



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE GUASAVE

Tesis

**Caracterización fisicoquímica, potencial nutraceutico y
estabilidad de las melaninas solubles de papache
(*Randia echinocarpa*)**

Presentada por:

Jesús Alejandro López Herrera

Como requisito para la obtención del grado de
Ingeniero en Industrias Alimentarias

Directora de tesis

M. C. Cindy Rosas Domínguez

codirectora de tesis

Dra. Laura Gabriela Espinosa Alonso



Guasave, Sinaloa, México. Febrero de 2026.

CARTA DE LIBERACION DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la realización de esta tesis en tiempo y forma.

Dedico este trabajo a mi padre cuyo apoyo constante, confianza y esfuerzo han sido fundamentales para alcanzar esta meta profesional.

Agradezco a la Dra. Laura Gabriela Espinosa Alonso por su orientación, por ayudarme a resolver dudas críticas y por su apoyo en el laboratorio incluso en fines de semana.

Agradezco a la MC. María Fernanda Jáuregui Angulo y a María Fernanda Sandoval González por enseñarme el uso correcto de los recursos empleados a lo largo del proyecto y por brindarme apoyo en los experimentos más complejos.

Agradezco a la Dra. Teresita de Jesús Celis Arámburo por señalar mis errores, explicarme los fundamentos necesarios y por sus recomendaciones para aumentar mi rigor experimental.

Agradezco a la Dra. Melina López Meyer y a la Dra. Claudia María Ramírez Douriet por proporcionarme insumos críticos, cuyo aporte fue determinante para concluir los análisis en tiempo y forma.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por el valioso apoyo brindado mediante la prestación del servicio de análisis por espectroscopía FT-IR, fundamental para la adecuada caracterización de las muestras estudiadas en este trabajo.

Agradezco al Dr. Sergio Medina Godoy por facilitarme el acceso al laboratorio mediante el préstamo de sus llaves personales, lo que me permitió trabajar los fines de semana y ampliar horarios de trabajo cuando fue necesario.

A todos ellos, mi reconocimiento y gratitud por su profesionalismo y compromiso con el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN (ABSTRACT)

El presente trabajo evaluó las melaninas solubles extraídas del fruto de *Randia echinocarpa* procedentes de dos localidades, con el objetivo de caracterizar sus propiedades fisicoquímicas y espectrales, cuantificar su contenido y evaluar su estabilidad y potencial nutracéutico. Se extrajeron y prepararon extractos de pulpa y de pulpa-semilla, éstos se caracterizaron por espectrofotometría UV-Vis, espectroscopía FT-IR, se cuantificaron mediante fluorescencia, y se evaluaron funcionalmente mediante determinaciones de capacidad antioxidante (ORAC-FL, DPPH, ABTS), ensayo de inhibición de α -amilasa y estimación *in vitro* del factor de protección solar. La estabilidad de los extractos se analizó frente a pH, temperatura, exposición a la luz, iones metálicos, agentes oxidantes/reductores y aditivos alimentarios. Los resultados mostraron presencia clara de melaninas en los extractos, los extractos de pulpa-semilla de Cahuinahuaro exhibieron mayor potencial nutracéutico (mayor actividad antioxidante y capacidad antidiabética), mientras que los extractos de pulpa-semilla de Rancho Viejo mostraron mayor resistencia frente a condiciones estresantes. Las condiciones que favorecieron mayor estabilidad fueron pH $\approx$ 5, 25 °C y protección frente a la luz. Estos hallazgos respaldan el potencial de las melaninas de papache como ingredientes naturales funcionales y orientan su validación a escala piloto.

Palabras clave: Melaninas solubles, *Randia echinocarpa*, estabilidad, capacidad antioxidante, capacidad antidiabética, protección UV, FPS.

ÍNDICE

CARTA DE LIBERACION DE TESIS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN (ABSTRACT)	iii
ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	8
INTRODUCCIÓN	13
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
II. JUSTIFICACIÓN	15
2.1. Impacto social	16
2.2. Impacto tecnológico	16
2.3. Impacto económico	16
2.4. Impacto ambiental.....	17
2.5. Alcance	17
2.6. Viabilidad y factibilidad de la investigación	18
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos específicos	20
V. MARCO TEÓRICO	21
5.1. Generalidades de <i>Randia equinocarpa</i>	21
5.1.1. El fruto de papache	22
5.2. Melaninas.....	25

5.2.1.	Identificación y estudio de melaninas	28
5.2.2.	Melaninas vegetales	38
5.3.	Factor de protección solar.....	42
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1.	Muestras	43
6.2.	Métodos	43
6.2.1.	Análisis fisicoquímicos de la pulpa.....	43
6.2.2.	Preparación de las muestras	46
6.2.3.	Caracterización de los extractos	49
6.2.4.	Análisis de estabilidad de los extractos	71
6.2.5.	Análisis estadístico	88
VII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
7.1.	Análisis fisicoquímicos de la pulpa de papache	89
7.1.1.	Determinación del índice de madurez de los frutos	90
7.2.	Extracción de melaninas solubles.....	90
7.3.	Caracterización de los extractos	92
7.3.1.	Caracterización espectroscópica UV-vis	92
7.3.1.1.	Determinación del factor de protección solar	100
7.3.2.	Caracterización espectroscópica FT-IR.....	103
7.3.3.	Cuantificación de melaninas.....	104
7.3.4.	Determinación de azúcares reductores	106
7.4.	Evaluación del potencial nutraceutico	109
7.4.1.	Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FL	109
7.4.2.	Determinación de capacidad antioxidante por DPPH.....	111

7.4.3.	Determinación de capacidad antioxidante por ABTS	113
7.4.4.	Determinación de capacidad antidiabética para α -amilasa	115
7.5.	Análisis de estabilidad de los extractos.....	118
7.5.1.	Análisis de estabilidad pH-Tiempo	118
7.5.2.	Análisis de estabilidad Temperatura-Tiempo	121
7.5.3.	Análisis de estabilidad Luz-Tiempo	124
7.5.4.	Análisis de estabilidad Redox-Tiempo.....	128
7.5.5.	Análisis de estabilidad Aditivos-Tiempo	134
7.5.6.	Análisis de la estabilidad Iones Metálicos-Tiempo	146
VIII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	158
8.1.	Conclusiones	158
8.1.1.	Análisis fisicoquímicos de la pulpa.....	158
8.1.2.	Extracción de melaninas solubles.....	158
8.2.	Recomendaciones	165
8.2.1.	Recomendaciones metodológicas	165
8.2.2.	Recomendaciones para la aplicación práctica	165
8.2.3.	Líneas de investigación futura	166
8.3.	Conclusión final.....	167
IX.	REFERENCIAS	168

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Distribución de <i>Randia echinocarpa</i>	22
Fig. 2. Frutos de papache.	23
Fig. 3. Conjunto de reacciones que dan lugar a las eumelaninas y feomelaninas (Pralea et al., 2019).....	26
Fig. 4. Estructuras moleculares de las formas redox de las melaninas (Xu, 2020)... ..	27
Fig. 5. Estructuras moleculares de las melaninas sintéticas DHI y DHICA (Xu, 2020).	29
Fig. 6. Estructuras moleculares propuestas de las eumelaninas.	30
Fig. 7. Espectros UV-vis característicos de las melaninas disueltas en NaOH 0.1 M.	33
Fig. 8. Espectros FT-IR de la melanina sintética y de <i>Sepia officinalis</i> (Pralea et al., 2019).....	34
Fig. 9. Espectros RMN de las melaninas.	35
Fig. 10. Reacción de comproporción que produce radicales semiquinona (Xu, 2020).	36
Fig. 11. MALDI-TOF MS de la melanina DHN extraída del micelio de <i>M. fijiensis</i> (Pralea et al., 2019).	37
Fig. 12. Algunas semillas que acumulan melaninas.	40
Fig. 13. Conjunto de reacciones que dan lugar a las melaninas en vegetales.	41
Fig. 14. Cambios de acidez y °Brix durante la maduración de las uvas viníferas. (Centro Tecnológico de la Vid y el Vino., 2010).	45
Fig. 15. ID que le tocó a cada stock de extractos.	49
Fig. 16. Composición de los pulls de extractos preparados.....	54
Fig. 17. Orden de llenado de la placa para la cuantificación de melaninas.	56
Fig. 18. Orden de llenado de las placas para el análisis de azúcares reductores.....	59
Fig. 19. Orden de llenado de la placa para el ensayo ORAC-FL.	62
Fig. 20. Orden de llenado de las placas para los ensayos DPPH/ABTS.	65

Fig. 21. Orden de llenado de las placas para el análisis de inhibición de la α -amilasa.	70
Fig. 22. Orden de llenado de las placas UV para los análisis de estabilidad.	74
Fig. 23. Gráfico de interacción entre los efectos Fuente-Lugar en los rendimientos de extracción.	91
Fig. 24. Espectros de absorción UV-vis de los extractos disueltos en distintos vehículos.	92
Fig. 25. Gráficos de la determinación de absorción de radiación UV de los extractos en distintos vehículos.	94
Fig. 26. Gráficos de la determinación de absorción de radiación UV de los extractos.	95
Fig. 27. Espectros y logaritmos de absorción de los extractos en medio acuoso.	96
Fig. 28. Espectros y logaritmos de absorción de los extractos en medio hidroalcohólico.	97
Fig. 29. Gráficos de la determinación de pureza relativa de los extractos.	100
Fig. 30. Valores de FPS obtenidos para cada bloqueador comercial.	101
Fig. 31. Gráficos de la determinación de FPS de los extractos.	102
Fig. 32. Espectros FT-IR de los extractos y las harinas de pulpa.	103
Fig. 33. Curva estándar de melaninas usada para la cuantificación de melaninas.	105
Fig. 34. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en el contenido de melaninas de los extractos.	106
Fig. 35. Curva estándar de glucosa usada para calcular los azúcares reductores.	106
Fig. 36. Gráficos de la determinación de azúcares reductores.	108
Fig. 37. Curva estándar de Trolox usada para calcular la capacidad antioxidante por ORAC-FL.	109
Fig. 38. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la TEAC por ORAC-FL.	110
Fig. 39. Curva estándar de Trolox usada para calcular la capacidad antioxidante por DPPH.	111

Fig. 40. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la TEAC por DPPH.	112
Fig. 41. Curva estándar de Trolox usada para calcular la capacidad antioxidante por ABTS.	113
Fig. 42. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la TEAC por ABTS.	114
Fig. 43. Curva estándar de acarbosa usada para calcular la AEIC.	115
Fig. 44. Gráficos del análisis de inhibición de α -amilasa.	116
Fig. 45. Gráficos de interacción en la prueba de pH.	120
Fig. 46. Cambios visibles encontrados entre los distintos pH.	121
Fig. 47. Gráficos de interacción en el análisis de termoestabilidad.	124
Fig. 48. Gráficos de interacción en la prueba de exposición a la luz.	126
Fig. 49. Cambios visibles encontrados entre las distintas condiciones de exposición a la luz.	127
Fig. 50. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad ante oxidantes.	130
Fig. 51. Cambios visibles encontrados entre las distintas concentraciones de H_2O_2 .	131
Fig. 52. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad ante reductores.	134
Fig. 53. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad en soluciones salinas.	137
Fig. 54. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad en soluciones de sacarosa.	139
Fig. 55. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad con benzoato de sodio.	142
Fig. 56. Cambios en la absorbancia de las muestras y blancos en el análisis de estabilidad frente a sorbato de potasio.	144
Fig. 57. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad con sorbato de potasio.	145
Fig. 58. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad frente a iones monovalentes.	148

Fig. 59. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad frente a iones divalentes.	152
Fig. 60. Cambios en la absorbancia de las muestras y blancos en el análisis de estabilidad frente a Fe^{3+}	153
Fig. 61. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad frente a iones trivalentes.	155
Fig. 62. Precipitaciones observadas en las soluciones con iones trivalentes.	156
Fig. 63. Precipitaciones observadas en las soluciones con iones de transición divalentes.	156
Fig. 64. Precipitaciones observadas en las soluciones con iones alcalinotérreos. .	157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cribado fitoquímico del fruto de papache (Ojeda-Ayala et al., 2022).	24
Tabla 2. Producto EE*I normalizado para cada longitud de onda (Sayre et al., 1979).	42
Tabla 3. Volúmenes empleados en la curva estándar de melaninas.	55
Tabla 4. Volúmenes empleados en la curva estándar de D-glucosa.	58
Tabla 5. Volúmenes empleados en la curva estándar de Trolox ORAC.	61
Tabla 6. Volúmenes empleados en la curva estándar de Trolox DPPH/ABTS.	64
Tabla 7. Volúmenes empleados en la curva estándar de acarbosa.	68
Tabla 8. ID de las muestras bajo distintos pH.	73
Tabla 9. ID de las muestras bajo distintas temperaturas.	75
Tabla 10. ID de las muestras bajo distintas condiciones de exposición a la luz.	76
Tabla 11. Volúmenes empleados en las soluciones de H ₂ O ₂ .	77
Tabla 12. Volúmenes empleados en las soluciones de NaHSO ₃ .	78
Tabla 13. ID de las muestras bajo las distintas concentraciones de H ₂ O ₂ .	79
Tabla 14. ID de las muestras bajo las distintas concentraciones de NaHSO ₃ .	79
Tabla 15. Volúmenes empleados en las soluciones de NaCl.	80
Tabla 16. Volúmenes empleados en las soluciones de sacarosa.	81
Tabla 17. Volúmenes empleados en las soluciones de benzoato de sodio.	81
Tabla 18. Volúmenes empleados en las soluciones de sorbato de potasio.	82
Tabla 19. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de NaCl.	83
Tabla 20. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de sacarosa.	83
Tabla 21. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de benzoato de sodio.	84
Tabla 22. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de sorbato de potasio.	84
Tabla 23. Volúmenes empleados en las soluciones de iones metálicos.	85
Tabla 24. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Fe ²⁺ y Fe ³⁺ .	86
Tabla 25. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Al ³⁺ y K ⁺ .	87

Tabla 26. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Ca^{2+} y Zn^{2+}	87
Tabla 27. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Cu^{2+} y Mg^{2+}	88
Tabla 28. Parámetros fisicoquímicos de la pulpa de papache.	89
Tabla 29. Coordenadas CieLab de la pulpa de papache.	89
Tabla 30. IM de los frutos de papache.	90
Tabla 31. Rendimiento de extracción promedio de cada extracto.	90
Tabla 32. Valores promedio de los ratios UV y AUC_{Abs} UV_{total} de los extractos de pulpa y pulpa-semilla en distintos vehículos.	93
Tabla 33. Longitudes de onda máxima de absorción y pendientes de las melaninas de distintas especies (Pralea et al., 2019).	98
Tabla 34. Medianas de la Abs_p , PRAC y PRP de cada extracto.	99
Tabla 35. Medianas de FPS de cada extracto.	100
Tabla 36. Medianas de FPS de cada tipo extracto en distinto vehículo.	102
Tabla 37. Correlación de Pearson entre los espectros FT-IR.	104
Tabla 38. Matriz RMSD de los espectros FT-IR.	104
Tabla 39. Contenido promedio de melaninas de cada extracto.	105
Tabla 40. Medianas del contenido de glucosa de cada extracto.	107
Tabla 41. Medianas de la TEAC de cada extracto por ORAC-FL.	109
Tabla 42. Medianas de ARA contra $\text{R-OO}\cdot$ de cada extracto por ORAC-FL.	110
Tabla 43. Valores promedio de la TEAC de cada extracto por DPPH.	111
Tabla 44. Valores promedio de ARA contra $\text{DPPH}\cdot$ de cada extracto.	112
Tabla 45. Valores promedio de la TEAC de cada extracto por ABTS.	114
Tabla 46. Valores promedio de ARA contra $\text{ABTS}\cdot+$ de cada extracto.	115
Tabla 47. Valores promedio de AEIC para α -amilasa de cada extracto.	116
Tabla 48. Valores promedio de % Inhibición de α -amilasa de cada extracto.	117
Tabla 49. Valores promedio de % Inhibición de α -amilasa de cada solución estándar de acarbosa.	117
Tabla 50. Medianas de la retención de los extractos bajo las condiciones de pH. .	118
Tabla 51. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y pH. .	119

Tabla 52. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las condiciones de pH.....	119
Tabla 53. Medianas de la retención de los extractos bajo distintas temperaturas. .	122
Tabla 54. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Temperatura y Tiempo.	122
Tabla 55. Medianas generales de la retención de melaninas a distintas temperaturas.	123
Tabla 56. Medianas de la retención de los extractos bajo las condiciones de exposición a la luz.....	125
Tabla 57. Medianas generales de la retención de melaninas ante la exposición a la luz.	126
Tabla 58. Medianas de la retención de los extractos bajo condiciones oxidantes. .	128
Tabla 59. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de H ₂ O ₂	129
Tabla 60. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas condiciones de oxidación.	129
Tabla 61. Medianas de la retención de los extractos bajo condiciones reductoras.	132
Tabla 62. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de NaHSO ₃	132
Tabla 63. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas condiciones reductoras.	133
Tabla 64. Medianas de la retención de los extractos bajo en medio salino.	135
Tabla 65. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de NaCl.	135
Tabla 66. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de NaCl.	136
Tabla 67. Medianas de la retención de los extractos bajo en medio salino.	138
Tabla 68. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de sacarosa.....	138

Tabla 69. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones sacarosa.....	139
Tabla 70. Medianas de la retención de los extractos bajo en medio salino.	140
Tabla 71. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de benzoato de sodio.....	141
Tabla 72. Promedios generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de benzoato de sodio.	141
Tabla 73. Medianas de la retención de los extractos bajo distintas concentraciones de sorbato de potasio.....	143
Tabla 74. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de sorbato de potasio.....	143
Tabla 75. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de sorbato de potasio.....	144
Tabla 76. Valores promedio de la retención de los extractos en presencia de iones K^+	146
Tabla 77. Correlación de Pearson entre las variables Retención, Tiempo y concentración de K^+	147
Tabla 78. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de K^+	147
Tabla 79. Medianas de la retención de los extractos en presencia de iones metálicos divalentes.	149
Tabla 80. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de cationes divalentes.....	150
Tabla 81. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de cationes divalentes.....	151
Tabla 82. Medianas generales de la retención de melaninas frente a distintos cationes divalentes.	151
Tabla 83. Medianas de la retención de los extractos en presencia de iones metálicos trivalentes.....	153

Tabla 84. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de cationes trivalentes.	154
Tabla 85. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de Al^{3+}	154

INTRODUCCIÓN

Se evaluaron de forma integral las melaninas solubles extraídas del fruto de papache (*Randia echinocarpa*), centrándose en su caracterización fisicoquímica, su estabilidad ante cambios de pH, temperatura, luz, iones metálicos, agentes redox, conservadores y azúcares, así como su potencial nutracéutico determinado por ensayos *in vitro* (capacidad antioxidante e inhibición de α -amilasa). El estudio atiende la necesidad de generar conocimiento técnico para la valorización de este recurso regional en formulaciones alimentarias y cosméticas y para su posible transferencia a escala piloto.

R. echinocarpa es una especie vegetal de la familia *Rubiaceae* con uso tradicional, no obstante, la información sobre sus pigmentos es limitada, especialmente sobre melaninas solubles. Estas melaninas, son biopolímeros con absorción en UV-Vis, actividad redox y capacidad de quelación, son candidatas para filtros UV naturales y productos alimentarios funcionales, siempre que se comprenda su estabilidad en condiciones reales.

El objetivo fue caracterizar fisicoquímicamente la pulpa de dos localidades, comparar sus melaninas obtenidas de pulpa y de pulpa-semilla, determinar propiedades espectrales (UV-Vis, FT-IR), estimar el FPS *in vitro*, evaluar la estabilidad y funcionalidad de los extractos mediante ORAC-FL, DPPH, ABTS y ensayo de inhibición de α -amilasa, complementando con análisis estadísticos para identificar efectos y correlaciones.

Los hallazgos aportan evidencia experimental sobre la naturaleza, estabilidad y actividad nutracéutica de las melaninas de papache, orientando su valoración tecnológica y futuras líneas de investigación.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aprovechamiento de pigmentos y antioxidantes vegetales es una oportunidad estratégica para la industria alimentaria y cosmética, especialmente cuando provienen de recursos locales poco valorizados. En el caso del papache existen reportes preliminares de actividad antioxidante y otras propiedades bioactivas; no obstante, la información sobre la naturaleza, estabilidad y funcionalidad específica de las melaninas solubles provenientes del fruto es limitada. Esto dificulta la evaluación de su aplicabilidad industrial (formulación, estabilidad, compatibilidad con matrices alimentarias o cosméticas y seguridad funcional).

El proyecto responde a la necesidad de:

- Caracterizar fisicoquímica y espectralmente estas melaninas.
- Identificar condiciones de procesamiento y almacenamiento que preserven su funcionalidad.
- Establecer evidencia de su potencial nutracéutico y cosmeceútico que justifique ensayos posteriores (*in vivo*, validaciones sensoriales y pruebas de seguridad).

La resolución de estas lagunas facilitará la valorización de productos locales y la generación de ingredientes naturales con valor agregado.

II. JUSTIFICACIÓN

El proyecto se enfoca en generar conocimiento aplicado sobre las melaninas solubles extraídas del fruto de papache (*Randia echinocarpa*), con el propósito de caracterizar sus propiedades fisicoquímicas y espectrales, evaluar su estabilidad frente a factores de proceso y almacenamiento (pH, temperatura, luz, iones metálicos, agentes oxidantes/reductores, conservadores y azúcares) y determinar su potencial nutracéutico (actividad antioxidante y posible efecto antidiabético *in vitro*).

El estudio responde a la creciente demanda por ingredientes naturales con funciones tecnológicas y nutracéuticas para la industria alimentaria y cosmética, y aprovecha un recurso silvestre regional con antecedentes etnobotánicos y de uso tradicional y actividad bioquímica reportada. La investigación aportará datos necesarios para la formulación, estabilización y validación preliminar de ingredientes a base de melaninas de papache.

La relevancia científica está respaldada por revisiones sobre melaninas vegetales y su caracterización mediante técnicas espectroscópicas, las cuales indican que presentan propiedades de absorción UV, capacidad de quelación de metales y actividad antioxidante que las hacen prometedoras para su aplicación en productos nutraceúticos y cosmeceúticos (Glagoleva *et al.*, 2020; Ojeda-Ayala *et al.*, 2022). Los siguientes puntos sustentan la necesidad del estudio:

- **Sensibilidad de melaninas** estabilidad **solubles al pH**. Muchas formulaciones de todo tipo tienen distintos valores de pH que pueden afectar la estructura química de las melaninas. Se tiene que medir si las melaninas sufren degradación o decoloración, lo cual sería problemático en aplicaciones industriales.
- **Estabilidad de melaninas solubles**. Si se pretende usar melaninas en productos estables a largo plazo, se necesita saber qué condiciones fisicoquímicas no interfieren con su. Esto permite diseñar productos funcionales seguros y eficaces (bebidas, suplementos, cosméticos, etc.).

- **Condiciones óptimas de almacenamiento.** El conocimiento de cómo reaccionan las melaninas al pH, temperatura, luz, iones metálicos, agentes oxidantes/reductores, conservadores y azúcares, ayuda a elegir los mejores estabilizantes y evitar condiciones que provoquen precipitación, degradación o pérdida de color.

2.1. Impacto social

Se espera que los resultados contribuyan a ampliar la oferta de a base de papache con potencial funcional para la industria alimentaria y cosmética, favoreciendo alternativas más saludables y percibidas como menos agresivas por consumidores sensibles a productos sintéticos. Además, se considera que el conocimiento generado podrá beneficiar a productores locales de papache al abrir vías de valorización del fruto como materia prima de alto valor agregado. Estas implicaciones se alinean con la orientación del CIIDIR hacia la vinculación con el sector productivo y la transferencia tecnológica.

2.2. Impacto tecnológico

Se realizará la adaptación de protocolos de extracción y ensayos de estabilidad al pH, temperatura, luz, iones metálicos, agentes oxidantes/reductores, conservadores y azúcares, lo que permitirá establecer metodologías reproducibles para evaluar la integridad fisicoquímica de melaninas solubles. Los avances metodológicos podrían ser la base para desarrollar formulaciones estables (p. ej. hidrogeles, bebidas o recubrimientos) y para transferir procesos a la industria.

2.3. Impacto económico

Se prevé que identificar condiciones de almacenamiento compatibles con las melaninas facilitará la formulación de productos comerciales (bebidas funcionales, suplementos, cosméticos) con menor dependencia de productos sintéticos, lo cual puede traducirse en nuevos nichos de mercado y fuentes de ingresos para emprendimientos regionales. La ejecución en un centro con historial de captación de

recursos y vinculación productiva aumenta la probabilidad de escalar resultados hacia desarrollos comerciales.

2.4. Impacto ambiental

El estudio contribuye a evaluar el potencial de las melaninas naturales como colorantes/antioxidantes biodegradables y con perfil nutraceútico favorable frente a aditivos sintéticos, lo que podría reducir la carga ambiental asociada a compuestos sintéticos persistentes. Asimismo, la valorización de subproductos vegetales promueve un uso más sustentable de recursos. Estas potenciales ventajas se respaldan por revisiones sobre aplicaciones y propiedades funcionales de las melaninas naturales.

2.5. Alcance

- El estudio abarcará la recolección de frutos de *R. echinocarpa* en dos localidades previamente identificadas (con registro de fecha), la caracterización fisicoquímica de la pulpa y la realización de extracciones estandarizadas para obtener melaninas solubles.
- Se implementarán ensayos espectrofotométricos (UV–Vis, fluorescencia y FT-IR) para caracterizar los extractos y cuantificar melaninas.
- Se evaluará la estabilidad frente a pH, temperatura, luz, iones metálicos, conservadores y agentes oxidantes/reductores mediante ensayos controlados y medición por UV–Vis.
- Se realizarán determinaciones *in vitro*: capacidad antioxidante (ORAC-FL, ABTS, DPPH), contenido de azúcares reductores (DNS), ensayo de inhibición de α amilasa (potencial antidiabético) y factor de protección solar (Mansur) como indicador de capacidad de absorción UV.
- El alcance queda limitado a ensayos *in vitro* y análisis a escala laboratorio, no incluye estudios *in vivo*, pruebas toxicológicas completas ni desarrollos de formulación comerciales a escala industrial, aunque los resultados servirán de base para estas fases posteriores.

- Se contemplará la reproducibilidad mediante réplicas y análisis estadístico apropiado (ANOVA, comparaciones múltiples, Kruskal Wallis, Correlaciones, etc).

2.6. Viabilidad y factibilidad de la investigación

La factibilidad técnica se fundamenta en la disponibilidad de infraestructura y material del centro en investigación (protocolos, equipos analíticos y materiales de trabajo). El protocolo propuesto (extracción, evaluación de estabilidad monitoreada por UV–Vis y evaluación nutraceutica) requiere insumos y equipos habituales en laboratorios de bioquímica y alimentos, sin embargo, su conclusión dependerá de la disponibilidad puntual de equipo calibrado (espectrofotómetro, placas de calentamiento, potenciómetro, sonda de ultrasonidos, fuentes de luz, etc) y del acceso a materia prima suficiente. Se considera que, con el apoyo institucional y la coordinación con las áreas correspondientes, el proyecto es viable dentro del marco propuesto.

Si no se realiza la investigación, se mantendrá la incertidumbre técnica respecto a la utilidad industrial de estas melaninas lo que puede frenar su adopción comercial y desaprovechar una fuente regional de materia prima con potencial de alto valor agregado.

III. HIPÓTESIS

Se plantea que los frutos de papache (*R. echinocarpa*) presentan características fisicoquímicas determinadas y diferencialmente influenciadas por la procedencia geográfica del fruto, a su vez que las melaninas solubles extraídas de estos presentan composiciones, características espectrales y funcionales influenciadas por el tipo de extracto, es decir del aprovechamiento de pulpa frente a la combinación de pulpa-semilla.

Concretamente, se espera que las diferencias de los frutos en pH, acidez, °Brix, humedad y color entre localidades reflejen variaciones significativas en el rendimiento y composición de los extractos, que la inclusión de semilla disminuya el rendimiento y modifique la composición del extracto, y que los perfiles obtenidos por UV–Vis y FT-IR muestren señales características de melaninas que se correlacionen con la cuantificación por fluorescencia y con el valor *in vitro* de protección UV (FPS).

Asimismo, se postula que la estabilidad de dichos extractos estará condicionada por factores de proceso y almacenamiento, la retención de melaninas disminuirá al disminuir el pH hacia condiciones ácidas, con temperaturas elevadas (particularmente >40 °C) y con exposición a luz solar directa, mientras que la presencia de iones metálicos y agentes oxidantes acelerará la degradación y agentes reductores la protegerán, además, la incorporación de aditivos alimentarios como sal, azúcar y conservadores puede alterar la estabilidad de los extractos a largo plazo. Finalmente, se anticipa que los extractos exhibirán actividad antioxidante (medida por ORAC-FL, ABTS y DPPH) y capacidad de inhibición de la α -amilasa *in vitro*, y que estas actividades funcionales se correlacionarán con la concentración de melaninas, todo lo cual podrá demostrarse mediante los ensayos espectrofotométricos y bioquímicos planteados en este anteproyecto.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar las propiedades fisicoquímicas del fruto de papache (*Randia echinocarpa*), así como las propiedades espectrales, la estabilidad y potencial nutracéutico de las melaninas solubles extraídas de los frutos de dos distintas localidades.

4.2. Objetivos específicos

1. Establecer las características fisicoquímicas del fruto de papache de acuerdo con sus diferencias geográficas.
2. Evaluar el rendimiento de la extracción de melaninas solubles de dos diferentes extractos, obtenidos a partir del aprovechamiento de la materia prima: pulpa y pulpa-semilla.
3. Caracterizar fisicoquímica y espectralmente los extractos, así como cuantificar las melaninas solubles de pulpa y pulpa-semilla, por métodos UV-visible, FT-IR y fluorescencia.
4. Evaluar la estabilidad de los extractos de melaninas de pulpa y pulpa-semilla bajo diferentes condiciones ambientales y químicas (pH, temperatura, luz, iones metálicos, agentes oxidantes y reductores, sales, azúcares y conservadores).
5. Evaluar el potencial nutracéutico y cosmeceútico de los extractos de melaninas de pulpa y pulpa-semilla, a partir de ensayos *in vitro* del factor de protección solar, capacidad antioxidante (ORAC-FL, ABTS y DPPH) y su potencial antidiabético, mediante un ensayo de inhibición de la enzima α -amilasa.

V. MARCO TEÓRICO

5.1. Generalidades de *Randia equinocarpa*

Randia echinocarpa pertenece a la familia *Rubiaceae* y a la tribu *Gardenieae*. Entre los sinónimos se incluyen: *Basanacantha echinocarpa* Bullock, *Solena echinocarpa* D. Dietr. y *Genipa echinocarpa* Gray. También pertenece al subgénero *Basanacantha* L. O. Williams., que se caracteriza por sus grandes flores y frutos, flores unisexuales y generalmente plantas dioicas (Bye *et al.*, 1991).

Randia echinocarpa es un arbusto o árbol pequeño de 2 a 6 m de altura, con ramas rígidas. Cada brote corto termina en cuatro espinas. La planta es dioica, aunque ocasionalmente puede ser poligamodioica. Las hojas, simples, ovadas u obovadas, son opuestas y generalmente perennes (o caducifolias en condiciones de sequía, excepto en el noroeste de México). Las flores solitarias son terminales y generalmente unisexuales, a veces bisexuales. Las flores pistiladas, de unos 3 cm de largo, son más largas que las estaminadas. Las corolas son blancas y se tornan de color amarillo anaranjado con la edad. La floración suele ocurrir de marzo a julio y los frutos maduran de julio a marzo (Bye *et al.*, 1991).

Esta especie se limita a la cuenca del Pacífico de México, creciendo generalmente desde cerca del nivel del mar hasta una altitud de 1700 m, con la mayoría de las poblaciones entre 255 y 1200 m. Su distribución va desde el sur de Sonora y el suroeste de Chihuahua hasta el centro de Guerrero y el suroeste de Puebla, con el desierto de Sonora marcando el límite norte y la cuenca del río Balsas formando el límite sur como se muestra en la Fig. 1. Este arbusto espinoso se encuentra generalmente en la vegetación secundaria asociada a estribaciones, laderas y llanuras aluviales de bosques tropicales caducifolios, de árboles bajos y espinosos (Bye *et al.*, 1991).



Fig. 1. Distribución de *Randia echinocarpa*.

Los puntos representan las localidades de origen de los especímenes estudiados por (Bye et al., 1991); las líneas diagonales cubren el probable rango natural; el cuadrado indica la ubicación del dudoso reporte del uso de esta especie por los indígenas Huaves de Oaxaca.

5.1.1. El fruto de papache

Los frutos de papache son bayas de 4.5 a 10 cm de diámetro, cubiertos de protuberancias irregularmente aplanadas de 0.5 a 3 cm de largo como se puede observar en la Fig. 2A, y a menudo amarillos al madurar. Los frutos contienen numerosas semillas redondas rodeadas de una pulpa oscura al madurar como se puede apreciar en la Fig. 2B.

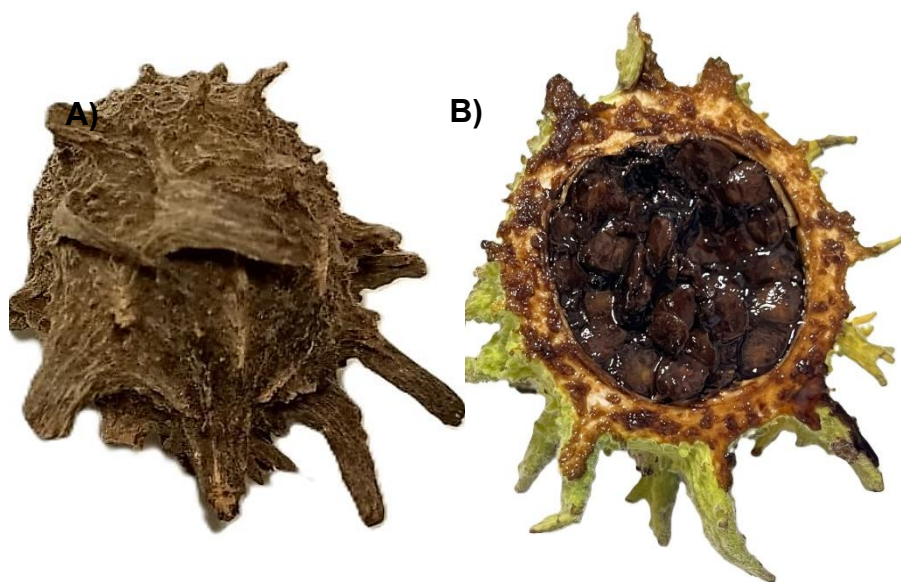


Fig. 2. Frutos de papache.
A) Fruto maduro y B) interior del fruto de papache.

Los frutos de papache son un elemento destacado de la herbolaria mexicana y se venden fuera del área de distribución biológica de esta especie debido a que son comúnmente empleados en remedios tradicionales para tratar el cáncer, la diabetes, úlceras pépticas, cálculos renales, cistitis, así como afecciones renales, pulmonares, circulatorias y gastrointestinales (Bye *et al.*, 1991; Ojeda-Ayala *et al.*, 2022).

En México, los usos etnobotánicos del papache se conocen desde 1777, con registros de indígenas tarahumaras que consumían los frutos de *Randia echinocarpa* y los restos de las cáscaras se utilizaban para preparar una cerveza de maíz sacramental (batari). Además, los informes de principios del siglo XX indican que las preparaciones de papache se utilizaban para tratar la malaria y otras enfermedades. Sin embargo, la mayoría de los usos etnofarmacológicos del papache no se han demostrado científicamente. En este sentido, los estudios químicos de *Randia equinocarpa* son escasos a pesar de la importancia etnobotánica del fruto (Ojeda-Ayala *et al.*, 2022).

Algunos estudios de actividad biológica que se han llevado a cabo con el fruto de *R. echinocarpa*, han encontrado que el papache posee actividad antibacteriana, antidiabética, antimutagénica, antioxidante, cicatrizante, diurética, nematocida y

antiproliferativa. En otro estudio de tamizaje fitoquímico se encontró que los extractos del fruto de papache carecen de alcaloides, mientras que algunos extractos presentaron bajas concentraciones de cumarinas, flavonoides y taninos, otros extractos presentaron concentraciones moderadas, bajas o ausencia de saponinas, terpenos, esteroides y derivados libres del antraceno como se muestra en la Tabla 1 (Ojeda-Ayala *et al.*, 2022).

Tabla 1. Cribado fitoquímico del fruto de papache (Ojeda-Ayala *et al.*, 2022).

Extract/ Fraction	Alkaloids	Coumarins	Flavonoids	Tannins	Saponins	Terpenes/ sterols	Free anthra- cenic deriva- tives	Phenolics	Anthraqui- nones
ME	-	+	+	+	+++	+	-	ND	ND
HF	-	+	-	-	++	++	-	ND	ND
CF	-	-	+	+	+	++	-	ND	ND
AQF	-	+	+	+	-	-	+	ND	ND
AEF	-	-	+	+	-	-	++	ND	ND

ME, extracto metanólico; *HF*, fracción hexánica; *CF*, fracción clorofórmica; *AQF*, fracción acuosa; *AEF*, fracción acetato etílico; *ND*, no determinado.

En la fracción acetato etílico del fruto de papache se identificaron 5 triterpenos, entre los cuales, los más abundantes fueron los ácidos quinóico y oxoquinóico (Bye *et al.*, 1991). En la fracción hexánica del fruto de papache se identificaron 3 esteroides, siendo el β -sitosterol el más abundante. Además, se encontró que la pulpa del fruto contiene ácidos linoleico y palmítico, siendo este último el más abundante, así mismo se ha reportado la presencia de 3 aldehídos, siendo el pentadecanal el más abundante (Ojeda-Ayala *et al.*, 2022).

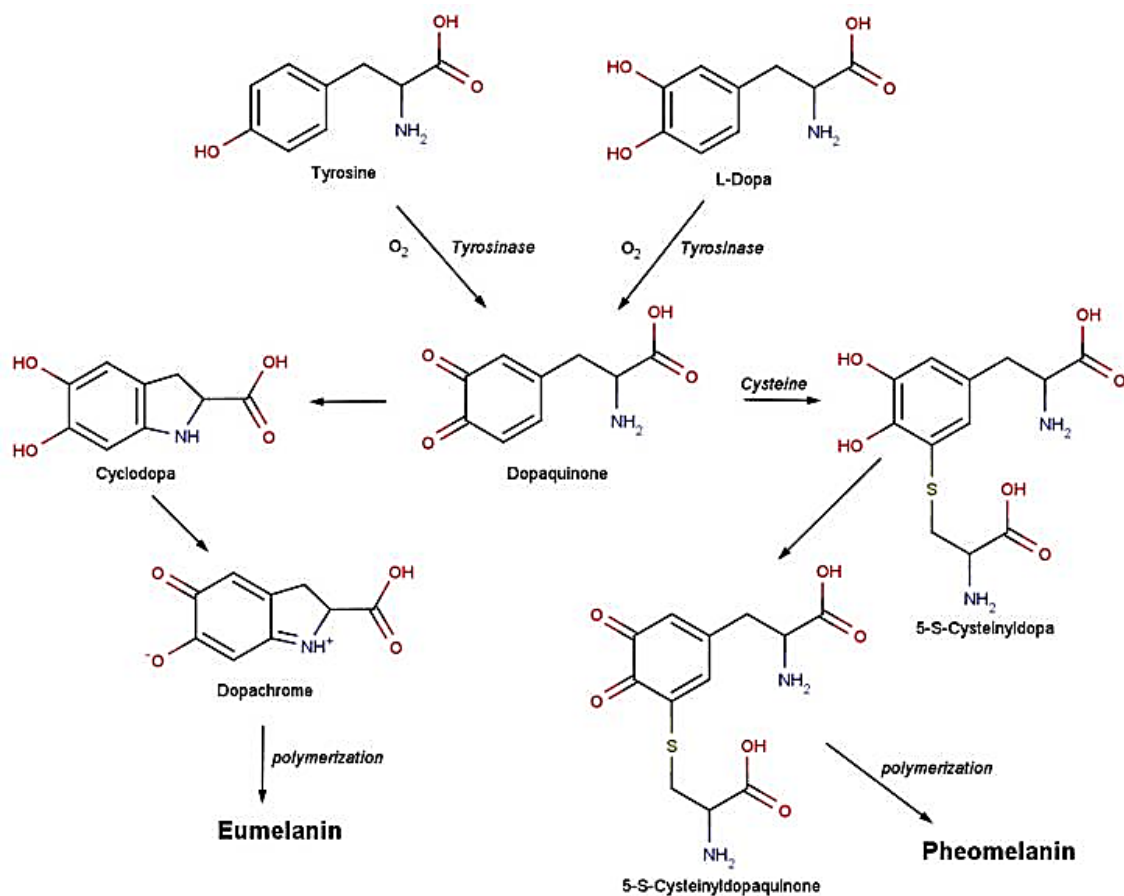
En otros estudios se ha encontrado que el extracto de acetona del fruto muestra actividad nematocida contra *Haemonchus contortus* L3, induciendo hasta un 37% de muerte tras 48 h de incubación. Además, el extracto acuoso de *R. echinocarpa* presenta actividad antimutagénica en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* YG1024, actuando mediante mecanismos desmutagénicos (prevención de daños) y

bioantimutagénicos (reparación de daños). En otro ensayo, el extracto metanólico de *R. echinocarpa* mostró mayor actividad antimutagénica en su fracción hexánica, siendo los compuestos responsables el β -sitosterol, el ácido linoleico y el ácido palmítico. El extracto acuoso presenta un bajo contenido de fenólicos, y los autores sugieren que los efectos sinérgicos (p. ej., entre el β -sitosterol y los fenólicos) contribuyen a la actividad antioxidante de *R. echinocarpa* (Ojeda-Ayala *et al.*, 2022).

5.2. Melaninas

La palabra "melanina" se refiere a un grupo de pigmentos de alto peso molecular, negros y marrones. Son compuestos bioactivos producidos por oxidación y polimerización de compuestos fenólicos, están presentes en todos los reinos de los organismos vivos y su estructura es compleja, diversa e indefinida, y participa en la termorregulación, la quimioprotección, el camuflaje, la atracción sexual, la fotoprotección, etc. Cabe destacar que los alimentos que contienen melanina se han asociado con propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes (Glagoleva *et al.*, 2020).

Actualmente, se reconocen tres tipos de melanina: eumelaninas, feomelaninas y alomelaninas. Las eumelaninas son formas predominantes que se encuentran en animales y microorganismos, y se encuentran en algunos hongos, las feomelaninas son específicas de animales superiores, mamíferos o aves. Ambos son derivados de la tirosina, pero las feomelaninas consisten en unidades monoméricas contenedoras de azufre, principalmente benzotiazina y benzotiazol, en lugar de unidades indólicas de las eumelaninas como se muestra en la Fig. 3. La neuromelanina es un subtipo de melanina que resulta de la mezcla de eumelanina y feomelanina. La melanina vegetal y fúngica, carente de nitrógeno, se denomina genéricamente alomelanina (otras melaninas). Es el grupo más heterogéneo y sus precursores son variados como el ácido homogénico que se autooxida y polimeriza en piomelanina, los ácidos catecol, cafeico, clorogénico, protocatecúico y gálico se consideran posibles precursores en plantas mientras que la mayoría de los hongos ascomicetos sintetizan melanina a



en el rango de 196-300 nm, funcionando como pigmento protector y que capta energía. Los mecanismos protectores de la melanina implican cambios en la composición y estructura química de la melanina, dispersión inelástica de fotones, disipación no radiativa de fotones absorbidos y eliminación de radicales libres. Además, la melanina es capaz de quelar eficazmente los iones metálicos, protegiendo las células de iones metálicos potencialmente tóxicos. Como la mayor parte de la energía radiativa de la luz solar se convierte en calor, la melanina también desempeña un papel importante en la termorregulación de los organismos melanizados. Además, en bacterias y hongos patógenos, la melanina es un factor determinante de virulencia, actuando como escudo frente a la respuesta inmunológica del huésped (Pralea *et al.*, 2019).

Se ha informado que la eumelanina y otros materiales a base de quinona/hidroquinona poseen propiedades antioxidantes y prooxidantes duales. Las propiedades prooxidantes de la eumelanina se atribuyen a diversas razones, por ejemplo, una razón es que la eumelanina reduce el O_2 para generar H_2O_2 y radicales $O_2^{\bullet-}$. El Fe^{3+} y el Cu^{2+} tienen un efecto sinérgico con el H_2O_2 y la eumelanina, por ejemplo, la eumelanina puede reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , que genera radicales $\bullet OH$ mediante la reacción de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$). Por otro lado, la neuromelanina puede quelar iones metálicos y eliminar radicales para proteger las células neuronales, lo que le confiere propiedades antioxidantes. A continuación en la Fig. 4 se muestran las distintas formas redox que pueden adquirir las melaninas (Xu, 2020).

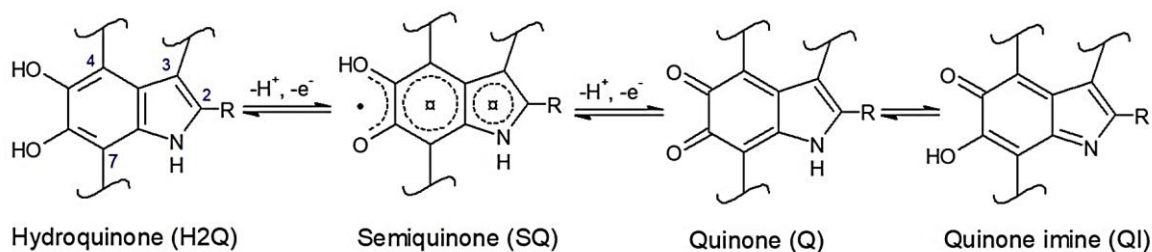


Fig. 4. Estructuras moleculares de las formas redox de las melaninas (Xu, 2020).

La melanina está presente en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano y sus actividades redox varían según el pH del tejido. Los órganos modifican el pH para regular las actividades redox de sus biomacromoléculas. A un $\text{pH} < 6.3$ la melanina o sus precursores no son reductores, a un $\text{pH} = \text{pKa}$ las propiedades redox de la melanina se activan o desactivan, a un pH entre estos valores de pKa la transferencia de electrones aumenta debido al aumento del pH y viceversa, por lo tanto, las actividades redox de la misma biomacromolécula varían en diferentes tejidos debido a los diferentes pH. Existen otras biomacromoléculas (proteínas, enzimas, péptidos y biopigmentos) que también presentan procesos de transferencia de electrones asistidos por protones (Xu, 2020).

5.2.1. Identificación y estudio de melaninas

La caracterización química de las melaninas puede ser una tarea desafiante, ya que el pigmento es altamente heterogéneo, insoluble en disolventes orgánicos, hidrofóbico y resistente a la degradación química. Estas propiedades fisicoquímicas limitan el número de enfoques analíticos capaces de identificar y caracterizar el pigmento. Además, los datos publicados hasta ahora son relativamente inconsistentes, ya que las discrepancias en la extracción y purificación, la preparación de muestras o el procesamiento de datos dificultan la comparación. Por otro lado, aplicar los mismos procedimientos en diferentes fuentes de melanina, ignorando su localización celular, sus vías biosintéticas o las posibles interferencias, no puede ofrecer resultados equivalentes (Pralea *et al.*, 2019).

Por ejemplo, existen diferencias claras en las melaninas sintéticas DHI y DHICA cuyas estructuras moleculares se muestran en la Fig. 5, siendo la primera un donante débil de átomos de H y un pobre captador de radicales libres, mientras que la segunda es un fuerte donante de átomos de H y un fuerte captador de radicales libres. Estas son consecuencias de las diferentes propiedades de deslocalización, absorción y paramagnetismo de electrones, así como del modo de agregación a nivel supramolecular. También se ha propuesto que los precursores de las melaninas tienen múltiples sitios de polimerización que permiten la formación de oligómeros

químicamente desordenados como se muestra en la Fig. 6, la convolución de las características ópticas de cada especie química hace que la absorción óptica total sea amplia (Xu, 2020). Basándose en estas diferencias intrínsecas, es esencial que los analistas tomen decisiones informadas al diseñar el flujo de trabajo para el análisis de melanina (Pralea *et al.*, 2019).

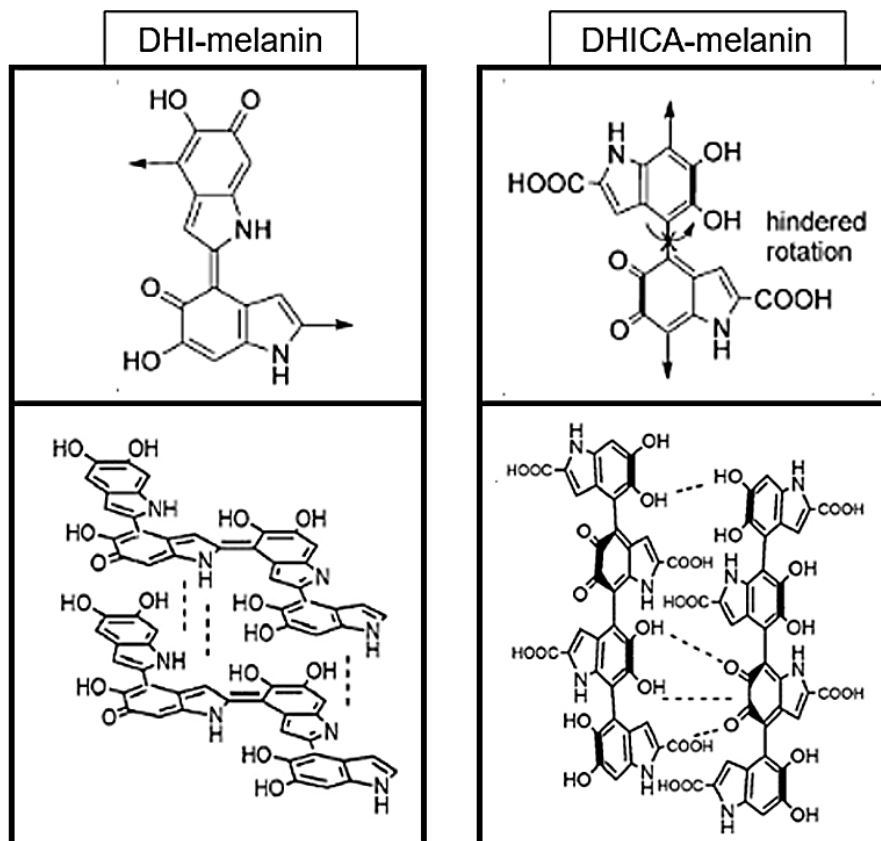


Fig. 5. Estructuras moleculares de las melaninas sintéticas DHI y DHICA (Xu, 2020).

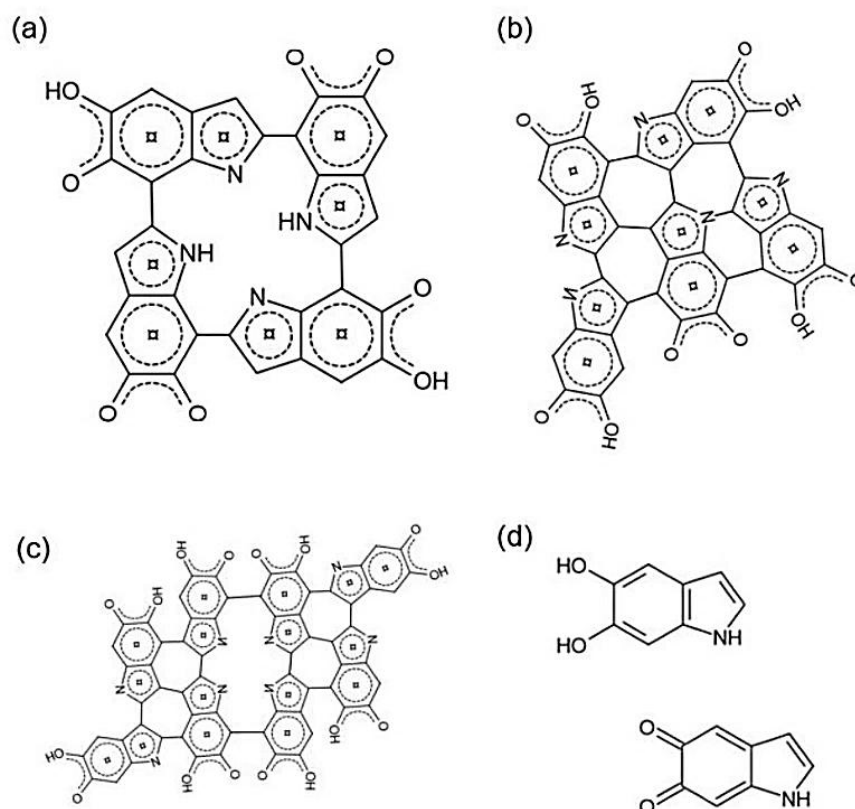


Fig. 6. Estructuras moleculares propuestas de las eumelaninas.
a) Modelo tetramérico, b) modelo pentamérico, c) modelo octamérico y d) modelo monomérico (Xu, 2020).

5.2.1.1. Extracción y purificación

Aunque numerosos estudios han utilizado extracciones hidrolíticas agresivas, algunos estudios han demostrado que las melaninas se descomponen en gran medida con el tratamiento ácido, especialmente mediante una descarboxilación extensa. Por ello, se han desarrollado métodos más suaves, como procedimientos enzimáticos que utilizan enzimas específicas de lisis de la pared celular, guanidina tiocianato para desnaturalización de proteínas y serina proteinasa para el clivaje. Se ha encontrado que la extracción ácido-base altera la estructura molecular de la melanina y afecta la concentración y distribución de metales coordinados. Por lo tanto, la melanina extraída por ácido-base puede considerarse un modelo pobre para el pigmento humano. En cambio, la melanina extraída enzimáticamente conserva la morfología intacta y debe preferirse al estudiar melanina humana. Como mejora, se ha propuesto la molienda de

tejidos en nitrógeno líquido antes de la digestión enzimática para reducir el calor generado durante la interrupción mecánica (Y. Liu *et al.*, 2003; Pralea *et al.*, 2019).

Desde 1956 hasta 1981 se estuvieron utilizando urea, papaína, tripsina, proteinasa PSF 2019, metabisulfito de sodio, dimetilfurano y bromuro de litio para aislar melanosomas del cabello humano, los gránulos de melanina capilar aislados enzimáticamente eran más homogéneos que la melanina extraída por ácido-base. A partir de 1990 se comenzó a usar proteinasa K, colagenasa, pronasa E, proteasa tipo XIV y Triton X-100 para el aislamiento de melaninas de la sustancia negra del cerebro, cabello e iris humanos y se descubrió que la caracterización química y espectral de estas melaninas revelaba diferencias estructurales marcadas que desafían la creencia común de que todas las melaninas son similares independientemente de su origen. Se sugirió que las diferencias entre melaninas podrían deberse a la diversidad de funciones, sitios de biosíntesis y almacenamiento. Por ejemplo, los diferentes lugares de biosíntesis varían respecto a la exposición a agentes químicos y físicos (tanto naturales como ambientales), lo que puede afectar la estructura, el estado de oxidación de los constituyentes moleculares y la composición metálica del pigmento (Y. Liu *et al.*, 2003).

El protocolo estándar de aislamiento de melaninas incluye la destrucción de la estrecha asociación de proteínas y otros componentes biológicos con las melaninas que puede lograrse mediante hidrólisis básica seguida de hidrólisis ácida y la purificación que se lleva cabo con sucesivos pasos de lavado del precipitado con disolventes orgánicos como cloroformo, éter de petróleo, acetato de etilo, acetona o etanol absoluto. Extraído de esta manera, el material pigmentario representa un polvo oscuro y brillante (Glagoleva *et al.*, 2020).

5.2.1.2. Caracterización fisicoquímica

La identificación y caracterización de las melaninas suele representarse mediante pruebas fisicoquímicas convencionales. Su función es respaldar, en una fase temprana, que el pigmento aislado podría ser melanina, para que se puedan aplicar

métodos más avanzados. Estas propiedades características de la melanina incluyen baja solubilidad en agua destilada y en los disolventes más orgánicos e inorgánicos, parcialmente soluble en ácidos sulfúricos y nítricos concentrados, y totalmente soluble en hidróxido de sodio y álcalis acuosos, blanqueamiento cuando se expone a agentes oxidantes fuertes, como peróxido de hidrógeno, permanganato potásico, dicromato de potasio, hipoclorito de sodio o agua de bromo, reacción positiva para polifenoles con la exposición al cloruro férrico que provoca la precipitación de un material floculento que se disuelve gradualmente cuando se eleva la concentración de cloruro férrico. Los resultados de las reacciones indican la presencia de grupos quinoides y fenólicos en las melaninas. Otras características de las melaninas son que reaccionan con ditionito sódico y solución de potasio, y reacción con solución de nitrato de plata amoniacal (Glagoleva *et al.*, 2020; Pralea *et al.*, 2019).

Además de las pruebas químicas, se han aplicado técnicas espectroscópicas para confirmar la naturaleza melánica de los pigmentos.

La espectroscopía UV-Vis es la más utilizada para identificar y cuantificar melaninas, las melaninas de diferentes orígenes se caracterizan por una alta absorción en el espectro visible y ultravioleta, con un máximo de 196–300 nm que disminuye gradualmente hacia longitudes de onda más largas como se puede apreciar en la Fig. 7a, la siguiente disminución de absorción es casi lineal para la mayoría de las melaninas, por lo tanto, cuando el logaritmo de absorbancia de una solución de melanina se representa en función de la longitud de onda, se obtienen líneas rectas con pendientes negativas, estas pendientes de los gráficos lineales se utilizan a menudo como un criterio importante para la identificación y caracterización de las melaninas como se muestra en la Fig. 7b. Además, la ausencia de cualquier nivel de absorción en 260 nm y 280 nm sugiere la ausencia de cualquier impureza de ácido nucleico, lípido o proteína (Glagoleva *et al.*, 2020).

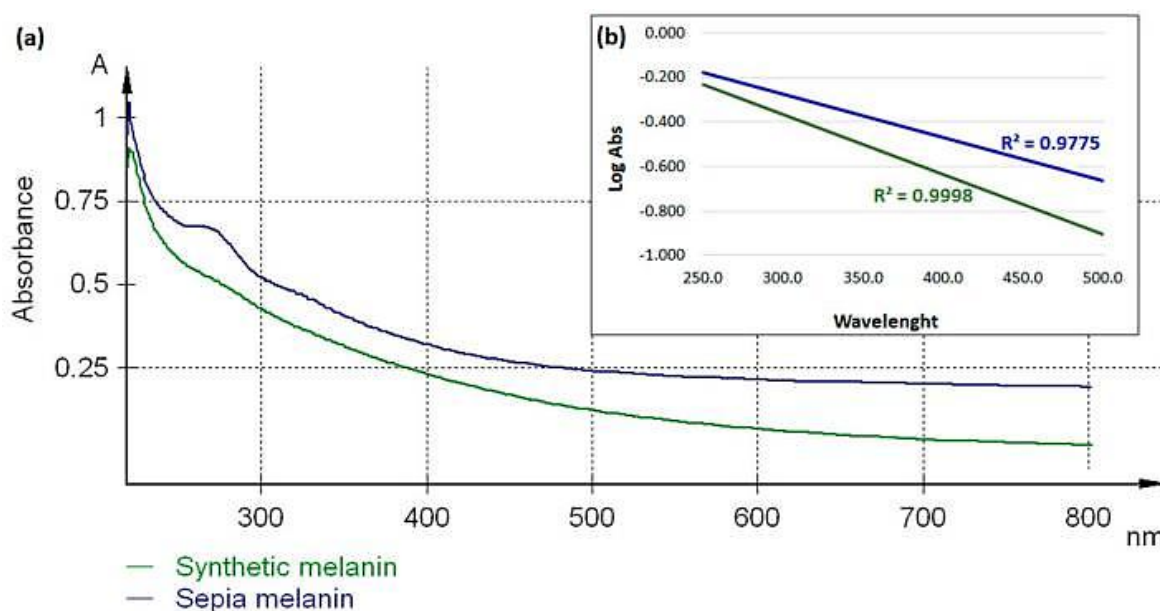


Fig. 7. Espectros UV-vis característicos de las melaninas disueltas en NaOH 0.1 M. (a) Espectro de absorción UV-vis de la melanina sintética y de *Sepia officinalis*, (b) las líneas de tendencia del logaritmo de absorbancia frente a longitud de onda (Pralea et al., 2019).

Para identificar los principales grupos funcionales en las macromoléculas de melanina, se ha utilizado espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Aunque los espectros infrarrojos de las melaninas varían según el tipo de melanina y el procedimiento de extracción, existen varias bandas características que pueden seguirse para identificar los principales grupos funcionales de la macromolécula de melanina. Los espectros típicos FT-IR de la melanina incluyen bandas características de -OH y -NH entre $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ (grupos amino, amida, carboxilo, indol y pirrol), de C-H entre $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ y entre $1465\text{--}1375\text{ cm}^{-1}$ (grupos alifáticos), de C=C y C=O entre $1650\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (grupos aromáticos y carboxilo), de N-H y C-N entre $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ (grupos indol), de -OH entre $1250\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$ (grupos fenol), de C-O-C entre $1150\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ (posibles moléculas condensadas), por debajo de 1100 cm^{-1} , las bandas de absorción fueron generalmente débiles y se asignaron a C-H y sistemas conjugados -CH= (grupos aromáticos y alqueno) como se muestra en la Fig. 8. Sin embargo, dependiendo de la fuente de melanina, también se han identificado otras bandas específicas (Pralea et al., 2019).

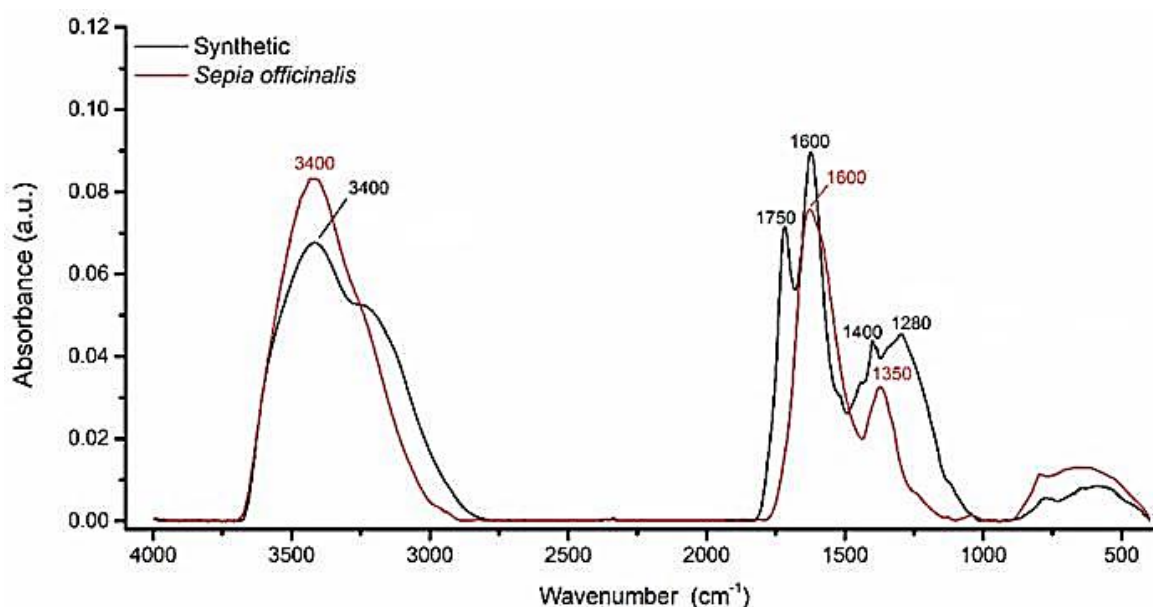


Fig. 8. Espectros FT-IR de la melanina sintética y de *Sepia officinalis* (Pralea et al., 2019).

Mediante los análisis por resonancia magnética nuclear ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se puede confirmar con mayor precisión la estructura molecular de las melaninas mediante la identificación de hidrógenos y carbonos aromáticos, grupos metilo o metileno unidos a átomos de nitrógeno y/u oxígeno, grupos NH unidos a indol y fragmentos de alquilo (Glagoleva et al., 2020). Como ejemplo de espectros característicos, en la Fig. 9 se presentan los espectros de RMN obtenidos para la melanina intracelular extraída del micelio de *Lachnum singerianum* YM296. como se muestra en la Fig. 9a, en las regiones aromáticas, los cambios químicos entre 6-8 ppm se atribuyen a los hidrógenos aromáticos de los anillos de indol y/o pirrol de la cadena polimérica de melanina, entre 3.2-4.2 ppm, los picos observados son causados por los grupos metilo o metileno unidos a átomos de nitrógeno y/u oxígeno. La presencia de un grupo NH vinculado al indol se atribuye a señales dentro del rango de 1.3-2.5 ppm. Además, los cambios químicos entre 0.2-2 ppm se atribuyen generalmente a la vibración de estiramiento de los fragmentos alquilo, lo que indica trazas de proteínas residuales. Como se puede apreciar en la Fig. 9b, los picos entre 160-185 ppm se atribuyen típicamente a los átomos de carbono en los grupos carboxilo y amida, o a los grupos carbonilo de los enlaces peptídicos. A continuación, los picos identificados entre 120-

140 ppm podrían ser generados por carbonos aromáticos, probablemente involucrados en sistemas indólicos o pirrólicos. Los picos de resonancia de los átomos de carbono unidos a nitrógeno o azufre son visibles entre 50-60 ppm, mientras que los picos de los átomos de carbono de los grupos metilo y metileno se detectan entre 10-40 ppm (Pralea *et al.*, 2019).

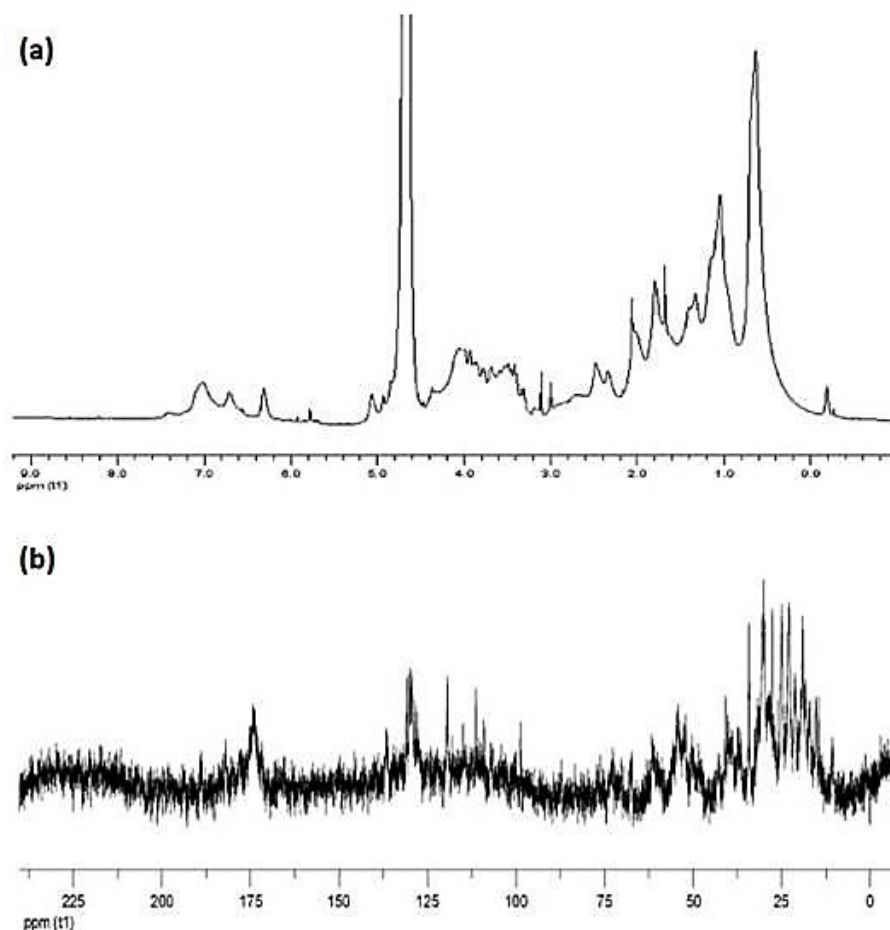


Fig. 9. Espectros RMN de las melaninas.

(a) Espectro ^1H -RMN y **(b)** espectro ^{13}C -RMN de las melaninas extraídas del micelio de *L. singerianum* YM296 (Pralea *et al.*, 2019).

Las melaninas son biopolímeros paramagnéticos debido a la presencia de radicales libres estables, que pueden detectarse mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR), una señal EPR característica de las melaninas se atribuye a los radicales semiquinona, los cuales se generan a partir de la interacción

de quinonas e hidroquinonas en presencia de agua como se muestra en la Fig. 10 (Glagoleva *et al.*, 2020; Xu, 2020).

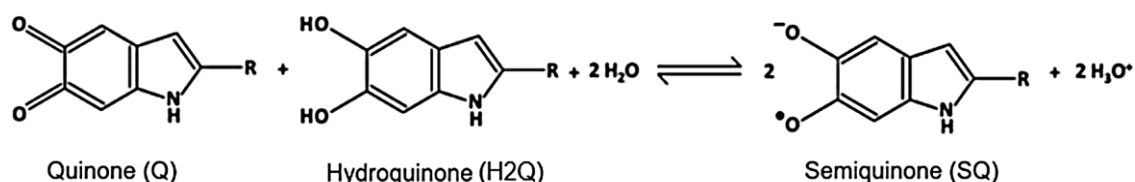


Fig. 10. Reacción de comproporción que produce radicales semiquinona (Xu, 2020).

Recientemente, se obtuvieron resultados prometedores en la determinación de la estructura de las melaninas mediante espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Aplicando este método para resolver la estructura de la melanina de avena, resultó ser un homopolímero distanciado en 162 Da, formado a partir del ácido p-cumánico y consiste principalmente en oligómeros de bajo peso molecular de 3-9 unidades monoméricas. La melanina DHN producida por el patógeno fúngico *Mycosphaerella fijiensis* también se estudió mediante este método, se informó que la masa molecular de la melanina DHN rondaba los 8,000 Da, mientras que el espectro resultante presentó una separación bien definida de 161.8 Da entre picos, asociada con unidades de 1,8-DHN como se muestra en la Fig. 11. Este patrón podría explicarse por el riguroso tratamiento requerido para la extracción y purificación de la melanina, considerando que la masa molecular de la melanina DHN sintética se reportó por encima de los 60 kDa (Glagoleva *et al.*, 2020; Pralea *et al.*, 2019).

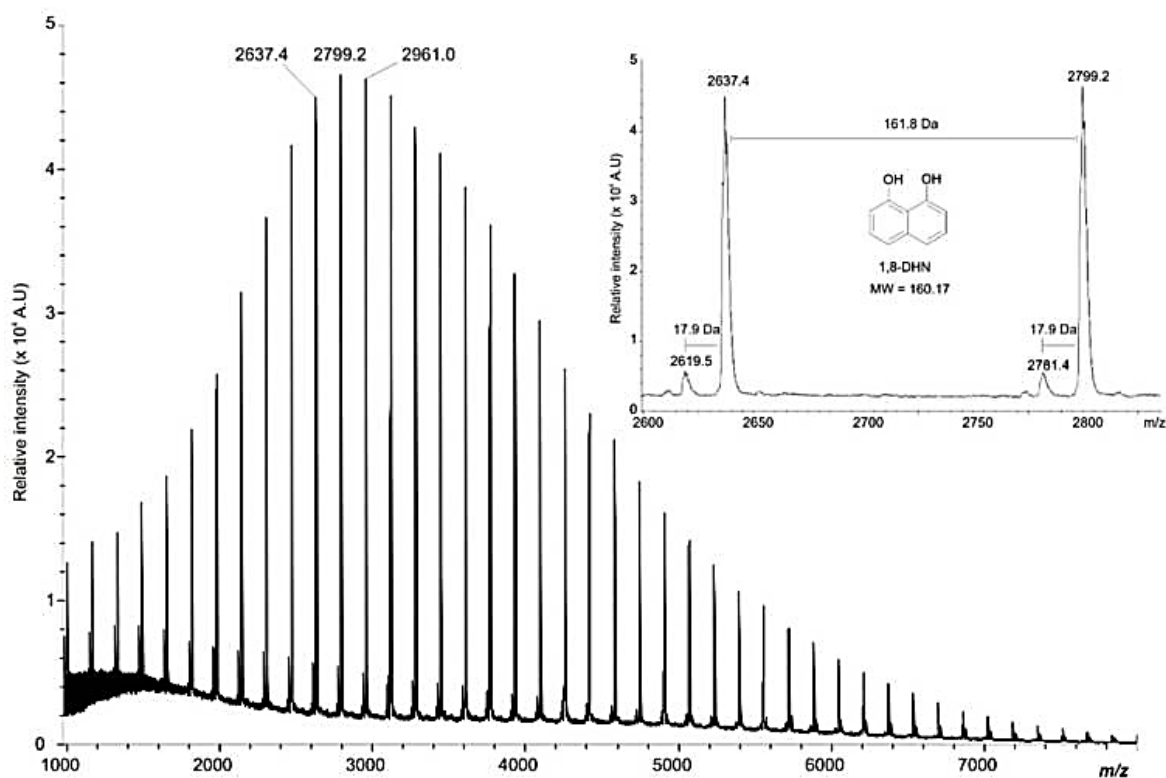


Fig. 11. MALDI-TOF MS de la melanina DHN extraída del micelio de *M. fijiensis* (Pralea et al., 2019).

5.2.1.3. Cuantificación

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es la técnica de oro a la hora de cuantificar melanina, especialmente cuando es necesario distinguir entre eumelanina y feomelanina. Este método es altamente sensible y preciso, permitiendo cuantificar diferentes tipos de melanina presentes en las muestras, mediante la detección de sus productos específicos de degradación. Como esta técnica no se realiza fácilmente en la mayoría de los laboratorios (requieren equipos y conocimientos muy específicos), la espectroscopía de absorción es el método más utilizado para cuantificar la melanina. Tras la solubilización de pigmentos de melanina a partir de células o muestras de tejido en álcali caliente y fuerte (Solueno-350 o 1 M NaOH), la cantidad total de melanina puede estimarse espectrofotométricamente analizando la absorbancia (comúnmente 405 nm) y comparando los datos obtenidos con una curva estándar de melanina sintética o melanina aislada de *Sepia officinalis* (Fernandes et al., 2016).

Aunque la espectroscopía de absorción es la técnica más empleada, en un estudio se encontró que este método sobrevalora claramente el contenido de melanina comparado con la espectroscopía de fluorescencia, que es el mejor método para la cuantificación de la melanina, ya que demostró ser altamente específica y precisa, detectando incluso pequeñas variaciones en la concentración de melanina, las melaninas no son fluorescentes nativamente pero, una vez sometidas a condiciones oxidativas (calentamiento en solución alcalina de peróxido de hidrógeno) adquieren fluorescencia. Este método también puede aplicarse a la cuantificación de la melanina en matrices biológicas complejas como embriones de pez cebra y cabello humano, ya que se forman productos solubles y la señal fluorescente de la melanina oxidada no se ve afectada por contaminación proteica o lipídica (Fernandes *et al.*, 2016).

Según la literatura, el H_2O_2 es eficiente en la oxidación alcalina tanto de la eumelanina como de la feomelanina, sin embargo, aún se desconoce si sus productos de oxidación presentan propiedades espectroscópicas similares, lo que se considera adecuado para la cuantificación de la melanina total mediante el método fluorimétrico, se necesitan más estudios para comprender la contribución de cada tipo de melanina a la señal fluorescente. Por lo tanto, el método basado en fluorescencia debería emplearse en sistemas esencialmente eumelánicos (Fernandes *et al.*, 2016).

5.2.2. Melaninas vegetales

Las plantas son una fuente importante de pigmentos naturales incluyendo melaninas, sin embargo, los estudios y usos de las melaninas vegetales son escasos (Gil-Avilés *et al.*, 2019). Durante mucho tiempo, estos pigmentos vegetales no se consideraron melanina ya que, según la definición del término "melanina", formulada a partir de exploraciones de melanina en animales, debe ser un pigmento que contenga nitrógeno, sin embargo, las melaninas de plantas no contienen nitrógeno. La terminología fue reconsiderada y el requisito de nitrógeno fue excluido de la definición del término "melanina" (Glagoleva *et al.*, 2020).

Las melaninas siguen siendo el pigmento más enigmático en las plantas. La pobre solubilidad de la melanina, en particular de los disolventes orgánicos, y su naturaleza polimérica compleja limitan significativamente su estudio. En comparación con los de animales y microorganismos, los aspectos bioquímicos, moleculares y genéticos de la formación de melanina en plantas han sido menos estudiados. Una de las razones, es que la melanina vegetal se acumula en envoltorios duros de semillas donde pueden estar presentes otros compuestos de colores similares, como las proantocianidinas (taninos condensados) (Glagoleva *et al.*, 2020).

El color marrón y negro de las semillas es un rasgo muy extendido en las plantas, el color puede estar causado por la presencia de melaninas, que son pigmentos de alto peso molecular. Debido a la capacidad de las superficies negras para absorber más energía solar que las superficies claras y convertirla en calor, teóricamente, las semillas de grano negro pueden madurar antes que las amarillas. Un estudio comparativo de variedades de cebada con semillas negras y blancas demostró que las primeras tienden a madurar antes que las segundas (Glagoleva *et al.*, 2020).

Las melaninas proporcionan resistencia mecánica adicional a las cáscaras de semillas, protegiéndolas de daños. Además, la melanina proporciona resistencia a insectos y plagas debido a su toxicidad. En el girasol, las semillas con cubierta negra se dañan menos por las larvas de topo que las blancas (Glagoleva *et al.*, 2020).

Mediante el uso de pruebas químicas en combinación de las técnicas espectroscópicas descritas, se ha demostrado la naturaleza melánica de los pigmentos negros en las semillas de las siguientes especies: sandía (*Citrullus lanatus*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), uva (*Vitis vinífera*), tomate, aceituna fragante, jazmín nocturno, sésamo (*Sesamum indicum*), ipomoea (*Ipomoea purpurea*), mostaza negra (*Brassica nigra*), colza (*Brassica napus*), castaño (*Castanea mollissima*), ajo, avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare*), algunas de las cuales se muestran en la Fig. 12 (Glagoleva *et al.*, 2020).



Fig. 12. Algunas semillas que acumulan melaninas.
Primera columna (de arriba a abajo): avena y castaño, segunda columna: cebada, sandía y girasol, tercera columna: ipomoea, uva y trigo sarraceno, cuarta columna: mostaza negra, colza y sésamo (Glagoleva et al., 2020).

5.2.2.1. Biosíntesis de melaninas vegetales

La síntesis de melanina vegetal está mayormente asociada con la reacción de pardeamiento enzimático que ocurre en los tejidos vegetales heridos. Esta reacción ocurre cuando, debido a la ruptura de los compartimentos celulares, las polifenol-oxidasas (PPOs) que pertenecen a la familia de oxidorreductasas que contienen cobre, se liberan de los cloroplastos e interactúan con sus sustratos vacuolares (compuestos fenólicos) y los oxidan en presencia de oxígeno para producir o-quinonas altamente reactivas, que a su vez se polimerizan no enzimáticamente entre sí o interactúan con otros compuestos, como tioles, aminoácidos y péptidos, formando productos coloreados. También pueden interactuar lentamente con el agua, lo que da lugar a la formación de trifenoles o pueden reducirse a los fenoles originales como se muestra en la Fig. 13 (Nicolas *et al.*, 1994)..

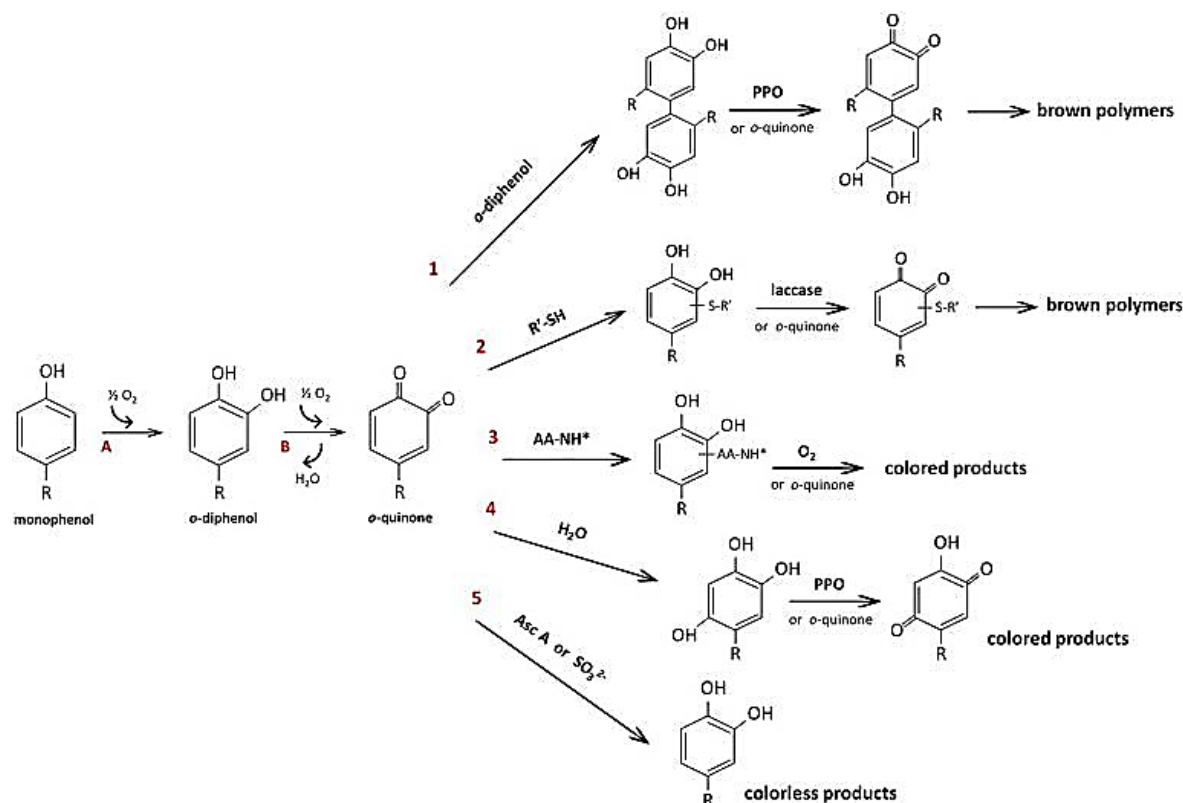


Fig. 13. Conjunto de reacciones que dan lugar a las melaninas en vegetales. A y B son reacciones catalizadas por la monofenolasa (cresolasa) y difenolasa (catecolasa); 1-5 son reacciones mediadas por la o-quinona y distintos grupos funcionales (Nicolas et al., 1994).

5.2.2.2. Melaninas del fruto de papache

En particular, las melaninas insolubles del fruto de *R. echinocarpa* mostraron actividad inmunomoduladora al aumentar la proliferación de esplenocitos. Algunos autores argumentan que este efecto se debe a las estructuras fenólicas presentes en las melaninas. Se sugiere que los fenólicos inducen enzimas endógenas (p. ej., superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y secuestran metales (p. ej., hierro y cobre). Las melaninas insolubles del fruto de *R. echinocarpa* también presentan una alta actividad antioxidante según los métodos FRAP ($1098.41 \pm 11.43 \mu\text{mol TE/g}$) y ABTS ($1333.5 \pm 8.45 \mu\text{mol TE/g}$), se observó un efecto dosis-respuesta con mejores resultados con las dos concentraciones más bajas de melanina (0.01 y 0.1 mg/ml) que con ácido ascórbico (Ojeda-Ayala et al., 2022).

Estudios sugieren que la solubilidad de las melaninas de *R. echinocarpa* está asociada con carbohidratos unidos a las estructuras fenólicas de las melaninas. Asimismo, se ha demostrado que la hidrólisis de las melaninas solubles produce melaninas insolubles, así como ácidos orgánicos como el benceno dicarboxílico, octadecanoico y hexadecanoico, los cuales quedan en la fase de diclorometano y carbohidratos como talosa, manosa, galactopiranososa y arabinosa, los cuales quedan en la fase acuosa (Gil-Avilés *et al.*, 2019).

5.3. Factor de protección solar

El método Mansur donde las muestras se analizan *in vitro* en la región ultravioleta 290-320 nm (radiación UVB), principal responsable de los daños cutáneos como el eritema, espectrofotométricamente se determina la absorción y se aplica una fórmula matemática para estimar su FPS, la fórmula pondera la intensidad de la radiación solar en cada longitud de onda y la respuesta eritemática de la piel. El FPS estimado refleja la capacidad de la muestra para reducir la intensidad de la radiación UV que llega a la piel. De acuerdo con la literatura, este método tiene buena correlación con los análisis *in vivo* para filtros solares orgánicos (Mansur *et al.*, 1986; Sayre *et al.*, 1979).

La relación que existe entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda son constantes, fueron determinadas en 1979 por Sayre *et al.* y se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Producto $EE \cdot I$ normalizado para cada longitud de onda (Sayre *et al.*, 1979).

Longitud de onda (nm)	EE*I (normalizado)
290	290
295	295
300	300
305	305
310	310
315	315
320	320

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Muestras

Para el desarrollo del proyecto se emplearon frutos de papache recolectados de dos regiones distintas de Sinaloa (Cahuinahuaro, Mocorito el 10 de diciembre del 2024 y Rancho Viejo, Badiraguato el 17 de diciembre de 2024), así como sus respectivas harinas liofilizadas de la pulpa.

6.2. Métodos

A continuación, se mencionan los distintos procedimientos realizados para cada uno de los análisis llevados a cabo durante el desarrollo del proyecto.

6.2.1. Análisis fisicoquímicos de la pulpa

Primero se analizaron los sólidos solubles del fruto de papache fresco de las dos regiones, Cahuinahuaro y Rancho Viejo usando el refractómetro de mano (ATAGO®), para ello se colocó un poco de pulpa en el lector del refractómetro hasta que se cubrió completamente y se tomó la lectura, para tomar la siguiente lectura se limpió el lector del refractómetro con servilletas Kimtech® Kimwipes cuidando de no rayar la lente. Las lecturas se realizaron por triplicado.

Después se analizó el color de la pulpa fresca del fruto de cada región usando un colorímetro (Konica Minolta® Chroma Meter CR-400), el cual se calibró con un color estándar blanco. Se tomaron aproximadamente 9 ml de pulpa fresca y se colocaron en vaso de precipitado de 10 ml el cual se forró con cinta negra para disminuir las interferencias, a la muestra se le tomó la lectura de color jalando el gatillo, evitando tocar la muestra con la lente e impidiendo el paso de luz hacia la muestra, se registraron las coordenadas CieLab (L^* , a^* , ΔE , b^* , c^* y h). Para la siguiente lectura se limpió el vaso de precipitado de 10 ml y se enjuagó con agua destilada. A la pulpa de cada región se le tomó la lectura por triplicado.

Posteriormente se determinó la actividad de agua (a_w) de la pulpa fresca de cada región por triplicado, para ello se utilizó un higrómetro (Novasina® LabStart- a_w), el cual se calibró usando un estándar de sal SAL-T-75%rH (0.753 a_w), las muestras se introdujeron en recipientes de medición dentro del higrómetro, se cerró y se presionó el botón Start, se esperó a que el higrómetro emitiera su señal y se tomó la lectura de a_w .

Se midió el pH de la pulpa fresca de cada región disueltas en agua destilada por triplicado con ayuda de un potenciómetro (Hanna Instruments® HI 2210), el cual se calibró usando buffers pH 4 y 7, las lecturas se realizaron sobre disoluciones de pulpa 1:10.

También se midió la acidez titulable de la pulpa fresca de cada región. Primero se prepararon 25 ml de hidróxido de sodio 0.01 N mezclando 250 μ l de hidróxido de sodio 1 N con 15 ml de agua destilada en un matraz aforado de 25 ml y con agua destilada. Para medir la acidez de la pulpa se pesaron 300 mg de pulpa y se disolvieron con 30 ml de agua estilada (disolución 1:100), cada disolución se tituló con hidróxido de sodio 0.01 N en agitación constante con magnetos y se midió el volumen gastado de NaOH para llegar a un pH de 8.3 medido con ayuda de un potenciómetro. La acidez se calculó usando la siguiente ecuación y se expresó como porcentaje de ácido cítrico.

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V_{NaOH} \cdot N_{NaOH} \cdot ME}{m} * 100 \quad \text{ecuación (1)}$$

Donde V_{NaOH} es el volumen de hidróxido de sodio gastado en la titulación en litros (L), N_{NaOH} es la normalidad de la solución de NaOH (en eq/L), ME es la masa equivalente del ácido más abundante de la muestra (para el ácido cítrico: 64.04 g/eq) y m es la masa de la muestra en gramos (g).

Finalmente se calculó el porcentaje de humedad a partir de los pesos usados y registrados del procedimiento de preparación de las muestras usando la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(PFra + PPul) - PFraPol}{PPul} * 100 \quad \text{ecuación (2)}$$

Donde PFra es el peso de los frascos vacíos en gramos (g), PPul es el peso de la pulpa con semillas en gramos (g), PFraPol es el peso de los frascos con pulpa liofilizada en gramos (g).

6.2.1.1. Determinación del índice de madurez de los frutos

A medida que las frutas avanzan en su proceso de maduración, se incrementa la cantidad de azúcares mientras que la acidez total disminuye como se muestra en la Fig. 14. Esta dinámica permite establecer un índice de madurez tecnológica, el cual se expresa mediante la ratio Azúcares/Acidez (Centro Tecnológico de la Vid y el Vino., 2010). Un mayor índice de madurez refleja un mayor grado de madurez.

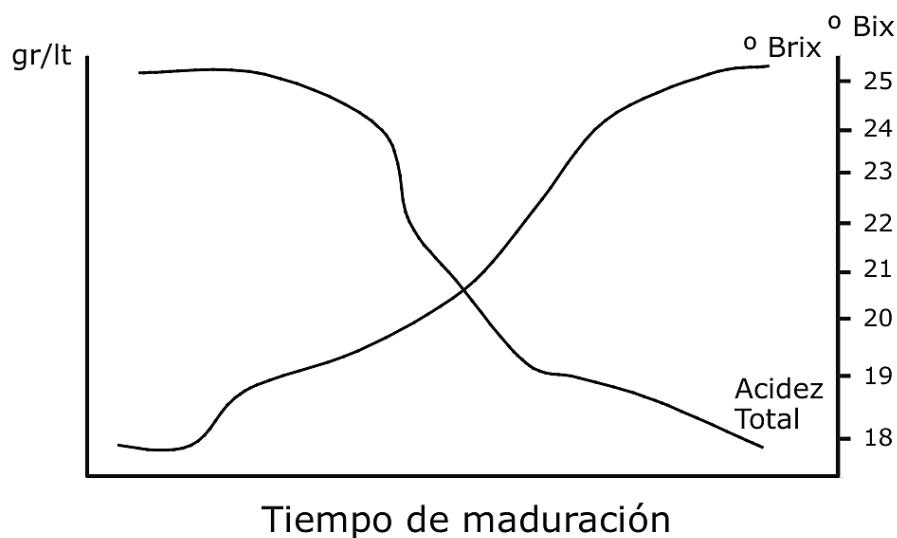


Fig. 14. Cambios de acidez y °Brix durante la maduración de las uvas viníferas. (Centro Tecnológico de la Vid y el Vino., 2010).

Para la determinación del índice de madurez (IM) de los frutos de papache estudiados se usaron los °Brix y acidez titulable obtenidos de los análisis físicoquímicos de la pulpa, los IM se calcularon usando la siguiente formula:

$$IM = \frac{^{\circ}Brix}{\% \text{ Acidez}} \quad \text{Ecuación (3)}$$

6.2.2. Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras, primero se obtuvieron las harinas de los frutos de papache, después se llevaron a cabo extracciones asistidas con una sonda ultrasónicos (Ultrasonic Processor CP50) usando agua destilada como solvente y se calcularon los rendimientos de extracción, finalmente se prepararon soluciones stock de 10 mg/ml para los ensayos usando los extractos liofilizados.

6.2.2.1. Obtención de harina de papache

Para la preparación de las muestras se procedió a suspender 60.2829 g de pulpa de papache con semillas de la región de Rancho Viejo, Badiraguato con 50 ml de agua destilada en un frasco de plástico genérico previamente pesado y etiquetado con el ID RVPS, y en otro frasco de plástico con peso registrado y etiquetado con el ID CNPS se suspendieron 63.1017 g de pulpa de papache con semillas de la región de Cahuinahuato, Mocorito con 50 ml de agua destilada, ambas suspensiones se pusieron en agitación en una placa de calentamiento (Ika® C-mag H77) con magnetos protegidos de la luz por 1 hora y se pesaron, posteriormente se llevaron a ultracongelar y se liofilizaron con un equipo LabConco® Freezone 6 7934022. Una vez liofilizados, los frascos con las muestras se pasaron a un desecador para ponerlas a temperatura ambiente y después se registró su peso para calcular el % de humedad. Ya que se pesaron las muestras, se trituraron en un procesador de alimentos y se terminaron de moler en morteros, posteriormente se pasaron a tubos falcón de 50 ml etiquetados con sus respectivas ID, se cerraron y sellaron con Parafilm para evitar que se difundiera la humedad o el oxígeno. Las muestras se almacenaron protegidos de la luz a -20 °C hasta su uso.

6.2.2.2. Extracción de melaninas solubles

Para las extracciones se partió tanto de las harinas liofilizadas de pulpa de papache etiquetadas con las ID CNP para las muestras de Cahuinahuaro y RVP para las muestras de Rancho Viejo, las cuales fueron secadas el 13 de marzo del 2025 y molidas el 25 de marzo del 2025 por María Fernanda Sandoval González, estudiante de maestría en el CIIDIR Sinaloa quien fue quien nos proporcionó la materia prima, así como de las harinas liofilizadas de pulpa-semilla RVPS y CNPS.

Primero se montó el sistema de extracción dentro de la campana de extracción para aislar el ruido generado, el sistema de extracción consistió en una placa de calentamiento junto a un soporte universal con unas pinzas sosteniendo la sonda de ultrasonidos. Después se calentaron 300 ml de agua potable dentro de un vaso de precipitado de 500 ml, al cual se le adaptó un sostén de unicel para poder colocar dentro un tubo Falcon de 50 ml en baño maría sin que se moviera de posición. También se puso a calentar agua destilada en otro vaso de precipitado de 250 ml en la misma placa hasta la temperatura de 100 °C.

Se pesaron 5 g de cada tipo de harina de cada región por triplicado, dando un total de 12 pesadas y se colocaron en tubos Falcon de 50 ml, los cuales se etiquetaron con las ID de sus respectivas muestras (CNAP, CNBP, CNCP, CNAPS, CNBPS, CNCPS, RVAP, RVBP, RVCP, RVAPS, RVBPS y RVCPS). Uno por uno a cada tubo Falcon se le añadió 40 ml de agua destilada a 100 °C y se agitó en un vortex (LabNet® VX100) por 1 min, después se colocó en el baño maría y se apagó la fuente de calor para someterlo a ultrasonidos con la sonda a 60 de amplitud por 1 hora protegido de la luz. Posterior a la sonicación, a cada tubo se le agregó 10 ml de agua destilada caliente y se llevó a baño maría con agitación (Thermo Scientific® Precision TSSWB27) de 200 rpm a 60 °C por 1 hora. Después, los tubos se centrifugaron en un equipo Hermle® Z366 por 30 min a 6000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes en frascos de plástico genéricos con peso registrado y etiquetados con sus respectivas ID. A cada pellet que quedó se le realizaron 2 reextracciones consecutivas siguiendo el mismo proceso

partiendo de la adición de 40 ml de agua destilada a 100 °C y seguido de la agitación en vortex, etc.

Cada sobrenadante de cada ciclo se mezcló con el sobrenadante del primer ciclo, se protegieron de la luz con papel aluminio y se llevaron a ultracongelación para después liofilizarlos. Ya liofilizados, los frascos con los extractos se colocaron en un desecador para llevarlos a temperatura ambiente y después se pesaron para calcular el rendimiento de extracción. Después de pesar los extractos se homogeneizaron en morteros y se pasaron a tubos falcón de 50 ml etiquetados con sus ID, se cerraron y sellaron con Parafilm para evitar que se humedecieran u oxidaran. Los extractos se almacenaron protegidos de la luz a -20 °C hasta su uso.

Se calculó el rendimiento de extracción siguiendo la siguiente formula:

$$\%Rendimiento = \frac{PFraExtS - PFra}{Pm} * 100 \quad \text{ecuación (4)}$$

Donde PFraExtS es el peso de los frascos con extracto seco en gramos (g), PFra es el peso de los frascos vacíos en gramos (g) y Pm es el peso de las muestras que se sometieron a extracción en gramos (g).

6.2.2.3. Preparación de disoluciones stock

En la mayoría de los experimentos se prepararon stocks nuevos de los extractos a la concentración de 10 mg/ml. Los stocks se prepararon pesando 50 mg de cada extracto liofilizado y se disolvieron con 3 ml de agua destilada en matraces aforados de 5 ml, cada matraz se agitó en vortex, se llevó a baño maría con ultrasonidos con un equipo Emerson® Branson CPX2800H a 25 °C por 10 min y después se aforó con agua destilada. Cada solución preparada se transfirió a un tubo Eppendorf de 5 ml

etiquetado con una letra mayúscula y se almacenó protegido de la luz a 4 °C hasta su uso. En la Fig. 15, se muestra que letra le tocó a cada stock de extractos.

CNAP -->> A	RVAP -->> D	CNAPS -->> G	RVAPS -->> J
CNBP -->> B	RVBP -->> E	CNBPS -->> H	RVBPS -->> K
CNCP -->> C	RVCP -->> F	CNCPS -->> I	RVCPS -->> L

Fig. 15. ID que le tocó a cada stock de extractos.

6.2.3. Caracterización de los extractos

Para la caracterización de los extractos se realizaron distintas determinaciones, primero se llevó a cabo la determinación del contenido de melaninas en los extractos, después se les analizó el contenido de azúcares reductores, posteriormente se determinó el potencial nutraceutico de los extractos mediante ensayos de actividad antioxidante e inhibición de la enzima α -amilasa, luego se determinaron los espectros UV-vis de los extractos y a partir de los datos obtenidos se calcularon las pendientes del Log(Abs) vs longitud de onda y el factor de protección solar (FPS), finalmente se determinaron los espectros FT-IR tanto de los extractos como de las harinas liofilizadas.

6.2.3.1. Caracterización espectroscópica UV-vis

Para la caracterización de los espectros UV-vis de los distintos extractos se prepararon soluciones trabajo en agua miliQ y EtOH 96% usando pulls de extractos siguiendo la metodología descrita por (DOS REIS *et al.*, 2009), con algunas modificaciones.

Los pulls de extractos se ajustaron a 0.2 mg/ml de agua miliQ y EtOH 96%. Primero se prepararon pulls de soluciones stock 10 mg/ml, para ello se tomaron 666 μ l de solución stock de cada tipo y se mezclaron en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID, se siguió el mismo esquema que en el método de cuantificación de melaninas (Fig. 16). Después se prepararon soluciones de los pulls extractos a 5 mg/ml tomando 950 μ l de cada pull de extractos de 10 mg/ml y

mezclándolos por separado con 950 µl de agua miliQ en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Posteriormente se prepararon soluciones pull de extractos a 1 mg/ml mezclando 400 µl de las soluciones de 5 mg/ml con 1600 µl de agua miliQ o EtOH Abs en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los pulls de extractos a 0.2 mg/ml se elaboraron mezclando 400 µl de las soluciones de 1 mg/ml con 1600 µl de agua miliQ (para los pulls en agua miliQ) o EtOH Abs (para los pulls en EtOH) en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID.

Las muestras fueron leídas mediante espectroscopía de absorción UV-vis con un equipo Thermo Scientific® Multiskan GO 1.01.12. Se realizaron barridos de 200 a 700 nm a intervalos de 3 nm, usando celdas de cuarzo, las cuales se cargaron con 3.7 ml de pull de extractos 0.2 mg/ml. Se uso agua miliQ como blanco para las muestras acuosas y EtOH 96% como blanco para las muestras hidroalcohólicas.

Los datos obtenidos se graficaron en Excel, se calcularon los ratios UVC/UVB y UVA/UVB usando el área bajo la curva de la absorbancia (AUC_{Abs}) de las muestras en las regiones UVC, UVB, UVA, las cuales se calcularon junto con la AUC_{Abs} en la región UV_{total} usando las siguientes ecuaciones:

$$AUC_{AbsUVC} = \sum_{\lambda=200\text{ nm}}^{280\text{ nm}} (Abs_{\lambda} * 3) \quad \text{Ecuación (5)}$$

$$AUC_{AbsUVB} = \sum_{\lambda=280\text{ nm}}^{320\text{ nm}} (Abs_{\lambda} * 3) \quad \text{Ecuación (6)}$$

$$AUC_{AbsUVA} = \sum_{\lambda=320\text{ nm}}^{400\text{ nm}} (Abs_{\lambda} * 3) \quad \text{Ecuación (7)}$$

$$AUC_{AbsUVtotal} = AUC_{AbsUVC} + AUC_{AbsUVB} + AUC_{AbsUVA} \quad \text{Ecuación (8)}$$

Donde AUC_{AbsUVC} es el área bajo la curva de la absorbancia en la región UVC de las muestras, Abs_{λ} es la absorbancia a la longitud de onda λ , AUC_{AbsUVB} es el área bajo la curva de la absorbancia en la región UVB de las muestras, AUC_{AbsUVA} es el área bajo la curva de la absorbancia en la región UVC de las muestras y $AUC_{AbsUVtotal}$ es el área bajo la curva total de la absorbancia en la región UV.

Se determinó el pico de máxima absorción de cada muestra y a partir de ese punto hasta los 500 nm se tomó como rango para delimitar los valores que se transformaron en $\text{Log}_{10}(\text{Abs})$ para linealizar el comportamiento de la variable respuesta. Los datos transformados se graficaron en Excel, se obtuvieron la ecuación de regresión lineal y R^2 . A partir de la ecuación de regresión lineal se extrajo la pendiente característica de cada muestra.

También se calculó la pureza relativa frente a ácidos nucleicos y proteínas de las muestras mediante las siguientes formulas:

$$PRAC = \frac{Abs_p}{Abs_{260\text{ nm}}} \quad \text{Ecuación (9)}$$

$$PRP = \frac{Abs_p}{Abs_{280\text{ nm}}} \quad \text{Ecuación (10)}$$

Donde PRAC es la pureza relativa frente a ácidos nucleicos de las muestras, Abs_p es la absorbancia del pico característico de cada muestra, $Abs_{260\text{ nm}}$ es la absorbancia a 260 nm (característica de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos), $Abs_{280\text{ nm}}$ es la absorbancia a 280 nm (característica de los aminoácidos aromáticos de las proteínas).

6.2.3.1.1. Determinación del factor de protección solar

Para la determinación del factor de protección solar (FPS) de los distintos extractos se empleó el método Mansur. Para ello se siguió el procedimiento descrito por Montañez, 2020, con algunas modificaciones. Como puntos de referencia y comparación se determinaron los FPS de 6 protectores solares comerciales, cuyas muestras se etiquetaron con las ID "X-50+", "Y-50+", "Z-6", "I-50", "J-30+", "K-30" para mantener confidencialidad y guardar respeto hacia las marcas.

Se prepararon soluciones trabajo de bloqueadores a 0.2 mg/ml. Primero prepararon soluciones stock de bloqueadores a 10 mg/ml pesando 500 mg de cada bloqueador en tubos Falcon de 15 ml y se mezclaron con 10 ml de EtOH Abs, los tubos se sonicaron a 25 °C por 3 min, se agitaron en vortex y dejaron en agitación orbital en un

equipo Premiere® Shaker RK-30 hasta su posterior manipulación. Después, uno a uno cada tubo se sonicó a 25 °C por 3 min, luego se transfirió su contenido a un matraz aforado de 50 ml, se le añadió 35 ml de EtOH Abs y se sonicó a 25 °C por 15 min, después se agitó en vortex y se aforó con EtOH Abs. Posteriormente se elaboraron soluciones a 1 mg/ml diluyendo 2.5 ml de cada stock de 10 mg/ml en matraces aforados de 25 ml con EtOH Abs. Las soluciones trabajo de bloqueadores a 0.2 mg/ml se prepararon diluyendo 1 ml de cada solución de 1 mg/ml en matraces de aforados de 5 ml con EtOH Abs. Su contenido se transfirió a tubos Eppendorf de 5 ml forrados de papel aluminio etiquetados con su ID correspondiente.

Se prepararon pulls de extractos a 0.2 mg/ml en agua miliQ y EtOH 96% usando los pulls de extractos a 1 mg/ml preparados para los barridos y se siguió el mismo proceso de dilución.

Las muestras fueron leídas mediante espectroscopía de absorción UV-vis. Se determinó la absorbancia de las muestras por triplicado en el rango de 290-320 nm en intervalos de 5 nm, usando celdas de cuarzo, las cuales se cargaron con 3.7 ml de pull de extractos 0.2 mg/ml. Se uso agua miliQ como blanco para las muestras acuosas, EtOH 96% como blanco para las muestras hidroalcohólicas y EtOH Abs como blanco para las muestras alcohólicas.

Con los datos obtenidos se calculó el FPS de cada muestra usando la siguiente formula:

$$FPS = FC * \sum_{\lambda=290\text{ nm}}^{320\text{ nm}} (EE_{\lambda} * I_{\lambda} * Abs_{\lambda}) \quad \text{Ecuación (11)}$$

Donde FC es un factor de corrección (igual a 10), EE_{λ} es el efecto eritemogénico de la radiación de la longitud de onda λ , I_{λ} es la intensidad del sol en la longitud de onda λ y Abs_{λ} es la absorbancia de la solución en la longitud de onda λ .

Los productos $EE_{\lambda} * I_{\lambda}$ normalizados correspondientes a cada longitud de onda se muestran en la Tabla 2.

6.2.3.2. Caracterización espectroscópica FT-IR

Para la determinación de los espectros FT-IR se usaron los extractos RVP (EMP RV), CNP (EMPCN), CNPS (EMPS CN), RVPS (EMPSRV), y las harinas de la pulpa de papache CNP (PCN) y RVP (PRV). Las muestras fueron caracterizadas con el objetivo de identificar los principales grupos funcionales presentes en cada muestra. Esta técnica permite obtener información estructural preliminar sobre los compuestos químicos que conforman los extractos, a partir de los patrones de absorción característicos de los enlaces químicos.

Para el análisis, se emplearon aproximadamente 5 mg de cada extracto. Las muestras fueron colocadas directamente, con ayuda de una espátula limpia, sobre el cristal de diamante del módulo de reflectancia total atenuada (ATR), asegurando un contacto adecuado entre la superficie del cristal y el material. Antes y después de la colocación de cada muestra, el cristal de diamante fue limpiado cuidadosamente con un algodón humedecido con alcohol, con el fin de evitar contaminación cruzada y garantizar la reproducibilidad de los espectros.

Posteriormente, los espectros fueron adquiridos utilizando un espectrofotómetro FT-IR Cary 630, registrando las bandas de absorción y transmitancia en un intervalo espectral comprendido entre 400 y 4000 cm^{-1} .

Los espectros obtenidos fueron procesados y organizados en Excel, lo que permitió su análisis comparativo. Finalmente, las bandas características fueron interpretadas mediante la confrontación con la base de datos Spectral Data Base System (SDBS), con el fin de asociar los picos observados con posibles grupos funcionales y clases de compuestos presentes en los extractos.

Los espectros FT-IR fueron procesados siguiendo un flujo de trabajo analítico estándar. Primero, los archivos en formato CSV fueron importados y depurados para asegurar su correcta lectura. Se identificaron las columnas correspondientes a número de onda (cm^{-1}) y transmitancia (%T). Posteriormente, cada espectro se convirtió de transmitancia a absorbancia (Abs) mediante la siguiente ecuación:

$$Abs_{cm^{-1}} = -\log_{10}(T_{cm^{-1}}/100) \quad \text{Ecuación (12)}$$

Donde $Abs_{cm^{-1}}$ es la absorbancia correspondiente al número de onda cm^{-1} , $\log_{10}$ es el logaritmo base 10 y $T_{cm^{-1}}$ es la transmitancia correspondiente al número de onda cm^{-1} .

Los datos fueron ordenados por número de onda, y se generaron gráficas superpuestas con el eje de número de onda invertido para mantener el formato convencional de espectros FT-IR. Finalmente, se elaboró una interpretación comparativa describiendo similitudes y diferencias en las bandas observadas.

6.2.3.3. Cuantificación de melaninas

Para la determinación del contenido de melaninas de los distintos extractos se siguió el procedimiento descrito en el Kit de cuantificación de melaninas (Sigma-Aldrich®) (Merck KGaA, 2023), con algunas modificaciones.

Se prepararon soluciones stock de los extractos a 50 mg/ml pesando 100 mg de cada extracto liofilizado en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID y se disolvieron con 2 ml de agua ultrapura (miliQ), cada tubo se agitó en vortex y se llevó a baño maría con ultrasonidos a 25 °C por 3 min. Después se prepararon pulls de soluciones stock debido a que el Kit de cuantificación contaba con reactivos limitados, para ello se tomaron 150 μ l de solución stock de cada tipo y se mezclaron en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. En la Fig. 16, se muestra el esquema seguido para preparar los pulls de stock de extractos.

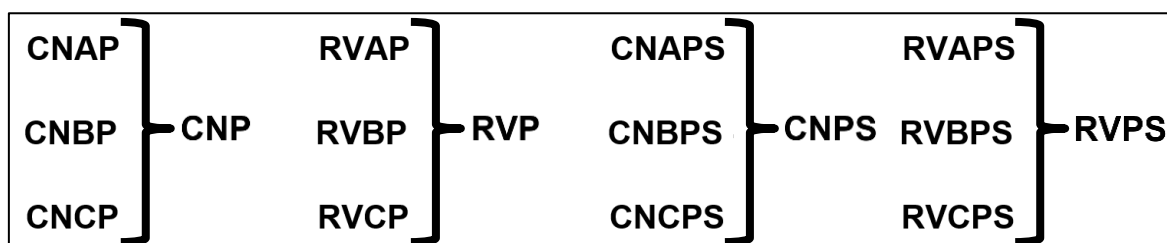


Fig. 16. Composición de los pulls de extractos preparados.

Posteriormente se prepararon soluciones de trabajo a 25 mg/ml tomando 150 µl de cada pull stock de 50 mg/ml y mezclándolos por separado con 150 µl de agua miliQ en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID, con ayuda del vortex.

Se elaboró una curva de melaninas con el estándar del Kit de cuantificación. Inicialmente se preparó una solución stock de 5 mg/ml añadiendo 120 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a 25 °C al vial de estándar de melaninas, se sonicó en baño maría a 25 °C por 3 min y se mezcló en vortex. Después se realizaron 7 diluciones seriadas 1:2 con buffer en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de las soluciones y buffer empleados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes empleados en la curva estándar de melaninas.

ID	Volumen (µl)	Volumen Buffer (µl)	Concentración final (µg/ml)
M1	60 del stock	540	500
M2	300 de M1	300	250
M3	300 de M2	300	125
M4	300 de M3	300	62.5
M5	300 de M4	300	31.25
M6	250 de M5	250	15.63
M7	150 de M6	150	7.81

Las muestras se analizaron a 25 °C por triplicado mediante espectroscopía de fluorescencia con un equipo Thermo Scientific® VarioskanFlash 4.00.53, usando una microplaca de fluorescencia de 96 pocillos, la cual se cargó con 50 µl de solución de trabajo o estándar de melaninas y 50 µl de potenciador de señal siguiendo el orden de la Fig. 17.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		BL	M1	M3	M5	M7	RVP	RVPS				
C		BL	M1	M3	M5	M7	RVP	RVPS				
D		BL	M1	M3	M5	M7	RVP	RVPS				
E		BL2	M2	M4	M6	CNP	CNPS					
F		BL2	M2	M4	M6	CNP	CNPS					
G		BL2	M2	M4	M6	CNP	CNPS					
H												

BL	Buffer
BL2	Agua miliQ

Fig. 17. Orden de llenado de la placa para la cuantificación de melaninas.

Después de cargar el potenciador de señal, la reacción se dejó incubando a 25 °C por 30 min protegida de la luz y se monitorearon las unidades relativas de fluorescencia (RFU) a $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 470/550$ nm cada 10 min durante 2 horas, posteriormente se calcularon las áreas bajo la curva bruta y neta del incremento de fluorescencia (AUC_{bIF} y AUC_{nIF}) de cada pozo usando las siguientes ecuaciones:

$$AUC_{bIF} = \sum_{i=30min}^{150min} (RFU_i * 600) \quad \text{Ecuación (13)}$$

$$AUC_{nIF} = AUC_{bIF(pozo)} - AUC_{bIF(blanco)} \quad \text{Ecuación (14)}$$

Donde AUC_{bIF} es el área bruta bajo la curva del incremento de fluorescencia del pozo, $\sum_{i=30min}^{150min}$ es la sumatoria del producto desde 30 hasta 150 min, RFU_i son las unidades relativas de fluorescencia al tiempo i , AUC_{nIF} es el área neta bajo la curva del incremento de fluorescencia del pozo y $AUC_{bIF(blanco)}$ es el área bruta bajo la curva del incremento de fluorescencia promedio del blanco (para la curva es buffer y para las muestras es agua miliQ).

Los valores del AUC_{nif} correspondientes a la curva estándar de melaninas y su blanco se graficaron en Excel, se obtuvieron la ecuación de regresión cuadrática y R². Despejando la variable x en la ecuación de regresión cuadrática obtenida se calculó la concentración equivalente de melaninas en µg ME/ml para cada una de las muestras. Los resultados se expresaron en mg ME/g extracto seco siguiendo la siguiente formula:

$$mg\ ME/g\ extracto\ seco = (\mu g\ ME/ml) * FD * \frac{Vstock(ml)}{Pstock(mg)} \quad \text{Ecuación (15)}$$

Donde µg ME/ml es la concentración equivalente de melaninas, FD es el factor de dilución (2), Vstock es el volumen en ml de solución stock preparada (2) y Pstock es el peso en mg del extracto usado en la solución stock (100)

6.2.3.4. Determinación de azúcares reductores

Para la determinación del contenido de azúcares reductores de los distintos extractos se empleó el método Miller donde el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reacciona a altas temperaturas en medio alcalino con los grupos aldehído de los azúcares reductores (maltosa, glucosa, fructosa, etc), reduciéndose a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que presenta un color rojo-anaranjado intenso, la intensidad del color es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes (Miller, 1959). Para ello se siguió el procedimiento descrito por Montañez, 2020, con algunas modificaciones.

Se prepararon 10 ml de solución DNS, pesando 160 mg de NaOH y disolviéndolo en un vaso de precipitado de 25 ml con 5 ml de agua destilada con apoyo de una placa/agitador magnético, después se añadieron lentamente 4.38 g de tartrato Na-K hasta que se disolvieron completamente con ayuda de un baño de agua caliente en la placa de agitación magnética, posteriormente se agregaron 100 mg de DNS y la solución se pasó a un matraz aforado de 10 ml. La solución se sometió a ciclos repetidos de baño de ultrasonidos a 60 °C por 10 min protegida de la luz y agitación en vortex hasta que se logró la disolución completa, se dejó enfriar a 25 °C y se aforó

con agua destilada. La solución se transfirió a un vial ámbar de 10 ml adecuadamente rotulado.

Se prepararon soluciones de trabajo a 2 mg/ml tomando 400 µl de cada stock de extractos de 10 mg/ml y mezclándolos por separado con 1600 µl de agua destilada en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID.

Se elaboró una curva estándar de glucosa. Inicialmente se preparó una solución stock de D-glucosa a 2 mg/ml pesando 20 mg de dextrosa anhidra y disolviéndola en un matraz aforado de 10 ml con 7 ml de agua destilada, la solución se agitó en vortex y se sonicó en baño maría a 25 °C por 10 min, después se volvió a mezclar en vortex y se aforó con agua destilada. La solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml adecuadamente rotulado y posteriormente se prepararon 7 diluciones en tubos Eppendorf de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución stock y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes empleados en la curva estándar de D-glucosa.

ID	Volumen stock 2 mg/ml(µl)	Volumen agua destilada (µl)	Concentración final (mg/ml)
G1	100	1900	0.1
G2	500	1500	0.5
G3	700	1300	0.7
G4	1000	1000	1
G5	1500	500	1.5
G6	1700	300	1.7
G7	2000	0	2

Para el análisis se hicieron mezclas de reacción mezclando por separado 250 µl de cada solución de trabajo, estándar de glucosa o agua destilada (blanco) con 250 µl de solución DNS en tubos de ensayo con taparrosca de 15 ml etiquetados con su correspondiente ID, cada tubo se agitó en vortex y se llevó a baño maría con un equipo Thermo Scientific® Precision 180 Series Water Bath de 92 °C por 5 min, después los tubos se colocaron en un baño de hielo por 5 min, se añadieron 2.5 ml de agua destilada a cada tubo y se agitaron en vortex.

Las muestras procesadas fueron leídas por triplicado mediante espectroscopía de absorción UV-vis a 540 nm, usando 3 microplacas de 96 pocillos, las cuales se cargaron con 200 µl del contenido de los tubos siguiendo el orden de la Fig. 18.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
B	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
C	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
D												
E												
F	.	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7				
G	.	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7				
H	.	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7				

.	Blanco
---	--------

Fig. 18. Orden de llenado de las placas para el análisis de azúcares reductores.

Una vez tomadas las lecturas a 540 nm se calculó la absorbancia neta (Abs_n) de cada pozo usando la siguiente ecuación:

$$Abs_n = Abs_{b(poza)} - Abs_{b(.)} \quad \text{Ecuación (16)}$$

Donde Abs_n es la absorbancia neta del pozo, Abs_b es la absorbancia bruta del pozo y $Abs_{b(.)}$ la absorbancia bruta promedio del blanco contemplando las 3 placas.

Los valores de Abs_n correspondientes a la curva estándar de glucosa y el blanco se graficaron en Excel, se obtuvieron la ecuación de regresión lineal y R^2 . Despejando la variable x en la ecuación de regresión lineal obtenida se calculó la concentración equivalente de glucosa para cada una de las muestras. Los resultados se expresaron en % glucosa siguiendo la siguiente formula:

$$\% \text{ glucosa} = \frac{100 * (mg \text{ GE/ml})}{ConcSTE} \quad \text{Ecuación (17)}$$

Donde mg GE/ml es la concentración equivalente de glucosa y ConcSTE es la concentración en mg/ml de la solución trabajo de extractos (2).

6.2.3.5. Determinación de capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los distintos extractos se siguieron 3 metodologías distintas con el fin de comparar la actividad antioxidante de un mismo extracto frente a distintos radicales. Los métodos empleados son el de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno con fluoresceína (ORAC-FL por sus siglas en inglés), por DPPH y por ABTS.

6.2.3.5.1. Método ORAC-FL

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ORAC-FL se siguió el procedimiento descrito por Prior *et al.*, 2003, con algunas modificaciones.

Se preparó 1 L de buffer de fosfatos 75 mM a pH 7.4. Primero se preparó una solución de K_2HPO_4 0.75 M disolviendo 32.66 g en un matraz de 250 ml con agua miliQ hasta la línea de aforo, después se preparó una solución de NaH_2PO_4 0.75 M disolviendo 22.496 g en un matraz de 250 ml con agua miliQ hasta la línea de aforo. Posteriormente se mezclaron 80 ml de K_2HPO_4 0.75 M y 35 ml de NaH_2PO_4 0.75 M en un vaso de precipitado de 250 ml, se ajustó el pH a 7.4 usando NaH_2PO_4 0.75 M. Se tomaron 100 ml del buffer 0.75 M con pH ajustado y se diluyó en 1:10 con agua miliQ,

Se elaboraron 50 ml de solución stock de fluoresceína 87 μ M disolviendo 1.6 mg de fluoresceína en un matraz de 50 ml con 40 ml buffer de fosfatos, la solución se sonicó a 25 °C por 10 min protegida de la luz y se aforó con buffer. El stock de fluoresceína se alicuotó en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml rotulados y se almacenó a -20 °C.

Se prepararon soluciones de los extractos a 1 mg/ml tomando 200 μ l de cada stock de extractos de 10 mg/ml y mezclándolos por separado con 1800 μ l de buffer de fosfatos en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Después se prepararon soluciones de trabajo de extractos a 0.2 mg/ml mezclando 400 μ l de las soluciones de 1 mg/ml con 1600 μ l de buffer de fosfatos en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID.

Se preparó una curva estándar de Trolox. Inicialmente se preparó una solución stock de Trolox a 300 mg/L pesando 15.5 mg de Trolox y disolviéndolo en un matraz aforado de 50 ml con 35 ml de MeOH Abs, se sonicó en baño maría a 25 °C por 10 min, se agitó en vortex y se aforó con agua miliQ. Después se preparó una solución de Trolox a 100 mg/L mezclando 2.5 ml del stock de Trolox 300 mg/L y 5 ml de buffer de fosfatos. Posteriormente, se preparó una solución de Trolox a 15 mg/L mezclando 1.5 ml de la solución de Trolox 100 mg/L y 8.5 ml de buffer de fosfatos. La solución de Trolox 15 mg/L se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado y posteriormente se prepararon 6 diluciones en tubos Eppendorf de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución de Trolox 15 mg/L y buffer de fosfatos empleados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Volúmenes empleados en la curva estándar de Trolox ORAC.

ID	Volumen Trolox 15 mg/ml (µl)	Volumen buffer fosfatos (µl)	Concentración final (mg/L)
Tx0	0	1000	0
Tx1	200	800	3
Tx2	400	600	6
Tx3	600	400	9
Tx4	800	200	12
Tx5	1000	0	15

Justo antes de realizar el análisis se preparó una solución de trabajo de fluoresceína disolviendo 25 µl con buffer de fosfatos a 37 °C en un matraz aforado de 25 ml, la solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se llevó a baño maría protegido de la luz a 37 °C junto con las soluciones trabajo de extractos, la curva estándar de Trolox y un tubo Falcon de 50 ml lleno de buffer de fosfatos. Después se prepararon 5 ml de AAPH 70 mM pesando 94.9 mg de AAPH en un vaso de precipitado de 10 ml y disolviéndolo con 3 ml de buffer de fosfatos a 37 °C, el AAPH completamente disuelto

se transfirió a un matraz de 5 ml y se aforó con buffer de fosfatos a 37 °C, la solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se llevó al baño maría a 37 °C

Las muestras se analizaron a 37 °C por triplicado mediante espectroscopía de fluorescencia, usando una microplaca de fluorescencia de 96 pocillos, la cual se cargó con 25 µl de solución trabajo de extractos, curva estándar de Trolox o buffer de fosfatos (blancos), 200 µl de solución trabajo de fluoresceína usando una micropipeta multicanal manual y 50 µl de solución AAPH usando una micropipeta multicanal electrónica (excepto blanco Gr01) siguiendo el orden de la Fig. 19.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Gr01	BL	Tx0	Tx2	Tx4	A	C	E	G	I	K	
C	Gr02	BL	Tx0	Tx2	Tx4	A	C	E	G	I	K	
D	Gr03	BL	Tx0	Tx2	Tx4	A	C	E	G	I	K	
E	Gr04	BL	Tx1	Tx3	Tx5	B	D	F	H	J	L	
F	Gr05	BL	Tx1	Tx3	Tx5	B	D	F	H	J	L	
G	Gr06	BL	Tx1	Tx3	Tx5	B	D	F	H	J	L	
H												

Gr01	Blanco sin AAPH
BL	Blanco con AAPH

Fig. 19. Orden de llenado de la placa para el ensayo ORAC-FL.

Después de cargar la solución de AAPH se monitorearon las RFU a $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 485/530$ nm cada 2 min durante 2:30 horas, posteriormente se calcularon las áreas bajo la curva bruta y neta del decaimiento de fluorescencia (AUC_{bDF} y AUC_{nDF}) de cada pozo usando las siguientes ecuaciones:

$$AUC_{bDF} = \sum_{i=0min}^{150min} (RFU_i * 120) \quad \text{Ecuación (18)}$$

$$AUC_{nDF} = AUC_{bDF(poza)} - AUC_{bDF(BL)} \quad \text{Ecuación (19)}$$

Donde AUC_{bDF} es el área bruta bajo la curva del decaimiento de fluorescencia del pozo, $\sum_{i=0min}^{150min}$ es la sumatoria del producto desde 0 hasta 150 min, RFU_i son las unidades relativas de fluorescencia al tiempo i, AUC_{nDF} es el área neta bajo la curva del

decaimiento de fluorescencia del pozo y $AUC_{bDF(BL)}$ es el área bruta bajo la curva del decaimiento de fluorescencia promedio del blanco con AAPH.

Los valores del AUC_{nDF} correspondientes a la curva estándar de Trolox se graficaron en Excel, se obtuvieron la ecuación de regresión lineal y R^2 . Despejando la variable x en la ecuación de regresión lineal obtenida se calculó la concentración equivalente de Trolox en $\mu\text{mol TE/L}$ para cada una de las muestras. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco y % actividad antirradical (ARA) siguiendo las siguientes formulas:

$$\mu\text{mol TE/g extracto seco} = (\mu\text{mol TE/L}) * FD * \frac{V_{stock}(ml)}{P_{stock}(mg)} \quad \text{Ecuación (20)}$$

$$\% ARA = 100 * \frac{AUC_{bDF}}{AUC_{bDF(Gr01)}} \quad \text{Ecuación (21)}$$

Donde $\mu\text{mol TE/L}$ es la concentración equivalente de Trolox, FD es el factor de dilución (50), V_{stock} es el volumen en ml de solución stock preparada (2), P_{stock} es el peso en mg del extracto usado en la solución stock (20), AUC_{bDF} es el área bruta bajo la curva del decaimiento de fluorescencia del pozo y $AUC_{bDF(Gr01)}$ es el área bruta bajo la curva del decaimiento de fluorescencia promedio del blanco sin AAPH.

6.2.3.5.2. Método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH con algunas modificaciones.

Se prepararon soluciones stock de los extractos a 50 mg/ml pesando 100 mg de cada extracto liofilizado en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID y se disolvieron con 2 ml de agua ultrapura (miliQ), cada tubo se agitó en vortex y se llevó a baño maría con ultrasonidos a 25 °C por 3 min. Después se prepararon soluciones de trabajo a 10 mg/ml tomando 400 μl de cada stock de extractos de 50 mg/ml y mezclándolos por separado con 1600 μl de agua miliQ en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID.

Se preparó una curva estándar de Trolox. Inicialmente se preparó una solución stock de Trolox a 800 μM pesando 10 mg de Trolox y disolviéndolo en un matraz aforado de 50 ml con 35 ml de MeOH Abs, se sonicó en baño maría a 25 °C por 15 min, se agitó en vortex y se aforó con MeOH Abs. La solución de Trolox 800 μM se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado y posteriormente se prepararon 8 diluciones en tubos Eppendorf de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución de Trolox 800 μM y MeOH Abs empleados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Volúmenes empleados en la curva estándar de Trolox DPPH/ABTS.

ID	Volumen Trolox 800 μM (μl)	Volumen agua destilada (μl)	Concentración final (μM)
T1	50	1950	20
T2	100	1900	40
T3	200	1800	80
T4	400	1600	160
T5	600	1400	240
T6	800	1200	320
T7	1000	1000	400
T8	1200	800	480

Justo antes de realizar el análisis se prepararon 25 ml de DPPH 150 μM pesando 1.5 mg de DPPH en una charola de pesado sin tarar y disolviéndolo en un matraz de 25 ml con 15 ml MeOH 80%, se sonicó a 25 °C por 10 min protegiéndolo de la luz, después se agitó en vortex y se aforó con MeOH 80%, la solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado.

Las muestras se analizaron a 25 °C por triplicado mediante espectroscopía de absorción UV-vis, usando microplacas de 96 pocillos, primero se tomaron lecturas en una placa con 20 μl de MeOH 80% y 200 μl de DPPH para ajustar la absorbancia a 0.8, después se cargó otra placa con 20 μl de solución trabajo de extractos, curva estándar de Trolox, MeOH 80% (blanco 1) o agua miliQ (blanco 2), y 200 μl de solución DPPH siguiendo el orden de la Fig. 20.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bla1	Bla2	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	L	
B	Bla1	Bla2	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	L	
C	Bla1	Bla2	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	L	
D	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
E	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
F	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
G												
H												

Bla1	MeOH 80%
Bla2	Agua miliQ

Fig. 20. Orden de llenado de las placas para los ensayos DPPH/ABTS.

Después de cargar la solución de DPPH se incubó la reacción a 25 °C protegida de la luz y se tomaron lecturas a 515 nm al minuto 30, 60, 75, 90 y 120. Se calcularon las absorbancias bruta y neta promedio (Abs_{bprom} y Abs_{nprom}) de cada pozo usando las siguientes ecuaciones:

$$Abs_{bprom} = \sum_{i=30min}^{120min} (Abs_{bi}) \quad \text{Ecuación (22)}$$

$$Abs_{ni} = Abs_{bi(pozo)} - Abs_{bi(Bla)} \quad \text{Ecuación (23)}$$

$$Abs_{nprom} = \sum_{i=30min}^{120min} (Abs_{ni}) \quad \text{Ecuación (24)}$$

Donde Abs_{bprom} es la absorbancia bruta promedio del pozo, Abs_{bi} es la absorbancia bruta del pozo al tiempo i, Abs_{ni} es la absorbancia neta del pozo al tiempo i, $Abs_{bi(Bla)}$ la absorbancia bruta promedio de las 3 réplicas del blanco al tiempo i (MeOH 80% para la curva de Trolox y agua miliQ para las muestras), Abs_{nprom} es la absorbancia neta promedio del pozo.

Los valores de Abs_{nprom} correspondientes a la curva estándar de Trolox y MeOH 80% se graficaron en Excel, se obtuvieron la ecuación de regresión lineal y R^2 . Despejando la variable x en la ecuación de regresión lineal obtenida se calculó la concentración equivalente de Trolox en $\mu\text{mol TE/L}$ para cada una de las muestras. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco usando la Ecuación (11) y % ARA siguiendo la siguiente formula:

$$\% \text{ARA} = 100 * \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{bprom}(\text{pozo})}}{\text{Abs}_{\text{bprom}(\text{Bla2})}}\right) \quad \text{Ecuación (25)}$$

Donde $\text{Abs}_{\text{bprom}(\text{pozo})}$ es la absorbancia bruta promedio del pozo y $\text{Abs}_{\text{bprom}(\text{Bla2})}$ es la absorbancia bruta promedio del promedio de las 3 réplicas del blanco de agua miliQ,

6.2.3.5.3. Método ABTS

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS con algunas modificaciones. Se usaron las mismas soluciones trabajo de extractos a 10 mg/ml y curva estándar de Trolox utilizadas en el ensayo DPPH.

Un día antes de realizar el análisis se prepararon 25 ml de solución stock de ABTS pesando 96 mg de ABTS y disolviéndolo en un matraz de 25 ml con 15 ml de agua miliQ, se sonicó a 25 °C por 10 min protegiéndolo de la luz, después se agitó en vortex y se aforó con agua miliQ, la solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado y se almacenó a 4 °C.

Justo antes de realizar el análisis se prepararon 25 ml de solución trabajo de ABTS diluyendo 500 µl de solución stock de ABTS en un matraz aforado de 25 ml con agua miliQ, la solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado.

Las muestras se analizaron a 25 °C por triplicado mediante espectroscopía de absorción UV-vis, usando microplacas de 96 pocillos, primero se tomaron lecturas en una placa con 20 µl de MeOH Abs y 200 µl de ABTS para ajustar la absorbancia a 0.7, después se cargó otra placa con 20 µl de solución trabajo de extractos, curva estándar de Trolox, MeOH Abs (blanco 1) o agua miliQ (blanco 2), y 200 µl de solución trabajo de ABTS siguiendo el mismo orden que en el ensayo DPPH (Fig. 20).

Después de cargar la solución trabajo de ABTS se incubó la reacción a 25 °C protegida de la luz y se tomaron lecturas a 735 nm al minuto 30, 60, 75, 90 y 120. Se calcularon las absorbancias bruta y neta promedio ($\text{Abs}_{\text{bprom}}$ y $\text{Abs}_{\text{nprom}}$) de cada pozo usando las Ecuaciones (13) y (15).

Los valores de $Abs_{n_{prom}}$ correspondientes a la curva estándar de Trolox y MeOH Abs se graficaron en Excel, se obtuvieron la ecuación de regresión lineal y R^2 . Despejando la variable x en la ecuación de regresión lineal obtenida se calculó la concentración equivalente de Trolox en $\mu\text{mol TE/L}$ para cada una de las muestras. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco y % ARA usando las Ecuaciones (11) y (16).

6.2.3.6. Determinación de capacidad antidiabética

Para la determinación de la capacidad antidiabética de los distintos extractos se realizó un ensayo de inhibición enzimática de la α -amilasa basado en el procedimiento descrito por Aguilar-Camacho *et al.*, 2024, con algunas modificaciones.

Se prepararon 25 ml de solución DNS, pesando 400 mg de NaOH y disolviéndolo en un vaso de precipitado de 50 ml con 10 ml de agua miliQ con apoyo de una placa/agitador magnético, después se añadieron lentamente 10.95 g de tartrato Na-K hasta que se disolvieron completamente con ayuda de un baño de agua caliente en la placa de agitación magnética, posteriormente se agregaron 250 mg de DNS y la solución se pasó a un matraz aforado de 25 ml. La solución se sometió a ciclos repetidos de baño de ultrasonidos a 60 °C por 10 min protegida de la luz y agitación en vortex hasta que se logró la disolución completa, se dejó enfriar a 25 °C y se aforó con agua miliQ. La solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado.

Se preparó un buffer de fosfatos 20 mM a pH 6.9. Primero se preparó una solución de Na_2HPO_4 0.02 M disolviendo 536.1 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un matraz aforado de 100 ml con agua miliQ, después se preparó una solución de NaH_2PO_4 0.02 M disolviendo 690 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en un matraz aforado de 250 ml con agua miliQ. Posteriormente se mezclaron 78.7 ml de Na_2HPO_4 0.02 M y 90 ml de NaH_2PO_4 0.02 M en un vaso de precipitado de 250 ml, se ajustó el pH a 6.9 usando NaH_2PO_4 0.02 M. El buffer se transfirió a un frasco de vidrio de 250 ml adecuadamente rotulado.

Se preparó una solución de almidón al 1%. Para ello se mezclaron 100 mg de almidón de trigo en un matraz aforado de 10 ml con 7 ml de buffer de fosfatos, la mezcla se

sometió a ciclos repetidos de baño de ultrasonidos a 60 °C por 15 min y agitación en vortex hasta que se logró la gelatinización, dispersión y clarificación completa, se dejó enfriar a 25 °C y se aforó con buffer de fosfatos. La solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml adecuadamente rotulado.

Se prepararon soluciones stock de los extractos a 10 mg/ml pesando 20 mg de cada extracto liofilizado en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID y se disolvieron con 2 ml de buffer de fosfatos, cada tubo se agitó en vortex y se llevó a baño maría con ultrasonidos a 25 °C por 3 min. Después se prepararon soluciones de trabajo a 2.5 mg/ml tomando 500 µl de cada stock de extractos de 10 mg/ml y mezclándolos por separado con 1500 µl de buffer de fosfatos en tubos Eppendorf ámbar de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID.

Se preparó una curva estándar de acarbosa. Inicialmente se preparó una solución stock de acarbosa 350 µM pesando 11.9 mg de acarbosa 95% y disolviéndola en un matraz aforado de 50 ml con 35 ml de buffer de fosfatos, se sonicó en baño maría a 25 °C por 15 min, se agitó en vortex y se aforó con buffer de fosfatos. La solución de acarbosa a 350 µM se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado y posteriormente se preparó una solución de acarbosa 200 µM mezclando 8571.4 µl de la solución de acarbosa 350 µM con 6428.6 µl de buffer de fosfatos en un tubo Falcon de 15 ml forrado de papel aluminio adecuadamente rotulado y posteriormente se prepararon 4 diluciones en tubos Eppendorf de 2 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución de acarbosa 200 µM y buffer de fosfatos empleados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Volúmenes empleados en la curva estándar de acarbosa.

ID	Volumen acarbosa 200 µM (µl)	Volumen buffer fosfatos (µl)	Concentración final (µM)
Ac1	250	1750	22
Ac2	500	1500	50
Ac3	1000	1000	100
Ac4	1500	500	150

Justo antes de realizar el análisis se preparó una solución de α -amilasa 13 U/ml. Para ello se disolvieron 13 mg de α -amilasa de páncreas porcino en un matraz aforado de 5 ml con 3 ml de buffer de fosfatos a 25 °C, la solución se sometió a ciclos repetidos de agitación ligera en vortex e incubación a 25 °C por 5 min, cuando se observó la menor cantidad y menor tamaño de partículas insolubles se aforó con buffer de fosfatos a 25 °C y se centrifugó a 6,000 rpm por 1 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 5 ml adecuadamente rotulado.

Para el análisis se hicieron dos rondas de mezclas de reacción simultaneas, la primera ronda se hizo mezclando por separado 250 μ l de cada solución de trabajo (muestras), estándar de acarbosa o buffer de fosfatos (control negativo) con 250 μ l de α -amilasa en tubos de ensayo con taparrosca de 15 ml etiquetados con su correspondiente ID, cada tubo se agitó en vortex y se incubó a 25 °C por 10 min, después se añadieron 250 μ l de almidón al 1% a 25 °C a cada tubo, se agitaron en vortex y se llevaron a baño maría de 37 °C por 10 min, posteriormente se añadieron 500 μ l de solución DNS a cada tubo, se agitaron en vortex y se llevaron a baño maría de 100 °C por 5 min, después los tubos se colocaron en un baño de hielo por 5 min, se añadieron 11.25 ml de agua miliQ a cada tubo y se agitaron en vortex. La segunda ronda se hizo mezclando por separado 120 μ l de cada solución de trabajo (blanco de muestra) o buffer de fosfatos (blanco) con 120 μ l de buffer de fosfatos en tubos de ensayo con taparrosca de 10 ml etiquetados con su correspondiente ID, cada tubo se agitó en vortex y se incubó a 25 °C por 10 min, después se añadieron 120 μ l de almidón al 1% a 25 °C a cada tubo, se agitaron en vortex y se llevaron a baño maría de 37 °C por 10 min, posteriormente se añadieron 240 μ l de solución DNS a cada tubo, se agitaron en vortex y se llevaron a baño maría de 100 °C por 5 min, después los tubos se colocaron en un baño de hielo por 5 min, se añadieron 5.4 ml de agua miliQ a cada tubo y se agitaron en vortex.

Las muestras procesadas fueron leídas por triplicado mediante espectroscopía de absorción UV-vis a 540 nm, usando 2 microplacas de 96 pocillos, las cuales se cargaron con 200 μ l del contenido de los tubos siguiendo el orden de la Fig. 21.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
B	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
C	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
D	Ac1	Ac1	Ac1	Ac3	Ac3	Ac3	CN	CN	CN			
E	Ac2	Ac2	Ac2	Ac4	Ac4	Ac4	BL	BL	BL			
F	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
G	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
H	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l

CN	ControlNegativo
BL	Blanco
Mayúscula	Muestra
Minúscula	BlancoMuestra

Fig. 21. Orden de llenado de las placas para el análisis de inhibición de la α -amilasa.

Una vez tomadas las lecturas a 540 nm se calculó la absorbancia neta (Abs_n) correspondientes a la señal de glucosa de cada pozo usando las siguientes formulas:

$$Abs_{n(CN)} = Abs_{b(CN)} - Abs_{b(BL)} \quad \text{Ecuación (26)}$$

$$Abs_{n(Ac)} = Abs_{b(Ac)} - Abs_{b(BL)} \quad \text{Ecuación (27)}$$

$$Abs_{n(muestra)} = Abs_{b(may)} - Abs_{b(min)} \quad \text{Ecuación (28)}$$

Donde $Abs_{n(CN)}$ es la absorbancia neta promedio del control negativo, $Abs_{b(CN)}$ es la absorbancia bruta promedio del control negativo, $Abs_{b(BL)}$ es la absorbancia bruta promedio del blanco, $Abs_{n(Ac)}$ es la absorbancia neta del estándar de acarbosa, $Abs_{b(Ac)}$ es la absorbancia bruta del estándar de acarbosa, $Abs_{n(muestra)}$ es la absorbancia neta de la solución trabajo de extractos, $Abs_{b(may)}$ es la absorbancia bruta de la muestra mayúscula y $Abs_{b(min)}$ es la absorbancia bruta promedio del blanco de muestra minúscula.

Los valores de Abs_n correspondientes a la curva estándar de acarbosa y el control negativo se graficaron en Excel, se obtuvieron la ecuación de regresión lineal y R^2 . Despejando la variable x en la ecuación de regresión lineal obtenida se calculó la concentración equivalente de acarbosa en $\mu\text{mol AE/L}$ para cada una de las muestras. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol AE/g}$ extracto seco y % inhibición siguiendo las siguientes formulas:

$$\mu\text{mol AE/g extracto seco} = (\mu\text{mol AE/L}) * FD * \frac{V_{\text{stock}}(\text{ml})}{P_{\text{stock}}(\text{mg})} \quad \text{Ecuación (29)}$$

$$\% \text{ Inhibición} = 100 * \frac{Abs_{n(CN)} - Abs_{n(muestra)}}{Abs_{n(CN)}} \quad \text{Ecuación (30)}$$

Donde $\mu\text{mol AE/L}$ es la concentración equivalente de acarbosa, FD es el factor de dilución (4), V_{stock} es el volumen en ml de solución stock preparada (2), P_{stock} es el peso en mg del extracto usado en la solución stock (20), $Abs_{n(CN)}$ es la absorbancia neta promedio del control negativo y $Abs_{n(muestra)}$ es la absorbancia neta de la muestra.

6.2.4. Análisis de estabilidad de los extractos

Para evaluar la estabilidad de las melaninas de los extractos ante distintas condiciones físicas y químicas se realizaron distintos experimentos, primero se llevó a cabo un análisis de estabilidad en condiciones de pH ácidas, neutras y básicas, después se hicieron evaluaciones de termo y fotoestabilidad, posteriormente se llevaron a cabo análisis de estabilidad ante entornos oxidantes y reductores así como la presencia de iones metálicos, finalmente se realizó un análisis de estabilidad ante la presencia de aditivos alimentarios.

6.2.4.1. Análisis de estabilidad pH-Tiempo

Para el análisis de la estabilidad de las melaninas de los extractos a distintos pH en el tiempo se siguió el procedimiento descrito por Liu *et al.*, 2023, con algunas modificaciones. Primero se prepararon buffers con pH 3, 5, 7, 9 y 11, a los cuales se les ajustó el pH con un potenciómetro usando ácido clorhídrico 1 N e hidróxido de sodio 1 N. El ácido clorhídrico 1 N se preparó mezclando 4.902 ml de ácido clorhídrico al 37.2 % con 30 ml de agua destilada en un matraz aforado de 50 ml y se aforó con agua destilada. El hidróxido de sodio 1 N se preparó disolviendo 1 g de hidróxido de sodio con 15 ml de agua destilada en un matraz aforado de 25 ml y se aforó con agua destilada.

Se prepararon 100 ml de buffer pH 3 pesando 1.05 g de ácido cítrico y 0.4 g de hidróxido de sodio, se mezclaron y disolvieron con 40 ml de agua destilada en un

matraz aforado de 50 ml y se aforó con agua destilada, de esta solución se tomaron 40.3 ml y se colocaron en un matraz aforado de 100 ml, posteriormente la solución se aforó con ácido clorhídrico 0.1 N y se transfirió la solución a dos tubos Falcon de 50 ml etiquetados con “pH 3”. El ácido clorhídrico 0.1 N se preparó mezclando 10 ml de ácido clorhídrico 1 N con 70 ml de agua destilada en un matraz aforado de 100 ml y aforando con agua destilada.

Se prepararon 100 ml de buffer pH 5 pesando 2.01 g de ácido cítrico y 0.8 g de hidróxido de sodio, se mezclaron y disolvieron con 80 ml de agua destilada en un matraz aforado de 100 ml, después se aforó la solución con agua destilada y se transfirió la solución a dos tubos Falcon de 50 ml etiquetados con “pH 5”.

Se prepararon 100 ml de buffer pH 7 pesando 5.8916 g de fosfato disódico y 369.6 mg de ácido cítrico, se mezclaron y disolvieron con 80 ml de agua destilada en un matraz aforado de 100 ml, después se aforó la solución con agua destilada y se transfirió la solución a dos tubos Falcon de 50 ml etiquetados con “pH 7”.

Se prepararon 100 ml de buffer pH 9 pesando 8.401 g de bicarbonato de sodio y 497.1 mg de carbonato de sodio, se mezclaron y disolvieron con 80 ml de agua destilada en un matraz aforado de 100 ml, después se puso en baño maría con ultrasonidos a 25 °C por 15 min, al finalizar se aforó con agua destilada y se transfirió la solución a dos tubos Falcon de 50 ml etiquetados con “pH 9”.

Se prepararon 100 ml de buffer pH 11 pesando 1.6802 g de bicarbonato de sodio y 9.9419 g de carbonato de sodio, se mezclaron y disolvieron con 80 ml de agua destilada en un matraz aforado de 100 ml, después se puso en baño maría con ultrasonidos a 25 °C por 15 min, al finalizar se aforó con agua destilada y se transfirió la solución a dos tubos Falcon de 50 ml etiquetados con “pH 9”.

Después de preparar y ajustar el pH de los buffers se llevó a cabo el ensayo de estabilidad de los extractos a distintos pH en el tiempo, para ello se tomaron 220 µl de cada stock de extractos y se colocaron en tubos Eppendorf de 5 ml etiquetados con la

ID del stock y pH correspondientes, a cada tubo Eppendorf se le agregó 5.28 ml del buffer correspondiente y se agitó en vortex por 30 s. Después de agitar todos los tubos Eppendorf se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 292 nm al tiempo 0 y cada día por 7 días protegiendo las soluciones de la luz y usando cada buffer como blanco de reacción en un tubo Eppendorf, se observó el cambio de color y se calculó la tasa de retención mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{A_i}{A_0} \right) * 100 \quad \text{Ecuación (31)}$$

Donde A_i es el valor de la absorbancia neta de la solución en el tiempo i, mientras que A_0 es el valor de la absorbancia neta inicial de la solución.

Las ID producto del cruce de los stocks con los buffers se muestran a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8. ID de las muestras bajo distintos pH.

Stock\pH		pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
CNAP	A	pH3a	Ph5a	Ph7a	Ph9a	pH11a
CNBP	B	pH3b	Ph5b	Ph7b	Ph9b	pH11b
CNCP	C	Ph3c	Ph5c	Ph7c	Ph9c	pH11c
RVAP	D	Ph3d	Ph5d	Ph7d	Ph9d	pH11d
RVBP	E	Ph3e	Ph5e	Ph7e	Ph9e	pH11e
RVCP	F	Ph3f	Ph5f	Ph7f	Ph9f	pH11f
CNAPS	G	Ph3g	Ph5g	Ph7g	Ph9g	pH11g
CNBPS	H	Ph3h	Ph5h	Ph7h	Ph9h	pH11h
CNCPS	I	Ph3i	Ph5i	Ph7i	Ph9i	pH11i
RVAPS	J	Ph3j	Ph5j	Ph7j	Ph9j	pH11j
RVBPS	K	Ph3k	Ph5k	Ph7k	Ph9k	pH11k
RVCPS	L	Ph3l	Ph5l	Ph7l	Ph9l	pH11l
Blanco	.	pH3.	pH5.	pH7.	pH9.	pH11.

Las lecturas del espectrofotómetro se realizaron mediante microplacas UV de 96 pocillos, las cuales se llenaron con 200 µl por triplicado siguiendo el orden de la Fig. 22.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
B	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
C	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
D	.	.	.									
E										.	.	.
F	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
G	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
H	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L

	Solución 1
.	Blanco
	Solución 2

Fig. 22. Orden de llenado de las placas UV para los análisis de estabilidad.

6.2.4.2. Análisis de estabilidad Temperatura-Tiempo

Para el análisis de la estabilidad de las melaninas de los extractos a distintas temperaturas en el tiempo se siguió la metodología descrita por Liu *et al.*, 2023, con algunas modificaciones. Primero se agregó 9.6 ml de agua destilada a tubos de ensayo de 15 ml con taparroscas etiquetados con la ID del stock y temperatura correspondientes y se pusieron en baños maría de 4, 25, 40, 60 y 80 °C por media hora, después se les agregó 0.4 ml de cada stock de extractos a cada tubo en baño maría haciendo que corresponda con su ID y se agitaron en vortex por 30 s. Después de agitar todos los tubos de ensayo se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 292 nm al tiempo 0 y cada 2 horas por 10 horas usando agua destilada como blanco de reacción en un tubo de ensayo, se observó el cambio de color y se calculó la tasa de retención mediante la Ecuación (31). Para el llenado de la microplaca se siguió el mismo orden de la Fig. 22.

Las ID producto del cruce de los stocks con las distintas temperaturas se muestran a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. ID de las muestras bajo distintas temperaturas.

Stock\Temperatura		4 °C	25 °C	40 °C	60 °C	80 °C
CNAP	A	4A	25A	40A	60A	80A
CNBP	B	4B	25B	40B	60B	80B
CNCP	C	4C	25C	40C	60C	80C
RVAP	D	4D	25D	40D	60D	80D
RVBP	E	4E	25E	40E	60E	80E
RVCP	F	4F	25F	40F	60F	80F
CNAPS	G	4G	25G	40G	60G	80G
CNBPS	H	4H	25H	40H	60H	80H
CNCPS	I	4I	25I	40I	60I	80I
RVAPS	J	4J	25J	40J	60J	80J
RVBPS	K	4K	25K	40K	60K	80K
RVCPS	L	4L	25L	40L	60L	80L
Blanco	.	4.	25.	40.	60.	80.

6.2.4.3. Análisis de estabilidad Luz-Tiempo

Para el análisis de la fotoestabilidad de las melaninas de los extractos a la exposición directa a la luz solar y luz artificial en el tiempo se siguió la metodología descrita por Liu *et al.*, 2023, con algunas modificaciones. Primero se montó el sistema de iluminación artificial se colocaron 4 lámparas LED con potencia de 10 W y 60 Hz, temperatura de color de 6500 K y flujo luminoso de 600 lm a una distancia promedio de 14.5 cm sobre de las muestras expuestas, dando un área de exposición de 0.09 m². Con estos datos se calculó la intensidad luminosa que incidió sobre las muestras siguiendo la siguiente formula.

$$Lux (lx) = \frac{\text{Flujo luminoso (lm)}}{\text{Área (m}^2\text{)}} \quad \text{ecuación (32)}$$

Después se agregó 0.4 ml de cada stock de extractos a tubos de ensayo de 15 ml con taparrosca etiquetados con la ID del stock y exposición correspondientes, después se agregó 9.6 ml de agua destilada a cada tubo y se agitaron en vortex por 30 s. Después de agitar todos los tubos de ensayo se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 292 nm al tiempo 0 y cada día por 7 días usando agua destilada como blanco de reacción

en un tubo de ensayo, los tubos con las ID “Sol” se expusieron al sol directo en el horario de 10 am a 3 pm, los tubos con las ID “Luz” se expusieron a luz artificial las 24 horas dejando que las lámparas del sistema descansaran por media hora, los tubos con las ID “Osc” se mantuvieron protegidas de la luz con una manta negra. Se observó el cambio de color y se calculó la tasa de retención mediante la Ecuación (31). Para el llenado de la microplaca se siguió el mismo orden de la Fig. 22.

Las ID producto del cruce de los stocks con las condiciones de luz se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. ID de las muestras bajo distintas condiciones de exposición a la luz.

Stock\Condición		Sol	Luz	Oscuridad
CNAP	A	Sol-A	Luz-A	Osc-A
CNBP	B	Sol-B	Luz-B	Osc-B
CNCP	C	Sol-C	Luz-C	Osc-C
RVAP	D	Sol-D	Luz-D	Osc-D
RVBP	E	Sol-E	Luz-E	Osc-E
RVCP	F	Sol-F	Luz-F	Osc-F
CNAPS	G	Sol-G	Luz-G	Osc-G
CNBPS	H	Sol-H	Luz-H	Osc-H
CNCPS	I	Sol-I	Luz-I	Osc-I
RVAPS	J	Sol-J	Luz-J	Osc-J
RVBPS	K	Sol-K	Luz-K	Osc-K
RVCPS	L	Sol-L	Luz-L	Osc-L
Blanco	.	Sol.	Luz.	Osc.

6.2.4.4. Análisis de estabilidad Redox-Tiempo

Para el análisis de la estabilidad de las melaninas de los extractos ante agentes redox a distintas concentraciones en el tiempo se siguió el procedimiento descrito por Liu *et al.*, 2023, con algunas modificaciones. Primero se prepararon soluciones de H₂O₂ a 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 2 M, y NaHSO₃ a 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 1.5 M.

Las soluciones de H_2O_2 se prepararon a partir de una solución stock de H_2O_2 2 M, la cual se preparó diluyendo 20.408 ml de H_2O_2 al 50% en un matraz aforado de 150 ml con agua destilada, la solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 ml y se prepararon las 5 diluciones en vasos de precipitado de 100 ml. Cada solución se transfirió a 2 tubos Falcon de 50 ml forrados de papel aluminio etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución stock H_2O_2 2 M y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Volúmenes empleados en las soluciones de H_2O_2 .

ID	Volumen H_2O_2 2 M (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Concentración final (M)
Perox1	0.375	74.625	0.01
Perox2	3.75	71.25	0.1
Perox3	18.75	56.25	0.5
Perox4	37.5	37.5	1
Perox5	75	0	2

Las soluciones de NaHSO_3 se prepararon a partir de una solución stock de NaHSO_3 1.5 M, la cual se preparó disolviendo 49.9091 g de NaHSO_3 en un matraz aforado de 150 ml con agua destilada, la solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 ml y se prepararon las 5 diluciones en vasos de precipitado de 100 ml. Cada solución se transfirió a 2 tubos Falcon de 50 ml forrados de papel aluminio etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución stock NaHSO_3 1.5 M y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Volúmenes empleados en las soluciones de NaHSO₃.

ID	Volumen NaHSO ₃ 1.5 M (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Concentración final (M)
Bisu1	0.5	74.5	0.01
Bisu2	5	70	0.1
Bisu3	25	50	0.5
Bisu4	50	25	1
Bisu5	75	0	1.5

Después de preparar las soluciones redox se llevó a cabo el ensayo de estabilidad de los extractos a distintos entornos redox en el tiempo, para ello se mezclaron 220 µl de cada stock de extractos con 5.28 ml de cada solución redox en tubos Eppendorf de 5 ml etiquetados con la ID del stock y agente empleados. Cada tubo se agitó en vortex y se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 292 nm al tiempo 0 y cada día por 7 días protegiendo las soluciones de la luz y usando cada solución redox como blanco de reacción en un tubo Eppendorf, se observó el cambio de color y se calculó la tasa de retención mediante la Ecuación (31). Para el llenado de la microplaca se siguió el mismo orden de la Fig. 22.

Las ID producto del cruce de los stocks con las distintas soluciones redox se muestran a continuación en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13. ID de las muestras bajo las distintas concentraciones de H_2O_2 .

Stock\Solución		Perox1	Perox2	Perox3	Perox4	Perox5
CNAP	A	Perox1A	Perox2A	Perox3A	Perox4A	Perox5A
CNBP	B	Perox1B	Perox2B	Perox3B	Perox4B	Perox5B
CNCP	C	Perox1C	Perox2C	Perox3C	Perox4C	Perox5C
RVAP	D	Perox1D	Perox2D	Perox3D	Perox4D	Perox5D
RVBP	E	Perox1E	Perox2E	Perox3E	Perox4E	Perox5E
RVCP	F	Perox1F	Perox2F	Perox3F	Perox4F	Perox5F
CNAPS	G	Perox1G	Perox2G	Perox3G	Perox4G	Perox5G
CNBPS	H	Perox1H	Perox2H	Perox3H	Perox4H	Perox5H
CNCPS	I	Perox1I	Perox2I	Perox3I	Perox4I	Perox5I
RVAPS	J	Perox1J	Perox2J	Perox3J	Perox4J	Perox5J
RVBPS	K	Perox1K	Perox2K	Perox3K	Perox4K	Perox5K
RVCPS	L	Perox1L	Perox2L	Perox3L	Perox4L	Perox5L
Blanco	.	Perox1.	Perox2.	Perox3.	Perox4.	Perox5.

Tabla 14. ID de las muestras bajo las distintas concentraciones de $NaHSO_3$.

Stock\Solución		Bisu1	Bisu2	Bisu3	Bisu4	Bisu5
CNAP	A	Bisu1A	Bisu2A	Bisu3A	Bisu4A	Bisu5A
CNBP	B	Bisu1B	Bisu2B	Bisu3B	Bisu4B	Bisu5B
CNCP	C	Bisu1C	Bisu2C	Bisu3C	Bisu4C	Bisu5C
RVAP	D	Bisu1D	Bisu2D	Bisu3D	Bisu4D	Bisu5D
RVBP	E	Bisu1E	Bisu2E	Bisu3E	Bisu4E	Bisu5E
RVCP	F	Bisu1F	Bisu2F	Bisu3F	Bisu4F	Bisu5F
CNAPS	G	Bisu1G	Bisu2G	Bisu3G	Bisu4G	Bisu5G
CNBPS	H	Bisu1H	Bisu2H	Bisu3H	Bisu4H	Bisu5H
CNCPS	I	Bisu1I	Bisu2I	Bisu3I	Bisu4I	Bisu5I
RVAPS	J	Bisu1J	Bisu2J	Bisu3J	Bisu4J	Bisu5J
RVBPS	K	Bisu1K	Bisu2K	Bisu3K	Bisu4K	Bisu5K
RVCPS	L	Bisu1L	Bisu2L	Bisu3L	Bisu4L	Bisu5L
Blanco	.	Bisu1.	Bisu2.	Bisu3.	Bisu4.	Bisu5.

6.2.4.5. Análisis de estabilidad Aditivos-Tiempo

Para el análisis de la estabilidad de las melaninas de los extractos ante la presencia de aditivos alimentarios a distintas concentraciones en el tiempo se siguió el procedimiento descrito por Liu *et al.*, 2023, con algunas modificaciones. Primero se prepararon soluciones de NaCl a 0.1, 1, 3, 5 y 10 mg/ml, sacarosa a 0.01, 0.05, 0.1, 0.3 y 0.6 g/ml, benzoato de sodio a 0.1, 0.5, 1, 2 y 5 mg/ml, y sorbato de potasio a 0.005, 0.01, 0.1, 0.5 y 1 mg/ml.

Las soluciones de NaCl se prepararon a partir de una solución stock de NaCl 10 mg/ml, la cual se preparó disolviendo 1.5 g de NaCl en un matraz aforado de 150 ml con agua destilada, la solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 ml y se prepararon las 5 diluciones en vasos de precipitado de 100 ml. Cada solución se transfirió a 2 tubos Falcon de 50 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución stock NaCl 10 mg/ml y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Volúmenes empleados en las soluciones de NaCl.

ID	Volumen NaCl 10 mg/ml (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Concentración final (mg/ml)
Sal1	0.75	74.25	0.1
Sal2	7.5	67.5	1
Sal3	22.5	52.5	3
Sal4	37.5	37.5	5
Sal5	75	0	10

Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución stock de sacarosa 0.6 g/ml, la cual se preparó disolviendo 150 g de sacarosa en un vaso de precipitado de 250 ml con 200 ml de agua destilada a 70 °C, la solución se pasó a un matraz de 250 ml, se esperó a que llegara a 25 °C y se aforó con agua destilada, la solución se transfirió a un vaso de precipitado de 500 ml y se prepararon las 5 diluciones en vasos de precipitado de 100 ml. Cada solución se transfirió a 2 tubos Falcon de 50 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución stock sacarosa 0.6 g/ml y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Volúmenes empleados en las soluciones de sacarosa.

ID	Volumen sacarosa 0.6 g/ml (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Concentración final (g/ml)
Saca1	1.25	73.75	0.01
Saca2	6.25	68.75	0.05
Saca3	12.5	62.5	0.1
Saca4	37.5	37.5	0.3
Saca5	75	0	0.6

Las soluciones de benzoato de sodio se prepararon a partir de una solución stock de benzoato 5 mg/ml, la cual se preparó disolviendo 750 mg de benzoato de sodio en un matraz aforado de 150 ml con agua destilada, la solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 ml y se prepararon las 5 diluciones en vasos de precipitado de 100 ml. Cada solución se transfirió a 2 tubos Falcon de 50 ml etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de solución stock benzoato 5 mg/ml y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Volúmenes empleados en las soluciones de benzoato de sodio.

ID	Volumen benzoato 5 mg/ml (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Concentración final (mg/ml)
Benz1	1.5	73.5	0.1
Benz2	7.5	67.5	0.5
Benz3	15	60	1
Benz4	30	45	2
Benz5	75	0	5

Las soluciones de sorbato de potasio se prepararon a partir de una solución stock de sorbato 1 mg/ml, la cual se preparó disolviendo 150 mg de sorbato de potasio en un matraz aforado de 150 ml con agua destilada, la solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 ml y se prepararon las 5 diluciones en vasos de precipitado de 100 ml. Cada solución se transfirió a 2 tubos Falcon de 50 ml etiquetados con su

correspondiente ID. Los volúmenes de solución stock sorbato 1 mg/ml y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Volúmenes empleados en las soluciones de sorbato de potasio.

ID	Volumen sorbato 1 mg/ml (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Concentración final (mg/ml)
Sorb1	0.375	74.625	0.005
Sorb2	0.75	74.25	0.01
Sorb3	7.5	67.5	0.1
Sorb4	37.5	37.5	0.5
Sorb5	75	0	1

Después de preparar las soluciones se llevó a cabo el ensayo de estabilidad de los extractos ante la presencia de aditivos alimentarios, para ello se mezclaron 220 µl de cada stock de extractos con 5.28 ml de cada solución de iones metálicos en tubos Eppendorf de 5 ml etiquetados con la ID del stock y solución empleados. Cada tubo se agitó en vortex y se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 292 nm al tiempo 0 y a las 24 horas protegiendo las soluciones de la luz y usando cada solución de aditivos alimentarios como blanco de reacción en un tubo Eppendorf, se observó el cambio de color y se calculó la tasa de retención mediante la Ecuación (31). Para el llenado de la microplaca se siguió el mismo orden de la Fig. 22.

Las ID producto del cruce de los stocks con las distintas soluciones de aditivos alimentarios se muestran a continuación en las Tablas 19, 20, 21 y 22.

Tabla 19. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de NaCl.

Stock\Solución		Sal-1	Sal-2	Sal-3	Sal-4	Sal-5
CNAP	A	Sal-1A	Sal-2A	Sal-3A	Sal-4A	Sal-5A
CNBP	B	Sal-1B	Sal-2B	Sal-3B	Sal-4B	Sal-5B
CNCP	C	Sal-1C	Sal-2C	Sal-3C	Sal-4C	Sal-5C
RVAP	D	Sal-1D	Sal-2D	Sal-3D	Sal-4D	Sal-5D
RVBP	E	Sal-1E	Sal-2E	Sal-3E	Sal-4E	Sal-5E
RVCP	F	Sal-1F	Sal-2F	Sal-3F	Sal-4F	Sal-5F
CNAPS	G	Sal-1G	Sal-2G	Sal-3G	Sal-4G	Sal-5G
CNBPS	H	Sal-1H	Sal-2H	Sal-3H	Sal-4H	Sal-5H
CNCPS	I	Sal-1I	Sal-2I	Sal-3I	Sal-4I	Sal-5I
RVAPS	J	Sal-1J	Sal-2J	Sal-3J	Sal-4J	Sal-5J
RVBPS	K	Sal-1K	Sal-2K	Sal-3K	Sal-4K	Sal-5K
RVCPS	L	Sal-1L	Sal-2L	Sal-3L	Sal-4L	Sal-5L
Blanco	·	Sal-1·	Sal-2·	Sal-3·	Sal-4·	Sal-5·

Tabla 20. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de sacarosa.

Stock\Solución		Saca-1	Saca-2	Saca-3	Saca-4	Saca-5
CNAP	A	Saca-1A	Saca-2A	Saca-3A	Saca-4A	Saca-5A
CNBP	B	Saca-1B	Saca-2B	Saca-3B	Saca-4B	Saca-5B
CNCP	C	Saca-1C	Saca-2C	Saca-3C	Saca-4C	Saca-5C
RVAP	D	Saca-1D	Saca-2D	Saca-3D	Saca-4D	Saca-5D
RVBP	E	Saca-1E	Saca-2E	Saca-3E	Saca-4E	Saca-5E
RVCP	F	Saca-1F	Saca-2F	Saca-3F	Saca-4F	Saca-5F
CNAPS	G	Saca-1G	Saca-2G	Saca-3G	Saca-4G	Saca-5G
CNBPS	H	Saca-1H	Saca-2H	Saca-3H	Saca-4H	Saca-5H
CNCPS	I	Saca-1I	Saca-2I	Saca-3I	Saca-4I	Saca-5I
RVAPS	J	Saca-1J	Saca-2J	Saca-3J	Saca-4J	Saca-5J
RVBPS	K	Saca-1K	Saca-2K	Saca-3K	Saca-4K	Saca-5K
RVCPS	L	Saca-1L	Saca-2L	Saca-3L	Saca-4L	Saca-5L
Blanco	·	Saca-1·	Saca-2·	Saca-3·	Saca-4·	Saca-5·

Tabla 21. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de benzoato de sodio.

Stock\Solución		Benz-1	Benz-2	Benz-3	Benz-4	Benz-5
CNAP	A	Benz-1A	Benz-2A	Benz-3A	Benz-4A	Benz-5A
CNBP	B	Benz-1B	Benz-2B	Benz-3B	Benz-4B	Benz-5B
CNCP	C	Benz-1C	Benz-2C	Benz-3C	Benz-4C	Benz-5C
RVAP	D	Benz-1D	Benz-2D	Benz-3D	Benz-4D	Benz-5D
RVBP	E	Benz-1E	Benz-2E	Benz-3E	Benz-4E	Benz-5E
RVCP	F	Benz-1F	Benz-2F	Benz-3F	Benz-4F	Benz-5F
CNAPS	G	Benz-1G	Benz-2G	Benz-3G	Benz-4G	Benz-5G
CNBPS	H	Benz-1H	Benz-2H	Benz-3H	Benz-4H	Benz-5H
CNCPS	I	Benz-1I	Benz-2I	Benz-3I	Benz-4I	Benz-5I
RVAPS	J	Benz-1J	Benz-2J	Benz-3J	Benz-4J	Benz-5J
RVBPS	K	Benz-1K	Benz-2K	Benz-3K	Benz-4K	Benz-5K
RVCPS	L	Benz-1L	Benz-2L	Benz-3L	Benz-4L	Benz-5L
Blanco	·	Benz-1·	Benz-2·	Benz-3·	Benz-4·	Benz-5·

Tabla 22. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de sorbato de potasio.

Stock\Solución		Sorb-1	Sorb-2	Sorb-3	Sorb-4	Sorb-5
CNAP	A	Sorb-1A	Sorb-2A	Sorb-3A	Sorb-4A	Sorb-5A
CNBP	B	Sorb-1B	Sorb-2B	Sorb-3B	Sorb-4B	Sorb-5B
CNCP	C	Sorb-1C	Sorb-2C	Sorb-3C	Sorb-4C	Sorb-5C
RVAP	D	Sorb-1D	Sorb-2D	Sorb-3D	Sorb-4D	Sorb-5D
RVBP	E	Sorb-1E	Sorb-2E	Sorb-3E	Sorb-4E	Sorb-5E
RVCP	F	Sorb-1F	Sorb-2F	Sorb-3F	Sorb-4F	Sorb-5F
CNAPS	G	Sorb-1G	Sorb-2G	Sorb-3G	Sorb-4G	Sorb-5G
CNBPS	H	Sorb-1H	Sorb-2H	Sorb-3H	Sorb-4H	Sorb-5H
CNCPS	I	Sorb-1I	Sorb-2I	Sorb-3I	Sorb-4I	Sorb-5I
RVAPS	J	Sorb-1J	Sorb-2J	Sorb-3J	Sorb-4J	Sorb-5J
RVBPS	K	Sorb-1K	Sorb-2K	Sorb-3K	Sorb-4K	Sorb-5K
RVCPS	L	Sorb-1L	Sorb-2L	Sorb-3L	Sorb-4L	Sorb-5L
Blanco	·	Sorb-1·	Sorb-2·	Sorb-3·	Sorb-4·	Sorb-5·

6.2.4.6. Análisis de estabilidad Iones Metálicos-Tiempo

Para el análisis de la estabilidad de las melaninas de los extractos ante la presencia de iones metálicos a distintas concentraciones se siguió el procedimiento descrito por Liu *et al.*, 2023, con algunas modificaciones. Primero se prepararon soluciones de iones Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mg^{2+} a 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$.

Las soluciones de iones metálicos se prepararon a partir de soluciones stock a 200 $\mu\text{g/ml}$, las cuales se prepararon disolviendo por separado 100.9 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), 145.2 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{3+}), 148.3 mg de AlCl_3 (Al^{3+}), 57.2 mg de KCl (K^+), 89.3 mg de CaCl_2 (Ca^{2+}), 62.5 mg de ZnCl_2 (Zn^{2+}), 117.9 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) y 117.5 mg de MgCl_2 (Mg^{2+}) en matraces aforados de 150 ml con agua destilada, las soluciones se transfirieron a vasos de precipitado de 250 ml y se prepararon sus 3 diluciones en vasos de precipitado de 100 ml. Cada solución se transfirió a 2 tubos Falcon de 50 ml forrados de papel aluminio etiquetados con su correspondiente ID. Los volúmenes de cada solución stock de iones metálicos y agua destilada empleados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Volúmenes empleados en las soluciones de iones metálicos.

ID	Volumen stock 200 $\mu\text{g/ml}$ (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)
1	18.75	56.25	50
2	37.5	37.5	100
3	75	0	200

Después de preparar las soluciones se llevó a cabo el ensayo de estabilidad de los extractos ante distintos iones metálicos, para ello se mezclaron 220 μl de cada stock de extractos con 5.28 ml de cada solución de iones metálicos en tubos Eppendorf de 5 ml etiquetados con la ID del stock y solución empleados. Cada tubo se agitó en vortex y se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 292 nm al tiempo 0 y a las 48 horas protegiendo las soluciones de la luz y usando cada solución de iones como blanco de reacción en un tubo Eppendorf, se observó el cambio de color y se calculó la tasa de

retención mediante la Ecuación (31). Para el llenado de la microplaca se siguió el mismo orden de la Fig. 22.

Las ID producto del cruce de los stocks con las distintas soluciones de iones metálicos se muestran a continuación en las Tablas 24, 25, 26 y 27.

Tabla 24. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} .

Stock\Solución		Fe2-1	Fe2-2	Fe2-3	Fe3-1	Fe3-2	Fe3-3
CNAP	A	Fe2-1A	Fe2-2A	Fe2-3A	Fe3-1A	Fe3-2A	Fe3-3A
CNBP	B	Fe2-1B	Fe2-2B	Fe2-3B	Fe3-1B	Fe3-2B	Fe3-3B
CNCP	C	Fe2-1C	Fe2-2C	Fe2-3C	Fe3-1C	Fe3-2C	Fe3-3C
RVAP	D	Fe2-1D	Fe2-2D	Fe2-3D	Fe3-1D	Fe3-2D	Fe3-3D
RVBP	E	Fe2-1E	Fe2-2E	Fe2-3E	Fe3-1E	Fe3-2E	Fe3-3E
RVCP	F	Fe2-1F	Fe2-2F	Fe2-3F	Fe3-1F	Fe3-2F	Fe3-3F
CNAPS	G	Fe2-1G	Fe2-2G	Fe2-3G	Fe3-1G	Fe3-2G	Fe3-3G
CNBPS	H	Fe2-1H	Fe2-2H	Fe2-3H	Fe3-1H	Fe3-2H	Fe3-3H
CNCPS	I	Fe2-1I	Fe2-2I	Fe2-3I	Fe3-1I	Fe3-2I	Fe3-3I
RVAPS	J	Fe2-1J	Fe2-2J	Fe2-3J	Fe3-1J	Fe3-2J	Fe3-3J
RVBPS	K	Fe2-1K	Fe2-2K	Fe2-3K	Fe3-1K	Fe3-2K	Fe3-3K
RVCPS	L	Fe2-1L	Fe2-2L	Fe2-3L	Fe3-1L	Fe3-2L	Fe3-3L
Blanco	.	Fe2-1.	Fe2-2.	Fe2-3.	Fe3-1.	Fe3-2.	Fe3-3.

Tabla 25. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Al^{3+} y K^+ .

Stock\Solución		Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
CNAP	A	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
CNBP	B	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
CNCP	C	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
RVAP	D	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
RVBP	E	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
RVCP	F	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
CNAPS	G	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
CNBPS	H	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
CNCPS	I	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
RVAPS	J	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
RVBPS	K	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
RVCPS	L	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3
Blanco	.	Al-1	Al-2	Al-3	K-1	K-2	K-3

Tabla 26. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Ca^{2+} y Zn^{2+} .

Stock\Solución		Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
CNAP	A	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
CNBP	B	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
CNCP	C	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
RVAP	D	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
RVBP	E	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
RVCP	F	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
CNAPS	G	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
CNBPS	H	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
CNCPS	I	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
RVAPS	J	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
RVBPS	K	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
RVCPS	L	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3
Blanco	.	Ca-1	Ca-2	Ca-3	Zn-1	Zn-2	Zn-3

Tabla 27. ID de las muestras ante las distintas concentraciones de Cu²⁺ y Mg²⁺.

Stock\Solución		Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
CNAP	A	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
CNBP	B	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
CNCP	C	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
RVAP	D	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
RVBP	E	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
RVCP	F	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
CNAPS	G	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
CNBPS	H	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
CNCPS	I	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
RVAPS	J	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
RVBPS	K	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
RVCPS	L	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3
Blanco	.	Cu-1	Cu-2	Cu-3	Mg-1	Mg-2	Mg-3

6.2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada uno de los experimentos fueron organizados en Excel y analizados con el software estadístico Statgraphics, se aplicaron pruebas paramétricas a los resultados de los experimentos que cumplieron con los supuestos de normalidad y varianza constante, mientras que a los resultados de los experimentos que no cumplieron con tales supuestos se les aplicaron pruebas no paramétricas. Se calcularon los valores promedio o medianas en su caso de las respuestas obtenidas en cada experimento, se determinaron aquellos factores con efecto significativo sobre la respuesta mediante el valor-p de las pruebas ANOVA y las pruebas de rangos múltiples LSD en el caso de los datos paramétricos o Kruskal-Wallis y los graficos de caja y bigote con muesca en la mediana en el caso de los datos no paramétricos, también se llevaron a cabo comparaciones entre las TEAC obtenidas por ORAC-FL, DPPH y ABTS, así como correlaciones múltiples intra y entre experimentos.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los análisis llevados a cabo a lo largo del proyecto.

7.1. Análisis fisicoquímicos de la pulpa de papache

En la Tabla 28 se muestran los promedios y desviación estándar de los análisis de sólidos solubles, actividad de agua, pH, acidez titulable y humedad para los frutos de papache de cada lugar. Solamente se encontraron diferencias significativas entre los valores de pH y acidez titulable, el pH promedio de las muestras de Cahuinahuaró fue de 6.8 mientras que el obtenido para las muestras de Rancho viejo fue de 6.55, la acidez titulable promedio de las muestras de Cahuinahuaró fue de 0.0997% ac. cítrico mientras que la obtenida para Rancho Viejo fue de 0.1707% ac. cítrico.

Tabla 28. *Parámetros fisicoquímicos de la pulpa de papache.*

Lugar	°Brix	aw	pH	Acidez (% ac. cítrico)	humedad (%)
CN	35.70 ± 0.46 ^a	0.88 ^a	6.80 ± 0.03 ^b	0.0997 ± 0.0249 ^a	46.43 ^a
RV	35.73 ± 0.31 ^a	0.88 ^a	6.55 ± 0.05 ^a	0.1708 ± 0.0323 ^b	46.94 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

En la Tabla 29 se muestran los valores promedio y desviación estándar de los distintos parámetros colorimétricos (coordenadas CieLab) obtenidos de las pulpas de las regiones de Cahuinahuaró y Rancho Viejo.

Tabla 29. *Coordenadas CieLab de la pulpa de papache.*

Región	L*	a*	ΔE	b*	c*	h
CN	18.0 ± 1.95 ^a	0.7 ± 0.09 ^a	17.2 ± 1.90 ^a	-0.3 ± 0.16 ^a	0.7 ± 0.02 ^a	335.6 ± 14.05 ^a
RV	18.4 ± 2.98 ^a	0.7 ± 0.07 ^a	16.8 ± 2.89 ^a	-0.3 ± 0.16 ^a	0.8 ± 0.08 ^a	335.8 ± 11.55 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

7.1.1. Determinación del índice de madurez de los frutos

En la Tabla 30 se muestran los promedios y desviación estándar del índice de madurez (IM) de los frutos de cada lugar, donde se encontraron diferencias significativas entre los IM de las muestras de Cahuinahuaro (CN) y Rancho viejo (RV) con un valor mínimo de 214.49 para RV y un valor máximo de 371.28 para CN. Estos datos muestran que los frutos de Cahuinahuaro presentaban un mayor estado de maduración.

Tabla 30. IM de los frutos de papache.

Lugar	IM (Azucares/Acidez)
CN	371.28 ± 80.35 ^b
RV	214.49 ± 42.33 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

7.2. Extracción de melaninas solubles

En la Tabla 31 se muestran los valores promedio y desviación estándar del rendimiento de extracción para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas entre los rendimientos de extracción de los tratamientos CNPS, RVPS, RVP y CNP, que presentaron un valor mínimo de 59.7% para CNPS y un valor máximo de 91.4% para RVP. Estos hallazgos no se corresponden con lo reportados por (Montes-Avila *et al.*, 2018) para los rendimientos de extracción de las melaninas de papache y *Vitex mollis* por medio de la extracción ácido-base, quienes obtuvieron rendimientos de 5.16% para el papache y 9.4% para *V. mollis*.

Tabla 31. Rendimiento de extracción promedio de cada extracto.

Tratamiento	%Rendimiento
CNP	90.6 ± 0.8 ^c
CNPS	59.7 ± 7.6 ^a
RVP	91.4 ± 0.4 ^c
RVPS	69.7 ± 6.4 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 23, la fuente de donde se obtiene el extracto afecta significativamente el rendimiento de extracción ($p=0.0000$), siendo la fuente pulpa la que tuvo los mayores rendimientos.

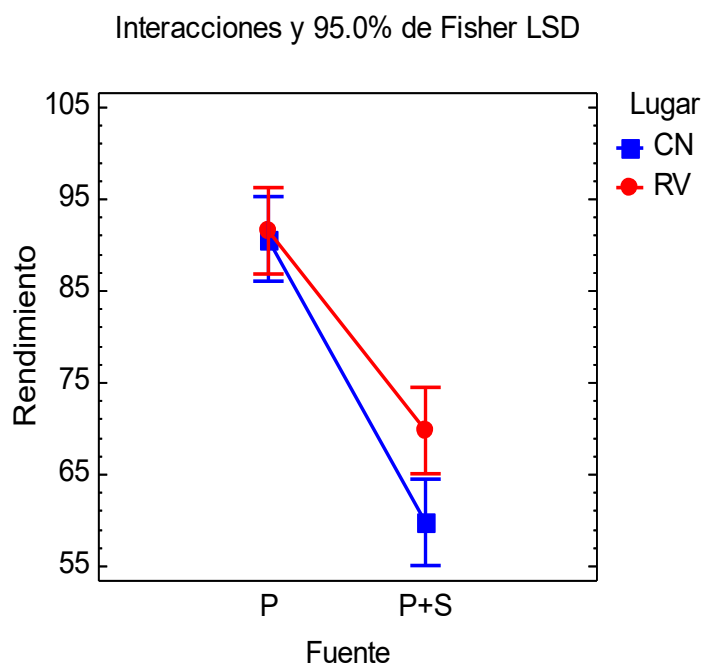


Fig. 23. Gráfico de interacción entre los efectos Fuente-Lugar en los rendimientos de extracción.

7.3. Caracterización de los extractos

7.3.1. Caracterización espectroscópica UV-vis

Tras la caracterización de los extractos por espectroscopia de absorción UV-vis se encontraron comportamientos diferenciales en los extractos dependiendo del vehículo donde se encontraban disueltos. Se observó un notable contraste de absorción en la región UVC, donde los extractos en medio acuoso presentaron absorbancias muy superiores a los extractos en medio hidroalcohólico como se muestra en la Fig 24.

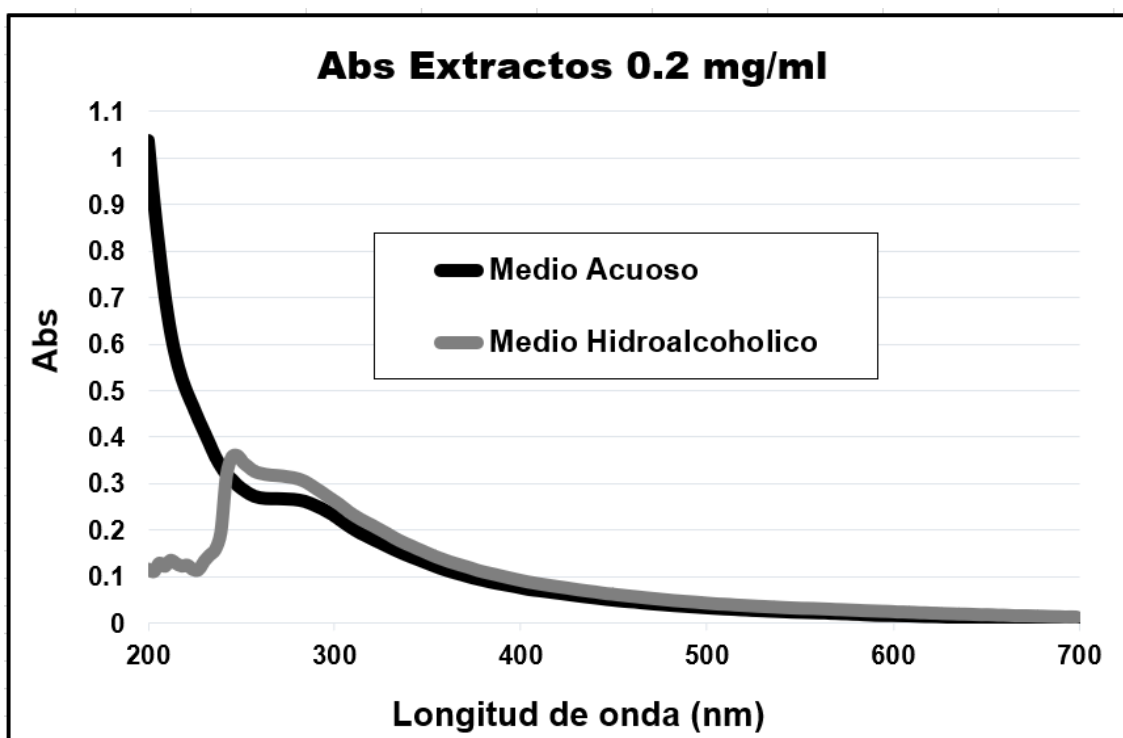


Fig. 24. Espectros de absorción UV-vis de los extractos disueltos en distintos vehículos.

En la Tabla 32 se muestran los valores promedio y desviación estándar de los ratios UV y el $AUC_{Abs\ UV_{total}}$ calculadas para los extractos de distinta fuente en los distintos vehículos (considerando ambos lugares), donde se encontraron diferencias significativas en el ratio UVC/UVB con un valor mínimo de 1.76 para los extractos de pulpa-semilla en medio hidroalcohólico y un valor máximo de 3.92 para los extractos de pulpa-semilla en medio acuoso, también se encontraron diferencias significativas en el ratio UVA/UVB con un valor mínimo de 1.05 para los extractos de pulpa en medio

hidroalcohólico y un valor máximo de 1.17 para los extractos de pulpa-semilla en medio hidroalcohólico, los valores de $AUC_{Abs} UV_{total}$ también presentaron diferencias significativas con un valor mínimo de 36.15 para los extractos de pulpa en medio hidroalcohólico y un valor máximo de 59.71 para los extractos de pulpa-semilla en medio acuoso.

Tabla 32. Valores promedio de los ratios UV y $AUC_{Abs} UV_{total}$ de los extractos de pulpa y pulpa-semilla en distintos vehículos.

Tratamiento	UVC/UVB	UVA/UVB	$AUC_{Abs} UV_{total}$
P-H ₂ O	3.90 ± 0.08 ^b	1.06 ± 0.02 ^a	48.25 ± 8.35 ^{a,b}
P-EtOH 96%	1.80 ± 0.03 ^a	1.05 ± 0.04 ^a	36.15 ± 3.54 ^a
PS-H ₂ O	3.92 ± 0.06 ^b	1.12 ± 0.01 ^{a,b}	59.71 ± 0.84 ^b
PS-EtOH 96%	1.76 ± 0.03 ^a	1.17 ± 0.01 ^b	44.03 ± 0.19 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

En la Fig. 25 se muestra el efecto del vehículo sobre los ratios UVC/UVB y UVA/UVB, como en el $AUC_{Abs} UV_{total}$ de los extractos. En la Fig. 25A se puede apreciar un efecto muy significativo del tipo de vehículo en el ratio UVC/UVB de los extractos, mientras que en el $AUC_{Abs} UV_{total}$ de los extractos se encontró un efecto relativamente significativo. Estos resultados muestran que las moléculas presentes en los extractos capaces de absorber radiación UVC son fotoactivas en presencia de agua y pierden actividad en presencia de EtOH, debido a esta mayor absorción UVC por parte de los extractos en medio acuoso, también presentan mayor absorción UV_{total} .

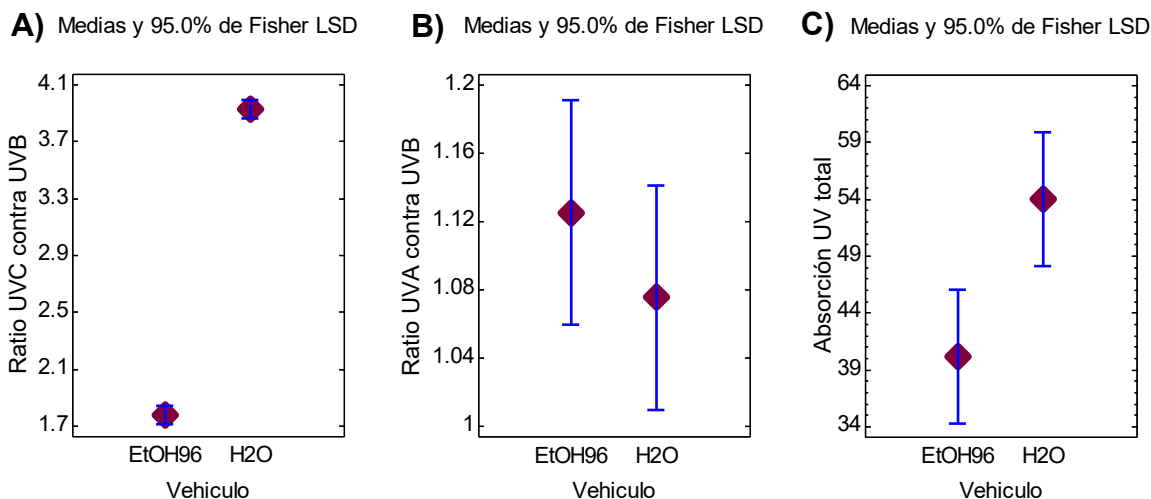


Fig. 25. Gráficos de la determinación de absorción de radiación UV de los extractos en distintos vehículos.

A) Efecto del factor Vehículo en el ratio UVC/UVB de los extractos, B) Efecto del factor Vehículo en el ratio UVA/UVB y C) Efecto del factor Vehículo en el $AUC_{Abs} UV_{total}$ de los extractos.

Como se puede apreciar en la Fig. 26, a pesar de que la fuente y el lugar no tienen efectos significativos sobre la absorción de radiación UV se encontraron distintas tendencias en sus comportamientos. En la Fig. 26A se puede observar un comportamiento dispar entre los extractos en el ratio UVC/UVB evidenciado por las pendientes opuestas, en la Fig. 26B se puede observar una marcada interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción en el ratio UVA/UVB evidenciado por el contraste de su pendiente respecto la otra, mientras que en la Fig. 26C se muestra un comportamiento de interacción en el $AUC_{Abs} UV_{total}$ de los extractos muy similar al de la Fig. 26B.

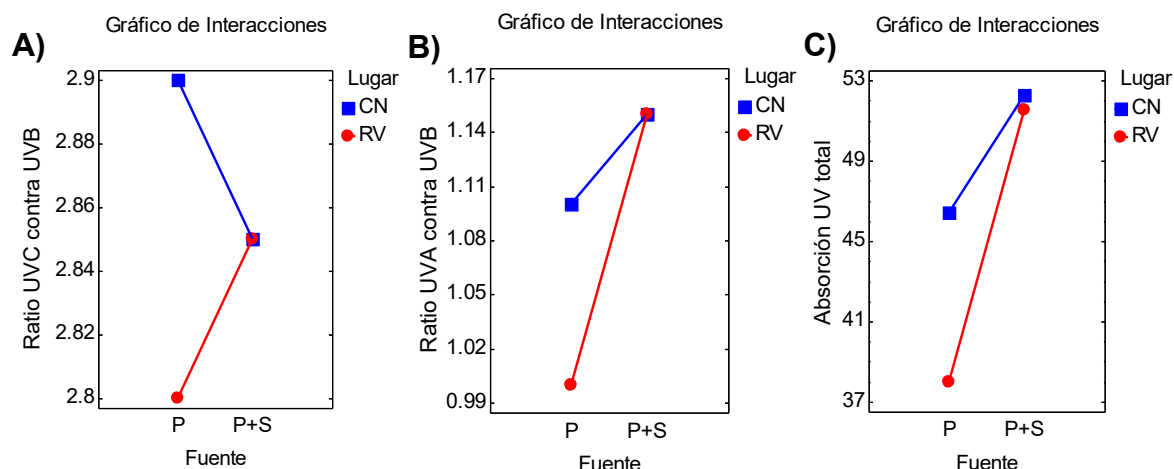


Fig. 26. Gráficos de la determinación de absorción de radiación UV de los extractos. A) Interacción entre los factores Fuente-Lugar en el ratio UVC/UVB de los extractos, B) Interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción en el ratio UVA/UVB y C) Interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción en el $AUC_{Abs} UV_{total}$ de los extractos.

En la Fig. 27 se muestran los espectros y logaritmos UV-vis característicos de los extractos en medio acuoso, donde se encontró que todos los extractos presentan su máxima absorbancia a 200 nm que va disminuyendo a medida que aumenta la longitud de onda y tienen pendientes muy similares (entre -0.0042 y -0.0044), pero el extracto RVP en específico mostró una absorción general menor. También se puede observar un ligero incremento de absorbancia en la región de 250-300 nm en todos los extractos, evidencia de posible presencia de ácidos nucleicos (pico de absorción a 260 nm) y proteínas, aminoácidos aromáticos o sus derivados (pico de absorción a 280 nm).

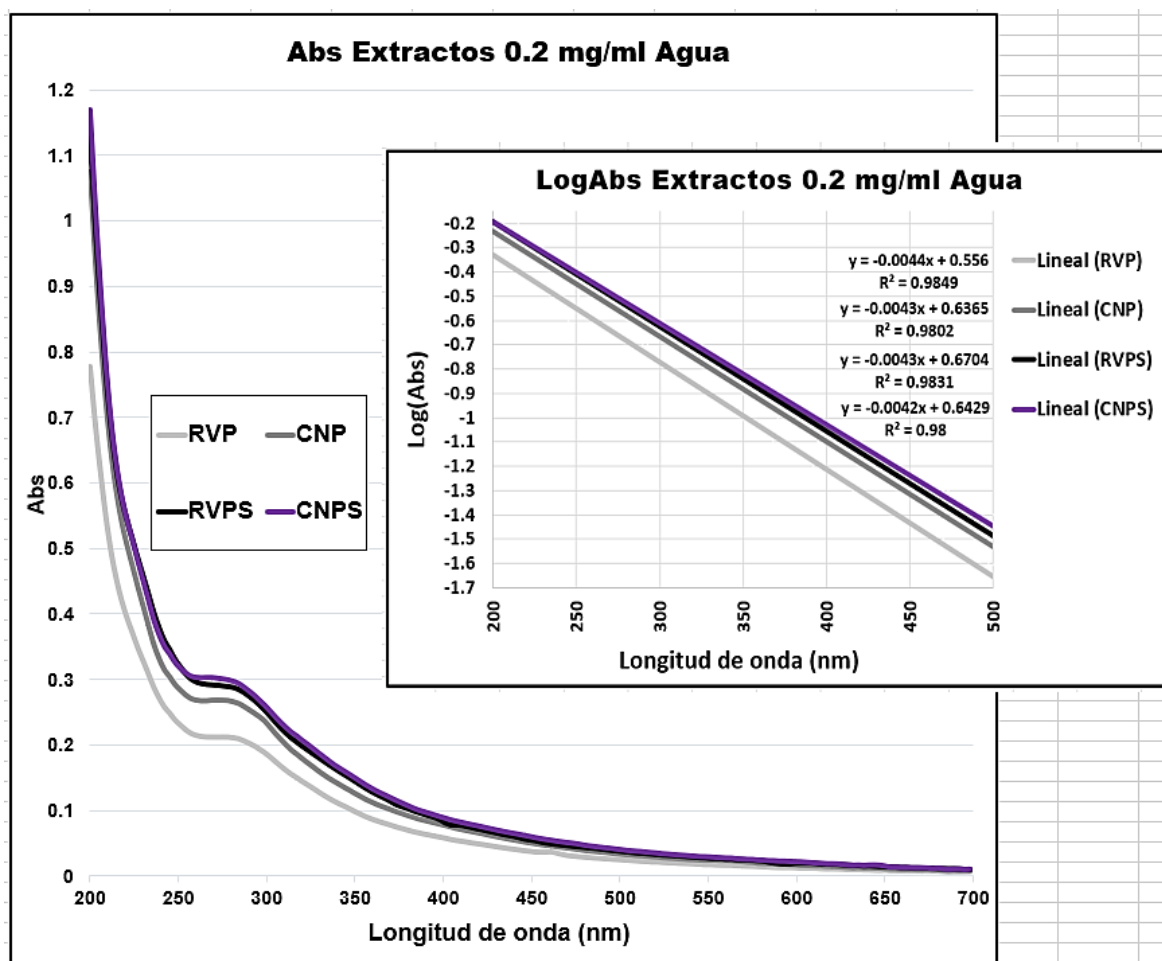


Fig. 27. Espectros y logaritmos de absorción de los extractos en medio acuoso.

En la Fig. 28 se muestran los espectros y logaritmos UV-vis característicos de los extractos en medio hidroalcohólico, donde se encontró que los extractos obtenidos de la fuente pulpa-semilla presentan su máxima absorbancia a 248 nm mientras que los extractos de pulpa tienen su pico a 245 nm, en todos los extractos la absorbancia a partir del pico va disminuyendo a medida que aumenta la longitud de onda y tienen pendientes similares (entre -0.0039 y -0.0043), los extractos de pulpa en específico mostraron una absorción general menor a partir de sus picos. También se puede observar un ligero incremento de absorbancia alrededor de los 275 nm en todos los extractos, evidencia de posible presencia de proteínas, aminoácidos aromáticos o sus derivados (pico de absorción a 280 nm).

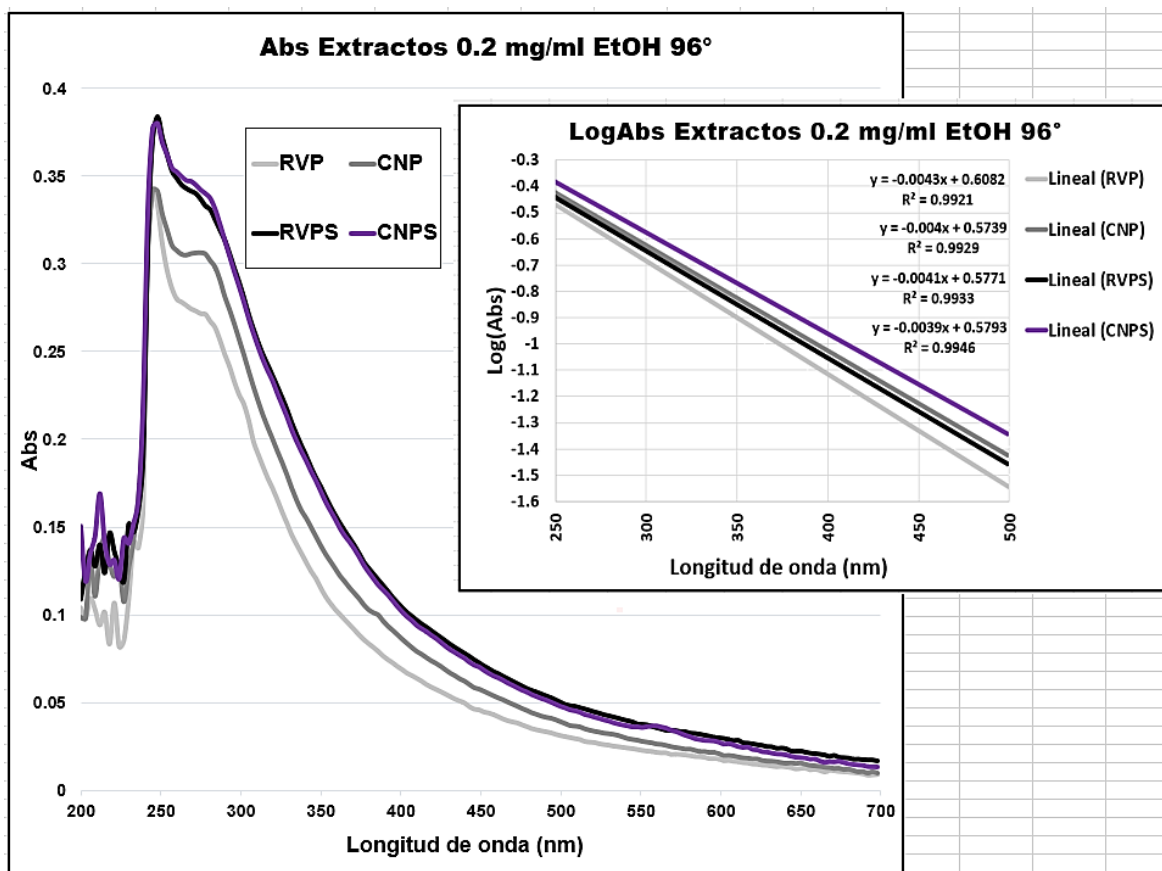


Fig. 28. Espectros y logaritmos de absorción de los extractos en medio hidroalcohólico.

Los resultados obtenidos de las longitudes de onda con máxima absorción no concuerdan con los reportados por Montes-Avila et al., 2018 quienes obtuvieron longitudes de onda máxima de 292 nm para *Randia equinocarpa* y 293 para *Vitex Mollis*. En otras investigaciones se encontraron picos a 195 nm en semillas de *O. fragans* y 280 nm en hojas de té negro (Montes-Avila et al., 2018). En la Tabla 33 se muestran las longitudes de onda pico y las pendientes de log (Abs).

Tabla 33. Longitudes de onda máxima de absorción y pendientes de las melaninas de distintas especies (Pralea et al., 2019).

Fuente de melanina	Longitud de onda máxima de absorción (nm)	Pendiente
Hongos		
<i>Auricularia auricula</i>	215	-0.0030
<i>Boletus griseus</i>	214	
<i>Chroogomphus rutilus</i>	212	
<i>Exophiala pisciphila</i>	216	-0.0030
<i>Inonotus hispidus</i>	212	-0.0031
<i>Lachnum singerianum</i> YM296	215	
<i>Lachnum</i> YM205	196	-0.0015 a -0.0030
<i>Lachnum</i> YM226	223	-0.0030
<i>Lachnum</i> YM404	210	-0.0015 a -0.0030
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	200-250	
<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	220-240	-0.0019
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	240	-0.0015
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	280	
Bacterias		
<i>Streptomyces glaucescens</i>	250	
Especies marinas		
<i>Actinoalloteichus</i> sp. MA-32	300	-0.2646
<i>Patinopecten yessoensis</i>	297	
Otras fuentes		
Ajo negro	210-250	
Tinta sepia	210-250	
<i>Castanea mollissima</i>	270-280	-0.0050

En la Tabla 34 se muestran las medianas de la absorbancia del pico (Abs_p) y las purezas relativas frente a ácidos nucleicos (PRAC) y proteínas (PRP) calculados para cada extracto (considerando ambos vehiculos), donde se encontraron ligeras diferencias de Abs_p que no llegan a ser significativas, también se encontraron ligeras diferencias en las PRAC que no son significativas, los valores de PRP también presentaron ligeras diferencias que no son significativas. Estos resultados sin diferencia significativa pueden deberse a la pequeña cantidad de datos usados para el análisis (n=8).

Tabla 34. Medianas de la Abs_p , PRAC y PRP de cada extracto.

Extracto	Abs_p	PRAC	PRP
CNP	0.7090 ^a	2.56 ^a	2.59 ^a
CNPS	0.7750 ^a	2.47 ^a	2.53 ^a
RVP	0.5581 ^a	2.42 ^a	2.47 ^a
RVPS	0.7580 ^a	2.67 ^a	2.55 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 29, a pesar de que la fuente y el lugar no tienen efectos significativos sobre la absorbancia de los picos (Abs_p) y las purezas relativas frente a ácidos nucleicos (PRAC) y proteínas (PRP), se encontraron distintas tendencias en sus comportamientos. En la Fig. 29A se puede observar una marcada interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción en la Abs_p evidenciado por su pendiente que contrasta con la otra, en la Fig. 29B se puede observar un comportamiento dispar de la PRAC entre los extractos evidenciado por las pendientes opuestas, mientras que en la Fig. 29C se muestra un comportamiento de interacción en la PRP de los extractos muy similar al de la Fig. 29B.

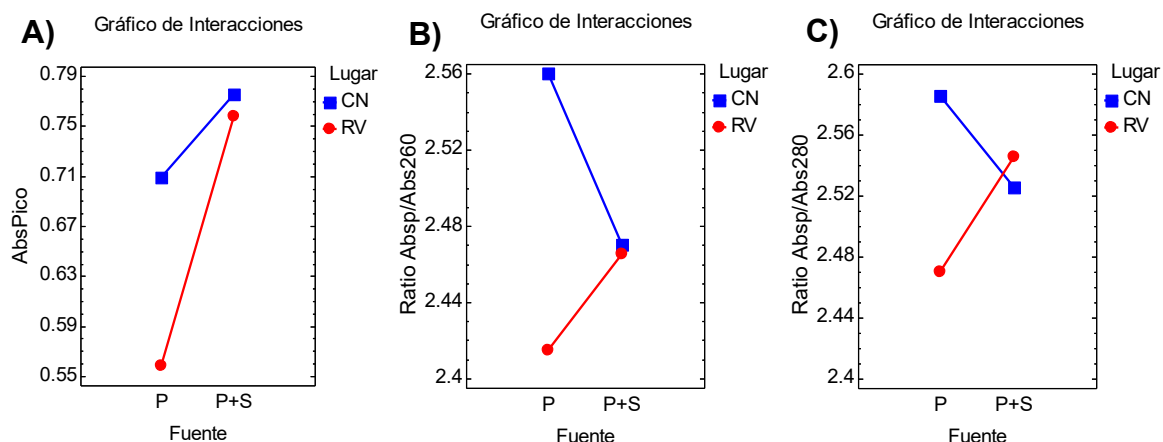


Fig. 29. Gráficos de la determinación de pureza relativa de los extractos. A) Interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción en la absorbancia del pico de los extractos, B) interacción entre los factores Fuente-Lugar en la PRAC de los extractos y C) interacción entre los factores Fuente-Lugar en la PRP de los extractos.

7.3.1.1. Determinación del factor de protección solar

Se calculó el factor de protección solar (FPS) de los extractos en medio acuoso e hidroalcohólico y unas muestras de bloqueadores comerciales en medio alcohólico como referencia. En la Tabla 35 se muestran las medianas de FPS calculadas para cada extracto (considerando ambos vehículos), donde se encontraron diferencias significativas en el FPS con un valor mínimo de 1.88 para RVP y un valor máximo de 2.56 de para CNPS. En otras investigaciones se encontró que las formulaciones de crema con extracto hidroalcohólico de fresa presentan un FPS de 0.83, y que el extracto al 5% presenta un FPS de 0.4568, por lo tanto los extractos de papache poseen mayor FPS que los extractos de fresa (Moya Cahuana & Osorio Oscoco, 2017).

Tabla 35. Medianas de FPS de cada extracto.

Tratamiento	FPS
CNP	2.23 ^b
CNPS	2.56 ^c
RVP	1.88 ^a
RVPS	2.53 ^c

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

En la Fig. 30 se muestran los valores promedio de FPS de los bloqueadores comerciales analizados, donde se puede observar que los resultados obtenidos *in-vitro* no corresponden a los valores reportados, incluso se puede apreciar que un bloqueador de supuestamente 6 FPS tiene un resultado superior al de dos bloqueadores de supuestamente 30+ y 50+ FPS. Lo cual indica que el método Mansur no es adecuado para el análisis del FPS *in-vitro* de estos bloqueadores.

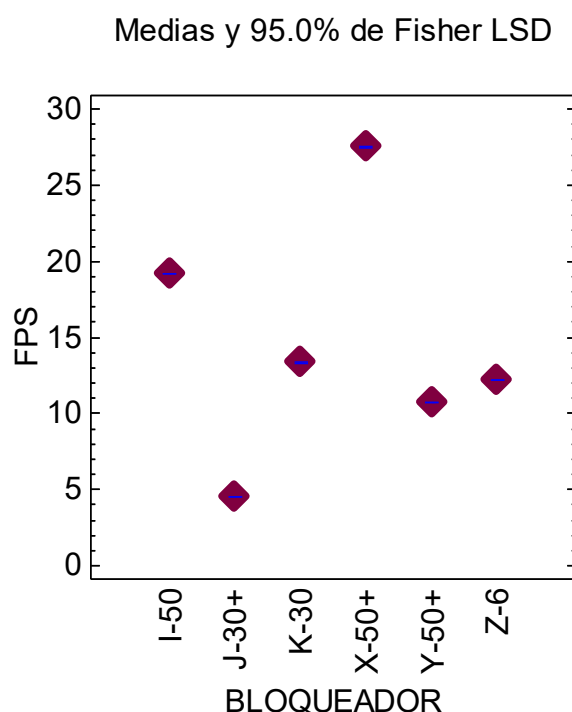


Fig. 30. Valores de FPS obtenidos para cada bloqueador comercial.

En la Tabla 36 se muestran las medianas de FPS calculadas para los extractos de distinta fuente en los distintos vehículos (considerando ambos lugares), donde se encontraron diferencias significativas de FPS con un valor mínimo de 1.96 para los extractos de pulpa en medio acuoso y un valor máximo de 2.71 para los extractos de pulpa-semilla medio hidroalcohólico.

Tabla 36. Medianas de FPS de cada tipo extracto en distinto vehículo.

Tratamiento	FPS
P-H ₂ O	1.96 ^a
P-EtOH 96%	2.16 ^a
PS-H ₂ O	2.39 ^b
PS-EtOH 96%	2.71 ^c

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

En la Fig. 31A, se puede observar una marcada interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción. Mientras que en la Fig. 31B se aprecia que a pesar de exhibir distintos valores de FPS, el factor Vehículo no tiene un efecto significativo sobre el FPS de los extractos evidenciado por el solapamiento de las muescas en la mediana.

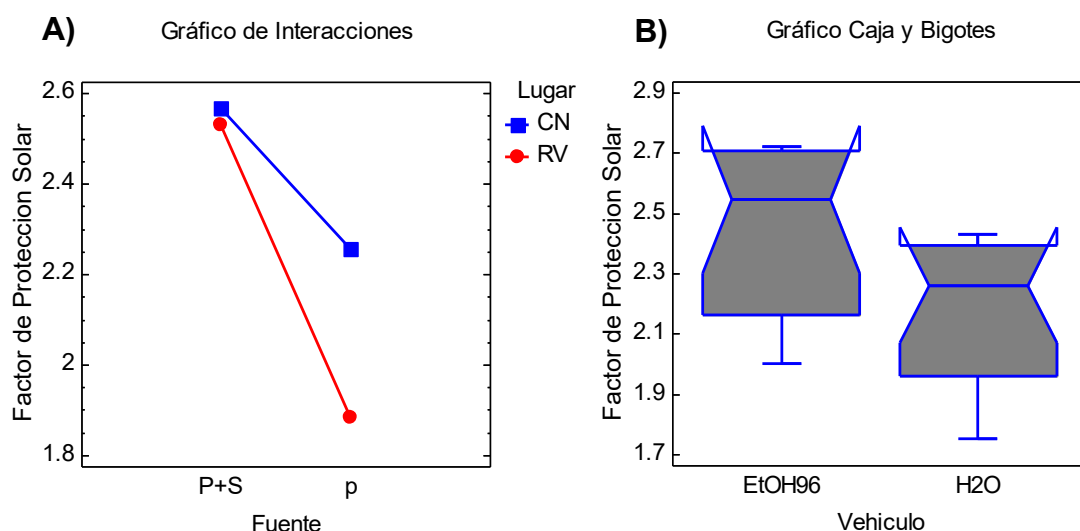


Fig. 31. Gráficos de la determinación de FPS de los extractos.

A) Interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción en el FPS de los extractos y B) efecto del factor Vehículo en el FPS de los extractos.

7.3.2. Caracterización espectroscópica FT-IR

En la Fig. 32 se muestran los espectros FT-IR característicos de los extractos, donde se puede apreciar la superposición general de las bandas principales y la variación relativa en la intensidad entre muestras.

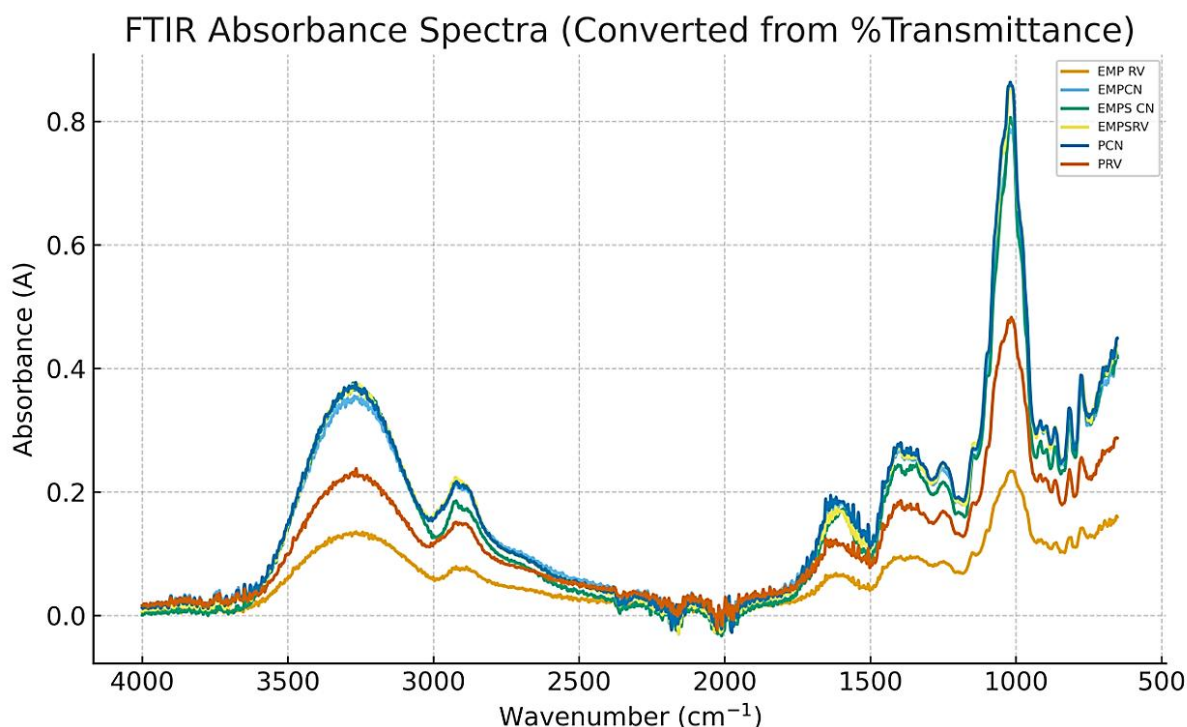


Fig. 32. Espectros FT-IR de los extractos y las harinas de pulpa.

La comparación de los seis espectros muestra que todos comparten las mismas bandas características: la banda ancha entre 3300–3400 cm⁻¹ (O–H/N–H), los estiramientos alifáticos C–H en 2920–2850 cm⁻¹, la banda de C=O alrededor de 1650–1700 cm⁻¹ y las señales intensas en la región 1000–1100 cm⁻¹ atribuibles a C–O/C–N. Por lo tanto, todas las muestras corresponden al mismo tipo de matriz química general. Sin embargo, se observan diferencias en la magnitud de la absorbancia: PCN, EMPCN y EMPS CN presentan señales más intensas, lo que sugiere mayor concentración relativa de compuestos orgánicos activos en FT-IR. En contraste, EMP RV y PRV muestran intensidades menores. Este patrón de bandas coincide parcialmente por el reportado por Pralea *et al.*, 2019, pero resalta otra bandas a los 1000 cm⁻¹

Con en análisis de correlación múltiple de Pearson mostrado en la Tabla 37 se encontró que los espectros presentan valores extremadamente altos de correlación (≥ 0.983), lo cual indica una alta similitud entre las señales FTIR de las seis muestras.

Tabla 37. Correlación de Pearson entre los espectros FT-IR.

	EMP RV	EMPCN	EMPS CN	EMPSRV	PCN	PRV
EMP RV	1.000000	0.986700	0.988115	0.985405	0.983241	0.990859
EMPCN	0.986700	1.000000	0.996819	0.999329	0.999310	0.997101
EMPS CN	0.988115	0.996819	1.000000	0.997271	0.996834	0.991906
EMPSRV	0.985405	0.999329	0.997271	1.000000	0.999194	0.996001
PCN	0.983241	0.999310	0.996834	0.999194	1.000000	0.995264
PRV	0.990859	0.997101	0.991906	0.996001	0.995264	1.000000

En la Tabla 38 se muestra la matriz RMSD (Root Mean Square Deviation), la cual confirma que las diferencias entre los espectros son mínimas. Los valores oscilan entre 0.007 y 0.15, lo cual indica que las variaciones son cuantitativas (intensidad) y no cualitativas (composición).

Tabla 38. Matriz RMSD de los espectros FT-IR.

	EMP RV	EMPCN	EMPS CN	EMPSRV	PCN	PRV
EMP RV	0.000000	0.141293	0.136325	0.150292	0.152649	0.070226
EMPCN	0.141293	0.000000	0.018665	0.012875	0.013706	0.071967
EMPS CN	0.136325	0.018665	0.000000	0.019237	0.022104	0.069884
EMPSRV	0.150292	0.012875	0.019237	0.000000	0.007124	0.081708
PCN	0.152649	0.013706	0.022104	0.007124	0.000000	0.083861
PRV	0.070226	0.071967	0.069884	0.081708	0.083861	0.000000

7.3.3. Cuantificación de melaninas

A continuación, en la Fig. 33 se muestra la curva estándar de melaninas donde se puede apreciar en qué región cayeron las muestras analizadas, así como la ecuación de regresión cuadrática y valor de R^2 .

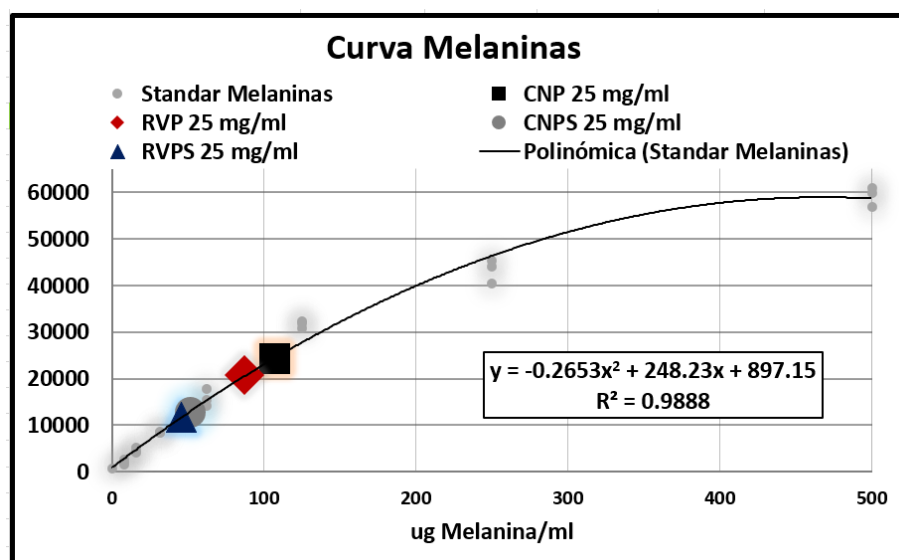


Fig. 33. Curva estándar de melaninas usada para la cuantificación de melaninas.

En la Tabla 39 se muestran los valores promedio y desviación estándar del contenido de melaninas calculados para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas en el contenido de melaninas entre los extractos con un valor mínimo de 1.81 mg ME/g extracto seco para RVPS y un valor máximo de 4.25 mg ME/g extracto seco para CVP.

Tabla 39. Contenido promedio de melaninas de cada extracto.

Tratamiento	mg ME/g Extracto Seco
CNP	4.25 ± 0.06^d
CNPS	2.05 ± 0.02^b
RVP	3.49 ± 0.14^c
RVPS	1.81 ± 0.03^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 34, tanto la fuente de donde se obtiene el extracto como el lugar de donde se cosechó el fruto afectan significativamente al contenido de melaninas ($p=0.0000$), siendo la fuente pulpa y el lugar Cahuinahuaro los que tuvieron mayor contenido equivalente de melaninas.

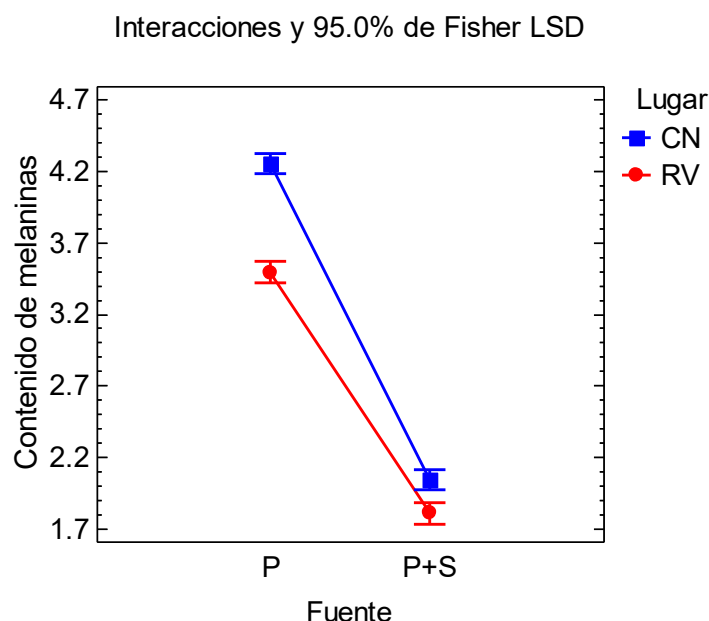


Fig. 34. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en el contenido de melaninas de los extractos.

7.3.4. Determinación de azúcares reductores

A continuación, en la Fig. 35 se muestra la curva estándar de glucosa donde se puede apreciar en qué región cayeron las muestras analizadas, así como la ecuación de regresión lineal y valor de R^2 .

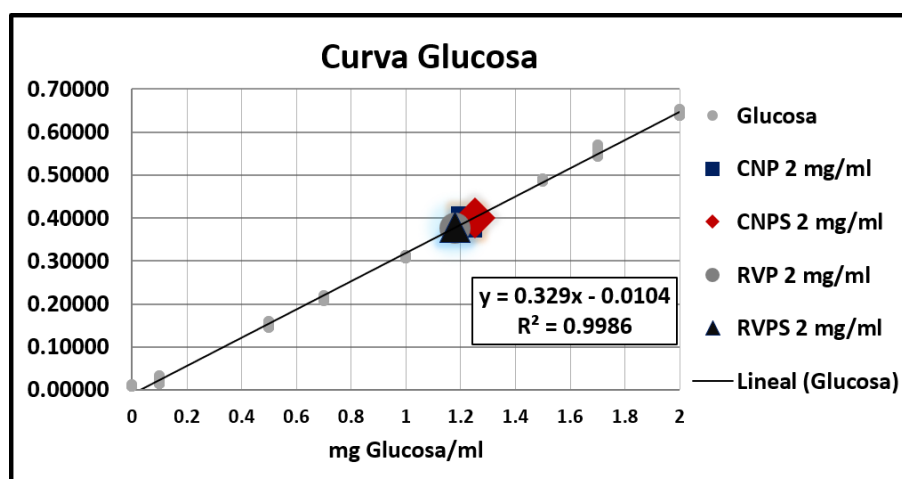


Fig. 35. Curva estándar de glucosa usada para calcular los azúcares reductores.

En la Tabla 40 se muestran las medianas del contenido de glucosa calculados para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas en el contenido de azúcares reductores entre los extractos con un valor mínimo de 58.81% para RVP y un valor máximo de 62.55% para CNPS.

Tabla 40. Medianas del contenido de glucosa de cada extracto.

Tratamiento	% Eq. glucosa
CNP	61.07^b
CNPS	62.74^c
RVP	57.65^a
RVPS	58.85^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 36A, el lugar de donde se obtuvieron los frutos afecta significativamente el contenido de azúcares reductores, siendo el lugar Cahuinahuaro el que presentó mayores cantidades de azúcares reductores, también existe una fuerte interacción entre el lugar Cahuinahuaro y la fuente de donde se obtuvieron los extractos, evidenciado por su marcada pendiente inclinada que contrasta con la otra. Como las lecturas fueron tomadas en 3 placas diferentes, se analizó el efecto del factor placa sobre la variabilidad de la respuesta y se encontró que tuvo un efecto significativo ($p=0.0025$) sobre la variable respuesta, siendo la placa C la que presentó mayores valores como se muestra en la Fig. 36B.

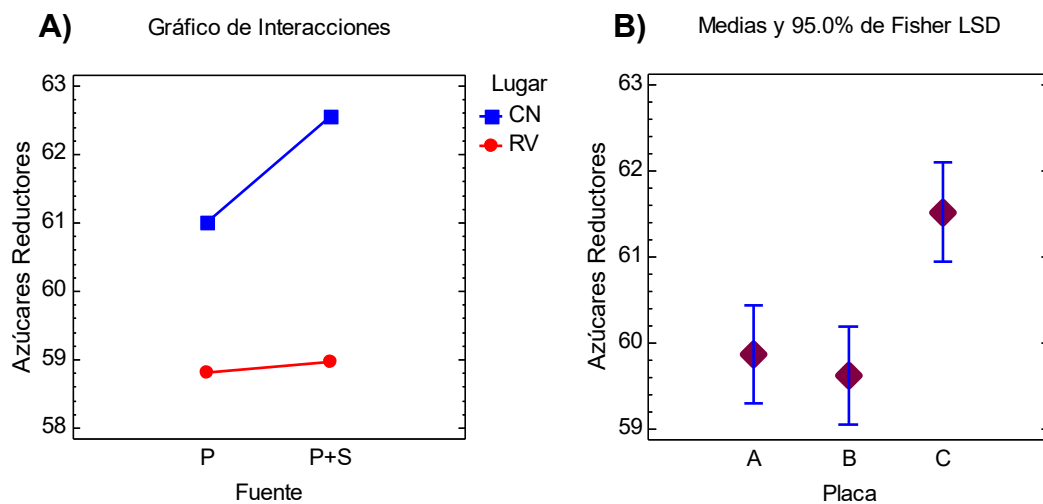


Fig. 36. Gráficos de la determinación de azúcares reductores.
A) Interacción entre los factores Fuente-Lugar en el contenido de azúcares reductores de los extractos y B) Efecto del factor placa en la lectura del contenido de azúcares reductores.

7.4. Evaluación del potencial nutraceutico

7.4.1. Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FL

A continuación, en la Fig. 37 se muestra la curva estándar de Trolox donde se puede apreciar en qué región cayeron las muestras analizadas, así como la ecuación de regresión lineal y valor de R^2 .

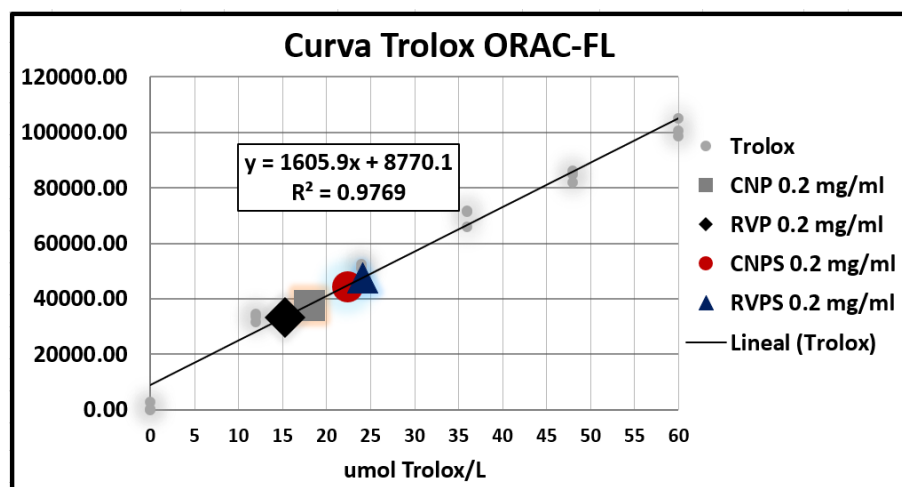


Fig. 37. Curva estándar de Trolox usada para calcular la capacidad antioxidante por ORAC-FL.

En la Tabla 41 se muestran las medianas de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) por ORAC-FL calculadas para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas de TEAC entre los extractos con un valor mínimo de 73.13 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco para RVP y un valor máximo de 114.85 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco para RVPS.

Tabla 41. Medianas de la TEAC de cada extracto por ORAC-FL.

Tratamiento	$\mu\text{mol TE/g}$ Extracto Seco
CNP	86.83 ^b
CNPS	102.95 ^c
RVP	73.13 ^a
RVPS	114.85 ^c

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 38, la fuente de donde se obtiene el extracto afecta significativamente la TEAC, siendo la fuente pulpa-semilla la que obtuvo mayores

resultados, también existe una fuerte interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción, evidenciado por su marcada pendiente oblicua.

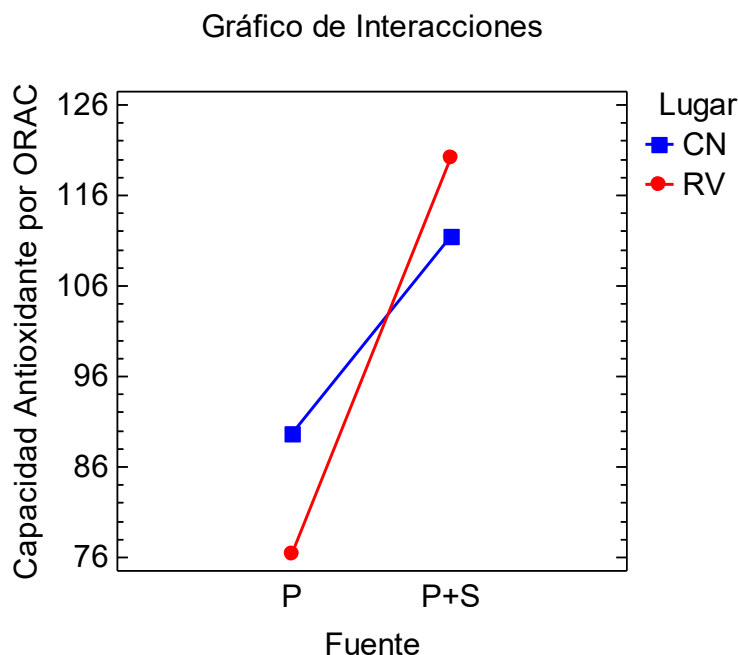


Fig. 38. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la TEAC por ORAC-FL.

En la Tabla 42 se muestran las medianas de la actividad antirradical (ARA) contra radicales R-OO $\cdot$ por ORAC-FL calculadas para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas de ARA entre los extractos con un valor mínimo de 9.96% para RVP y un valor máximo de 11.99% para RVPS.

Tabla 42. Medianas de ARA contra R-OO $\cdot$ de cada extracto por ORAC-FL.

Tratamiento	% ARA R-OO $\cdot$
CNP	10.62 ^b
CNPS	11.41 ^c
RVP	9.96 ^a
RVPS	11.99 ^c

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

El gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la actividad antirradical por ORAC-FL mostró exactamente la misma tendencia que la Fig. 38 (grafica no mostrada).

7.4.2. Determinación de capacidad antioxidante por DPPH

A continuación, en la Fig. 39 se muestra la curva estándar de Trolox donde se puede apreciar en qué región cayeron las muestras analizadas, así como la ecuación de regresión lineal y valor de R^2 .

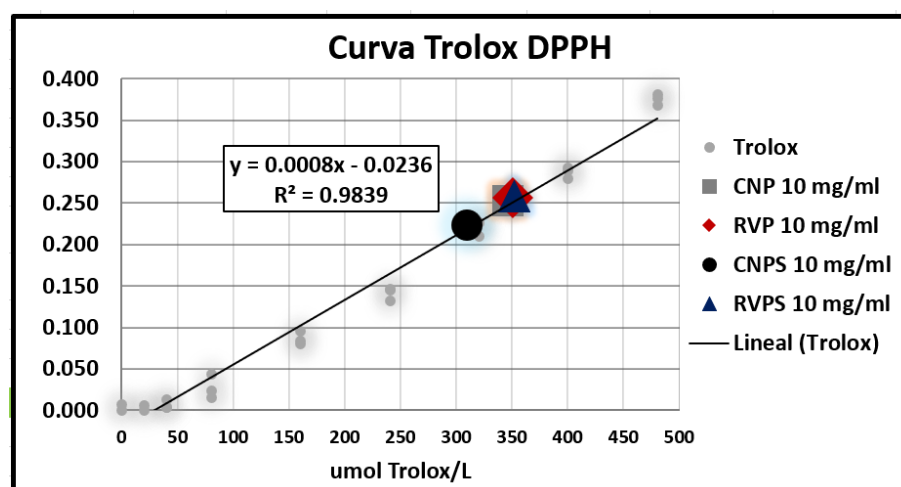


Fig. 39. Curva estándar de Trolox usada para calcular la capacidad antioxidante por DPPH.

En la Tabla 43 se muestran los valores promedio y desviación estándar de TEAC por DPPH calculados para cada uno de los tratamientos, se encontraron diferencias significativas de TEAC entre los extractos con un valor mínimo de $30.83 \mu\text{mol TE/g}$ extracto seco para CNPS y un valor máximo de $35.04 \mu\text{mol TE/g}$ extracto seco para RVPS.

Tabla 43. Valores promedio de la TEAC de cada extracto por DPPH.

Tratamiento	$\mu\text{mol TE/g}$ Extracto Seco
CNP	34.46 ± 0.93^b
CNPS	30.83 ± 1.49^a
RVP	34.90 ± 35.04^b
RVPS	35.04 ± 2.36^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 40, existe una fuerte interacción entre el lugar Cahuinahuaro y la fuente de extracción, evidenciado por su gran pendiente inclinada.

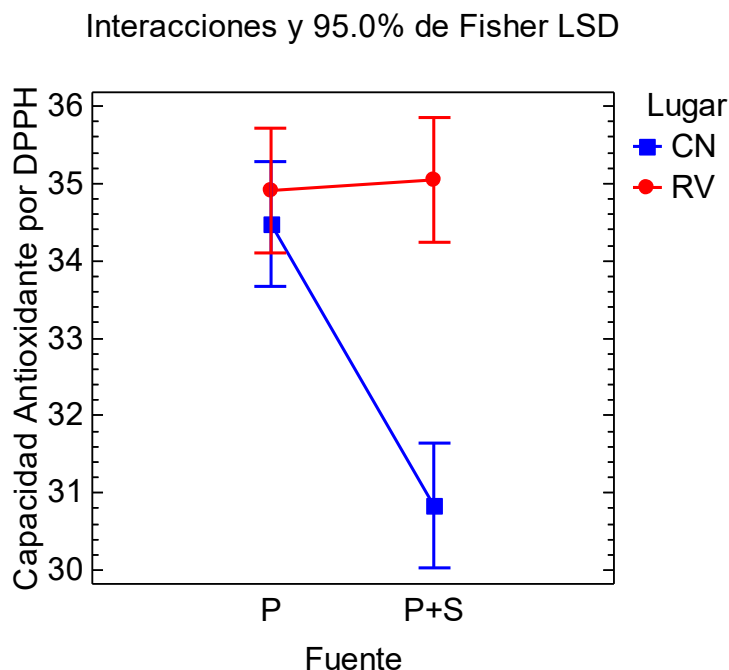


Fig. 40. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la TEAC por DPPH.

En la Tabla 44 se muestran los valores promedio y desviación estándar de ARA contra radicales DPPH $\cdot$ calculados para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas de ARA entre los extractos, con un valor mínimo de 31.99% para CNPS y un valor máximo de 36.86% para RVPS.

Tabla 44. Valores promedio de ARA contra DPPH $\cdot$ de cada extracto.

Tratamiento	% ARA DPPH $\cdot$
CNP	36.16 $\pm$ 1.06 ^b
CNPS	31.99 $\pm$ 1.78 ^a
RVP	36.69 $\pm$ 1.82 ^b
RVPS	36.86 $\pm$ 2.68 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

El gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la ARA contra DPPH $\cdot$ mostró exactamente la misma tendencia que la Fig. 40 (grafica no mostrada).

7.4.3. Determinación de capacidad antioxidante por ABTS

A continuación, en la Fig. 41 se muestra la curva estándar de Trolox donde se puede apreciar en qué región cayeron las muestras analizadas, así como la ecuación de regresión lineal y valor de R^2 .

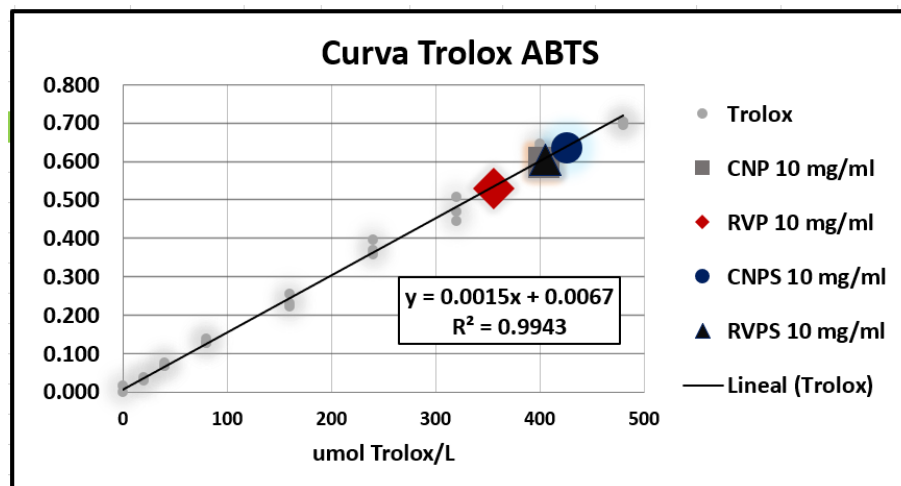


Fig. 41. Curva estándar de Trolox usada para calcular la capacidad antioxidante por ABTS.

En la Tabla 45 se muestran los valores promedio y desviación estándar de TEAC por ABTS calculados para cada uno de los tratamientos, se encontraron diferencias significativas de TEAC entre los extractos con un valor mínimo de 35.49 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco para RVP y un valor máximo de 42.48 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco para CNPS. Estos resultados son muy inferiores a los reportados por Montes-Avila *et al.*, 2018, quienes encontraron capacidades antioxidantes de 835.7 $\mu\text{mol TE/g}$ para *R. equinocarpa* y 1333.5 $\mu\text{mol TE/g}$ para *V. mollis*, pero son relativamente similares a los obtenidos por Cuevas-Juárez *et al.*, 2014, donde encontraron una capacidad antioxidante de 53-76 $\mu\text{mol TE/g}$ para los extractos de *R. equinocarpa*.

Tabla 45. Valores promedio de la TEAC de cada extracto por ABTS.

Tratamiento	$\mu\text{mol TE/g Extracto Seco}$
CNP	40.22 ± 2.51^b
CNPS	42.48 ± 1.22^c
RVP	35.49 ± 1.36^a
RVPS	40.37 ± 2.67^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 42, tanto la fuente de donde se obtiene el extracto como el lugar de donde se cosechó el fruto afectan significativamente la TEAC ($p=0.0000$), también existe una ligera interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción, apreciable por su pendiente ligeramente inclinada en contraste con la otra.

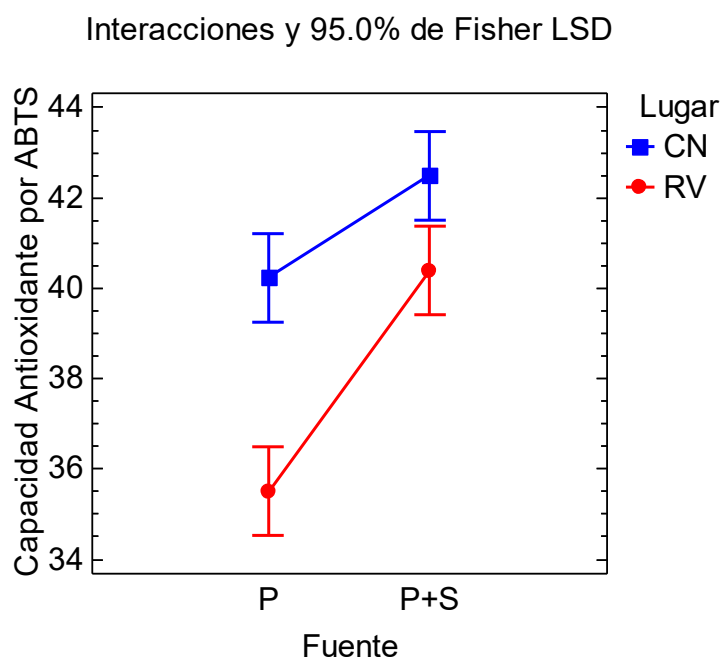


Fig. 42. Gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la TEAC por ABTS.

En la Tabla 46 se muestran los valores promedio y desviación estándar de ARA contra radicales ABTS $\cdot+$ calculados para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas de ARA entre los extractos, con un valor mínimo de 71.36% para RVP y un valor máximo de 85.51% para CNPS.

Tabla 46. Valores promedio de ARA contra ABTS $\cdot^+$ de cada extracto.

Tratamiento	% ARA ABTS $\cdot^+$
CNP	80.93 $\pm$ 5.02 ^b
CNPS	85.51 $\pm$ 2.57 ^c
RVP	71.36 $\pm$ 2.74 ^a
RVPS	81.32 $\pm$ 5.39 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

El gráfico de interacción entre los factores Fuente-Lugar en la ARA contra ABTS $\cdot^+$ mostró exactamente la misma tendencia que la Fig. 42 (grafica no mostrada).

7.4.4. Determinación de capacidad antidiabética para α -amilasa

A continuación, en la Fig. 43 se muestra la curva estándar de acarbosa donde se puede apreciar en qué región cayeron las muestras analizadas, así como la ecuación de regresión lineal y valor de R^2 .

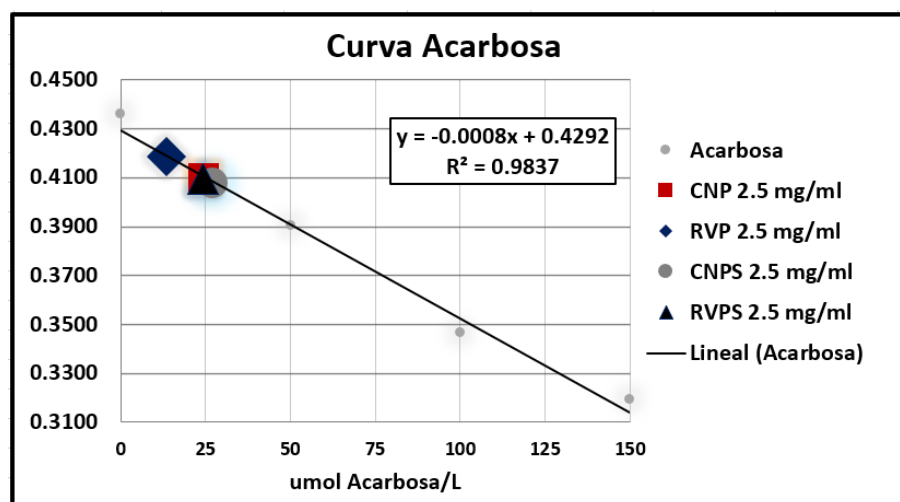


Fig. 43. Curva estándar de acarbosa usada para calcular la AEIC.

En la Tabla 47 se muestran los valores promedio y desviación estándar de la capacidad inhibitoria equivalente de acarbosa (AEIC) para α -amilasa calculados para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas en la AEIC entre los extractos con un valor mínimo de 5.36 μ mol AE/g extracto seco para RVP y un valor máximo de 10.7 μ mol AE/g extracto seco para CNPS.

Tabla 47. Valores promedio de AEIC para α -amilasa de cada extracto.

Tratamiento	$\mu\text{mol AE/g Extracto Seco}$
CNP	9.70 ± 2.57^b
CNPS	10.70 ± 5.34^b
RVP	5.36 ± 2.24^a
RVPS	9.62 ± 3.72^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en la Fig. 44A, existe una marcada interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción, evidenciado por su pendiente inclinada en contraste con la otra. Como las lecturas fueron tomadas en 2 placas distintas, se analizó el efecto del factor placa sobre la variabilidad de la respuesta y se encontró que tuvo un efecto significativo ($p=0.0074$) sobre la variable respuesta, siendo la placa A la que presentó mayor respuesta como se muestra en la Fig. 44B.

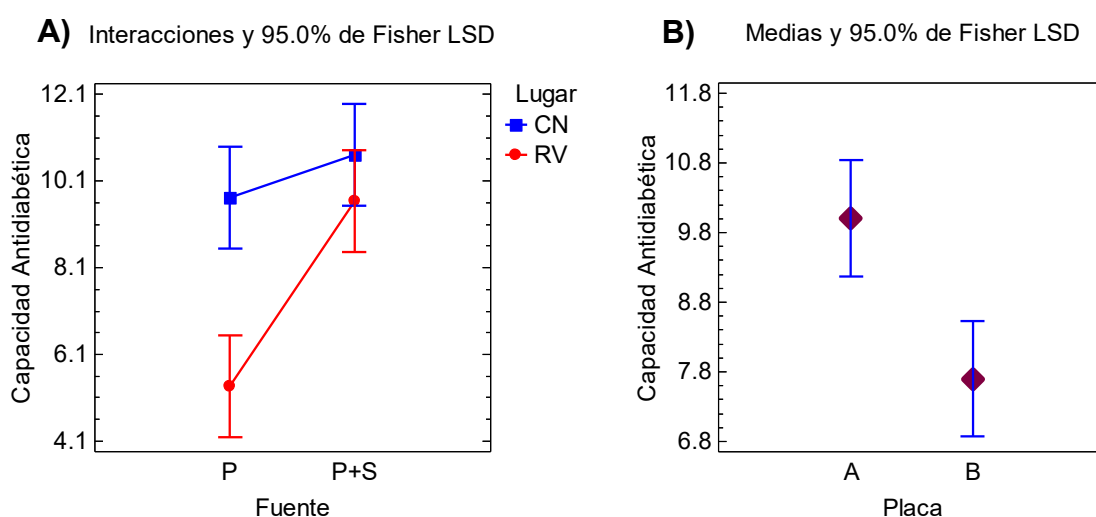


Fig. 44. Gráficos del análisis de inhibición de α -amilasa.

A) Interacción entre los factores Fuente-Lugar en la AEIC para α -amilasa de los extractos y B) Efecto del factor placa en la lectura de AEIC para α -amilasa).

En la Tabla 48 se muestran los valores promedio y desviación estándar del % inhibición de la α -amilasa calculados para cada uno de los tratamientos, donde se encontraron diferencias significativas de inhibición entre los extractos, con un valor mínimo de 4.08% para RVP y un valor máximo de 6.54% para CNPS. Estos valores son muy inferiores a los reportados por Aguilar-Camacho *et al.*, 2024, quienes reportaron

valores de 20.8-34.2% de inhibición en extractos de cultivos celulares de *R. equinocarpa*.

Tabla 48. Valores promedio de % Inhibición de α -amilasa de cada extracto.

Tratamiento	% Inhibición de α -amilasa
CNP	6.10 ± 1.18^b
CNPS	6.54 ± 2.45^b
RVP	4.08 ± 1.03^a
RVPS	6.09 ± 1.73^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Como punto referencia, en la Tabla 49 se muestran los % Inhibición de α -amilasa obtenidos de las distintas soluciones estándar de acarbosa.

Tabla 49. Valores promedio de % Inhibición de α -amilasa de cada solución estándar de acarbosa.

Acarbosa (μ M)	% Inhibición de α -amilasa
25	7.29 ± 0.23
50	10.52 ± 0.65
100	20.58 ± 3.36
150	26.85 ± 0.36

Los gráficos de % Inhibición de α -amilasa mostraron exactamente la misma tendencia que la Fig. 44A (grafica no mostrada).

7.5. Análisis de estabilidad de los extractos

7.5.1. Análisis de estabilidad pH-Tiempo

En la Tabla 50 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo los distintos pH (considerando todos los tiempos). En el caso del pH 3 se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 92.3% para CNPS y un valor máximo de 102.6% para RVPS. En las soluciones de pH 5 se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 90.4% para RVP y un valor máximo de 102.8% para RVPS, respectivamente. En el caso de las soluciones de pH 9 se encontraron diferencias significativas en la retención con un valor mínimo de 82.2% para RVP y un valor máximo de 88.0% para CNPS. En las soluciones de pH 11 se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 62.8% para RVP y un valor máximo de 72.6% para CNPS.

Tabla 50. Medianas de la retención de los extractos bajo las condiciones de pH.

Extracto	Retención (%)				
	pH3	pH5	pH7	pH9	pH11
CNP	100.0 ^b	91.8 ^a	96.5 ^a	87.6 ^b	71.8 ^b
CNPS	92.3 ^a	100.5 ^b	92.6 ^a	88.0 ^b	72.6 ^b
RVP	102.4 ^b	90.4 ^a	92.0 ^a	82.2 ^a	62.8 ^a
RVPS	102.6 ^b	102.8 ^b	97.1 ^a	87.9 ^b	71.9 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con en análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 51 se encontró que en general la retención de melaninas se ve más significativamente afectada por el aumento del pH que por el aumento del tiempo de exposición, mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 45B.

Tabla 51. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y pH.

	Retencion	Tiempo	pH
Retencion		-0.1186	-0.6958
		(1260)	(1260)
		0.0000	0.0000
Tiempo	-0.1186		0.0000
	(1260)		(1260)
	0.0000		1.0000
pH	-0.6958	0.0000	
	(1260)	(1260)	
	0.0000	1.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 52 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo los distintos pH en el día 7 (considerando todos los extractos). Se encontraron diferencias significativas entre el efecto de los distintos pH sobre la retención de melaninas, con un valor mínimo de 71.9% para pH 11 y un valor máximo de 98.4% para el pH 5. Estos datos muestran una tendencia contraria a la reportada por (S. Liu *et al.*, 2023) para las melaninas de calamar, donde encontraron que la tasa de retención de las melaninas bajo condiciones neutras y alcalinas con valores de pH de 7.0, 9.16 y 10.83, fue alta y casi sin cambios, mientras que en condiciones ácidas, con pH de 3.0 y 5.0, la tasa de retención de melaninas fue menor.

Tabla 52. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las condiciones de pH.

pH	Retención (%) en día 7
3	97.1 ^c
5	98.4 ^c
7	90.0 ^c
9	83.6 ^b
11	71.9 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del grafico de interacciones de la Fig. 45A se puede observar que existe una fuerte interacción entre el lugar Rancho Viejo y la fuente de extracción pulpa-semilla, evidenciado por su pendiente inclinada.

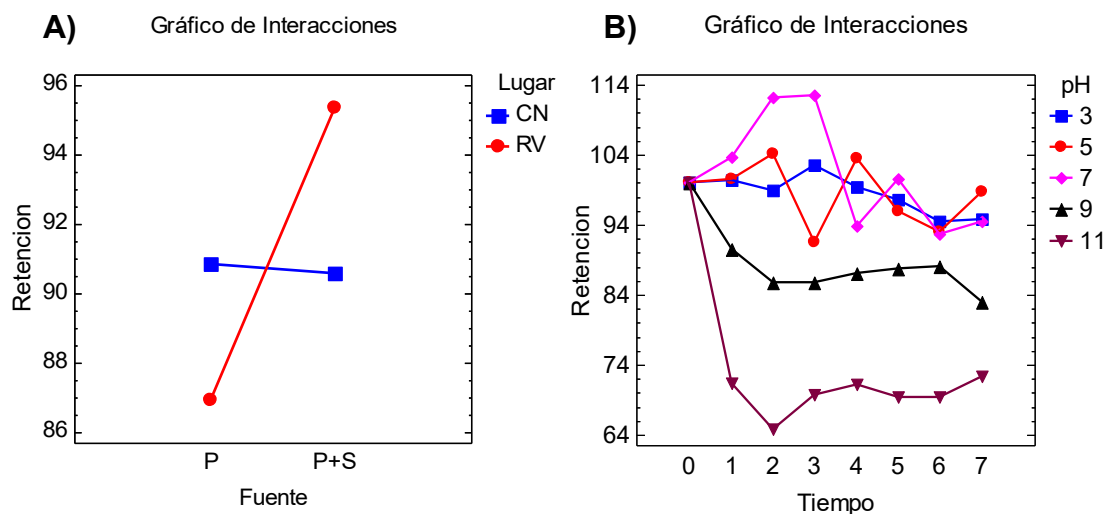


Fig. 45. Gráficos de interacción en la prueba de pH.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todos los pH y tiempos), y B) gráfico de interacción entre el pH y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

A lo largo del experimento no se encontraron variaciones visibles apreciables en el color de las soluciones pero si se observaron cambios en la solubilidad de las melaninas, donde se observó que las melaninas expuestas al pH 3 se precipitan formando agregados de color oscuro, las melaninas expuestas al pH 5 sufrieron un proceso de floculación ligera donde se formaron agregados traslucidos, las muestras expuestas al pH 7 tuvieron una floculación moderada donde se formaron agregados traslucidos, mientras que las muestras expuestas a pH 9 y 11 no presentaron cambios apreciables en su solubilidad. Estos hallazgos corresponden parcialmente con los encontrados por (S. Liu *et al.*, 2023) para las melaninas de calamar, quienes observaron que, cuando el pH < 5,0, la solución de melaninas comenzó a formar precipitados floculentos, haciendo que el color de la solución cambiara de marrón oscuro a claro, este comportamiento puede deberse a las propiedades de los carbohidratos y ácidos orgánicos acomplejados en la estructura de las melaninas (Gil-

Avilés *et al.*, 2019), tales interacciones podrían dar lugar a la generación de puntos isoeléctricos que provocan la precipitación. Al momento de fotografiar las muestras solo se apreciaron diferencias en la solución de pH 3 como se muestra en la Fig. 46.



Fig. 46. Cambios visibles encontrados entre los distintos pH.

7.5.2. Análisis de estabilidad Temperatura-Tiempo

En la Tabla 53 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas temperaturas (considerando todos los tiempos). En el caso de la temperatura de 4 °C se encontraron diferencias significativas, con un valor mínimo de 99% para RVPS y un valor máximo de 105.1% para RVP. Para la temperatura de 25 °C se encontraron diferencias significativas en la retención entre los extractos, con un valor mínimo de 104.3% para RVPS y un valor máximo de 112.8 °C para CNPS. En la temperatura de 40 °C también se encontraron diferencias significativas en la retención entre los extractos, con un valor mínimo de 95.2% para RVPS y un valor máximo de 97.1 °C para RVP.

Tabla 53. Medianas de la retención de los extractos bajo distintas temperaturas.

Extracto	Retención (%)				
	4 °C	25 °C	40 °C	60 °C	80 °C
CNP	99.3 ^a	104.5 ^a	96.4 ^{a,b}	96.3 ^a	97.6 ^a
CNPS	101.9 ^b	112.8 ^c	96.4 ^{a,b}	96.4 ^a	98.1 ^a
RVP	105.1 ^b	106.1 ^b	97.1 ^b	95.3 ^a	97.7 ^a
RVPS	99.0 ^a	104.3 ^a	95.2 ^a	95.6 ^a	98.1 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con el análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 54 se encontró que en general la retención de melaninas se ve más significativamente afectada por el aumento de la temperatura que por el aumento del tiempo de exposición, mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 47B.

Tabla 54. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Temperatura y Tiempo.

	Retencion	Temperatura	Tiempo
Retencion		-0.4379	-0.0812
		(900)	(900)
		0.0000	0.0149
Temperatura	-0.4379		0.0000
	(900)		(900)
	0.0000		1.0000
Tiempo	-0.0812	0.0000	
	(900)	(900)	
	0.0149	1.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 55 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo los distintos pH a las 10 horas (considerando todos los extractos). Se encontraron diferencias significativas entre el efecto de las distintas temperaturas sobre la retención de melaninas, con un valor mínimo de 94.6% a los 60 °C y un valor máximo de 108.6% para los 25 °C. Estos resultados, a pesar de ser un poco distintos que los obtenidos para las melaninas de calamar por Liu *et al.*, 2023, los cuales estuvieron entre 98% y 97% para los intervalos entre 4 y 80 °C, se mantienen en el mismo rango aproximado mostrando comportamientos similares, aunque los datos obtenidos en este experimento presentaron mayor variabilidad.

Tabla 55. Medianas generales de la retención de melaninas a distintas temperaturas.

Temperatura	Retención (%) a las 10 horas
4 °C	101.6 ^c
25 °C	108.6 ^d
40 °C	98.9 ^b
60 °C	94.6 ^a
80 °C	98.4 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del grafico de interacciones de la Fig. 47A se puede observar que existe una fuerte interacción opuesta entre el lugar de origen y la fuente de extracción, evidenciado por las pendientes inclinadas inversas. Mientras que en la Fig. 47B se aprecian comportamientos atípicos a 4 y 25 °C donde presentaron absorbancias superiores a la inicial, esto puede deberse a la oxidación/polimerización de las melaninas en medio acuoso, cuya polimerización pudiera inhibirse a altas temperaturas.

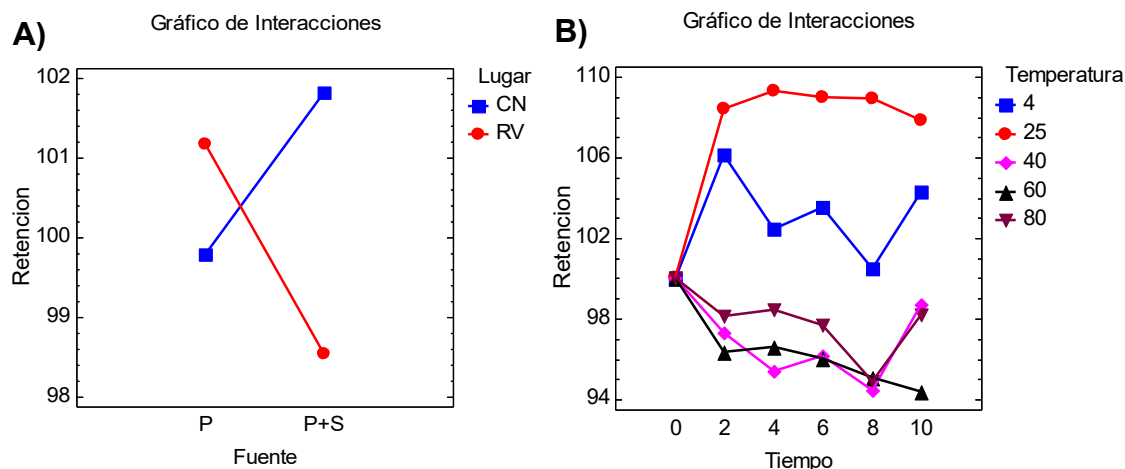


Fig. 47. Gráficos de interacción en el análisis de termoestabilidad.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las temperaturas y tiempos), y B) Gráfico de interacción entre la temperatura y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

Cabe señalar que no se encontraron variaciones en la coloración de las soluciones a lo largo del experimento. Resultados que se corresponden con los obtenidos por S. Liu *et al.*, 2023 para las melaninas de calamar.

7.5.3. Análisis de estabilidad Luz-Tiempo

En la Tabla 56 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas condiciones de exposición de a luz (considerando todos los tiempos). En el caso de la exposición directa al sol se determinó la irradiación solar media por hora entre los días de exposición que fueron del 3 al 9 de diciembre del 2025 mediante los datos meteorológicos presentados en la página web de TuTiempo (TuTiempo.net, 2025), dando un resultado de 587 Wh/m² por hora de exposición. En total fueron aproximadamente 24219 Wh/m² de irradiación y se encontraron diferencias significativas en la retención entre los extractos, con un valor mínimo 73.4% para RVP y un valor máximo de 81.8% para RVPS. En el caso de la exposición a la luz artificial se estimó un aproximado de 26.67 klx de iluminación incidente durante las pruebas de fotoestabilidad y se encontraron diferencias significativas en los valores de retención entre los extractos, con un valor mínimo de 95.7% para CNPS y un valor máximo de 125.3% para CNP. Así mismo en las muestras

protegidas de la luz se encontraron diferencias significativas en los valores de retención entre los extractos, con un valor mínimo de 105.8% para CNP y un valor máximo de 111.2% para CNPS.

Tabla 56. Medianas de la retención de los extractos bajo las condiciones de exposición a la luz.

Extracto	Retención (%)		
	Sol	Luz	Oscuridad
CNP	68.1^a	125.3^c	105.8^a
CNPS	78.3^b	95.7^a	111.2^c
RVP	73.4^{a,b}	116.5^b	108.6^b
RVPS	81.8^c	119.7^b	111.1^c

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

En la Tabla 57 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas condiciones de exposición a la luz (considerando todos los extractos). Se encontró que la condición de exposición solar directa presenta diferencias significativas en la retención de melaninas, con un valor mínimo de 68.7% para la luz solar directa y un valor máximo de 114.9 para las muestras protegidas de la luz. Sin considerar las datos de exposición solar directa, estos hallazgos no se corresponden con los reportados por S. Liu *et al.*, 2023 para las melaninas de calamar, quienes reportaron valores de retención de 92% para la exposición a la luz artificial, la cual ajustaron a una intensidad de 100 klx (aproximadamente 4 veces mayor a la de este estudio) y 96% para las muestras que se mantuvieron protegidas de la luz. En el caso de la exposición solar directa, los hallazgos encontrados muestran un comportamiento similar al reportado por (Montes-Avila *et al.*, 2018) para las melaninas de papache expuestas por 15 días, quienes encontraron que la absorbancia de las soluciones de melaninas disminuyó hasta un 50% al día 15 de exposición.

Tabla 57. Medianas generales de la retención de melaninas ante la exposición a la luz.

Exposición	Retención (%) al día 7
Sol	68.7 ^a
Luz	109.8 ^b
Oscuridad	114.9 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del gráfico de interacciones de la Fig. 48A se puede observar que existe una fuerte interacción entre el lugar de origen y la fuente de extracción, evidenciado por las marcadas pendientes opuestas. Mientras que en el gráfico de interacciones de la Fig. 48B se puede observar que en general la retención de melaninas se ve más significativamente afectada por la condición de exposición a la luz que por el aumento del tiempo de exposición, aunque también existe una marcada interacción entre la exposición a la luz solar directa y el tiempo de exposición, evidenciado por la gran pendiente que exhibe respecto a las otras condiciones de exposición a la luz.

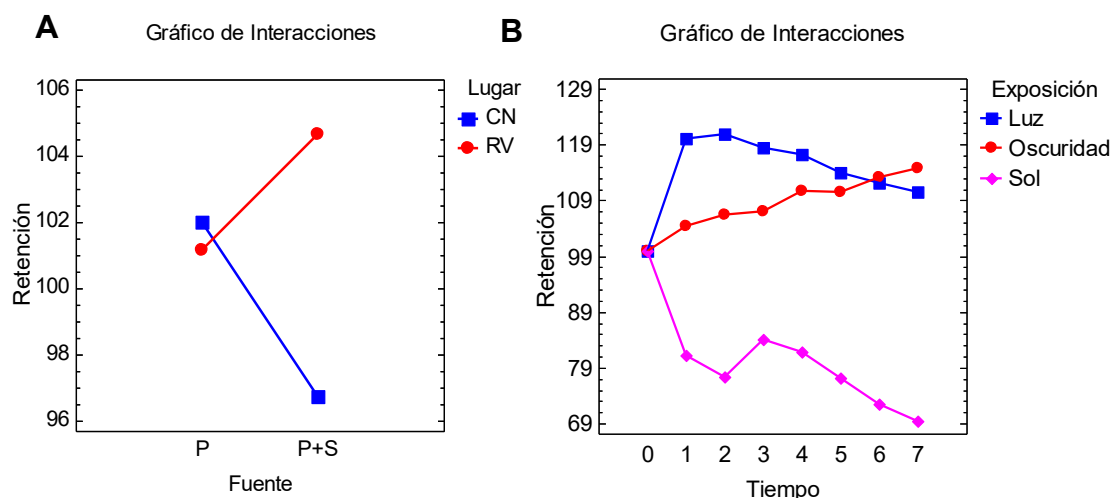


Fig. 48. Gráficos de interacción en la prueba de exposición a la luz.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todos los tipos y tiempos de exposición), y B) gráfico de interacción entre los tipos y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

Al finalizar el experimento se encontraron variaciones visibles en el color de la solución como se muestra en la Fig. 49, donde se observó que las melaninas expuestas a la luz artificial sufrieron ligeras decoloraciones en comparación de las melaninas que se mantuvieron protegidas de la luz, e incluso, las melaninas expuestas a la luz solar directa sufrieron decoloraciones mas intensas respecto a las muestras expuestas a la luz artificial. Estos resultados se corresponden con los reportados por (Montes-Avila *et al.*, 2018).



Fig. 49. Cambios visibles encontrados entre las distintas condiciones de exposición a la luz.

7.5.4. Análisis de estabilidad Redox-Tiempo

En la Tabla 58 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de H_2O_2 (considerando todos los tiempos). En el caso de H_2O_2 0.01 M se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 88.50% para CNP y un valor máximo de 96.87% para RVPS, en el caso de H_2O_2 0.1 M se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 84.19% para RVP y un valor máximo de 87.42% para CNPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento H_2O_2 0.5 M donde el valor mínimo fue de 70.10% para CNP y el valor máximo fue de 77.68% para RVPS, en el caso de H_2O_2 1 M también se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 43.99% para RVP y un valor máximo de 64.49% para RVPS, mientras que en el caso de H_2O_2 2 M se dieron diferencias significativas con un valor mínimo de 67.23% para CNP y un valor máximo de 98.15% para RVP, paradójicamente los valores de retención en H_2O_2 2 M son mayores que en concentraciones menores.

Tabla 58. Medianas de la retención de los extractos bajo condiciones oxidantes.

Extracto	%Retención frente a H_2O_2				
	0.01 M	0.1 M	0.5 M	1 M	2 M
CNP	88.50^a	84.39^a	70.10^a	57.05^b	67.23^a
CNPS	91.84^b	87.42^b	72.24^{a,b}	58.09^b	80.36^b
RVP	88.82^a	84.19^a	74.07^b	43.99^a	98.15^c
RVPS	96.87^c	86.35^{a,b}	77.68^c	64.49^c	83.76^{b,c}

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con el análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 59 se encontró que en general la retención de melaninas se ve más negativamente afectada por el tiempo de exposición que por el aumento de la concentración de H_2O_2 , mismo efecto que se puede apreciar en el gráfico de interacciones de la Fig. 50B.

Tabla 59. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de H₂O₂.

	Retención	Concentración	Tiempo
Retención		-0.3267	-0.4953
		(1440)	(1440)
		0.0000	0.0000
Concentración	-0.3267		0.0000
	(1440)		(1440)
	0.0000		1.0000
Tiempo	-0.4953	0.0000	
	(1440)	(1440)	
	0.0000	1.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 60 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de H₂O₂ en el día 7 (considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 47.67% para H₂O₂ 1 M y un valor máximo de 86.14% para H₂O₂ 0.01 M. estos valores son superiores a los reportados por (S. Liu *et al.*, 2023), donde encontraron retenciones del 25% a la concentración de 2 M para las melaninas de calamar.

Tabla 60. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas condiciones de oxidación.

H ₂ O ₂	%Retención en día 7
0.01 M	86.14 ^d
0.1 M	77.73 ^c
0.5 M	66.22 ^b
1 M	47.67 ^a
2 M	76.7 ^c

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del grafico de interacciones de la Fig. 50A se puede observar que los extractos del lugar Rancho Viejo presentan mayor retención a la vez que los extractos de pulpa-semilla también lo hacen.

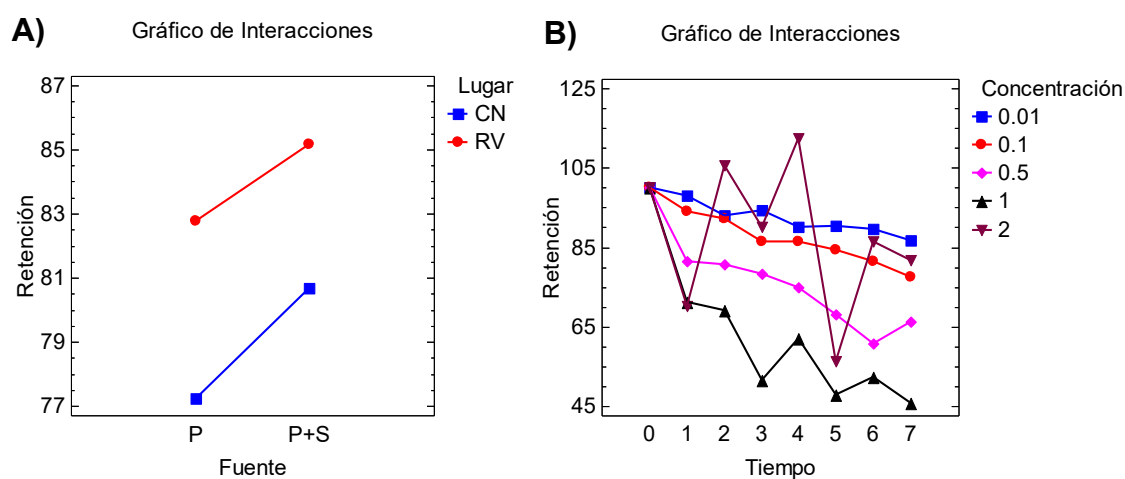


Fig. 50. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad ante oxidantes. A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las concentraciones y tiempos), y B) gráfico de interacción entre la concentración y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

A lo largo del experimento se encontraron variaciones visibles apreciables en el color de las soluciones, donde se observó que los extractos se van de colorando con mayor intensidad a medida que aumenta la concentración de H_2O_2 como se muestra en la Fig. 51. Estos resultados se corresponden con los reportado por (Montes-Avila *et al.*, 2018).



Fig. 51. Cambios visibles encontrados entre las distintas concentraciones de H_2O_2 .

En la Tabla 61 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de $NaHSO_3$ (considerando todos los tiempos). En el caso de $NaHSO_3$ 0.01 M se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 92.09% para RVPS y un valor máximo de 95.73% para RVP. En el caso de $NaHSO_3$ 0.1 M se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 75.88% para RVPS y un valor máximo de 93.73% para CNP, respectivamente. En el caso de $NaHSO_3$ 0.5 M se encontraron diferencias significativas en la retención con un valor mínimo de 75.86% para RVPS y un valor máximo de 142.73% para RVP. En el caso de $NaHSO_3$ 1 M se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 87.87% para CNPS y un valor máximo de 212.24% para RVP, mientras que en el caso de $NaHSO_3$ 1.5 M se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 52.02% para RVPS y un valor máximo de 152.05% para CNP.

Tabla 61. Medianas de la retención de los extractos bajo condiciones reductoras.

Extracto	Retención (%) frente a NaHSO ₃				
	0.01 M	0.1 M	0.5 M	1 M	1.5 M
CNP	94.46^b	93.73^b	131.12^b	128.09^b	152.05^c
CNPS	92.66^{a,b}	80.45^a	80.96^a	87.87^a	66.30^b
RVP	95.73^b	76.19^a	142.73^b	212.24^c	129.11^c
RVPS	92.09^a	75.88^a	75.86^a	89.17^a	52.02^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con el análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 62 se encontró que en general la retención de melaninas se ve más negativamente afectada por el tiempo de exposición que por el aumento de la concentración de NaHSO₃, incluso se encontró una paradójica correlación positiva con la concentración mismo efecto que se puede apreciar en el gráfico de interacciones de la Fig. 52B. Este aumento de retención en los extractos puede ser debido al incremento de la absorbancia producto de la reducción de los grupos quinona presentes en la estructura de las melaninas en difenoles, los cuales pueden llegar a exhibir mayor absorbancia a 292 nm.

Tabla 62. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de NaHSO₃.

	Retención	Concentración	Tiempo
Retención		0.0923	-0.1848
		(1440)	(1440)
		0.0005	0.0000
Concentración	0.0923		0.0000
	(1440)		(1440)
	0.0005		1.0000
Tiempo	-0.1848	0.0000	
	(1440)	(1440)	
	0.0000	1.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 63 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de NaHSO_3 en el día 7 (considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 72.32% para NaHSO_3 0.1 M y un valor máximo de 109.27% para NaHSO_3 0.5 M. Este comportamiento muestra que la formación de grupos difenol tiene su máxima expresión con NaHSO_3 0.5 M, posiblemente debido a la disminución de la abundancia de grupos quinona disponibles en las melaninas. Estos valores también son superiores a los reportados por (S. Liu *et al.*, 2023), quienes encontraron retenciones de 86% a la concentración de 1.5 M para las melaninas de calamar.

Tabla 63. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas condiciones reductoras.

NaHSO_3	%Retención en día 7
0.01 M	88.27^b
0.1 M	72.32^a
0.5 M	109.27^b
1 M	93.04^b
1.5 M	98.94^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del gráfico de interacciones de la Fig. 52A se puede observar que la fuente de los extractos afecta significativamente los resultados obtenidos.

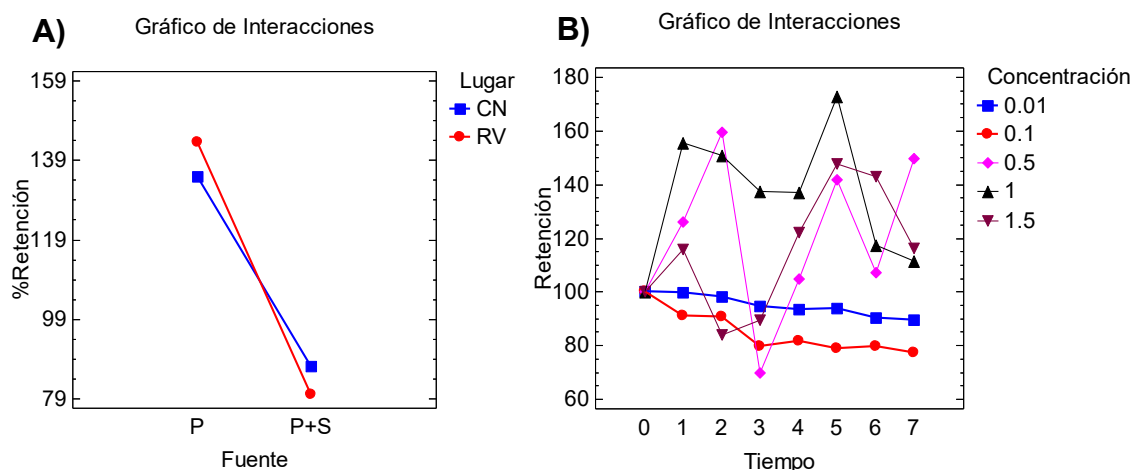


Fig. 52. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad ante reductores. A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las concentraciones y tiempos), y B) gráfico de interacción entre la concentración y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

Cabe señalar que no se encontraron variaciones en la coloración ni precipitaciones en las soluciones a lo largo del experimento. Estos datos corresponden con los reportados por S. Liu *et al.*, 2023 para las melaninas de calamar

7.5.5. Análisis de estabilidad Aditivos-Tiempo

En la Tabla 64 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de NaCl (considerando todos los tiempos). En el caso de NaCl 0.1 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 95.64% para CNP y un valor máximo de 106.84% para RVPS, en el caso de NaCl 1 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 102.91% para CNP y un valor máximo de 116.87% para RVPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento NaCl 3 mg/ml donde el valor mínimo fue de 104.24% para RNP y el valor máximo fue de 118.78% para RVPS, en el caso de NaCl 5 mg/ml también se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 102.62% para RVP y un valor máximo de 112.31% para RVPS, mientras que en el caso de NaCl 10 mg/ml se dieron diferencias

significativas con un valor mínimo de 100.98% para RNP y un valor máximo de 107.48% para RVP.

Tabla 64. Medianas de la retención de los extractos bajo en medio salino.

Extracto	%Retención frente a NaCl				
	0.1 mg/ml	1 mg/ml	3 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
CNP	95.64 ^a	102.91 ^a	105.22 ^a	104.87 ^b	101.76 ^a
CNPS	98.56 ^a	108.16 ^b	107.69 ^b	106.34 ^b	101.67 ^a
RVP	96.88 ^a	106.49 ^b	104.24 ^a	102.62 ^a	100.98 ^a
RVPS	106.84 ^b	116.87 ^c	118.78 ^c	112.31 ^c	107.48 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con en análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 65 se encontró que en general la retención de melaninas se ve más negativamente afectada por el tiempo de exposición que por el aumento de la concentración de NaCl, mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 53B. Este comportamiento evidencia un aumento de la absorbancia de las muestras a mayor concentración, posiblemente debido a la formación de complejos Melanina-Na con mayor fotoactividad y absorbancia a 292 nm.

Tabla 65. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de NaCl.

	Retención	Tiempo	Concentración
Retención		-0.1656	0.0626
		(1440)	(1440)
		0.0000	0.0176
Tiempo	-0.1656		0.0000
	(1440)		(1440)
	0.0000		1.0000
Concentración	0.0626	0.0000	
	(1440)	(1440)	
	0.0176	1.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 66 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de NaCl en el día 7 (considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 98.79% para NaCl 0.1 mg/ml y un valor máximo de 107.82% para NaCl 1 mg/ml. Este comportamiento muestra que la posible formación de complejos Melanina-Na tiene su máxima expresión con NaCl 1 mg/ml, posiblemente debido a la saturación de los sitios de unión disponibles en la estructura de las melaninas. Estos valores son superiores pero se encuentran cerca de los valores reportados por S. Liu *et al.*, 2023, quienes encontraron valores de 97-98.3% de retención para las melaninas de calamar.

Tabla 66. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de NaCl.

NaCl	%Retención en día 7
0.1 mg/ml	98.79 ^a
1 mg/ml	107.82 ^d
3 mg/ml	106.84 ^d
5 mg/ml	105.29 ^c
10 mg/ml	102.39 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del gráfico de interacciones de la Fig. 53A se puede observar que los extractos del lugar Rancho Viejo presentan mayor retención a la vez que los extractos de pulpa-semilla también lo hacen. En la Fig. 53B se puede apreciar que la posible formación de complejos Melanina-Na tiene su máxima expresión a los 2-4 días de exposición.

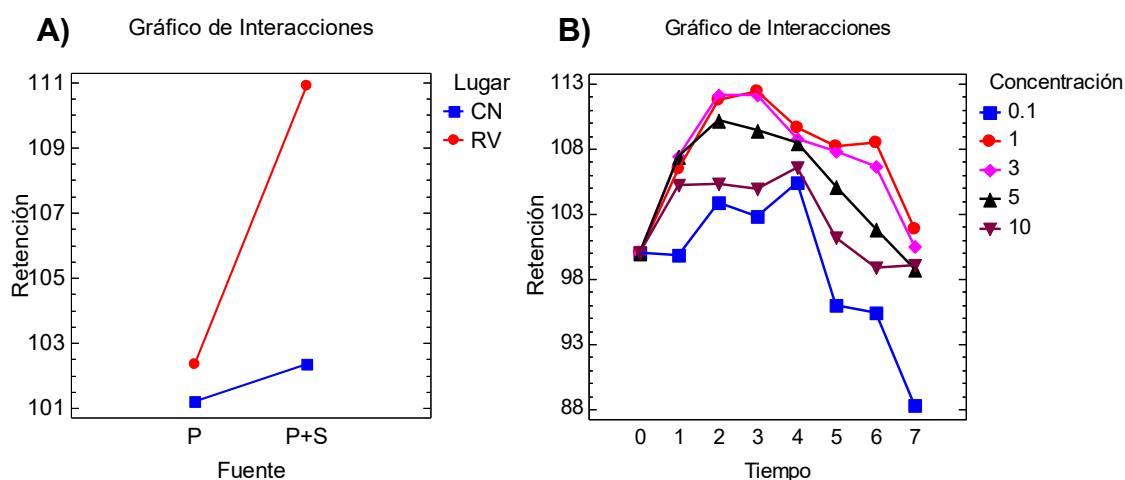


Fig. 53. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad en soluciones salinas.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las concentraciones y tiempos), B) Gráfico de interacción entre la concentración y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

Cabe señalar que no se encontraron variaciones en la coloración ni precipitaciones en las soluciones de NaCl a lo largo del experimento. Estos hallazgos se corresponden con los reportados por S. Liu *et al.*, 2023 para las melaninas de calamar

En la Tabla 67 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de sacarosa (considerando todos los tiempos). En el caso de sacarosa 0.01 g/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 96.42% para RVP y un valor máximo de 103.86% para RVPS, en el caso de sacarosa 0.05 g/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 97.89% para RVP y un valor máximo de 100.1% para CNPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento sacarosa 0.1 g/ml donde el valor mínimo fue de 98.11% para RVPS y el valor máximo fue de 99.13% para CNPS, en el caso de sacarosa 0.3 g/ml también se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 96.98% para CNPS y un valor máximo de 98.60% para RVPS, mientras que en el caso de sacarosa 0.6 g/ml se dieron diferencias significativas con un valor mínimo de 93.17% para CNPS y un valor máximo de 99.74% para RVPS.

Tabla 67. Medianas de la retención de los extractos bajo en medio salino.

Extracto	%Retención frente a sacarosa				
	0.01 g/ml	0.05 g/ml	0.1 g/ml	0.3 g/ml	0.6 g/ml
CNP	97.32^a	98.04^a	98.15^a	97.32^a	98.22^c
CNPS	101.42^b	100.01^b	99.13^b	96.98^a	93.17^a
RVP	96.42^a	97.89^a	98.34^a	97.71^{a,b}	95.90^b
RVPS	103.86^c	98.39^a	98.11^{a,b}	98.60^b	99.74^{b,c}

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con en análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 68 se encontró que en general la retención de melaninas se ve más negativamente afectada por el aumento de la concentración de sacarosa que por el tiempo de exposición, mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 54B.

Tabla 68. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de sacarosa.

	Concentración	Retención	Tiempo
Concentración		-0.2796	0.0000
		(1440)	(1440)
		0.0000	1.0000
Retención	-0.2796		-0.2394
	(1440)		(1440)
	0.0000		0.0000
Tiempo	0.0000	-0.2394	
	(1440)	(1440)	
	1.0000	0.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 69 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de sacarosa en el día 7 (considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 96.01% para sacarosa 0.6 g/ml y un valor máximo de 100.83% para sacarosa 0.01 g/ml. Estos datos corresponden a los reportados por S. Liu *et al.*, 2023, quienes encontraron valores de 97.3-98.6% de retención para las melaninas de calamar.

Tabla 69. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones sacarosa.

sacarosa	%Retención en día 7
0.01 g/ml	100.83 ^b
0.05 g/ml	99.00 ^{a,b}
0.1 g/ml	99.42 ^b
0.3 g/ml	97.06 ^a
0.6 g/ml	96.01 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del gráfico de interacciones de la Fig. 54A se puede observar que los extractos de pulpa-semilla del lugar Rancho Viejo presentan la mayor retención de melaninas. En la Fig. 54B se puede apreciar un comportamiento atípico con sacarosa 0.01 g/ml, posiblemente al mismo efecto encontrado en el análisis de termoestabilidad.

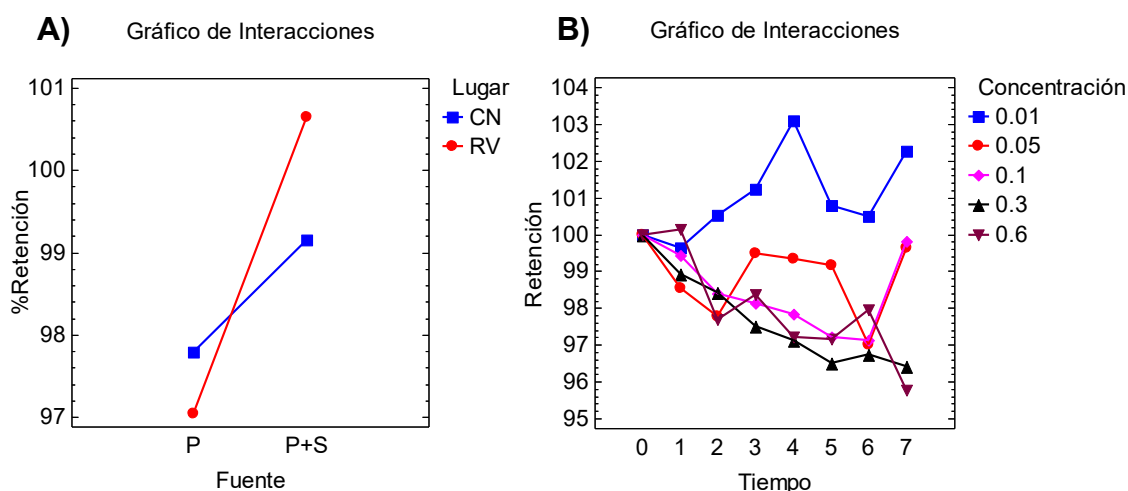


Fig. 54. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad en soluciones de sacarosa.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las concentraciones y tiempos), y B) Gráfico de interacción entre la concentración y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

Cabe señalar que no se encontraron variaciones en la coloración ni precipitaciones en las soluciones de sacarosa a lo largo del experimento. Estos hallazgos se corresponden con los reportados por S. Liu *et al.*, 2023 para las melaninas de calamar.

En la Tabla 70 se muestran los valores de las medianas de las retenciones obtenidas de los extractos bajo las distintas concentraciones de benzoato de sodio (considerando todos los tiempos). En el caso de benzoato 0.1 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 97.00% para RVP y un valor máximo de 106.99% para RVPS, en el caso de benzoato 0.5 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 101.28% para CNP y un valor máximo de 109.87% para RVPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento benzoato 1 mg/ml donde el valor mínimo fue de 95.67% para RVP y el valor máximo fue de 103.79% para RVPS, en el caso de benzoato 2 mg/ml también se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 103.31% para RVP y un valor máximo de 107.06% para RVPS, mientras que en el caso de benzoato 5 mg/ml se dieron diferencias significativas con un valor mínimo de 100.21% para RVP y un valor máximo de 105.24% para CNPS.

Tabla 70. Medianas de la retención de los extractos bajo en medio salino.

Extracto	%Retención frente a benzoato de sodio				
	0.1 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	5 mg/ml
CNP	97.54^a	101.69^a	95.67^a	104.12^a	102.18^b
CNPS	100.61^b	104.67^b	100.06^b	105.73^b	105.24^c
RVP	97.00^a	101.28^a	95.81^a	103.31^a	100.72^{a,b}
RVPS	106.99^c	109.87^c	103.79^c	107.06^b	100.21^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con en análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 71 se encontró que en general la retención de melaninas tiene correlación positiva con el aumento de la concentración de benzoato de sodio y el tiempo de exposición, mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 55B. Este comportamiento posiblemente también se deba a la formación de complejos Melanina-Na en sinergia del efecto conservante del benzoato de sodio.

Tabla 71. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de benzoato de sodio.

	Concentración	Retención	Tiempo
Concentración		0.1313	0.0000
		(1440)	(1440)
		0.0000	1.0000
Retención	0.1313		0.0766
	(1440)		(1440)
	0.0000		0.0037
Tiempo	0.0000	0.0766	
	(1440)	(1440)	
	1.0000	0.0037	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 72 se muestran los valores promedio de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de benzoato de sodio en el día 7 (considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 93.20% para benzoato 1 mg/ml y un valor máximo de 105.63% para benzoato 0.5 mg/ml. Estos valores no corresponden a los reportados por S. Liu *et al.*, 2023, quienes obtuvieron valores en torno a 90% para las melaninas de calamar.

Tabla 72. Promedios generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de benzoato de sodio.

Benzoato de sodio	%Retención en día 7
0.1 mg/ml	98.60 ± 6.37 ^b
0.5 mg/ml	105.63 ± 5.67 ^c
1 mg/ml	93.20 ± 5.99 ^a
2 mg/ml	104.80 ± 5.16 ^c
5 mg/ml	100.11 ± 4.27 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Del grafico de interacciones de la Fig. 55A se puede apreciar que los extractos de pulpa-semilla del lugar Rancho Viejo presentan mayores absorbancias. En la Fig. 55B se puede apreciar una tendencia al alza independiente de la concentración.

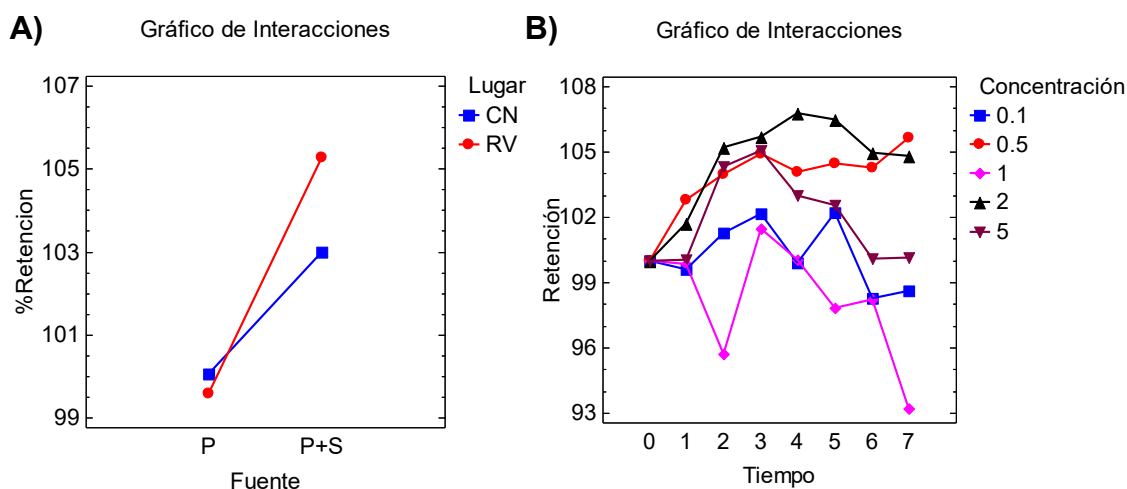


Fig. 55. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad con benzoato de sodio.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las concentraciones y tiempos), y B) gráfico de interacción entre la concentración y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

Cabe señalar que no se encontraron variaciones en la coloración ni precipitaciones en las soluciones de benzoato de sodio a lo largo del experimento. Estos hallazgos se corresponden con los reportados por S. Liu *et al.*, 2023 para las melaninas de calamar.

En la Tabla 73 se muestran los valores de las medianas de la retención obtenida de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de sorbato de potasio (considerando todos los tiempos). En el caso de sorbato 0.005 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 106.40% para CNPS y un valor máximo de 122.65% para RVPS. En el caso de sorbato 0.01 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 114.05% para CNP y un valor máximo de 141.73% para CNP, respectivamente. En el caso de sorbato 0.1 mg/ml se encontraron diferencias significativas en la retención con un valor mínimo de 171.02% para CNP y un valor máximo de 296.88% para RVPS. En el caso de sorbato 0.5 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 224.11% para CNP y un valor máximo de 426.71% para RVPS, mientras que en el caso de sorbato 0.5 mg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 276.19% para CNP y un valor máximo de 582.98% para RVPS.

Tabla 73. Medianas de la retención de los extractos bajo distintas concentraciones de sorbato de potasio.

Extracto	Retención (%) frente a sorbato de potasio				
	0.005 mg/ml	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
CNP	106.49^a	114.05^a	171.02^a	224.11^a	276.19^a
CNPS	106.40^a	120.26^b	278.76^c	348.49^c	408.19^b
RVP	107.83^a	126.65^c	205.50^b	294.14^b	296.98^a
RVPS	122.65^b	141.73^d	296.88^d	426.71^d	582.98^c

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con en análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 74 se encontró que en general la absorbancia presenta una paradójica correlación positiva tanto con el aumento de la concentración de sorbato como con el tiempo de exposición, mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 57B. Este exagerado incremento en la respuesta de los extractos puede ser debido a la posible formación de complejos Melanina-Sorbato cuyos enlaces dobles alternados pudieran interactuar entre si estabilizando la resonancia de electrones pi provocando una mayor absorción a 292 nm.

Tabla 74. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de sorbato de potasio.

	Concentración	Retención	Tiempo
Concentración		0.6692 (1440)	0.0000 (1440)
		0.0000	1.0000
Retención	0.6692 (1440)		0.3049 (1440)
	0.0000		0.0000
Tiempo	0.0000 (1440)	0.3049 (1440)	
	1.0000	0.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 75 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de sorbato de potasio en el día 7 (considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con

un valor mínimo de 112.97% para sorbato 0.005 mg/ml y un valor máximo de 303.75% para sorbato 1 mg/ml. Este comportamiento muestra que la posible formación de complejos Melanina-Sorbato es dependiente de la concentración de sorbato de potasio. Estos valores distan demasiado de los reportados por S. Liu *et al.*, 2023, quienes encontraron valores de 72-90% para las melaninas de calamar.

Tabla 75. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de sorbato de potasio.

Sorbato de potasio	%Retención en día 7
0.005 mg/ml	112.07 ^a
0.01 mg/ml	114.24 ^a
0.1 mg/ml	191.96 ^b
0.5 mg/ml	222.76 ^b
1 mg/ml	303.75 ^c

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Cabe destacar que las retenciones exageradamente altas encontradas con los tratamientos con alta concentración de sorbato de potasio se deben a que las absorbancias de las muestras aumentaron respecto al inicio del experimento, mientras que los blancos fueron perdiendo absorbancia con el tiempo como se muestra en la Fig. 56.

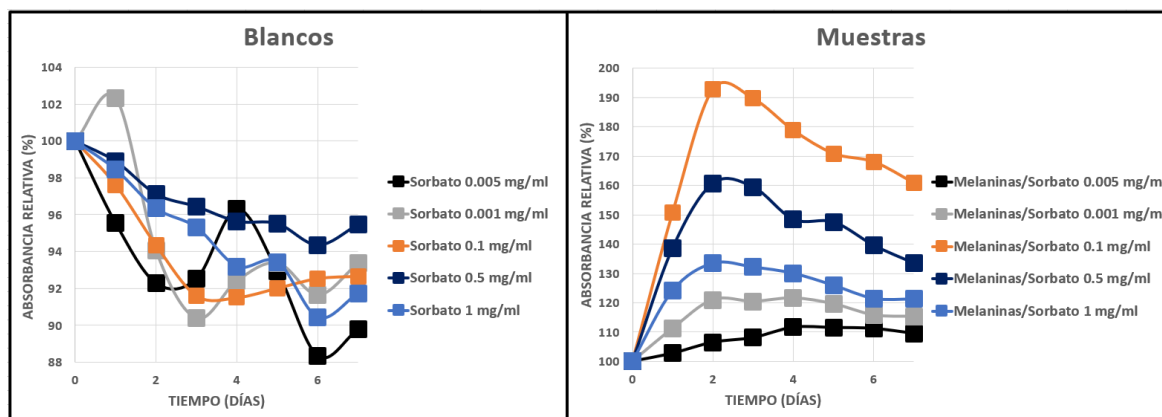


Fig. 56. Cambios en la absorbancia de las muestras y blancos en el análisis de estabilidad frente a sorbato de potasio.

Del gráfico de interacciones de la Fig. 57A se puede observar que los extractos de pulpa-semilla y el lugar Rancho Viejo muestran la mayor reactividad frente al sorbato de potasio.

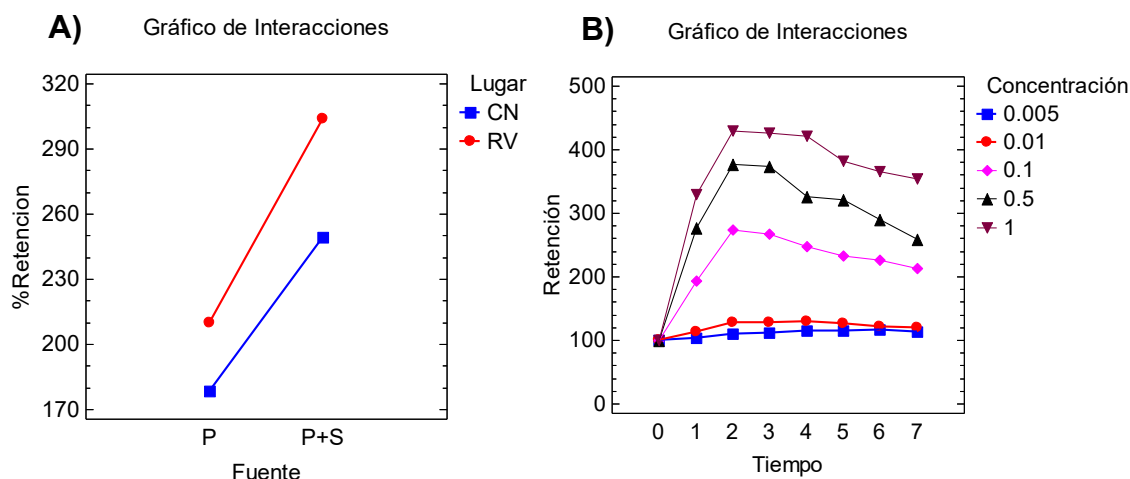


Fig. 57. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad con sorbato de potasio.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las concentraciones y tiempos), y B) gráfico de interacción entre la concentración y el tiempo de exposición (considerando todos los extractos).

Cabe señalar que no se encontraron variaciones en la coloración ni precipitaciones en las soluciones a lo largo del experimento. Estos resultados se corresponden con los reportado por (Montes-Avila *et al.*, 2018).

7.5.6. Análisis de la estabilidad Iones Metálicos-Tiempo

En la Tabla 76 se muestran los valores promedio y desviación estándar de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de cationes monovalentes de potasio. En el caso de K^+ 50 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 93.84% para RVP y un valor máximo de 102.37% para RVPS, en el caso de K^+ 100 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 87.76% para RVP y un valor máximo de 96.62% para CNPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento K^+ 200 $\mu\text{g/ml}$ donde el valor mínimo fue de 79.79% para RVP y el valor máximo fue de 95.26% para RVPS.

Tabla 76. Valores promedio de la retención de los extractos en presencia de iones K^+ .

Extracto	%Retención frente a K^+		
	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$
CNP	98.82 $\pm$ 2.58 ^b	90.89 $\pm$ 3.75 ^b	85.80 $\pm$ 1.83 ^b
CNPS	97.27 $\pm$ 2.82 ^b	87.78 $\pm$ 1.89 ^a	91.44 $\pm$ 3.08 ^c
RVP	93.84 $\pm$ 2.29 ^a	87.76 $\pm$ 4.21 ^a	79.79 $\pm$ 2.35 ^a
RVPS	102.37 $\pm$ 2.74 ^c	96.62 $\pm$ 2.34 ^c	95.26 $\pm$ 2.82 ^d

Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas (Fisher LSD, $\alpha=0.05$).

Con el análisis de correlación múltiple de Pearson mostrado en la Tabla 77 se encontró que en general la retención de melaninas se ve más negativamente afectada por el tiempo de exposición que por el aumento de la concentración de iones monovalentes K^+ , mismo efecto que se puede apreciar en el gráfico de interacciones de la Fig. 58B.

Tabla 77. Correlación de Pearson entre las variables Retención, Tiempo y concentración de K⁺.

	Concentración	Retención	Tiempo
Concentración		-0.3140	0.0000
		(216)	(216)
		0.0000	1.0000
Retención	-0.3140		-0.6356
	(216)		(216)
	0.0000		0.0000
Tiempo	0.0000	-0.6356	
	(216)	(216)	
	1.0000	0.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 78 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de K⁺(considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 84.28% para K⁺ 200 µg/ml y un valor máximo de 97.97% para K⁺ 50 µg/ml. Este comportamiento muestra una mayor pérdida de absorbancia a medida que aumenta la concentración de K⁺.

Tabla 78. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de K⁺.

K ⁺	%Retención general
50 µg/ml	97.97 ^b
100 µg/ml	87.96 ^a
200 µg/ml	84.28 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del grafico de interacciones de la Fig. 58A se puede observar que los extractos del lugar Rancho Viejo tienen una fuerte interacción con la fuente de extracción, evidenciado por su marcada pendiente. En la Fig. 58B se puede apreciar una tendencia opuesta en la retención de los extractos pulpa y pulpa-semilla a partir de los 100 µg/ml. Esto posiblemente debido a la formación de complejos con los iones K⁺ por parte de moléculas no melánicas en los extractos pulpa-semilla.

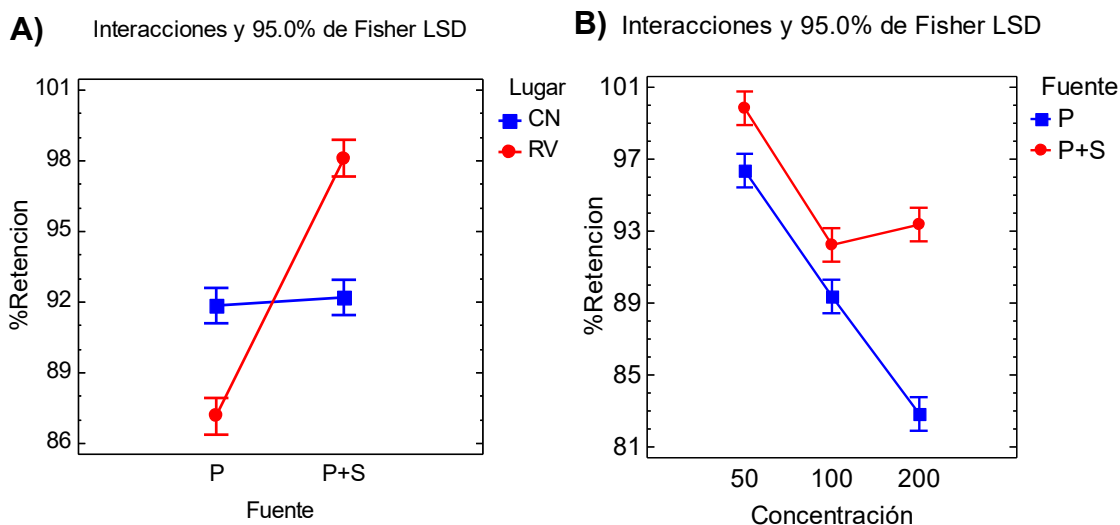


Fig. 58. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad frente a iones monovalentes.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todas las concentraciones), y B) gráfico de interacción entre la concentración y la fuente de extracción (considerando ambos lugares).

En la Tabla 79 se muestran las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de cationes metálicos divalentes. En el caso de Ca^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 99.38% para RVP y un valor máximo de 110.40% para RVPS, con Ca^{2+} 100 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 103.20% para RVP y un valor máximo de 109.58% para RVPS. En el caso de Mg^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 97.56% para RVP y un valor máximo de 107.87% para RVPS, con Mg^{2+} 100 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 90.92% para RVP y un valor máximo de 99.54% para CNPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento Mg^{2+} 200 $\mu\text{g/ml}$ donde el valor mínimo fue de 85.86% para RVP y el valor máximo fue de 100.36% para RVPS. En el caso de Cu^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 100.21% para RVP y un valor máximo de 105.37% para CNP, con Cu^{2+} 100 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 102.57% para RVP y un valor máximo de 106.08% para CNPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento Cu^{2+} 200 $\mu\text{g/ml}$ donde el valor

mínimo fue de 99.31% para CVP y el valor máximo fue de 108.32% para RVPS. En el caso de Fe^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 101.82% para RVPS y un valor máximo de 115.11% para CNPS, con Fe^{2+} 100 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 97.9% para CNPS y un valor máximo de 105.1% para RVP, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento Fe^{2+} 200 $\mu\text{g/ml}$ donde el valor mínimo fue de 83.83% para CNP y el valor máximo fue de 101.39% para CNPS. En el caso de Zn^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 96.78% para RVP y un valor máximo de 102.73% para RVPS, con Zn^{2+} 100 $\mu\text{g/ml}$ se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 99.02% para RVP y un valor máximo de 105.55% para CNPS, también se encontraron diferencias significativas con el tratamiento Zn^{2+} 200 $\mu\text{g/ml}$ donde el valor mínimo fue de 98.45% para RVPS y el valor máximo fue de 101.33% para RVP.

Tabla 79. Medianas de la retención de los extractos en presencia de iones metálicos divalentes.

Catión		%Retención de los extractos			
		CNP	CNPS	RVP	RVPS
Ca^{2+}	50 $\mu\text{g/ml}$	102.49 ^a	102.76 ^a	99.38 ^a	110.40 ^b
	100 $\mu\text{g/ml}$	104.59 ^{a,b}	105.22 ^b	103.20 ^a	109.58 ^c
	200 $\mu\text{g/ml}$	104.05 ^a	103.32 ^a	103.38 ^a	106.65 ^a
Mg^{2+}	50 $\mu\text{g/ml}$	98.93 ^a	105.56 ^b	97.56 ^a	107.87 ^b
	100 $\mu\text{g/ml}$	97.37 ^b	99.54 ^b	90.92 ^a	98.81 ^b
	200 $\mu\text{g/ml}$	92.43 ^b	91.65 ^{a,b}	85.86 ^a	100.36 ^c
Cu^{2+}	50 $\mu\text{g/ml}$	105.37 ^b	100.30 ^a	100.21 ^a	104.88 ^b
	100 $\mu\text{g/ml}$	104.60 ^b	106.08 ^c	102.57 ^a	106.05 ^c
	200 $\mu\text{g/ml}$	99.31 ^a	107.61 ^b	107.02 ^b	108.32 ^b
Fe^{2+}	50 $\mu\text{g/ml}$	108.98 ^a	115.11 ^b	112.30 ^b	101.82 ^a
	100 $\mu\text{g/ml}$	101.70 ^{a,b}	97.90 ^a	105.10 ^{a,b}	102.86 ^b
	200 $\mu\text{g/ml}$	83.83 ^a	101.39 ^a	94.53 ^a	87.38 ^a
Zn^{2+}	50 $\mu\text{g/ml}$	99.20 ^b	98.14 ^b	96.78 ^a	102.73 ^c
	100 $\mu\text{g/ml}$	101.43 ^b	105.55 ^c	99.02 ^a	105.03 ^c
	200 $\mu\text{g/ml}$	100.96 ^b	100.99 ^b	101.33 ^b	98.45 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Con en análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 80 se encontró un extraño comportamiento donde en general la retención de melaninas se ve ligera y negativamente afectada por el aumento de la concentración de iones divalentes mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 59B, mientras que el tiempo de exposición muestra una correlación positiva con la retención observada.

Tabla 80. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de cationes divalentes.

	%Retención	Concentración	Tiempo
%Retención		-0.0785	0.2796
		(1080)	(1080)
		0.0099	0.0000
Concentración	-0.0785		0.0000
	(1080)		(1080)
	0.0099		1.0000
Tiempo	0.2796	0.0000	
	(1080)	(1080)	
	0.0000	1.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 81 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de iones metálicos divalentes (considerando todos los extractos). En el caso del ion calcio se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 102.92% para Ca^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ y un valor máximo de 105% para Ca^{2+} 100 $\mu\text{g/ml}$. En el caso del ion magnesio se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 92.19% para Mg^{2+} 200 $\mu\text{g/ml}$ y un valor máximo de 103.69% para Mg^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. En el caso del ion cúprico se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 102.19% para Cu^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ y un valor máximo de 107.02% para Cu^{2+} 200 $\mu\text{g/ml}$. En el caso del ion ferroso se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 91.35% para Fe^{2+} 200 $\mu\text{g/ml}$ y un valor máximo de 111.69% para Fe^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. También se encontraron diferencias significativas en el caso del ion zinc con un valor mínimo de 99.04% para Zn^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ y un valor máximo de 101.84% para Zn^{2+} 100 $\mu\text{g/ml}$. Este comportamiento muestra tendencias

opuestas con algunos iones divalentes. Los comportamientos identificados en Fe^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} concuerdan con los reportados por (Montes-Avila *et al.*, 2018)

Tabla 81. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de cationes divalentes.

Cación	%Retención general		
	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Ca^{2+}	102.92 ^a	105.00 ^a	104.90 ^a
Mg^{2+}	103.69 ^a	98.10 ^a	92.19 ^a
Cu^{2+}	102.19 ^a	105.49 ^b	107.02 ^b
Fe^{2+}	111.69 ^c	101.72 ^b	91.35 ^a
Zn^{2+}	99.04 ^a	101.84 ^b	100.89 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

En la Tabla 82 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas frente a los distintos iones divalentes (considerando todas las concentraciones y extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 97.5% para Mg^{2+} y un valor máximo de 105.09% para Cu^{2+} . Este comportamiento muestra una mayor capacidad del ion cúprico a la posible formación de complejos coordinados con mayor fotoactividad, esta capacidad de formar complejos fotoactivos parece no estar relacionada con el radio iónico del metal debido a que el ion cúprico tiene uno de los radios más grandes, mientras que el ion magnesio es el que posee menor radio.

Tabla 82. Medianas generales de la retención de melaninas frente a distintos cationes divalentes.

Cación	%Retención general
Ca^{2+}	104.49 ^c
Mg^{2+}	97.50 ^a
Cu^{2+}	105.09 ^c
Fe^{2+}	103.17 ^c
Zn^{2+}	100.5 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del gráfico de interacciones de la Fig. 59A se puede observar que los extractos de pulpa-semilla de Rancho Viejo presentan la mayor absorbancia. En la Fig. 59B se puede apreciar una tendencia opuesta en la respuesta por parte de los iones magnesio y ferroso, los cuales podrían generar complejos fotoactivos inestables ante mayores concentraciones de aniones provenientes de las sales empleadas en la preparación de las soluciones de iones metálicos.

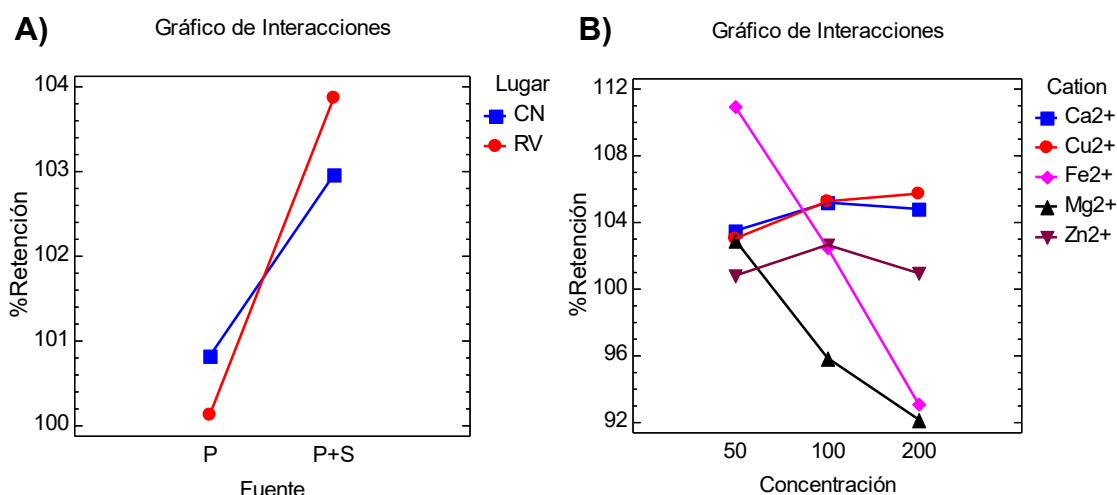


Fig. 59. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad frente a iones divalentes.

A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todos los cationes y concentraciones), y B) gráfico de interacción entre la concentración y los cationes (considerando todos los extractos).

En la Tabla 83 se muestran las medianas de las retenciones obtenidas de los distintos extractos bajo las distintas concentraciones de cationes metálicos trivalentes. En el caso de Al³⁺ 50 µg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 93.41% para CNPS y un valor máximo de 101.81% para RVPS, con Al³⁺ 100 µg/ml se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 83.41% para CVP y un valor máximo de 88.32% para RVPS, también se encontraron diferencias significativas en el caso de Al³⁺ 200 µg/ml con un valor mínimo de 13.46% para RVP y un valor máximo de 34.23% para RVPS. No se encontraron valores reales para comparar por parte de los tratamientos con el ion férrico.

Tabla 83. Medianas de la retención de los extractos en presencia de iones metálicos trivalentes.

Cación		%Retención de los extractos			
		CNP	CNPS	RVP	RVPS
Al^{3+}	50 $\mu\text{g/ml}$	95.87 ^a	93.41 ^a	101.81 ^b	93.89 ^a
	100 $\mu\text{g/ml}$	83.41 ^a	87.31 ^b	85.11 ^a	88.32 ^{a,b}
	200 $\mu\text{g/ml}$	32.2 ^b	29.38 ^b	13.46 ^a	34.23 ^b
Fe^{3+}	50 $\mu\text{g/ml}$	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	100 $\mu\text{g/ml}$	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	200 $\mu\text{g/ml}$	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Cabe destacar que las lecturas de absorbancia tomadas de los tratamientos con ion férrico se encontraban muy por debajo de sus respectivos blancos como se muestra en la Fig. 60, dando resultados negativos, por ello se dejaron con valor 0 en la Tabla 83.

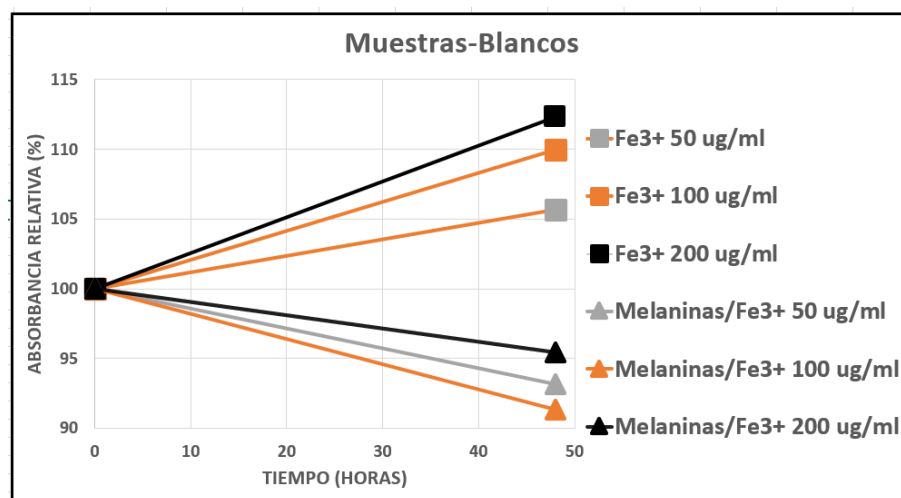


Fig. 60. Cambios en la absorbancia de las muestras y blancos en el análisis de estabilidad frente a Fe^{3+} .

Con en análisis de correlación múltiple de Spearman mostrado en la Tabla 84 se encontró un comportamiento donde en general la retención de melaninas se ve negativamente afectada por el aumento de la concentración de iones trivalentes mismo efecto que se puede apreciar en el grafico de interacciones de la Fig. 61B.

Tabla 84. Correlación de Spearman entre las variables Retención, Tiempo y concentración de cationes trivalentes.

	%Retención	Concentración	Tiempo
%Retención		-0.2406	0.0000
		(432)	(432)
		0.0000	1.0000
Concentración	-0.2406		0.0000
	(432)		(432)
	0.0000		1.0000
Tiempo	0.0000	0.0000	
	(432)	(432)	
	1.0000	1.0000	

Fila 1= Correlación, fila 2= (Tamaño de muestra), fila 3= Valor-P

En la Tabla 85 se muestran los valores de las medianas generales de las retenciones obtenidas bajo las distintas concentraciones de Al^{3+} (considerando todos los extractos), donde se encontraron diferencias significativas con un valor mínimo de 24.79% para Al^{3+} 200 $\mu\text{g/ml}$ y un valor máximo de 93.4% para Al^{3+} 50 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 85. Medianas generales de la retención de melaninas bajo las distintas concentraciones de Al^{3+} .

Al^{3+}	%Retención general
50 $\mu\text{g/ml}$	93.40 ^c
100 $\mu\text{g/ml}$	83.74 ^b
200 $\mu\text{g/ml}$	24.79 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Del grafico de interacciones de la Fig. 61A se puede observar que el lugar Rancho Viejo tiene una fuerte interacción con la fuente de extracción evidenciado por su contrastada pendiente. En la Fig. 61B se puede apreciar la correlación negativa entre la concentración del ion Al^{3+} y la retención de melaninas, cabe destacar que los tratamientos con iones Fe^{3+} carecen de retención.

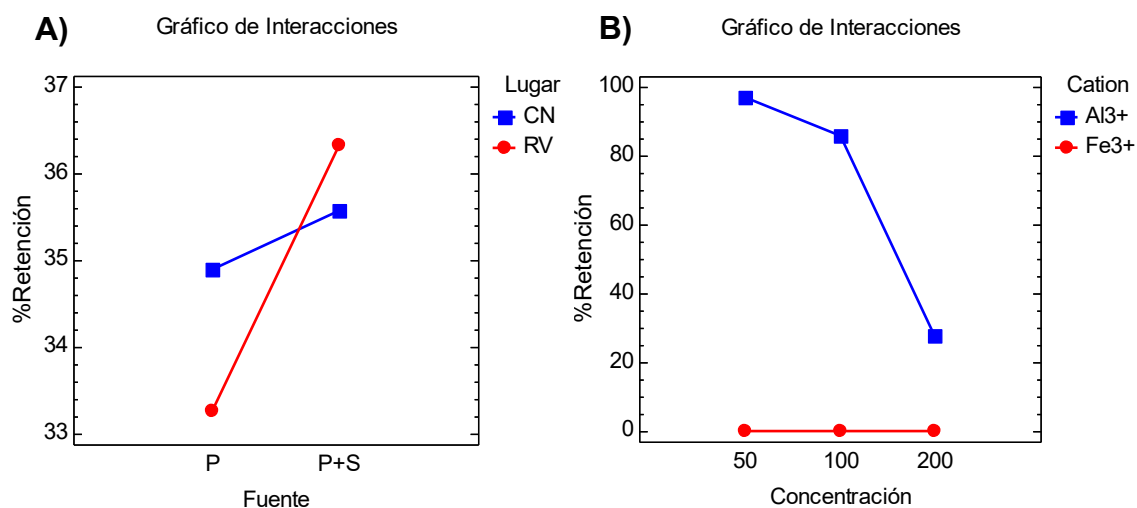


Fig. 61. Gráficos de interacción en la prueba de estabilidad frente a iones trivalentes. A) Gráfico de interacción entre el lugar de origen y la fuente del extracto (considerando todos los cationes y concentraciones), y B) gráfico de interacción entre la concentración y los cationes (considerando todos los extractos).

Cabe señalar que no se encontraron variaciones en la coloración, pero si se detectaron precipitaciones en las soluciones de iones metálicos Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} al final del experimento. En la Fig. 62 se muestran las precipitaciones exhibidas por los extractos en presencia de iones metálicos trivalentes, donde se encontraron ligeras precipitaciones en presencia de Al^{3+} mientras que en presencia de Fe^{3+} (FeCl_3) se encontró una precipitación semicompleta a 50 $\mu\text{g/ml}$ que tendió a disminuir al aumentar la concentración, este comportamiento frente a FeCl_3 evidencia la naturaleza fenólica de los extractos. En la Fig. 63 se muestran las precipitaciones exhibidas por los extractos en presencia de iones metálicos de transición divalentes, donde se encontró un mayor grado de precipitación en presencia de Fe^{2+} . En la Fig. 64 se muestran las precipitaciones exhibidas por los extractos en presencia de iones metálicos alcalinotérreos, donde se encontró un ligero mayor grado de precipitación en presencia de Mg^{2+} . Estos hallazgos se corresponden parcialmente con los reportados por S. Liu *et al.*, 2023 para las melaninas de calamar.

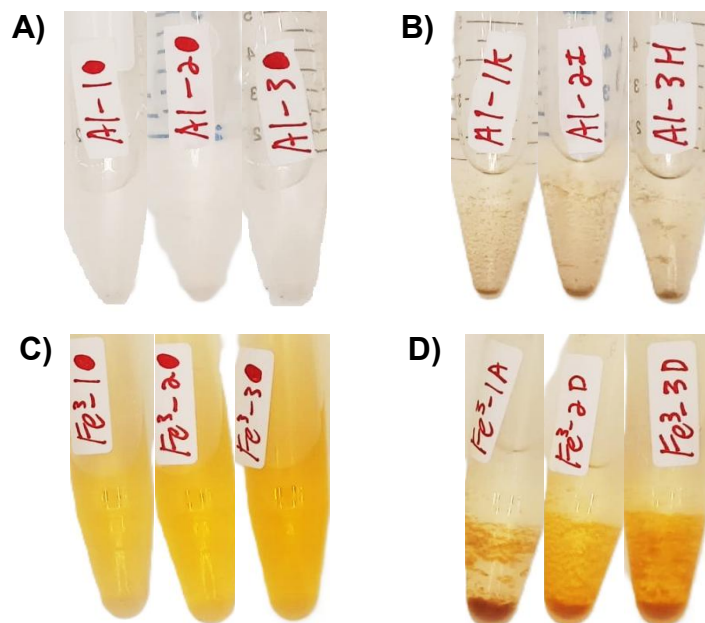


Fig. 62. Precipitaciones observadas en las soluciones con iones trivalentes.
 A) Soluciones blanco de Al^{3+} , B) muestras en soluciones de Al^{3+} , C) Soluciones blanco de Fe^{3+} , y D) muestras en soluciones de Fe^{3+} .

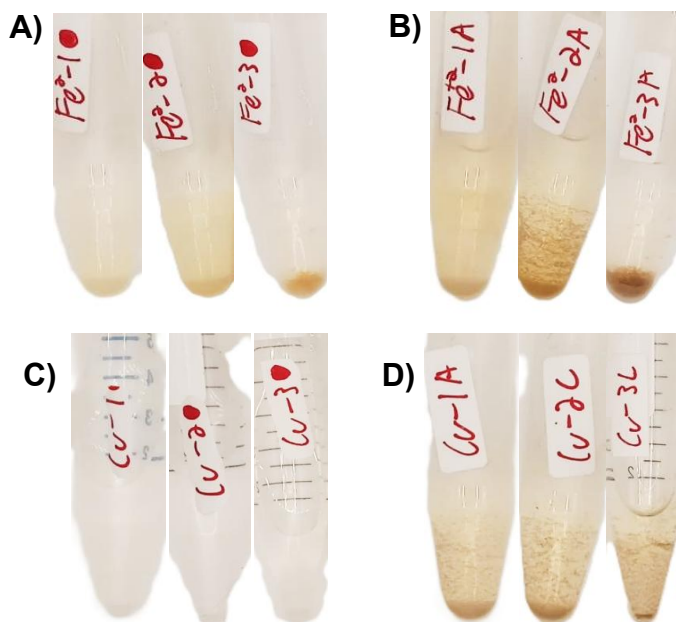


Fig. 63. Precipitaciones observadas en las soluciones con iones de transición divalentes.
 A) Soluciones blanco de Fe^{2+} , B) muestras en soluciones de Fe^{2+} , C) Soluciones blanco de Cu^{2+} , y D) muestras en soluciones de Cu^{2+} .

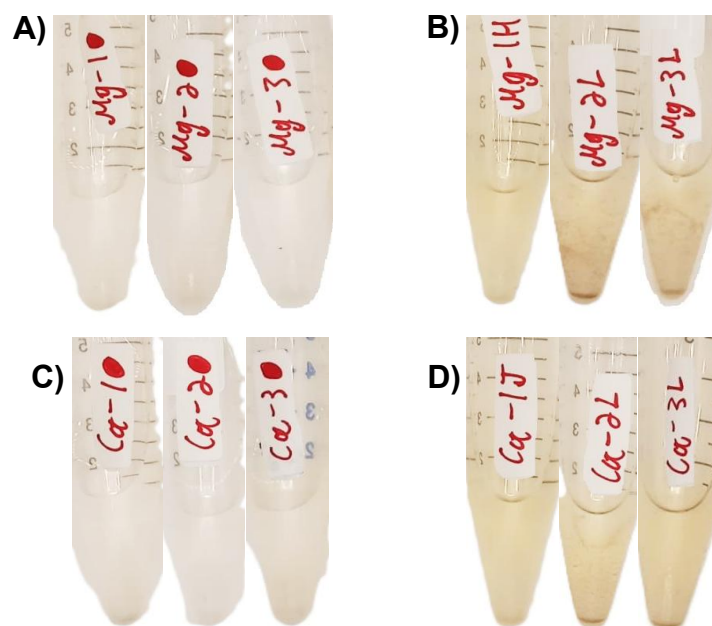


Fig. 64. *Precipitaciones observadas en las soluciones con iones alcalinotérreos.*
 A) Soluciones blanco de Mg^{2+} , B) muestras en soluciones de Mg^{2+} , C) Soluciones blanco de Ca^{2+} , y D) muestras en soluciones de Ca^{2+} .

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

A partir de la discusión de los resultados obtenidos y comparándolos con los reportados por otros autores se sintetizaron las siguientes conclusiones.

8.1.1. Análisis fisicoquímicos de la pulpa

De acuerdo con los valores mostrados en tablas de los parámetros analizados, se llegó a la conclusión de que los frutos de las regiones de Cahuinahuaro, Mocorito y Rancho Viejo, Badiraguato no son diferentes entre sí a excepción de su pH y acidez, donde se encontró que los frutos de Rancho Viejo presentan un pH menor y mayor concentración de ácidos orgánicos, esta variación puede deberse tanto a las condiciones climáticas de las regiones como a la disponibilidad de nutrientes en sus respectivos suelos.

8.1.1.1. Determinación del índice de madurez de los frutos

De acuerdo con los índices de madurez (IM) calculados para las pulpas de los frutos se llegó a la conclusión de que los frutos provenientes de Cahuinahuaro presentaban mayor grado de madurez que los de Rancho Viejo al momento de ser recolectados.

8.1.2. Extracción de melaninas solubles

Analizando el comportamiento gráfico de los rendimientos de extracción entre las regiones de Cahuinahuaro y Rancho Viejo con las fuentes de extracción pulpa y pulpa-semilla, se determinó que los menores rendimientos en las extracciones pulpa-semilla se deben principalmente al peso y gran número de semillas presentes en el fruto, y la variabilidad en los rendimientos de esta fuente se pueden deber a un número diferencial de semillas en los frutos de las distintas regiones.

8.1.3. Caracterización de los extractos

8.1.3.1. Caracterización espectroscópica UV-vis

De acuerdo con el patrón de los espectros de absorción de los extractos se concluyó que efectivamente todos los extractos son de naturaleza melánica y poseen mayor absorción de radiación UV en matrices acuosas.

8.1.3.1.1. Determinación del factor de protección solar

De acuerdo con los comportamientos observados en las gráficas de interacción se llegó a la conclusión de que los extractos de pulpa-semilla tienen mayor FPS que los de sólo pulpa debido a una mayor abundancia de moléculas no melánicas fotoactivas en UV, a la vez que los extractos de Cahuinahuaro poseen mayor FPS que los de Rancho Viejo debido a su mayor grado de maduración. Específicamente el FPS de los extractos fue de 2-3.

8.1.3.2. Caracterización espectroscópica FT-IR

Los espectros FT-IR de los distintos extractos presentan una similitud extremadamente alta tanto en su forma como en la posición de las bandas principales. Las correlaciones superiores a 0.98 y los valores RMSD muy bajos confirman que todas las muestras corresponden a la misma matriz química general. Las diferencias observadas se explican únicamente por variaciones en la intensidad y pueden atribuirse a cambios en la concentración o espesor de muestra, sin indicar diferencias cualitativas en la composición química.

De acuerdo con el patrón de bandas de los espectros FT-IR de los extractos se concluyó que efectivamente todos los extractos contienen melaninas, pero además cuentan con abundantes cantidades de otras biomoléculas.

8.1.3.3. Cuantificación de melaninas

De acuerdo con el comportamiento observado en la gráfica de interacción se llegó a la conclusión de que los extractos acuosos contienen cantidades muy pequeñas de melaninas en relación a la masa total, específicamente se encontró que los extractos tienen un contenido equivalente a melanina de 2-4 mg ME/g extracto seco. Además,

se encontró que las melaninas sintetizadas por el fruto de papache se acumulan principalmente en la pulpa, a la vez que los frutos de Cahuinahuaro también contenían más melaninas que los de Rancho Viejo debido a su mayor grado de maduración.

8.1.3.4. Determinación de azúcares reductores

De acuerdo con el comportamiento observado en la gráfica de interacción se llegó a la conclusión de que los extractos se componen principalmente de azúcares reductores como la glucosa o fructosa, específicamente se encontró que los extractos poseen un contenido de azúcares equivalente a glucosa de 58-63%. Además, se encontró que los frutos de Cahuinahuaro contenían mayor cantidad de azúcares, lo que concuerda con su mayor grado de madurez. También se descubrió que usar distintas placas de 96 pocillos introducen demasiado ruido en las respuestas, posiblemente se halla usado una placa UV por equivocación.

8.1.4. Evaluación del potencial nutraceutico

Con el análisis de los distintos experimentos se encontró que los extractos provenientes de pulpa-semilla poseen el mayor potencial nutraceutico medido en capacidad antioxidante e inhibición de la enzima digestiva α -amilasa, además se concluyó que la mayor parte del potencial antioxidante se relaciona con el grado de madurez y no se debe a las melaninas contenidas en los extractos. También se concluyó que los extractos tienen mayor actividad antirradical frente a ABTS^{•+} comparado con DPPH[•].

8.1.4.1. Método ORAC-FL

Enfocándonos en la capacidad antioxidante de los extractos determinada por ORAC-FL se encontró que los extractos de pulpa-semilla presentan mayor capacidad antioxidante que los de sólo pulpa. Específicamente se llegó a la conclusión de que los extractos poseen una capacidad antioxidante equivalente a Trolox de 73-115 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco.

8.1.4.2. Método DPPH

Enfocándonos en la capacidad antioxidante determinada por DPPH se concluyó que los frutos de Rancho Viejo poseen mayor capacidad antioxidante que los de Cahuinahuaro. Específicamente se llegó a la conclusión de que los extractos poseen una capacidad antioxidante equivalente a Trolox de 31-35 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco.

8.1.4.3. Método ABTS

Enfocándonos en la capacidad antioxidante determinada por ABTS se concluyó que los frutos de Cahuinahuaro poseen mayor capacidad antioxidante que los de Rancho Viejo y que los extractos de pulpa-semilla también presentan mayor capacidad antioxidante. Específicamente se llegó a la conclusión de que los extractos poseen una capacidad antioxidante equivalente a Trolox de 35-43 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto seco.

8.1.4.4. Determinación de capacidad antidiabética

Enfocándonos en la capacidad antidiabética determinada por medio de inhibición de la α -amilasa se concluyó que los frutos de Cahuinahuaro poseen mayor capacidad inhibitoria que los de Rancho Viejo y que los extractos de pulpa-semilla también presentan mayor capacidad inhibitoria. Específicamente se llegó a la conclusión de que los extractos poseen una capacidad inhibitoria equivalente a acarbosa de 5-11 $\mu\text{mol AE/g}$ extracto seco. De igual manera se encontró que usar distintas placas de 96 pocillos introduce demasiado ruido a la respuesta del análisis.

8.1.5. Análisis de estabilidad de los extractos

8.1.5.1. Análisis de estabilidad pH-Tiempo

De acuerdo con los valores mostrados en tablas y el comportamiento gráfico de los parámetros analizados, se llegó a la conclusión de que la estabilidad de las melaninas solubles de papache se ve fuertemente afectada por el pH de las soluciones donde se encuentra dispersa, las melaninas se mantuvieron relativamente estables en soluciones ácidas con valores de $\text{pH} \leq 5$ mientras que exhiben mayor inestabilidad en soluciones alcalinas con $\text{pH} \geq 7$, siendo más inestables a un pH más básico. A partir del comportamiento visible se puede concluir que, a pesar de ser más estables en pH

ácido, las melaninas tienden a precipitarse a medida que disminuye el pH y esto implica problemas prácticos al momento de realizar formulaciones alimentarias, por ello se recomienda incluir las melaninas en matrices ligeramente ácidas. Además, se pudo determinar que la combinación del lugar Rancho Viejo con la fuente pulpa-semilla y el pH 5 mostró el comportamiento más estable de todos los tratamientos, esto puede deberse a la presencia de otros compuestos bioactivos presentes en las semillas y ausentes en la pulpa, ya que muchos metabolitos secundarios pueden actuar sinérgicamente protegiendo las melaninas como pueden ser sistemas amortiguadores de pH u otros tipos de antioxidantes.

8.1.5.2. Análisis de estabilidad Temperatura-Tiempo

De acuerdo con los valores mostrados en tablas y el comportamiento grafico de los parámetros analizados, se llegó a la conclusión de que la estabilidad de las melaninas solubles de papache se ve fuertemente afectada por la temperatura de exposición, las melaninas permanecieron relativamente estables a las temperaturas de 4 y 25 °C mientras que a temperaturas mayores de 40 °C se ve afectada la estabilidad de las melaninas sin mucha diferencia entre los 40 y 80 °C. Además, se pudo determinar que la combinación del lugar Cahuinahuaro con la fuente pulpa-semilla y la temperatura de 25 °C mostró el comportamiento más estable de todos los tratamientos, esto también puede deberse a la presencia de otros compuestos bioactivos presentes en las semillas y ausentes en la pulpa, estos compuestos bioactivos pueden estar protegiendo las melaninas por distintos mecanismos como puede ser una mayor susceptibilidad a la degradación térmica, absorbiendo la energía libre y degradándose antes que las melaninas.

8.1.5.3. Análisis de estabilidad Luz-Tiempo

De acuerdo con los valores mostrados en tablas y el comportamiento grafico de los parámetros analizados, se llegó a la conclusión de que la estabilidad de las melaninas solubles de papache se ve fuertemente afectada con la exposición a la luz, las melaninas protegidas de la luz y la expuestas a luz artificial mostraron comportamientos relativamente estables mientras que las melaninas expuestas a la

luz solar directa sufrieron una drástica degradación, estos efectos pueden deberse a la gran cantidad de radiación UV proveniente del sol y a la prácticamente insignificante radiación UV proveniente de la luz artificial. A partir del comportamiento visible se puede concluir que a pesar de mantenerse relativamente estables expuestas a la luz artificial, las melaninas tienden a decolorarse con el paso del tiempo, y las muestras expuestas a la luz solar directa son las que presentan mayor decoloración. De esta manera, se pudo determinar que la combinación del lugar Rancho Viejo con la fuente pulpa-semilla y protección ante la luz (oscuridad) exhibió el comportamiento más estable de todos los tratamientos, este efecto a su vez también puede explicarse por la presencia otros compuestos provenientes de las semillas que pudieran estarle confiriendo un factor de protección solar a las melaninas. Se sabe que los taninos presentes en muchas semillas de distintas especies vegetales poseen propiedades similares a las melaninas y pueden ser estos metabolitos los que le confieren mayor fotoestabilidad a las soluciones de melaninas.

8.1.5.4. Análisis de estabilidad Redox-Tiempo

De acuerdo con los valores mostrados en tablas y el comportamiento gráfico de los parámetros analizados, se encontró que la estabilidad de las melaninas solubles de papache se ve fuertemente afectada por entornos redox, las melaninas sufrieron una fuerte degradación frente a H_2O_2 mientras que en presencia de NaHSO_3 se potenció su absorbancia, con este comportamiento se concluyó que los extractos son susceptibles tanto a la oxidación como la reducción. A partir del comportamiento visual se llegó a la conclusión de que la oxidación de las melaninas con H_2O_2 fue casi completa debido a la pérdida de color presentada. Además, se concluyó que los frutos de Rancho Viejo son más resistentes a la oxidación que los de Cahuinahuaró debido a la menor cantidad de antioxidantes a la vez que se concluyó que los extractos de sólo pulpa son más susceptibles a la reducción, esto posiblemente se deba al mayor contenido de melaninas en la pulpa, las cuales se pudieron haber oxidado parcialmente durante el procesamiento y almacenamiento de los extractos.

8.1.5.5. Análisis de estabilidad Aditivos-Tiempo

De acuerdo con los valores mostrados en tablas y el comportamiento gráfico de los parámetros analizados, se encontró que la estabilidad de las melaninas solubles de papache se ve fuertemente afectada por la presencia de aditivos alimentarios, las melaninas sufrieron degradación en presencia de sacarosa y cloruro de sodio mientras que los conservadores benzoato de sodio y sorbato de potasio tienen a potenciar la señal exhibida por las melaninas mediante la posible formación de complejos coordinados fotoactivos. Además, se concluyó que los extractos de pulpa-semilla presentan mayor estabilidad que los de sólo pulpa, posiblemente debido a una mayor cantidad de compuestos que interactúan con los aditivos estabilizando la nube de electrones π .

8.1.5.6. Análisis de estabilidad Iones Metálicos-Tiempo

De acuerdo con los valores mostrados en tablas y el comportamiento gráfico de los parámetros analizados, se encontró que la estabilidad de las melaninas solubles de papache se ve fuertemente afectada por la presencia de iones metálicos, las melaninas sufrieron degradación severa y precipitación en presencia de cationes trivalentes mientras que en presencia de iones mono y divalentes se mantuvieron relativamente estables, pero se precipitaron principalmente en presencia de iones de transición divalentes. Además, se concluyó que los extractos de pulpa-semilla presentan mayor estabilidad que los de sólo pulpa, posiblemente debido a una mayor cantidad de compuestos sin sitios de unión para los iones lo que disminuye la cantidad de compuestos fotoactivos precipitados.

8.2. Recomendaciones

Con la intención de mejorar la representatividad, replicación y aplicabilidad de la propuesta, así como orientar investigaciones futuras recomendando lo siguiente:

8.2.1. Recomendaciones metodológicas

- **Ampliar el muestreo:** Realizar muestreos probabilísticos y aumentar la cobertura geográfica y temporal (distintas cosechas/estaciones) para mejorar la representatividad y permitir análisis de variabilidad poblacional con distribuciones más normales.
- **Incrementar réplicas y tamaño muestral:** Aumentar el número de réplicas y muestras por tratamiento para mejorar la potencia estadística y reducir la variabilidad e incertidumbre en las estimaciones.
- **Considerar diseños complementarios:** Para encontrar condiciones óptimas que maximicen las variables de interés se pueden modelar respuestas continuas empleando Diseños de Superficie de Respuesta (RSM).
- **Registro detallado de covariables:** Anotar y analizar variables ambientales y de calidad de fruto que puedan actuar como covariables e incidan en la variabilidad del análisis.
- **Análisis cinético y modelado:** Cuando proceda, modelar la degradación de melaninas mediante cinética (orden de reacción, constantes k) y ajustar modelos de Arrhenius para estimar parámetros térmicos (energía de activación), lo que aporta predicciones útiles para la industria.

8.2.2. Recomendaciones para la aplicación práctica

- **Probar estrategias de estabilización:** Según los patrones observados, investigar y aplicar métodos de estabilización de compuestos bioactivos (encapsulación, adición de antioxidantes, ajuste del proceso de extracción) antes de la incorporación industrial de extractos que contengan melaninas.
- **Validación a escala piloto/industrial:** Antes de transferir procesos al ámbito productivo, ejecutar ensayos piloto que contemplen tiempos de

almacenamiento, condiciones de envasado y factores sanitarios para verificar la robustez de la retención de melaninas en condiciones reales.

- **Evaluación sensorial y de seguridad:** Complementar pruebas químicas con evaluaciones sensoriales y controles de seguridad alimentaria (microbiología, residuos) cuando exista intención de uso en productos alimentarios o ingredientes funcionales.

8.2.3. Líneas de investigación futura

Los hallazgos y la metodología desarrollada abren múltiples líneas de investigación que pueden profundizar y ampliar el conocimiento sobre melaninas en papache y muestras similares:

- **Estudios comparativos entre especies y genotipos:** Evaluar la estabilidad y características de las melaninas en otras especies del género *Randia*, así como estudiar la influencia genética sobre la estabilidad del pigmento.
- **Análisis estructural y molecular.** Emplear técnicas instrumentales avanzadas (HPLC, RMN, EPR, MALDI-TOF MS, SEM) para caracterizar la estructura de las melaninas, productos de degradación y mecanismos de fotodegradación o termo-oxidación.
- **Investigaciones sobre propiedades funcionales.** Analizar si la pérdida o modificación de las melaninas afecta las propiedades funcionales relevantes (capacidad antioxidante y capacidad antidiabética).
- **Optimización de procesos de extracción y formulación.** Desarrollar y validar protocolos de extracción más eficientes o ecológicos (extracción asistida, solventes verdes), y evaluar tecnologías de microencapsulación para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad.
- **Modelado predictivo y digitalización.** Crear modelos predictivos integrados (machine learning o modelos estadísticos) que relacionen variables de proceso y ambientales con la estabilidad y potencial nutraceutico de las melaninas para facilitar la toma de decisiones en procesos industriales.

- **Estudios de vida útil y almacenamiento.** Diseñar experimentos de que combinen factores múltiples (temperatura, humedad, oxígeno, luz) para definir condiciones óptimas de procesamiento que extiendan la vida de anaquel del extracto o los productos alimentarios adicionados con este.

8.3. Conclusión final

En conjunto, la presente investigación aporta una base metodológica sólida caracterizar los extractos con melaninas, así como para evaluar el potencial nutraceutico y estabilidad de los extractos ante factores clave (pH, temperatura, luz, agentes redox, aditivos alimentarios, iones metálicos y tiempo).

Se concluyó que los extractos acuosos del fruto de papache contienen melaninas y en general los extractos provenientes de Cahuinahuaró y pulpa-semilla presentan mayor potencial nutraceutico medido en capacidad antioxidante y capacidad inhibitoria de la α -amilasa. Mientras que los extractos provenientes de Rancho Viejo y pulpa-semilla presentan mayor estabilidad ante entornos estresantes como pH ácido y básico, altas temperaturas, luz solar directa, presencia de aditivos alimentarios e iones metálicos, las condiciones óptimas para garantizar la mayor estabilidad en el tiempo son matrices con pH 5, temperatura de 25 °C, protección ante la luz, ausencia de oxidantes y presencia de antioxidantes, concentraciones bajas de sodio y sacarosa, concentraciones intermedias de conservantes, concentraciones pequeñas de electrolitos y ausencia de metales pesados e iones trivalentes.

Para aumentar la aplicabilidad y generalización de los resultados, es indispensable replicar y expandir los estudios siguiendo las recomendaciones aquí propuestas. Estas acciones permitirán no sólo robustecer el conocimiento científico, sino también facilitar la transferencia tecnológica y el diseño de procesos industriales que conserven las propiedades deseadas de los extractos estudiados.

IX. REFERENCIAS

- Aguilar-Camacho, M., Gómez-Sánchez, C. E., Cruz-Mendivil, A., Luna-Vital, D. A., Guerrero-Analco, J. A., Monribot-Villanueva, J. L., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2024). Untargeted metabolomic analysis of *Randia echinocarpa* cell cultures treated with L-Tyrosine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 158(1), 14.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & 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)
- Bye, R., Linares, E., Mata, R., Albor, C., Castañeda, P. C., & Delgado, G. (1991). Ethnobotanical and phytochemical investigation of *Randia echinocarpa* (Rubiaceae). *Anales del Instituto de Biología. Serie Botanica*, 62(1), 87-106.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 14(3), 303–311. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)
- Centro Tecnológico de la Vid y el Vino. (2010). *Monitoreo de madurez*. Programa Territorial Integrado. <http://static.elmercurio.cl/Documentos/Campo/2012/11/19/20121119153346.pdf>
- Cuevas-Juárez, E., Yuriar-Arredondo, K. Y., Pío-León, J. F., Montes-Avila, J., López-Angulo, G., Díaz-Camacho, S. P., & Delgado-Vargas, F. (2014). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *Journal of Functional Foods*, 9, 78-88.
- DOS REIS, G. S., VALADÃO, A. F., DE LIMA, L. R. P., & MOREIRA, M. L. (2009). Preparación de un protector solar y evaluación de la acción fotoprotectora del propóleo verde del Vale do Aço, Minas Gerais, Brasil. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(4), 282-288.

- Fernandes, B., Matamá, T., Guimarães, D., Gomes, A., & Cavaco-Paulo, A. (2016). Fluorescent quantification of melanin. *Pigment cell & melanoma research*, 29(6), 707-712.
- Gil-Avilés, M. del R., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Picos-Salas, M. A., López-Angulo, G., Reynoso-Soto, E. A., Osuna-Martínez, L. U., & Delgado-Vargas, F. (2019). Soluble melanins of the *Randia echinocarpa* fruit—Structural characteristics and toxicity. *Journal of food biochemistry*, 43(12), e13077.
- Glagoleva, A. Y., Shoeva, O. Y., & Khlestkina, E. K. (2020). Melanin pigment in plants: Current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 770.
- Liu, S., Liu, X., Zhang, X., Su, Y., Chen, X., Cai, S., Liao, D., Pan, N., Su, J., & Chen, X. (2023). Exploring the potential of water-soluble squid ink melanin: Stability, free radical scavenging, and Cd²⁺ adsorption abilities. *Foods*, 12(21), 3963.
- Liu, Y., Kempf, V. R., Brian Nofsinger, J., Weinert, E. E., Rudnicki, M., Wakamatsu, K., Ito, S., & Simon, J. D. (2003). Comparison of the structural and physical properties of human hair eumelanin following enzymatic or acid/base extraction. *Pigment cell research*, 16(4), 355-365.
- Mansur, J. de S., Breder, M. N., Mansur, M. C., & Azulay, R. D. (1986). Determination of sun protection factor by spectrophotometry. *An. Bras. Dermatol*, 61(3), 121-124.
- Merck KGaA. (2023). *Melanin Assay Kit (MAK557)* [Technical Bulletin]. Sigma-Aldrich Rev. 12/23. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/292/536/mak557pis-mk.pdf>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Montañez, L. J. B. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3, 5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación*, 13(1), 57-66.
- Montes-Avila, J., Ojeda-Ayala, M., López-Angulo, G., Pío-León, J. F., Díaz-Camacho, S. P., Ochoa-Terán, A., & Delgado-Vargas, F. (2018). Physicochemical

- properties and biological activities of melanins from the black-edible fruits *Vitex mollis* and *Randia echinocarpa*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 1972-1980.
- Moya Cahuana, T. M., & Osorio Oscoco, R. I. (2017). *Actividad fotoprotectora de formulación tópica a base del extracto hidroalcohólico de Fragaria vesca L.(fresa)*.
- Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M.-J., & Aubert, S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(2), 109-157.
- Ojeda-Ayala, M., Gaxiola-Camacho, S. M., & Delgado-Vargas, F. (2022). Phytochemical composition and biological activities of the plants of the genus *Randia*. *Botanical Sciences*, 100(4), 779-796.
- Pralea, I.-E., Moldovan, R.-C., Petrache, A.-M., Ilieș, M., Hegheș, S.-C., Ielciu, I., Nicoară, R., Moldovan, M., Ene, M., & Radu, M. (2019). From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3943.
- Prior, R. L., Hoang, H. A., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3273-3279.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology*, 29(3), 559-566.
- TuTiempo.net. (2025). *Radiación solar en Guasave (México)*. <https://www.tutiempo.net/radiacion-solar/guasave.html>

Xu, R. (2020). *Electrochemical Studies on the Biopigment Eumelanin*. Ecole Polytechnique, Montreal (Canada).