54.8588	-15.2948
A	5.7066×10^{-1}	1.2021×10^{-1}	-5.9058×10^{-1}	4.6043×10^{-2}
B	2.9822×10^{-1}	1.8600×10^{-1}	-8.1220×10^{-1}	4.9693×10^{-1}
C	4.0179×10^{-1}	4.0250×10^{-1}	-2.7334×10^{-1}	2.8147×10^{-1}
AA	-3.4629×10^{-3}	1.7765×10^{-3}	3.4005×10^{-3}	-1.9559×10^{-3}
BB	3.5529×10^{-3}	2.4414×10^{-3}	6.4308×10^{-3}	-4.6986×10^{-3}
CC	-9.7369×10^{-4}	-1.5549×10^{-3}	3.6270×10^{-3}	-2.4391×10^{-3}
AB	-2.9175×10^{-3}	-3.0260×10^{-3}	2.4060×10^{-3}	1.8565×10^{-3}
AC	1.1177×10^{-1}	-2.1067×10^{-4}	2.6940×10^{-3}	2.1600×10^{-4}
BC	-6.2704×10^{-3}	-3.9496×10^{-3}	-3.5692×10^{-3}	5.0000×10^{-6}

A = Proporción (% agua-etanol 96°), B = Temperatura (°C), C = Tiempo (min).

9.5.1.2. Influencia de las variables experimentales en el modelo

La relevancia estadística de los factores experimentales y el ajuste global de los modelos se determinó mediante el análisis de los valores de probabilidad (p), los cuales permitieron establecer si los estadísticos F obtenidos fueron lo suficientemente elevados para evidenciar un efecto significativo de las variables independientes sobre las respuestas evaluadas. En ese contexto, se consideró que valores de p inferiores a 0.05 mostraban una influencia estadísticamente significativa.

▪ *Contenido antioxidante general*

En cuanto a la recuperación de fenoles totales, el análisis de varianza indicó que sólo la proporción de agua (A) y la temperatura (B) en términos lineales tuvieron efectos significativos ($p < 0.05$), como se aprecia en la Tabla 11. Por lo tanto, una mayor concentración de agua y un aumento en la temperatura correspondieron a una mayor extracción de estos compuestos.

De la misma forma se observa que, para el contenido de flavonoides, únicamente la proporción de agua (A) como término lineal tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$); es decir, a mayor concentración de agua, mayor extracción de flavonoides (Tabla 11).

▪ *Evaluación de la capacidad antioxidante*

En relación con la capacidad de inhibición del radical DPPH• expresados en IC₅₀, se encontró que la proporción de agua (A), la temperatura (B) y tiempo (C) en términos lineales y cuadráticos influyeron significativamente en la respuesta del sistema ($p < 0.05$). Existe interacción significativa entre la proporción de agua y la temperatura en función del tiempo, como se muestra en la Tabla 11.

De igual manera, la actividad antioxidante determinada mediante la captación del radical OH• y expresada como IC₅₀ mostró que la proporción de agua (A) y la temperatura (B) tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$), en sus componentes lineales como cuadráticos, además de en su interacción. Por su parte, el tiempo de contacto (C) también presentó una influencia significativa, aunque sólo en su efecto cuadrático, lo que indica un comportamiento no lineal en su respuesta (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de varianza para extractos de pulpa de zapote negro.

Término	Fenoles totales	Flavonoides	DPPH•	OH•
	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
A	0.0373	0.0137	0.0316	0.0230
B	0.0091	0.0560	0.0013	0.0464
C	0.3806	0.2709	0.0020	0.9867
AA	0.2090	0.3435	0.0206	0.0047
BB	0.3938	0.4013	0.0087	0.0004
CC	0.5928	0.2412	0.0026	0.0002
AB	0.3936	0.2193	0.1443	0.0193
AC	0.6175	0.8919	0.0281	0.6143
BC	0.0515	0.0724	0.0222	0.9925
R	0.8997	0.8910	0.9728	0.9768
Concentración (%)	53.54	75.00	55.00	74.33
Temperatura (°C)	80.00	80.00	79.87	41.67
Tiempo (min)	30.00	30.00	30.00	59.73

A = Proporción (% agua-etanol 96°), B = Temperatura (°C), C = Tiempo (min), R = Coeficiente de correlación.

A su vez, el análisis estadístico también indicó relaciones muy elevadas a través del coeficiente de correlación existente entre las variables de proceso experimentales sobre las respuestas evaluadas, lo que comprueba su influencia y dirección casi en su totalidad.

Además, se exhiben las condiciones óptimas de extracción para cada parámetro evaluado, destacando la necesidad de condiciones altamente acuosas para obtener una mayor recuperación de flavonoides e inhibición del radical OH•, así como de mezclas menos polares para un contenido superior de fenoles totales y con mayor capacidad de captura frente a DPPH•. La temperatura que favoreció la mayoría de respuestas fue de 80 °C, a excepción de la eliminación de OH•, que podría requerir de compuestos de carácter termolábil para actuar. En cambio, el tiempo de contacto, funciona como un factor de ajuste, cuyo promedio fue de 30 minutos.

9.5.1.3. Correlación entre variables de respuesta del modelo

Como apartado adicional, se efectuó un análisis de correlación entre el contenido de fenoles totales y flavonoides con la actividad antioxidante de los extractos de la pulpa de *Diospyros nigra*, evaluada mediante la inhibición de los radicales DPPH• y OH•, expresada como IC₅₀; con el fin de determinar la influencia biológica entre el contenido de compuestos con su actividad biológica. Dado que valores más bajos de IC₅₀ indican una mayor capacidad antioxidante, de forma teórica se esperaría una correlación negativa entre esta comparación (Tabla 12).

Tabla 12. Correlación entre variables de respuesta en extracto de pulpa de zapote negro.

Variables correlacionadas	Rho (ρ)	Valor de p	Significancia (α = 0.05)	IC 95%
Fenoles totales vs DPPH	-0.2146	0.4054	No, Spearman	-0.6395 a 0.3107
Fenoles totales vs OH•	-0.0576	0.8260	No, Spearman	-0.4475 a 0.5349

Flavonoides totales vs DPPH	-0.2500	0.3319	No, Spearman	-0.6611 a 0.2765
Flavonoides totales vs OH•	-0.0809	0.7584	No, Spearman	-0.5514 a 0.4287
Flavonoides totales vs OH•	-0.1412	0.5888	No, Pearson	-0.5823 a 0.3642

Rho (ρ) = Coeficiente de correlación, IC = Intervalo de confianza al 95%

Partiendo con los fenoles totales, la correlación con la inhibición del radical DPPH• fue negativa ($\rho = -0.2146$), lo que sugiere una tendencia débil hacia una mayor actividad antioxidante conforme aumenta el contenido fenólico; sin embargo, esta relación no fue estadísticamente significativa ($p = 0.4054$) y el intervalo de confianza al 95% (-0.6395 a 0.3107) incluye el valor cero, lo que confirma la ausencia de una asociación monotónica clara entre ambas variables.

De igual manera, la correlación entre fenoles totales y la inhibición del radical OH• fue básicamente nula o no significativa ($\rho = 0.0576$; $p = 0.8260$), lo que indica que el contenido fenólico total no explica de forma directa la capacidad de neutralización de este radical bajo las condiciones experimentales antes mencionadas.

Respecto a los flavonoides, se observaron correlaciones negativas tanto con la inhibición de DPPH• ($\rho = -0.2500$) como con la del radical OH• ($\rho = -0.0809$), pero en ambos casos las asociaciones fueron débiles y estadísticamente no significativas ($p > 0.05$). Los amplios intervalos de confianza al 95% obtenidos refuerzan la alta variabilidad de los datos y la falta de una relación consistente entre estas variables. Adicionalmente, se aplicó la prueba de Pearson para la correlación entre flavonoides y OH•, la cual confirmó la ausencia de una relación lineal significativa ($r = -0.1412$; $p = 0.5888$), lo que sugiere que el tipo de asociación entre estas variables no es ni monotónica ni lineal.

Los resultados indican que, pese a que existe una tendencia negativa esperada entre el contenido de compuestos fenólicos y los valores de IC₅₀, dicha relación no fue significativa en los extractos de pulpa. Esto sugiere que la actividad antioxidante no depende exclusivamente de la concentración de fenoles o flavonoides, sino que podría estar influenciada por otros factores: como la naturaleza estructural de los compuestos fenólicos presentes (sea ligados a azúcares, formando complejos glicosilados), posibles efectos sinérgicos o antagonistas entre metabolitos, así como que la actividad provenga de compuestos hidrófilos no fenólicos, como la vitamina C (Ramírez-Briones *et al.* 2019).

9.5.1.4. Selección de extractos de pulpa de *Diospyros nigra*

Puesto que en el apartado anterior se demostró que la actividad antioxidante de los extractos de pulpa no se relaciona directamente con su contenido de compuestos fenólicos, se optó por la posibilidad de que la inhibición de los radicales estuviera siendo aportada por otro tipo de metabolitos; por lo que se seleccionaron únicamente tres tratamientos con base en su capacidad de inhibición del radical OH•, a los que se les cuantificó el contenido de ácido ascórbico como se presenta en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores experimentales para extractos seleccionados de pulpa de zapote negro.

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH• (IC ₅₀ mg/mL)	OH• (IC ₅₀ mg/mL)	Vitamina C (mg de AA/g)
5	50	40	30	4.057 ± 0.26	4.574 ± 0.03	9.567 ± 0.02	4.742 ± 0.16	0.948 ± 0.10
6	50	40	90	5.101 ± 0.30	4.015 ± 0.07	20.282 ± 0.28	5.051 ± 0.00	0.401 ± 0.08
14	75	40	60	11.784 ± 0.16	13.349 ± 0.34	15.299 ± 0.10	4.229 ± 0.09	2.306 ± 0.005

CE = Corrida experimental, Temp = temperatura, EAG = equivalentes de ácido gálico, EQ = equivalentes de quercetina, IC₅₀ = Concentración Inhibitoria Media, AA = Ácido ascórbico (Vit C) Los datos de fenoles totales, flavonoides, DPPH• y OH• son el promedio de los triplicados.

Dichos tratamientos que pasaron el proceso de selección (5P, 6P y 14P) presentaron un contenido moderado de compuestos, resultando el más elevado el valor de 11.784 ± 0.16 mg EAG/g para fenoles totales y 13.349 ± 0.34 mg EQ/g para flavonoides; con una capacidad antioxidante variable frente al radical DPPH• obteniendo un IC₅₀ de 9.567 ± 0.02 mg/mL, pero presentando una inhibición destacada frente a OH• con un valor de 4.229 ± 0.09 mg/mL.

A su vez, el contenido de ácido ascórbico determinado en dichos tratamientos osciló entre 0.401 y 2.306 mg/g de muestra seca, en función de los factores experimentales utilizados durante la extracción. Para establecer una comparación metodológica válida, los valores reportados en la literatura -expresados originalmente en base fresca- fueron convertidos a base seca considerando sus porcentajes respectivos de humedad. Tras ello, se alcanzaron concentraciones como 0.841 mg/g por Corral *et al.* (2008), 1.167 mg/g por Yahia *et al.* (2011) y 2.451 mg/g por Moo *et al.* (2014); mientras que, en su revisión, Jiménez y Guerrero (2021) reportaron un intervalo equivalente de 1.615 a 6.621 mg/g en base seca. En ese contexto, los valores obtenidos se sitúan dentro del rango inferior a intermedio descrito para el fruto, con magnitudes comparables a algunos reportes al emplear extractos con mayor proporción acuosa.

Las diferencias en el contenido de vitamina C pueden atribuirse a la variabilidad intrínseca del fruto, incluyendo su estado de madurez, condiciones edafoclimáticas y variabilidad genética y metodológica, ampliamente documentados en matrices vegetales (Staveckienė *et al.*, 2024). El manejo postcosecha y los procesos de deshidratación previos a la extracción pueden influir en su concentración final, dado que es un compuesto altamente susceptible a la degradación oxidativa en presencia de oxígeno y luz, capaz de destruirse fácilmente durante el tratamiento térmico (Moscoso, 2017).

Por otra parte, el incremento observado en los extractos con mayor proporción acuosa es coherente con la naturaleza polar e hidrosoluble del ácido ascórbico, puesto que diversos trabajos han demostrado que la composición del solvente es un factor crítico en la solubilidad y recuperación de estos compuestos al emplear solventes con mayor polaridad (Cendrowski *et al.*, 2024), lo que confirma la influencia de las condiciones de proceso y del sistema de extracción.

9.5.2. Diseño experimental para extractos de cáscara de *Diospyros nigra*

Siguiendo con la misma línea, los resultados del modelo experimental Box-Behnken para la extracción de compuestos de cáscara y su actividad antioxidante se presentan en la Tabla 14. Aquí mismo se observa que el tratamiento 17 obtuvo la mayor extracción de fenoles totales, con 10.558 ± 0.09 mg EAG/g y de flavonoides, con 8.779 ± 0.07 mg EQ/g; así como la mayor actividad antioxidante en DPPH•, con un IC₅₀ de 13.235 ± 0.09 mg/mL, mientras que en OH• se dio en el tratamiento 6 con 6.224 ± 0.07 mg/mL. De manera general, y similar a la pulpa, hay un aparente mayor arrastre de compuestos fenólicos en los tratamientos con mayor polaridad (menor contenido de etanol) expuestos a temperaturas superiores de las condiciones de los puntos centrales (60-80 °C).

Tabla 14. Valores experimentales del diseño Box-Behnken para extractos de cáscara de zapote negro.

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH• (IC ₅₀ mg/mL)	OH•• (IC ₅₀ mg/mL)
1	25	40	60	3.868 ± 0.03	1.949 ± 0.17	32.046 ± 0.35	11.032 ± 0.05
2	25	60	30	5.020 ± 0.16	4.356 ± 0.14	23.841 ± 0.08	11.724 ± 0.01
3	25	60	90	5.130 ± 0.38	2.630 ± 0.17	20.383 ± 0.13	10.581 ± 0.52
4	25	80	60	6.903 ± 0.06	5.255 ± 0.10	19.793 ± 0.30	15.794 ± 1.05
5	50	40	30	5.441 ± 0.13	2.970 ± 0.10	23.406 ± 0.05	6.820 ± 0.13
6	50	40	90	6.349 ± 0.34	4.963 ± 0.17	34.706 ± 0.27	6.224 ± 0.07
7	50	60	60	8.143 ± 0.25	4.234 ± 0.17	16.021 ± 0.12	7.107 ± 0.03
8	50	60	60	8.254 ± 0.22	4.404 ± 0.14	15.095 ± 0.04	7.088 ± 0.25
9	50	60	60	7.944 ± 0.16	4.331 ± 0.38	16.623 ± 0.06	7.069 ± 0.21
10	50	60	60	8.365 ± 0.13	4.380 ± 0.10	15.802 ± 0.18	6.836 ± 0.17
11	50	60	60	8.232 ± 0.25	4.307 ± 0.27	15.790 ± 0.06	6.909 ± 0.00
12	50	80	30	8.542 ± 0.19	8.196 ± 0.21	20.166 ± 0.22	8.695 ± 0.21
13	50	80	90	9.118 ± 0.06	6.373 ± 0.31	15.082 ± 0.03	7.367 ± 0.10
14	75	40	60	8.431 ± 0.09	4.185 ± 0.10	16.192 ± 0.10	6.635 ± 0.15
15	75	60	30	8.342 ± 0.34	7.053 ± 0.31	17.625 ± 0.15	6.713 ± 0.24
16	75	60	90	9.539 ± 0.03	6.227 ± 0.24	18.571 ± 0.24	7.461 ± 0.05
17	75	80	60	10.558 ± 0.09	8.779 ± 0.07	13.235 ± 0.09	8.600 ± 0.04

CE = Corrida experimental, Temp = temperatura, EAG = equivalentes de ácido gálico, EQ = equivalentes de quercetina, IC₅₀ = Concentración Inhibitoria Media. Los datos de fenoles totales, flavonoides, DPPH• y OH•• son el promedio de los triplicados.

9.5.2.1. Modelo polinomial de segundo grado para extractos de cáscara

Los modelos polinomiales de segundo orden presentados en la Tabla 14 lograron describir la relación entre las variables del proceso y las respuestas evaluadas, considerando no sólo los efectos individuales de cada factor experimental, sino también sus interacciones y comportamientos no lineales. A partir de los coeficientes de regresión y de la significancia estadística de los términos incluidos, fue posible determinar el efecto de las condiciones de extracción en la recuperación de fenoles totales y flavonoides sobre la capacidad antioxidante de los extractos por la inhibición de los radicales DPPH• y OH••.

Tabla 15. Modelo de regresión cuadrático para extractos de cáscara de *Diospyros nigra*.

Término	Fenoles totales	Flavonoides	DPPH•	OH••
Intercepto	-7.89463	2.2255	82.139	21.4429
A	1.7343×10 ⁻¹	-8.5140×10 ⁻³	-6.1638×10 ⁻¹	-4.8106×10 ⁻¹
B	1.5888×10 ⁻¹	-3.6420×10 ⁻²	-1.2136	-1.0140×10 ⁻¹
C	8.5636×10 ⁻²	-1.7445×10 ⁻²	-1.3252×10 ⁻¹	5.1841×10 ⁻²
AA	-8.8188×10 ⁻⁴	1.2144×10 ⁻⁴	9.7224×10 ⁻⁴	4.2854×10 ⁻³
BB	-4.9106×10 ⁻⁴	1.5873×10 ⁻³	9.6066×10 ⁻³	2.0878×10 ⁻³
CC	-6.9853×10 ⁻⁴	7.3267×10 ⁻⁴	4.0346×10 ⁻³	-6.2267×10 ⁻⁴
AB	-4.5400×10 ⁻⁴	6.4400×10 ⁻⁴	4.6480×10 ⁻³	-1.3985×10 ⁻³
AC	3.6233×10 ⁻⁴	3.0000×10 ⁻⁴	1.4680×10 ⁻³	6.3033×10 ⁻⁴
BC	-1.3833×10 ⁻⁴	-1.5900×10 ⁻³	-6.8267×10 ⁻³	-3.0500×10 ⁻⁴

A = Proporción (% agua-etanol 96°), B = Temperatura (°C), C = Tiempo (min).

9.5.2.2. Influencia de las variables experimentales en el modelo

La significancia de los factores experimentales y el ajuste del modelo propuesto se evaluó a partir del análisis de los niveles de probabilidad (p) asociados a cada término. En donde dichos valores permitieron verificar si los estadísticos F calculados indicaban una contribución real y no atribuible al azar de las variables independientes sobre las respuestas analizadas. Bajo este criterio, se estableció que aquellos términos con valores de p menores a 0.05 presentaron un efecto estadísticamente significativo.

▪ *Contenido antioxidante general*

El análisis de varianza para los extractos de cáscara indicó que tanto la proporción de agua (A), como la temperatura (B) y el tiempo de contacto (C) en términos lineales y cuadráticos tuvieron efectos significativos en la respuesta del modelo ($p < 0.05$), así como la interacción de la temperatura y el tiempo en función de la proporción del agua, como se observa en la Tabla 16. Por lo tanto, un aumento de todos los factores correspondió a una mayor extracción de fenoles totales.

En relación a la obtención de flavonoides, se puede observar que la proporción de agua (A) como la temperatura (B) en términos lineales, además de la temperatura y tiempo (C) en sus aportes cuadráticos y la interacción de estos últimos presentó un efecto significativo ($p < 0.05$).

▪ *Evaluación de la capacidad antioxidante*

En lo que respecta a los valores de inhibición de DPPH•, se encontró un comportamiento similar a la extracción de flavonoides, donde la proporción de agua (A) y la temperatura (B) en su término lineal, además de este último y el tiempo de contacto (C) en sus aportes cuadráticos y en su combinación, que presentaron un efecto significativo ($p < 0.05$).

Por último, para la actividad de eliminación de OH•, se observa que únicamente la proporción de agua (A) y la temperatura (B) como factores lineales y cuadráticos fueron significativos ($p < 0.05$).

Tabla 16. Análisis de varianza para extracto de cáscara de zapote negro.

Término	Fenoles totales	Flavonoides	DPPH•	OH•
	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
A	0.0000	0.0000	0.0036	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0010	0.0019
C	0.0006	0.0793	0.6172	0.2885
AA	0.0003	0.7156	0.6339	0.0001
BB	0.0466	0.0156	0.0162	0.0474
CC	0.0001	0.0132	0.0207	0.1513
AB	0.0299	0.1606	0.1059	0.0910
AC	0.0140	0.3092	0.4085	0.2270
BC	0.3535	0.0023	0.0137	0.6239
R	0.9981	0.9891	0.9604	0.9824
Concentración (%)	75.00	75.00	75.00	75.00
Temperatura (°C)	80.00	79.55	79.46	40.00
Tiempo (min)	72.82	30.00	30.00	84.92

A = Proporción (% agua-etanol 96°), B = Temperatura (°C), C = Tiempo (min), R = Coeficiente de correlación.

El tratamiento estadístico reveló valores elevados de coeficientes de correlación entre las variables del proceso y las respuestas analizadas, lo que evidencia una asociación estrecha y consistente, así como una influencia marcada de las condiciones experimentales sobre los parámetros evaluados.

Se identificaron las condiciones óptimas de extracción para cada variable de respuesta, en donde medios altamente polares favorecieron la recuperación de fenoles totales y flavonoides, así como una mayor capacidad de inhibición de los radicales DPPH• y OH•-. En general, temperaturas elevadas (≈ 80 °C) favorecieron la mayoría de las respuestas, a excepción de la inhibición del radical OH•-, que mostró mayor eficiencia a temperaturas más bajas, asociado a compuestos termolábiles. El tiempo de extracción actuó como un factor modulador, con efectos favorables en un intervalo que osciló entre 30 y 90 minutos.

9.5.2.3. Correlación entre variables de respuesta del modelo

A continuación, se presentan en la Tabla 17 los coeficientes del análisis de correlación de Spearman entre el contenido de fenoles totales y flavonoides con la actividad antioxidante de los extractos de cáscara de *Diospyros nigra*, evaluada mediante los ensayos de inhibición de los radicales DPPH• y OH•- expresados como valores de IC₅₀, cuyos valores menores señalan una mayor actividad antioxidante, por lo que una correlación negativa se asocia con una mayor capacidad de neutralización de radicales.

Tabla 17. Correlación entre variables de respuesta en extracto de cáscara de zapote negro.

Variables correlacionadas	Rho (ρ)	Valor de p	Significancia ($\alpha = 0.05$)	IC 95%
Fenoles totales vs DPPH	-0.7108	0.0019	**	-0.8913 a -0.3359
Fenoles totales vs OH•-	-0.1936	0.4550	No, Spearman	-0.6264 a 0.3303
Flavonoides totales vs DPPH	-0.3407	0.1809	No, Spearman	-0.7135 a 0.1824
Flavonoides totales vs OH•-	0.0588	0.8241	No, Spearman	-0.4466 a 0.5358

Rho (ρ) = Coeficiente de correlación, IC = Intervalo de confianza al 95%

En este contexto, se observó una correlación negativa fuerte y estadísticamente significativa entre el contenido de fenoles totales y la inhibición del radical DPPH• ($\rho = -0.7108$; $p = 0.0019$), lo que indica que el incremento en la concentración de fenoles en los extractos de cáscara se asocia directamente con una disminución significativa de los valores de IC₅₀, siendo cruciales en neutralizar DPPH•. Esta relación se confirma por acción del intervalo de confianza al 95% totalmente negativo (-0.8913 a -0.3359).

Por el contrario, la correlación entre fenoles totales y la inhibición del radical OH•- fue débil y no significativa ($\rho = -0.1936$; $p = 0.4550$), con un intervalo de confianza amplio que incluye el valor cero (-0.6264 a 0.3303). Esto indica que, bajo las condiciones experimentales, el contenido de fenoles no explica de forma directa la capacidad de neutralización del radical hidroxilo, lo que puede atribuirse a las diferencias entre los ensayos realizados; dado que el radical OH•- es altamente reactivo y no selectivo, lo que puede enmascarar relaciones simples con el contenido fenólico total.

En cuanto a flavonoides, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas con ninguno de los radicales evaluados. La relación entre flavonoides y DPPH• fue negativa pero moderada ($\rho = -0.3407$; $p = 0.1809$), mientras que con el radical OH•- fue prácticamente nula ($\rho = 0.0588$; $p = 0.8241$).

En ambos casos, los intervalos de confianza al 95% incluyeron el valor cero, lo que confirma la ausencia de una asociación monotónica clara entre estas variables.

Estos resultados muestran que el contenido de fenoles totales es un factor clave en la actividad antioxidante de los extractos de cáscara del zapote negro frente al radical DPPH•, mientras que los flavonoides y la inhibición y la inhibición del radical OH• no muestran una relación directa con los valores de IC₅₀. Esto sugiere que la actividad antioxidante de la cáscara está fuertemente influenciada por su perfil fenólico total -probablemente compuesto por ácidos fenólicos u otros compuestos no flavonoides- y que su aporte antioxidante depende del tipo de radical evaluado.

9.5.2.4. Selección de extractos de cáscara de *Diospyros nigra*

Nuevamente, para la selección de extractos de cáscara, se optó por la posibilidad de que la inhibición de los radicales estuviera siendo aportada por otro tipo de compuestos además que los fenólicos; por lo que se seleccionaron únicamente tres tratamientos con base en su capacidad de inhibición del radical OH•, a los cuales se les cuantificó el contenido de ácido ascórbico como se presenta en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores experimentales para extractos seleccionados de cáscara de zapote negro.

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH• (IC ₅₀ mg/mL)	OH• (IC ₅₀ mg/mL)	Vitamina C (mg de AA/g)
6	50	40	90	6.349 ± 0.34	4.963 ± 0.17	34.706 ± 0.27	6.224 ± 0.07	0.593 ± 0.05
14	75	40	60	8.431 ± 0.09	4.185 ± 0.10	16.192 ± 0.10	6.635 ± 0.15	0.249 ± 0.07
15	75	60	30	8.342 ± 0.34	7.053 ± 0.31	17.625 ± 0.15	6.713 ± 0.24	0.373 ± 0.01

CE = Corrida experimental, Temp = temperatura, EAG = equivalentes de ácido gálico, EQ = equivalentes de quercetina, IC₅₀ = Concentración Inhibitoria Media, AA = Ácido ascórbico (Vit C) Los datos de fenoles totales, flavonoides, DPPH• y OH• son el promedio de los triplicados.

Los tratamientos seleccionados (6C, 14C y 15C) mostraron un contenido intermedio de compuestos bioactivos. El valor más alto correspondió a 8.431 ± 0.09 mg EAG/g en fenoles totales y 7.053 ± 0.31 mg EQ/g para flavonoides. En cuanto a la actividad antioxidante, exhibieron una respuesta variable frente al radical DPPH•, con un IC₅₀ de 16.192 ± 0.10 mg/mL. No obstante, la inhibición del radical OH• fue la más notable, alcanzando un IC₅₀ de 6.224 ± 0.07 mg/mL, lo que sugiere mayor eficacia frente a este.

El contenido de ácido ascórbico que se cuantificó en dichos tratamientos varió entre 0.249 y 0.593 mg/g de muestra seca, de acuerdo con los factores experimentales de proceso. Valores que fueron comparados con los reportes directos para el tejido de la misma especie, ejemplares del género *Diospyros* o similares no emparentados filogenéticamente, en donde Merino *et al.* (2022) obtuvieron entre 3.872-18.229 mg/g muestra seca de la totalidad del fruto (pulpa y cáscara) de *Diospyros nigra* durante su maduración en la semana 0 a 14. Por otro lado, Butt *et al.* (2015) confirman un intervalo de 4.609 a 5.412 mg/g de muestra seca para *Diospyros kaki* (caqui o persimón), donde Gautam *et al.* (2020) complementan con un valor de 0.751 mg/g en base seca para el mismo fruto con cáscara.

Diversos estudios sostienen que, la distribución de ácido ascórbico entre las fracciones del fruto puede variar de forma significativa, pero existe un patrón de que los tejidos externos como la cáscara retienen niveles similares o superiores a los de la pulpa bajo condiciones analíticas comparables. Por ejemplo, en mango (*Mangifera indica*), donde se reportó una mayor acumulación de vitamina C y polifenoles totales

en el epicarpio respecto al mesocarpio, lo cual se les atribuye a diferencias en la actividad metabólica y exposición a estrés oxidativo (Ma *et al.*, 2017). La reserva de ascorbato se ve influenciada por el estrés oxidativo provocado por factores abióticos como la radiación lumínica o el calor, lo que conduce a un aumento de la fotorreducción y fotorrespiración, así como mayor biosíntesis del mismo para detoxificar las especies reactivas de oxígeno (EROs) generadas durante la ontogenia del fruto (Fenech *et al.*, 2019).

9.5.3. Diseño experimental para extractos de semilla de *Diospyros nigra*

Por último, los resultados del modelo experimental Box-Behnken para la extracción de compuestos de semilla y su capacidad antioxidante se presentan en la Tabla 19. En la parte inferior, se observa que el tratamiento 13 presentó la mayor extracción de fenoles totales, con 1.311 ± 0.01 mg EAG/g y la mayor actividad antioxidante contra el radical $\text{OH}^{\bullet}$, con un IC_{50} de 4.469 ± 0.00 mg/mL; mientras que la mayor extracción de flavonoides, con 0.843 ± 0.09 mg EQ/g, así como la mayor inhibición contra $\text{DPPH}^{\bullet}$ con un IC_{50} de 86.493 ± 0.04 mg/mL, ocurrió en el tratamiento 12. En donde, a diferencia del resto de fracciones vegetales, de forma general hay un mayor arrastre de compuestos fenólicos en los tratamientos que utilizan una mezcla equivalente de solventes (50% agua-etanol) a temperaturas superiores de las condiciones de los puntos centrales (60-80 °C).

Tabla 19. Valores experimentales del diseño Box-Behnken para extractos de semilla de zapote negro.

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH• (IC_{50} mg/mL)	OH•• (IC_{50} mg/mL)
1	25	40	60	0.759 ± 0.00	0.194 ± 0.04	275.330 ± 0.27	15.354 ± 0.36
2	25	60	30	0.841 ± 0.01	0.346 ± 0.04	115.719 ± 0.05	9.718 ± 0.09
3	25	60	90	0.857 ± 0.00	0.206 ± 0.09	151.256 ± 0.18	14.918 ± 0.17
4	25	80	60	0.539 ± 0.01	0.295 ± 0.07	328.711 ± 0.31	10.274 ± 0.23
5	50	40	30	0.891 ± 0.01	0.372 ± 0.04	168.892 ± 0.03	5.557 ± 0.00
6	50	40	90	0.918 ± 0.02	0.435 ± 0.02	155.311 ± 0.08	5.537 ± 0.02
7	50	60	60	1.112 ± 0.01	0.448 ± 0.02	104.689 ± 0.12	5.176 ± 0.00
8	50	60	60	1.060 ± 0.01	0.435 ± 0.09	111.670 ± 0.07	5.201 ± 0.05
9	50	60	60	1.067 ± 0.01	0.423 ± 0.04	116.666 ± 0.02	5.515 ± 0.08
10	50	60	60	1.136 ± 0.02	0.410 ± 0.02	102.349 ± 0.10	5.096 ± 0.04
11	50	60	60	1.123 ± 0.02	0.448 ± 0.14	106.321 ± 0.06	5.263 ± 0.05
12	50	80	30	1.230 ± 0.01	0.843 ± 0.09	86.493 ± 0.04	4.980 ± 0.02
13	50	80	90	1.311 ± 0.01	0.779 ± 0.14	98.800 ± 0.15	4.469 ± 0.00
14	75	40	60	0.862 ± 0.01	0.359 ± 0.02	252.872 ± 0.24	4.993 ± 0.09
15	75	60	30	0.885 ± 0.00	0.423 ± 0.04	177.206 ± 0.06	5.080 ± 0.01
16	75	60	90	0.698 ± 0.01	0.384 ± 0.09	257.522 ± 0.35	4.498 ± 0.12
17	75	80	60	0.754 ± 0.01	0.435 ± 0.02	246.405 ± 0.09	15.748 ± 0.05

CE = Corrida experimental, Temp = temperatura, EAG = equivalentes de ácido gálico, EQ = equivalentes de quercetina, IC_{50} = Concentración Inhibitoria Media. Los datos de fenoles totales, flavonoides, $\text{DPPH}^{\bullet}$ y $\text{OH}^{\bullet}$ son el promedio de los triplicados.

9.5.3.1. Modelo polinomial de segundo grado para extractos de semilla

Los modelos de regresión de segundo orden expuestos en la Tabla 18 permitieron describir de manera robusta la relación entre las variables de extracción y las respuestas analizadas, integrando los efectos lineales, de interacción y no lineales de las variables del proceso. Con base en los coeficientes estimados

y su significancia estadística, se evaluó la influencia de los factores experimentales sobre la recuperación de fenoles totales y flavonoides, así como sobre la capacidad antioxidante de los extractos, evaluada mediante la inhibición de los radicales DPPH• y OH•.

Tabla 20. Modelo de regresión cuadrático para extractos de semilla de *Diospyros nigra*.

Término	Fenoles totales	Flavonoides	DPPH•	OH•
Intercepto	-6.2563×10^{-1}	1.6613×10^{-1}	898.106	51.01
A	5.2783×10^{-2}	3.1894×10^{-2}	-16.0286	-1.23692
B	1.3953×10^{-2}	-1.3318×10^{-2}	-17.6418	-8.0081×10^{-1}
C	-3.5392×10^{-3}	-1.2155×10^{-2}	4.50848	3.4588×10^{-1}
AA	-5.1068×10^{-4}	-3.0364×10^{-4}	1.7243×10^{-1}	7.9278×10^{-3}
BB	-1.2981×10^{-4}	1.9431×10^{-4}	1.4930×10^{-1}	3.8429×10^{-3}
CC	4.4250×10^{-5}	1.0747×10^{-4}	-4.5205×10^{-2}	-1.8351×10^{-3}
AB	5.6000×10^{-5}	-1.2500×10^{-5}	-2.9924×10^{-2}	7.6175×10^{-3}
AC	-6.7667×10^{-5}	3.3667×10^{-5}	1.4926×10^{-2}	-1.9273×10^{-3}
BC	2.2500×10^{-5}	-5.2917×10^{-5}	1.0787×10^{-2}	-2.0458×10^{-4}

A = Proporción (% agua-etanol 96°), B = Temperatura (°C), C = Tiempo (min).

9.5.3.2. Influencia de las variables experimentales en el modelo

La relevancia estadística de las variables experimentales, así como la calidad del ajuste del modelo, se determinó mediante el análisis de los valores de probabilidad (p) correspondientes a cada término, lo que permitió comprobar si los estadísticos F obtenidos reflejaban una influencia efectiva de los factores independientes sobre las variables de respuesta, descartando efectos debidos al azar. Por lo tanto, se consideró que valores de p inferiores a 0.05 ejercieron un efecto estadísticamente significativo.

▪ *Contenido antioxidante general*

Respecto a la obtención de fenoles totales, el análisis de varianza indicó que la proporción de agua (A) en términos cuadráticos fue exclusivamente el único factor experimental con efectos significativos ($p < 0.05$), como se observa en la Tabla 21.

De igual manera, para el contenido de flavonoides, se muestra que tanto la proporción de agua (A) como término cuadrático y la temperatura (B) en término lineal tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) durante la extracción (Tabla 21).

▪ *Evaluación de la capacidad antioxidante*

En relación con la capacidad de inhibición de DPPH•, se encontró que sólo la proporción de agua (A) y la temperatura (B) en términos cuadráticos tuvieron efectos significativos ($p < 0.05$) en la Tabla 21.

Por último, para la actividad de captura de los radicales OH• se verifica que únicamente la proporción de agua (A) en términos lineales, cuadráticos y en su interacción con la temperatura fue significativa ($p < 0.05$) en la inhibición del radical, como se expone en la Tabla 21.

Tabla 21. Análisis de varianza para extracto de semilla de zapote negro.

Término	Fenoles totales	Flavonoides	DPPH•	OH•
	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
A	0.6665	0.0629	0.6499	0.0050
B	0.4005	0.0058	0.5110	0.3936
C	0.8929	0.5007	0.4171	0.4488
AA	0.0046	0.0034	0.0022	0.0008
BB	0.5257	0.1184	0.0350	0.1234
CC	0.6244	0.0624	0.1188	0.1019
AB	0.7360	0.8930	0.5444	0.0039
AC	0.5450	0.5907	0.6482	0.1525
BC	0.8704	0.5016	0.7909	0.8954
R	0.8564	0.9331	0.9115	0.9571
Concentración (%)	53.41	52.53	55.00	75.00
Temperatura (°C)	67.86	80.00	80.00	80.00
Tiempo (min)	30.00	30.00	32.97	32.87

A = Proporción (% agua-etanol 96°), B = Temperatura (°C), C = Tiempo (min), R = Coeficiente de correlación.

El análisis estadístico puso de manifiesto relaciones estadísticas sólidas entre los factores del proceso y las variables de respuesta, reflejadas en valores altos de correlación que confirman la influencia de las condiciones de extracción sobre el comportamiento de los sistemas analizados.

A partir de esta aproximación, fue posible delimitar condiciones experimentales óptimas para cada respuesta, observándose que mezclas con proporciones más equilibradas de agua-etanol propiciaron una mayor eficiencia en la solubilización de fenoles y flavonoides, así como un incremento en la capacidad antioxidante frente al radical DPPH•, mientras que para OH• ocurrió en soluciones más acuosas. De manera general, el incremento de la temperatura hasta valores cercanos a 80°C favoreció la mayoría de las respuestas analizadas; no obstante, la extracción de fenoles presentó un patrón distinto, mostrando un mejor desempeño a temperaturas ligeramente menores. Por su parte, el tiempo de contacto se comportó como un parámetro de ajuste flexible, con efectos positivos en los 30 minutos.

9.5.3.3. Correlación entre variables de respuesta del modelo

Otro punto importante fue el análisis de correlación de Spearman presentado en la Tabla 22, donde se muestran los coeficientes entre el contenido de fenoles totales y flavonoides con la actividad antioxidante de los extractos de semilla de *Diospyros nigra*, determinada mediante los ensayos de inhibición de los radicales DPPH• y OH•, expresados como valores de IC₅₀, cuyos valores menores indican una mayor eficiencia antioxidante, por lo que se espera una correlación negativa directa.

Tabla 22. Correlación entre variables de respuesta en extracto de semilla de zapote negro.

Variables correlacionadas	Rho (ρ)	Valor de p	Significancia (α = 0.05)	IC 95%
Fenoles totales vs DPPH	-0.8971	<0.0001	****	-0.9638 a -0.7248
Fenoles totales vs OH•	-0.5466	0.0251	*	-0.8187 a -0.0740

Flavonoides totales vs DPPH	-0.6925	0.0027	**	-0.8836 a -0.3036
Flavonoides totales vs OH•	-0.5154	0.0360	*	-0.8038 a -0.0307

Rho (ρ) = Coeficiente de correlación, IC = Intervalo de confianza al 95%

Inicialmente, se observó una correlación negativa muy fuerte y altamente significativa entre fenoles totales y la inhibición del radical DPPH• ($\rho = -0.8971$; $p = <0.0001$), lo que sugiere que el aumento en el contenido fenólico de los extractos se asocia con una marcada disminución de los valores de IC₅₀. Esta relación se respaldó por un intervalo de confianza al 95% completamente negativo y estrecho (-0.9638 a -0.7248) que no incluye al cero. Esta respuesta indica que los compuestos fenólicos presentes en semilla son determinantes clave de la capacidad antioxidante frente a DPPH•.

Adicionalmente, la correlación entre fenoles totales y la inhibición del radical OH• fue moderada, negativa y estadísticamente significativa ($\rho = -0.5466$; $p = 0.0251$), con un intervalo de confianza al 95% que no incluye el valor cero (-0.8187 a -0.0740). Este resultado denota que, aunque la relación es menos intensa que al compararla con DPPH•, el contenido fenólico también contribuye de forma significativa a la capacidad de neutralización del radical hidroxilo en los extractos de semilla, lo que demuestra una actividad antioxidante más amplia y consistente en esta fracción vegetal.

En cuanto a los flavonoides, se observó una correlación negativa fuerte y significativa en la inhibición del radical DPPH• ($\rho = -0.6925$; $p = 0.0027$), lo que indica que el aumento en el contenido de flavonoides se asocia con menores valores de IC₅₀ y, por ende, con una mayor capacidad antioxidante. Esta asociación se confirmó por un intervalo de confianza al 95% completamente negativo (-0.8836 a -0.3036). La correlación entre flavonoides y la inhibición del radical OH• resultó moderada y significativa ($\rho = -0.5154$; $p = 0.0360$), lo que señala que estos compuestos también contribuyen, aunque en menor magnitud, a la neutralización de este tipo de especies altamente reactivas.

Los resultados obtenidos para la semilla del zapote negro evidencian una relación clara, consistente y estadísticamente significativa entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante frente a ambos radicales. A diferencia de lo observado en la pulpa y, en menor medida, en la cáscara, la semilla presenta un comportamiento fuertemente dependiente de la concentración de sus metabolitos fenólicos, propio de un perfil fitoquímico más eficaz en términos de donación de electrones o hidrógenos, lo que la vuelve la fracción del fruto con mayor potencial antioxidante intrínseco.

9.5.3.4. Selección de extractos de semilla de *Diospyros nigra*

De la misma forma y por medio del análisis de correlación antes realizado, se pudo comprobar que la actividad antioxidante de las semillas está ampliamente ligada a su contenido de fenoles y flavonoides totales; por lo que se seleccionaron únicamente tres tratamientos con el mayor contenido de compuestos, siguiendo el criterio de realizarlo con base en su capacidad de inhibición del radical OH•, a los que también se les cuantificó el contenido de ácido ascórbico como se presenta en la Tabla 23.

Tabla 23. Valores experimentales para extractos seleccionados de semilla de zapote negro.

CE	Agua (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH• (IC ₅₀ mg/mL)	OH• (IC ₅₀ mg/mL)	Vitamina C (mg de AA/g)
12	50	80	30	1.230 ± 0.01	0.843 ± 0.09	86.493 ± 0.04	4.980 ± 0.02	0.050 ± 0.03
13	50	80	90	1.311 ± 0.01	0.779 ± 0.14	98.800 ± 0.15	4.469 ± 0.00	0.022 ± 0.04

16	75	60	90	0.698 ± 0.01	0.384 ± 0.09	257.522 ± 0.35	4.498 ± 0.12	0.038 ± 0.02
----	----	----	----	--------------	--------------	----------------	---------------------	--------------

CE = Corrida experimental, Temp = temperatura, EAG = equivalentes de ácido gálico, EQ = equivalentes de quercetina, IC₅₀ = Concentración Inhibitoria Media, AA = Ácido ascórbico (Vit C) Los datos de fenoles totales, flavonoides, DPPH• y OH• son el promedio de los triplicados.

Los tratamientos 12S, 13S y 16S tras el proceso de selección, presentaron concentraciones notables de compuestos fenólicos pero muy inferiores respecto al resto de fracciones vegetales. En donde el contenido máximo registrado fue de 1.311 ± 0.01 mg EAG/g para fenoles totales y 0.843 ± 0.09 mg EQ/g en flavonoides. Respecto a la capacidad antioxidante, la actividad frente al radical DPPH• fue variable, alcanzando un IC₅₀ de 86.493 ± 0.04 mg/mL. La captación del radical OH• resultó más eficiente, al obtenerse un IC₅₀ de 4.469 ± 0.00 mg/mL, una efectividad igual de buena que la pulpa.

Por su parte, el contenido de ácido ascórbico en dichos extractos seleccionados resultó muy inferior, con valores entre 0.022 y 0.050 mg/g de muestra seca, que difirieron respecto a las variables de proceso. Con el fin de lograr una discusión válida, se comparó estos resultados con los valores de vitamina C para la misma especie o ejemplares similares al género *Diospyros*, en donde Ramde *et al.* (2023) reportaron 0.115 mg/g de muestra seca en *Diospyros mespiliiformis*; mientras que, en otro estudio, Omena *et al.* (2012) obtuvieron 0.010, 0.033 y 0.016 mg/g de muestra seca en semillas de frutas como el genipapo (*G. americana* L.), la siriguela (*S. purpurea*) y el umbú (*S. tuberosa*), respectivamente. Lo anterior demuestra que, en general, las semillas reportadas presentan contenidos significativamente menores o trazas de ácido ascórbico respecto a su parte comestible, lo cual resulta consistente con los hallazgos obtenidos.

En los frutos, la distribución de metabolitos responde a la función fisiológica de cada tejido vegetal. La acumulación de ácido ascórbico está fuertemente asociada con tejidos metabólicamente activos y en desarrollo como la pulpa, con un rol regulador activo en procesos de crecimiento, maduración y reserva postcosecha (Zheng *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2025); así como en procesos redox de defensa contra estrés oxidativo, al proteger frente a especies reactivas de oxígeno generadas en matrices fotosintéticas durante la maduración (Fenech *et al.*, 2019; Paciolla *et al.*, 2019).

Las semillas frutales contienen cantidades mínimas de ácido ascórbico, que por lo general se encuentra en forma oxidada, determinado por el desarrollo del fruto y cambios ambientales (Paciolla *et al.*, 2019); forman parte de órganos de reserva y latencia con una actividad metabólica relativamente nula y tejidos especializados -endospermo o cotiledones- orientados a acumular recursos hasta su imbibición y germinación (El-Maarouf-Bouteau, 2022). Estudios sobre su composición han demostrado que éstas presentan un elevado contenido de proteínas y lípidos (Purkrtova *et al.*, 2008; Jain, 2023), así como cantidades importantes de metabolitos como compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y flavonoides, carotenoides, alcaloides, terpenoides, fitoesteroides, saponinas, tocoferoles, péptidos como agentes con actividad quelante o ácidos grasos insaturados (Fidelis *et al.*, 2019; Jain, 2023; Zhang *et al.*, 2025).

9.6. Caracterización de la actividad citotóxica, antioxidante y citoprotectora de extractos de *Diospyros nigra* en fibroblastos 3T3-L1

Las células de la línea 3T3-L1 se cultivaron hasta alcanzar entre tres y cinco pases. Posteriormente, se ajustaron las diferentes densidades celulares utilizando una cámara de Neubauer, con el objetivo de sembrar aproximadamente 20,000 células por pozo en placas de 96 pozos.

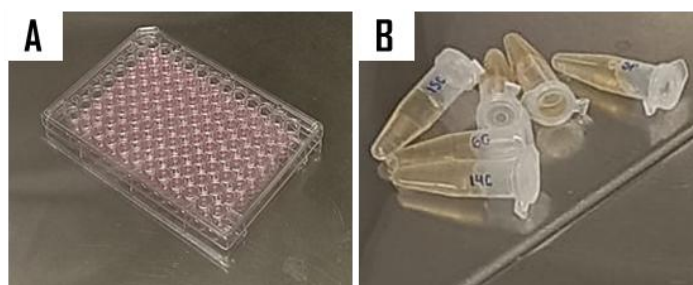


Figura 17. Cultivo celular 3T3-L1 (A) y tratamientos de pulpa, cáscara y semilla de *Diospyros nigra* (B).

A continuación, las células fueron tratadas con los extractos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro, previamente seleccionados por su alta capacidad de inhibición del radical hidroxilo (Figura 17).

9.6.1. Efecto de los extractos de pulpa de *Diospyros nigra* sobre la viabilidad celular en 3T3-L1

Los resultados del ensayo MTT demostraron que los extractos obtenidos de pulpa de *Diospyros nigra* (5P, 6P y 14P) -seleccionados por su capacidad de inhibición frente al radical hidroxilo- no presentaron efectos citotóxicos sobre la línea celular 3T3-L1 en el rango de concentraciones evaluado (25-200 µg/mL), mismos que se presentan en la Figura 18. En todos los casos, los tratamientos mostraron que la viabilidad no fue drásticamente modificada por la adición de los extractos, ya que exhibieron un 100% de viabilidad a la concentración más baja [25 µg/mL], con una ligera disminución de la misma a 93 y 97% al aumentar la concentración hasta 200 µg/mL. Esta respuesta es consistente con lo observado en estudios con extractos naturales ricos en antioxidantes, que muestran baja citotoxicidad en fibroblastos de la misma línea celular, además de que mantienen viabilidades superiores al 80% en rangos similares de concentración (Pramanik *et al.*, 2023; Artanti *et al.*, 2025).

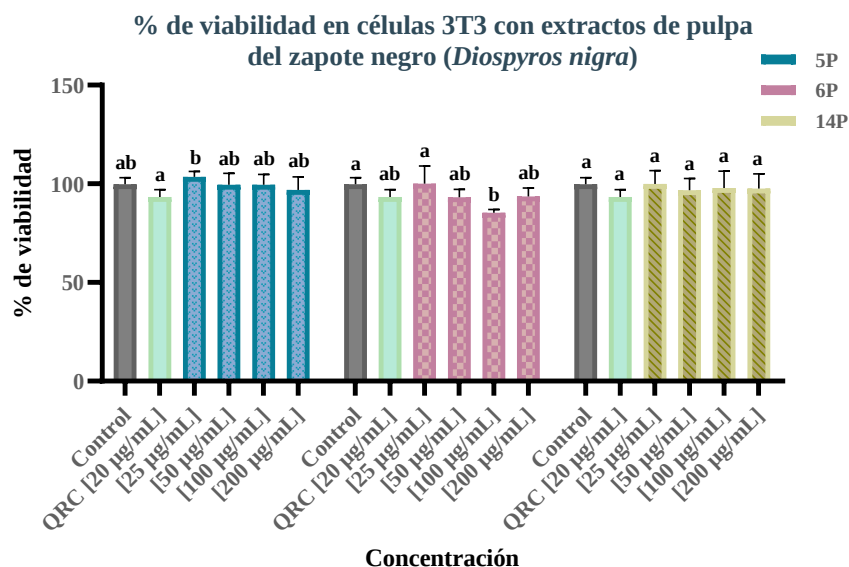


Figura 18. Gráfica del efecto de los extractos de pulpa del zapote negro (*Diospyros nigra*) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 mediante MTT

En particular, los extractos de pulpa tuvieron un comportamiento muy estable, con viabilidades cercanas al 100% en todas las concentraciones, destacando el tratamiento 5P ($103.49\% \pm 2.73$ a $25 \mu\text{g/mL}$ y $96.84\% \pm 6.67$ a $200 \mu\text{g/mL}$) y 14P ($99.90\% \pm 6.75$ a $25 \mu\text{g/mL}$ y $97.56\% \pm 7.43$ a $200 \mu\text{g/mL}$), cuyos resultados pueden atribuirse a la presencia de compuestos hidrosolubles antioxidantes como al ácido ascórbico y flavonoides, característicos de tejidos fotosintéticos metabólicamente activos. Yadav *et al.* (2026) han demostrado que extractos ricos en compuestos fenólicos favorecen la viabilidad celular al mantener la actividad metabólica mitocondrial evaluada mediante MTT.

Por su parte, el extracto 6P mantuvo una viabilidad celular ligeramente menor en el mismo rango de dosis ($100.02\% \pm 9.03$ a $25 \mu\text{g/mL}$ y $93.54\% \pm 4.32$ a $200 \mu\text{g/mL}$), con una diferencia estadísticamente significativa respecto al control a $100 \mu\text{g/mL}$ ($85.39\% \pm 1.62$); sin embargo, este efecto no se considera indicativo de citotoxicidad. Dicha disminución puntual puede atribuirse a la variabilidad inherente del ensayo MTT, viéndose influenciada por factores como la actividad metabólica celular, la interacción de compuestos del extracto con el reactivo tetrazolio o ligeras diferencias en la densidad celular; además, la ausencia de una relación dosis-respuesta clara y la recuperación de la viabilidad a una concentración superior sugieren que el efecto es una fluctuación experimental y no un efecto biológico real.

El tratamiento con quercetina (QRC) como estándar registró una viabilidad del $93.36\% \pm 3.63$ a $20 \mu\text{g/mL}$, menor a la mayoría de concentraciones utilizadas entre tratamientos, sin citotoxicidad basal ni presentar diferencias significativas; que coinciden con Roshanzamir y Yazdanparast (2014) y Zhang *et al.* (2024), quienes reportaron viabilidades celulares cercanas al 95% a $60 \mu\text{M}$ ($18.13 \mu\text{g/mL}$) en células SK-N-MC y de alrededor del 94% a $75 \mu\text{M}$ ($22.67 \mu\text{g/mL}$) en células HepG2 tras su tratamiento durante 24 h, respectivamente. La concentración utilizada está justo en el límite previo donde otros estudios señalan citotoxicidad dosis-dependiente respecto al control, pudiendo promover o inhibir la proliferación celular a razón de su concentración y del modelo evaluado (Ebrahimi *et al.*, 2023).

9.6.1.1. Efecto protector de los extractos de pulpa de *Diospyros nigra* frente a estrés oxidativo

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de pulpa (5P, 6P y 14P) frente a condiciones de estrés oxidativo, tras la exposición a peróxido de hidrógeno [$300 \mu\text{M}$] en el rango de concentraciones evaluado (25 - $200 \mu\text{g/mL}$), como se observa en la Figura 19. Los resultados evidenciaron el efecto protector de los tratamientos respecto al control, observándose un aumento en la viabilidad celular a medida que incrementaba la concentración del extracto, lo que sugiere una relación directamente proporcional entre dosis y efecto antioxidante.

Entre los extractos evaluados, el tratamiento 5P incrementó la viabilidad desde $32.19\% \pm 3.01$ a $25 \mu\text{g/mL}$ hasta $77.34\% \pm 2.64$ en la concentración máxima, con diferencias estadísticamente significativas entre dosis, lo que indica una clara relación dosis-respuesta. Dicha tendencia coincide con Alnuqaydan (2020), el cual expone que extractos vegetales ricos en polifenoles muestran una mejora progresiva en la viabilidad celular conforme se incrementa la dosis.

El tratamiento 6P mostró el menor efecto protector, con $26.993\% \pm 1.17$ a $25 \mu\text{g/mL}$ y $57.510\% \pm 5.25$ a $200 \mu\text{g/mL}$; mientras que el tratamiento 14P presentó un comportamiento sostenido superior al resto, con una viabilidad del $81.077\% \pm 1.36$ - $82.268\% \pm 0.60$ en la concentración evaluada, actividad sin diferencias significativas reportada por Charoensin y Weera (2022), donde compuestos antioxidantes

con alta capacidad de neutralización de radicales libres mantienen su efecto independientemente de su concentración a ciertos rangos.

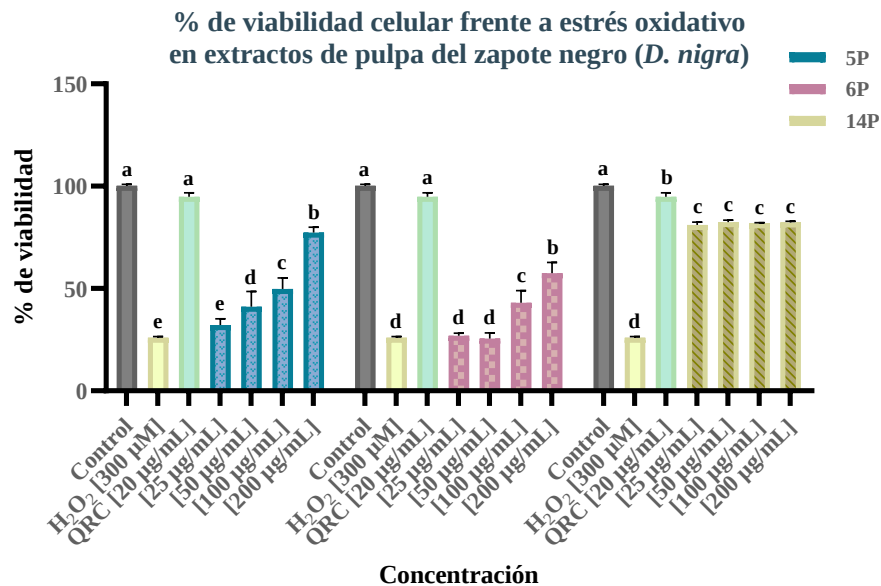


Figura 19. Gráfica del efecto protector de los extractos de pulpa del zapote negro (*Diospyros nigra*) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 tras inducción de estrés oxidativo con H₂O₂ [300 µM]

Por su parte, el tratamiento con exclusivamente peróxido de hidrógeno [300 µM], redujo su viabilidad celular hasta 25.95% ± 2.96, con diferencias significativas respecto al control y a la mayoría de extractos -con excepción de su dosis inicial-, confirmando la inducción efectiva de estrés oxidativo; cuyos valores han sido replicados por Roshanzamir y Yazdanparast (2014) y Zhang *et al.* (2024) con una reducción de hasta cerca del 30% en células SK-N-MC y HepG2 respectivamente, tras su exposición a 300 µM durante 24 h; mientras que Li *et al.* (2024) obtuvo una viabilidad de aproximadamente 25% a 250 µM.

El tratamiento con quercetina (20 µg/mL) como elemento estándar restauró la viabilidad hasta 94.78% ± 1.92, valor que no muestra diferencias significativas respecto al control. Roshanzamir y Yazdanparast (2014), indicaron en su estudio que la quercetina presentó un efecto protector a dosis de 50 µM (18.13 µg/mL), mejorando la viabilidad hasta cerca del 77% frente a células SK-N-MC expuestas a H₂O₂ [150 µM]. Por otro lado, Zhang *et al.* (2024) reportaron un valor superior al 90% en células HepG2 a dosis de 75 µM (22.67 µg/mL) respecto a H₂O₂ [200 µM]. En conjunto, estos hallazgos confirman el efecto protector de la quercetina, el cual puede variar en función del tipo celular, la concentración empleada y la intensidad del agente oxidante.

9.6.2. Efecto de los extractos de cáscara de *Diospyros nigra* sobre la viabilidad celular en 3T3-L1

De manera similar, los extractos de cáscara de *Diospyros nigra* (6C, 14C y 15C) -seleccionados por su actividad frente al radical hidroxilo-, fueron evaluados en células 3T3-L1 mediante el ensayo MTT, en donde no mostraron citotoxicidad bajo el intervalo analizado (25-200 µg/mL) en la Figura 20. De manera general, los tratamientos evidenciaron una alta viabilidad celular, con valores iniciales del 100%

a la concentración mínima (25 µg/mL) y con una disminución más marcada en la viabilidad al aumentar la dosis en comparación de la pulpa, alcanzando valores de entre 85 y 93% a 200 µg/mL.

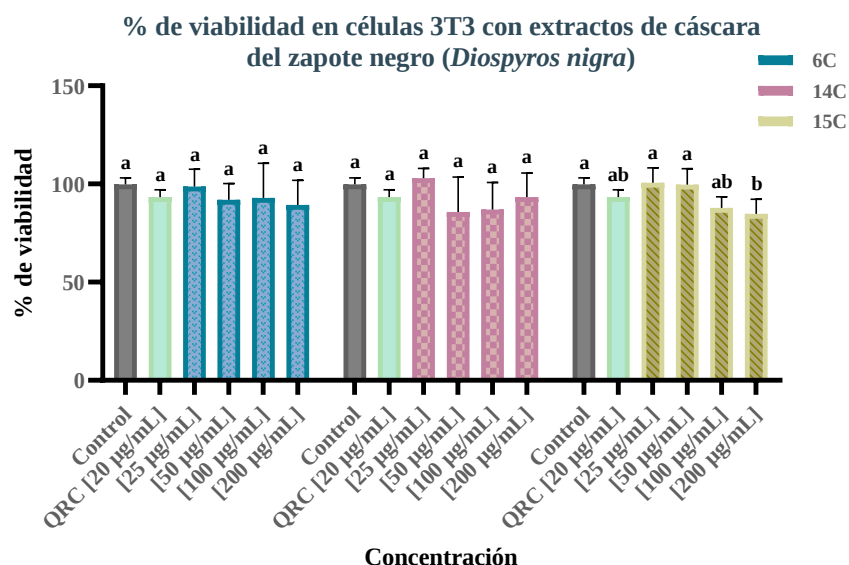


Figura 20. Gráfica del efecto de los extractos de cáscara del zapote negro (*Diospyros nigra*) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 mediante MTT

Como ya se mencionó, los extractos tuvieron una gran biocompatibilidad en el ensayo, destacando al tratamiento 6C (98.70% $\pm$ 8.81 a 25 µg/mL y 89.28% $\pm$ 12.53 a 200 µg/mL); sin embargo, hay que reconocer que exhibieron una viabilidad menor al resto de tejidos del fruto analizados, como en el tratamiento 15C (100.68% $\pm$ 7.58 a 25 µg/mL y 84.79% $\pm$ 7.38 a 200 µg/mL), con diferencias respecto al control en la concentración máxima. Buranasudja *et al.* (2022) mencionan que esto puede deberse al alto contenido de compuestos fenólicos expresados en pigmentos vegetales, capaces de ejercer efectos duales antioxidantes-prooxidantes dependientes de la dosis.

Cabe señalar que, aunque el extracto 14C mantuvo niveles estables de supervivencia (103.01% $\pm$ 4.86 a 25 µg/mL hasta 93.299% $\pm$ 12.23 a 200 µg/mL), presentó una disminución entre las dosis intermedias (85.74% $\pm$ 17.78 a 50 µg/mL y 87.00% $\pm$ 13.77 a 100 µg/mL) respecto al control, estas diferencias no fueron significativas ni deben considerarse como indicativos de citotoxicidad, sino parte de la variabilidad experimental dentro de los márgenes de viabilidad permitidos.

El grupo tratado con quercetina (QRC) como elemento estándar (20 µg/mL) aportó una viabilidad del 93.36% $\pm$ 3.63, mayor a la mayoría de concentraciones evaluadas entre tratamientos; además, no resultó citotóxico ni presentó diferencias estadísticamente significativas entre extractos. De Oliveira *et al.* (2016) y Li *et al.* (2016) señalan que la quercetina ejerce un efecto citoprotector visible incluso en condiciones basales, capaz de modular distintos procesos implicados en la regulación del potencial de membrana y biogénesis mitocondrial, la respiración oxidativa, producción de ATP y el estado redox intracelular, en donde se mantiene la homeostasis y se reprimen eventos oxidativos espontáneos en cultivos celulares.

9.6.2.1. Efecto protector de los extractos de cáscara de *Diospyros nigra* frente a estrés oxidativo

En este apartado, se determinó la capacidad antioxidante de los extractos de cáscara (6C, 14C y 15C) frente a condiciones de estrés oxidativo inducido mediante su estímulo con H_2O_2 [300 μM] en el rango de concentraciones de 25-200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21). Los resultados mostraron un desempeño global superior al resto de tejidos del fruto, con respuestas consistentes y similares a lo largo del rango de dosis evaluado, lo que les confiere a los tratamientos un sólido efecto protector respecto al control.

Dentro de los extractos analizados, el tratamiento 6C exhibió un aumento en la viabilidad de $59.003\% \pm 2.08$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ hasta $86.474\% \pm 5.62$ a 200 $\mu\text{g/mL}$; de manera similar, el tratamiento 14C presentó un incremento desde $55.563\% \pm 0.55$ a la concentración mínima hasta $86.067\% \pm 3.91$ a 200 $\mu\text{g/mL}$, con diferencias significativas entre las dosis de ambos tratamientos. La respuesta dosis-dependiente que se observa coincide con lo reportado en modelos celulares, donde extractos vegetales aumentan la viabilidad conforme se incrementa la concentración bajo rangos no citotóxicos (Pramanik *et al.*, 2023).

En contraste, el tratamiento 15C mostró una actividad antioxidante ligeramente más elevada que se expresa en mayor viabilidad celular, partiendo desde $60.078\% \pm 3.29$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ y alcanzando un valor de $90.475\% \pm 2.49$ a la concentración máxima, sin diferencias significativas entre éste y el tratado con quercetina; lo cual puede deberse a la concentración de compuestos fenólicos en la cáscara, que actúan como antioxidantes capaces de neutralizar EROs. Marimoutou *et al.* (2015) demuestran que extractos vegetales ricos en polifenoles no sólo reducen estas especies, sino que regulan mecanismos antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), mejorando su supervivencia bajo estrés oxidativo.

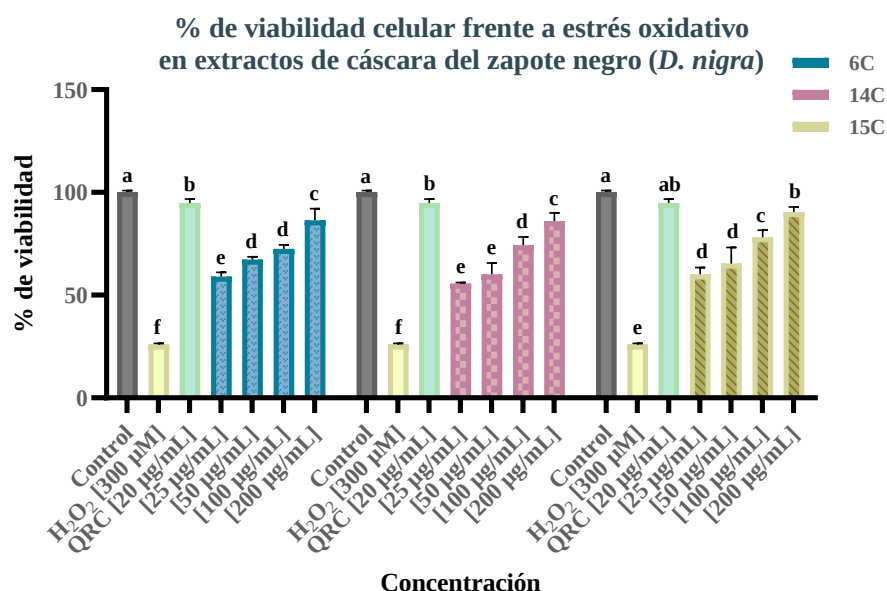


Figura 21. Gráfica del efecto protector de los extractos de cáscara del zapote negro (*Diospyros nigra*) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 tras inducción de estrés oxidativo con H_2O_2 [300 μM]

El grupo tratado con H_2O_2 [300 μM] disminuyó su viabilidad hasta $25.95\% \pm 2.96$, con diferencias significativas respecto al control y el resto de tratamientos, demostrando la inducción efectiva de estrés

oxidativo mediante su generación de especies oxidantes capaces de modificar la homeostasis celular, que a su vez derivan en apoptosis (Musalib *et al.*, 2024).

El tratamiento con el estándar de quercetina [20 µg/mL] presentó una protección casi completa ante el estímulo, con una viabilidad de hasta $94.78\% \pm 1.92$, con diferencias significativas respecto al control y a la mayoría de extractos -a excepción del 15C a 200 µg/mL -, manteniendo un efecto citoprotector, al actuar como captador directo de EROs y modulador de la respuesta antioxidante endógena vía Nrf2, que permiten la recuperación del balance redox; además de preservar la integridad de las membranas celulares (Li *et al.*, 2016; Ebrahimi *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024). Este efecto se refuerza por la optimización de la función mitocondrial y la conservación del potencial de membrana, que actúan como coadyuvantes de la supervivencia celular bajo estrés oxidativo (Yao *et al.*, 2021).

9.6.3. Efecto de los extractos de semilla de *Diospyros nigra* sobre la viabilidad celular en 3T3-L1

Los extractos de semilla de *Diospyros nigra* (12S, 13S y 16S) -seleccionados por su capacidad de inhibición contra el radical hidroxilo y contenido antioxidante-, no mostraron citotoxicidad en células de la línea 3T3-L1 dentro del rango de concentraciones de 25-200 µg/mL según el ensayo MTT (Figura 22). Los resultados revelaron una alta viabilidad y proliferación celulares en todos los tratamientos, especialmente a la concentración más baja (25 µg/mL), con valores cercanos al 100%. Se aprecia que, conforme se incrementó la dosis de los extractos, se presentó una leve disminución en la viabilidad con rangos de entre 87 y 95% a 200 µg/mL.

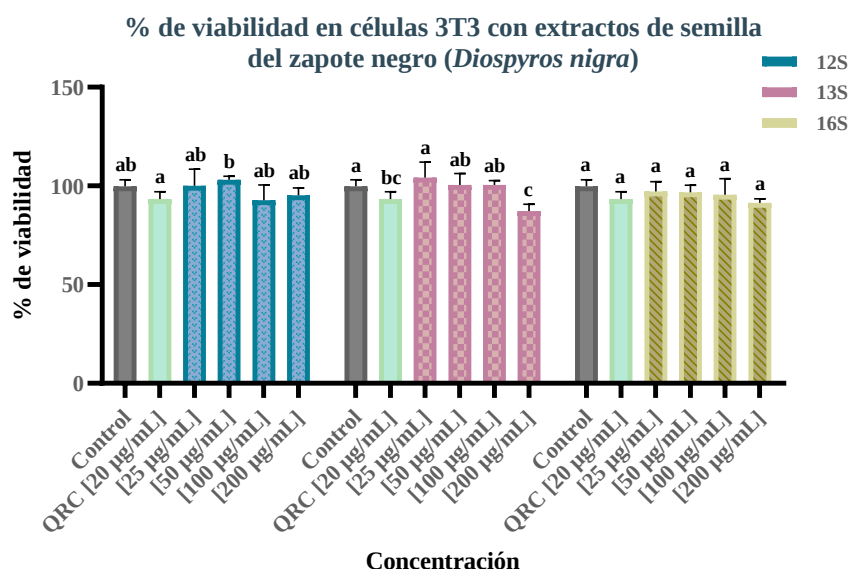


Figura 22. Gráfica del efecto de los extractos de semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 mediante el ensayo MTT

En términos comparativos, estos extractos mostraron una respuesta intermedia respecto a las demás fracciones vegetales, evidenciando una menor reducción en la viabilidad celular en comparación con los extractos de cáscara, pero un comportamiento menos estable que el observado en los de pulpa. En ese sentido, Qurat-ul-Ain *et al.* (2023) señalan que los compuestos bioactivos de origen vegetal suelen

mostrar una baja citotoxicidad, pero también efectos variables dependiendo de la composición química del tejido y de su concentración.

En particular, los tratamientos 12S y 16S destacaron por mantener una mayor viabilidad celular, con valores de $100.11\% \pm 8.40$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ y $95.22\% \pm 3.80$ a 200 $\mu\text{g/mL}$ para 12S, y de $97.22\% \pm 4.95$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ y $91.44\% \pm 2.08$ a 200 $\mu\text{g/mL}$ para 16S, sin diferencias respecto al control. Por otro lado, el tratamiento intermedio 13S ($104.23\% \pm 7.84$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ y $87.32\% \pm 3.34$ a 200 $\mu\text{g/mL}$) presentó una disminución estadísticamente significativa a la concentración máxima, sin considerarse citotóxico.

El tratamiento control que empleó quercetina (QRC) como estándar (20 $\mu\text{g/mL}$) aportó una viabilidad de $93.36\% \pm 3.63$, muy similar a la mayoría de concentraciones evaluadas entre los extractos, sin resultar citotóxico ni presentar diferencias estadísticamente significativas; manteniendo buena estabilidad del compuesto a condiciones basales (Li *et al.*, 2024).

9.6.3.1. Efecto protector de los extractos de semilla de *Diospyros nigra* frente a estrés oxidativo

Por último, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de semilla (12S, 13S y 16S) en el rango de concentraciones de 25-200 $\mu\text{g/mL}$, frente a un modelo de estrés oxidativo tras su exposición a H_2O_2 [300 μM] (Figura 23). Los resultados de esta fracción vegetal tuvieron el comportamiento más heterogéneo, con efectos protectores muy variables entre tratamientos respecto al control.

Describiendo a detalle cada uno, el tratamiento 12S presentó un efecto dosis-respuesta moderado, manteniendo una viabilidad celular mayor conforme aumentaba la concentración del extracto, partiendo de $49.09\% \pm 1.12$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ hasta alcanzar $81.34\% \pm 6.03$ a 200 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, el tratamiento 13S exhibió una respuesta destacable y consistente, manteniendo niveles de supervivencia cercanos a 100% en el rango de dosis evaluado ($98.54\% \pm 4.48$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ hasta $101.43\% \pm 1.32$ a 200 $\mu\text{g/mL}$), comparables e incluso superiores al estándar comercial, lo que sugiere una fuerte capacidad antioxidante; algo que Artanti *et al.* (2025) han descrito en compuestos bioactivos altamente eficientes, que no sólo inactivan especies reactivas, sino que restauran completamente la actividad metabólica celular.

En contraparte, el tratamiento 16S mostró un efecto protector limitado, con una baja recuperación de la viabilidad celular, cuyos valores no superaron el 25% observado del grupo tratado con H_2O_2 en ningún punto del rango utilizado ($25.26\% \pm 4.07$ a 25 $\mu\text{g/mL}$ y $25.56\% \pm 4.47$ a 200 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados sugieren una eficacia antioxidante reducida frente a estas condiciones, o un posible efecto prooxidante, como se ha reportado en extractos donde ciertos metabolitos pueden inducir estrés oxidativo dependiendo de su estructura química o concentración, como mencionan Buranasudja *et al.* (2022).

El tratamiento con H_2O_2 [300 μM] provocó una marcada disminución en la viabilidad celular, hasta un valor de $25.95\% \pm 2.96$, lo que confirma la efectiva inducción de estrés oxidativo en el modelo experimental. Este resultado valida la pertinencia del sistema utilizado para evaluar el efecto citoprotector de los tratamientos, al generar un daño celular suficientemente marcado que permite evidenciar posibles mecanismos antioxidantes.

De la misma forma, el grupo tratado con quercetina [20 $\mu\text{g/mL}$] como estándar comercial, recuperó casi en su totalidad la viabilidad perdida frente al estímulo ($94.78\% \pm 1.92$); manteniendo diferencias significativas respecto al control y a la mayoría de grupos, con excepción del tratamiento 13S a 25 $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo con Li *et al.* (2021), la elevada viabilidad puede estar ligada a su efecto a nivel mitocondrial,

ya que este flavonoide no sólo conserva su integridad, sino que también permite su fusión y evade su fragmentación bajo daño oxidativo. Además, modula rutas de supervivencia como las vías PI3K/AKT y ERK, como resistencia ante el estrés y aumento de la preservación celular, asociado con la inhibición de la apoptosis por Bcl-2 y caspasas (Park *et al.*, 2003; Boumaza *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2021).

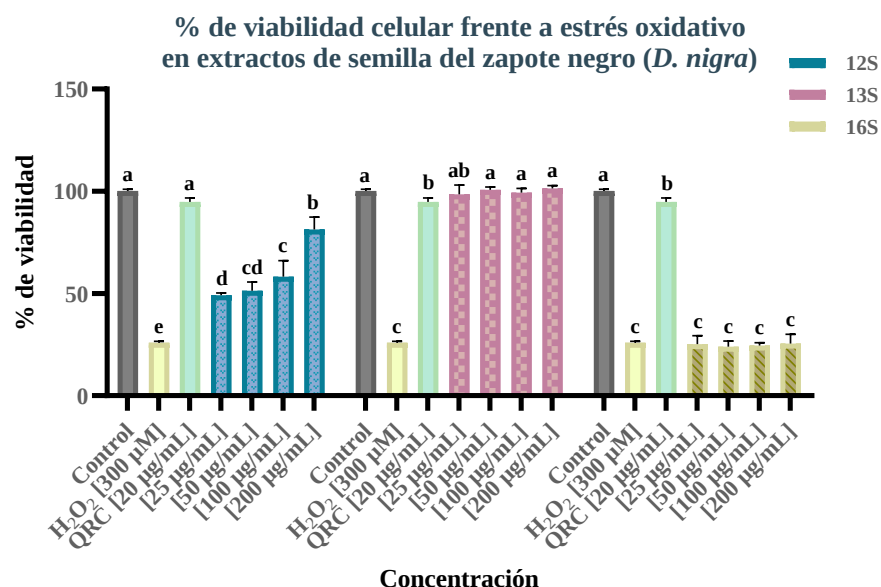


Figura 23. Gráfica del efecto protector de los extractos de semilla del zapote negro (*Diospyros nigra*) sobre el porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 tras inducción de estrés oxidativo con H₂O₂ [300 µM]

9.6.4. Evaluación del efecto de los extractos de *Diospyros nigra* sobre la peroxidación lipídica

La determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) permitió evaluar de forma específica la peroxidación lipídica inducida por el estrés oxidativo en la línea celular 3T3-L1, expresada como concentración de malondialdehído (MDA), presentada en la Figura 24.

De modo que, bajo las condiciones experimentales descritas, el grupo tratado con H₂O₂ [300 µM] mostró un incremento significativo en la producción de este compuesto, con 6.201 ± 0.79 µM de MDA respecto al control (1.170 ± 0.50 µM a niveles basales), lo que confirma la inducción efectiva de estrés oxidativo. De acuerdo con Ayala *et al.* (2014), esta respuesta es coherente con lo reportado anteriormente, donde el H₂O₂ actúa como precursor de especies reactivas de oxígeno (EROs) capaces de iniciar la peroxidación de los lípidos de las membranas, derivando en la formación de aldehídos secundarios tóxicos como el MDA y el 4-Hidroxinonenal (4-HNE).

La quercetina [20 µg/mL], utilizada como estándar antioxidante, redujo significativamente los niveles de MDA hasta valores de 1.421 ± 0.29 µM, cercanos al control basal y sin diferencias estadísticas entre ambos tratamientos. Este resultado coincide con estudios que documentan la capacidad de la quercetina para inhibir la peroxidación lipídica, mediante mecanismos que contribuyen en mantener la viabilidad celular: como la captación directa de radicales libres, quelación de metales de transición y la modulación de los sistemas antioxidantes endógenos –sistema GSH/GPx (Glutación reducido/Glutación peroxidasa)-responsables de la eliminación de peróxidos lipídicos (Boots *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019).

En cuanto a los extractos de *Diospyros nigra*, se observaron diferencias importantes en la capacidad antioxidante dependiendo de la matriz vegetal evaluada. El tratamiento de pulpa 14P [200 µg/mL] mostró una reducción significativa de MDA (1.862 ± 0.29 µM) respecto al grupo tratado con H₂O₂, alcanzando valores cercanos a los observados con la quercetina. Dicho efecto puede atribuirse al elevado contenido de compuestos fenólicos previamente cuantificados en esta fracción, los cuales se han relacionado fuertemente con la inhibición de la peroxidación lipídica en modelos celulares (Shahidi y Ambigaipalan, 2015; Cory *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque tuvo una respuesta notable, no logró atenuar el MDA producido a condiciones basales, lo que sugiere una capacidad antioxidante moderada en comparación con otros extractos evaluados.

Por otro lado, los extractos procedentes de cáscara presentaron un comportamiento dependiente de las condiciones de maceración implicadas. Mientras el tratamiento 6C presentó un efecto muy limitado en la reducción de MDA (3.560 ± 0.66 µM) con diferencias significativas respecto al control y al resto de grupos, el 14C mostró una mejora antioxidante significativa (2.428 ± 0.29 µM de MDA) con similitudes estadísticas entre todos los tratamientos, excepto con el tratado con H₂O₂. El tratamiento 15C destacó por su potente actividad antioxidante (1.358 ± 0.19 µM de MDA) con valores comparables al control y ligeramente inferiores a la quercetina. Lo cual podría explicarse por las variaciones en la composición fitoquímica entre extractos, puesto que diversos estudios han demostrado que tanto la concentración como estructura química de los polifenoles -grado de hidroxilación o polimerización- influyen en su capacidad antioxidante final (Heim *et al.*, 2002; Panche *et al.*, 2016).

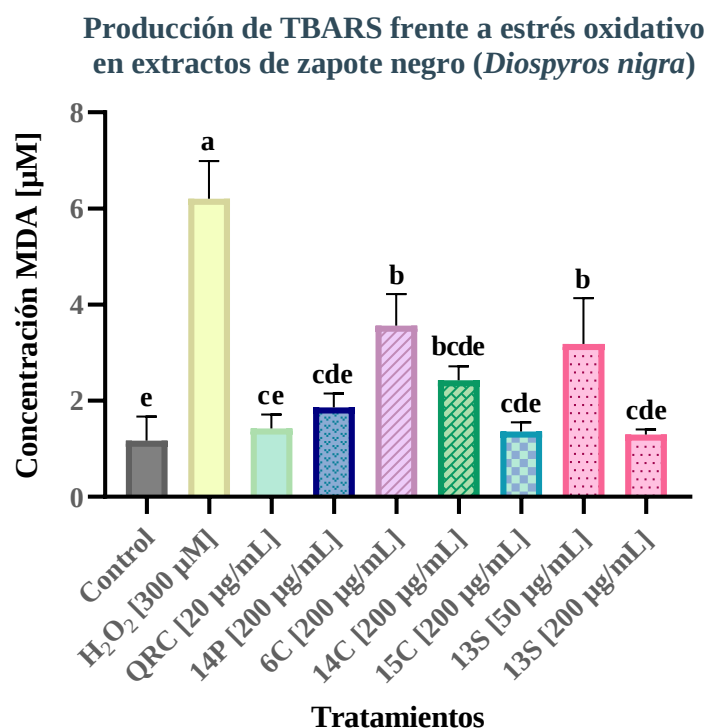


Figura 24. Gráfica concentración de MDA (µM) tras inducción de estrés oxidativo utilizando diversos extractos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro.

El extracto de semilla 13S [200 µg/mL] exhibió el efecto antioxidante más sobresaliente, restaurando los niveles de MDA a valores prácticamente basales e incluso mejores a los del estándar de quercetina (1.296 ± 0.11 µM de MDA). A pesar de que esta fracción presentó el menor contenido de compuestos fenólicos en comparación con la pulpa, su elevada inhibición de la peroxidación podría estar relacionada con la presencia de compuestos de alta reactividad como taninos condensados, quinonas o metabolitos de bajo peso molecular que aporten la actividad antioxidante mencionada (Fraga *et al.*, 2019).

Dada la relevancia biológica del tratamiento 13S, se optó por utilizar una dosis más baja, con el fin de compararlo directamente con la quercetina como flavonoide puro; sin embargo, se obtuvo una pérdida parcial de la actividad antioxidante, en donde los niveles de MDA aumentaron considerablemente hasta un valor de 3.182 ± 0.95 µM a 50 µg/mL, con diferencias significativas respecto al control y al estándar.

9.6.5. Evaluación del efecto de los extractos de *Diospyros nigra* sobre los niveles de GSH

La determinación de glutatión reducido (GSH) permitió evaluar la respuesta del sistema antioxidante no enzimático en células 3T3-L1 sometidas a estrés oxidativo, proporcionando información adicional a la peroxidación lipídica determinada anteriormente mediante TBARS (Figura 25).

Bajo las mismas condiciones experimentales establecidas, el tratamiento con H₂O₂ [300 µM] indujo una disminución significativa en los niveles intracelulares de GSH, con 8.96 ± 0.23 µM respecto al grupo control (20.92 ± 0.43 µM a niveles basales), evidenciando la oxidación de GSH a GSSG y su consumo acelerado, como parte de los mecanismos frente a especies reactivas de oxígeno (EROs). De acuerdo con Forman *et al.* (2009) y Sies (2015), el GSH actúa como uno de los principales sistemas de defensa redox, al intervenir como captador directo de radicales libres y como cofactor en reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa (GPx), particularmente en la detoxificación de peróxidos lipídicos.

En contraste, la quercetina como estándar antioxidante [20 µg/mL] mostró una capacidad significativa para restaurar los niveles de GSH (17.66 ± 0.34 µM), acercándolos a condiciones basales del control, lo que no sólo refleja su capacidad como captador de radicales libres, sino también su papel modulador del sistema antioxidante celular. Estudios recientes demostraron que la QRC puede incrementar los niveles intracelulares de GSH, al inducir la expresión de enzimas relacionadas con su síntesis y regeneración - como la γ -glutamilcisteína sintetasa-, mediante la activación de las vías Nrf2 y MAPK, favoreciendo la recuperación celular bajo estrés oxidativo (Boots *et al.*, 2008; Kobori *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2019).

Entre los extractos de *Diospyros nigra*, se observaron grandes diferencias en su actividad antioxidante para modular los niveles intracelulares de GSH. El tratamiento de pulpa 14P [200 µg/mL] mostró un efecto moderado, incrementando significativamente las reservas respecto al grupo tratado con H₂O₂, aunque sin lograr una recuperación cercana al nivel basal (13.48 ± 0.68 µM de GSH). Este resultado, aunque podría parecer contradictorio dado el mayor contenido de compuestos fenólicos, sugiere que la capacidad de inducir la síntesis o regeneración de GSH no se determina únicamente por la concentración total de estos compuestos, sino por otros factores como su biodisponibilidad, estructura química y las posibles interacciones dentro de la matriz del extracto (Cory *et al.*, 2018).

Los extractos de cáscara evidenciaron un comportamiento diferencial. El tratamiento 6C presentó una recuperación limitada de GSH (13.26 ± 2.38 µM), con diferencias respecto al control y resto de grupos; mientras que los extractos 14C y 15C mostraron una restauración significativamente mayor, con 16.67 ± 0.62 y 15.96 ± 0.33 µM de GSH respectivamente, alcanzando valores comparables a los observados con

quercetina. Dicho efecto señala que ciertos compuestos presentes en la cáscara podrían estar actuando como moduladores más eficientes del sistema glutatión, lo que sugiere una mayor eficiencia en la síntesis y/o regeneración de GSH, así como una posible reducción del estrés oxidativo celular. Para Kasai *et al.* (2020) y Buranasudja *et al.* (2022), algunos polifenoles pueden inducir la expresión de genes antioxidantes a través de la vía Nrf2/ARE, favoreciendo la síntesis de GSH y la restauración del equilibrio redox celular tras la activación de enzimas como catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

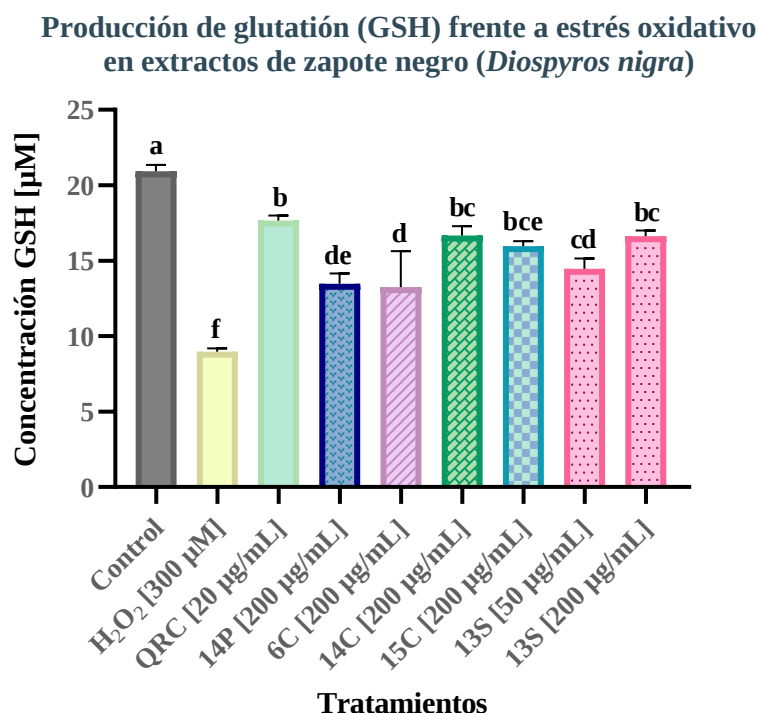


Figura 25. Gráfica concentración de GSH (µM) tras inducción de estrés oxidativo utilizando diversos extractos de pulpa, cáscara y semilla del zapote negro.

El extracto de semilla 13S [200 µg/mL] exhibió una elevada capacidad para recuperar los niveles de GSH (16.62 ± 0.38 µM), obteniendo valores similares a los de los tratamientos más efectivos y cercanos al estándar de quercetina. De la misma forma que con el ensayo TBARS, esta fracción mostró una alta actividad antioxidante pese a presentar un menor contenido de compuestos fenólicos totales, lo que propone la existencia de compuestos bioactivos capaces de modular directamente el sistema glutatión o reducir el estrés oxidativo celular de manera más efectiva. Según Sies (2017) y Forman y Zhang (2021), ciertos compuestos pueden ejercer efectos antioxidantes significativos mediante mecanismos indirectos como la regulación de rutas celulares, más que por su captura directa de radicales.

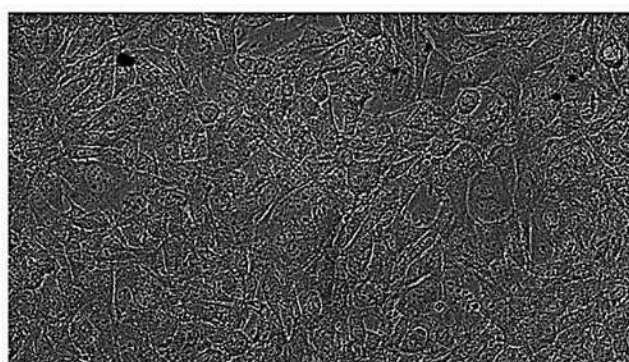
Un hallazgo importante en el tratamiento 13S fue que, al reducir su concentración hasta 50 µg/mL, se conservó una capacidad intermedia para restaurar los niveles de GSH (14.47 ± 0.67 µM de GSH) similar a la observada en 6C y 14P [200 µg/mL] aunque inferior a su dosis máxima original; lo que apunta a un efecto dependiente de la dosis en la regulación del sistema antioxidante, donde concentraciones más altas favorecen una activación mayor de los mecanismos celulares de defensa.

9.6.6. Efecto citoprotector de los extractos de *Diospyros nigra* sobre la morfología celular

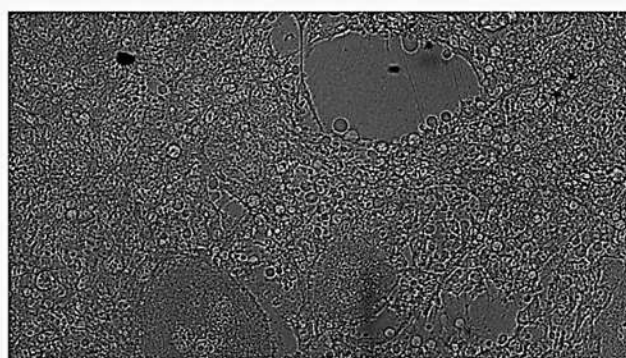
El análisis morfológico de los cultivos de fibroblastos murinos 3T3-L1 permitió corroborar de forma cualitativa el impacto de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 sobre la viabilidad celular, además del efecto protector de los extractos de *Diospyros nigra* mediante microscopía (Figura 26).

En condiciones basales, el grupo control presentó una monocapa celular uniforme y continua, la cual se caracterizó por células con morfología fusiforme, alargada y firmemente adherida al sustrato, que es típico de fibroblastos en condiciones fisiológicas. Por otro lado, la exposición a H_2O_2 [300 μ M] provocó importantes alteraciones estructurales respecto a su morfología original, con un redondeamiento celular, pérdida de la adhesión y la aparición de cuerpos apoptóticos, acompañado de espacios vacíos producto de la disrupción de su monocapa. Dichos cambios han sido reportados en modelos de estrés oxidativo en fibroblastos, donde la sobreproducción de EROs induce daño en componentes estructurales, favoreciendo la desorganización y activación de procesos apoptóticos (Giampieri *et al.*, 2014; Sies *et al.*, 2017).

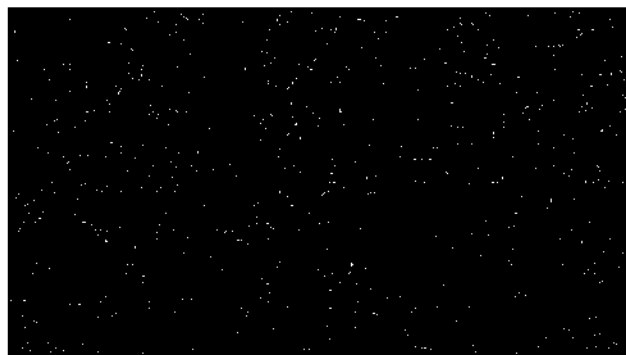
La conservación de la morfología celular que se observó en los tratamientos con extractos vegetales y quercetina muestra un efecto citoprotector frente al daño oxidativo. En particular, el grupo tratado con QRC [20 μ g/mL] presentó una arquitectura tisular comparable al control, que coincide con su capacidad antioxidante ampliamente documentada, por medio de la neutralización directa de EROs como a la modulación enzimática y activación de mecanismos de defensa. Tanigawa *et al.* (2014) describen dicho comportamiento en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo, donde compuestos como la quercetina previenen la pérdida de la integridad estructural y reducen la apoptosis inducida por H_2O_2 .



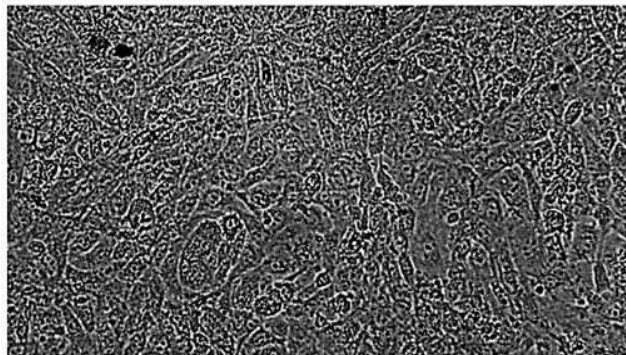
Control



H2O2 [300 μ M]



Quercetina [20 μ g/mL]



14P [200 μ g/mL]

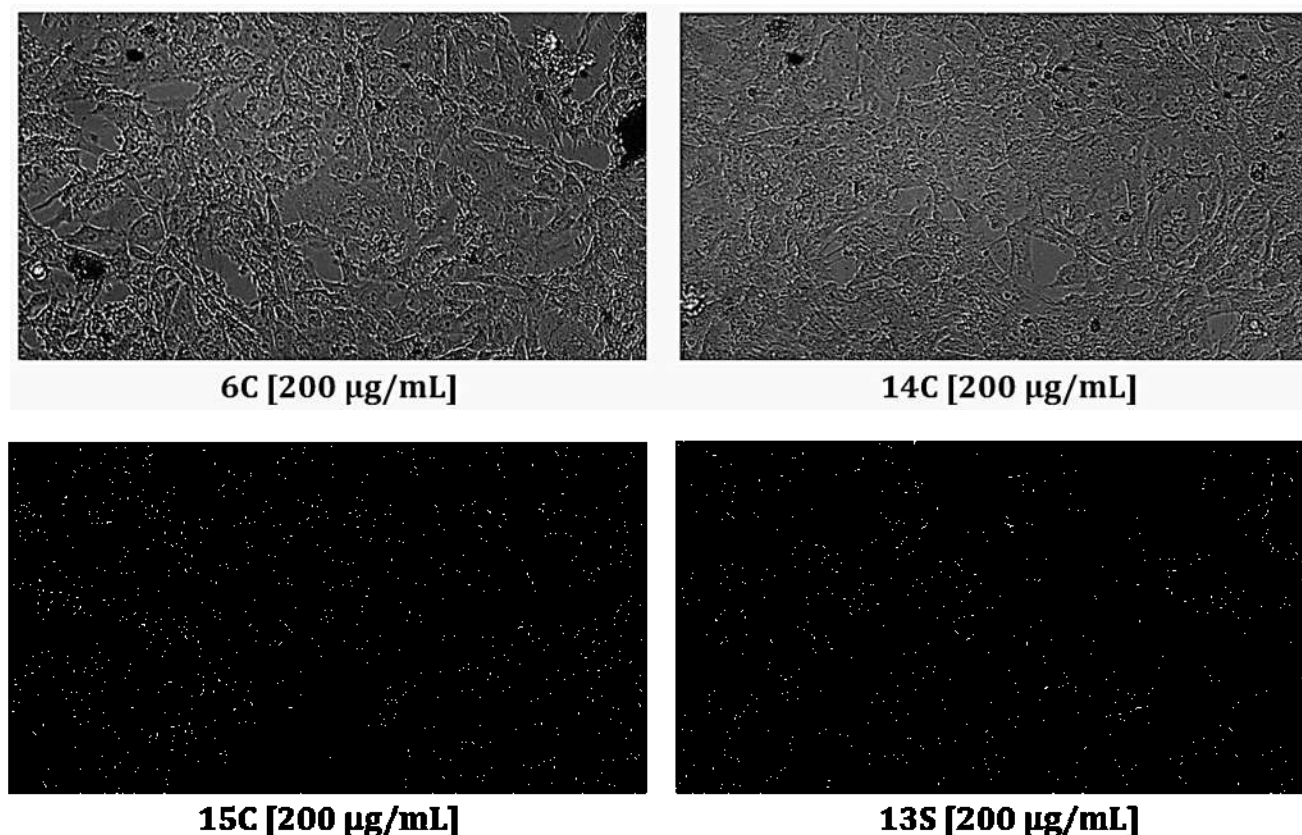


Figura 26. Efecto protector de los extractos evaluados sobre la morfología celular 3T3-L1.

Entre los extractos de *Diospyros nigra*, los tratamientos 14P (pulpa), 15C (cáscara) y 13S (semilla) mostraron una clara preservación de la morfología celular, manteniendo la organización en monocapa y su forma fusiforme característica. Una respuesta congruente con los resultados obtenidos en los ensayos bioquímicos (TBARS y GSH), donde estos mismos tratamientos mostraron una reducción significativa en la peroxidación lipídica y mayor recuperación de los niveles intracelulares de glutatión, lo que sugiere que la protección celular observada a nivel morfológico está directamente relacionada con la reducción del daño oxidativo a nivel de membranas y la mejora en sus sistemas antioxidantes endógenos. Por ende, extractos ricos en polifenoles y otros metabolitos bioactivos no sólo actúan como antioxidantes directos, sino que son claves en la protección del citoesqueleto y en mantener la adhesión, continuidad y viabilidad celulares *in vitro* (Giampieri *et al.*, 2014; Cory *et al.*, 2018; Forman y Zhang, 2021).

Por otro lado, los tratamientos 6C y 14C mostraron una menor capacidad protectora, que se observa por la presencia de espacios intercelulares, pérdida parcial de la monocapa y alteraciones morfológicas, lo que coincide con su menor eficacia en los ensayos TBARS como en GSH, y con ello, menor capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo. Esta relación refuerza la idea que, la integridad morfológica y la viabilidad del sistema son un reflejo directo del estado redox intracelular, donde un mayor daño oxidativo trae como consecuencia alteraciones estructurales más pronunciadas (Merecz-Sadowska *et al.* 2021).

X. CONCLUSIONES

El estudio de los extractos de pulpa, cáscara y semilla de *Diospyros nigra* evidenció que estos poseen una actividad antioxidante relevante y ejercen un efecto citoprotector sobre la línea celular 3T3-L1 bajo condiciones de estrés oxidativo. En conjunto, los resultados confirman que los distintos tejidos del fruto constituyen una fuente abundante de compuestos bioactivos con potencial biológico significativo.

Se observó que las condiciones de extracción influyen de manera determinante en la composición química y en la actividad biológica de los extractos. Donde aquellos obtenidos con mayor proporción de agua presentaron un mayor contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico, lo que se asoció con una menor citotoxicidad y una mayor viabilidad celular. Asimismo, se identificó que tiempos de extracción más prolongados favorecieron la degradación térmica u oxidativa del ácido ascórbico, lo que impactó negativamente en la capacidad antioxidante de los tratamientos.

En términos de actividad biológica, se estableció una relación directa entre el contenido de compuestos antioxidantes y el efecto protector celular. Los flavonoides, y en menor medida el ácido ascórbico, desempeñan un papel clave tanto en la viabilidad celular como en la respuesta frente al estrés oxidativo. De manera consistente, los extractos mostraron un efecto protector dependiente de la concentración, reduciendo significativamente el daño inducido.

A nivel funcional, los extractos disminuyeron la peroxidación lipídica y fortalecieron los sistemas antioxidantes endógenos, demostrado por la reducción de productos de oxidación lipídica y el incremento en los niveles de glutatión reducido. Estos efectos confirman un mecanismo de acción integral basado tanto en la neutralización de especies reactivas como en la potenciación de las defensas celulares.

Por último, el extracto obtenido de semilla destacó por presentar el mayor efecto antioxidante y citoprotector, mostrando una elevada capacidad para mitigar el daño oxidativo, preservar la integridad celular y mantener una morfología comparable a la observada con el estándar antioxidante. Este hallazgo posiciona a la semilla como la fracción con mayor potencial para el aprovechamiento biotecnológico y farmacológico dentro del fruto.

XI. REFERENCIAS

- Adu, O. T., Naidoo, Y., Lin, J., Adu, T. S., Sivaram, V., Dewir, Y. H. y El-Banna, A. N. (2022). Phytochemical Screening and Biological Activities of *Diospyros villosa* (L.) De Winter Leaf and Stem-Bark Extracts. *Horticulturae*, 8, 945. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100945>
- Alikhani, M., MacLellan, C. M., Raptis, M., Vora, S., Trackman, P. C. y Graves, D. T. (2007). Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(2), C850-C856. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00356.2006>
- Alnuqaydan A. M. (2020). *Tamarix articulata* Extracts Exhibit Antioxidant Activity and Offer Protection against Hydrogen Peroxide-Mediated Toxicity to Human Skin Fibroblasts. *Journal of Toxicology*, 8896263. <https://doi.org/10.1155/2020/8896263>

- Alós, E., Rodrigo, M. J. y Zacarias, L. (2019). Ripening and Senescence. En *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 131–155). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00007-5>
- Arana, K. M. y Cevallos, A. A. (2016). Análisis de la *Diospyros digyna* (Zapote negro) como materia prima en la elaboración de un producto en el área de la repostería [tesis de licenciatura, Universidad de Guayaquil]. Repositorio Institucional UN. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/12379>
- Arcos, P. y Bustamante, S. (s.f.). *Mexico's Geopolitics Timeline*. Sutori. <https://www.sutori.com/es/historia/mexico-s-geopolitics-timeline--uzZFHCk5hqJjQRwRc5uFtnWg>
- Artanti, A. N., Prihapsara, F., Rahman, F. A., Syaifudin, M., Muchtaridi, M., Septisetyani, E. P., Meiyanto, E. y Astirin, O. P. (2025). Cytoprotective effect and antioxidant activities of hesperidin against cisplatin-induced fibroblast cell. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 16(2), 86–91. https://doi.org/10.4103/JAPTR.JAPTR_298_24
- Ayala, A., Muñoz, M. F. y Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... y Omar, A. K. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., Price, P., Reid, Y. A. y Simione, F. (2017). Best practices in cell culture: an overview. *cellular & developmental biology. Animal*, 53(8), 669–672. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R. y Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Borges-Argáez, I., Vera-Ku, M., Juárez-Méndez, M. T., Chan-Zapata, I. y Carrillo-Sánchez, L. E. (2021). El K' aakalché (*Diospyros anisandra*), una especie con alto valor farmacéutico. *Desde El Herbario CICY*, 13, 152–155. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/2021
- Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M. y Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2–3), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>
- Boumaza, S., Belkebir, A., Neggazi, S., Sahraoui, H., Berdja, S., Smail, L., Benazzoug, Y., Kacimi, G. y Aouichat Bouguerra, S. (2018). Therapeutic Role of Resveratrol and Quercetin on Aortic Fibroblasts of *Psammomys obesus* After Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide. *American Journal of Therapeutics*, 25(3), e299–e313. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000392>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Buranasudja, V., Muangnoi, C., Sanookpan, K., Halim, H., Sritularak, B. y Rojsitthisak, P. (2022). Eriodictyol Attenuates H₂O₂-Induced Oxidative Damage in Human Dermal Fibroblasts through Enhanced Capacity of Antioxidant Machinery. *Nutrients*, 14(12), 2553. <https://doi.org/10.3390/nu14122553>
- Butt, M. S., Sultan, M. T., Aziz, M., Naz, A., Ahmed, W., Kumar, N. y Imran, M. (2015). Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI Journal*, 14, 542–561. <https://doi.org/10.17179/excli2015-159>
- Cacace, J. E. y Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68(1), 240-248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x>
- Cendrowski, A., Studnicki, M. y Kalisz, S. (2024). Impact of Different Solvents and Temperatures on the Extraction of Bioactive Compounds from Rose Fruits (*Rosa rugosa*) Pomace. *Applied Sciences*, 14(2), 691. <https://doi.org/10.3390/app14020691>
- Charoensin, S. y Weera, W. (2022). Preventive Effect of Nuciferine on H₂O₂-Induced Fibroblast Senescence and Pro-Inflammatory Cytokine Gene Expression. *Molecules*, 27(23), 8148. <https://doi.org/10.3390/molecules27238148>
- Circu, M. L. y Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M. y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-212. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M., Carrillo-Lopez, A. y González-Aguilar, G. (2008). Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498–10504. <https://doi.org/10.1021/jf801983r>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M. y Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Crane, J. H. y Balerdi, C. F. (2025). Black Sapote Growing in the Florida Home Landscape. *UF/IFAS Extension*, University of Florida. <https://doi.org/10.32473/EDIS-HS1511-2025>
- Curis, A. (2014). *La cocina prehispánica mexicana*. X Congreso Internacional de Promoción al Consumo de Frutas y Verduras. Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria. Sante Fe, Argentina. <https://www.assal.gov.ar/congreso/2014/disertaciones/Curis-Cocina-Prehispanica.pdf>
- Dai, J. y Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- De Oliveira, M. R., Nabavi, S. M., Braid, N., Setzer, W. N., Ahmed, T. y Nabavi, S. F. (2016). Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotechnology advances*, 34(5), 532–549. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.014>
- Del Juncal, D. (2016). Microencapsulación de polifenoles contenidos en jugo de Zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) utilizando almidones modificados de arroz mediante secado por aspersión para su

incorporación en un yogur natural [tesis de maestría, Universidad Veracruzana]. Repositorio Institucional UN. <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/42615>

- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K. y Liu, R. H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Díaz-Corona, L. R., Macías-Rodríguez, M. E., Arellano-Pérez, L. M., Romero-Yerena, A., Martínez-Preciado, A. H. y Reyes-Becerril, M. (2023). Immunostimulant effects of diet supplementation with yellow (*Pouteria campechiana*), white (*Casimiroa edulis*), and black (*Diospyros digyna*) sapote nanocapsules on laying hens: *in vitro* and *in vivo* study. *Tropical Animal Health and Production*, 55(6), 360. <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03778-y>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. y Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Dorantes-Salazar, E. L., Báez-González, J. G., Gastelúm-Martínez, É., Morales-Landa, J. L. y García-Marquez, E. (2023). Determinación de actividad antioxidante en alimentos funcionales. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8, 643-649. <https://idcyta.uanl.mx/index.php/i/article/download/84/79>
- Dulyanska, Y., Cruz-Lopes, L. P., Esteves, B., Ferreira, J. V., Domingos, I., Lima, M. J., Correia, P. M. R., Ferreira, M., Fragata, A., Barroca, M. J., Moreira da Silva, A. y Guiné, R. P. F. (2022). Extraction of Phenolic Compounds from Cherry Seeds: A Preliminary Study. *Agronomy*, 12(5), 1227. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051227>
- Ebrahimi, A., Parivar, K., Roodbari, N. H. y Eidi, A. (2023). Treatment with quercetin increases Nrf2 expression and neuronal differentiation of sub ventricular zone derived neural progenitor stem cells in adult rats. *Molecular Biology Reports*, 50(10), 8163–8175. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08707-8>
- ElGamal, R., Song, C., Rayan, A. M., Liu, C., Al-Rejaie, S. y ElMasry, G. (2023). Thermal Degradation of Bioactive Compounds during Drying Process of Horticultural and Agronomic Products: A Comprehensive Overview. *Agronomy*, 13(6), 1580. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>
- El-Maarouf-Bouteau, H. (2022). The Seed and the Metabolism Regulation. *Biology*, 11(2), 168. <https://doi.org/10.3390/biology11020168>
- Essodolom, P., Chantal, B. E., Mamatchi, M. y Kous'anta, A. (2020). Effect of temperature on the degradation of ascorbic acid (vitamin c) contained in infant supplement flours during the preparation of porridges. *International Journal of Advanced Research (IJAR)*, 8(3), 116-121. <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/10605>
- Fenech, M., Amaya, I., Valpuesta, V. y Botella, M. A. (2019). Vitamin C Content in Fruits: Biosynthesis and Regulation. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.02006>
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M. y García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 110-122.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200002&lng=es&tlng=es

- Fidelis, M., de Moura, C., Kabbas Junior, T., Pap, N., Mattila, P., Mäkinen, S., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Tian, Y., Yang, B. y Granato, D. (2019). Fruit Seeds as Sources of Bioactive Compounds: Sustainable Production of High Value-Added Ingredients from By-Products within Circular Economy. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(21), 3854. <https://doi.org/10.3390/molecules24213854>
- Forman, H. J., Zhang, H. y Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- Forman, H. J. y Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature reviews Drug Discovery*, 20(9), 689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O. y Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, 10(2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/C8FO01997E>
- Galano, A. (2017). Estrés oxidativo, radicales libres, antioxidantes y... ¿Química Computacional? *Boletín de la Sociedad Química de México*, 11(3), 21–26. Recuperado de http://bsqm.org.mx/pdf-boletines/V11/V11N3/BSMQ_11_3_kEstresOxidativo.pdf
- García-Triana, B. E., Saldaña-Bernabeu, A. y Saldaña-García, L. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 12(2), 187–196. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2013000200005&lng=es&tlng=en
- Gautam, A., Dhiman, A. K., Attri, S. y Kathuria, D. (2020). Nutritional and functional characteristics of ripe persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 3364–3367. <https://doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i4ah.12138>
- Giamperri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., González-Paramàs, A. M., Santos-Buelga, C., Quiles, J. L., Bompadre, S., Mezzetti, B. y Battino, M. (2014). Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. *Molecules* (Basel, Switzerland), 19(6), 7798–7816. <https://doi.org/10.3390/molecules19067798>
- Giusti, M. M. y Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. En R. E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons: New York, 1–13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Gnagne, A. A. G. B., Soro, D., Gnoumou, K. J. I., Yao, N. J. C. y Koffi, K. E. (2022). Optimization of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts of cashew apple bagasse by mean of experimental design. *African Journal of Food Science*, 16(6), 137–150. <https://doi.org/10.5897/AJFS2022.2177>
- González-Jiménez, F. E., Hernández-Espinosa, N., Cooper-Bribiesca, B. L., Núñez-Bretón, L. C. y Reyes-Reyes, M. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Vertientes. Revista Especializada En Ciencias De La Salud*, 18(1). <https://revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/51730>

- Guija-Guerra, H. y Guija-Poma, E. (2023). Radicales libres y sistema antioxidante. *Horiz Med (Lima)*, 23(2): e2158. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2023.v23n2.12>
- Gutiérrez-Salinas, J., Mondragón-Terán, P., García-Ortiz, L., Hernández-Rodríguez, S., Ramírez-García, S., Núñez-Ramos, N. R. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Med Quir*, 19(4), 446-454. <https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2014/rmq144h.pdf>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., y Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Huet, C. (2017). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas [tesis de licenciatura, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio Institucional UN. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/20675>
- Illescas-Montes, R., Rueda-Fernández, M., González-Acedo, A., Melguizo-Rodríguez, L., García-Recio, E., Ramos-Torrecillas, J. y García-Martínez, O. (2024). Effect of Punicalagin and Ellagic Acid on human fibroblasts *in Vitro*: a preliminary evaluation of their therapeutic potential. *Nutrients*, 16(1), 23. <https://doi.org/10.3390/nu16010023>
- Ilouno, L. E., Omaji, G. O. y Anthony, E. O. (2018). Proximate, Mineral and Anti-Nutritional Composition of Jackal Berry (*Diospyros mespiliformis*) Seeds. *FUDMA Journal of Sciences*, 2(1), 75-79. <https://fjs.fudutsinma.edu.ng/index.php/fjs/article/view/1264>
- Instituto de Derecho Ambiental de la República Dominicana (IDARD). (s.f.). *Zapote negro*. Maroteo: Vivero frutal. <https://idard.org.do/catalogo/zapote-negro/>
- Jaime, M. J. (2021). Revisión bibliográfica sobre nuevas técnicas de obtención de extractos a partir de sustratos vegetales [tesis de licenciatura, Universidad de Extremadura]. Repositorio Institucional UN. <https://dehesa.unex.es/handle/10662/13171>
- Jain, A. (2023). Seed Storage Protein, Functional Diversity and Association with Allergy. *Allergies*, 3(1), 25-38. <https://doi.org/10.3390/allergies3010003>
- Jiménez, O. (2023). Secado por aspersión como método de conservación y estabilización de pigmentos extraídos de frutos y plantas con alto potencial antioxidante [tesis de doctorado, Universidad de las Américas Puebla]. Repositorio Institucional UN. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/dcl/jimenez_gonzalez_o/
- Jiménez-González, O. y Guerrero-Beltrán, J. A. (2021). *Diospyros digyna* (black sapote), an Undervalued Fruit: A Review. *ACS Food Science & Technology*, 1(1), 3-11. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00103>
- Kanthavelkumaran, N., Kumar, S. M., Iyyappan, S., Prasad, N. N. y Raja, S. (2024). Utilizing *Manilkara zapota* seed oil for biodiesel production and conducting an investigation into its properties and characteristics. *Global Nest Journal*, 26(2). <https://doi.org/10.30955/gnj.005387>
- Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., Mimura, J. y Itoh, K. (2020). Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*, 10(2), 320. <https://doi.org/10.3390/biom10020320>

- Kobori, M., Takahashi, Y., Akimoto, Y., Sakurai, M., Matsunaga, I., Nishimuro, H., Ippoushi, K., Oike, H. y Ohnishi-Kameyama, M. (2015). Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice. *Journal of Functional Foods*, 15, 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.006>
- Konica Minolta (s.f.). Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B*. Konica Minolta Sensing Americas, Inc. <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- Lazcano-Hernández, M., Dávila-Márquez, R. M., Navarro-Cruz, A. R., Maciel-Rodriguez, M. y Acevez-Cruz, I. (2011). Desarrollo de un producto a base de zapote negro (*Diospyros digyna*) jugo de naranja (*Citrus aurantium*). *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 6(5), 40–45. <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/1115>
- Lee, S. C., Prosky, L. y De Vries, J. W. (1992). Determination of Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods —Enzymatic— Gravimetric Method, MES-TRIS Buffer: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 75(3), 395-416. <https://doi.org/10.1093/jaoac/75.3.395>
- Li, F., Liu, J., Tang, S., Yan, J., Chen, H., Li, D. y Yan, X. (2021). Quercetin regulates inflammation, oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial structure and function in H9C2 cells by promoting PVT1 expression. *Acta histochemica*, 123(8), 151819. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151819>
- Li, Y., Han, N., Hou, P., Zhao, F.-Q. y Liu, H. (2024). Roles of MAPK and Nrf2 signaling pathways in quercetin alleviating redox imbalance induced by hydrogen peroxide in mammary epithelial cells. *Animal Nutriomics*, 1, e1. <https://doi.org/10.1017/anr.2024.2>
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M., Wang, S., Liu, H. y Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
- Llacuna, L. y Mach, N. (2012). Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 16(1), 16-24. [https://doi.org/10.1016/S2173-1292\(12\)70067-4](https://doi.org/10.1016/S2173-1292(12)70067-4)
- López, A., Fernando, C., Lazarova, Z., Bañuelos, R. y Sánchez, S. H. (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM* (Impresa), 6(1), 48-53. <https://www.researchgate.net/publication/264233113>
- López, D. A. (2016) Bioaccesibilidad, cambios en potencial antioxidante y estabilidad de los compuestos bioactivos presentes en dos extractos ricos en fibra sometidos a un proceso de digestión *in vitro* [tesis de licenciatura, Universidad Miguel Hernández de Elche]. Repositorio Institucional UN. <http://hdl.handle.net/11000/3472>
- López, L. X., y González, G. A. (2024). *El zapote negro: las otras frutas tropicales de México*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). <https://www.ciad.mx/el-zapote-negro-las-otras-frutas-tropicales-de-mexico/>
- Ma, X., Wu, H., Xu, W., Wang, S., Yao, Q. y Zhou, Y. (2017). Antioxidant capacity, polyphenol, vitamin C and minerals in mango pulp and peel. *Acta Horticulturae*, 1183, 23–28. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2017.1183.4>
- Mannino, G., Serio, G., Berteà, C. M., Chiarelli, R., Lauria, A. y Gentile, C. (2022). Phytochemical profile and antioxidant properties of the edible and non-edible portions of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). *Food Chemistry*, 380, 132137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132137>

- Mariaca, C. J., Zapata, M. y Uribe, P. (2016). Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 24(3), 162-173. <https://doi.org/10.29176/2590843X.292>
- Marimoutou, M., Le Sage, F., Smadja, J., Lefebvre d'Hellencourt, C., Gonthier, M.-P. y Robert-Da Silva, C. (2015). Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes. *Journal of Inflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0055-6>
- Matos, L. N. (2019). Caracterización molecular de genotipos criollos de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) cultivados en Yucatán [tesis de maestría, Tecnológico Nacional de México]. Repositorio Institucional UN. https://conkal.tecnm.mx/images/POSGRADO_NEW/GEN_2017-2019/Laura%20Nataly%20Matos%20D%C3%ADaz.pdf
- Mejía-Reyes, J. D., García-Cabrera, K. E., Velázquez-Ovalle, G. y Vázquez-Ovando, A. (2021). Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9 (1), 9-33. <https://doi.org/10.23850/24220582.4023>
- Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Kucharska, E., Kowalczyk, T., Zajdel, K., Cegliński, T. y Zajdel, R. (2021). Antioxidant Properties of Plant-Derived Phenolic Compounds and Their Effect on Skin Fibroblast Cells. *Antioxidants*, 10(5), 726. <https://doi.org/10.3390/antiox10050726>
- Merentes, E. (2016). Manual de Técnicas Básicas del Cultivo Celular. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/17792/1/libro%20profesora%20%20merentes.pdf>
- Merino, L. (2011). Evaluación de propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) [tesis de maestría, Universidad Veracruzana]. Repositorio Institucional UN. <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46806>
- Merino-Sánchez, L., Romero-Luna, H. E., García-Barradas, O., Mendoza-López, M. R. y Jiménez-Fernández, M. (2022). Physicochemical and antioxidant changes of black sapote (*Diospyros digyna*, Ebenaceae) during on-tree fruit development. *Acta Botánica Mexicana*, (129), e2032. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2032>
- Mex-Álvarez, R. M. J., Guillen-Morales, M. M., Garma-Quen, P. M., Yanez-Nava, D., Kantún-Haas, J. L., Chan-Martínez, R. E., Contreras-Dzul, K. A. y Chulin-Canul, E. R. (2023). Modelos para evaluar la actividad antioxidante en plantas. *Alimentos e nutrição: Promoção da saúde e equipe multiprofissional* 2, 15, 155-160. doi:10.22533/at.ed.319231108
- Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas, M. de L. V. y, Betancur-Ancona, D. y Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.013>
- Mora- Agüero, S. Á., Zeledón- Aguilera, A. S. y Vargas- Rubio, T. (2019). Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. *Revista Médica Sinergia*, 4(5), 89-100. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i5.211>
- Morales-Sánchez, J., Ulloa-Fernández, A., Castro-Piedra, S., Centeno-Cerdas, C. y Calvo-Castro, L. A. (2019). Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. *Tecnología en Marcha*.

- Especial 2019. 25° Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología, 32, 56-65. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628>
- Morton, J. F. (1987). Black Sapote (*Diospyros digyna* Jacq). In *Fruits of warm climates* (pp. 416–418).
- Moscoso, M. V. (2017). Tecnología de IV Gamma para optimizar la calidad microbiológica del rábano (*Raphanus sativus*) cultivado en la parroquia de Panzaleo [tesis de licenciatura, Universidad Regional Autónoma de los Andes]. Repositorio Institucional UN. <http://dspace.uniandes.edu.ec/handle/123456789/6013>
- Murillo, E. G. (2022). Elaboración de un queso fortificado con harinas de berries con propiedades de alimento funcional [tesis de licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio Institucional UN.
- Mutalib, M. A., Rahmat, A., Khan, M. S., Zaman, A., Malik, M. I., Muhammad, K., Khan, S. R., Malik, S. N. y Rustam, S. A. (2024). Protective Effects of *Cyphomandra betacea* Extract Against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Stress in 3T3 Cells and Synergistic Anticancer Properties in HepG2 and MDA-MB-231 Cell Lines: Anticancer Properties of *Cyphomandra betacea*. *Biological Sciences-PJSIR*, 67(2), 167-173. <https://v2.pjsir.org/index.php/biological-sciences/article/view/3072>
- Naranjo, J. I. (2016). Evaluación de dos métodos para la obtención de extractos con actividad antioxidante a partir de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) con aplicación en productos mínimamente procesados [tesis de licenciatura, Universidad de La Salle]. Repositorio Institucional UN. https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/58/
- Navarrete, C. N. (2019). Caracterización morfológica, bromatológica y fitoquímica de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) [tesis de maestría, Tecnológico Nacional de México]. Repositorio Institucional UN. https://conkal.tecnm.mx/images/POSGRADO_NEW/GEN_2017-2019/Cindy%20Neftaly%20Navarrete%20Zapata.pdf
- Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Omena, C. M. B., Valentim, I. B., Guedes, G. da S., Rabelo, L. A., Mano, C. M., Bechara, E. J. H., Sawaya, A. C. H. F., Trevisan, M. T. S., da Costa, J. G., Ferreira, R. C. S., Sant’Ana, A. E. G. y Goulart, M. O. F. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International*, 49(1), 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.010>
- Paciolla, C., Fortunato, S., Dipierro, N., Paradiso, A., De Leonardis, S., Mastropasqua, L. y de Pinto, M. C. (2019). Vitamin C in Plants: From Functions to Biofortification. *Antioxidants*, 8(11), 519. <https://doi.org/10.3390/antiox8110519>
- Palacios-Pérez, F. y Luna-Suárez, S. (2023). Estudio de la composición química de semillas de zapote negro. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 708–713. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.92>
- Panche, A. N., Diwan, A. D. y Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Park, C., So, H. S., Shin, C. H., Baek, S. H., Moon, B. S., Shin, S. H., Lee, H. S., Lee, D. W. y Park, R. (2003). Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial

- dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells. *Biochemical Pharmacology*, 66(7), 1287–1295. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00478-7](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00478-7)
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C. y Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A. y Mitry, R. R. (2012). Introduction to cell culture. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 806, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_1
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J. y Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, 184(15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Pramanik, F., Satari, M. y Azhari, A. (2023). Cytotoxic Activity of Gambier Leave (*Uncaria gambir*) Ethyl Acetate Extract on Mouse Embryonic Fibroblast Cell (NIH-3T3) using MTT Assay. *Open Dentistry Journal*, 17: e187421062212300. <http://dx.doi.org/10.2174/18742106-v17-e230109-2022-78>
- Purkrtova, Z., Jolivet, P., Miquel, M. y Chardot, T. (2008). Structure and function of seed lipid body-associated proteins. *C. R. Biologies*, 331(10), 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.016>
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es&tlng=es
- Qurat-ul-Ain, Muhammad, M. T., Khan, K. M. y Choudhary, M. I. (2023). Estimation of *In-Vitro* Free Radical Scavenging and Cytotoxic Activities of Thiocarbohydrazones Derivatives. *arXiv e-prints, Quantitative Biology – Biomolecules*: arXiv:2310.00939. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2310.00939>
- Ramadwa, T. E. y Meddows-Taylor, S. (2023). Traditional Uses, Pharmacological Activities, and Phytochemical Analysis of *Diospyros mespiliformis* Hochst. ex. A. DC (Ebenaceae): A Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(23), 7759. <https://doi.org/10.3390/molecules28237759>
- Ramde-Tiendrebeogo, A., Bado, D., Yoda, J., Compaore, M., Kini, F., Kiendrebeogo, M., Guissou, I. P. y Guisse, A. (2023). Phytonutrients content and biological activities of fruits of *Diospyros mespiliformis* Hoschst ex A.DC (Ebenaceae) used in the treatment of gastroenteritis and gastroduodenal ulcer in Burkina Faso. *International Journal of Medicinal Plants Research*, 12(4), 1–10. hal-04475776. <https://hal.science/hal-04475776v1>
- Ramírez-Briones, E., Rodríguez Macías, R., Casarrubias Castillo, K., del Río, R. E., Martínez-Gallardo, N., Tiessen, A., Ordaz-Ortiz, J., Cervantes-Hernández, F., Délano-Frier, J. P. y Zañudo-Hernández, J. (2019). Fruits of wild and semi-domesticated *Diospyros* tree species have contrasting phenological, metabolic, and antioxidant activity profiles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(13), 6020–6031. Portico. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9878>
- Rauf, A., Uddin, G., Patel, S., Khan, A., Halim, S. A., Bawazeer, S., Ahmad, K., Muhammad, N., y Mubarak, M. S. (2017). *Diospyros*, an under-utilized, multi-purpose plant genus: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 714–730. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.012>

- Red de Viveros de Biodiversidad (s.f.). Fichas para la propagación de árboles clave para la restauración ecológica: *Diospyros nigra* (J.F.Gmel.) Perrier, 1825, Zapote negro. Revivemx. https://revivemx.org/Recursos/Fichas_propagacion/FichaPropagacion_F2_Diospyros_nigra.pdf
- Redza-Dutordoir, M. y Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
- Ribeiro, A., Serrano, R., da Silva, I. B. M., Gomes, E. T., Pinto, J. F. y Silva, O. (2023). The Genus *Diospyros*: A Review of Novel Insights into the Biological Activity and Species of Mozambican Flora. *Plants*, 12, 2833. <https://doi.org/10.3390/plants12152833>
- Rioja-Antezana, A. P., Vizaluque, B. E., Aliaga-Rossel, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P. y Peñarrieta, J. M. (2018). Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de *Chenopodium quinoa*. *Revista Boliviana de Química*, 35(5), 168-176. <https://www.redalyc.org/journal/4263/426358213006/html/>
- Roshanzamir, F. y Yazdanparast, R. (2014). Quercetin attenuates cell apoptosis of oxidant-stressed SK-N-MC cells while suppressing up-regulation of the defensive element, HIF-1 α . *Neuroscience*, 277, 780–793. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.036>
- Sai-Ut, S., Kingwascharapong, P., Mazumder, M. A. R. y Rawdkuen, S. (2023). Optimization of Ethanolic Extraction of Phenolic Antioxidants from Lychee and Longan Seeds Using Response Surface Methodology. *Foods* (Basel, Switzerland), 12(15), 2827. <https://doi.org/10.3390/foods12152827>
- Sánchez-Valle, V. y Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*, 20(3), 161-168. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=79284>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (s. f.). Zapote negro (*Diospyros nigra*). Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/726352/Zapote_negro.pdf
- Shahidi, F. y Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. En *Methods in Enzymology* (pp. 152–178). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sistema de Información para la Reforestación (s. f.). *Diospyros digyna* Jacq. (Paquete tecnológico). <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/917Diospyros%20digyna.pdf>
- Smirnoff, N. y Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)

- Solís-Fuentes, J. A., Ayala-Tirado, R. C., Fernández-Suárez, A. D. y Durán-de-Bazúa, M. C. (2015). Mamey sapote seed oil (*Pouteria sapota*). Potential, composition, fractionation and thermal behavior. *Grasas y aceites*, 66(1), e056-e056. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0691141>
- Spigno, G., Tramelli, L. y De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Staveckienė, J., Medveckienė, B., Jarienė, E. y Kulaitienė, J. (2024). Effects of Different Ripening Stages on the Content of the Mineral Elements and Vitamin C of the Fruit Extracts of *Solanum* Species: *S. melanocerasum*, *S. nigrum*, *S. villosum*, and *S. retroflexum*. *Plants*, 13(3), 343. <https://doi.org/10.3390/plants13030343>
- Sulaiman, C. T., Shahida, V. y Balachandran, I. (2015). Effect of extraction solvent on the phytoconstituents of *Aegle marmelos* (L.) Correa. *Journal of Natural Remedies*, 15(1), 58-64. <https://doi.org/10.18311/jnr/2015/498>
- Taga, M. S., Miller, E. E. y Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928–931. Portico. <https://doi.org/10.1007/BF02542169>
- Tan, H. H., Thomas, N. F., Inayat-Hussain, S. H. y Chan, K. M. (2020) Cytoprotective effects of (E)-N-(2-(3,5-dimethoxystyryl) phenyl) furan-2-carboxamide (BK3C231) against 4-nitroquinoline 1-oxide-induced damage in CCD-18Co human colon fibroblast cells. *PLOS ONE* 15(5): e0223344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223344>
- Tanigawa, T., Kanazawa, S., Ichibori, R., Fujiwara, T., Magome, T., Shingaki, K., Miyata, S., Hata, Y., Tomita, K., Matsuda, K., Kubo, T., Tohyama, M., Yano, K. y Hosokawa, K. (2014). (+)-Catechin protects dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-133>
- Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E. y García-Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (16), 15-29. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/quimica/article/view/1583/1238>
- Xu, D., Hu, M.-J., Wang, Y.-Q. y Cui, Y.-L. (2019). Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*, 24(6), 1123. <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
- Xue, H., Zhao, J., Wang, Y., Shi, Z., Xie, K., Liao, X. y Tan, J. (2024). Factors affecting the stability of anthocyanins and strategies for improving their stability: A review. *Food Chemistry: X*, 24, 101883. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101883>
- Yadav, P., Sankar, J., Mora, C., Mu, S., Rusch, N. J., Watanabe, F., Guisbiers, G. y Devarajan, S. (2026). Nanoencapsulated gamma-oryzanol enhances fibroblast proliferation, migration, and reduces oxidative stress in H₂O₂-induced cellular aging model. *Journal of Functional Foods*, 136, 107130. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2025.107130>
- Yahia, E. M., Gutierrez-Orozco, F. y Arvizu-de Leon, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). *Food Research International*, 44(7), 2210-2216. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.025>

- Yahia, E. M. y Gutierrez-Orozco, F. (2011). Black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 244–251e). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092762.244>
- Yahia, E. M., Ornelas-Paz, J. D. J. y Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). Nutritional and health-promoting properties of tropical and subtropical fruits. En *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 21-78). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857093622.21>
- Yao, X., Mei, Y. y Mao, W. (2021). Quercetin Improves Mitochondrial Function and Inflammation in H₂O₂-Induced Oxidative Stress Damage in the Gastric Mucosal Epithelial Cell by Regulating the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 1386078. <https://doi.org/10.1155/2021/1386078>
- Yaqub, S., Farooq, U., Tusneem Kausar, Z. H., Jaskani, M., y Ullah, S. (2013). Hypocholesterolemic effect of persimmon peel powder in rabbits. *Science International* (Lahore), 25(3), 605-609. https://www.researchgate.net/publication/259284916_Hypocholesterolemic_effect_of_persimmon_peel_powder_in_rabbits#:~:text=,45%5D.
- Yen, G. C. y Chen, H. Y. (1996). Relationship between antimutagenic activity and major components of various teas, *Mutagenesis*, 11(1), 37-41. <https://doi.org/10.1093/mutage/11.1.37>
- Zalidis, A. P., Tsakiridis, N., Zalidis, G., Mourtzinis, I. y Gkatzionis, K. (2025). Evaluating the Effect of Thermal Treatment on Phenolic Compounds in Functional Flours Using Vis–NIR–SWIR Spectroscopy: A Machine Learning Approach. *Foods*, 14(15), 2663. <https://doi.org/10.3390/foods14152663>
- Zhang, D., Wu, H., Xia, Z., Wang, C., Cai, J., Huang, Z., Du, L., Sun, P. y Xie, J. (2012). Partial characterization, antioxidant and antitumor activities of three sulfated polysaccharides purified from *Bullacta exarata*. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.006>
- Zhang, M., Zhang, G., Meng, X., Wang, X., Xie, J., Wang, S., Wang, B., Wang, J., Liu, S., Huang, Q., Yang, X., Li, J. y Wang, H. (2024). Reduction of the oxidative damage to H₂O₂-induced HepG2 cells via the Nrf2 signalling pathway by plant flavonoids Quercetin and Hyperoside. *Food Science and Human Wellness*, 13(4): 1864-1876. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250155>
- Zhang, X., Liang, J., Lin, X., Chen, J. y Luo, X. (2025). A comprehensive review on the composition, processing methods, and sustainable utilization of tropical fruit seeds in food industry. *Food Frontiers*, 6, 644–669. <https://doi.org/10.1002/fft2.493>
- Zheng, X., Gong, M., Zhang, Q., Tan, H., Li, L., Tang, Y., Li, Z., Peng, M. y Deng, W. (2022). Metabolism and Regulation of Ascorbic Acid in Fruits. *Plants* (Basel, Switzerland), 11(12), 1602. <https://doi.org/10.3390/plants11121602>

Arturo Arias Alcalá

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ZAPOTE NEGRO (*Diospyros nigra*) EN LA LÍNE...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:592674233

Fecha de entrega

18 may 2026, 10:52 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

18 may 2026, 11:17 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ZAPOTE NEGRO (*Diospyros nigra*)....pdf

Tamaño del archivo

3.2 MB

95 páginas

42.312 palabras

233.715 caracteres

13% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 13%  Fuentes de Internet
- 9%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
66 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
-  **Texto oculto**
65 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de zapote negro (<i>Diospyros nigra</i>) en la línea celular 3T3-L1	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	QFB. Arturo Arias Alcalá	1800337h@umich.mx
Director	Dr. Rafael Zamora Vega	rafael.zamora@umich.mx
Codirector	Dra. Lorena Martínez Alcantar	lorena.martinez@umich.mx
Coordinador del programa	Dra. Rosa Elvira Núñez Anita	mae.ciencias.biologicas@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	Sí	Esto con el objetivo de no incurrir en el plagio, de redactar de diferente forma a la cita original.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	La traducción al español de artículos o citas se hizo manualmente por el autor.
Traducción a otra lengua	Sí	La traducción a otra lengua (en el apartado de Abstract) se hizo con la plataforma DeepL Translate.
Revisión y corrección de estilo	Sí	Se consultó el sentido de la redacción para dar a entender con mayor precisión las ideas.
Análisis de datos	Sí	Para ver otra perspectiva sobre el significado de los resultados obtenidos, consultar si estaba faltando interpretación en el trabajo.
Búsqueda y organización de información	Sí	Búsqueda de artículos y fuentes verificables cuando hacerlo manualmente no arrojaba resultados convincentes.
Formateo de las referencias bibliográficas	No	El formato de las referencias se obtuvo directamente de los artículos consultados o se redactó consultando el formato APA 7° edición.
Generación de contenido multimedia	No	Las imágenes utilizadas provienen de fuentes reales o son hechas por el autor del trabajo.
Otro	-	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Arturo Arias Alcalá
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán, México. 12 de mayo del 2026.