



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

División de Estudios de Posgrado

PROGRAMA INSTITUCIONAL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

TESIS

Para obtener el grado: Doctora en Ciencias

Disminución de los niveles de adipocinas proinflamatorias IL-6, FNT α , MCP-1, interferón -y en ratas con obesidad y dislipidemia, tratadas con extracto acuoso de hojas de *Psidium guajava*.

PRESENTA

Karen Fabiola Tena Rojas
Maestra en ciencias de la salud.



DIRECCIÓN DE TESIS

Héctor Eduardo Martínez Flores.
Doctor en Ciencias



Morelia, Michoacán, México - Agosto 2023.



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, bajo la dirección del doctor Héctor Eduardo Martínez Flores.

Agradecimientos y dedicatoria.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Doctorado.



Agradezco a cada uno de los profesores e investigadores y estudiantes que durante los 4 años del protocolo aportaron su granito de arena, apoyando y colaborando de manera continua.



Por último, agradezco el apoyo incondicional de mi familia para poder realizar mis estudios de doctorado.



RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES.....	6
3.1 Compuestos Fenólicos (CF)	8
3.2 Guayaba (Psidium guajava) fuente de antioxidantes	9
3.3 Extracción de polifenoles.....	11
3.4 Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	12
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVO GENERAL	16
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
7. CAPITULO I DEL PROYECTO, EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJA DE PSIDIUM GUAJAVA POR UAE Y MACERACIÓN.....	17
7.1 MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1.1 ENSAYO DE FENOLES TOTALES.....	18
7.1.2 ENSAYO DE FLAVONOIDES TOTALES.....	19
7.1.3 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES ABTS.....	20
7.1.4 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES DPPH.....	21
7.2. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR TÉCNICA ASISTIDA POR ULTRASONIDO.....	22
7.2.1 Diseño de estudio experimental.....	22
7.2.2 ENSAYO FENOLES TOTALES.....	24
7.2.3 FLAVONOIDES TOTALES.....	36
7.2.4 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES ABTS.....	52
7.2.5 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES DPPH.....	72
7.2.6 CONCLUSIÓN GENERAL EXTRACCIÓN POR TÉCNICA ASISTIDA DE ULTRASONIDO.....	92
7.3. EXTRACCION POR TÉCNICA DE MACERACIÓN	93
7.3.1 Diseño de estudio experimental.....	93
7.3.2 ENSAYO FENOLES TOTALES.....	95
7.3.3. FLAVONOIDES TOTALES.....	105
7.3.4 ENSAYO INHIBICIÓN RADICALES ABTS.....	117
7.3.5 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES DPPH.....	128
7.3.6 CONCLUSIÓN GENERAL DE LA EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.....	138
7.4 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA O HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC).....	140
7.5 DISCUSIÓN CAPITULO I, SOBRE LOS RESULTADOS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN VIA UAE Y MACERACIÓN.....	145
8. CAPITULO II DEL PROYECTO, INSTAURACIÓN DEL MODELO DE INFLAMACIÓN EN ROEDOR.	147
8.1 MATERIALES Y MÉTODOS	147
8.1.1 DISEÑO DE DIETA PROINFLAMATORIA (DPI).....	147
8.1.2 SELECCIÓN DE DOSIS Y REQUERIMIENTOS DE INSUMOS BIOLÓGICOS.....	153
8.1.3 CALCULO MUESTRAL Y SELECCIÓN DEL NÚMERO DE ROEDORES	155
8.1.4 INTEGRACIÓN DISEÑO EXPERIMENTAL.....	156
8.2 RESULTADOS CAPITULO II, MODELO DE INFLAMACIÓN EN ROEDOR.....	158
8.2.1.PESO.....	158
8.2.1 GLUCOSA.....	170

8.2.3 TRIGLICÉRIDOS.....	177
8.2.3 CONCLUSIÓN GENERAL SOBRE PESO, GLUCOSA EN AYUNO, CONTEO TOTAL DE TRIGLICÉRIDOS....	184
8.3 RESULTADOS ADIPOCINAS PROINFLAMATORIAS IL-6, MCP-1, IFy y FNT α EN MODELO ROEDOR....	185
8.3.2 FACTOR NECROSIS TUMORAL ALFA.....	186
8.3.3 INTERLEUCINA 6.....	190
8.3.4 INTERFERÓN GAMMA.....	194
8.3.5 MCP-1.....	198
8.3.5 DISCUSIÓN GENERAL CAPITULO II, MODELO DE INFLAMACIÓN EN ROEDOR.....	201
9. CONCLUSIÓN GENERAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	204
10. REFERENCIAS.....	205

RESUMEN

Antecedentes: Las hojas de diversos frutos y plantas han sido utilizadas por generaciones desde una perspectiva nutraceútica, tal es el caso de las hojas de *Psidium guajava*. En la actualidad el uso de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales está en aumento debido a la biodiversidad y eficacia de los compuestos para participar en procesos fisiológicos en el ámbito médico e industrial. La investigaciones actuales indican que los antioxidantes naturales pueden modular el estrés oxidativo y mejorar la función inmunológica en procesos crónicos como la obesidad. Objetivo: Evaluar la capacidad antioxidante del extracto de *Psidium guajava* para disminuir los niveles de IL-6, FNT α , MCP-1, interferón -y así determinar su actividad, antilipemiante, antiobesogénica, antidiabética en un modelo roedor. Metodología: Se determino la capacidad antioxidante del extracto por medio de las pruebas de polifenoles totales, flavonoides, ABTS y DPPH por la técnica asistida por ultrasonido y maceración. Se selecciono el extracto con la mejor capacidad antioxidante. Posteriormente se formaron 6 grupos con las siguientes características, Grupo 1, ratas con dieta proinflamatoria (DPI), obesas, a las que se les impartió un tratamiento de 200mg/día de extracto acuoso de hojas de guayaba (EAG). Grupo 2, ratas con DPI, obesas, a las que se les impartió un tratamiento de 500mg/día EAG. Grupo 3, Ratas con DPI, obesas, a las que se les impartió un tratamiento de 200 mg/día de quercetina. Grupo 4, ratas con dieta proinflamatoria, obesas con toma de agua ad libitum. Grupo 5, ratas con dieta estándar (DE), con toma de agua ad libitum. Grupo 6, ratas con DE a las que se les impartió un tratamiento de 200 mg/día EAG. El periodo experimental duró 8 semanas, muestra sérica, donde se midió, glucosa en ayuno, triglicéridos totales, peso corporal en diferentes tiempos del periodo experimental. Resultados: Se determinó que la técnica por ultrasonido obtuvo mayor efectividad a las siguientes condiciones 1g/50mL, 50°C, 30% amplitud, y 20 minutos de extracción comparado con la maceración convencional. En el modelo roedor se determinó que una vez instaurado el estado proinflamatorio se determinó que el grupo 1, y 2, mostraron diferencia significativa en la disminución máxima de los niveles de triglicéridos (64%), glucosa en ayuno (28.8%), IL-6 (19.7%), FNT α (11%), IFN- γ (21.6%), MCP-1 (6.9%) además el peso corporal disminuyo un máximo del (10%) en comparación al grupo control, a las dos semanas del tratamiento. Conclusión: El extracto acuoso de hojas de guayaba posee una alta capacidad antioxidante por lo cual favorece la disminución del estado de obesidad e inflamación crónica en el modelo roedor estudiado.

Palabras clave: Obesidad, Antioxidantes, Inflamación, Nutraceúticos, Guayaba.

ABSTRACT

Background: The leaves of various fruits and plants have been used for generations from a nutraceutical perspective, such is the case of the leaves of *Psidium guajava*. Currently, the use of bioactive compounds from natural sources is increasing due to the biodiversity and efficacy of the compounds to participate in physiological processes in the medical and industrial fields. Current research indicates that natural antioxidants can modulate oxidative stress and improve immune function in chronic conditions such as obesity. **Objective:** To evaluate the antioxidant capacity of the extract of *Psidium guajava* to decrease the levels of IL-6, TNF α , MCP-1, interferon - and thus determine its antilipidemic, antiobesogenic, antidiabetic activity in a rodent model. **Methodology:** The antioxidant capacity of the extract is determined through the tests of total polyphenols, flavonoids, ABTS and DPPH by the technique assisted by ultrasound and maceration. The extract with the best antioxidant capacity is selected. Subsequently, 6 groups were formed with the following characteristics: Group 1, rats with a proinflammatory diet (DPI), obese, which were given a treatment of 200mg/day of aqueous extract of guava leaves (EAG). Group 2, obese rats with DPI, which were given a treatment of 500mg/day EAG. Group 3, Obese rats with DPI, which were given a treatment of 200 mg/day of quercetin. Group 4, rats on a proinflammatory diet, obese with water intake ad libitum. Group 5, rats on a standard diet (DE), with water intake ad libitum. Group 6, ED rats given a 200 mg/day EAG treatment. The experimental period lasted 8 weeks, serum sample, where fasting glucose, total triglycerides, body weight were measured at different times of the experimental period. **Results:** It was determined that the ultrasound technique was more effective under the following conditions: 1g/50mL, 50°C, 30% amplitude, and 20 minutes of extraction compared to conventional maceration. In the rodent model, it was determined that once the proinflammatory state was established, it was determined that groups 1 and 2 showed a significant difference in the maximum decrease in triglyceride levels (64%), fasting glucose (28.8%), IL- 6 (19.7%), TNF α (11%), IFN- γ (21.6%), MCP-1 (6.9%), in addition, body weight decreased a maximum of (10%) compared to the control group, after two weeks of the treatment. **Conclusion:** The aqueous extract of guava leaves has a high antioxidant capacity, which favors the reduction of the state of obesity and chronic inflammation in the rodent model studied.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad, una condición médica caracterizada por el exceso de acumulación de tejido adiposo en el cuerpo, ha emergido como un desafío global de salud pública en las últimas décadas. La prevalencia de la obesidad ha aumentado de manera alarmante, afectando a personas de todas las edades y grupos demográficos en todo el mundo. Además de ser un factor de riesgo importante para diversas enfermedades crónicas, como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos, la obesidad también está asociada con una disminución de la calidad de vida y un aumento en los costos de atención médica.

Ante esta creciente preocupación, la búsqueda de enfoques naturales y efectivos para abordar la obesidad y sus comorbilidades ha adquirido importancia en la investigación científica. Las plantas medicinales y sus componentes bioactivos han sido objeto de exploración en este contexto. Entre estas plantas, las hojas de *Psidium guajava*, conocidas comúnmente como hojas de guayaba, han ganado reconocimiento por sus potenciales propiedades antiobesogénicas y su capacidad para abordar los síntomas y comorbilidades asociados con la obesidad. (Sookkhee et al., 2019).

Las hojas de *Psidium guajava*, una especie nativa de América tropical, han sido tradicionalmente utilizadas en la medicina herbaria de diversas culturas debido a sus propiedades terapéuticas. Estudios recientes, realizados en un período que abarca desde 2019 hasta el presente, han arrojado luz sobre los efectos beneficiosos de las hojas de guayaba en relación con la obesidad y sus consecuencias para la salud, Cruz et al. (2021). Estas hojas se caracterizan por su contenido en compuestos bioactivos, como ácido ascórbico, quercetina y ácido gálico, que se han asociado con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y reguladoras del metabolismo. (Jayashree et al., 2020)

En este contexto, esta tesis tiene como objetivo explorar de manera integral las propiedades de las hojas de guayaba en relación con la obesidad y sus efectos en la reducción de síntomas y comorbilidades asociadas, expresadas a través del estado inflamatorio característico, evaluando el potencial terapéutico de las hojas de *Psidium guajava* y su aplicación en el proceso de la obesidad y sintomatología asociada.

2. ANTECEDENTES

En los últimos años, la inadecuada alimentación crónica caracterizada por consumo de una dieta alta en grasas se ha visto cada vez más como un factor clave que acelera el riesgo para padecer diversas enfermedades. Este fenómeno se caracteriza por un estado de sobrepeso u obesidad, originado por la acumulación anormal de grasa a nivel corporal. En el mundo hay más de 1900 millones de adultos de 18 o más años con sobrepeso, y más de 600 millones con obesidad. La niñez también está siendo afectada, se estima que existen 41 millones de niños menores de 5 años con sobrepeso u obesidad. En México, las cifras son devastadoras, cerca de 72.5% de la población adulta presenta sobrepeso u obesidad. El sobrepeso y obesidad son el principal factor de riesgo de enfermedades no transmisibles, como las cardiovasculares (cardiopatías y accidentes cerebrovasculares), diabetes, trastornos del aparato locomotor (como la osteoartritis, enfermedad degenerativa de las articulaciones muy discapacitante), y algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) (OMS, 2019; ENSANUT, 2018).

En la actualidad la obesidad se considera un desorden inflamatorio. Este proceso inflamatorio es sumamente perjudicial al adquirir un carácter crónico (Leisegang *et al.*, 2019). La respuesta inflamatoria propagada por el tejido adiposo es capaz de producir una situación crónica a nivel sistémico que conduce a diversas patologías, como resistencia a la insulina, aterosclerosis, y otras relacionadas al síndrome metabólico (Rohm *et al.*, 2022). Este desorden está asociado a factores secretados por el mismo tejido adiposo, denominadas adipocinas proinflamatorias, que favorecen un estado de estrés oxidativo, el cual se define como un proceso por el cual existe un desbalance entre la respuesta antioxidante y la producción de agentes oxidantes con un aumento exacerbado en la producción de radicales libres (Liguori *et al.*, 2018). El mecanismo por el cual la inflamación se produce para favorecer la obesidad es muy complejo. Uno de los primeros protagonistas ligados a este estado inflamatorio es el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que fue la primera citoquina identificada capaz de inducir resistencia a la insulina en adipocitos *in vitro* (Castoldi, *et al.*, 2016.) En el tejido adiposo la secreción de TNF- α se deriva principalmente de los macrófagos (Ferrante, 2013) y la

acumulación de estas células inmunitarias en la obesidad contribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina y comorbilidades (Ouchi, 2011).

Además del estrés oxidativo, la obesidad y enfermedades asociadas tienen su origen en alteraciones del metabolismo, el cual es altamente afectado por factores genéticos y ambientales entre los que destacan la poca actividad física y el consumo de dietas hipercalóricas con bajo contenido en vegetales y sus biocomponentes antioxidantes (OMS, 2019).

En general, la terapéutica actual para aminorar y disminuir los efectos deletéreos por los radicales libres se basa principalmente en el aporte exógeno de compuestos bioactivos con actividad antioxidante (Liguori *et al.*, 2018). Se ha descrito que son varios los mecanismos por los cuales estos compuestos facilitan la mejora de las comorbilidades y proceso inflamatorio en individuos con obesidad, la dieta es el principal componente que disminuye la sintomatología (Shang *et al.*, 2020).

Estudios actuales deben centrarse en la exploración de alternativas naturales como las plantas, que ofrecen mecanismos de acción efectivos, con necesidad de ser más estudiados y con ello contribuyan al tratamiento de diversos padecimientos, siendo uno de los más beneficiados la obesidad.

3. MARCO TEORICO

3.1 *Compuestos Fenólicos (CF)*

Los compuestos fenólicos (CF) o polifenoles son producto del metabolismo secundario de plantas y tienen capacidad para actuar como antioxidantes, estabilizando radicales libres. Su estructura química se constituye por anillos aromáticos con presencia de uno o más grupos hidroxilos y su propiedad antioxidante se relaciona con la posición del grupo hidroxilo y grado de hidroxilación de los anillos (Zhang et al., 2021) . Los polifenoles tienen propiedades anticancerígenas, antiteratogénicas, cardioprotectoras, neuroprotectoras y reguladoras del metabolismo. En los últimos años se ha mostrado la capacidad de los CF como reguladores de la inflamación, una respuesta fisiológica que conecta el consumo de dietas hiperlipídica y desarrollo de obesidad (Thaler et al., 2012).

Esta regulación se lleva a cabo al inhibirse dos factores de transcripción involucrados en las cascadas de señalización pro-inflamatorias, las de NF- κ B (nuclear factor-kappa B) y AP-1 (activator protein 1), además de la actividad regulatoria sobre la vía de las MAPK (mitogen-activated protein kinase). Por ello, los CF, principalmente los de tipo flavonoide, podrían ejercer sus efectos modulatorios sobre el metabolismo de la glucosa y el perfil lipídico vía una regulación de la inflamación. Flavonoides como kaempferol y quercetina han mostrado un importante efecto positivo sobre la captura de glucosa, reducción de la gluconeogénesis y reducción de la adipogénesis; esto asociado a una modulación de las vías inflamatorias dependientes de NF- κ B, TNF- α e Interleucinas (Vinayagam & Xu, 2015).

En general, existen alrededor de 500 tipos de CF identificados en plantas. Basados en su estructura, se clasifican en 4 grupos, ácidos fenólicos, estilbenos, ligninas y flavonoides. Estos últimos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina. Existen alrededor de 5000 tipos de flavonoides descritos a la fecha, en general estos se dividen a su vez en flavonas como catequina, flavononas, antocianinas, isoflavona y flavonoles, este último grupo representado por quercetina y kaempferol, actualmente muy estudiados por sus mecanismos antioxidantes y su rol en diversas patologías relacionadas a la obesidad, muchos de estos componentes activos se encuentran en una amplia variedad de fuentes alimenticias, como son las verduras y las frutas.

3.2 Guayaba (*Psidium guajava*) fuente de antioxidantes

El árbol de guayaba (*Psidium guajava*) pertenece a la familia *Myrtaceae*. Crece en zonas tropicales y subtropicales del mundo, se adapta a las diferentes condiciones climáticas, pero prefiere los climas secos. Es una especie nativa de América Central. En México, entre los principales productores se encuentra el estado de Michoacán, con una producción estimada para el 2014 de 93,466.6 Ton en una superficie de 7488.8 Ha (INEGI, 2017). El fruto y las hojas poseen compuestos funcionales, con alto contenido en vitaminas A y C, riboflavina y niacina, taninos, CF, triterpenos, flavonoides, aceites esenciales, saponinas, carotenoides y lectinas (Kamath *et al.*, 2014).

Los beneficios metabólicos de la hoja de guayaba se basan en los CF, que son considerados los principales fitoquímicos por su capacidad para reducir alteraciones asociadas a obesidad y diabetes. Los componentes principales de las hojas de guayaba del tipo fenólico solubles son el ácido gálico, catequina, epicatequina, rutina y quercetina (Chen & Yen, 2007).

Un estudio realizado por Li *et al.* (2021) analizó el perfil fitoquímico y las actividades biológicas de las hojas de guayaba. Los resultados mostraron la presencia de varios compuestos bioactivos, como son los ácidos ascórbico, cafeico y clorogénico que mostraron tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Además, los extractos de hojas de guayaba también exhibieron actividad antimicrobiana contra diversas bacterias y hongos.

Otro estudio realizado por Freire *et al.* (2014) evaluó la capacidad de los extractos de hojas de guayaba para reducir el estrés oxidativo en ratas wistar macho, mostrándose que los extractos de hojas de guayaba redujeron significativamente los niveles de colesterol total y aumentaron la función antioxidante mediante la enzima superóxido dismutasa en el modelo roedor.

Kumar *et al.* (2022), investigó la actividad hipoglucemiante de los extractos de hojas de guayaba en ratones diabéticos. Los resultados mostraron que los extractos de hojas de guayaba redujeron significativamente los niveles de glucosa en sangre y mejoraron la función hepática en los ratones diabéticos.

En otro estudio realizado por Lok et al. (2023), encontraron que extractos de hojas de guayaba exhibieron una actividad significativa contra el crecimiento de células tumorales.

En un estudio anterior, realizado por Sourì et al. (2021), se investigó el potencial antiinflamatorio del extracto de hojas de guayaba en un modelo roedor. Los resultados mostraron que los extractos de hojas de guayaba redujeron significativamente la inflamación. De acuerdo a este estudio, esto ocurre principalmente a través de la inhibición de PGE2, COX-2, NO, iNOS, ERK1/2, migración de células leucocitarias, así como la supresión del edema.

Un estudio publicado por Li et al. (2021) encontró que el la suplementacion de polisacaridos de hojas de *Psidium guajava* redujo significativamente el peso corporal y la acumulación de grasa en ratones alimentados con una dieta hiperlipidica. También se mostro una disminución en el aumento de peso corporal inducido por la dieta hiperlipidica, pot otro lado, se mostró reducción en los niveles de colesterol sérico, triglicéridos y LDL-C. Además, se mejoró la resistencia a la insulina, la acumulación de lípidos hepáticos y la metainflamación tanto en el hígado como en los tejidos adiposos en ratones obesos. Sorprendentemente, el tratamiento restauró la relación Firmicutes/Bacteroidetes, indujo el crecimiento de bacterias beneficiosas, incluidas *Clostridium XIVa*, *Parvibacter* y *Enterorhabdus*, y disminuyó la bacteria relacionada con la inflamación *Mucispirillum* en muestras fecales, acompañado de una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon.

Otro estudio publicado en 2019 por König y colaboradores demostró los efectos del extracto de hojas de *Psidium guajava* en la inhibición de la absorción de glucosa a nivel intestinal en individuos sanos, posiblemente debido a la inhibición del transporte de glucosa mediado por el cotransportador de glucosa dependiente de sodio 1 (SGLT1) y el transportador de glucosa 2 (GLUT2) en vitro, (células Caco-2) probado en modelos roedores.

Finalmente, un estudio publicado en 2021 por Huang y colaboradores, en el que se investigó los efectos del extracto de hojas de *P. guajava* en ratas con síndrome metabólico. Los autores

encontraron que el extracto mejoró la dislipidemia y la resistencia a la insulina, sugiriendo un posible uso terapéutico de las hojas en la prevención y tratamiento del síndrome metabólico.

3.3 Extracción de polifenoles

La gran importancia de los polifenoles ha dado lugar a un gran número de estudios enfocados a su extracción a partir de diversas fuentes vegetales. Entre las técnicas más utilizadas de extracción de estos compuestos se encuentran la maceración, la cual está asociada a un alto consumo de disolventes orgánicos, cuyos remanentes limitan la aplicación de los extractos debido a la toxicidad del solvente, además de requerir largos tiempos de extracción, implicando un alto consumo energético (Da Porto *et al.*, 2013).

Por lo cual en la actualidad se ha desarrollado la implementación de tecnologías novedosas de extracción asistidas por diversos mecanismos como el ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos extracción acelerada por disolventes (Lavilla *et al.*, 2017). Siendo el principal objetivo de estas tecnologías la reducción del consumo de energía y tiempo, que es reflejado en la disminución del costo, por lo que han sido denominadas como sustentables, debido a que protegen tanto al medio ambiente como a la salud de los consumidores, potenciando la competitividad económica e innovadora de las industrias (Armenta *et al.*, 2015).

En la Tabla 1 se presentan las principales diferencias entre los diferentes métodos utilizados para la extracción de polifenoles.

De las tecnologías de extracción presentadas en la Tabla 1, la EAU resalta como una alternativa sustentable al requerir una inversión moderada de solvente y energía. Además de ser considerada de fácil manejo, segura, económica y reproducible, ya que esta tecnología permite su desarrollo bajo condiciones de presión atmosférica y temperatura ambiente (Soria & Villamiel. 2010; Vieira *et al.*, 2013).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de métodos de extracción de polifenoles

Característica	EAU	Microondas	Fluidos Super críticos	Soxhlet
Principio	Cavitación Acústica	Energía por microondas	Presión	Calor
Tiempo extracción	10 – 60 min	3-30 min	10-60 min	6-24 h
Tamaño muestra	1- 30 g	1-10g	1-5 g	1-30g
Disolvente	50 -200mL	10-40mL	30-60mL	150-500mL
Energía utilizada	Moderada	Alta	Moderada	Alta
Ventajas	Manejo simple, seguro, poco uso de solventes, intervalos cortos de tiempo	Rápido, fácil manejo, moderado uso de solvente.	Alta selectividad Rápido. Sin necesidad de filtrado.	No es necesario uso de equipos sofisticados.
Desventajas	Paso de filtración requerida. Degradación de analitos en altas frecuencias.	Riesgo de explosión. Costoso Filtración previa requerida	Muchos parámetros para optimizar.	Riesgo de exposición a vapores, y degradación de analitos termolábiles.

3.4 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

El ultrasonido está basado en la propagación de ondas mecánicas conformada por un conjunto de ciclos, definidos como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas compresiones y rarefacciones, respectivamente (Awad *et al.*, 2012). Las principales características de la onda de ultrasonidos son (Tippens, 2009):

- Longitud: distancia entre dos puntos de compresión o rarefacción.

- Amplitud: altura máxima de una onda.
- Frecuencia (Hz): número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): producto de la frecuencia por la longitud de onda.
- Potencia (W): cociente entre la energía transportada y el tiempo considerado
- Intensidad (W/cm²): cociente de una unidad de potencia a través de una unidad área.

Al espectro de ondas implicadas en el ultrasonido se les denomina ondas ultrasónicas cuyas frecuencias se encuentran por encima del intervalo audible (<20KHz) y por debajo de las frecuencias de microondas (hasta 10 Mhz) (Kadam *et al.*, 2015). La EAU tiene como principal fuerza impulsora a la cavitación acústica, capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente presente, provocando la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y presión (Shirsath *et al.*, 2012). En la Figura 1, se muestra el fundamento de cavitación acústica anteriormente abordado.

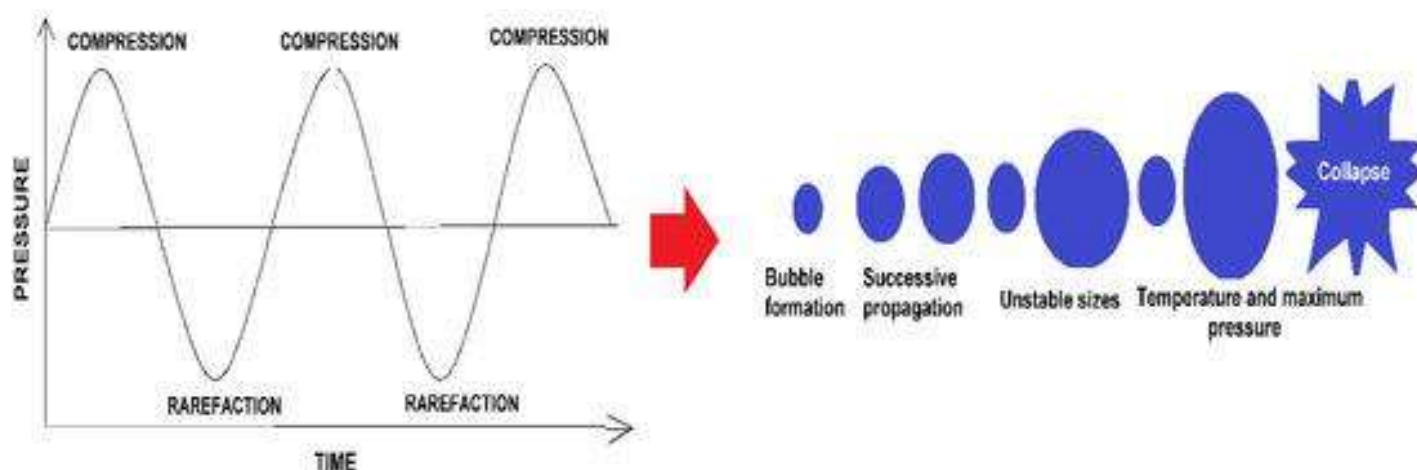


Figura 1. Principio de cavitación acústica.

Existen varios mecanismos que participan en EAU, uno de ellos la fragmentación, dada por la colisión de las partículas y las ondas ultrasónicas, generando la disminución del tamaño de partícula, facilitando de esta manera la transferencia de componentes.

La erosión es otro mecanismo que permite aumentar el acceso del disolvente a partir de la ruptura de las burbujas sobre la superficie del analito.

Otros factores que mejoran la introducción del disolvente son dos efectos:

Sonocapilaridad y sonoporación, lo cuales son capaces de producir conductos gracias a la implosión de la burbujas, favoreciendo la permeabilidad de la pared celular y facilitando la liberación de su contenido. Por último el fenomeno de oscilación produce colapso de las burbujas en el fluido. En la siguiente figura se muestra de manera más precisa el fenómeno por el cual se liberan componentes mediante EAU. En la Figura 2 se muestra representación gráfica de cavitación-burbuja colapsando y liberando material vegetal en tres pasos. (A) Representación de burbujas y células vegetales, (B) Desglose de la pared celular y colapso de burbujas, finalmente (C) Difusión del solvente a través de la ruptura y liberación celular de los compuestos

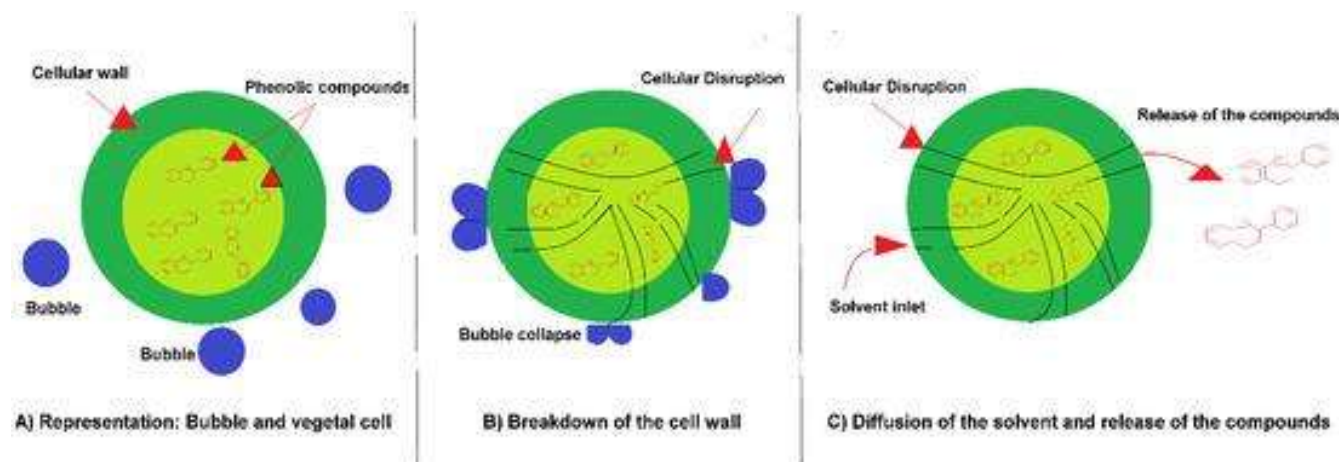


Figura 2. Fundamento de colapso de burbuja y liberación de biocomponentes.

Por otro lado, el efecto de las variables involucradas en la extracción por ultrasonido está directamente relacionadas con la eficiencia y el rendimiento del proceso. En la Tabla 2, se muestran algunos de los resultados reportados por diferentes equipos de investigación.

Tabla 2. Efecto reportado de las variables implicadas en la extracción ultrasónica.

Variable	Condiciones	Observaciones	Autor
Frecuencia	25 – 60 kHz	Bajas frecuencias mejoraron el rendimiento de extracción	Soria y Villamiel (2010)
Amplitud	20, 50 y 100% 30, 50 y 70%	Ciclos mas altos aumentaron la recuperación. A mayor amplitud mayor rendimiento.	Meullemiestre <i>et al.</i> (2016) Mane <i>et al.</i> (2015)

Tiempo	40, 80 min	Mayor tiempo resulta en mayor rendimiento.	Tomšik (2016)
Temperatura	20, 50, 70 °C	Incremento de las temperaturas, mayor rendimiento de extracción.	Garcia-Castello <i>et al.</i> (2015)

El uso de ultrasonido como una técnica actual, para la captación de compuestos bioactivos. Deberá ser una herramienta eficaz que permite obtener una mayor eficiencia de extracción de los compuestos de interés, facilitando además de su obtención, la adecuada integridad de sus características estructurales y actividades antioxidantes.

4. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la obesidad y sus comorbilidades en México, y en el mundo, ha requerido intensificar los estudios para su tratamiento y prevención, ya que este padecimiento ha sido declarado el mayor problema de salud pública en las últimas décadas. En la actualidad, la obesidad se considera un estado de inflamación crónica debido a una producción exacerbada de agentes oxidantes e inflamatorios, propagados por el exceso de grasa corporal. Una alternativa es estudiar los compuestos bioactivos presentes en plantas, que puedan ser factibles de implementarse como tratamientos reales en la prevención de enfermedades como la obesidad y de las crónicas-degenerativas que de ellas se derivan, tal es caso del aprovechamiento de hojas del árbol de guayaba. En la presente investigación se estudiará el efecto de compuestos fenólicos extraídos de hoja de guayaba, en la inflamación crónica de bajo grado, con el propósito de generar una alternativa natural y accesible, a partir de la suplementación de estos componentes activos, que sirvan como coadyuvantes en el tratamiento de la obesidad y por consecuencia de sus comorbilidades. Mejorando la calidad de vida de quienes la padecen y abordando un problema de salud pública importante en nuestro país.

5. HIPÓTESIS

La administración del extracto de hojas de *Psidium guajava*, disminuye los niveles de adipocinas proinflamatorias (IL6, MCP-1, IFN- γ , FNT α) en ratas con obesidad.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración del extracto de hojas de *Psidium guajava* sobre los niveles de adipocinas proinflamatorias (IL6, MCP-1, IFN- γ , FNT α) en ratas con obesidad.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un estudio comparativo del proceso de extracción de compuestos fenólicos de hojas de guayaba, utilizando los procesos de maceración convencional y por proceso ultrasónico.
2. Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante de extractos de hoja de guayaba obtenidos por ambos procesos de extracción para seleccionar el tratamiento con mayor efectividad.
3. Analizar el efecto antioxidante, antiobesogénico, antiinflamatorio, antidiabético e hipolipemiante del extracto de *Psidium guajava* en los diferentes grupos experimentales.
4. Demostrar el efecto antiinflamatorio del extracto de *Psidium guajava* en el modelo roedor mediante la medición de adipocinas proinflamatorias IL-6, FNT α , MCP-1, IFN- γ .

7. CAPITULO I DEL PROYECTO, EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJA DE PSIDIUM GUAJAVA POR UAE Y MACERACIÓN.

7.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se ejecutaron siguiendo las metodologías, para el ensayo de fenoles totales se llevó a cabo utilizando la metodología propuesta por Makkar (1993). Para el ensayo de flavonoides totales se siguió la metodología de Liu, 2020. Para la prueba ABTS se siguió la metodología de Re, 1999, y por último para la prueba DPPH se utilizó la metodología de Randhir, (2007). Cada una con modificaciones para adaptar a las necesidades del estudio, las cuales se especifican en las siguientes páginas.

7.1.1 ENSAYO DE FENOLES TOTALES

PROCEDIMIENTO

1. Se preparó una solución stock de ácido gálico a una concentración de 200ppm y se realizó la curva de calibración de acuerdo a la Tabla 3.
2. Se preparó una solución de carbonato de sodio a una concentración de 75 g/L.
3. Se tuvieron 3 tratamientos blanco además de de 6 tratamientos con 3 réplicas n=18 tubos.
4. Se pipetearon 250 μ L de cada concentración de la curva de calibración en sus tubos de ensayo correspondientes.
5. Se pipetearon 250 μ L de Reactivo Folin-Ciocalteu a cada concentración de curva de calibración y muestra a analizar (preparar 10.5 μ L).
6. Se pipetearon 250 μ L de carbonato de sodio a cada concentración de curva de calibración y muestra a analizar con su posterior homogenización.
7. Se incubo en baño maría por 30 minutos a 40 °C.
8. Se pipetearon 2mL de agua destilada a cada concentración de curva de calibración y muestra a analizar. Se leyó a una longitud de onda de 750 nm.

Tabla 3. Curva de calibración para ensayo fenoles totales.

Curva de calibración ácido gálico			
Ppm	μ L de solución stock	μ L de H ₂ O	Volumen final
0	0	1000	1 mL
20	100	900	1 mL
50	250	750	1 mL
70	350	650	1 mL
90	450	550	1 mL
110	550	450	1 mL
150	750	250	1 mL

7.1.2 ENSAYO DE FLAVONOIDES TOTALES

1. Se preparó una solución stock de quercetina a una concentración de 1000 ppm y realizó la siguiente curva de calibración de acuerdo a la Tabla 4.
2. Se preparó una solución de nitrito de sodio (NaNO_2) a una concentración de 5%.
3. Se preparó una solución de cloruro de aluminio (AlCl_3) a una concentración de 10%.
4. Se preparó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 1M.
5. Se rotularon tubos de ensayo, se obtuvieron 3 tratamientos blanco además de un total de 6 tratamientos con 3 réplicas, $n = 18$ tubos.
6. Se pipetearon 150 μL de cada concentración de la curva de calibración en sus tubos de ensayo correspondientes.
7. Se pipetearon 150 μL de la muestra a analizar en sus tubos de ensayo correspondientes. (considerar el factor de dilución de la muestra).
8. Se pipetearon 150 μL de solución de nitrito de Sodio a cada concentración de curva de calibración y muestra a analizar.
9. Se pipetearon 150 μL de la solución de Cloruro de aluminio a cada concentración de curva de calibración y muestra a analizar.
10. Se pipeteo 1mL de la solución de hidróxido de sodio a cada concentración de curva de calibración y muestra a analizar y posteriormente se homogenizo.
12. Se leyó a una longitud de onda de 510 nm.

Tabla 4. Curva de calibración para ensayo flavonoides totales.

Curva de calibración quercetina			
Ppm	μL de solución stock	μL de H_2O	Volumen final
0	0	1000	1 mL
100	100	900	1 mL
200	200	800	1 mL
300	300	700	1 mL
400	400	600	1 mL
500	500	500	1 mL
600	600	400	1 mL

Para evaluar la actividad antioxidante del extracto, se realizaron las pruebas pruebas 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) y (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS).

7.1.3 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES ABTS

1. Se preparó una solución stock de trolox a una concentración de 200 ppm y se realizó la curva de calibración motrada en la Tabla 5.
2. Se preparo una solución acuosa de ABTS a una concentración de 7mM.
3. Se preparo una solución de persulfato de potasio a una concentración de 2.45mM.
4. Se mezclo la solución de ABTS y la solución de persulfato de potasio en una proporción 2:1 respectivamente y se dejó oxidar la mezcla por 12 h antes de ser utilizada.
5. Se realizaron las soluciones diluidas de la mezcla oxidada de ABTS en etanol hasta que se obtuvo un valor de 0.700(+/-) 0.002nm con absorbancia. 0.732
6. Se pipetearon 100 µL de cada concentración de la curva de calibración a cada tubo.
7. Se pipetearon 100 µL de la muestra a analizar directamente sobre la celdilla.
8. Se pipetearon 1900 µL de ABTS, ajustado previamente, a cada concentración de curva de calibración y muestra a analizar. Se leyó a una longitud de onda de 734 nm.

Tabla 5. Curva de calibración para ensayo ABTS.

Curva de calibración de Trolox			
Ppm	µL de solución stock	µL de agua destilada	Volumen final
0	0	1000	1mL
10	100	900	1mL
20	200	800	1mL
30	300	700	1mL
40	400	600	1mL
50	500	500	1mL
60	600	400	1mL
70	700	300	1mL
80	800	200	1mL

7.1.4 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES DPPH

1. Se preparó una solución stock de ácido gálico a una concentración de 200ppm y se realizó la siguiente curva de calibración de acuerdo a la Tabla 6.
2. Para preparar la curva de calibración se preparó una solución stock de ácido gálico a una concentración de 500 ppm a diferentes concentraciones.
3. Se preparó reactivo DPPH diluido en metanol una concentración de metanol absoluto, a una concentración de 60 μ M.
4. Se rotularon tubos de ensayo según la cantidad de muestras a analizar y concentraciones de la curva de calibración.
5. Se pipetearon 50 μ L de cada concentración de la curva de calibración en sus tubos de ensayo correspondientes.
6. Se pipetearon 50 μ L de la muestra a analizar en sus tubos de ensayo correspondientes.
7. Se agregaron 2950 μ L de reactivo DPPH a cada tubo de curva de calibración y de muestra a analizar.
8. Se homogenizaron los tubos y se mantuvieron en incubación por 30 minutos en oscuridad.
9. Los resultados se leyeron a una longitud de onda de 517 nm.

Tabla 6. Curva de calibración para ensayo DPPH.

Curva de calibración de ácido gálico			
ppm	μ L de solución stock	μ L de agua destilada	Volumen final
0	0	1000	1mL
10	50	950	1mL
20	100	900	1mL
30	150	850	1mL
50	250	750	1mL
60	300	700	1mL
70	350	650	1mL
80	400	500	1mL

El porcentaje de captación para las pruebas 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) y (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de captación de ABTS} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100$$

El porcentaje de captación representa la pérdida del color azul-verde del radical ABTS*+, cuando le es agregado un compuesto antioxidante, disminuyendo así la absorbancia de la solución, que es medida a 754 nm; la absorbancia inicial se tomó en el minuto cero sin adición de ácido gálico o extracto, la absorbancia final se toma 10 minutos después de agregar el ácido gálico o extracto, el ácido ascórbico o la rutina.

7.2. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR TÉCNICA ASISTIDA POR ULTRASONIDO.

7.2.1 Diseño de estudio experimental

Con el objetivo de comparar las diferentes condiciones por técnica de ultrasonido se formuló un estudio en parcelas divididas donde se evaluaron las siguientes variables: temperatura, tiempo, dilución y amplitud de onda. En la Tabla 7 se muestra el diseño. Se formularon dos parcelas de tiempo con un total de 16 tratamientos con tres réplicas, por parcela.

TIEMPO 1 (10 minutos)						
Amplitud onda 30%				Amplitud de onda 50%		
Dilución 50		Dilución 100		Dilución 50		Dilución 100
Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30
T1*A30*D50*T30	T1*A30*D50*T50	T1*A30*D100*T30	T1*A30*D100*T50	T1*A50*D50*T30	T1*A50*D50*T50	T1*A50*D100*T30
TIEMPO 2 (20 minutos)						
Amplitud de onda 30%				Amplitud de onda 50%		
Dilución 50		Dilución 100		Dilución 50		Dilución 100
Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30

T2*A30*D50*T30	T2*A30*D50*T50	T2*A30*D100*T30	T2*A30*D100*T50	T2*A50*D50*T30	T2*A50*D50*T50	T2*A50*D100*T30
-----------------------	----------------	-----------------	-----------------	----------------	----------------	-----------------

Tabla 7. Diseño experimental en parcelas divididas.

Con la matriz de datos organizada se procedió a evaluar el diseño. Para validar el diseño se utilizó el software JMP. Se evaluó el diseño mediante el modelo de análisis en parcelas divididas, se construyeron los efectos del modelo, especificando el número de interacciones (4) y se realizó el diagnóstico. Obteniéndose el siguiente resultado en la Tabla 8 por lo cual se concluye que el diseño utilizado es confiable.

Diagnóstico del diseño	Diseño D-óptimo
Eficiencia D	100
Eficiencia G	100
Eficiencia A	100
Varianza Media de predicción	0.3333

Tabla 8. Resultado de validación de diseño experimental.

Una vez evaluado el diseño se procedió a ejecutar las pruebas conforme a la planeación, el modelo permitió conocer el comportamiento de cada una de las variables y sus posibles interacciones. Se creó una base de datos en el programa Excel y se construyó posteriormente un matriz de datos para el programa JMP versión 15.2.1

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.2.2 ENSAYO FENOLES TOTALES

En la figura 3 y la tabla 9, se muestra la respuesta del tratamiento en torno al modelo completo.

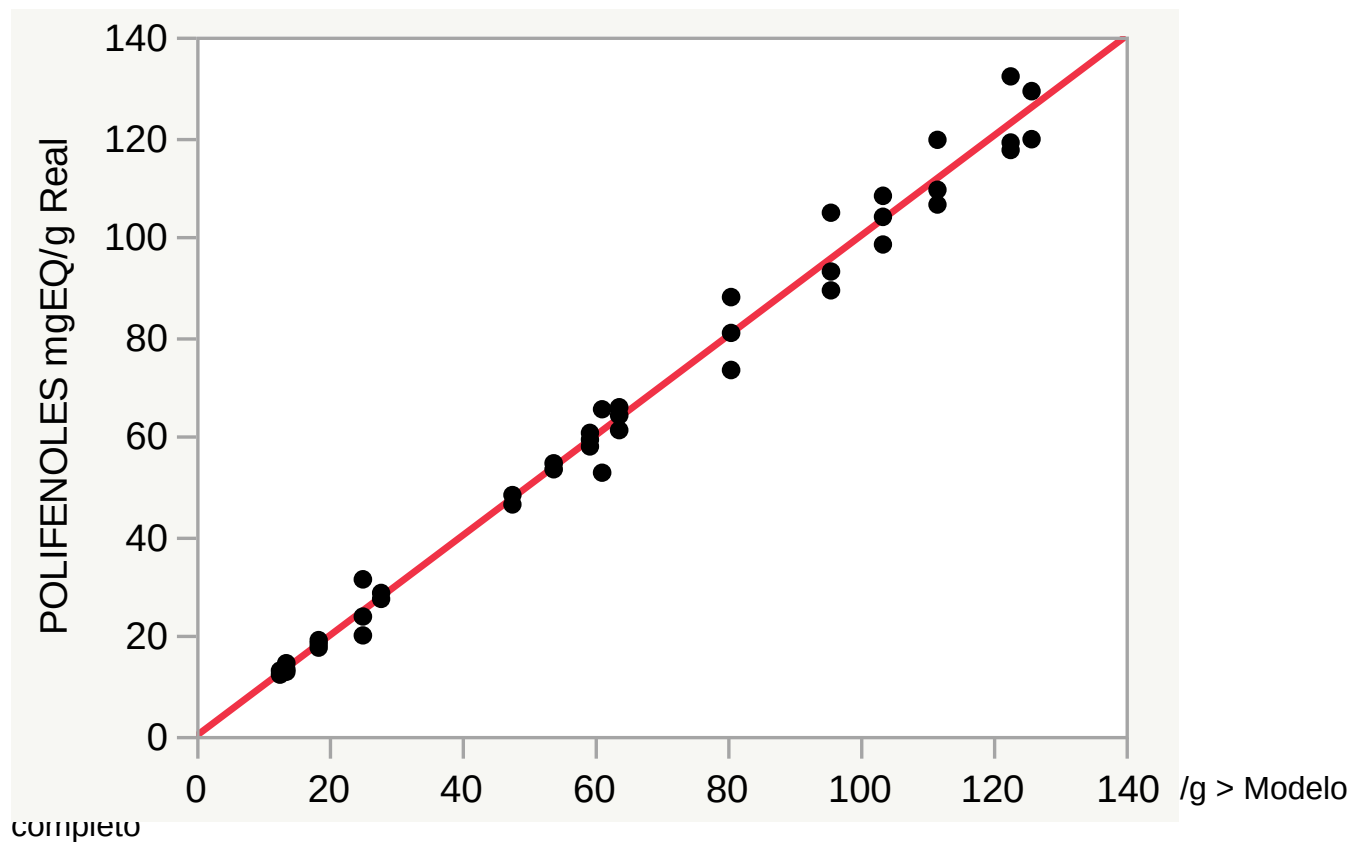


Tabla 9. Resumen del ajuste del modelo.

R cuadrado			0.988955	
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	15	68523.01	4568.20	191.0094
Error	32	765.31	23.92	Prob > F
C. Total	47	69288.32		<.0001*

Tabla 10. Análisis de varianza.

De acuerdo con la R cuadrada mostrada en la Tabla 9, se explica un 98.88% de los resultados basado en el modelo, habiendo una relación muy alta entre factores y respuestas. Por lo tanto, los resultados encontrados son estadísticamente confiables, tanto en términos probabilísticos como en términos de variación explicada. En la Tabla 11 se muestra el resumen de las interacciones con su valor de significancia.

Fuente	N Par	GL	S C	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	11973.49	500.6458	<.0001*
TEMPERATURA	1	1	7903.95	330.4864	<.0001*
AMPLITUD	1	1	247.15	10.3342	0.0030*
DILUCION	1	1	25931.92	1084.29	<.0001*
TIEM*TEMP	1	1	1194.60	49.95	<.0001*
TIEM*AMPLITUD	1	1	84.76	3.54	0.0689
TIEM*DILU	1	1	13.16	0.55	0.4636
TEMP*LONG	1	1	4810.82	201.15	<.0001*
TEMP*DILU	1	1	375.89	15.72	0.0004*
LONG*DILU	1	1	2961.44	123.83	<.0001*
TIEM*TEMP*AMPLITUD	1	1	5270.45	220.37	<.0001*
TIEM*TEMP*DILU	1	1	0.88	0.037	0.8494
TIEM*LONG*DILU	1	1	233.84	9.78	0.0037*
TEMP*LONG*DILU	1	1	6839.54	285.98	<.0001*
TIEM*TEMP*LONG*DILU	1	1	681.09	28.478	<.0001*

Tabla 11. Resumen pruebas de los efectos e interacciones.

A continuación, se describen los resultados encontrados de acuerdo con cada variable y sus combinaciones.

DILUCIÓN

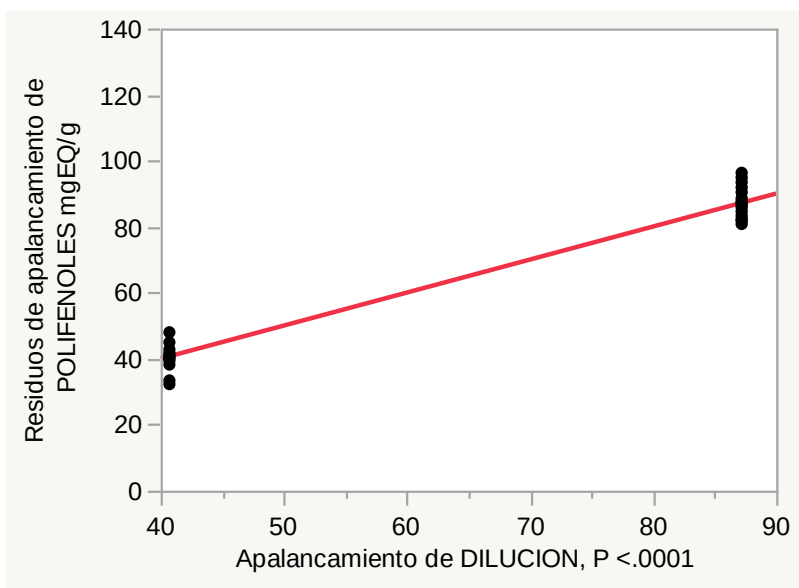


Figura 4. Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > DILUCIÓN.

En la Figura 4 se observa que para la prueba de fenoles totales se encontró que la variable dilución se considera el factor con mayor significancia, siendo la D50 la de mayor eficacia de extracción con un promedio de 87.19 mgEQ/g en comparación a la D100 con un promedio de 40.70 mgEQ/g de rendimiento de extracción. Se realizó la prueba t de student con un valor de $\alpha < 0.05$, $t = 2.01669$ por lo cual se observa que las diferencias entre grupos son significativas.

TIEMPO

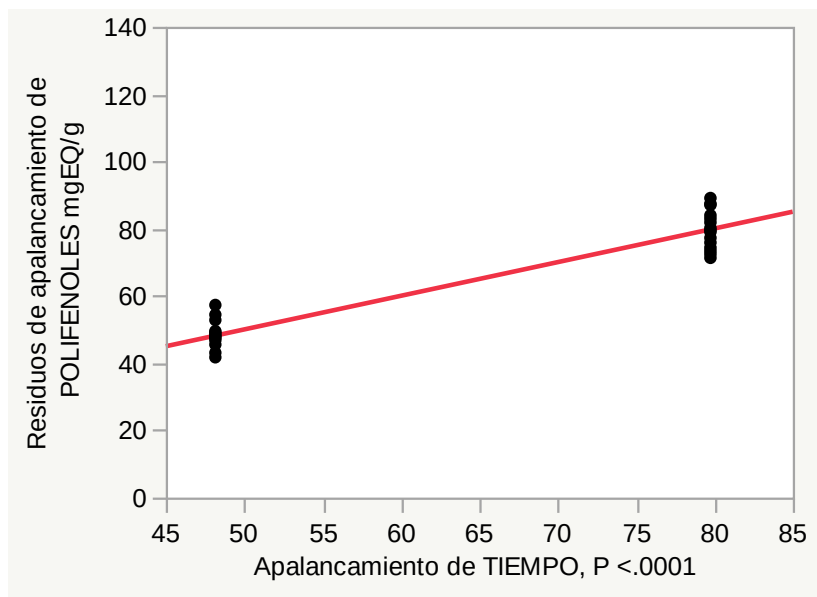


Figura 5. Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > TIEMPO.

En la figura 5, se muestra que La variable tiempo se considera una variable significativa presentando un valor de P de <0.0001 , observándose que T2 con un promedio de 79.74 mgEQ/g, tiene una eficiencia de extracción mayor a T1 con un promedio de 48.15, con un de $\alpha = <0.05$, $t = 2.01669$ lo que representa una diferencia significativa entre medias.

TEMPERATURA

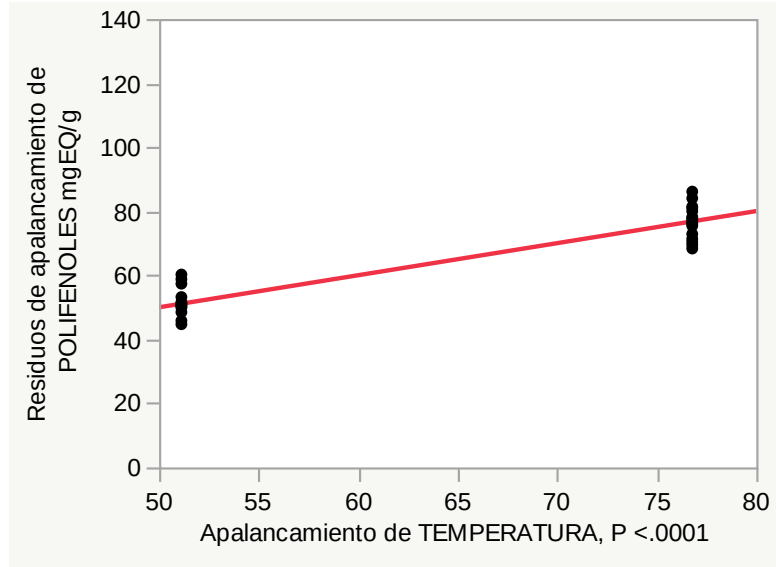


Figura 6. Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g >TEMPERATURA.

En la Figura 6, se observó que para la variable temperatura la T50 tuvo una mayor eficiencia de extracción con un promedio de 76.78 mgEQ/g, en comparación a la T30 con un promedio de extracción 51.1182 mgEQ/g, se ejecutó la prueba t de student por lo que se observó que ambas temperaturas son significativamente diferentes de acuerdo con su promedio de extracción con un $\alpha = <0.05$, $t = 2.01669$.

AMPLITUD DE ONDA SÓNICA

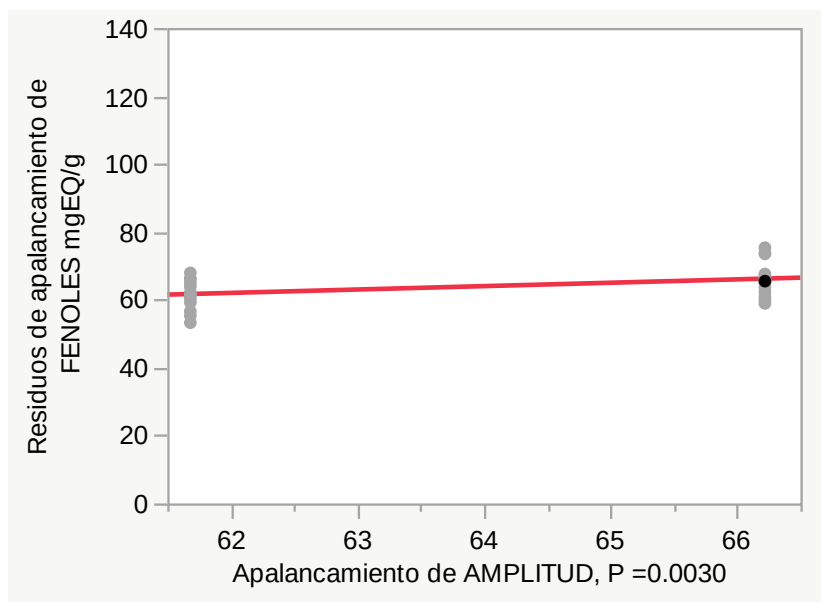


Figura 7. Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g >AMPLITUD.

En cuanto a polifenoles totales (Figura 7), la variable amplitud de onda no es un valor significativo, presentando un $\alpha=0.5$, con medias parecidas entre sí, por lo cual se deduce que además de no ser una variable importante, ambas amplitudes de onda comparten una media de extracción similar, 50% (66.21 mgEQ/g) 30% (61.68 mgEQ/g).

ANÁLISIS DE INTERACCIONES

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > TIEMPO*TEMPERATURA

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T2, T50	A				97.56
T2, T30		B			61.92
T1, T50			C		56.00
T1, T30				D	40.31

Tabla 11. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Todos los niveles fueron significativamente distintos. Se observó que la interacción entre T2 (20 min) y T50 (50 °C) (Tabla 11) tuvo mayor eficiencia de extracción de polifenoles, en comparación a la interacción tiempo 1 (10 min) y T30 (30 °C) con 57.19 mg menos de extracción.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > TIEMPO*AMPLITUD

Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T2, A50	A			83.34
T2, A30		B		76.14
T1, A50			C	49.09
T1, A30			C	47.21

Tabla 12. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

La interacción del tiempo 2 (20 min) y A50 (50% amplitud) (Tabla 2) mostró mayor eficiencia de extracción en comparación a las demás combinaciones. Y se notó que la T2 es una variable altamente involucrada en la eficiencia de extracción en comparación al T1.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > TIEMPO*DILUCION

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T2, D50	A				103.51
T1, D50		B			70.87
T2, D100			C		55.97
T1, D100				D	25.43

Tabla 13. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a lo mostrado en la Tabla 13, todos los niveles son significativamente distintos, siendo la interacción entre T2 (20 min) y D50 (1g/50mL) la que tienen una mayor eficiencia de extracción con 78.08 más mg que la interacción entre el T1 (10 min) y D100 (1g/100mL). Además, se puede notar que la dilución es un factor sumamente importante y está asociado a la eficiencia de extracción de polifenoles.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > TEMPERATURA*AMPLITUD.

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T50, A30	A				84.52
T50, A50		B			69.04
T30, A50			C		63.39
T30, A30				D	38.83

Tabla 14. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Se observa una diferencia entre todos los niveles de acuerdo a la Tabla 14, siendo los de mayor extracción, la interacción entre T50 (50 °C) ya sea con 50% amplitud o 30% amplitud.

Además, se notó que la temperatura es un factor con más relevancia en comparación a la amplitud de onda sónica.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > TEMPERATURA*DILUCION

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T50, D50	A				102.82
T30, D50		B			71.56
T50, D100			C		50.74
T30, D100				D	30.67

Tabla 15. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Tabla 15 se observaron diferencias entre los niveles siendo los de mejor extracción los que cuentan D50 (1g/50mL), además se evidencia que la T50 (50 °C) sigue siendo la temperatura que está relacionada a una mayor eficiencia de extracción de polifenoles.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g > AMPLITUD*DILUCION

Nivel					Media de mínimos cuadrados
A50, D50	A				97.31
A30, D50		B			77.06
A30, D100			C		46.29
A50, D100				D	35.12

Tabla 16. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Tabla 16 se muestran diferencias entre todos los niveles, siendo los de mejor extracción aquellos con D50 (1g/50mL) en comparación con aquellos con D100 (1g/100mL). La

amplitud de onda se mostró como un factor no tan determinante como lo es la dilución, sin embargo, se podría concluir elegir 50% amplitud ya que está más ligada a los tratamientos con mayor eficacia de extracción cuando la dilución es a 50mL.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g interacción a 3 factores >
TIEMPO*TEMPERATURA*AMPLITUD

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T2, T50, A50	A				101.63
T2, T50, A30	A				93.50
T1, T50, A30		B			75.54
T2, T30, A50			C		65.05
T1, T30, A50			C		61.74
T2, T30, A30			C		58.79
T1, T50, A50				D	36.45
T1, T30, L30				E	18.88

Tabla 17. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Los resultados mostrados en la Tabla 17, evidencian que las variables que determinan la eficiencia de extracción son dadas por la T2 (20 min) y la T50 (50 °C) independientemente de la amplitud de onda. Siendo estas interacciones parte del mismo grupo de medias.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g interacción a 3 factores >
TIEMPO*AMPLITUD*DILUCION

Nivel							Media de mínimos cuadrados
T2, A50, D50	A						117.17
T2, A30, D50		B					89.85
T1, A50, D50			C				77.46
T1, A30, D50				D			64.28
T2, A30, D100				D			62.44
T2, A50, D100					E		49.51
T1, A30, D100						F	30.14
T1, A50, D100						G	20.72

Tabla 18. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

La interacción con D50 (1g/50mL) (Tabla18) mostró mejor eficiencia de extracción, T2 (20 min) siguió siendo el mejor tiempo de extracción, y la longitud de onda 50 (50% amplitud) fue la variable asociada a las combinaciones con mejor rendimiento de extracción.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g interacción a 3 factores >
TEMPERATURA*AMPLITUD*DILUCION

Nivel							Media de mínimos cuadrados
T50,A30, D50	A						114.64
T30, A50, D50		B					103.63
T50, A50, D50			C				91.00
T50, A30, D100				D			54.40
T50, A50, D100				D	E		47.08
T30, A30, D50					E		39.49
T30, A30, D100					E		38.18
T30, A50, D100						F	23.16

Tabla 19. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Existen diferencias significativas de la interacción dada por la temperatura, amplitud y dilución, se observó en la tabla 19, que las combinaciones con mayor rendimiento de extracción son los niveles A, B, y C; todos con una dilución menor (1g/50mL) por lo que se destaca que la dilución tiene un papel muy importante.

Respuesta FENOLES TOTALES mgEQ/g interacción a 4 factores >

Nivel									Media de mínimos cuadrados
T2, T50, L30, D50	A								125.84
T2, T50, L50, D50	A								122.68
T2, T30, L50, D50	A	B							111.65
T1, T50, L30, D50		B	C						103.45
T1, T30, L50, D50			C						95.61
T2, T50, L50, D100				D					80.57
T2, T30, L30, D100					E				63.72
T2, T50, L30, D100					E	F			61.15
T1, T50, L50, D50					E	F			59.31
T2, T30, L30, D50					E	F			53.86
T1, T50, L30, D100						F			47.64
T1, T30, L50, D100							G		27.86
T1, T30, L30, D50							G	H	25.12
T2, T30, L50, D100							G	H	18.45
T1, T50, L50, D100							G	H	13.59
T1, T30, L30, D100								H	12.64

Tabla 19. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Existieron diferencias muy pronunciadas entre todos niveles (Tabla 19), siendo los de mejor extracción y con medias dentro del mismo grupo, aquellas con tiempo de 20 min, temperatura de 50 °C, dilución 1g/50mL. Se observa que la amplitud de onda no juega un factor determinante en la extracción en comparación a las demás variables.

7.2.3 FLAVONOIDES TOTALES

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > Modelo completo

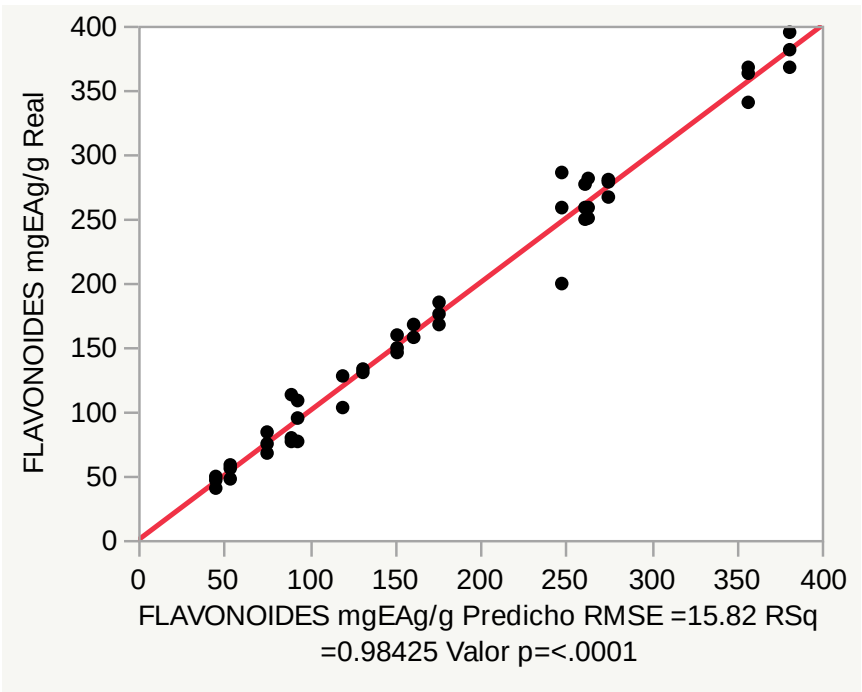


Figura 7. Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > Modelo completo.

R cuadrado	0.984248
R cuadrado ajustado	0.976865
Raíz del error cuadrático medio	15.8201
Media de respuesta	180.2159
Observaciones (o suma de pesos)	48

Tabla 20. Resumen del ajuste.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	15	500431.53	33362.1	133.3015
Error	32	8008.82	250.3	Prob > F
C. Total	47	508440.34		<.0001*

Tabla 21. Análisis de varianza.

De acuerdo a la R cuadrada (Tabla 20) se explica un 98.4248% de los resultados de acuerdo al modelo, por lo que hubo relación muy alta entre factores y respuestas. Por ello, los resultados fueron estadísticamente confiables, tanto en términos probabilísticos como de variación explicada. En la Figura 7 y Tabla 21 el modelo completo presentó un valor $<.0001$, siendo altamente significativo.

En la Tabla 22 se muestra el resumen de los efectos e interacciones con su valor de significancia.

Fuente	N Par	GL	SC	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	67295.61	268.8861	$<.0001^*$
TEMPERATURA	1	1	54736.38	218.7045	$<.0001^*$
AMPLITUD	1	1	2369.85	9.4690	0.0043*
DILUCION	1	1	17808.01	71.1536	$<.0001^*$
TIEMPO*TEMP	1	1	55.94	0.2235	0.6396
TIEMPO*AMPL	1	1	8268.75	33.0386	$<.0001^*$
TIEMPO*DILU	1	1	8031.84	32.0920	$<.0001^*$
TEMP*AMPL	1	1	265518.75	1060.906	$<.0001^*$
TEMP*AMPL	1	1	91.75	0.3666	0.5491
LONG*DILU	1	1	26516.55	105.9494	$<.0001^*$
TIEM*TEMP*AMPL	1	1	9556.22	38.1828	$<.0001^*$
TIEM*TEMP*DILU	1	1	15571.64	62.2180	$<.0001^*$
TIEM*AMPL*DILU	1	1	2194.37	8.7678	0.0057*
TEMP*AMPL*DILU	1	1	22180.18	88.6231	$<.0001^*$
TIEM*TEMP*AMPL*DILU	1	1	235.69	0.9417	0.3391

Tabla 22. Pruebas de los efectos > Flavonoides.

De acuerdo con los resultados, se muestran los siguientes gráficos por cada una de las variables del diseño y su relevancia.

DILUCIÓN

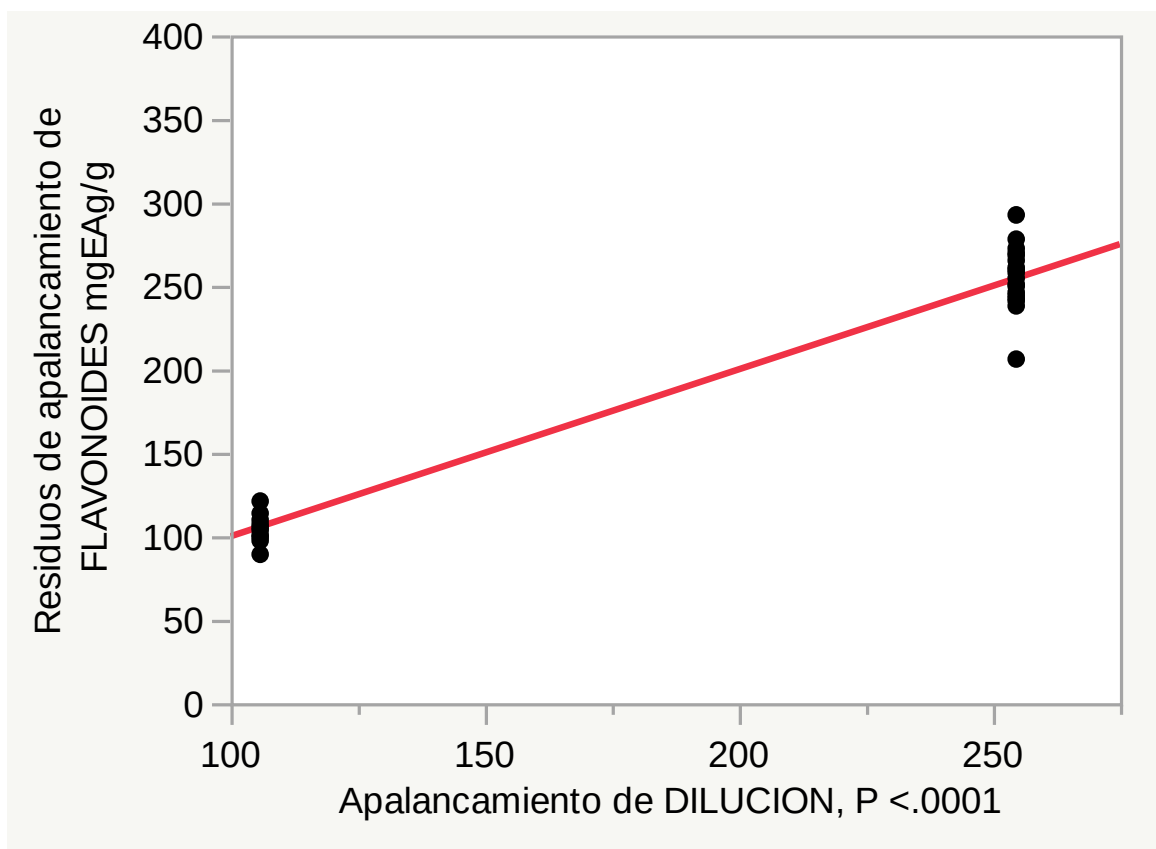


Figura 8. Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > Dilución.

En la Figura 8, se muestra que el factor más importante para la prueba de flavonoides totales fue la variable dilución con un valor de $P < 0.0001$ de significancia. A su vez para la variable dilución se observó que la D50 tiene mayor rendimiento de extracción en comparación a la D100. Se realizó prueba t de student para conocer las diferencias de las medias de mínimos cuadrados se encontró que D50 (254.59 mgEAg/g) y D100 (105.84 mgEAg/g) son significativamente distintos con un $\alpha = < 0.05$, $t = 2.01669$.

TIEMPO

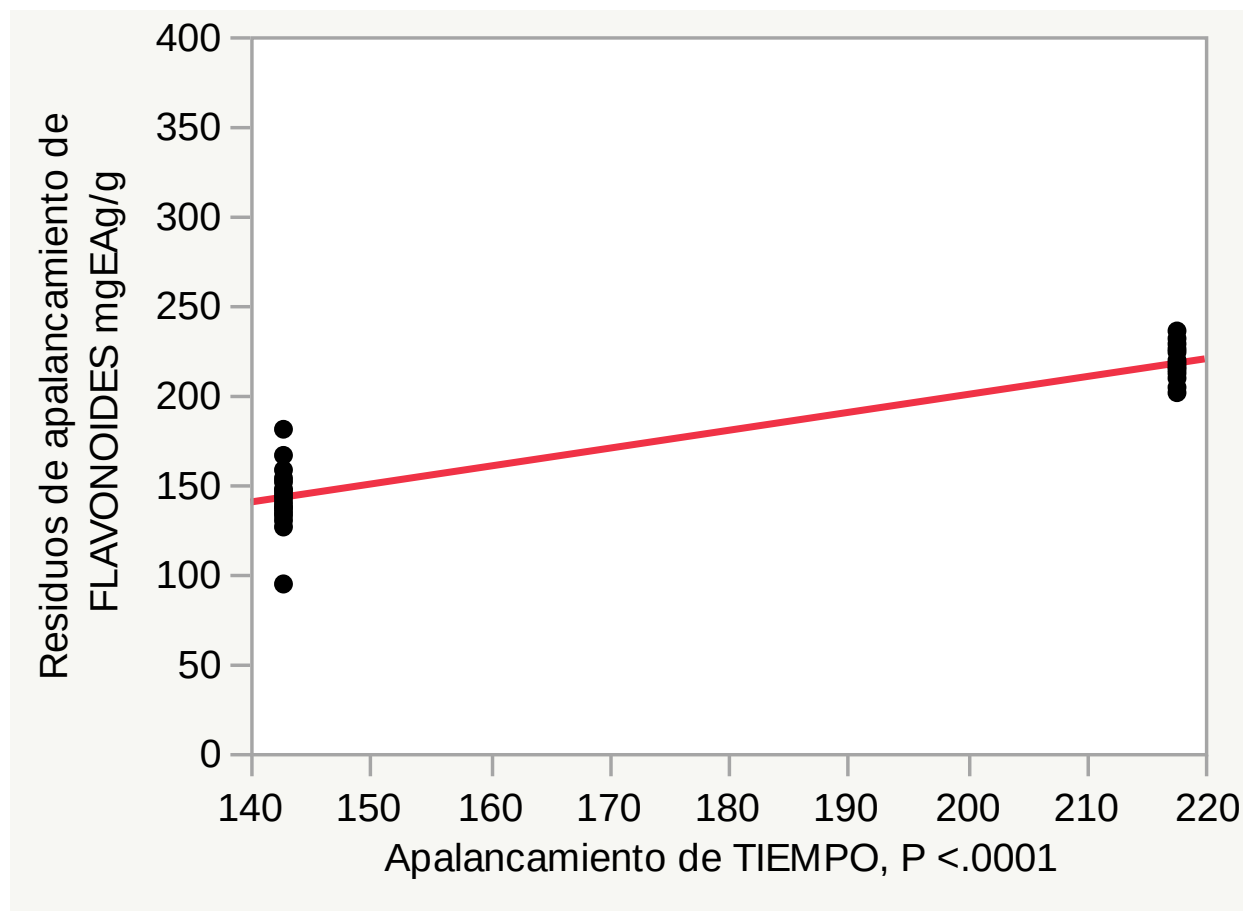


Figura 9. Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g >Tiempo.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 9, la segunda variable con mayor significancia según los datos observados fue para la variable tiempo, de la cual el T2 presento mayor eficiencia de extracción. Se realizó prueba t conocer las diferencias de las medias de mínimos cuadrados se encontró que T1(142.773 mgEAg/g) y T2 (217.659 mgEAg/g) son significativamente distintos con un $\alpha = <0.05$, $t = 2.01669$

TEMPERATURA

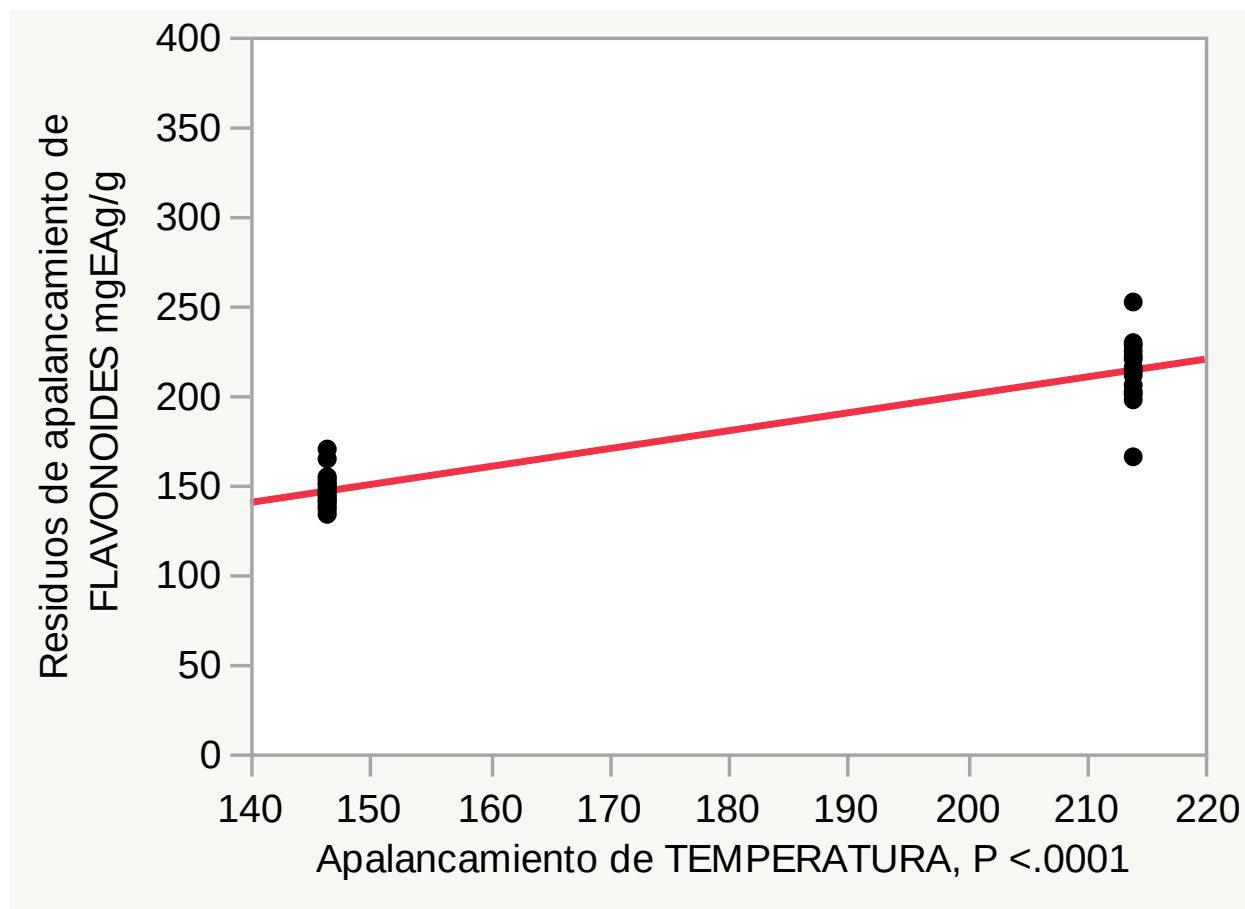


Figura 10. Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > Temperatura.

De acuerdo a la Tabla 22, la variable temperatura es la tercera variable con mayor importancia; según los resultados mostrados en la Figura 10, se aprecia que la T 50 °C tiene mayor eficiencia de extracción en comparación a la T 30 °C.

Se realizó prueba t para conocer las diferencias de las medias de mínimos cuadrados se encontró que T^{30} (146.447 mgEAg/g) y T^{50} (213.985 mgEAg/g) son significativamente distintos con un $\alpha = < 0.05$, $t = 2.01669$

AMPLITUD DE ONDA SÓNICA

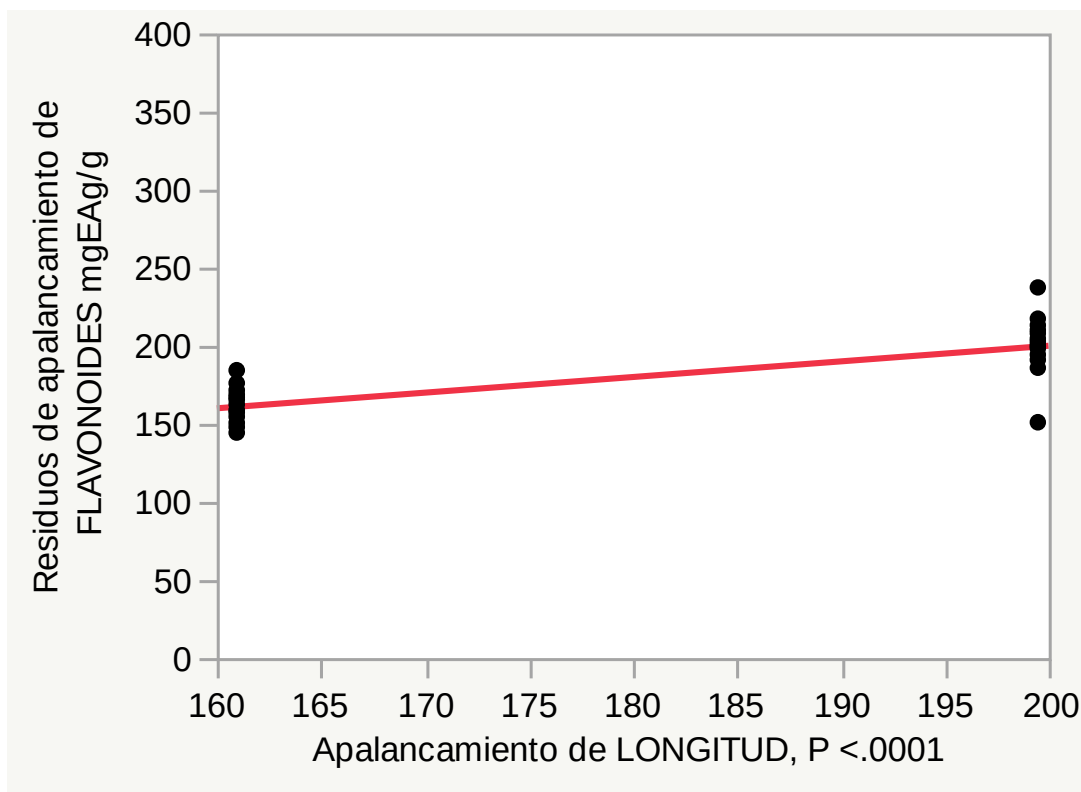


Figura 11. Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g >Longitud.

De acuerdo con la Tabla 22 y la Figura 11, la variable de longitud de onda es considerada la de menor influencia en comparación a las demás variables, Se observó que de acuerdo con el gráfico de las medias de mínimos cuadrados la A50 tiene un mayor rendimiento de extracción en comparación a la A30. Se realizó prueba t para conocer la diferencia de las medias de mínimos cuadrados se encontró que A30 (160.95 mgEAg/g) y A50 (199.47 mgEAg/g) son significativamente distintos con un $\alpha = 0.05$, $t = 2.01669$

Análisis de efectos e interacción entre 2 variables.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*TEMPERATURA

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T2, T50	A			258.45
T2, T30		B		176.86
T1, T50		B		169.51
T1, T30			C	116.03

Tabla 23. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo con los resultados observados en la Tabla 23, las variables T2 (20 min) y T50 (50 °C) son la combinación con mayor eficacia para la extracción de flavonoides, y T1(10 minutos) combinado con T30 (30 °C) muestran un menor rendimiento de extracción.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*AMPLITUD

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T2, A50	A				238.00
T2, A30		B			197.31
T1, A50			C		160.95
T1, A30				D	124.59

Tabla 24. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Se observó que nuevamente en la tabla 24, que la variable T2 (20 min) tiene un mejor rendimiento de extracción cuando está combinado con la A50 (50% amplitud) en comparación a los tratamientos con T1(10 min) y A30 (30% amplitud).

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TEMPERATURA*AMPLITUD

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T50, A50	A			220.12
T50, A30	A			207.84
T30, A50		B		178.83
T30, A30			C	114.06

Tabla 25. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Tabla 25 se observa que nuevamente la T50 (50 °C) es la temperatura que muestra un mayor rendimiento de extracción, también se puede notar que la longitud de onda no tiene tanta relevancia como es la temperatura, pero de elegirse, la longitud de onda L50 (50% amplitud) es la más adecuada y relacionada a una mayor extracción de flavonoides.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*DILUCION

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T2, D50	A				290.65
T1, D50		B			218.53
T2, D100			C		144.66
T1, D100				D	67.01

Tabla 26. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Para la combinación tiempo y dilución observada en la Tabla 26 se notó que la D50 (1g/50mL) está asociada a un mayor rendimiento de extracción, resultando un factor más relevante que el tiempo.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TEMPERATURA*DILUCION

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T50, D50	A			311.86
T30, D50		B		197.31
T50, D100			C	116.10
T30, D100			D	95.57

Tabla 27. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Tabla 27 se muestra que para la combinación temperatura y dilución se observó, que la D50 (1g/50mL) está asociada a un mayor rendimiento de extracción, resultando un factor más relevante que la temperatura.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > AMPLITUD*DILUCION

Nivel				Media de mínimos cuadrados
A50, D50	A			291.86
A30, D50		B		217.31
A50, D100			C	107.09
A30, D100			C	104.59

diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Tabla
28.
Prueba
HSD de
Tukey
de las

En la Tabla 28 se muestra la interacción entre amplitud de onda y dilución, donde se observó que la D50 (1g/50mL) está asociada a un mayor rendimiento de extracción, resultando un factor muy relevante, por otro lado, se observa que la amplitud de onda es un factor menos relevante en comparación al factor dilución es D100 (1g/100mL), con medias observadas en el mismo grupo, el nivel C con 187.27 mg menos de captación en comparación al nivel A.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g>TIEMPO*TEMPERATURA*AMPLITUD

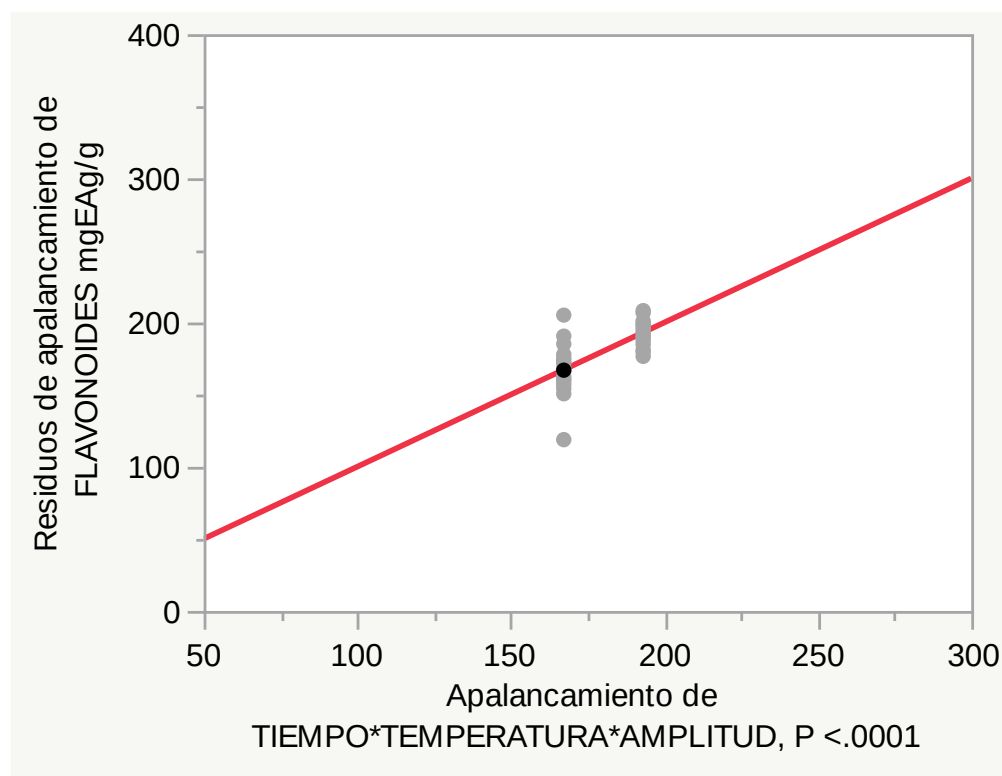


Figura 12. Tiempo/Temperatura/Amplitud.

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T2, T50, A50	A				278.60
T2, T50, A30		B			238.30
T2, T30, A50			C		197.39
T1, T50, A30			C	D	177.39
T1, T50, A50				D	161.63
T1, T30, A50				D	160.27
T2, T30, A30				D	156.33
T1, T30, A30				E	71.78

Tabla 29. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Derivado de la interacción entre tiempo, temperatura y amplitud, se observó (Figura 12), una respuesta altamente significativa entre las tres variables de interés, presentando un valor $P < .0001$. Se notó, que de acuerdo con la prueba posthoc mostrada en la Tabla 29, todas las combinaciones pertenecen a diferente grupo de medias, siendo la combinación T2, T50 y A50, la que asoció a un mayor rendimiento de extracción reportándose una media de 278 mgEAg/g.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCIÓN

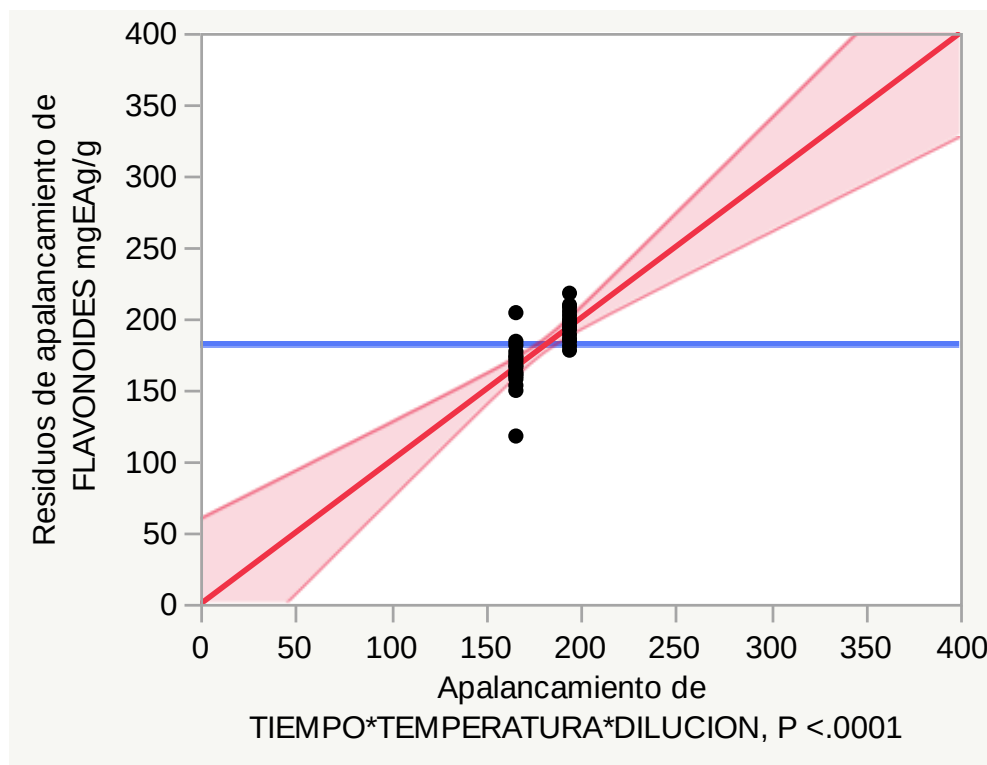


Figura 13. Flavonoides en relación con el tiempo, temperatura y dilución.

Nivel								Media de mínimos cuadrados
T2, T50, D50	A							369.06
T1, T50, D50		B						254.66
T2, T30, D50			C					212.24
T1, T30, D50				D				182.39
T2, T50, D100					E			147.84
T2, T30, D100					E			141.48
T1, T50, D100						F		84.36
T1, T30, D100							G	49.66

Tabla 30. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

La combinación tiempo, temperatura y dilución, ejerce una gran significancia en el rendimiento de extracción, de acuerdo con el valor $P < .0001$ encontrado en la Figura 13, además se notó que todos los diferentes niveles de combinación son muy distintos de acuerdo a la tabla 30, siendo el nivel A, el de mayor rendimiento de extracción correspondiente a 369 mgEAg/g, cabe notar que los niveles que se asocia a un mayor rendimiento de extracción son aquellos con menor dilución, y a una mayor temperatura.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*AMPLITUD*DILUCIÓN

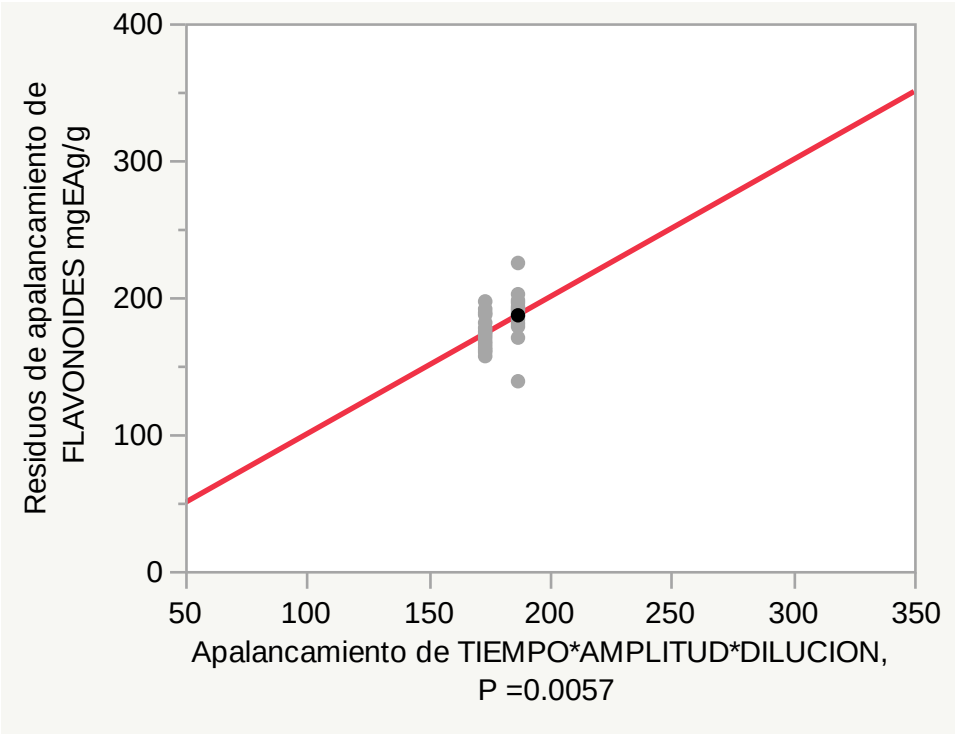


Figura 14. Flavonoides con relación al tiempo, amplitud y dilución.

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T50, A50, D50	A				314.51
T50, A30, D50	A				309.21
T30, A50, D50		B			269.21
T50, A50, D100			C		125.72
T30, A30, D50			C		125.42
T50, A30, D100			C	D	106.48
T30, A30, D100			C	D	102.69
T30, A50, D100				D	88.45

Tabla 31. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Para la combinación tiempo, amplitud y dilución, nuevamente se observa (Figura 14), que esta interacción ejerce gran relevancia en torno al rendimiento de extracción de los flavonoides, también se muestra en la Tabla 31, que los niveles de mayor extracción son aquellos de menor dilución y mayor temperatura (nivel A). Además, se observó que la amplitud de onda es la variable con menor significancia.

Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*TEMPERATURA*LONGITUD*DILUCION

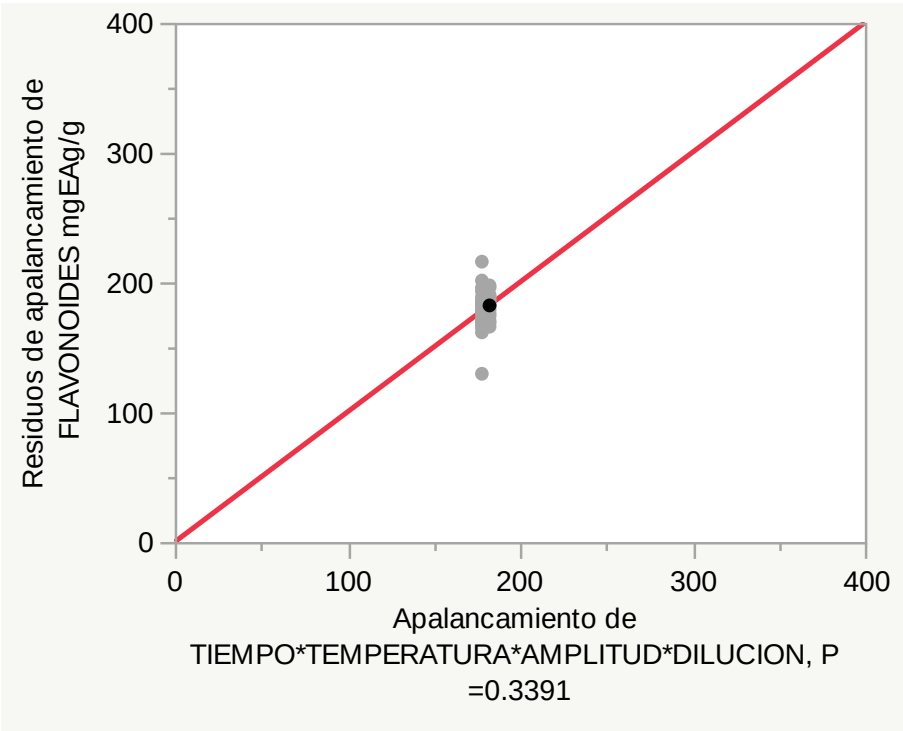


Figura 15. Contenido de flavonoides de acuerdo al tiempo, temperatura, amplitud y dilución.

En la Figura 15, se observó que la interacción producida por las 4 variables involucradas no es significativa, sin embargo, la interacción producida por tiempo/temperatura/dilución si lo es, por lo cual se concluye que la variable amplitud de onda no es relevante en este estudio o ambas amplitudes son igualmente efectivas esto se observa en la Tabla 32.

Nivel								Media de mínimos cuadrados
T2, T50, A50, D50	A							381.18
T2, T50, A30, D50	A							356.93
T1, T30, A50, D50		B						275.12
T2, T30, A50, D50		B						263.30
T1, T50, A30, D50		B						261.48
T1, T50, A50, D50		B						247.84
T2, T50, A50, D100			C					176.03
T2, T30, A30, D50			C	D				161.18
T2, T30, A30, D100			C	D				151.48
T2, T30, A50, D100			C	D	E			131.48
T2, T50, A30, D100				D	E	F		119.66
T1, T50, A30, D100					E	F	G	93.30
T1, T30, A30, D50					E	F	G	89.66
T1, T50, A50, D100						F	G	75.42
T1, T30, A30, D100							G	53.90
T1, T30, A50, D100							G	45.42

Tabla 32. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

7.2.4 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES ABTS

Los resultados obtenidos se muestran como porcentaje de inhibición, se procesó la matriz de datos del total de tratamientos, encontrándose los siguientes resultados.

Respuesta ABTS (%) inhibición > Modelo completo

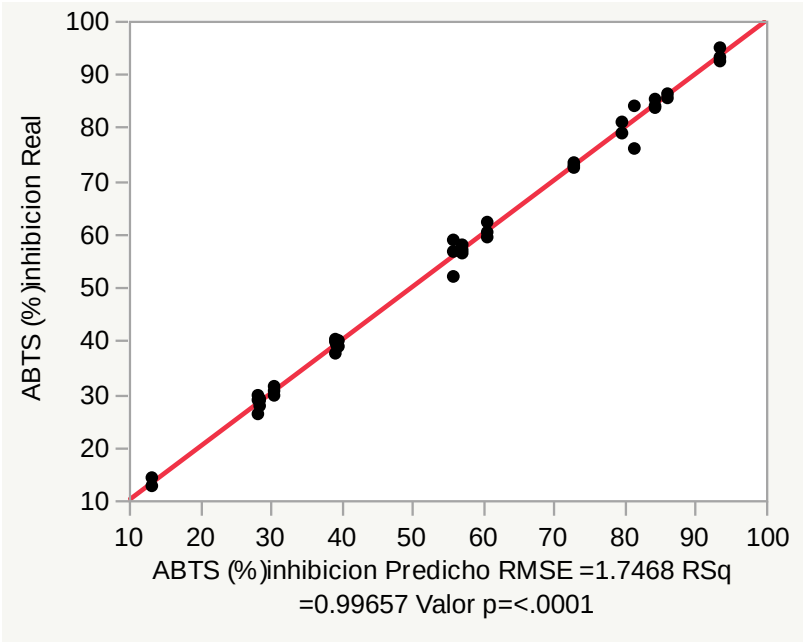


Figura 16. Respuesta ABTS (%) inhibición.

R cuadrado	0.996568
R cuadrado ajustado	0.99496
Raíz del error cuadrático medio	1.746764
Media de respuesta	55.62324
Observaciones (o suma de pesos)	48

Tabla.33 Resumen del ajuste.

Fuente		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo		15	28353.680	1890.25	619.5123
Error		32	97.638	3.05	Prob > F
C. Total		47	28451.318		<.0001*

Tabla 34. Análisis de varianza.

Tabla 35. Resumen de efectos e interacciones para el ensayo ABTS.

En la Figura 16, se muestra que las interacciones producidas por las cuatro variables generan una influencia muy significativa en el porcentaje de inhibición, presentando un valor de $P < .0001$. De acuerdo a los resultados de la Tabla 33, se observó que, de acuerdo con la R cuadrada encontrada, se puede explicar un 99.6568% de los resultados, con solo un porcentaje menor al 1% de variación no explicada. Por lo cual se concluye que el modelo puede estimar correctamente con una alta confiabilidad de los datos.

Fuente	N par	GL	SC	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	765.692	250.9492	<.0001*
TEMPERATURA	1	1	9.135	2.9938	0.0932
TIEMPO*TEMP	1	1	2217.164	726.6571	<.0001*
AMPLITUD	1	1	480.951	157.6278	<.0001*
TIEMPO*AMPL	1	1	0.063	0.0206	0.8868
TEMP*AMPL	1	1	1910.844	626.2634	<.0001*
TIEMPO*TEMP*AMPL	1	1	1943.188	636.8638	<.0001*
DILUCION	1	1	15538.439	5092.595	<.0001*
TIEMPO*DILU	1	1	11.585	3.7969	0.0602
TEMP*DILU	1	1	681.990	223.5167	<.0001*
TIEMPO*TEMP*DILU	1	1	443.921	145.4915	<.0001*
AMPL*DILU	1	1	907.732	297.5017	<.0001*
TIEM*AMPL*DILU	1	1	1670.751	547.5749	<.0001*
TEMP*AMPL*DILU	1	1	1703.807	558.4087	<.0001*
TIEM*TEMP*AMPL*DILU	1	1	68.417	22.4232	<.0001*

En la Tabla 35, se muestra el resumen de los efectos e interacciones del modelo completo con su valor de significancia.

En función de los resultados encontrados, se observan los siguientes comportamientos por cada variable.

AMPLITUD DE ONDA SÓNICA

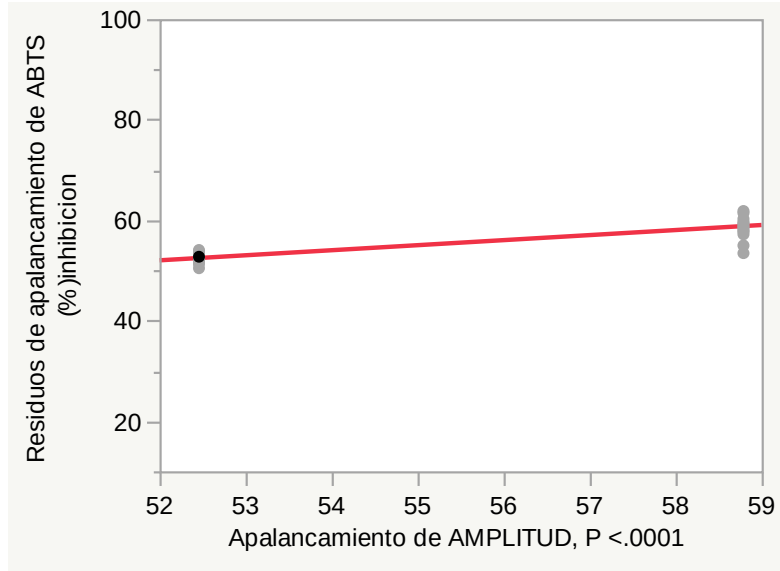


Figura 17. Respuesta ABTS (%) inhibición > LONGITUD.

De acuerdo con los resultados encontrados en la Figura 17 para el ensayo ABTS se observó que la amplitud de onda sónica muestra diferencias significativas con un valor de $p < .0001$, se realizó prueba de t de las diferencias de mínimos cuadrados, donde se reportó que ambos niveles son significativamente distintos una $\alpha=0.05$, A30 con una media de inhibición 58.7%, A50 una media de inhibición 52.45%

TIEMPO

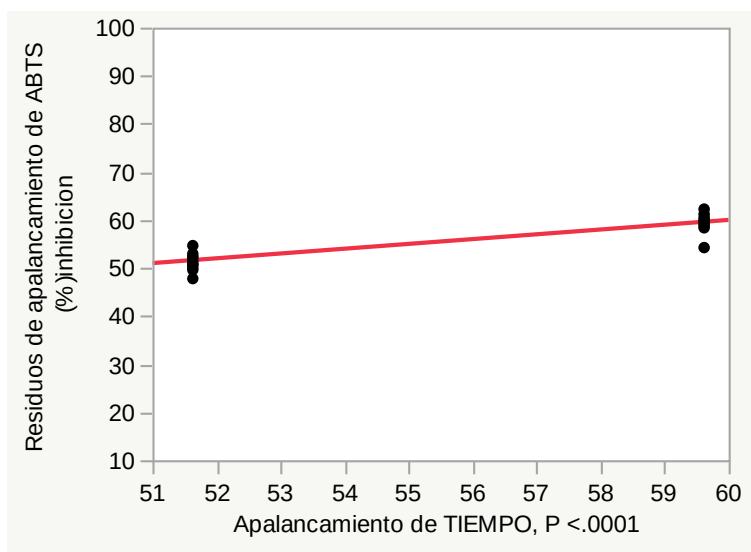


Figura 18. Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 18, se observó que la variable tiempo, también es un factor relevante, para mejorar el porcentaje de inhibición del radical ABTS, se presentaron diferencias entre medias de ambos grupos con un 59.61% para T2(20 minutos) y 51.62% T1 (10 min) siendo significativamente distintos.

TEMPERATURA

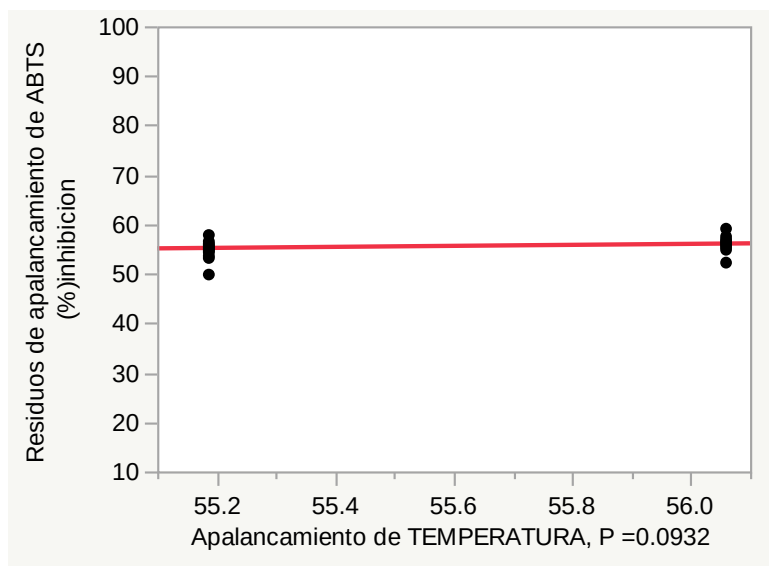


Figura 19. Respuesta ABTS (%) inhibición > TEMPERATURA.

En la Figura 19 se observa que la variable temperatura no se considera un factor relevante para la eficiencia del porcentaje de inhibición del radical ABTS con un valor de $P=0.00932$, ambos niveles de temperatura (T1, T2) presentan medias de inhibición similares un 55.18% inhibición para T30, 56.05% para T50.

DILUCIÓN

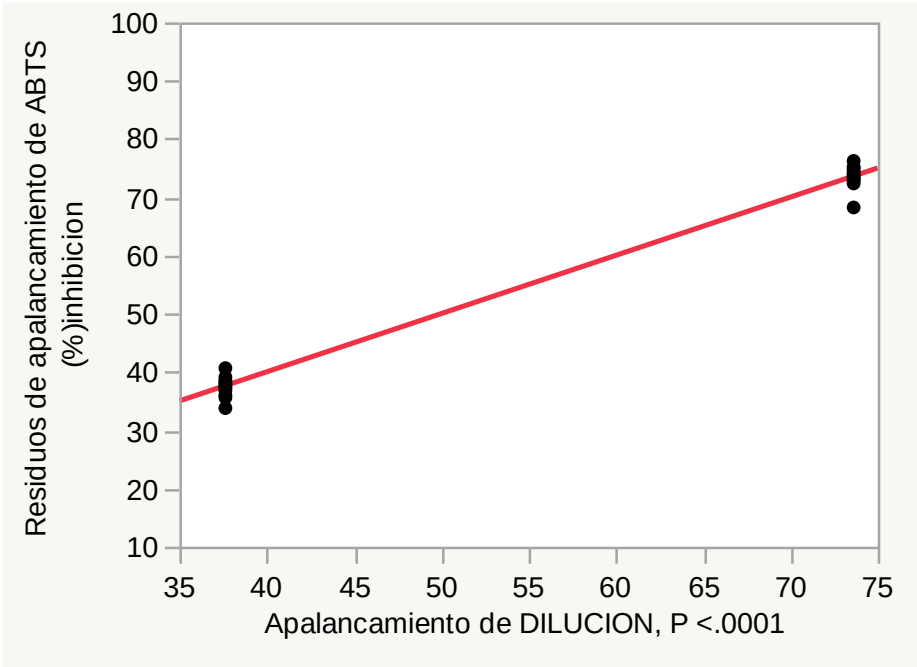


Figura 20. Respuesta ABTS (%) inhibición >DILUCIÓN.

En la Figura 20 se muestra que la variable dilución representa un resultado altamente significativo con un valor $P < 0.0001$, siendo la D50 la dilución con mayor actividad antioxidante con una media de porcentaje de inhibición de 73% en comparación a la D100 con un porcentaje de inhibición promedio de 37.63%. Según los datos observados, las demás variables, no influyen significativamente en la actividad antioxidante del extracto.

ANÁLISIS DE EFECTOS E INTERACCIONES

Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA

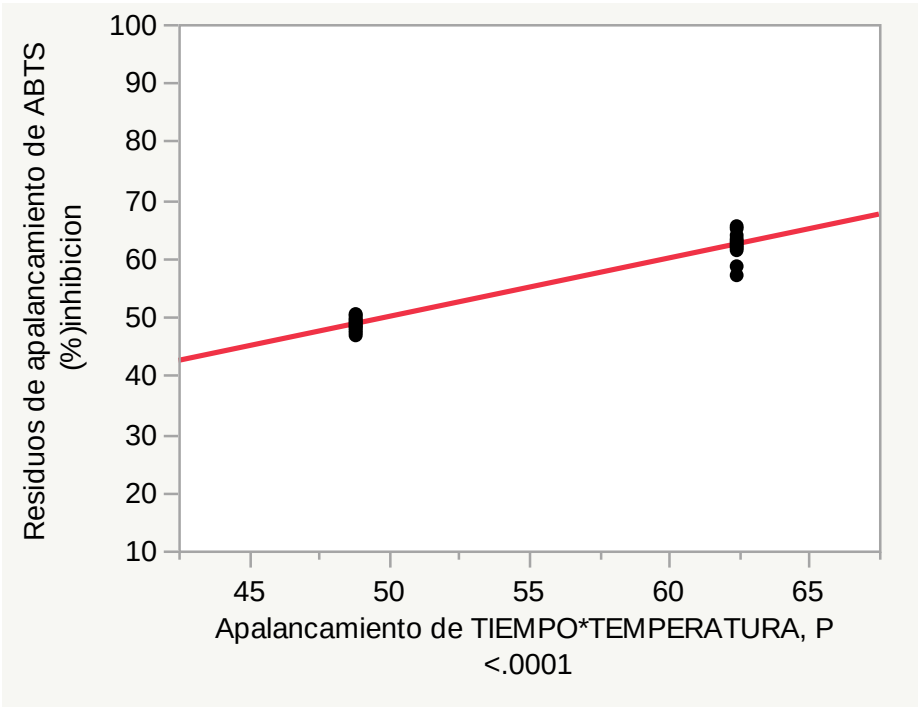


Figura 21. Respuesta ABTS de acuerdo al tiempo, temperatura.

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T2, T30	A				65.97
T1, T50		B			58.86
T2, T50			C		53.25
T1, T30				D	44.39

Tabla 35. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 21 se muestra que la interacción dada entre tiempo y temperatura se considera muy significativa un valor $P<.0001$. Además, en la Tabla 35 se observó que el nivel A conformado por la combinación entre T2 (20 min) y T30 (30 °C) tiene un mayor porcentaje de inhibición de 65.97%; en contraste a los demás resultados donde la temperatura de 50 °C tiende a tener un mejor desempeño.

Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO*AMPLITUD.

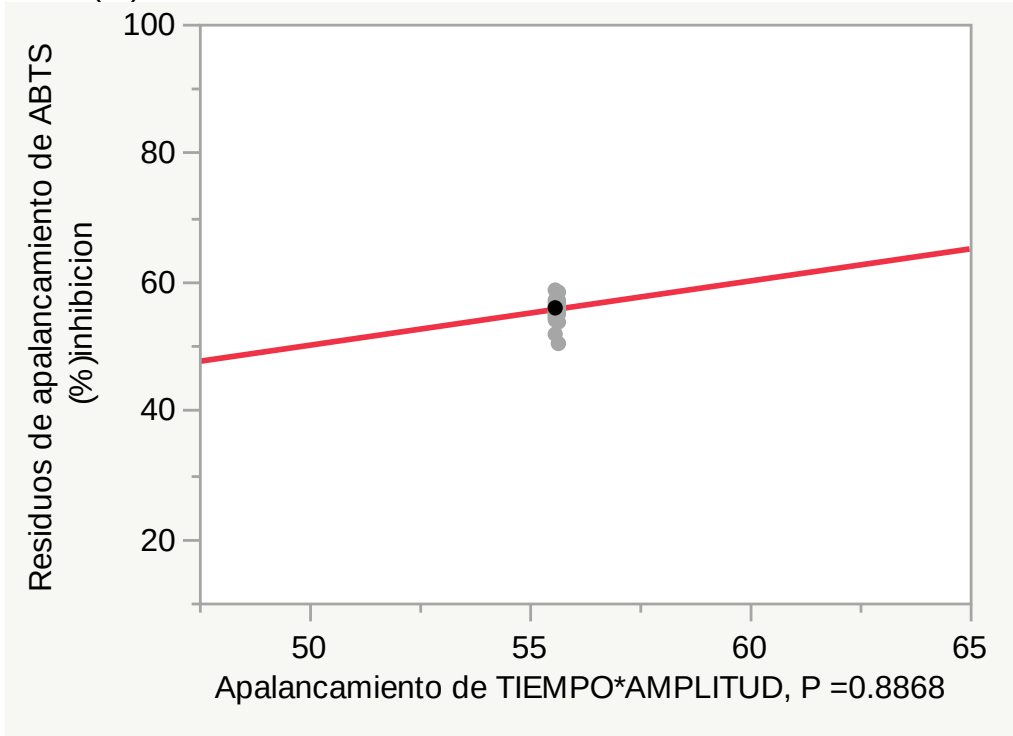


Figura 22. Respuesta ABTS de acuerdo a la interacción tiempo y longitud.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T2, A30	A			62.81
T2, A50		B		56.41
T1, A30		B		54.75
T1, A50			C	48.50

Tabla 35. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En relación a la interacción entre tiempo y longitud de onda sónica, que, de acuerdo a los resultados encontrados, esta interacción no es significativa desde la perspectiva general, sin embargo, al realizar la prueba potshoc, se puede notar diferencias significativas entre los diferentes niveles, siendo la interacción entre T2 (20 min) y A30 (30% amplitud) la que mejor porcentaje de inhibición del radical ABTS presenta.

Respuesta ABTS (%) inhibición > TEMPERATURA*AMPLITUD

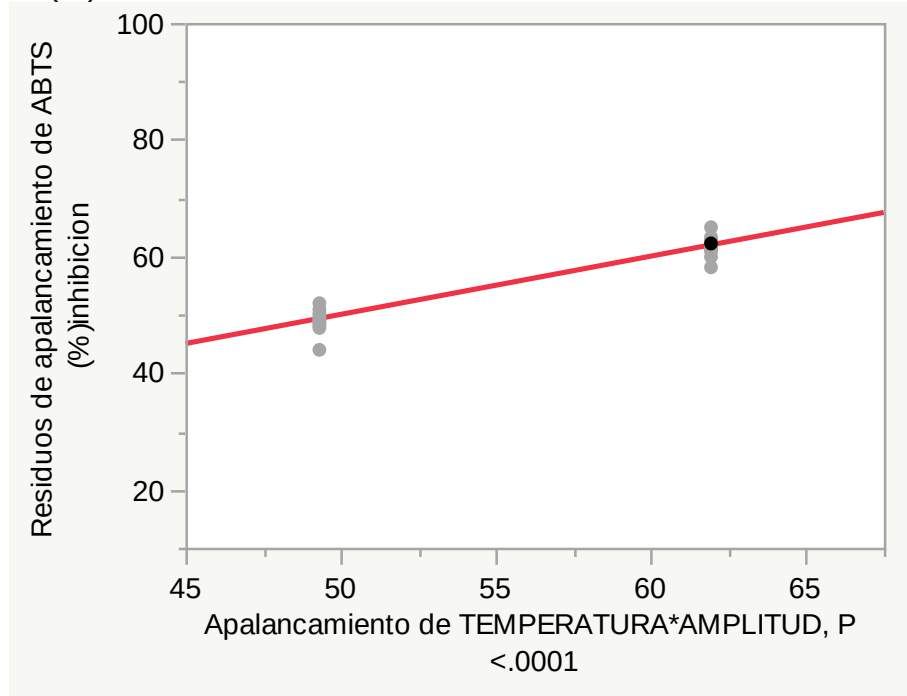


Figura 23. Respuesta de inhibición de acuerdo a la interacción temperatura y amplitud.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T50, A30	A			65.53
T30, A50		B		58.33
T30, A30			C	52.04
T50, A50			D	46.58

Tabla 36. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 23 se muestra que la interacción dada entre la temperatura y la amplitud de onda es muy significativa presentando un valor $P < .0001$. Por otro lado, en la Tabla 36 se observó que la combinación entre la T50 (50 °C) y A30 (30%amplitud) reporta un mayor porcentaje de inhibición comparado con los demás niveles (interacciones).

Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO*DILUCION

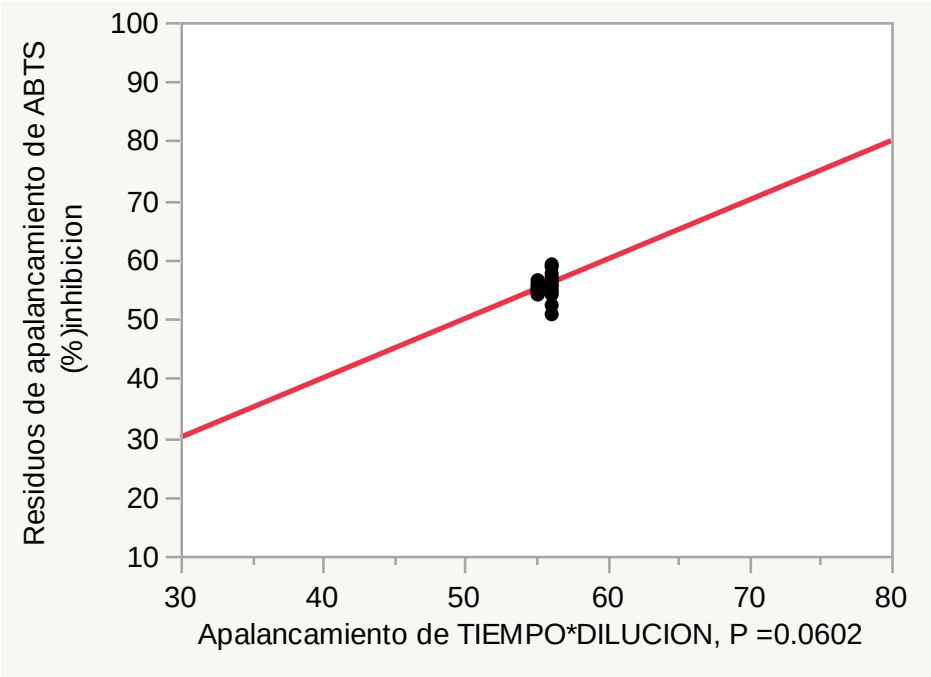


Figura 24. Respuesta (%) inhibición de acuerdo a la interacción tiempo y dilución.

Nivel v				Media de mínimos cuadrados
T2, D50	A			78.10
T1, D50		B		69.13
T2, D100			C	41.13
T1, D100			D	34.12

Tabla 37. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 24 se muestra que no existe significancia entre la interacción tiempo y dilución, con una $P=0.0602$, por otro lado aunque la mayoría de los datos tiene un comportamiento parecido al realizarse la prueba posthoc mostrada en la Tabla 37, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes niveles, Siendo el de mayor eficiencia de extracción la combinación entre T2(20minutos) y D50(1g/50mL) nivel A, con un rendimiento 43.972% mayor al del nivel D, correspondiente a la interacción entre T1 (10 min) y D100 (1g/100mL).

Respuesta ABTS (%) inhibición > TEMPERATURA*DILUCION

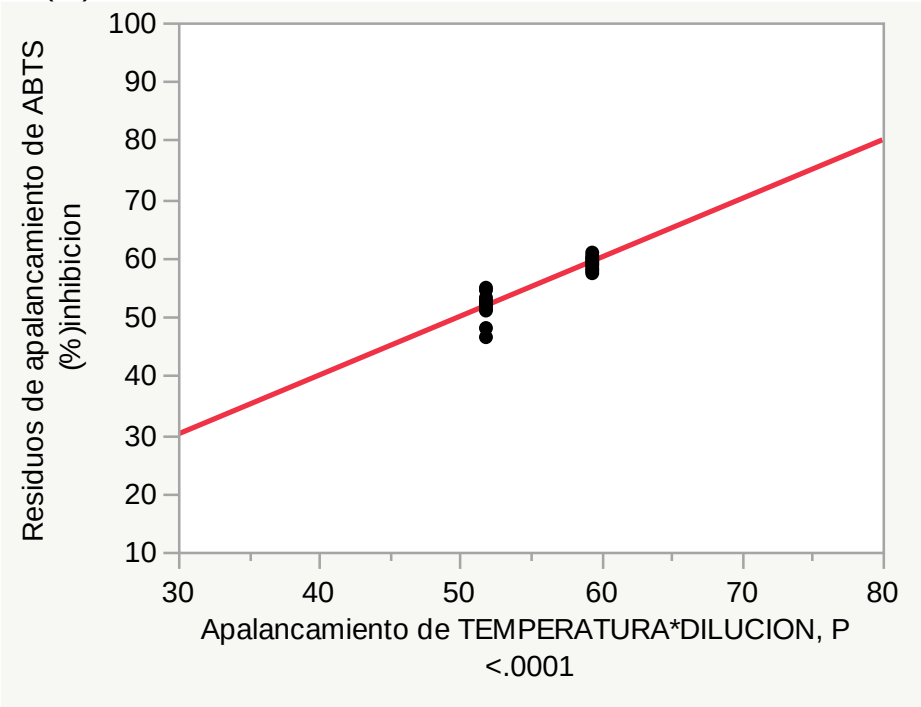


Figura 26. Respuesta (%) inhibición ABTS de acuerdo a la interacción temperatura y dilución.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T50, D50	A			77.82
T30, D50		B		69.40
T30, D100			C	40.96
T50, D100			D	34.29

Tabla 38. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la Figura 26, para la interacción entre la temperatura y dilución se observó una relación significativa con una $P<.0001$, donde se notó que, de las combinaciones presentadas entre T50 (50 °C) y D50 (1g/50mL) presentan una mayor eficacia presenta para la inhibición del radical ABTS, en comparación a los demás niveles mostrados en la tabla 38, aunque también se evidencia que la D50 es una variable muy importante que está asociada a un mayor poder de inhibición.

Respuesta ABTS (%) inhibición > AMPLITUD*DILUCION

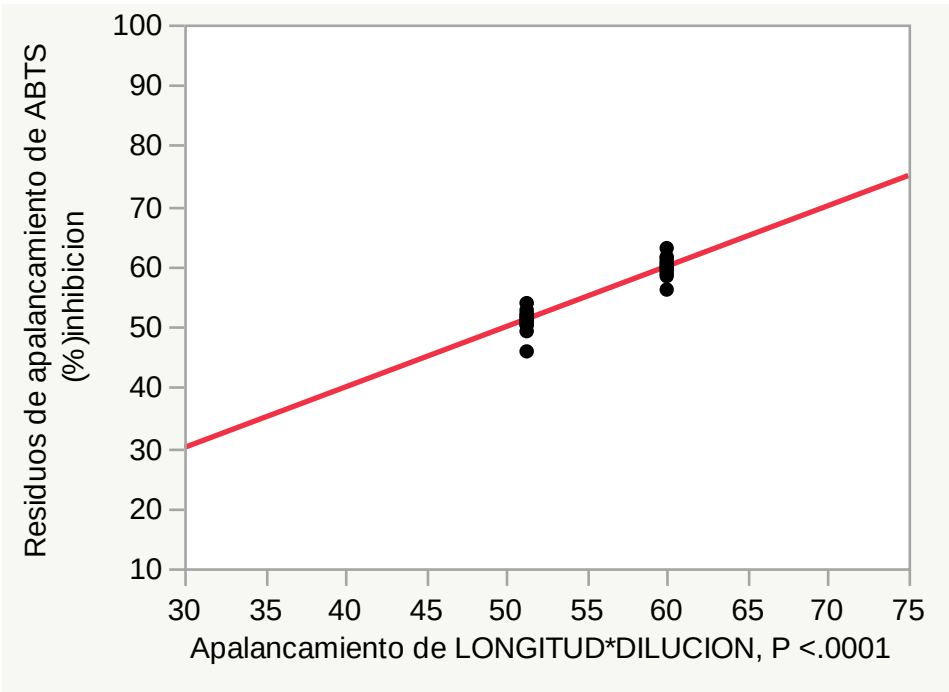


Figura 27. Respuesta (%) ABTS de acuerdo a la interacción longitud y dilución.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
A50, D50	A			74.79
A30, D50		B		72.43
A30, D100			C	45.14
A50, D100			D	30.11

Tabla 39. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 27 se muestra una diferencia muy significativa entre la interacción dada por amplitud y dilución, presentando un valor $P < .0001$. De acuerdo a los resultados encontrados en la prueba posthoc mostrada en la Tabla 39, se puede notar que hay diferencias significativas para todos los niveles de combinación, siendo los de mayor eficiencia los niveles A, B ambos con D50(1g/50mL) y con amplitudes dentro del grupo A50 y A30; lo que indica, que la dilución es clave en el proceso de inhibición en comparación a la amplitud de onda.

ANÁLISIS DE INTERACCIÓN CON 3 VARIABLES

Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA*AMPLITUD

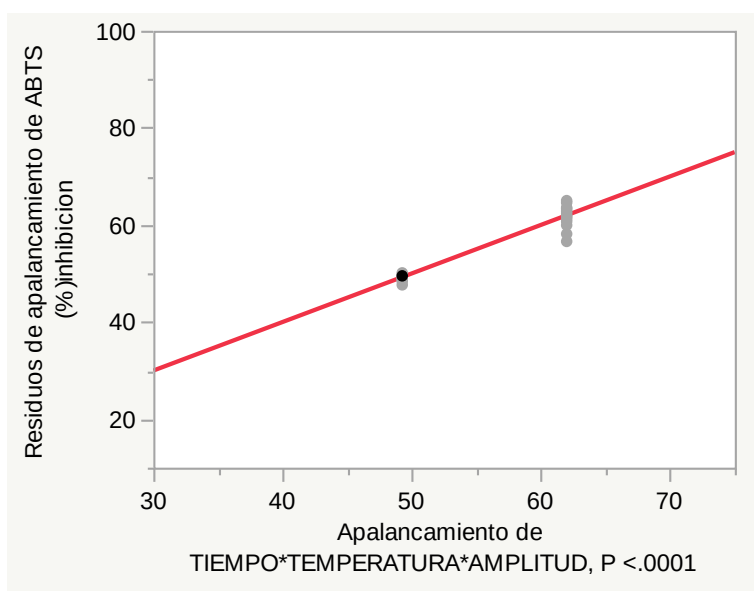


Figura 28. Respuesta (%) inhibición ABTS de acuerdo a la interacción tiempo, temperatura y Longitud.

Nivel								Media de mínimos cuadrados
T1, T50, A30	A							74.66
T2, T30, A30		B						69.23
T2, T30, A50			C					62.72
T2, T50, A30				D				56.40
T1, T30, A50				D				53.93
T2, T50, A50					E			50.10
T1, T50, A50						F		43.06
T1, T30, A30							G	34.85

Tabla 39. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la interacción observada de las variables tiempo, temperatura y dilución (Figura 28) se notó que existió una alta significancia entre dichos factores, reportando un valor $P < .0001$; en la Tabla 39 se notó que existió una gran diferencia entre cada una de las medias de todos los niveles, siendo los niveles A,B los que se asociaron a un mayor rendimiento de extracción, ambos niveles presentan un 30% amplitud de onda, sin embargo, para el nivel A se caracterizó por un tiempo corto (10 min) con una temperatura mayor (50 °C) y para el nivel B un tiempo mayor de (20 min) con una temperatura menor (30 °C) ambas combinaciones se asocian a las de mayor potencial de inhibición del radical ABTS

Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCIÓN

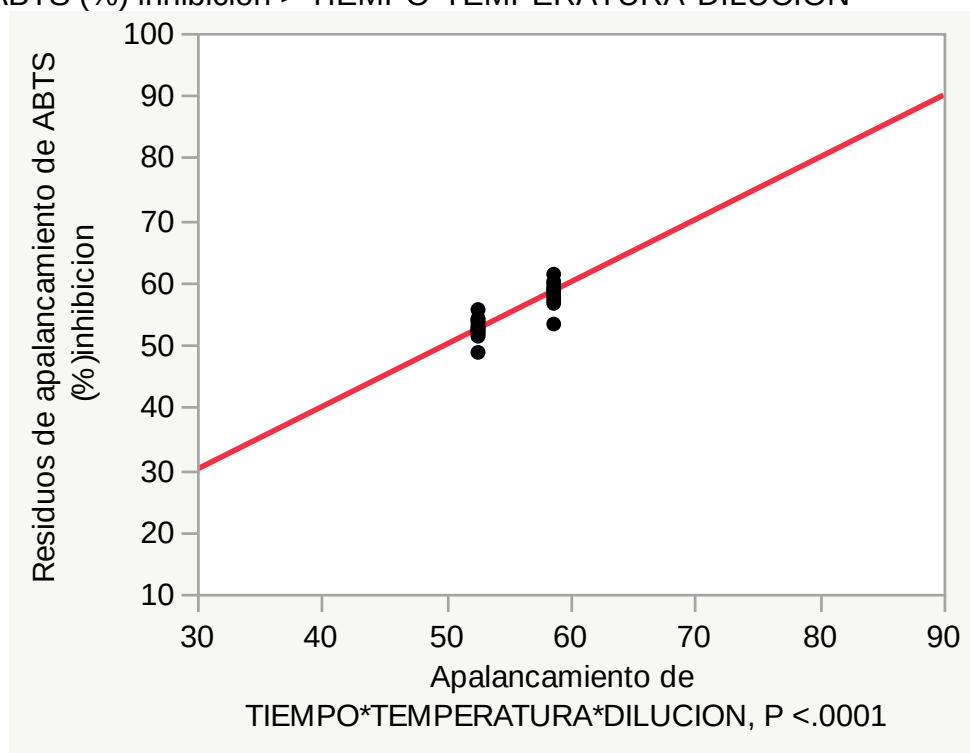


Figura 29. Respuesta (%) inhibición ABTS de acuerdo a la interacción entre tiempo, temperatura y dilución.

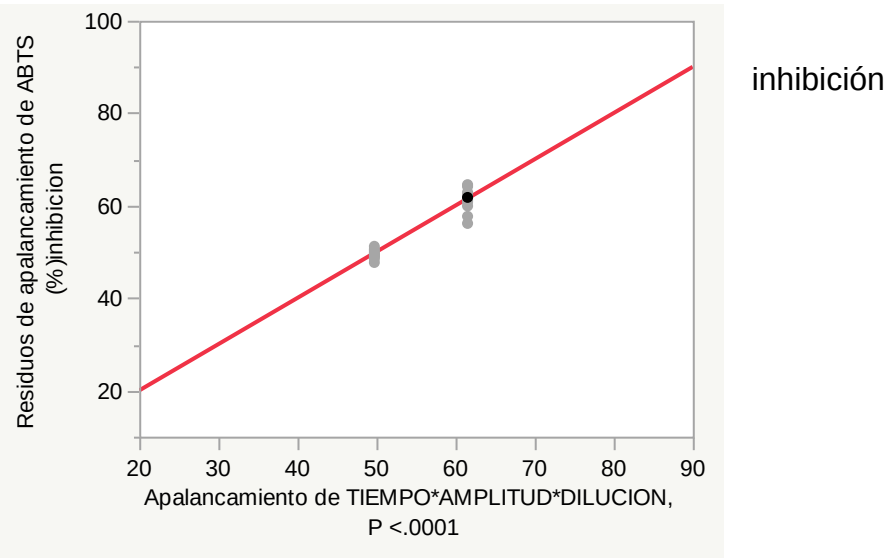
Nivel						Media de mínimos cuadrados
T2, T30, D50	A					83.73
T1, T50, D50	A					83.17
T2, T50, D50		B				72.46
T1, T30, D50			C			55.08
T2, T30, D100				D		48.22
T1, T50, D100					E	34.55
T2, T50, D100					E	34.04
T1, T30, D100					E	33.70

Tabla 40. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 29 se notó que la interacción dada entre el tiempo, temperatura, y dilución, muestra una alta significancia, reportando una $P < .0001$. En la Tabla 40 se encuentran diferencias significativas en todos los niveles de combinación de las variables, y se observó que existen 2 combinaciones con mayor eficacia para inhibición del radical ABTS, destaca la D50, como la dilución efectiva en comparación a la D100.

Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO*AMPLITUD*DILUCIÓN

Figura 30. Respuesta (%) ABTS de acuerdo a la interacción tiempo, longitud y dilución.



Nivel								Media de mínimos cuadrados
T2, A30, D50	A							82.85
T1, A50, D50		B						76.24
T2, A50, D50		B						73.34
T1, A30, D50			C					62.01
T1, A30, D100				D				47.50
T2, A30, D100					E			42.78
T2, A50, D100						F		39.48
T1, A50, D100							G	20.75

Tabla 41. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 30 se observa una alta significancia $P < .0001$, del efecto que ejerce la interacción entre tiempo, amplitud y dilución, además de acuerdo a la Tabla 41, se observa que el nivel A presenta una mayor inhibición del radical ABTS (82.85%), seguido del nivel B (76.24%) ambos niveles se consideran las mejores combinaciones en comparación a los demás niveles que disminuyen menos de un 50% el radical ABTS. Nuevamente destaca la D50 como la mejor dilución, también se nota que los tratamientos en los cuales la temperatura es más alta, la amplitud de onda 30% en este caso, es suficiente para tener una buena inhibición del radical.

Respuesta ABTS (%) inhibición > TEMPERATURA*AMPLITUD*DILUCIÓN

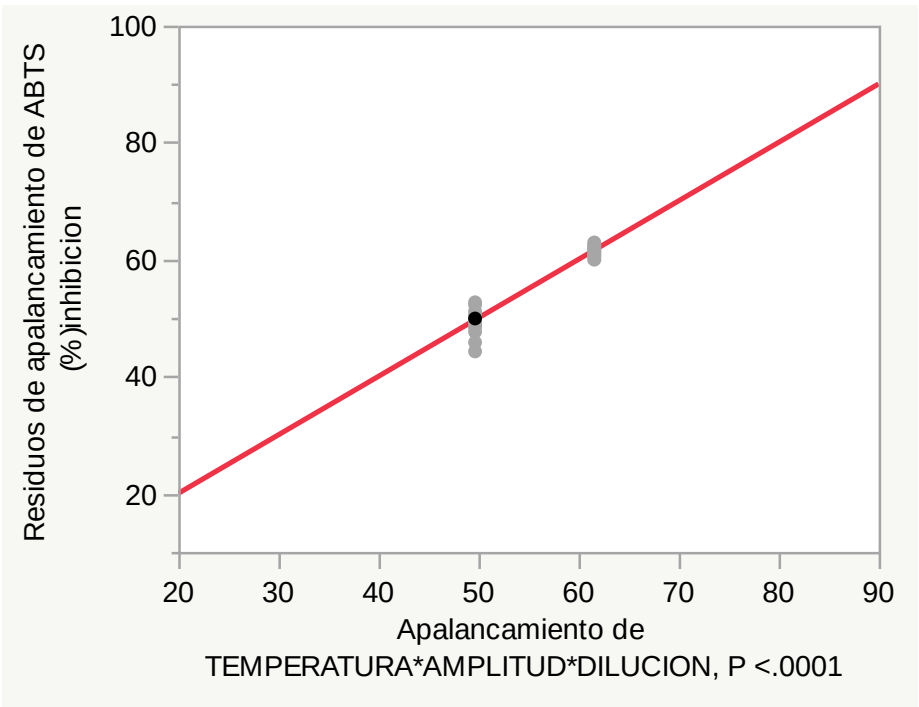


Figura 31. Resultado (%) inhibición de acuerdo a la interacción entre temperatura, amplitud y dilución.

Nivel									Media de mínimos cuadrados
T50, A30, D50	A								88.90
T30, A50, D50		B							82.86
T50, A50, D50			C						66.73
T30, A30, D50				D					55.95
T30, A30, D100					E				48.12
T50, A30, D100						F			42.16
T30, A50, D100							G		33.80
T50, A50, D100								H	26.43

Tabla 42. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 31 se observa la respuesta dada por la interacción entre temperatura, amplitud y dilución es altamente significativa, presentando un valor $P < .0001$, de acuerdo a lo reportado por la prueba posthoc (Tabla 42), se observó que todas las medias de los niveles son diferentes. Por otro lado, también se notó que los niveles de mayor extracción nuevamente corresponden a aquellos con una menor dilución (D50), y se observó que cuando la temperatura es mayor la longitud de onda debe ser menor y es adecuada para tener un buen rendimiento en la inhibición del radical ABTS.

Análisis de efector e interacción entre las 4 variables de interés.

Respuesta ABTS (%) inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA*AMPLITUD*DILUCIÓN

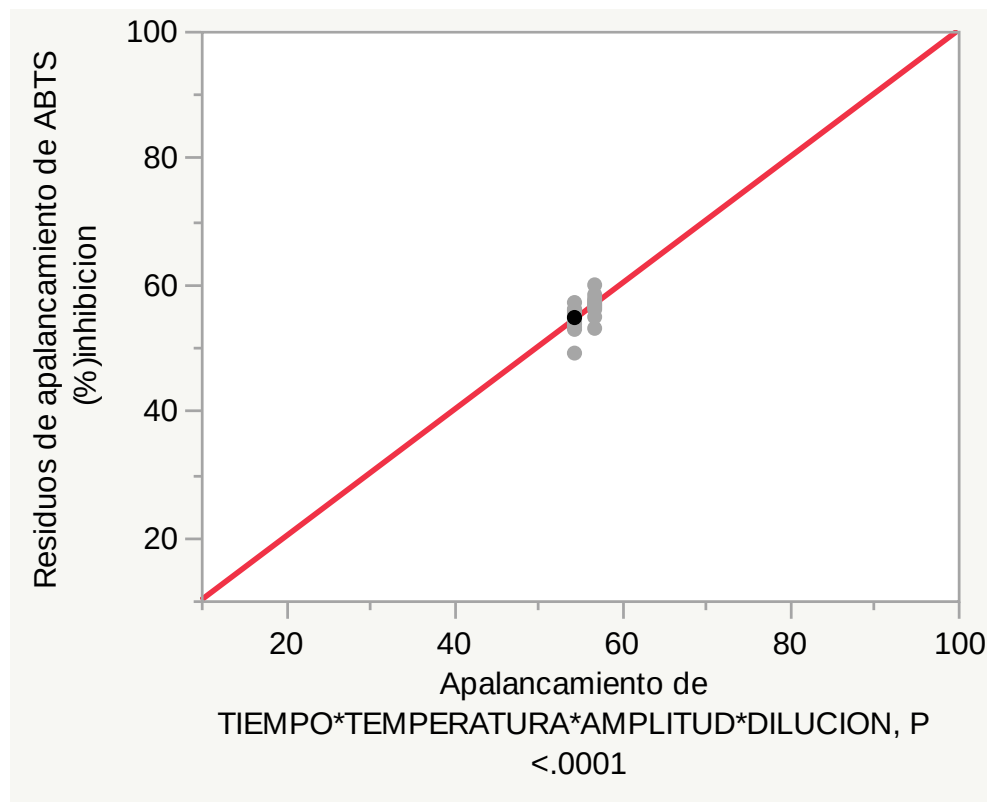


Figura 32. Respuesta (%) ABTS de acuerdo a la interacción entre tiempo, temperatura y dilución.

Nivel									Media de mínimos cuadrados
T1, T50, A30, D50	A								93.49
T2, T30, A50, D50		B							86.07
T2, T50, A30, D50		B	C						84.32
T2, T30, A30, D50		B	C						81.38
T1, T30, A50, D50			C						79.64
T1, T50, A50, D50				D					72.85
T2, T50, A50, D50					E				60.61
T2, T30, A30, D100					E				57.07
T1, T50, A30, D100					E				55.83
T2, T50, A50, D100						F			39.59
T2, T30, A50, D100						F			39.36
T1, T30, A30, D100						F			39.17
T1, T30, A30, D50							G		30.53
T2, T50, A30, D100							G		28.49
T1, T30, A50, D100							G		28.23
T1, T50, A50, D100								H	13.26

Tabla 43. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 32 se observó que la interacción de las 4 variables, tiempo, temperatura, amplitud de onda sónica y dilución es altamente significativa, se muestra que de las diferentes combinaciones mostradas en la Tabla 43, el nivel A se asocia a una mayor inhibición del radical ABTS, y este se caracteriza por las condiciones siguientes, T1 (10 min), T50 (50°C), L30 (30% amplitud), D50(1g/50mL), llegando a inhibir hasta un 93.49% el radical. Por otro lado, se evidencia que las combinaciones asociadas a una dilución mayor, D100 (1g/100mL) tienen un menor potencial inhibitorio.

7.2.5 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES DPPH

Los resultados obtenidos se muestran como porcentaje de inhibición, se procesó la matriz de datos del total de tratamientos, encontrándose los siguientes resultados.

Respuesta DPPH (%) inhibición > Modelo completo

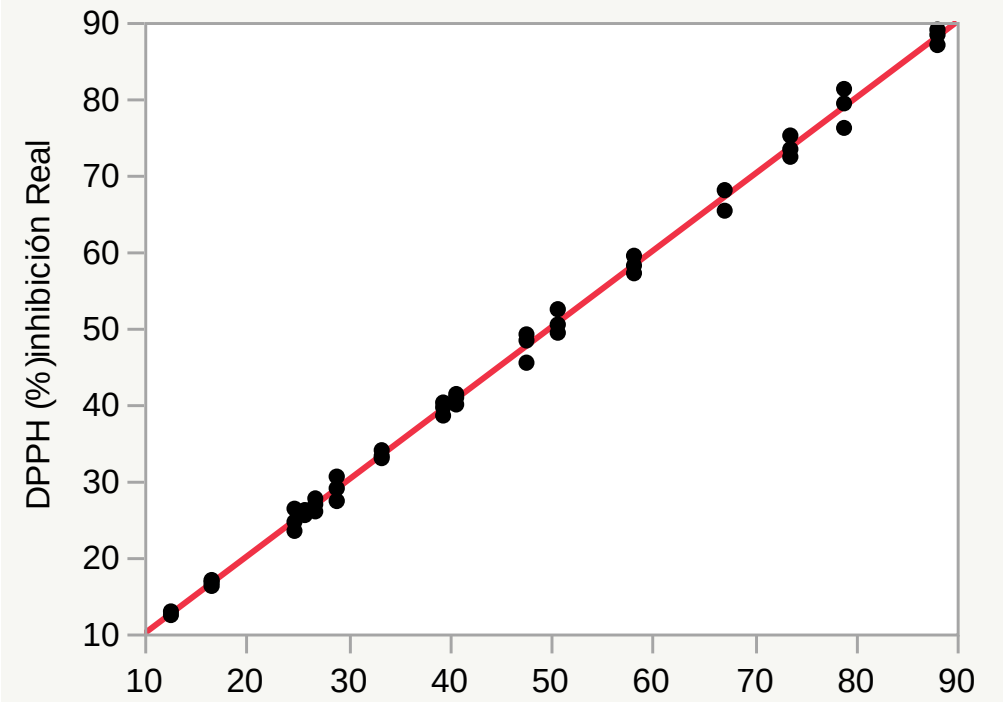


Figura 33. Respuesta (%) inhibición DPPH modelo completo.

R cuadrado	0.997731
R cuadrado ajustado	0.996667
Raíz del error cuadrático medio	1.300181
Media de respuesta	44.59902
Observaciones (o suma de pesos)	48

Tabla 44. Resumen de ajuste.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	15	23782.438	1585.50	937.9017
Error	32	54.095	1.69	Prob > F
C. Total	47	23836.533		<.0001*

Tabla 45. Análisis de varianza.

De acuerdo con la Figura 33 es notable que las variables implicadas tienen un efecto importante en torno al porcentaje de inhibición del radical DPPH se reporta una significancia de <.0001, además de acuerdo a la Tabla 44, este modelo puede explicar un 99.77% del comportamiento de los datos, por lo cual los resultados obtenidos son altamente confiables.

En la Tabla 46, se muestra el resumen de todos los efectos y las combinaciones, reportando su nivel de significancia.

Fuente	N PAR	GL	SC	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	215.414	127.4283	<.0001*
TEMP	1	1	287.756	170.2226	<.0001*
TIEM*TEMP	1	1	1567.465	927.2352	<.0001*
AMPLITUD	1	1	54.967	32.5159	<.0001*
TIEM*AMPL	1	1	240.128	142.0478	<.0001*
TEMP*AMPL	1	1	874.130	517.0922	<.0001*
TIEM*TEMP*AMPL	1	1	2737.029	1619.092	<.0001*
DILUCIÓN	1	1	10127.789	5991.104	<.0001*
TIEM*DILU	1	1	345.474	204.3657	<.0001*
TEMP*DILU	1	1	131.274	77.6552	<.0001*
TIEMPO*TEMP*DILU	1	1	722.409	427.3420	<.0001*
AMPL*DILU	1	1	4133.207	2445.002	<.0001*
TIEMPO*AMPL*DILU	1	1	131.814	77.9747	<.0001*
TEMP*AMPL*DILU	1	1	2103.990	1244.618	<.0001*
TIEM*TEMP*AMPL*DILU	1	1	109.592	64.8293	<.0001*

Tabla 46. Resumen de efectos e interacciones del modelo completo.

A continuación, se muestra cada uno de las variables y su nivel de significancia.

TIEMPO

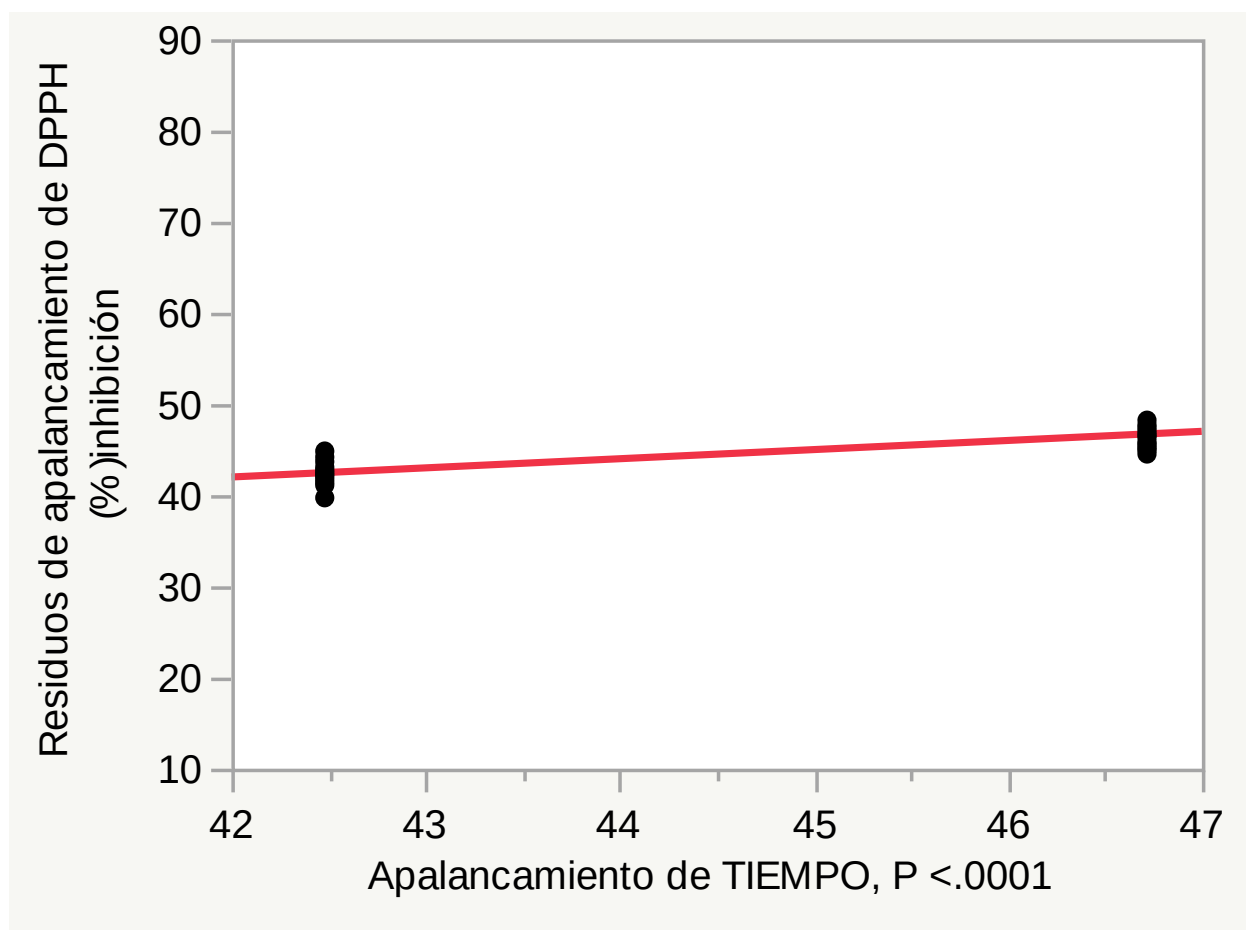


Figura 34. Respuesta DPPH (%) inhibición > TIEMPO.

De acuerdo con la Figura 34 se observa que el tiempo es una variable altamente significativa, presentando un valor de $P < .0001$, ambas medias son diferentes, presentando T1 (10 min) un 46.71% de inhibición del radical DPPH, y T2 (20 min) con una media de inhibición de 42%.

TEMPERATURA

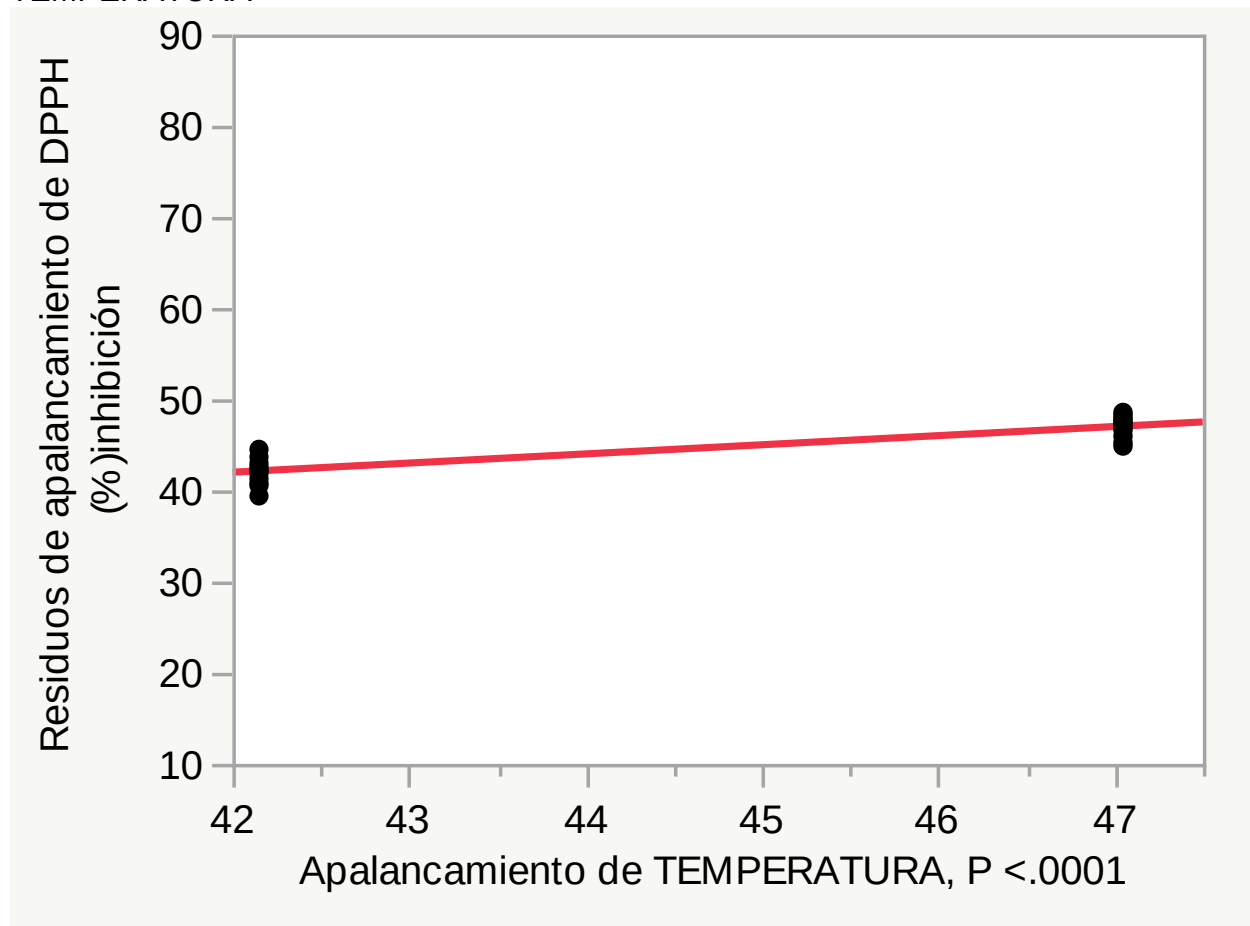


Figura 35. Respuesta DPPH (%) inhibición > TEMPERATURA.

En la Figura 35 se puede apreciar que la variable temperatura, también presenta una alta significancia, ambas medias se reportan diferentes, 42.15% para T30 (30 °C) y 47.04% para T50 (50 °C), se observa que, a mayor temperatura de extracción, favorece un mayor potencial de inhibición.

AMPLITUD DE ONDA SÓNICA

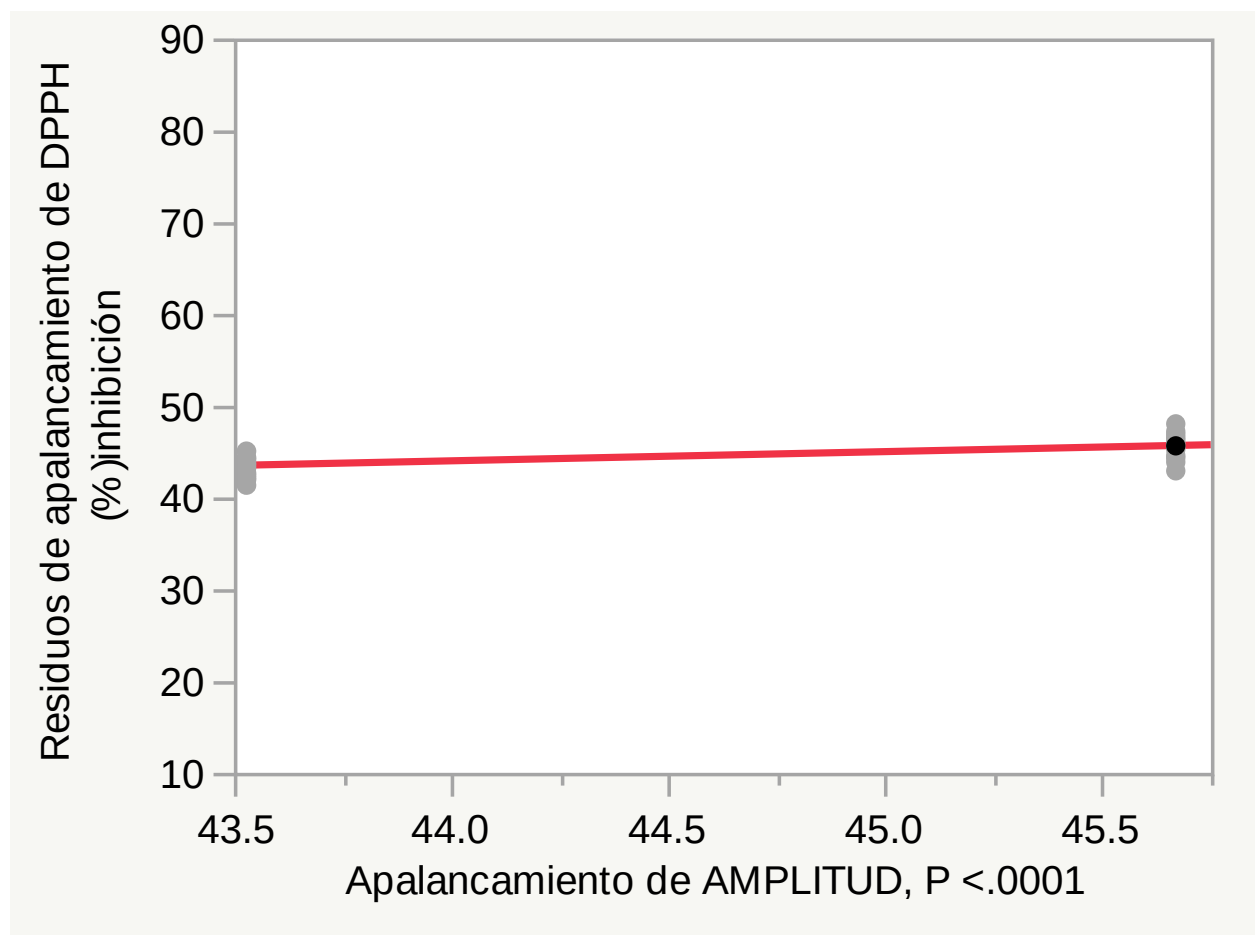


Figura 36. Respuesta DPPH (%) inhibición > AMPLITUD.

De acuerdo a los resultados encontrados en la Figura 36, existen diferencias significativas de acuerdo a los dos niveles de amplitud de onda, L30 (30% amplitud), con un porcentaje de inhibición del radical de 43.52% y A50 (50% amplitud) con un porcentaje de inhibición de 45.6%. Por otro lado, también se puede notar, que, de acuerdo al resumen de efectos, la amplitud por si sola, es el factor con menos significancia para favorecer la actividad antioxidante del extracto e inhibir el radical.

DILUCIÓN

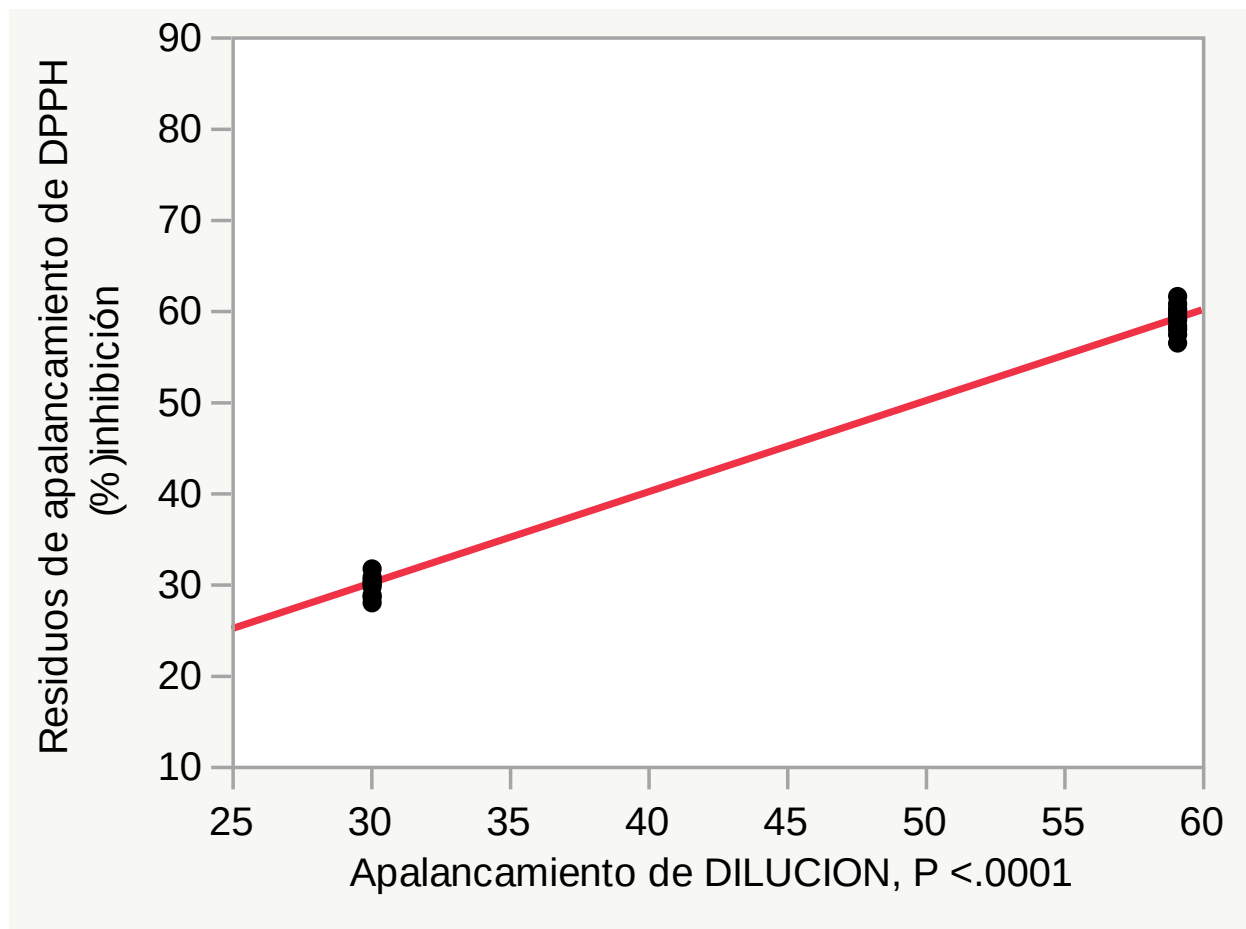


Figura 37. Respuesta DPPH (%)inhibición > DILUCION.

De acuerdo a la Figura 37 y en concordancia con la Tabla 46, de las cuatro variables reportadas, la dilución es la variable que mas influencia tiene en la actividad antioxidante del extracto para inhibir el radical DPPH, por otro lado en la gráfica se muestra que ambas diluciones tienen medias diferentes, presentando un valor $P < .0001$ de significancia, favoreciendo un mayor efecto Inhibidor la D50 (1g/50mL).

ANÁLISIS DE EFECTOS E INTERACCIONES ENTRE 2 VARIABLES

Respuesta DPPH (%)inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA

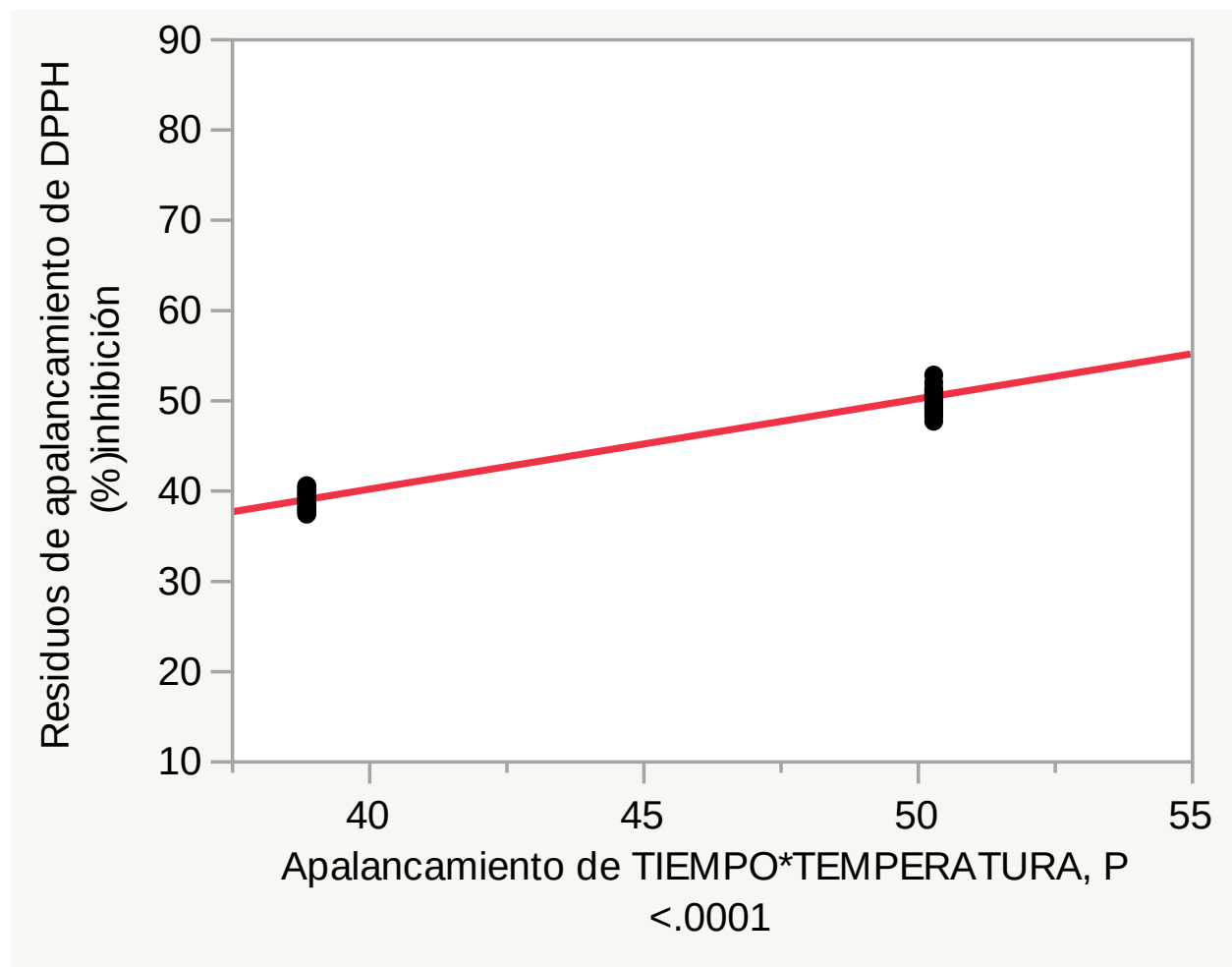


Figura 39. Respuesta (%) inhibición DPPH entre la interacción tiempo y temperatura.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T1, T50	A			54.88
T2, T30		B		45.74
T2, T50			C	39.21
T1, T30			C	38.55

Tabla 47. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo con la Figura 39, la interacción dada entre el tiempo y la temperatura es altamente significativa, con un valor $P < 0.0001$, basado en las combinaciones mostradas en la Tabla 47, el nivel A, corresponde a la mejor combinación, con un porcentaje de inhibición del 54.88%, por otro lado, el nivel B, se considera el segundo nivel con mayor porcentaje de inhibición, ambos se observan como las mejores combinaciones para favorecer la inhibición de radical DPPH.

Respuesta DPPH (%) inhibición > TIEMPO*AMPLITUD

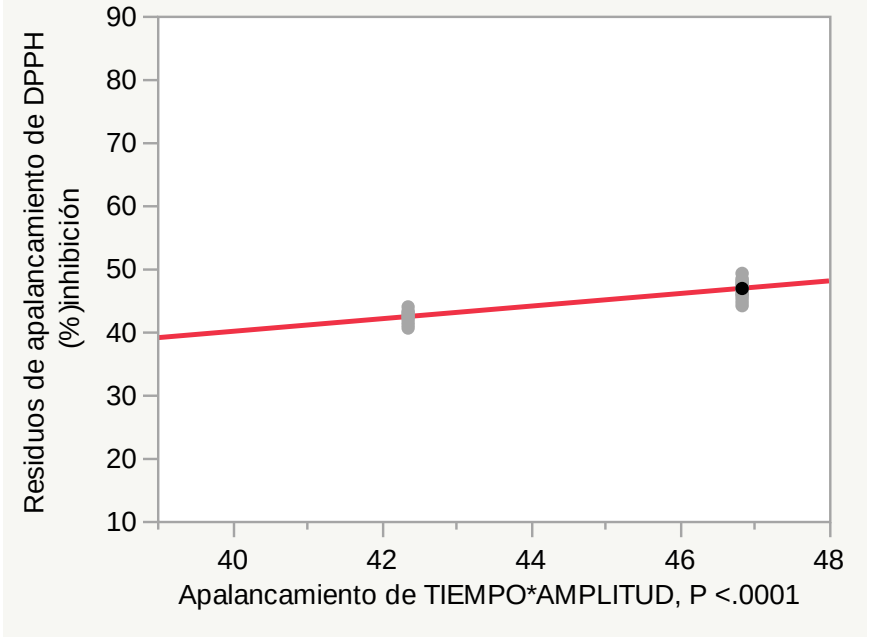


Figura 40. Respuesta (%) inhibición de acuerdo a la interacción tiempo y temperatura.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T1, A30	A			47.88
T2, A50		B		45.78
T1, A50		B		45.55
T2, A30			C	39.17

Tabla 48. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que la interacción entre tiempo y amplitud, son altamente significativas, presentando un valor $P < .0001$, además se muestra, que el nivel A, es el que se asocia a un mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH con un 47.88% de inhibición y se conforma por la interacción entre T1 (10 min) a una A30 (30% amplitud).

Respuesta DPPH (%)inhibición > TEMPERATURA*AMPLITUD

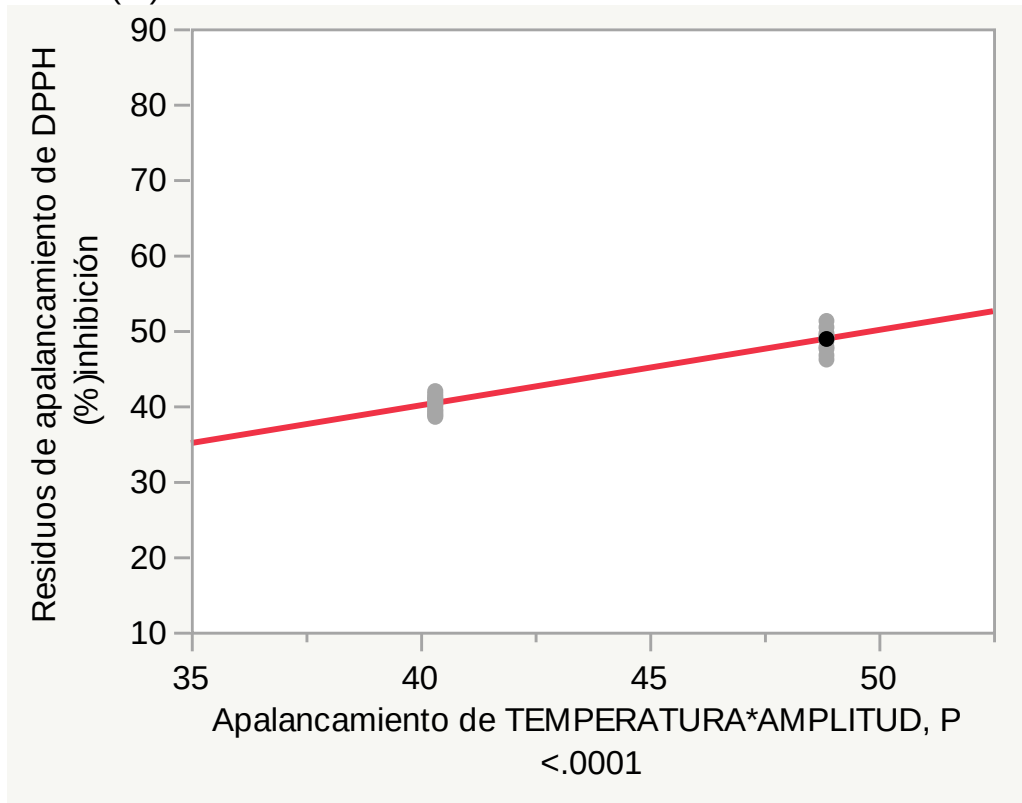


Figura 41. Respuesta (%) inhibición DPPH de acuerdo a la interacción temperatura y longitud.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T50, A30	A			50.24
T30, A50		B		47.48
T50, A50			C	43.85
T30, A30			D	36.81

Tabla 49. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la Figura 41, la interacción producida entre las variables temperatura y amplitud de onda, son altamente significativas, presentando un valor de $P < .0001$, además en la Tabla 49, se muestra que de acuerdo a la prueba posthoc, todas las medias de cada nivel de son diferentes. Por otro lado se observa que al combinar una temperatura mayor con una longitud de onda menor (Nivel A) hay un mayor porcentaje de inhibición del extracto.

Respuesta DPPH (%) inhibición > TIEMPO*DILUCION

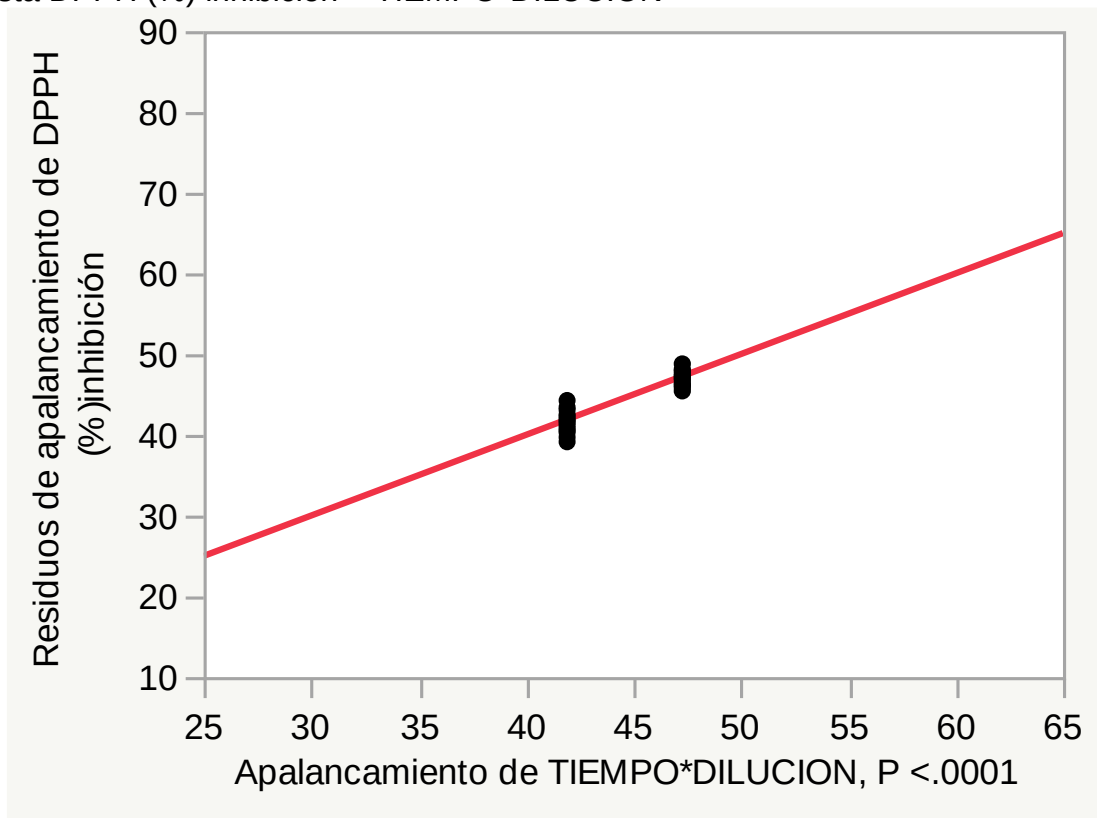


Figura 42. Respuesta (%) inhibición DPPH de acuerdo a la interacción tiempo y dilución.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T1, D50	A			63.92
T2, D50		B		54.32
T2, D100			C	30.63
T1, D100			C	29.50

Tabla 50. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la Figura 42 se muestra una diferencia significativa entre los diferentes niveles, presentando un valor de $P=0.0001$; de acuerdo a la prueba posthoc mostrada en la Tabla 50, se observó que los mejores niveles de potencial de inhibición son aquellos con una dilución menor (D50), en comparación a los niveles con mayor dilución.

Respuesta DPPH (%) inhibición > TEMPERATURA*DILUCION

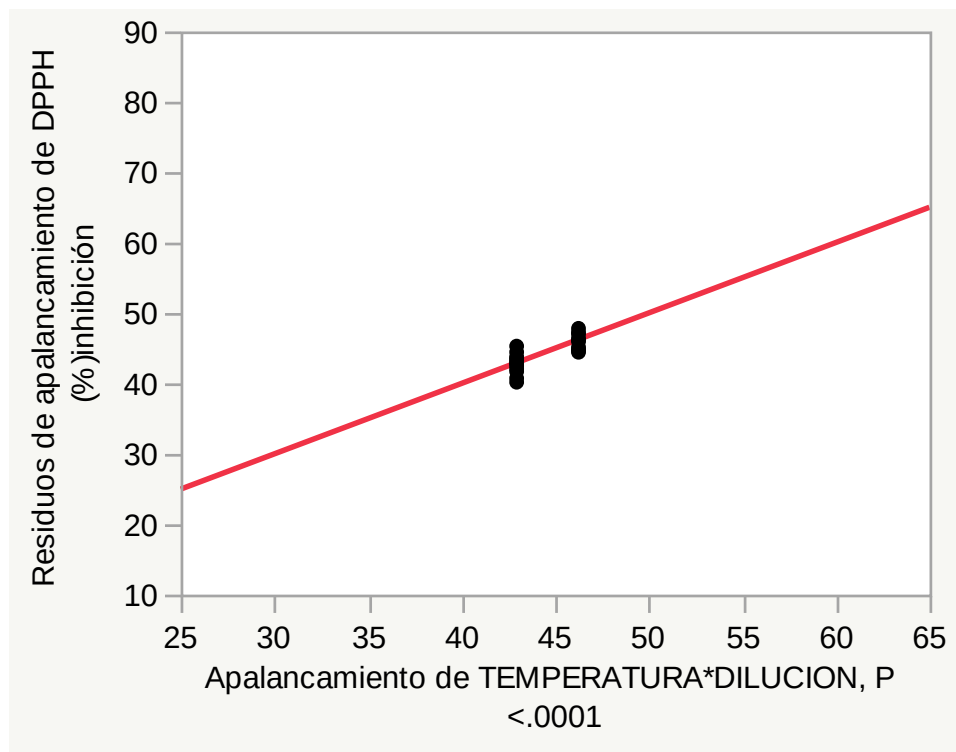


Figura 43. Resultado (%) inhibición DPPH de acuerdo a la interacción temperatura y dilución.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
T50, D50	A			63.22
T30, D50		B		55.02
T50, D100			C	30.86
T30, D100			D	29.27

Tabla 51. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la Figura 43, se observó que las combinaciones de mayor efectividad son aquellas con dilución menor (D50, 1g/50mL), rectificando la importancia de la dilución elegida

en un experimento de extracción, por otro lado, en la Tabla 51 se observó que aún cuando las medias entre niveles A,B son diferentes, ambas son adecuadas alternativas para utilizar, ya que son las que mejor desempeño obtuvieron, a dos tipos de temperaturas diferentes.

Respuesta DPPH (%) inhibición > AMPLITUD*DILUCION

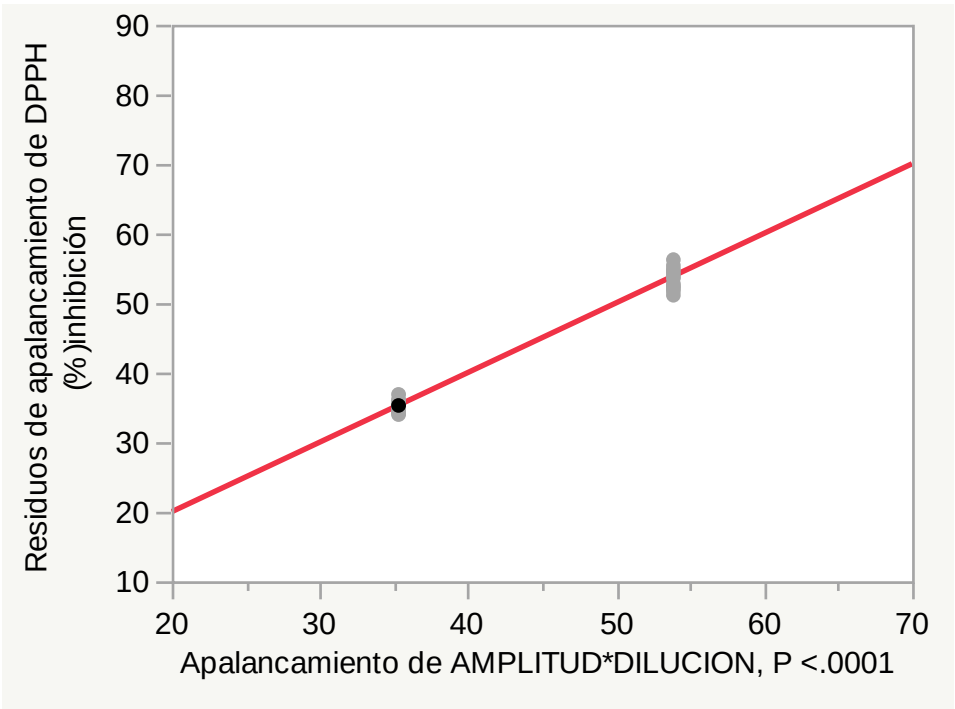


Figura 44. Respuesta (%) inhibición DPPH de acuerdo a la interacción entre amplitud y dilución.

Nivel					Media de mínimos cuadrados
A50, D50	A				69.47
A30, D50		B			48.77
A30, D100			C		38.28
A50, D100				D	21.86

Tabla 52. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la Figura 44, la interacción dada entre la amplitud y la dilución es altamente significativa, presentando un valor $P < .001$, por otro lado, en la Tabla 52 se notan diferencias significativas entre todos lo niveles, siendo los de mayor potencia de inhibición del radical, aquellos con menor dilución.

ANÁLISIS DE EFECTOS E INTERACCIONES ENTRE 3 VARIABLES.

DPPH (%) inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA*AMPLITUD

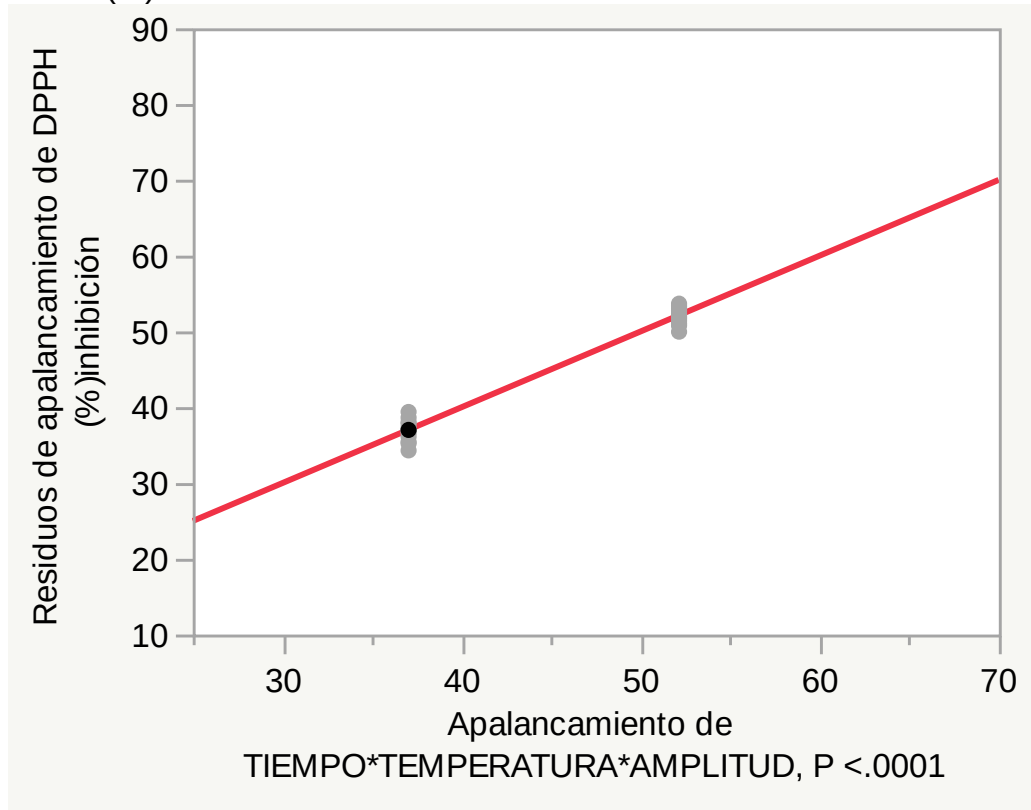


Figura 45. Resultados (%) inhibición de acuerdo a la interacción tiempo, temperatura y longitud.

Nivel						Media de mínimos cuadrados
T1, T50, A30	A					67.86
T1, T30, A50		B				49.20
T2, T50, A50			C			45.80
T2, T30, A50			C			45.76
T2, T30, A30			C			45.72
T1, T50, A50				D		41.89
T2, T50, A30					E	32.62

T1, T30, A30						F	27.90
--------------	--	--	--	--	--	---	-------

Tabla 53. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a los resultados de la Figura 45, se encuentra una alta significancia entre la interacción dada por el tiempo, temperatura y dilución, se reporta un valor de $P < .0001$, se realizó la prueba posthoc, de acuerdo a la Tabla 53, y con las diferentes combinaciones se presentan diferencias entre la mayoría de los niveles, siendo los de mayor eficiencia de extracción los niveles A,B, por lo cual se consideran 2 diferentes combinaciones con gran eficacia para inhibición del radical DPPH

Respuesta DPPH (%) inhibición > TIEMPO*AMPLITUD*DILUCIÓN

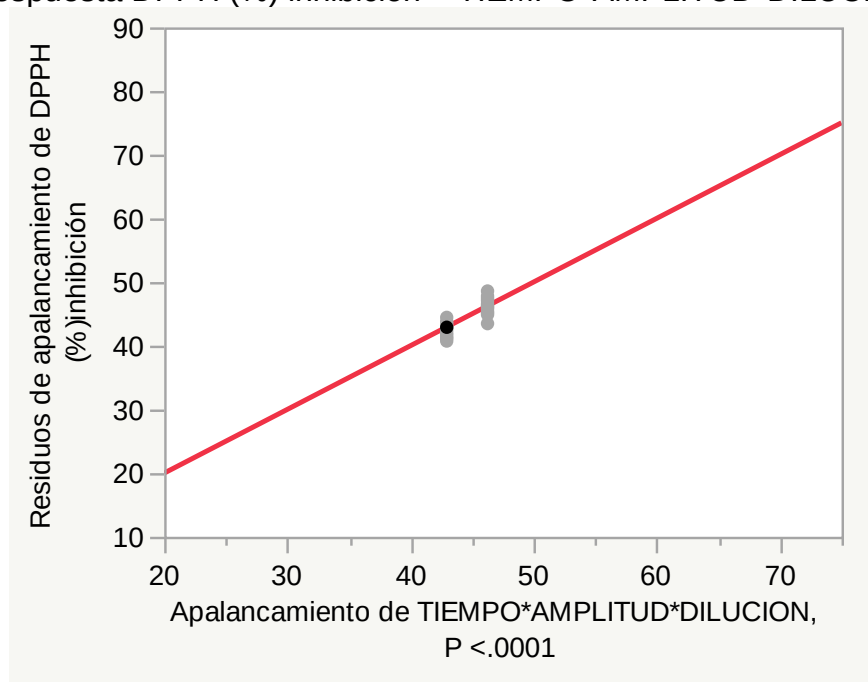


Figura 46. Resultados (%) inhibición DPPH de acuerdo a la interacción tiempo, longitud y dilución.

Nivel					Media de mínimos cuadrados
T1, A50, D50	A				70.38
T2, A50, D50	A				68.56
T1, A30, D50		B			57.47
T2, A30, D50			C		40.08
T1, A30, D100			C		38.29
T2, A30, D100			C		38.26
T2, A50, D100				D	23.00
T1, A50, D100				D	20.72

Tabla 54. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la Figura 46, la interacción entre las variables tiempo, amplitud y dilución, siendo altamente significativas presentando un valor de $P < .0001$, de acuerdo con la prueba posthoc (Tabla 54), existen 2 combinaciones con un excelente potencial para inhibición del radical DPPH, ambas con diluciones y amplitudes son iguales, con medias pertenecientes al mismo grupo.

Respuesta DPPH (%) inhibición > TEMPERATURA*AMPLITUD*DILUCION

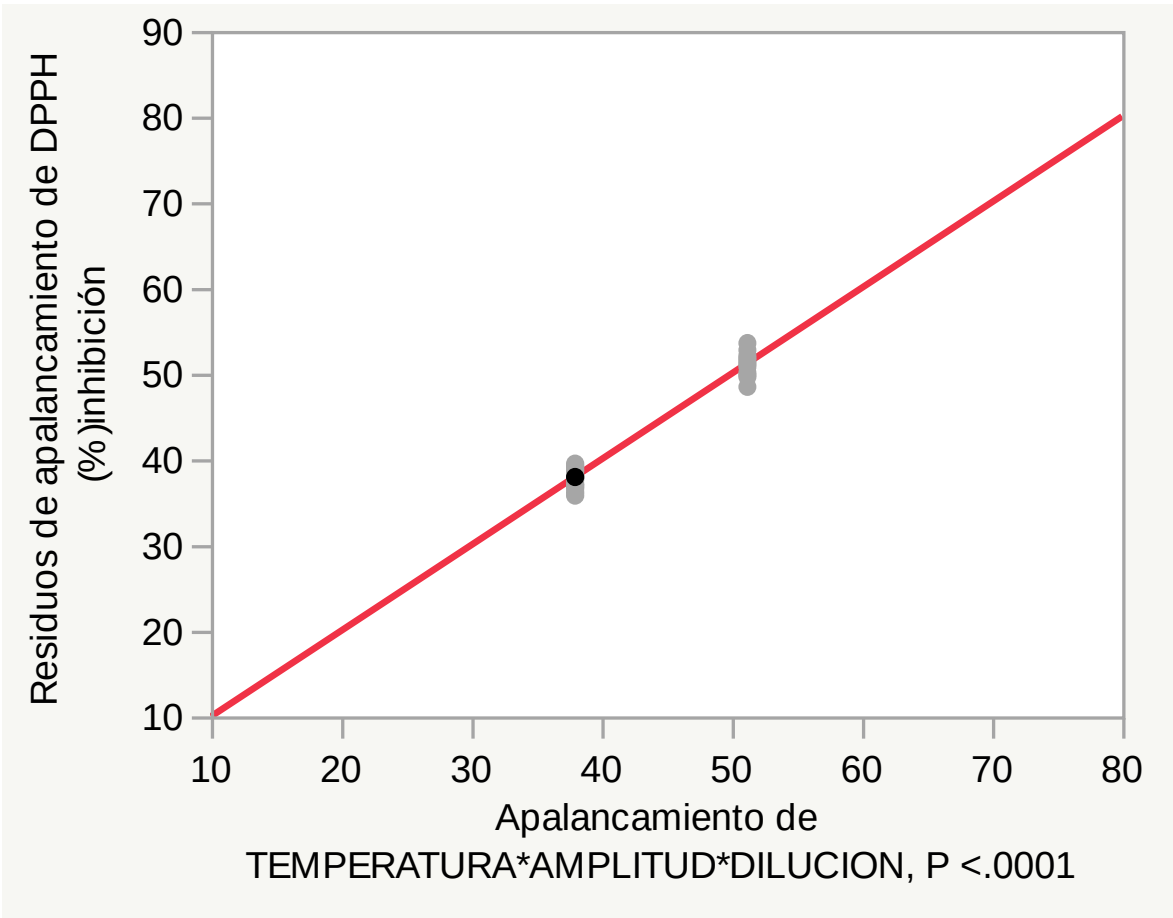


Figura 47. Resultados (%) inhibición de acuerdo a la interacción temperatura, longitud, dilución.

Nivel								Media de mínimos cuadrados
T30, A50, D50	A							76.26
T50, A30, D50		B						63.76
T50, A50, D50		B						62.68
T30, A30, D100			C					39.84
T50, A30, D100				D				36.72
T30, A30, D50					E			33.78
T50, A50, D100						F		25.01
T30, A50, D100							G	18.71

Tabla 55. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a los resultados encontrados en la Figura 47 se observó que la interacción producida entre temperatura, amplitud y dilución son altamente significativas presentando un valor $P < .0001$, de acuerdo a la Tabla 55, la combinación T30 (30 °C), A50(50% amplitud) y D50 (1g/50mL) se muestra como la que tiene un mejor desempeño en torno a la inhibición del radical DPPH. Nuevamente es evidente que la dilución menor es clave para impulsar el potencial inhibición del radical.

Respuesta DPPH (%)inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA*AMPLITUD*DILUCION

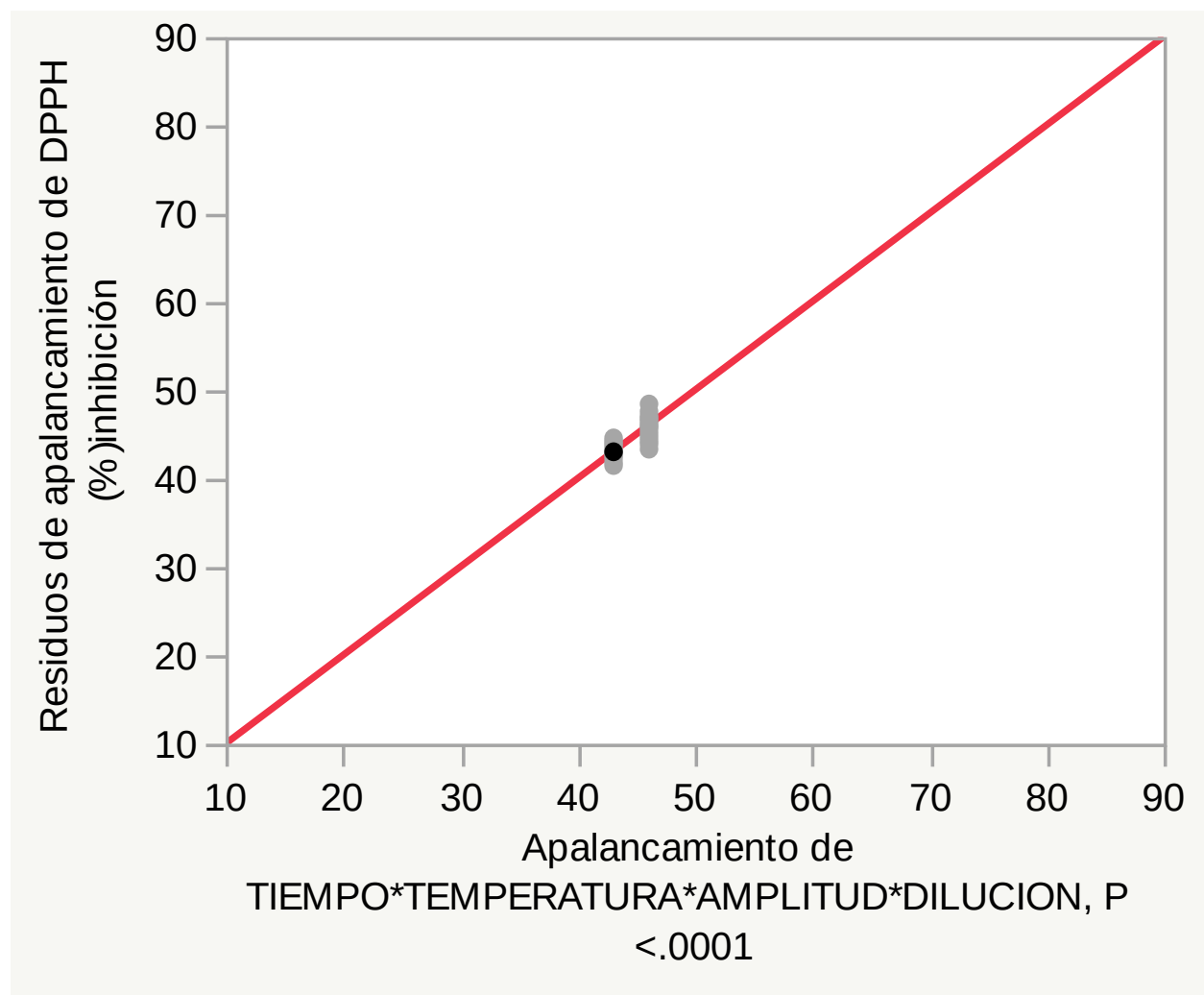


Figura 48. Resultado (%) inhibición DPPH de acuerdo a la interacción entre las variables tiempo, temperatura, amplitud y dilución.

Nivel													Media de mínimos cuadrados
T1, T50, A30, D50	A												88.09
T2, T30, A50, D50		B											78.90
T1, T30, A50, D50			C										73.61
T1, T50, A50, D50				D									67.14
T2, T50, A50, D50					E								58.22
T2, T30, A30, D100						F							50.72
T1, T50, A30, D100						F							47.63
T2, T30, A30, D50							G						40.72
T2, T50, A30, D50							G						39.43
T2, T50, A50, D100								H					33.38
T1, T30, A30, D100									I				28.95
T1, T30, A30, D50									I	J			26.84
T2, T50, A30, D100									I	J			25.81
T1, T30, A50, D100										J			24.79
T1, T50, A50, D100											K		16.64
T2, T30, A50, D100												L	12.63

Tabla 56. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la Figura 48 todas las variables ejercen efecto significativo entre sí, favoreciendo el desempeño del extracto para inhibir el radical DPPH, en la Tabla 56, se observó que el factor más determinante es la dilución, también se notó que la amplitud de onda que está asociada a una mayor extracción es la A50 (50% amplitud), por otro lado también se puede observar que cuando la temperatura es alta (50 °C) el intervalo de tiempo necesario es más corto (T1, 10 min), y cuando la temperatura es menor, se necesita aumentar el tiempo de

extracción, nótese estas características en los niveles A, B, siendo las mejores combinaciones, de acuerdo a su porcentaje de inhibición.

7.2.6 CONCLUSIÓN GENERAL EXTRACCIÓN POR TÉCNICA ASISTIDA DE ULTRASONIDO.

Hasta el momento, se concluye que el modelo estadístico utilizado permitió conocer los efectos e interacciones de las cuatro variables. Para la prueba de fenoles totales la combinación T2, T50, A30, D50 y T2, T50, A50, D50 mostraron el mejor rendimiento de extracción con medias dentro del mismo nivel, obteniéndose un total de 125.84 mgEQ/g y 122.68 mgEQ/g respectivamente, por lo que se observó, que para este ensayo la variable longitud de onda en el proceso por ultrasonido no fue relevante en comparación a la temperatura, tiempo y dilución.

Para la prueba flavonoides se concluye que la combinación T2, T50, A50, D50 y T2, T50, A30, D50 mostraron un mayor rendimiento de extracción y ambas combinaciones pertenecen al mismo grupo de medias, con un total de 381.18 mgEAg/g y 356.93 mgEAg/g, respectivamente, siendo que las condiciones de mayor extracción son idénticas tanto en la prueba para flavonoides como en la prueba fenoles totales. También es importante recalcar que la amplitud de onda para estos ensayos con flavonoides no fue un factor relevante.

Para el ensayo ABTS, se concluye que la combinación T1, T50, A30, D50 mostró la mayor influencia en el porcentaje de inhibición del radical ABTS del extracto, con un alto poder de inhibición, correspondiente a un 93.4%. Esta inhibición es la máxima encontrada, comparada con la combinación T1, T50, A50, D100 con tan solo un 13.24% de inhibición. Es importante recalcar de nueva cuenta que la dilución en este ensayo también fue la variable con mayor importancia.

Para el ensayo DPPH, se concluye que la combinación T1, T50, A30, D50 fue la que presentó el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH, con una media de inhibición de 88.09%. Es importante mencionar el resultado idéntico con el ensayo ABTS, por lo cual se concluye que ambas pruebas son adecuadas para conocer la actividad antioxidante de extracto y que ambas tienen resultados muy similares de acuerdo con su porcentaje de inhibición.

7.3. EXTRACCION POR TÉCNICA DE MACERACIÓN

7.3.1 Diseño de estudio experimental

Con el objetivo de comparar las diferentes condiciones por técnica de ultrasonido se formuló un estudio en parcelas divididas donde se evaluaron las siguientes variables: temperatura, tiempo, dilución. En la Tabla 57 se muestra el diseño. Se formularon 2 parcelas de tiempo con un total de 8 tratamientos con 4 réplicas, por parcela.

TIEMPO 1 (10 hrs)			
Dilución 50		Dilución 100	
Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30	Temperatura 50
T1*D50*T30	T1*D50*T50	T1*D100*T30	T1*D100*T50
TIEMPO 2 (2h)			
Dilución 50		Dilución 100	
Temperatura 30	Temperatura 50	Temperatura 30	Temperatura 50
T2*D50*T30	T2*D50*T50	T2*D100*T30	T2*D100*T50

Tabla 57. Diseño experimental parcelas divididas para extracción por maceración.

Validación del diseño

Con la matriz de datos organizada se procedió a evaluar el diseño, para validar el diseño se utilizó el software JMP , Se evaluó el diseño mediante el modelo de análisis en parcelas divididas, se construyeron los efectos del modelo, especificando el número de interacciones (3) y se realizó el diagnóstico.

Obteniéndose el siguiente resultado mostrado en la Tabla 58. por lo cual se concluye que el diseño utilizado es confiable.

Diagnóstico del diseño	Óptimo
Eficiencia D	100
Eficiencia G	100
Eficiencia A	100
Varianza media de predicción	0.1041767

Tabla 58. Resultado de validación de diseño experimental.

Una vez evaluado el diseño se procedió a ejecutar las pruebas conforme a la planeación, el modelo permitió conocer el comportamiento de cada una de las variables y sus posibles interacciones. Se creó una base de datos en el programa Excel y se construyó posteriormente un matriz de datos para el programa JMP versión 15.2.1. A continuación, se muestra cada uno de los resultados obtenidos por el modelo de cada factor, así como sus interacciones.

7.3.2 ENSAYO FENOLES TOTALES

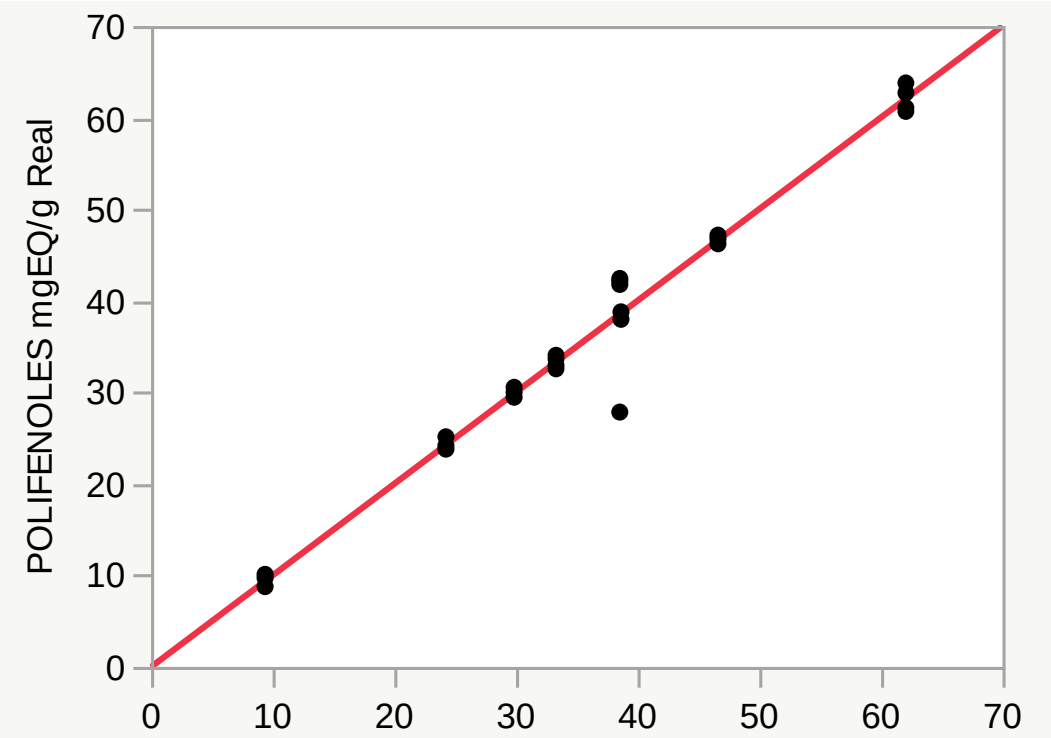


Figura 49. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta POLIFENOLES mgEQ/g > Modelo completo

R cuadrado	0.976198
R cuadrado ajustado	0.969256
Raíz del error cuadrático medio	2.622762
Media de respuesta	35.32432

Tabla 59. Resumen del ajuste.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	7	6770.9916	967.285	140.6166
Error	24	165.0931	6.879	Prob > F
C. Total	31	6936.0847		<.0001*

Tabla 60. Análisis de varianza.

De acuerdo a los datos obtenidos de la Tabla 59 se observa que el modelo se puede explicar en un 97.6% de los resultados obtenidos en este estudio una variabilidad no explicada inferior al 1%, habiendo una buena relación entre factores y variables de respuesta. En la siguiente tabla se muestra un resumen de cada una de las variables, sus interacciones y la significancia encontrada.

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	1861.3244	270.5854	<.0001*
TEMPERATURA	1	1	363.4062	52.8293	<.0001*
DILUCION	1	1	3965.3123	576.4473	<.0001*
TIEMPO*TEMPERATURA	1	1	4.4193	0.6424	0.4307
TIEMPO*DILUCION	1	1	1.9197	0.2791	0.6022
TEMPERATURA*DILUCION	1	1	8.4939	1.2348	0.2775
TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION	1	1	566.1158	82.2977	<.0001*

Tabla 61. Resumen pruebas de los efectos e interacciones.

TIEMPO

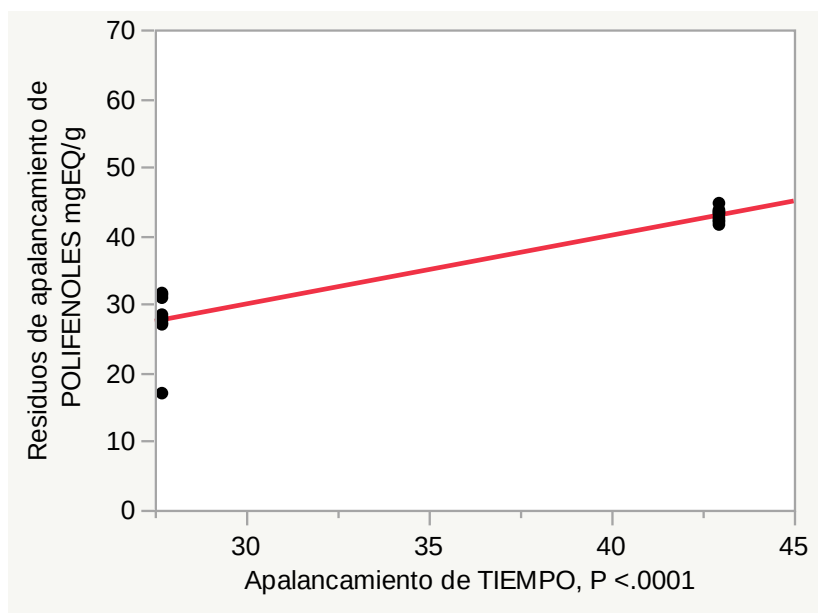


Figura 50. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta POLIFENOL mgEQ/g > TIEMPO.

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
2 h	27.697635	0.65569050	27.6976
10 h	42.951014	0.65569050	42.9510

Tabla 62. Presentación de medias por niveles de tiempo.

De acuerdo a los resultados mostrado en la Figura 50, se observa una alta significancia un valor P menor a .001, En la Tabla 62. Se evidencia la diferencia entre medias de grupo de acuerdo al tiempo, lo que sugiere que el tiempo es un factor determinante para una mayor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos.

TEMPERATURA

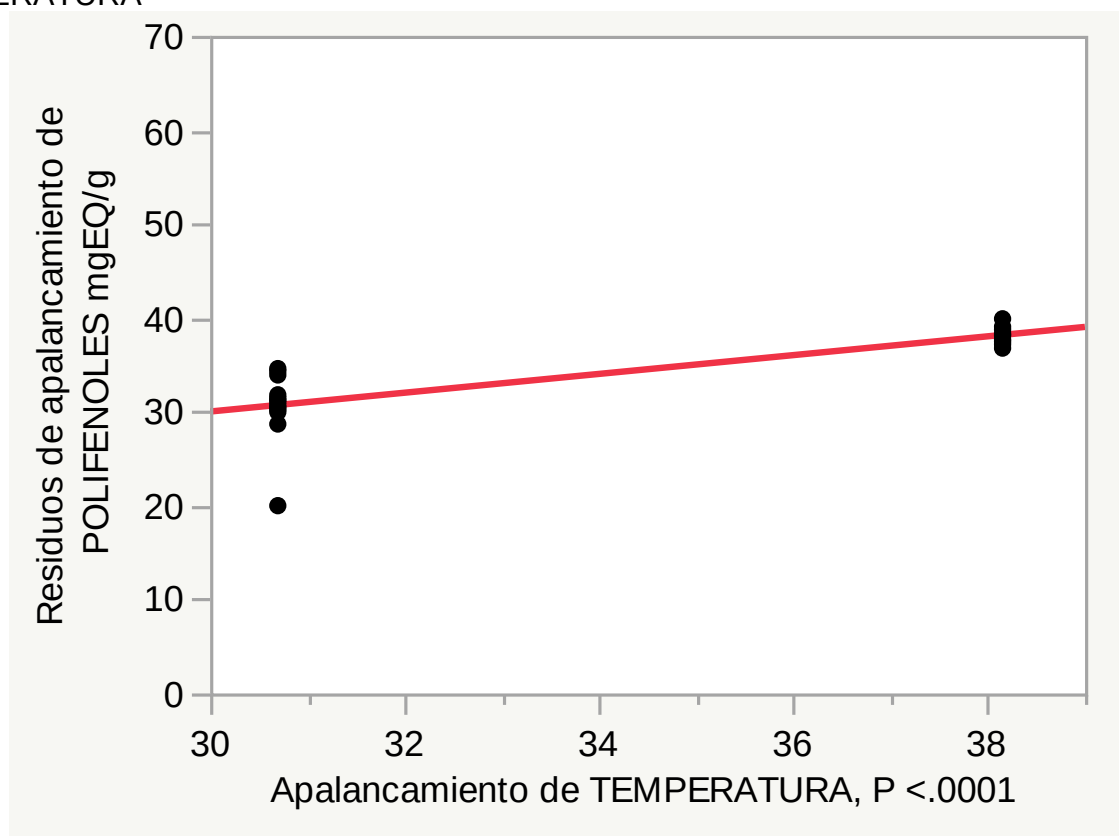


Figura 51. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta POLIFENOLES mgEQ/g > TEMPERATURA.

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
30 °C	30.695946	0.44658628	30.6959
50°C	38.150901	0.44658628	38.1509

Tabla 63. Presentación de medias por niveles de temperatura.

En la Figura 63 se muestra que el factor temperatura es modifica la eficiencia de extracción, encontrándose medias diferentes entre grupos mostradas en la tabla 63, siendo la que mejor se relaciona a un mayor número de polifenoles, la temperatura de extracción a 50°C.

DILUCIÓN

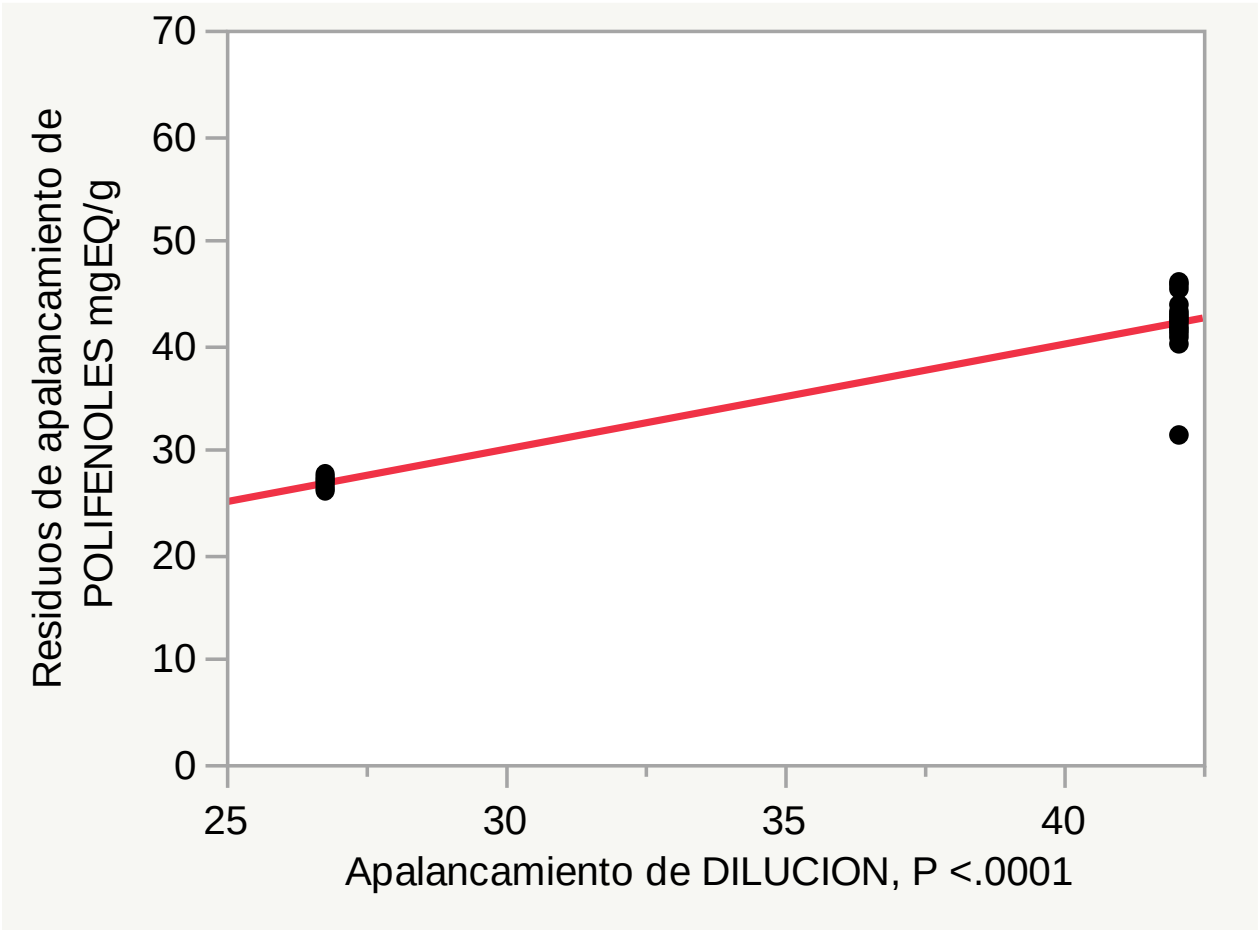


Figura 52. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta POLIFENOLES mgEQ/g > DILUCION.

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
1g/50mL	46.456081	0.65569050	46.4561
1g/100mL	24.192568	0.65569050	24.1926

Tabla 64. Presentación de medias por niveles de temperatura.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que la dilución es un factor importante y que influye negativamente o positivamente en el rendimiento de extracción de los polifenoles. En la Tabla 64, se aprecia diferencias significativas entre ambos grupos siendo la de mejor rendimiento la correspondiente a 1g/ 50mL.

Análisis de efectos e interacciones entre variables para ensayo fenoles totales

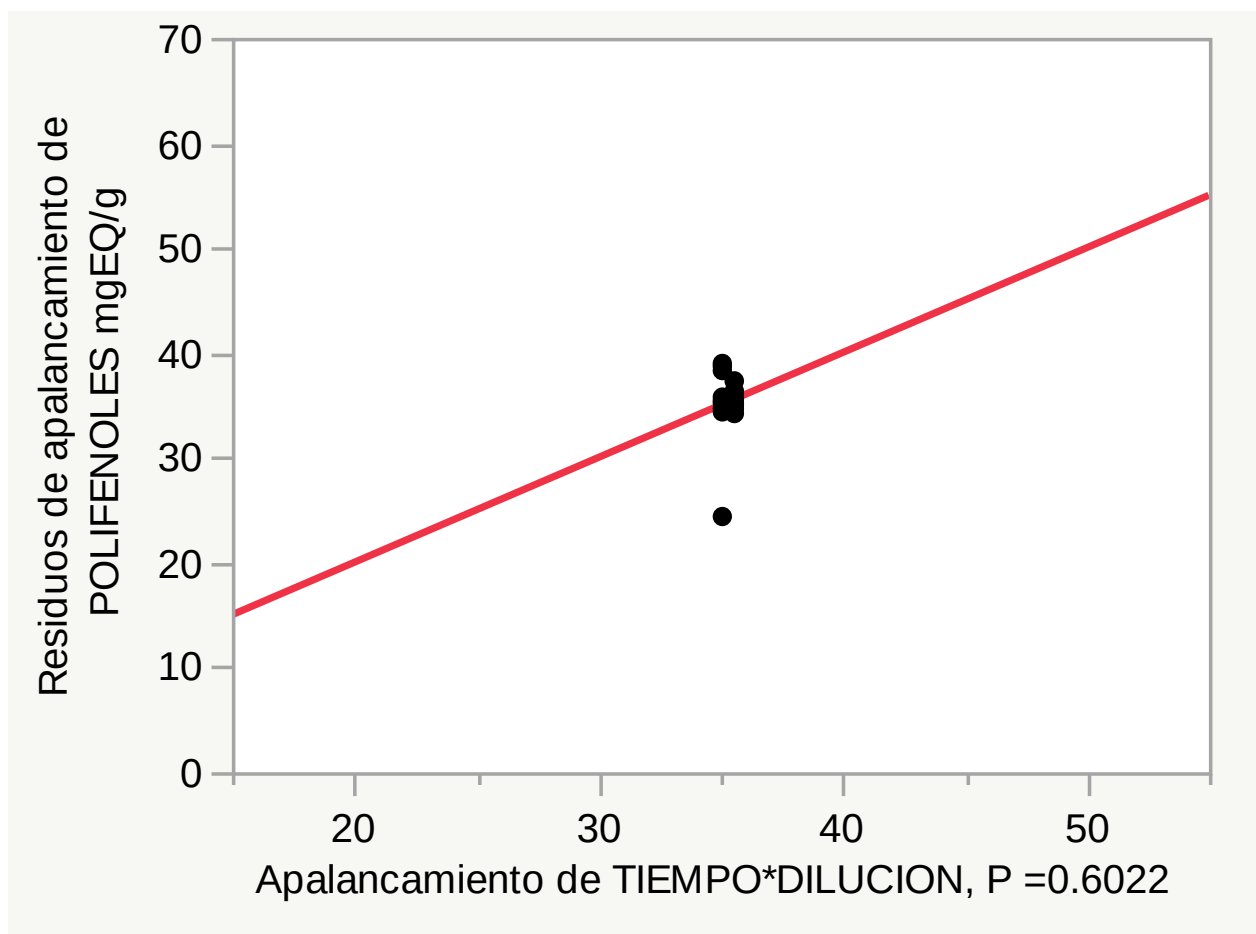


Figura 53. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta POLIFENOLAS mgEQ/g > TIEMPO*DILUCION.

La interacción dada entre el tiempo y la dilución resultó no significativa en la Tabla 65 se puede observar las medias de extracción obtenidas.

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar
2 h,1g/50mL	38.584459	0.92728640
2 h,1g/100mL	16.810811	0.92728640
10 h,1g/50mL	54.327703	0.92728640
10 h,1g/100mL	31.574324	0.92728640

Tabla 65. Tabla de medias de mínimos cuadrados.

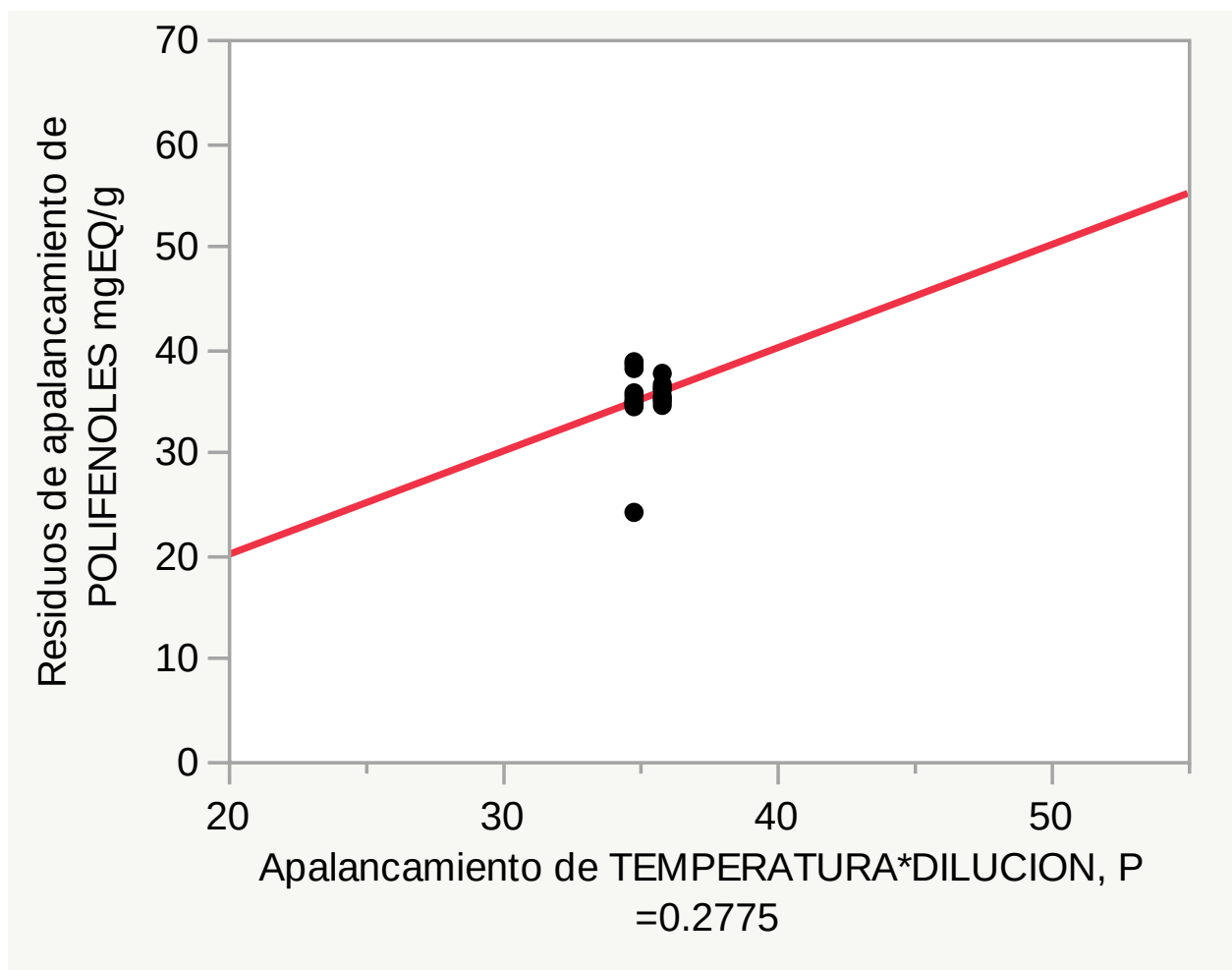


Figura 54. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta POLIFENOLES mgEQ/g > TEMPERATURA*DILUCION.

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar
30 °C,1g/50mL	42.570946	0.92728640
30 °C,1g/100mL	21.337838	0.92728640
50°C,1g/50mL	50.341216	0.92728640
50°C,1g/100mL	27.047297	0.92728640

Tabla 66. Presentación de medias de acuerdo a la interacción Temperatura * Tiempo.

Por otro lado, para el caso de la interacción entre temperatura y dilución, se observa que no es significativa, donde las medias de todas las combinaciones son pertenecientes al mismo grupo, muy similares entre sí.

Análisis interacción entre 3 variables de interés.

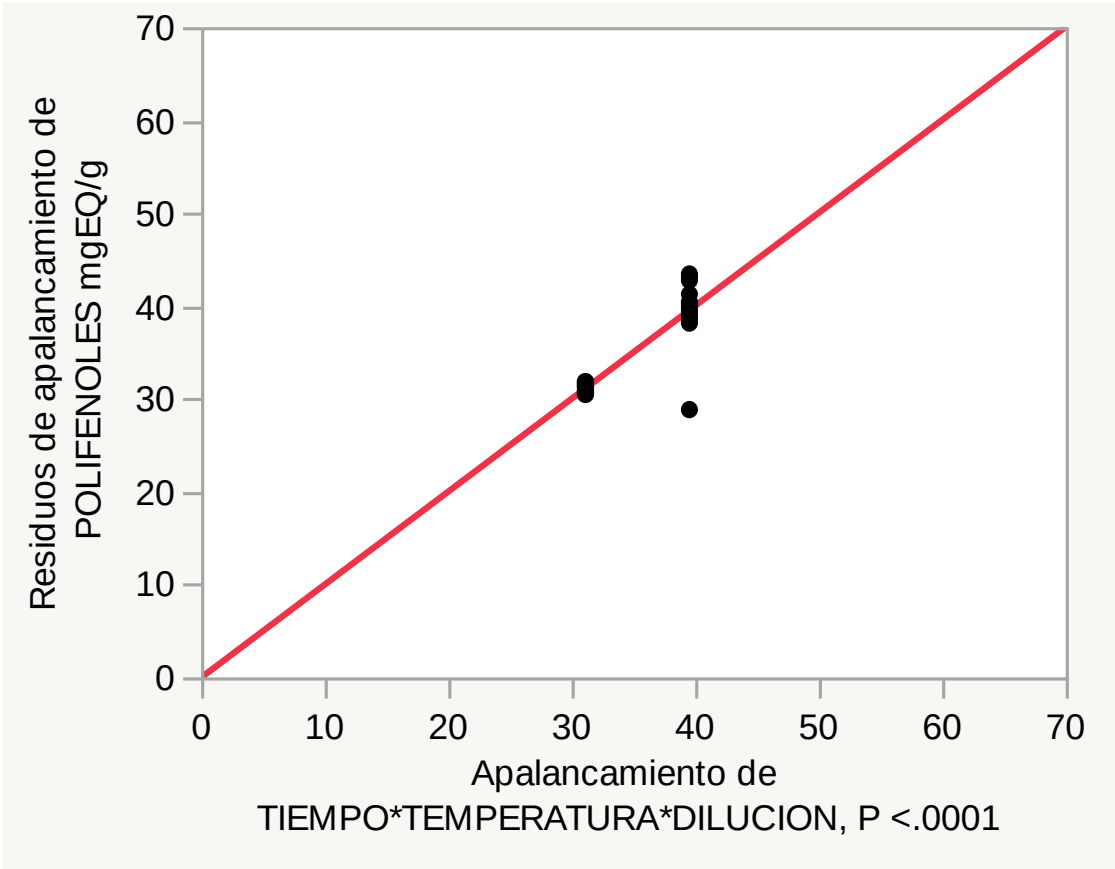


Figura 55. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta POLIFENOLAS mgEQ/g > TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION.

Nivel							Media de mínimos cuadrados
10 h, 50 °C, 1g/50mL	A						62.04
10 h, 30 °C, 1g/50mL		B					46.60
2 h, 50 °C, 1g/50mL			C				38.63
2 h, 30 °C, 1g/50mL			C				38.53
10 h, 30 °C, 1g/100mL			C	D			33.29

10 h, 50 °C, 1g/100mL				D	E		29.85
2 h, 50 °C, 1g/100mL					E		24.24
2 h, 30 °C, 1g/100mL						F	9.37

Tabla 67. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados de acuerdo a todas las combinaciones y sus medias de extracción.

De acuerdo a la Figura 55. Se puede observar que la interacción entre las 3 variables de interés es significativa, y que influyen en el comportamiento y eficiencia de extracción de compuestos fenólicos.

Por otro lado en la Tabla 67 se evidencian las combinaciones relacionada a una mayor extracción, siendo los niveles. A,B ambos presentando una dilución de 1g/50mL. Para el nivel A una temperatura de 50 °C y un tiempo de 10h, para el nivel B una temperatura de 30 °C y un tiempo de 10 h, por lo que destaca el tiempo de 10 hrs a que mayor se asocia a una media más alta, en comparación a los niveles E,F,G.

7.3.3. FLAVONOIDES TOTALES

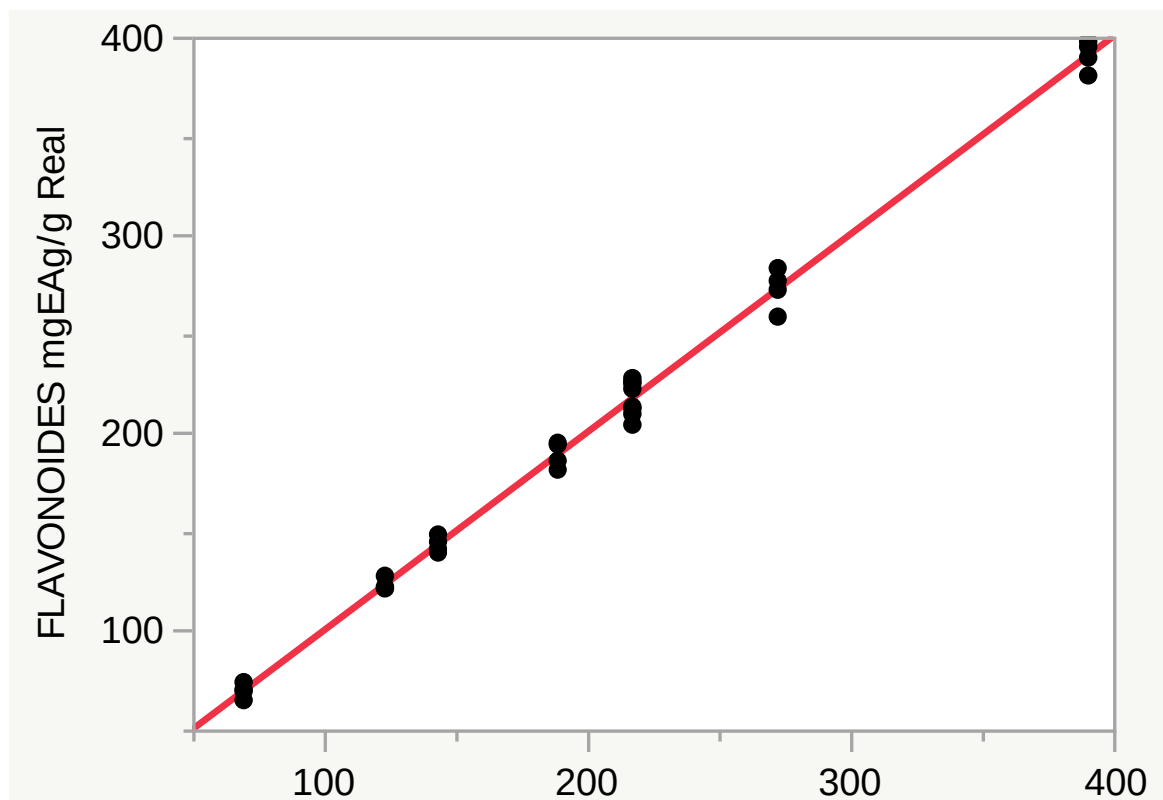


Figura 56. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > Modelo completo.

Con el objetivo de detectar la presencia de flavonoides en el extracto se realizó la evaluación para cada una de las variables de interés, de acuerdo al modelo propuesto, se observa que los resultados pueden explicarse en un 99.5% de su comportamiento, con un mínimo de variación no explicada de acuerdo a la Figura 56, cada una de las variables afecta el comportamiento con base al proceso de extracción por maceración, a continuación se describe los efectos e interacciones de acuerdo a las variables de interés. En la tabla 68, se muestra un resumen de los resultados y su significancia.

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	90205.015	1680.842	<.0001*
TEMPERATURA	1	1	24244.364	451.7593	<.0001*
DILUCION	1	1	82094.153	1529.708	<.0001*
TIEMPO*TEMPERATURA	1	1	73860.113	1376.278	<.0001*
TIEMPO*DILUCION	1	1	232.529	4.3328	0.0482*
TEMPERATURA*DILUCION	1	1	2404.288	44.8005	<.0001*
TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION	1	1	177.434	3.3062	0.0815

Tabla 68. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > Modelo completo.

TIEMPO

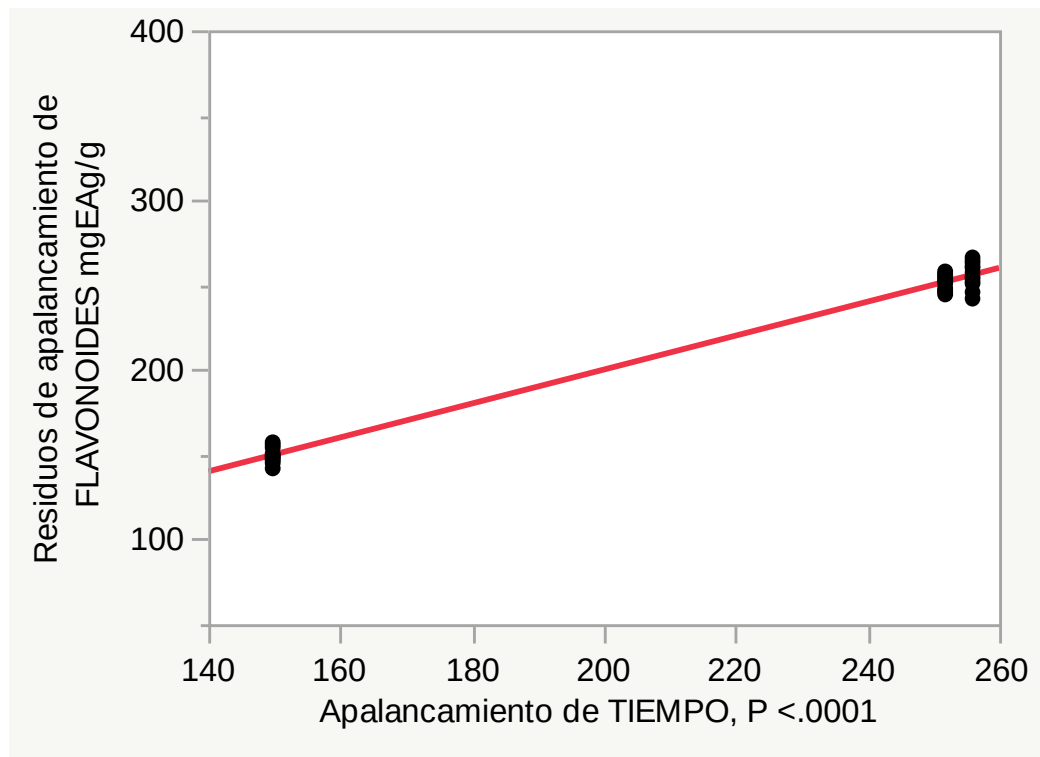


Figura 57. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO

Para la eficiencia de extracción de flavonoides, se observa, de acuerdo a la figura 57, la variable tiempo modifica la cantidad de flavonoides extraídos; en la tabla 69, se puede ver que a las 2 h de extracción hay una cantidad mayor de compuestos flavonoides, y que el tiempo mayor, puede influir en la degradación de dichos compuestos, por lo cual hay una menor cantidad de estos a las 10 h.

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
2 h	255.95455	1.8314365	255.955
10 h	149.76779	1.8314365	149.768

Tabla 69. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

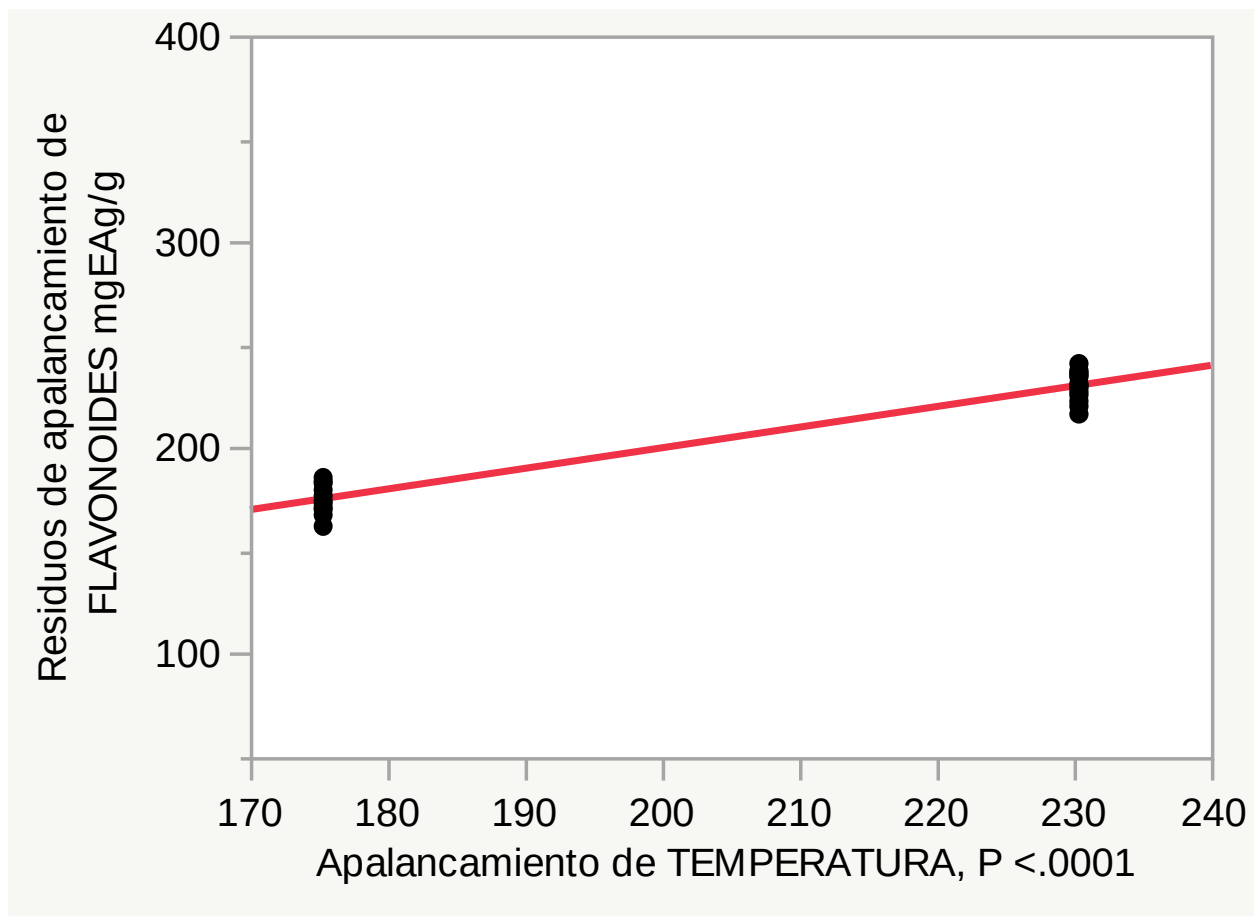


Figura 58. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TEMPERATURA

Nivel			Media de mínimos cuadrados
50°C	A		230.38
30 °C		B	175.33

Tabla 70. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la variable temperatura, en la figura 58, se observa que este factor influye directamente en la eficiencia de extracción de flavonoides , para el caso de la temperatura de 50°C la media de extracción es mayor en comparación a la temperatura de 30°C ambos datos se muestran en la tabla 70, por lo cual la temperatura 50°C favorece de manera positiva una mayor captación de flavonoides.

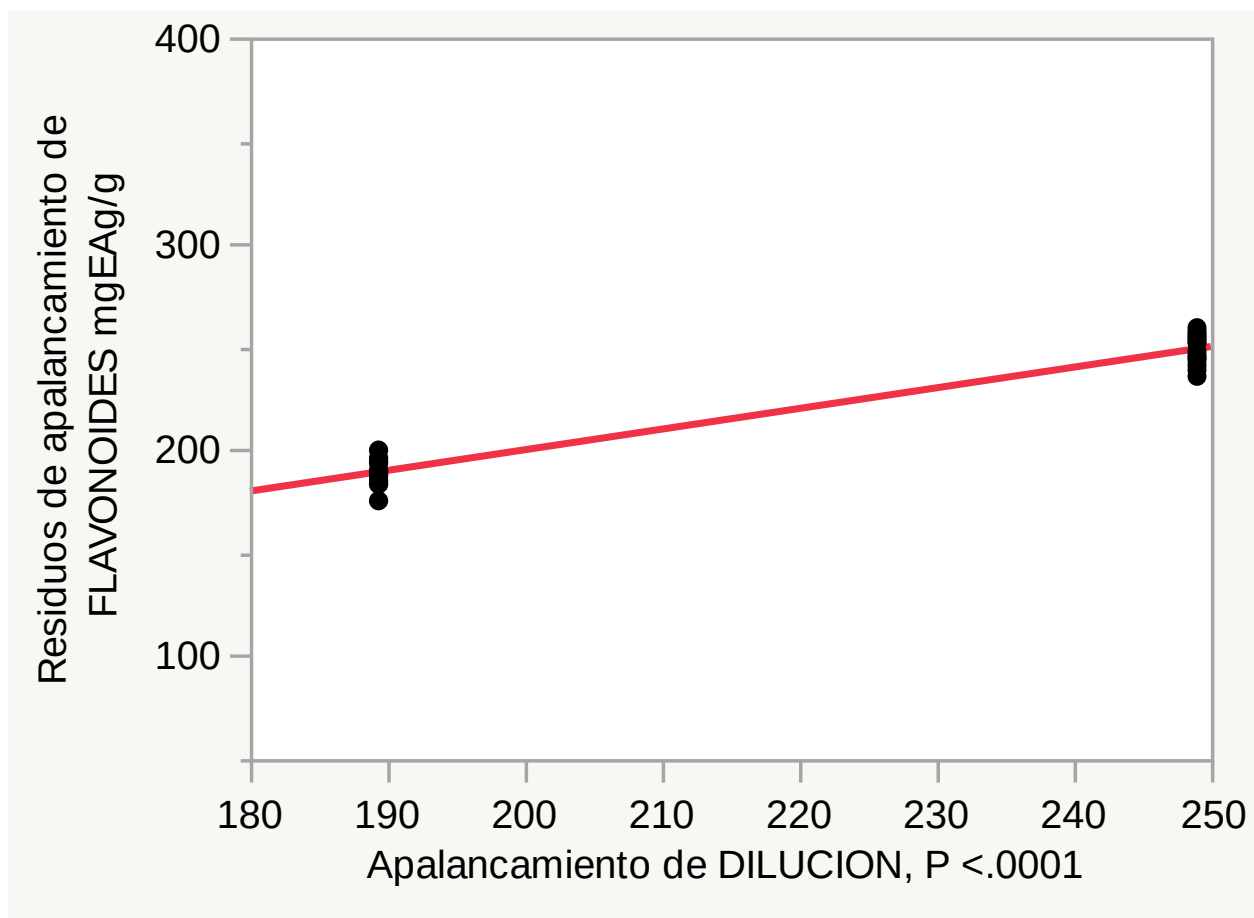


Figura 59. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > DILUCION

Nivel			Media de mínimos cuadrados
1g/50mL	A		253.51
1g/100mL		B	152.21

Tabla 71. Prueba t de Student de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

Para el caso de la variable dilución, se observa en la Figura 59, que los 2 niveles de dilución influyen en la eficiencia de extracción, siendo altamente significativos, en la tabla 71, se puede notar que la dilución menor, obtuvo una media de extracción 24% más alta en comparación la media obtenida por el extracto más diluido.

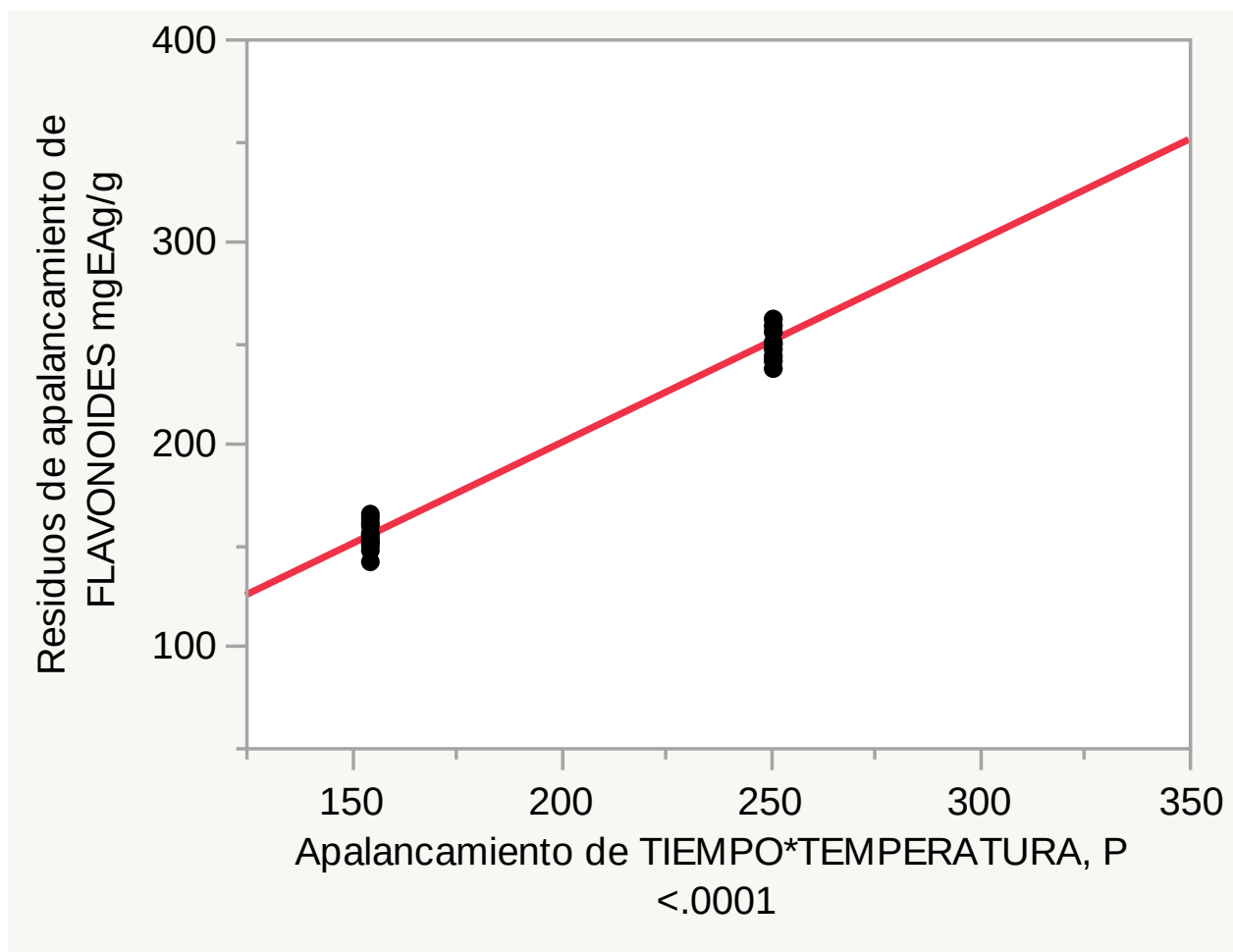


Figura 60. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*TEMPERATURA

Nivel				Media de mínimos cuadrados
2 h,50°C	A			331.52
2 h,30 °C		B		180.38
10 h,30 °C		B		170.28
10 h,50°C			C	129.25

Tabla 72. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

De acuerdo a la figura 60, se observa que el efecto que ejerce la interacción entre tiempo y temperatura es altamente significativo, y este es importante para la eficiencia de extracción de los flavonoides, en la tabla 72, se puede notar que, de todas las combinaciones, el nivel A

obtuvo una media de extracción mayor, en comparación a los demás niveles. Se observa que una temperatura mayor favorece la captación de flavonoides, por otro lado, se observa que a mayor tiempo de extracción la temperatura alta puede ocasionar pérdida de compuestos bioactivos, por lo cual la temperatura ambiente en procesos de extracción más largos podría ser la más indicada para evitar la desnaturalización de estos biocomponentes.

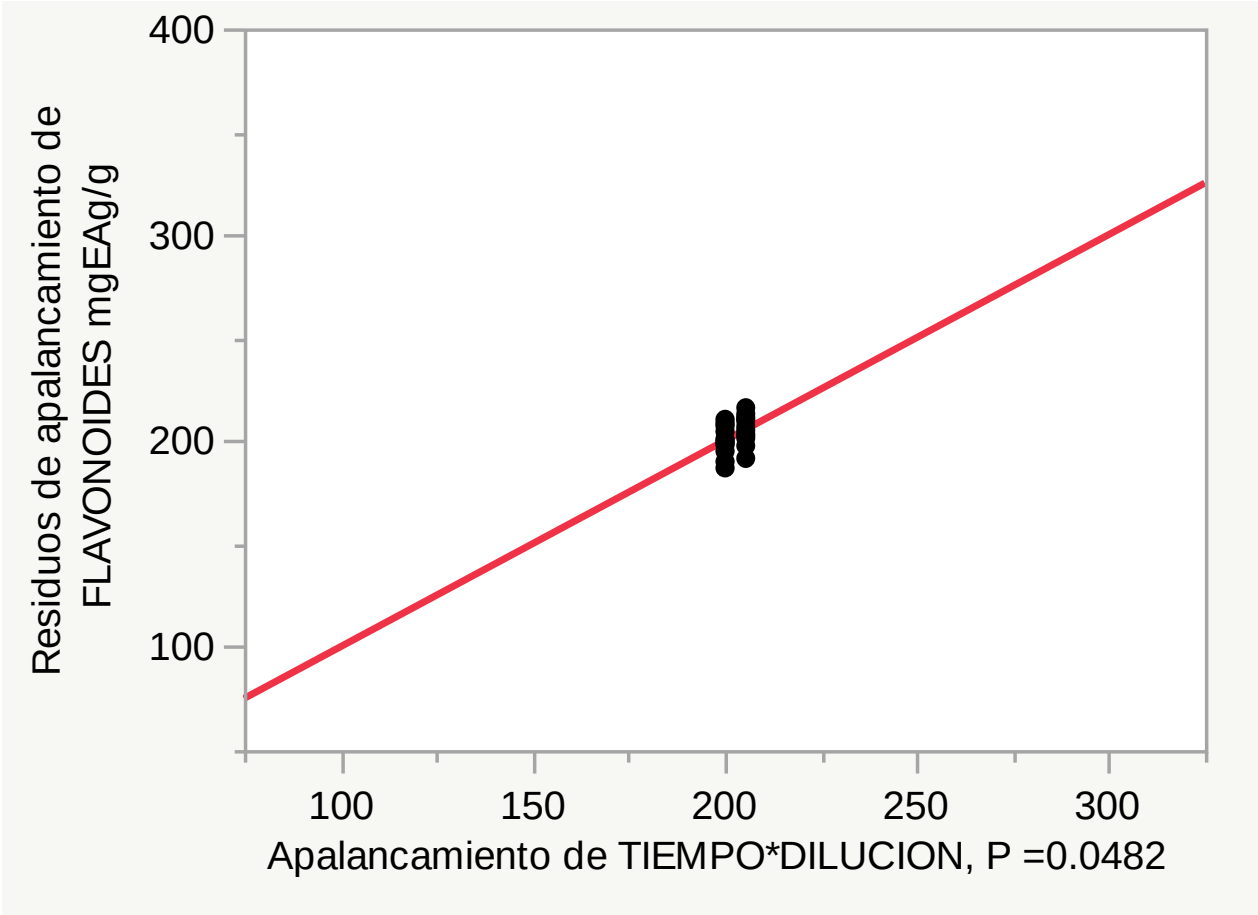


Figura 61. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*DILUCION

Nivel				Media de mínimos cuadrados
2 h,1g/50mL	A			303.90

2 h,1g/100mL		B	208.00
10 h,1g/50mL		B	203.11
10 h,1g/100mL		C	96.42

Tabla 73. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

Para la interacción dada entre tiempo y dilución se observa en la figura 61, un resultado significativo, en la tabla 73, se puede notar que el nivel de mayor eficiencia de extracción es el A, con una media 68.3% mayor en comparación al nivel C que corresponde a la mayor dilución con un tiempo mas prologando de extracción, lo que sugiere que extracciones largas podrían asociarse a una mayor degradación de los flavonoides.

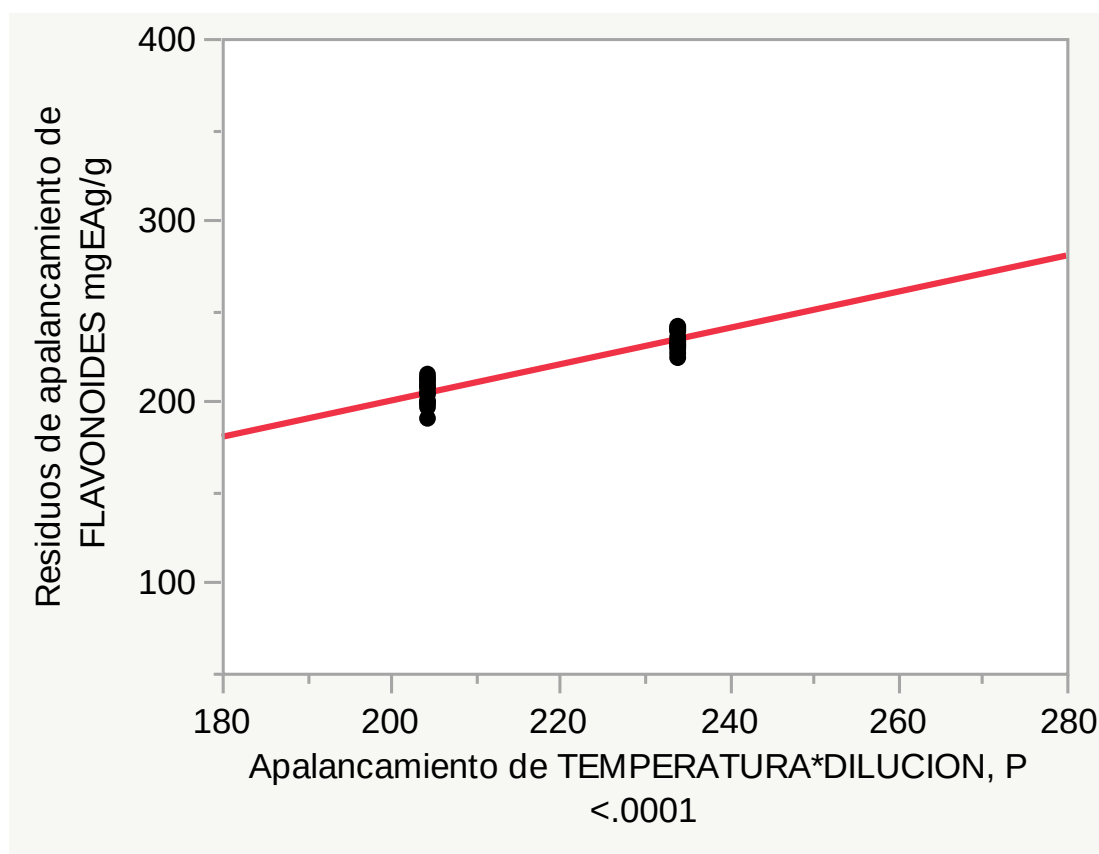


Figura 62. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TEMPERATURA*DILUCION

Nivel					Media de mínimos cuadrados
-------	--	--	--	--	----------------------------

50°C,1g/50mL	A				271.18
30 °C,1g/50mL		B			226.78
30 °C,1g/100mL			C		196.79
50°C,1g/100mL				D	181.93

Tabla 74. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la figura 62, la interacción producida por la temperatura y el nivel de dilución es altamente significativa, en la tabla 74, se muestra que las medias de cada combinación son diferentes entre sí, siendo el nivel A el de mayor eficiencia de extracción caracterizado por una temperatura alta con tiempo de extracción menor, en comparación a los demás niveles.

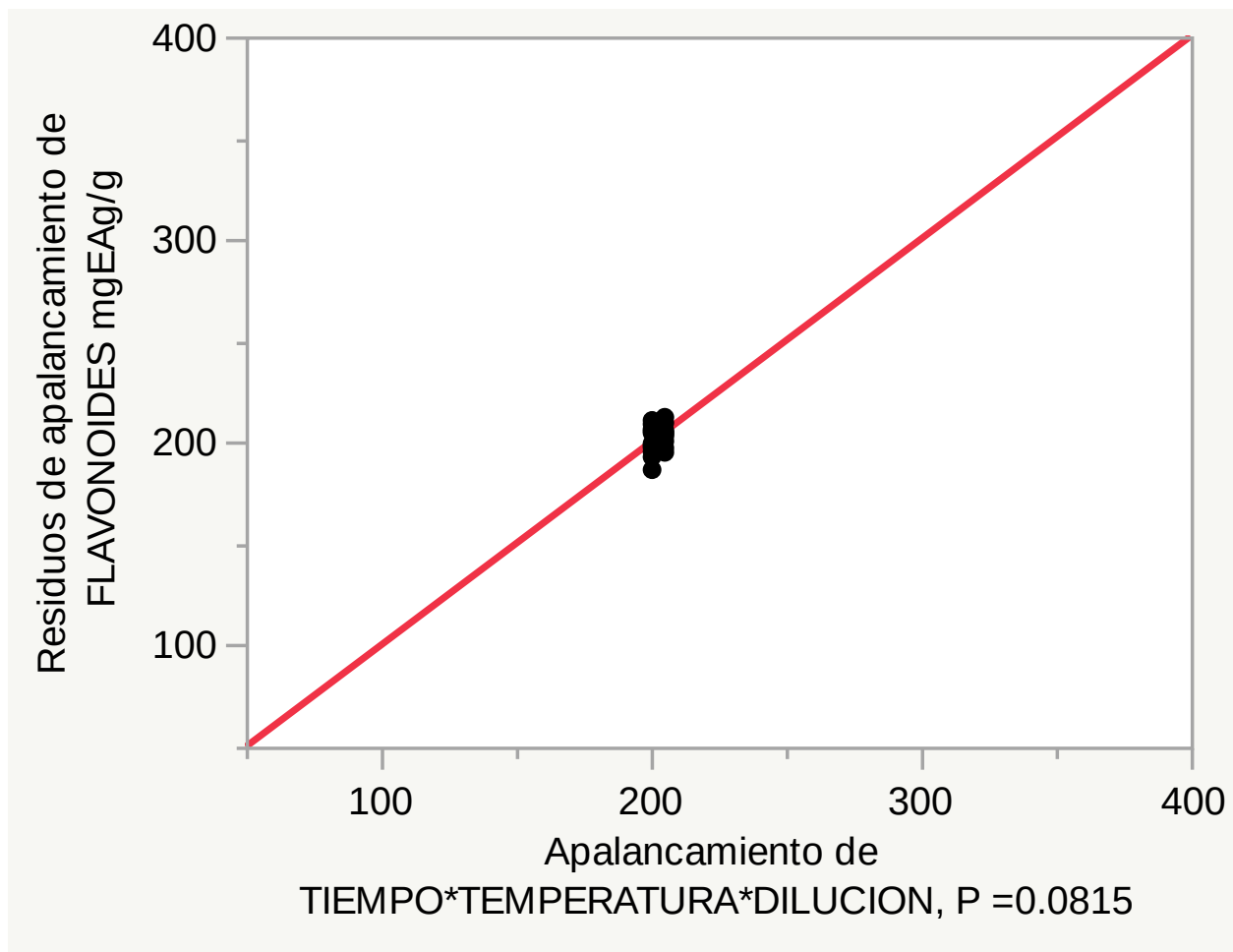


Figura 63. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta FLAVONOIDES mgEAg/g > TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar
2 h,30 °C,1g/50mL	217.31818	3.6628731
2 h,30 °C,1g/100mL	143.45455	3.6628731
2 h,50°C,1g/50mL	390.50000	3.6628731
2 h,50°C,1g/100mL	272.54545	3.6628731
10 h,30 °C,1g/50mL	217.31818	3.6628731
10 h,30 °C,1g/100mL	123.25298	3.6628731
10 h,50°C,1g/50mL	188.90909	3.6628731
10 h,50°C,1g/100mL	69.59091	3.6628731

Tabla 75.Tabla de medias de mínimos cuadrados.

Nivel								Media de mínimos cuadrados
2 h,50°C,1g/50mL	A							390.50
2 h,50°C,1g/100mL		B						272.54
10 h,30 °C,1g/50mL			C					217.31
2 h,30 °C,1g/50mL			C					217.31
10 h,50°C,1g/50mL				D				188.90
2 h,30 °C,1g/100mL					E			143.45
10 h,30 °C,1g/100mL						F		123.25
10 h,50°C,1g/100mL							G	69.59

Tabla 76. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

De acuerdo a la figura 63, el efecto provocado por la interacción entre tiempo, temperatura y dilución, no es significativo, en la tabla 75, se muestra el resumen de medias encontradas por cada una de las combinaciones, siendo los de mejor eficiencia de extracción aquellos con tiempos cortos, temperatura 50°C y una dilución menor.

Si bien el modelo, aplicando las tres interacciones no resultó significativo, las medias entre las diferentes combinaciones sí, en la tabla 76, se observa que existe una diferencia significativa en torno a la eficiencia de extracción. Como se notó anteriormente los tratamientos con un periodo de extracción menor y una temperatura mayor, son los que obtuvieron mejores resultados, por otro lado, se nota que la temperatura y tiempo, se destacan como los 2 factores de mayor relevancia.

7.3.4 ENSAYO INHIBICIÓN RADICALES ABTS

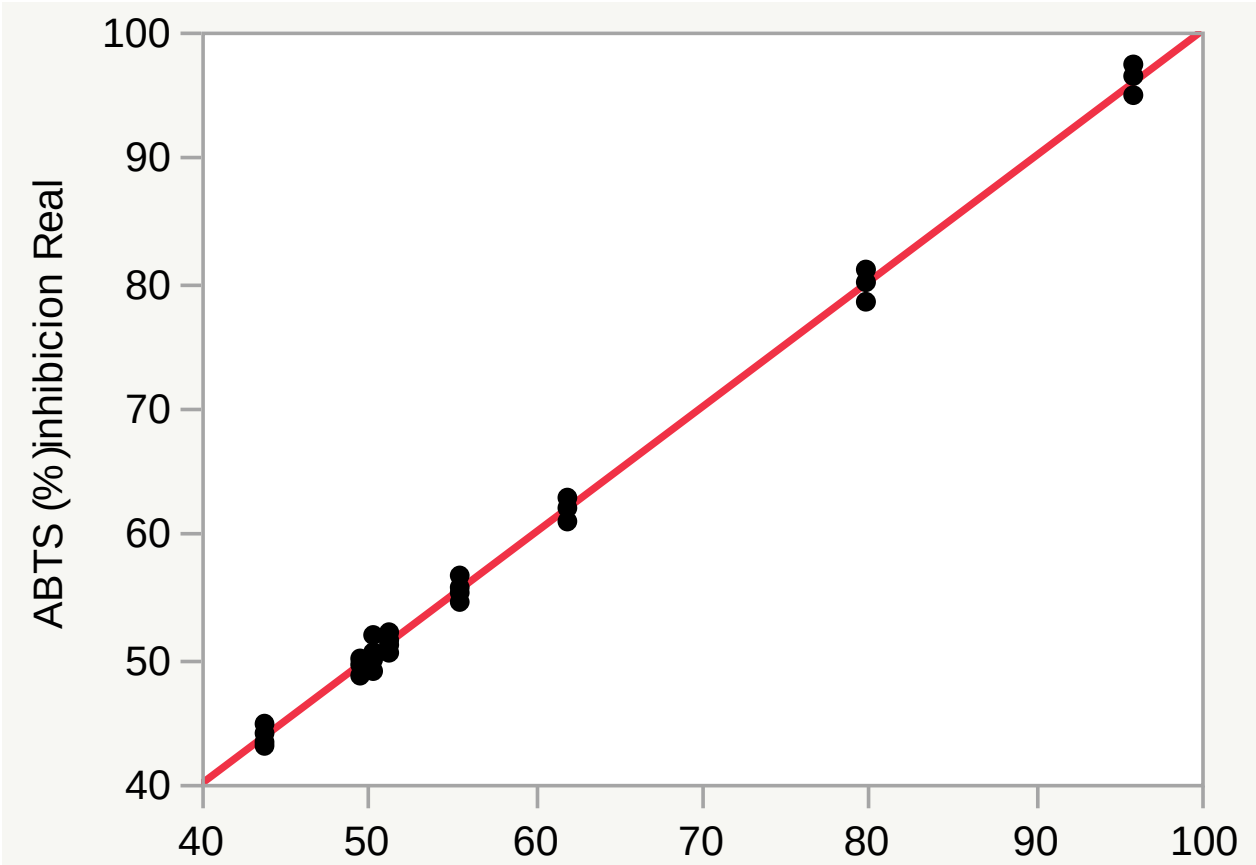


Figura 63. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibición > Modelo completo

R cuadrado	0.9977
R cuadrado ajustado	0.997029
Raíz del error cuadrático medio	0.928327
Media de respuesta	61.02547
Observaciones (o suma de pesos)	32

Tabla 77. Resumen del ajuste

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	7	8971.3298	1281.62	1487.156
Error	24	20.6830	0.86	Prob > F
C. Total	31	8992.0128		<.0001*

Tabla 78. Análisis de varianza

De acuerdo a la figura 63, para el ensayo ABTS, el modelo propuesto puede explicar un 92.8% del comportamiento de las variables, encontrando resultados significativos con un valor $P < .001$ (Tabla 78.), lo que indica que las variables estudiadas afectan directamente la capacidad antioxidante del extracto. A continuación, en la tabla 79, se muestran cada uno de los factores y su significancia.

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	4836.4623	5612.102	<.0001*
TEMPERATURA	1	1	132.3022	153.5199	<.0001*
DILUCION	1	1	2216.1386	2571.548	<.0001*
TIEMPO*TEMPERATURA	1	1	4.1925	4.8649	0.0372*
TIEMPO*DILUCION	1	1	1252.9772	1453.921	<.0001*
TEMPERATURA*DILUCION	1	1	157.0218	182.2039	<.0001*
TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION	1	1	372.2353	431.9319	<.0001*

Tabla 79. Prueba de los efectos

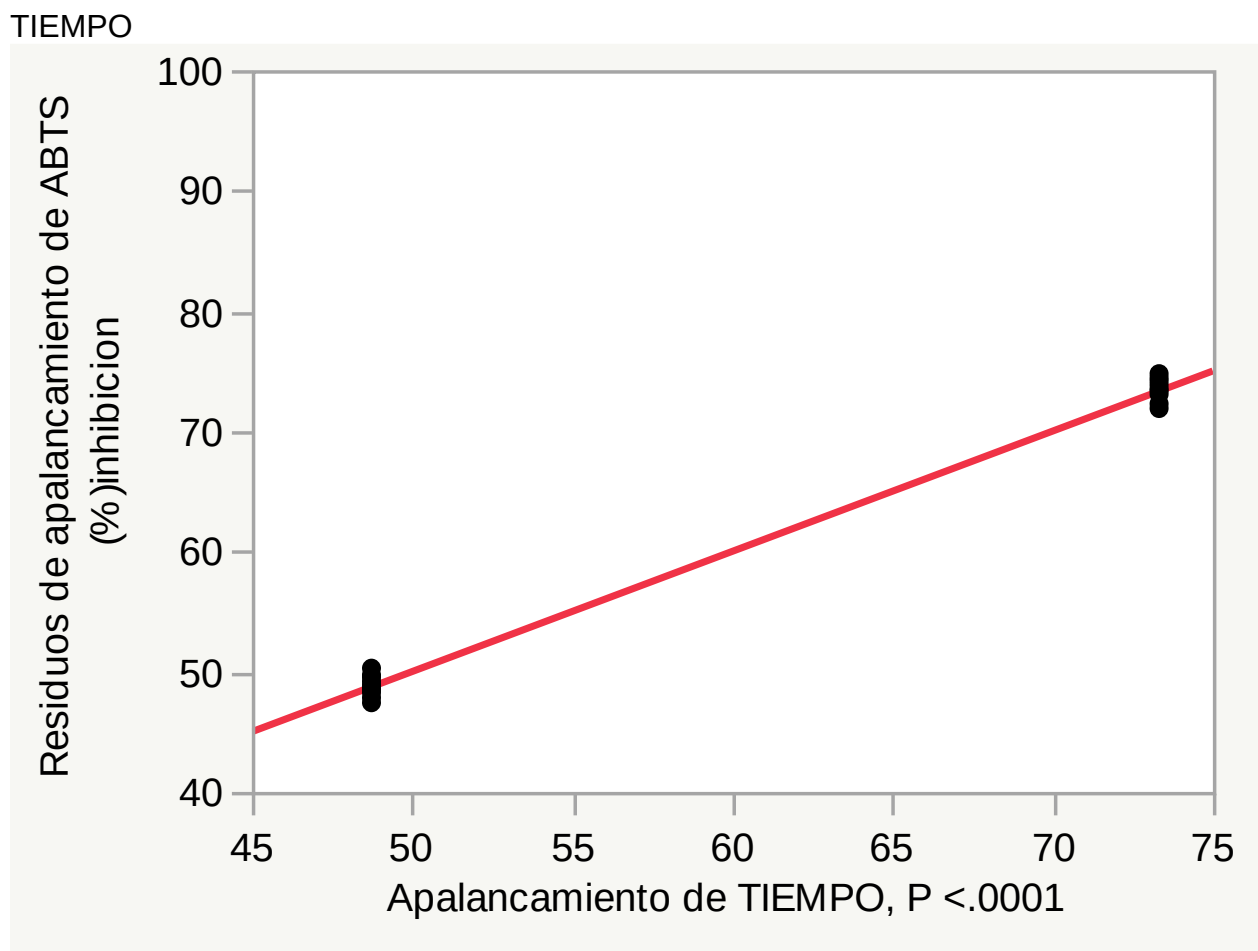


Figura 64. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibicion > TIEMPO

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
2 h	48.731589	0.23208182	48.7316
10 h	73.319346	0.23208182	73.3193

Tabla.80 Tabla de medias de mínimos cuadrados

De acuerdo a la figura 64, se observa que la variable tiempo, influye en la capacidad antioxidante del extracto, siendo el tiempo 10 horas, mostrado en la tabla 80, el que mayor porcentaje de inhibición muestra.

TEMPERATURA

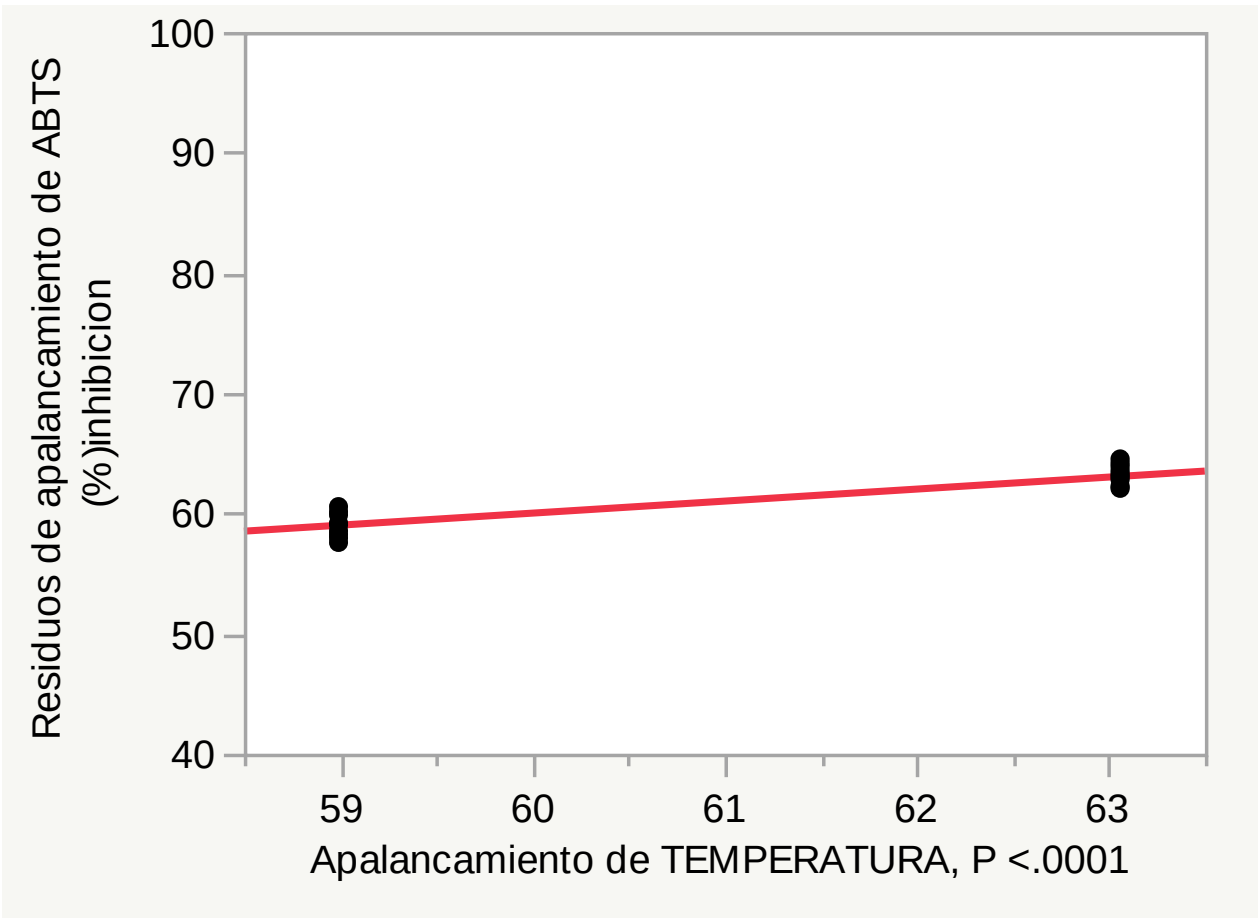


Figura 65. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibicion > TEMPERATURA

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
30 °C	58.992134	0.23208182	58.9921
50°C	63.058800	0.23208182	63.0588

Tabla 81. Tabla de medias de mínimos cuadrados

De acuerdo a los resultados encontrados en la figura 65, la variable temperatura efecta directamente en la capacidad antioxidante del extracto, en la tabla 81 se observa que la temperatura 50°C se relaciona a un mayor porcentaje de inhibición del radical ABTS.

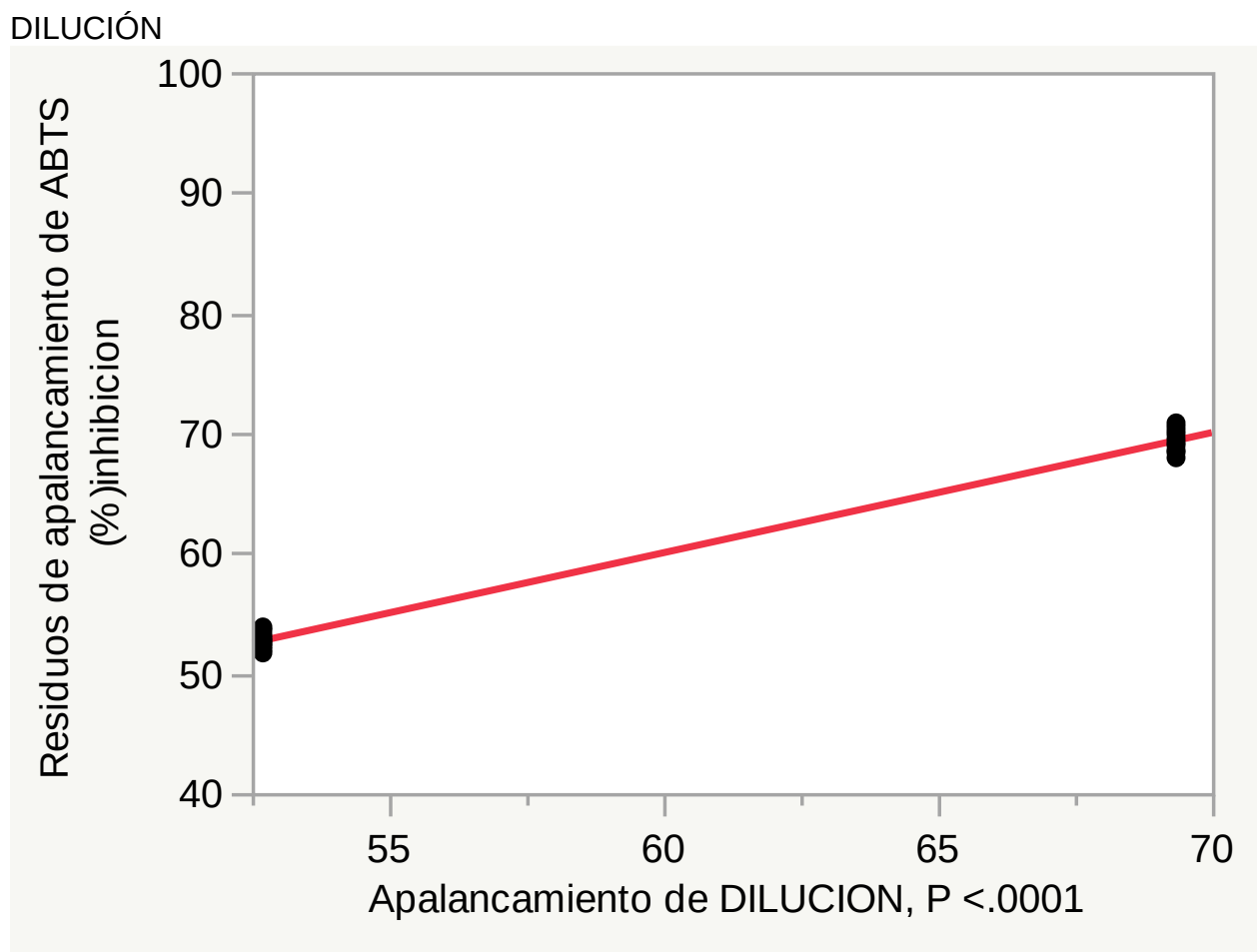


Figura 66. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibicion > DILUCION

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
1g/50mL	69.347386	0.23208182	69.3474
1g/100mL	52.703549	0.23208182	52.7035

Tabla 82. Medias de mínimos cuadrados

En la figura 66, se muestra, que la dilución es un factor que influye en la capacidad antioxidante del extracto, en la tabla 82, se nota que a mayor dilución del extracto menor inhibición del radical ABTS.

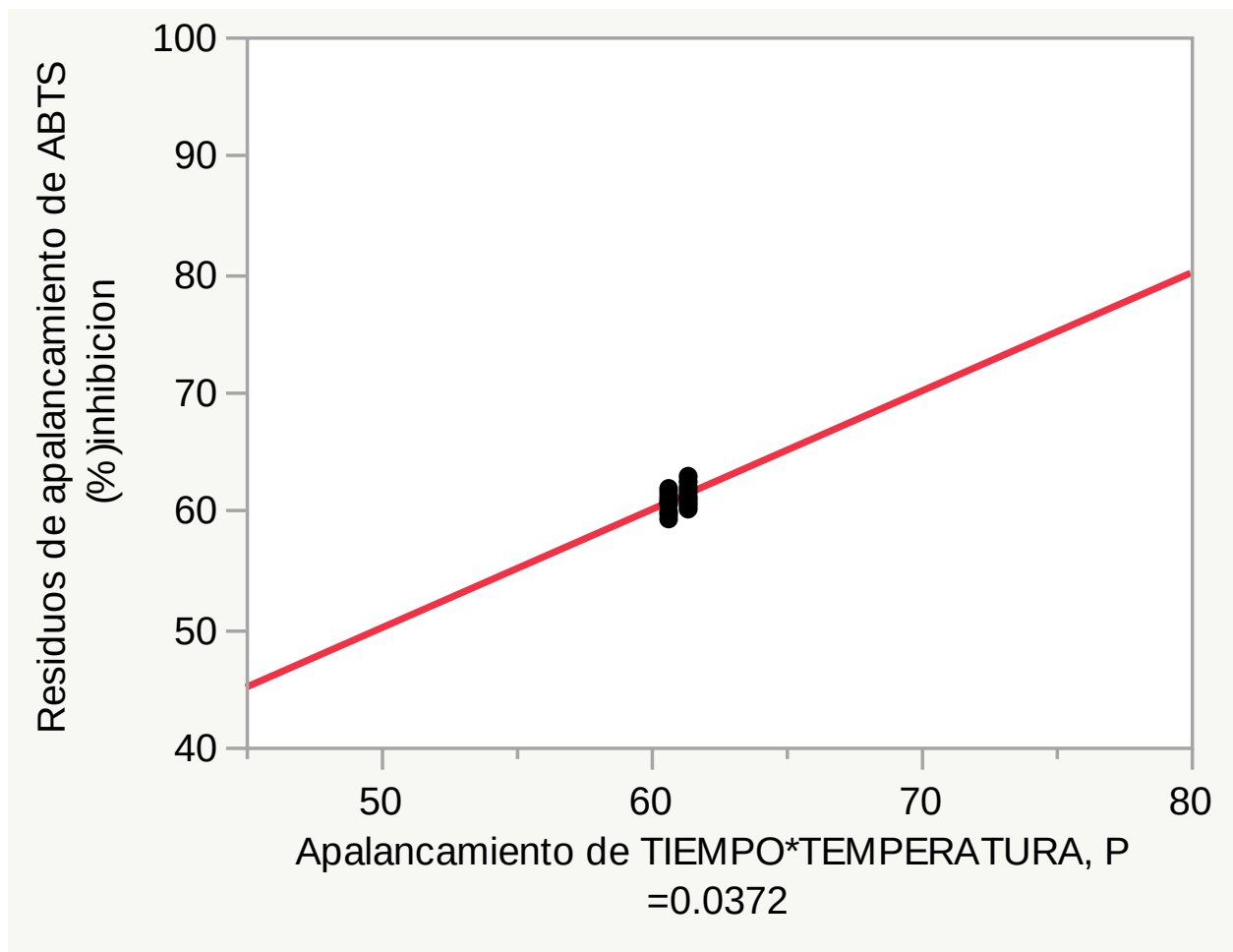


Figura 67. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA

Nivel				Media de mínimos cuadrados
10 h,50°C	A			75.71
10 h,30 °C		B		70.92
2 h,50°C			C	50.40
2 h,30 °C			D	47.06

Tabla 83. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

El efecto que ejerce la interacción tiempo y temperatura, presentados en la figura 67, es significativo con un valor $P < .05$, en la tabla 83, se observa que las medias son muy diferentes de acuerdo a las combinaciones siendo las de mejor porcentaje de inhibición el nivel A.

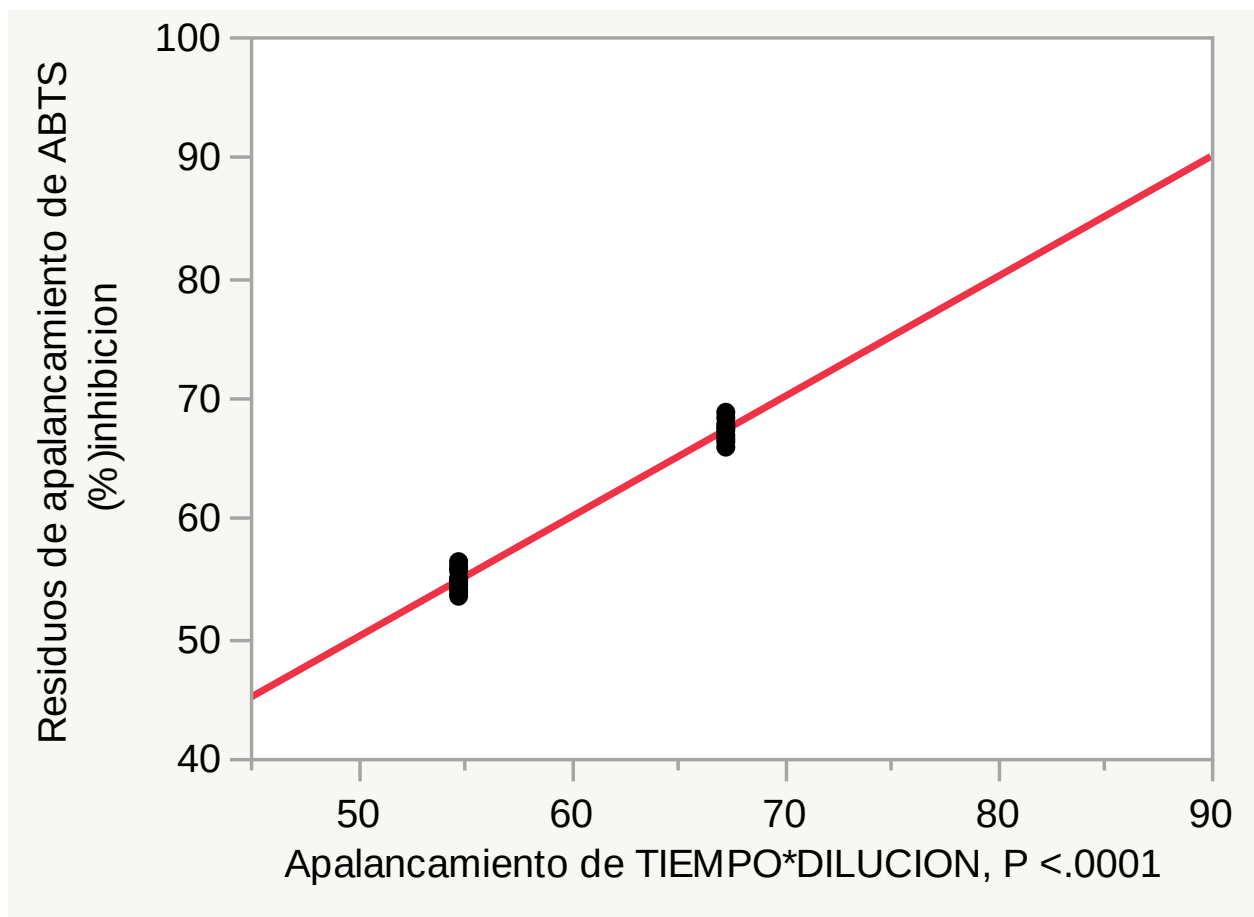


Figura 68. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibicion > TIEMPO*DILUCION

Nivel					Media de mínimos cuadrados
10 h,1g/50mL	A				87.89
10 h,1g/100mL		B			58.73
2 h,1g/50mL			C		50.79
2 h,1g/100mL				D	46.66

Tabla 84. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

En la figura 68, se muestra el efecto que ejerce la interacción tiempo dilución en torno a la inhibición del radical ABTS, es altamente significativo, en la tabla 84 se nota que las medias de cada nivel de combinación es diferente, siendo la que mejor inhibición del porcentaje presenta el nivel A, correspondiente a un tiempo de extracción de 10 hrs, y una dilución de 50 mL.

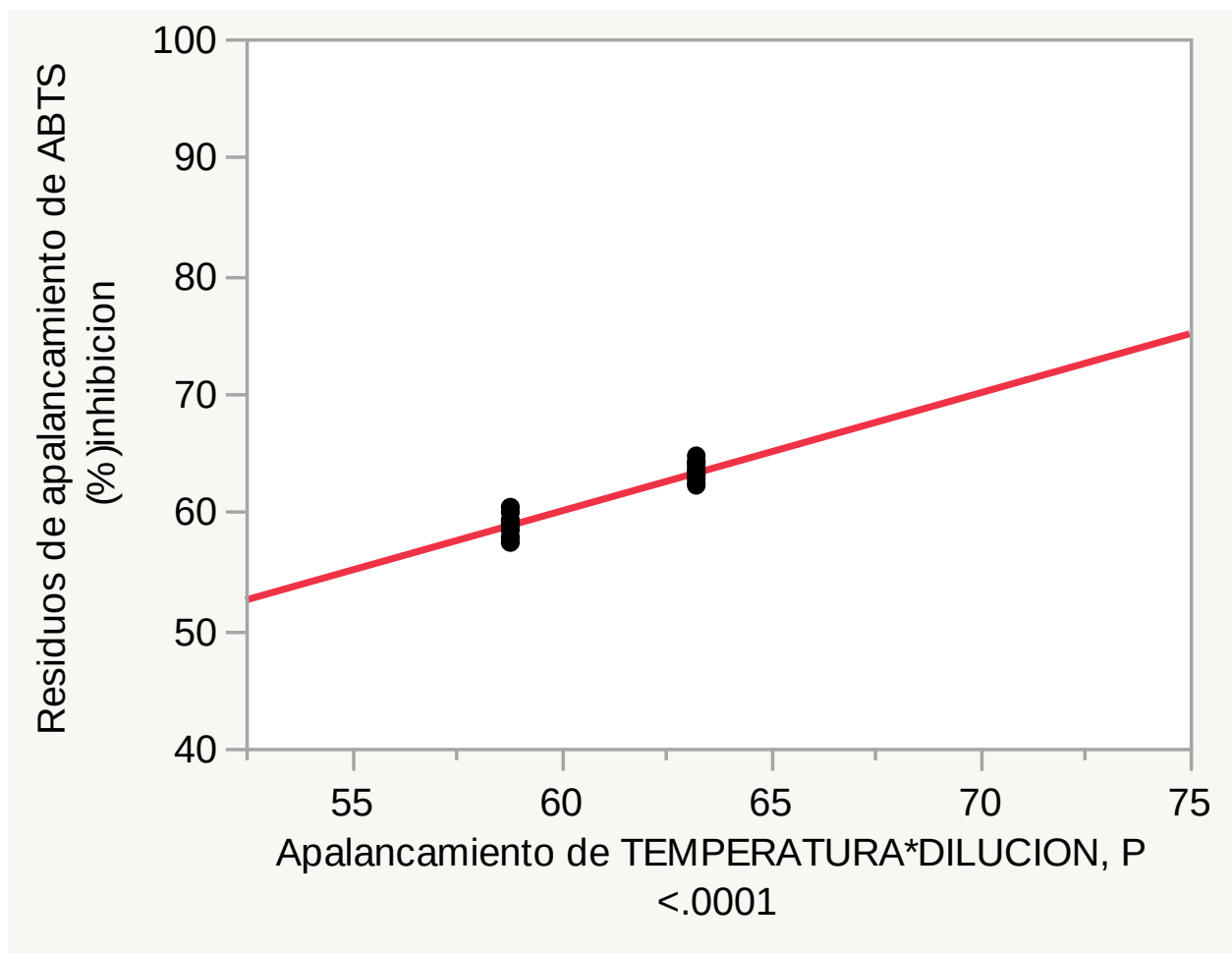


Figura 68. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibición > TIEMPO*DILUCION

Tabla 85. Tabla Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

Nivel				Media de mínimos cuadrados
50°C,1g/50mL	A			73.59
30 °C,1g/50mL		B		65.09
30 °C,1g/100mL			C	52.88
50°C,1g/100mL			C	52.52

En la figura 68, Se muestra que el efecto ocurrido por las variables temperatura y dilución, es altamente significativa, presentando un valor $P < .0001$, una media de inhibición del radical ABTS

de 75.5% para el nivel A (Tabla 85) caracterizada por una dilución de 50 mL y una temperatura de 50°C.

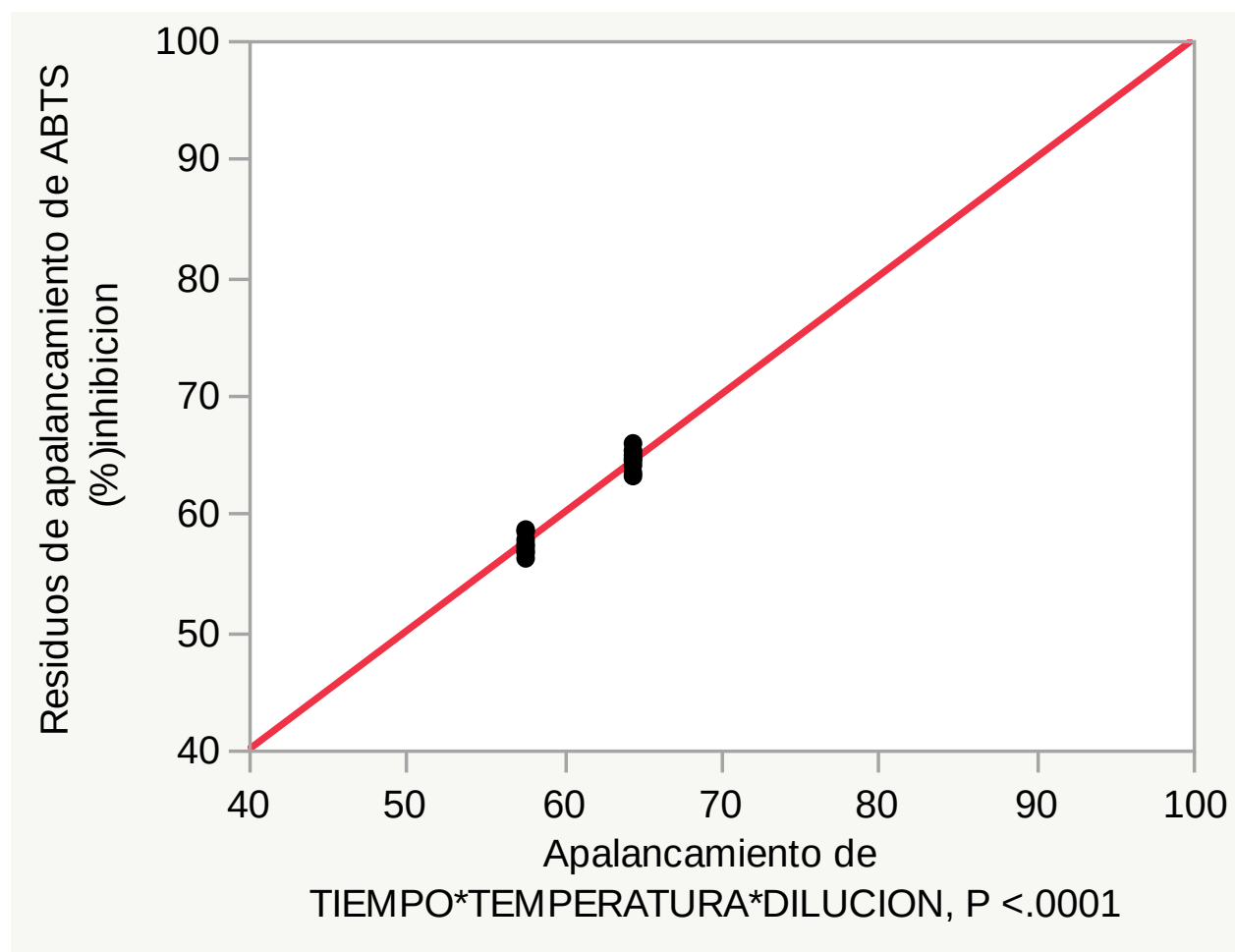


Figura 69. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta ABTS (%)inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION

Nivel							Media de mínimos cuadrados
10 h,50°C,1g/50mL	A						95.91
10 h,30 °C,1g/50mL		B					79.87
10 h,30 °C,1g/100mL			C				61.97
10 h,50°C,1g/100mL				D			55.50
2 h,50°C,1g/50mL					E		51.27
2 h,30 °C,1g/50mL					E		50.32
2 h,50°C,1g/100mL					E		49.53
2 h,30 °C,1g/100mL						F	43.80

Tabla 86. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

En la figura 69, se muestra que la combinación de las tres variables de interés tiene un efecto altamente significativo, y que afectan en la inhibición del radical ABTS, en la tabla 86, se muestran las medias de cada una de las combinaciones en torno al porcentaje de inhibición, destacan los niveles A,B, por ser los que mayor eficacia muestran, disminuyendo dicho radical hasta en un 95.9%

7.3.5 ENSAYO INHIBICIÓN DE RADICALES DPPH

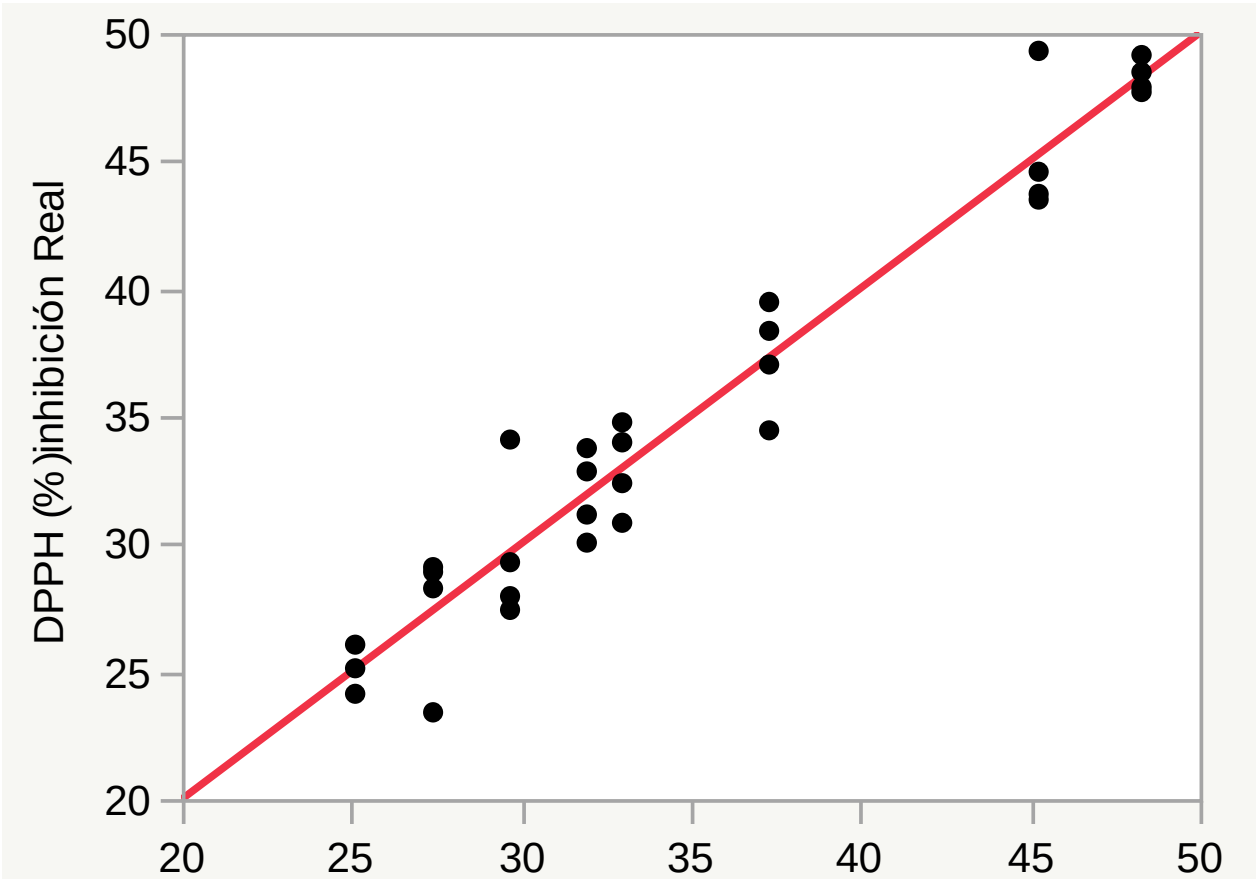


Figura 70. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (%)inhibición > Modelo completo

R cuadrado	0.947839
R cuadrado ajustado	0.932625
Raíz del error cuadrático medio	2.106596
Media de respuesta	34.74639
Observaciones (o suma de pesos)	32

Tabla 87. Resumen del ajuste

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	7	1935.3601	276.480	62.3019
Error	24	106.5059	4.438	Prob > F
C. Total	31	2041.8661		<.0001*

Tabla 88. Análisis de varianza

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
TIEMPO	1	1	271.1036	61.0904	<.0001*
TEMPERATURA	1	1	1.4915	0.3361	0.5675
DILUCION	1	1	1133.9093	255.5146	<.0001*
TIEMPO*TEMPERATURA	1	1	5.2998	1.1943	0.2853
TIEMPO*DILUCION	1	1	320.0765	72.1259	<.0001*
TEMPERATURA*DILUCION	1	1	171.9836	38.7547	<.0001*
TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION	1	1	31.4958	7.0972	0.0136*

Tabla 89. Pruebas de los efectos

De acuerdo a los resultados observados en la figura 70. El comportamiento de los resultados puede explicarse en un 94.7% de confiabilidad (Tabla 87), se obtuvo un valor $P < .0001$, siendo altamente significativos (Tabla 88), lo cual indica que las variables de interés influyen directamente en la efectividad del extracto para inhibir al radical DPPH. En la tabla 89 se muestra el resumen de cada una de las medias encontradas por factor e interacciones, así como su significancia.

TIEMPO

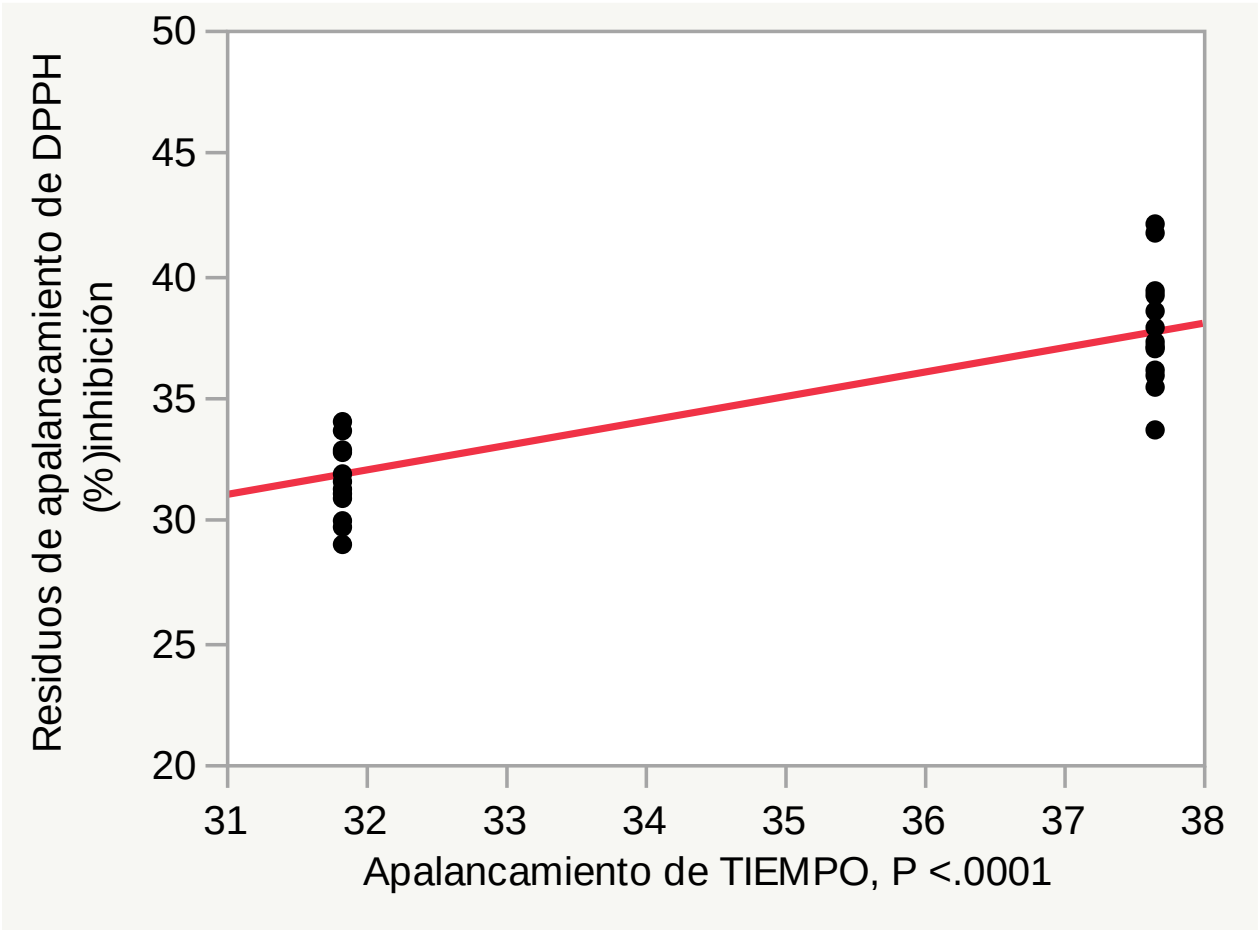


Figura 71. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (% inhibición) > TIEMPO

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
2 h	31.835726	0.52664905	31.8357
10 h	37.657062	0.52664905	37.6571

Tabla 90. Tabla de medias de mínimos cuadrados

En la figura 71, se aprecia que la variable tiempo, es altamente significativa, ambos tiempos de extracción presenta diferencias en sus medias (Tabla 90).

TEMPERATURA

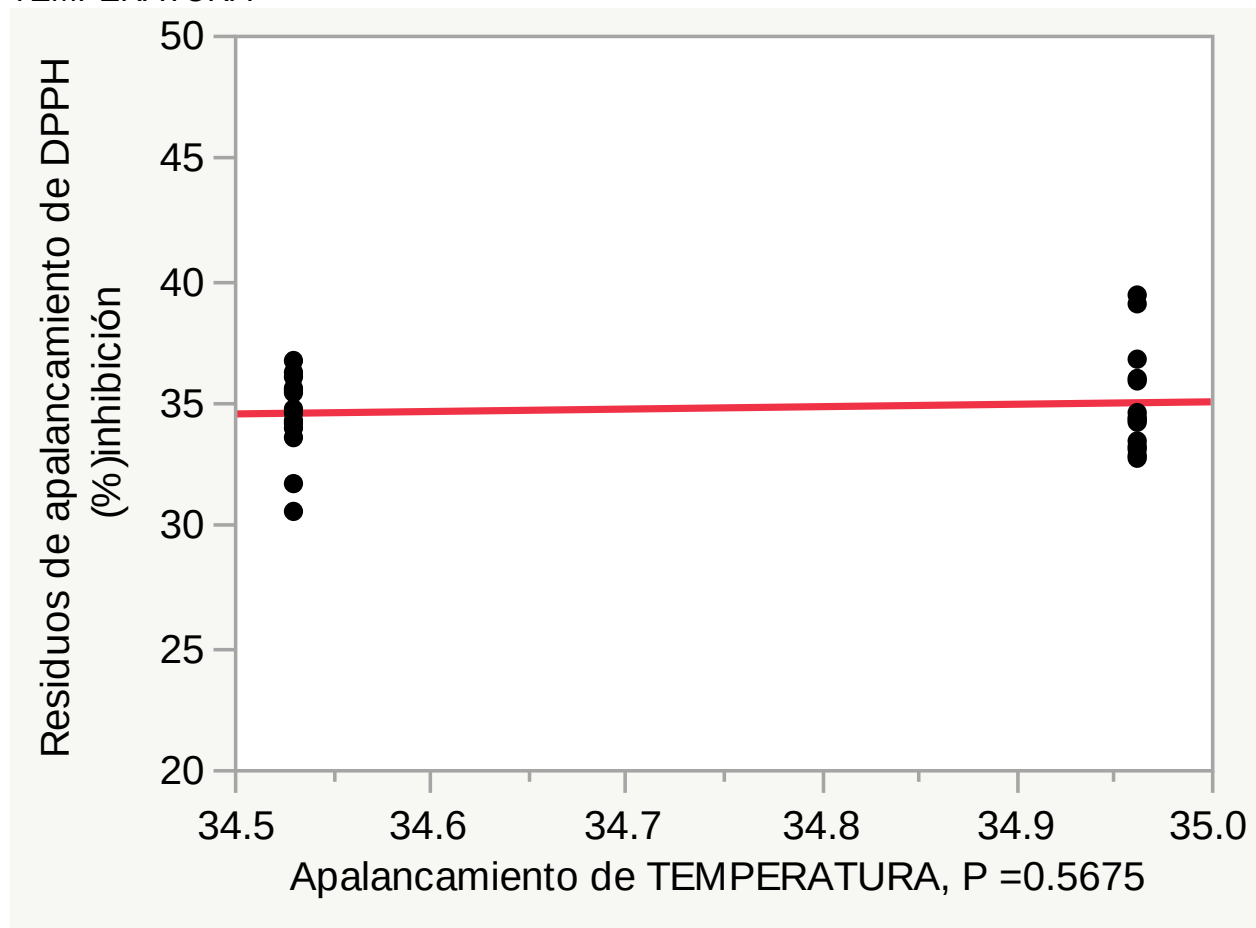


Figura 72. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (%)inhibición > TEMPERATURA

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
30 °C	34.962290	0.52664905	34.9623
50°C	34.530499	0.52664905	34.5305

Tabla 91. Tabla de medias de mínimos cuadrados.

De acuerdo a la figura 72, se notó que la temperatura por si sola, no resultó significativa, ya que de acuerdo a la tabla 91, se observa que las medias de cada grupo son similares.

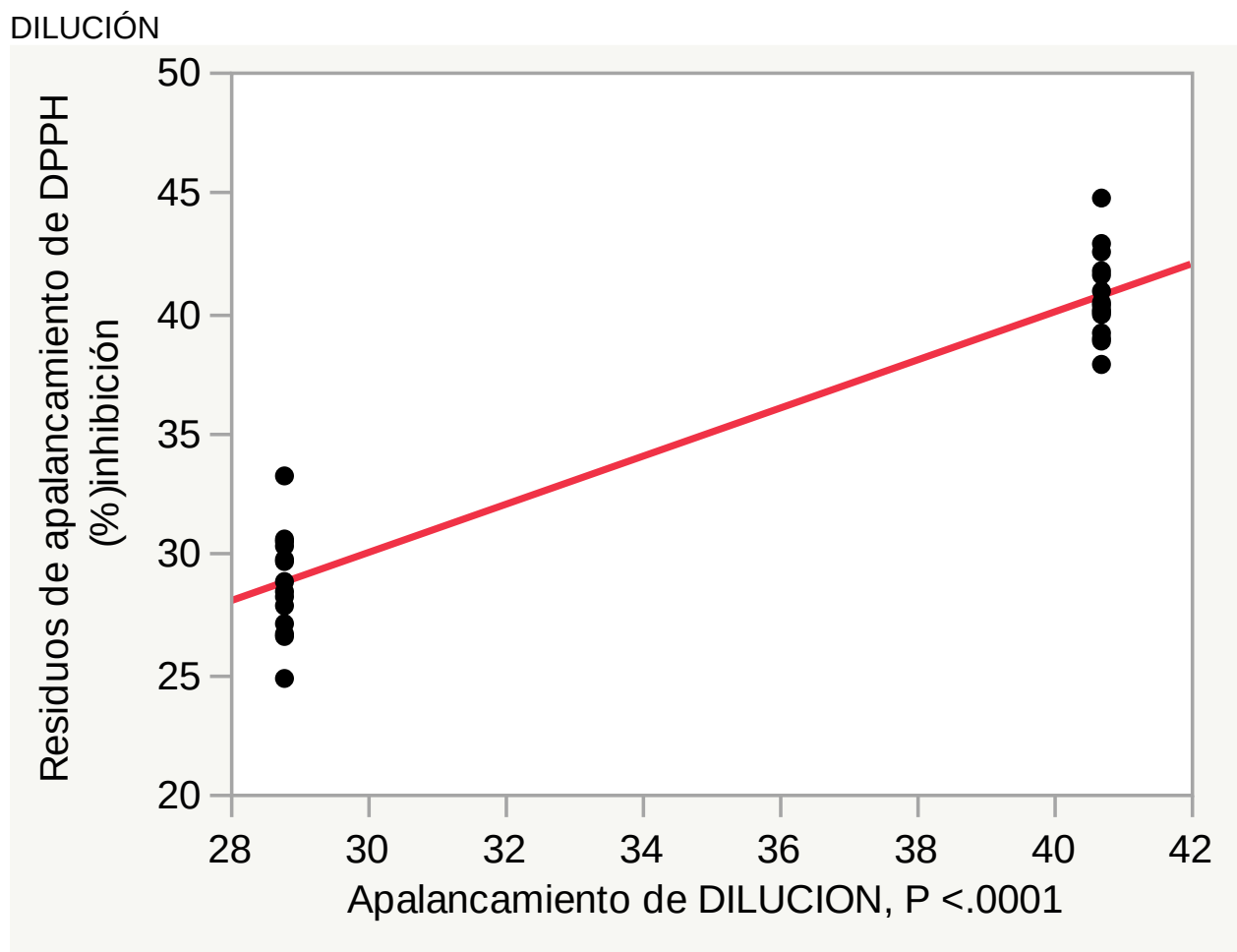


Figura 73. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (%)inhibición > DILUCION

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar	Media
1g/50mL	40.699097	0.52664905	40.6991
1g/100mL	28.793692	0.52664905	28.7937

Tabla 92. Tabla de medias de mínimos cuadrados

En contraste con la anterior, la dilución es un factor que influye en la capacidad de inhibición del radical DPPH, en la tabla 92, se muestra que las medias de cada grupo son diferentes.

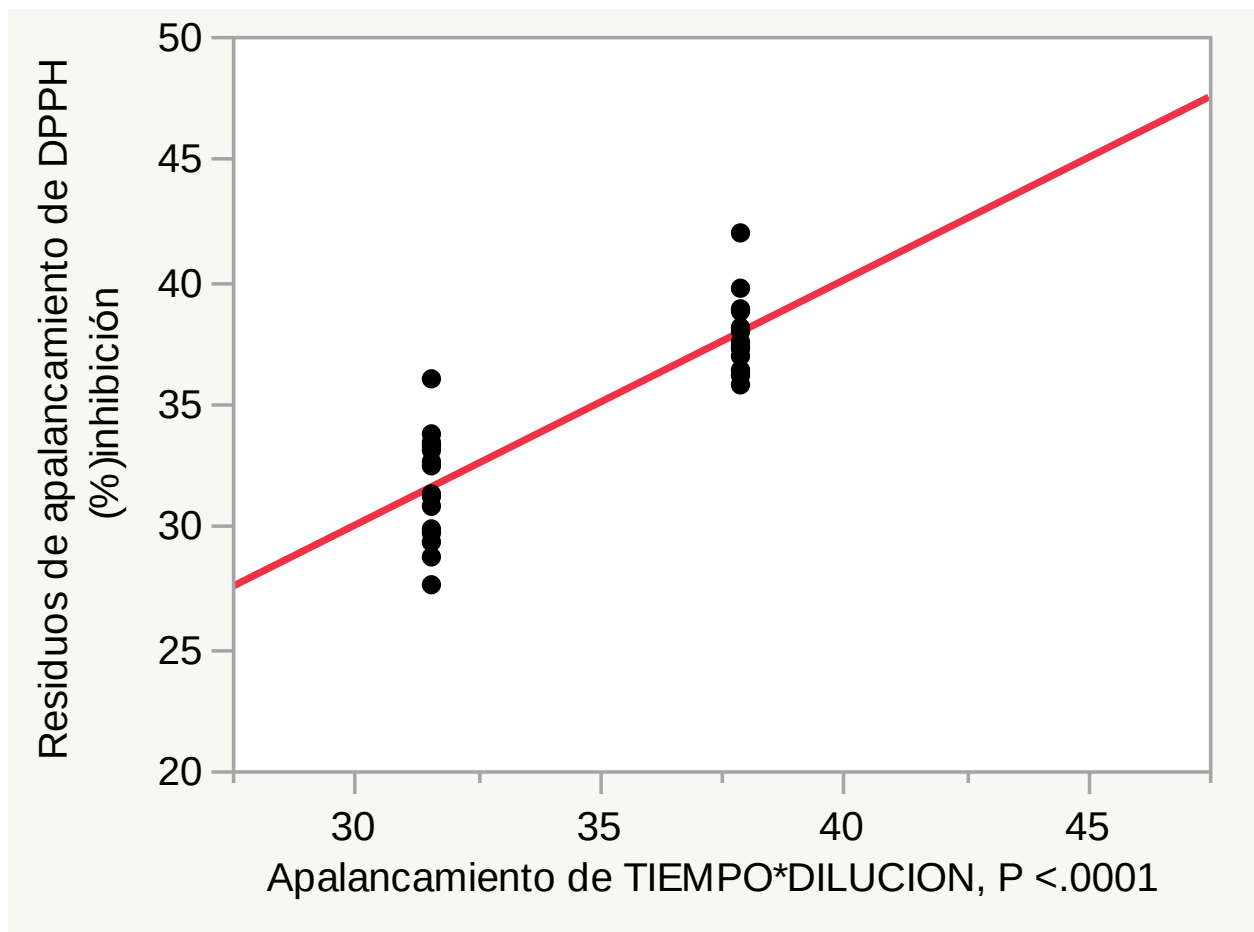


Figura 74. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (%)inhibición > TIEMPO*DILUCION

Nivel				Media de mínimos cuadrados
10 h,1g/50mL	A			46.77
2 h,1g/50mL		B		34.62
2 h,1g/100mL			C	29.04
10 h,1g/100mL			C	28.54

Tabla 93. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

El efecto de la interacción producida por tiempo y dilución es altamente significativo, se muestra en la figura 74, en la tabla 93, se nota que el nivel A, es el de mayor porcentaje de inhibición, y corresponde a un tiempo de extracción de 10 horas, y una dilución menor.

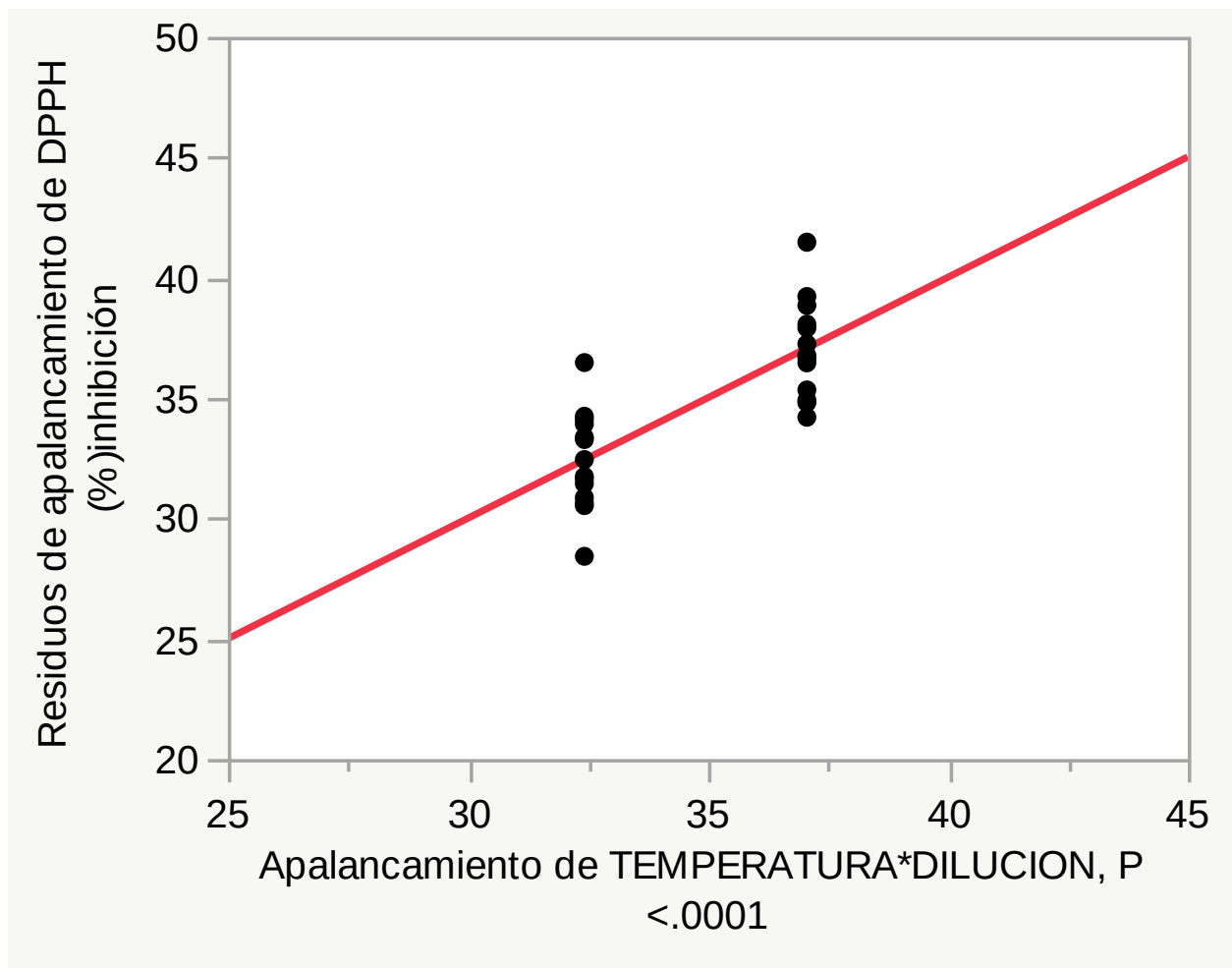


Figura 75. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (%)inhibición > TEMPERATURA*DILUCION

Nivel				Media de mínimos cuadrados
50°C,1g/50mL	A			42.80
30 °C,1g/50mL		B		38.59
30 °C,1g/100mL			C	31.32
50°C,1g/100mL			D	26.25

Tabla 94. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

En la figura 75, se muestra que la interacción entre temperatura y dilución es altamente significativa, en la tabla 94 se observa que cada una de las combinaciones pertenece a diferente grupo de medias, siendo la de mayor porcentaje de inhibición el nivel A, B. destacados ambos por tener una menor dilución.

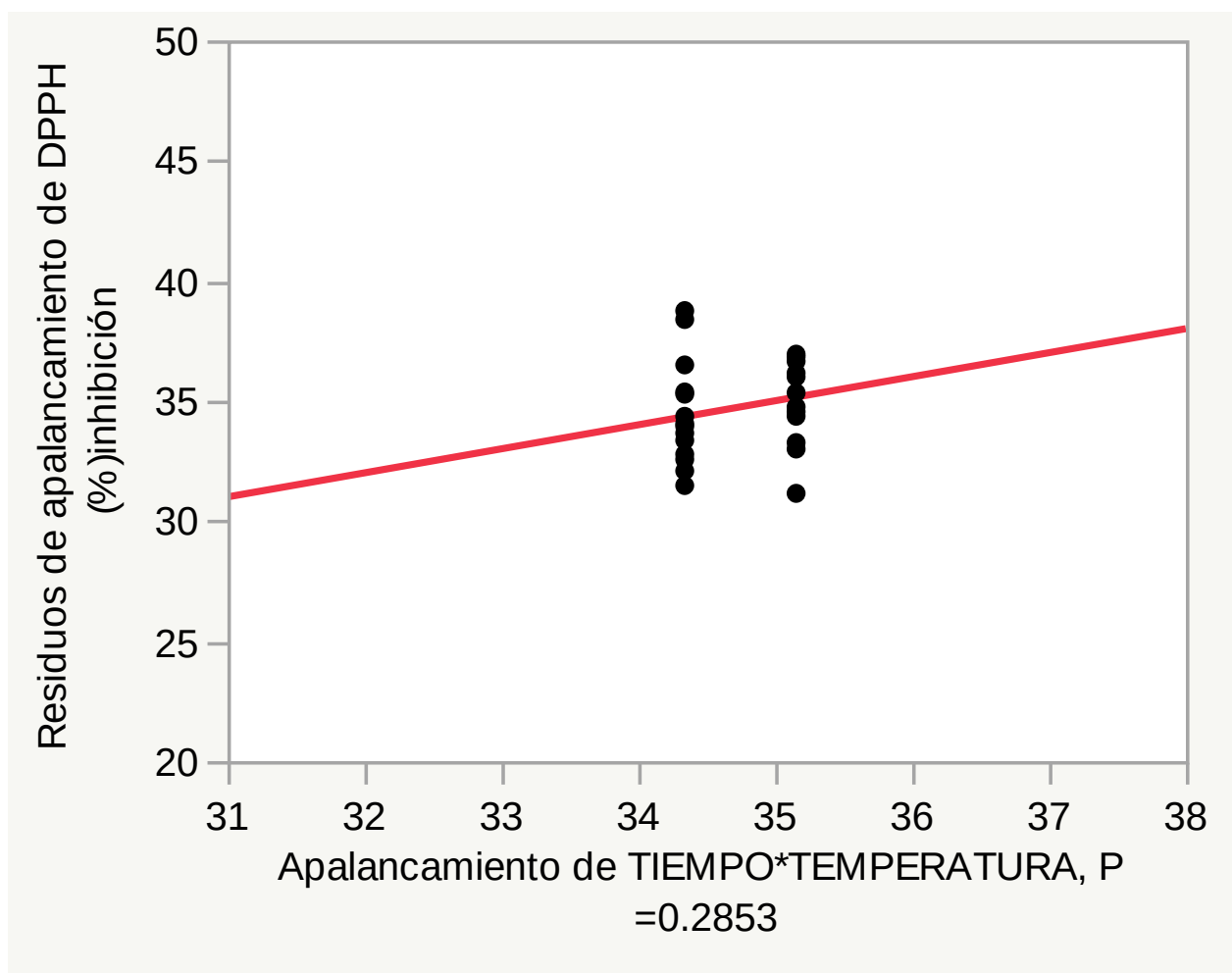


Figura 76. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (%)inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar
2 h,30 °C	32.458586	0.74479423
2 h,50°C	31.212867	0.74479423
10 h,30 °C	37.465993	0.74479423
10 h,50°C	37.848131	0.74479423

Tabla 95. Tabla de medias de mínimos cuadrados

De acuerdo a la figura 76, la interacción entre las variables tiempo y temperatura no son significativas por si solas, en la tabla 95, se muestran las medias de cada una de las combinaciones, todas pertenecientes al mismo grupo de medias.

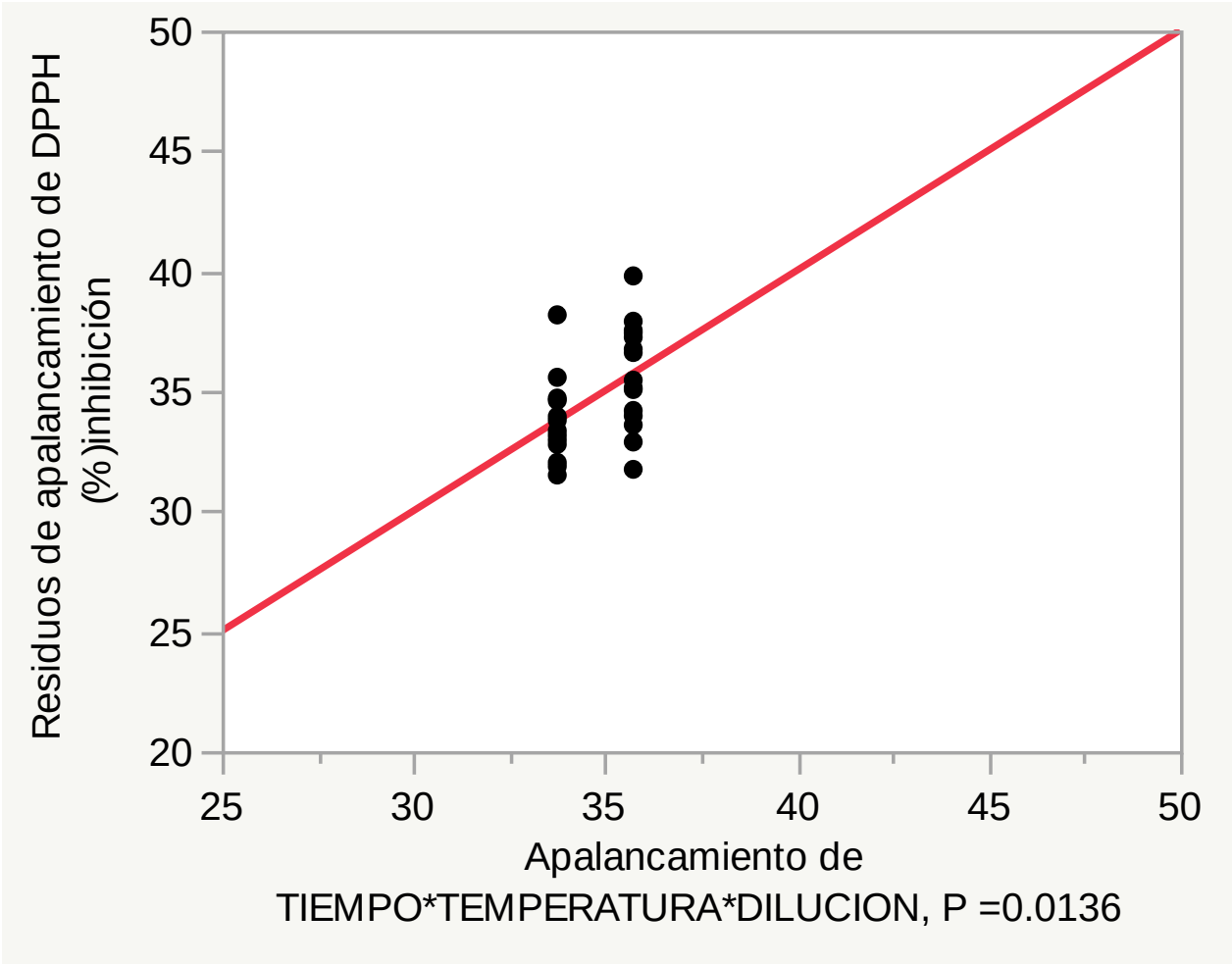


Figura 77. Ajuste por mínimos cuadrados > Respuesta DPPH (%)inhibición > TIEMPO*TEMPERATURA*DILUCION

Nivel						Media de mínimos cuadrados
10 h,50°C,1g/50mL	A					48.28
10 h,30 °C,1g/50mL	A					45.25
2 h,50°C,1g/50mL		B				37.31
2 h,30 °C,1g/100mL		B	C			32.97
2 h,30 °C,1g/50mL			C	D		31.93
10 h,30 °C,1g/100mL			C	D	E	29.67
10 h,50°C,1g/100mL				D	E	27.40
2 h,50°C,1g/100mL					E	25.11

Tabla 96. Prueba HSD de Tukey de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

De acuerdo a la figura 77, se observa que cada una de las variables produce un efecto en la capacidad de inhibición del radical DPPH, se observa un valor $P < .005$, por lo cual los resultados son significativos. En la tabla 96 se muestran cada una de las combinaciones, su media de inhibición en porcentaje, donde se observa que la combinación 10 h,50°C,1g/50mL y 10 h,30 °C,1g/50mL son las que mejor capacidad antioxidante ejercen. Destaca para estos niveles que el tiempo y la dilución son los factores que más influencia ejercen en comparación a la temperatura.

7.3.6 CONCLUSIÓN GENERAL DE LA EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

Se concluye que el modelo utilizado es confiable y puede explicar el comportamiento de los resultados encontrados, permitió conocer el efecto de cada una de las variables y sus interacciones.

Para el ensayo fenoles totales, se encontró que la combinación T1(10 h) T2 (50°C) y D1 (1g/50mL) obtuvo una mayor eficiencia de extracción correspondiente a 62.047297 mgEQ/g, en comparación a la combinación T1 (2 h), T1 (30 °C), D2 (1g/100mL) la cual obtuvo un 85.1% menor eficiencia de extracción. Por otro lado, se notó que la interacción producida por las 3 variables de interés es altamente significativa por lo tanto la elección de estos parámetros influye directamente en la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos.

Para el ensayo flavonoides, se observó que la combinación entre la temperatura y dilución es la que mayor influencia ejerce en torno a la eficiencia de extracción, siendo esta interacción altamente significativa, incluso aún mayor que los efectos producidos por las combinación de las tres variables. Destacando que la D1 (1g /50mL) y la T2 (50°C) son la combinación que se asocia a una mayor eficiencia de extracción de los compuestos, 289 mg/Eag en comparación a la combinación T1 (30 °C) y D2 (1g/100mL) que presentó un 54% menos cantidad de flavonoides extraídos.

Por otro lado para el ensayo ABTS, se encontró que la interacción ocurrida entre las tres variables de interés es altamente significativa, de acuerdo a los resultados encontrados, se notó que la combinación que se asocia a una mayor eficiencia de inhibición del radical DPPH fue la correspondiente al T2 (10 h), T2 (50°C) D1(1g/50mL) obteniendo un porcentaje de inhibición de 95.9% del radical ABTS en comparación a la combinación T1 (2 h) T1 (30 °C), D2 (1g/100mL) presentando un 43.8% de inhibición.

Por último, para el ensayo DPPH, se observó que las tres variables de interés poseen un efecto sinérgico en torno a la inhibición del radical, concuerda con los resultados anteriores, donde la mejor combinación corresponde a T2 (10 h), T2 (50°C) D1(1g/50mL) presentando un 48% de inhibición además de la combinación 10 h,30 °C,1g/50mL con un porcentaje de inhibición de

45.2%, ambas pertenecientes al mismo grupo de medias. Contrastan ambas combinaciones con el efecto producido por la interacción T1 (2 h) T2 (50 °C), D2 (1g/100mL) que obtuvo solo un 25.1% de inhibición del radical DPPH.

MEJORES COMBINACIONES POR AMBAS TÉCNICAS					
METODO	COMBINACION	POLIFENOLES	FLAVONOIDES	ABTS	DPPH
UAE	T2,T50,L30,D50	125.84 mgEQ/g	381.18 mgEAg/g	85.28%	40.2%
MC	T2, T50, D50	62.047297 mgEQ/g,	289 mgEAg/g	95.9%	48%
COMPARACIÓN DE ACUERDO AL ESTÁNDAR CONSTRUIDO					
ESTÁNDAR POLIFENOLES		110.12 mgEQ/g			
ESTÁNDAR FLAVONOIDES			222 mgEAg/g		
ESTÁNDAR ABTS				71%	
ESTÁNDAR DPPH					89.84%

Tabla 97. Comparación entre métodos estudiados y sus resultados.

7.4 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA O HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Para comprender el comportamiento de los resultados, se analizaron los extractos obtenidos, considerados como los mejores tratamientos en torno a la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos y flavonoides. En la Figura 78 se muestra el equipo utilizado para el análisis de los extractos. El análisis se llevó a cabo en el Centro Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán (CIDAM) y se utilizaron las siguientes condiciones:

Condiciones cromatográficas

Columna: C18 Ascentis Express 250 × 4.6 mm, 5 µm

Temperatura de columna: 35 °C

Volumen de inyección: 10 µL

Flujo: 0.8 mL/min

Fase móvil: A: Metanol, B: Ácido fórmico 1 %

Elución en gradiente: 0 – 5 min: 2 % A

5 – 15 min: 2 – 15% A

15 – 30 min: 15 – 25% A

30 – 35 min: 25 – 35% A

35 – 45 min: 35 – 55% A

45 – 50 min: 55% A

50 – 55 min: 55 – 2 % A

55 – 60 min: 2 % A

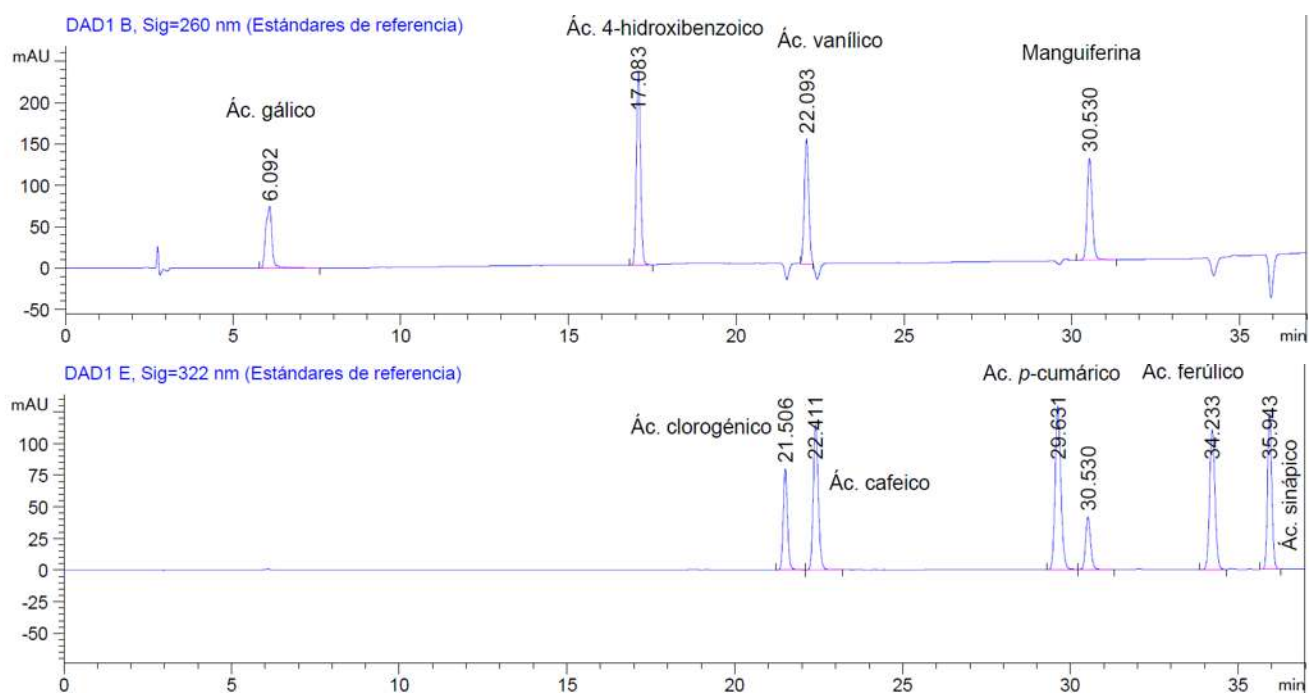
Post-time: 5 min

Detector DAD: 255, 260, 270, 310, 322, 370 nm



Figura 78. Equipo agilent technologies Infinity 1260 series

Para analizar y comparar los resultados, se construyeron los cromatogramas standard para los siguientes analitos:



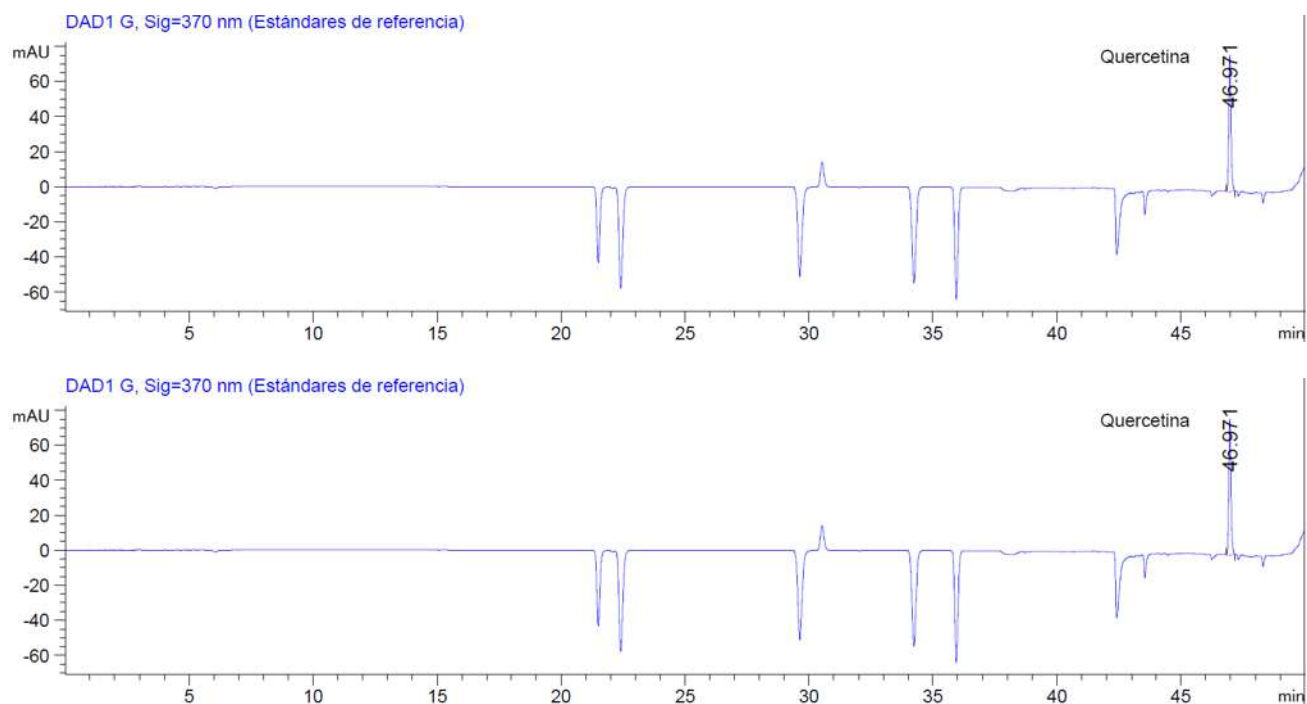


Figura. 79 Estándares contruidos

En la tabla 98, se muestran el resumen de los resultados encontrados de acuerdo a estudio cromatográfico.

Analito	Tr Standard	Tr Real Extracto	Longitud de onda	Área UAE	Área MC
Ácido Gálico	6.092	6.103	270 nm	10824.1	7432.2
Ácido 4-p-OH Benzoico	17.083	17.130	255 nm	217.255	
Ácido Clorogénico	21.506	ND	322 nm	ND	ND
Ácido Vánilico	22.093	ND	260 nm	ND	ND
Ácido Cafeico	22.411	ND	322 nm	ND	ND
Ácido p Cumarínico	29.631	ND	310 nm	ND	ND
Manguiferina	30.530	ND	255 nm	ND	ND
Ácido Fenólico	34.233	ND	322 nm	ND	ND
Ácido Sináptico	35.943	ND	322 nm	ND	ND
Quercetina	46.971	47.012	370 nm	47.8064	33.2836

Tabla 98. Tiempo de retención de metabolitos encontrados en HPLC.

En las siguientes figuras se aprecian los cromatogramas y el tiempo de retención (Tr) de cada uno de los analitos de interés de las muestras analizadas.

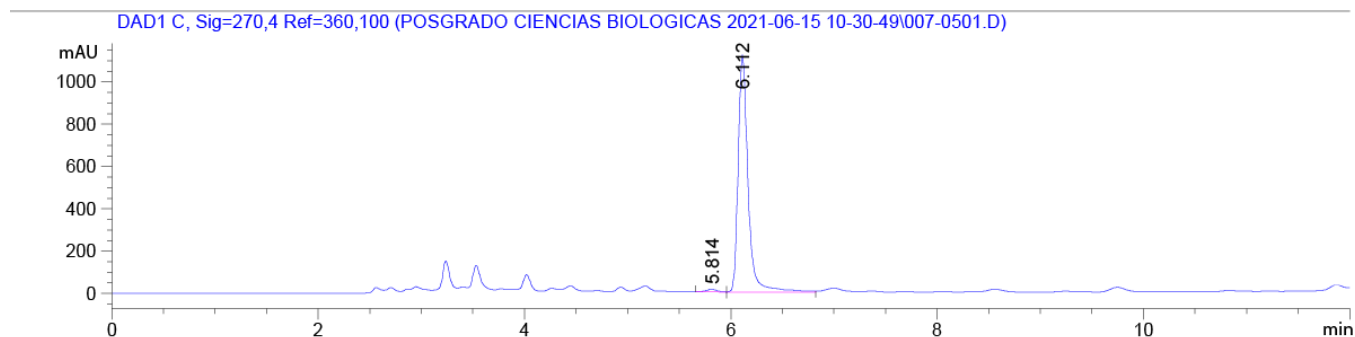


Figura 80. Tiempo de retención ácido gálico para extracto Hidrozac, método de extracción convencional por maceración (MC)

En la Figura 80 se aprecia que el Tr del ácido gálico es de 6.112 min, con un tamaño correspondiente a 7432.1 de área.

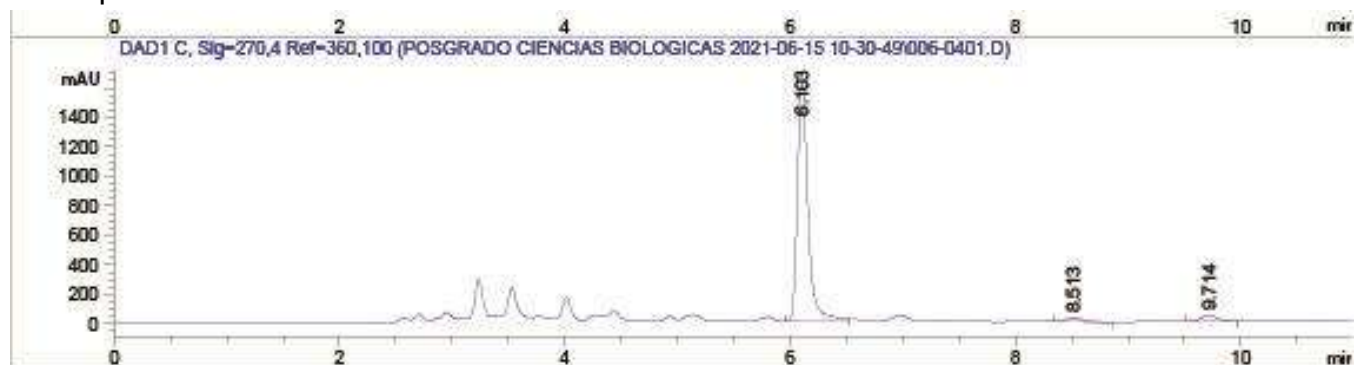


Figura 81. Tiempo de retención ácido gálico para extracto Hidrozac, método de extracción por ultrasonido (UAE)

Para el caso de UAE, se encontró que el Tr del ácido gálico fue de 6.103 min, con un área de 10,824.1, por lo cual se concluye que el área encontrada en UAE es 31.4 mayor que por MC y representa una mayor cantidad dicho compuesto.

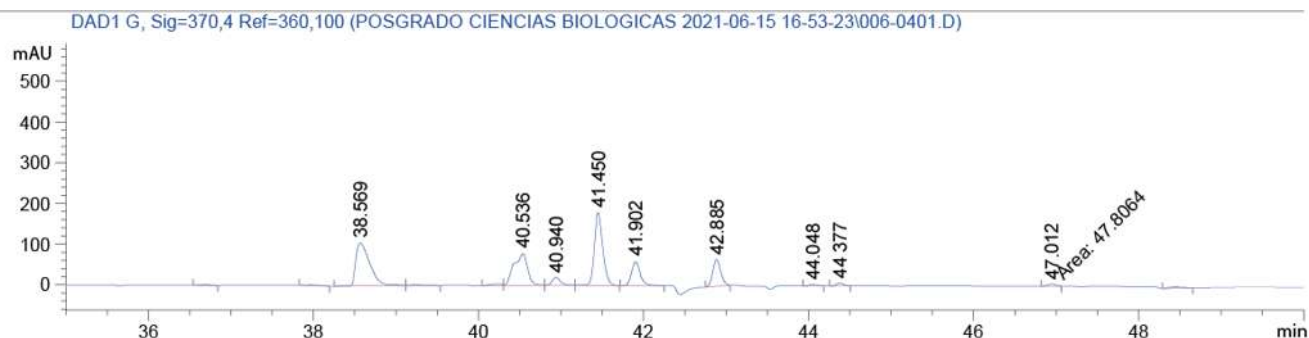


Figura 82. Tiempo de retención quercetina, para extracto Hidrozac, método de extracción por ultrasonido (UAE)

En el caso de los flavonoides, se muestra que contiene una gran cantidad de dichos compuestos, sin embargo, no fueron identificados por falta de insumos. El único que se muestra e identifica fue la quercetina con un tiempo de retención 47.012 min, y un tamaño de 47.8064 de área. Es importante señalar que específicamente para el caso de flavonoides la longitud de onda a 370 nm es la única absorbida por los mismos por lo cual, aunque, no se identifican los compuestos específicos, se concluye que son flavonoides los picos mostrados en el cromatograma.

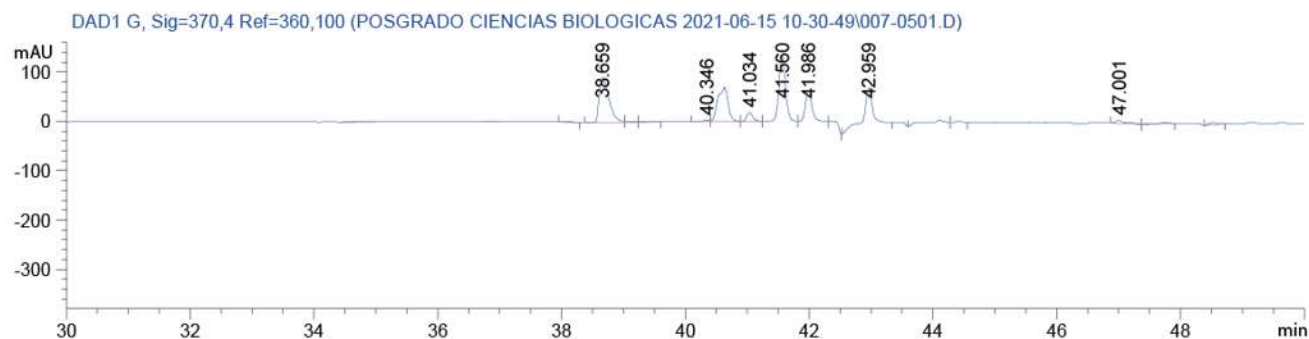


Figura 83. Tiempo de retención quercetina, para extracto Hidrozac, método de extracción convencional por maceración (MC).

En el caso del MC se aprecia la presencia de varios flavonoides, se identificó la presencia de quercetina con un Tr de 47.001, correspondiente a un tamaño de 33.2836 de área, un 30.4% menor cantidad de quercetina en comparación al UAE.

7.5 DISCUSIÓN CAPITULO I, SOBRE LOS RESULTADOS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN VIA UAE Y MACERACIÓN.

En la actualidad el uso de técnicas asistidas como el ultrasonido han sido bien aceptadas como uno de los métodos más atractivos para la extracción de diversos compuestos, basados en la versatilidad y practicidad del equipo (Rodríguez-Pérez, 2015) facilitando y acortando los tiempos de extracción con buenos resultados y escalable a nivel industrial.

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos e interacciones producidas por las variables involucradas en el proceso de extracción de compuestos fenólicos. En los resultados se observó que hubo diferencia significativa (t test $< .005$) entre ambos métodos de extracción, siendo la técnica asistida por ultrasonido (UAE) el método más eficiente, resultados que concuerdan con Muhammad et al. (2017), en donde reportó que esta técnica fue la que se relacionó a una mayor extracción de compuestos bioactivos, además de una mayor eficiencia del tiempo de extracción, en comparación al método convencional, estos resultados también concuerdan con Jovanović et al. (2016), el cual propone a partir de sus resultados que UAE podría ser usada como una técnica altamente exitosa, adecuada para la extracción de compuestos fenólicos.

Por otro lado, este estudio proporcionó información importante respecto a las diferentes combinaciones de las variables estudiadas de acuerdo al método de extracción, para el caso de ultrasonido se observó que tanto la amplitud, dilución, temperatura y tiempo, juegan un papel importante para la eficiencia de extracción de los componentes bioactivos.

Para la variable amplitud de onda sónica se encontró que tanto el 30% como el 50% de amplitud se asociaron a una mayor eficiencia de extracción, a mayor amplitud mayor rendimiento, resultados que concuerdan con Meullemiestre et al. (2016) que reportó que ciclos más amplios aumentaron la recuperación de los componentes. Para la variable dilución, la relación usada sólido/líquido fue uno de los factores de mayor relevancia, en este estudio se observó que 1g de hoja en 50mL de agua destilada, resultó en mayor eficiencia de extracción, en comparación a 1g de hoja en 100mL de agua destilada. Nuestros resultados concuerdan con

los encontrados por Muñiz-Márquez et al. (2013) quien observó que a menor relación sólido/líquido mayor rendimiento.

La variable temperatura se consideró una de las variables que determina en gran medida la cantidad de componentes extraídos, en este estudio la temperatura de extracción a 50°C se relacionó a una mejor recuperación de los compuestos fenólicos, en comparación a la temperatura ambiente, que fue de 30°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Garcia-Castello et al. (2015) quien señala que un incremento de las temperaturas mejoró el rendimiento de extracción. De acuerdo con los resultados encontrados para la variable tiempo se observó que un tiempo de ultrasonido de 20 min se asoció a mayor recuperación de los compuestos activos. Nuestros resultados concuerdan con Tomski et al. (2016) quien documento que a mayor tiempo mayor rendimiento. De acuerdo las variables implicadas se deben considerar las interacciones resultantes del modelo experimental, por esta razón, se recalca que de acuerdo a los resultados se concluye que la combinación de 20 min, temperatura de 50°C, 1g de hoja en 50mL de dilución y amplitud de onda a 50% o 30% se asociaron a mayor eficiencia de extracción y mayor inhibición del radical ABTS 85.28% y DPPH 40.2%, en este caso ambas amplitudes de onda se relacionaron a los mejores tratamientos, siendo cualquier elección de amplitud adecuada, y por otro lado poco significativa en comparación a las demás variables.

En el análisis del método convencional por maceración, destacan los siguientes puntos, el primero es que la maceración es una técnica convencional que ha sido muy usada para la extracción de compuestos bioactivos debido a su bajo costo y con buena eficiencia de extracción, es por esta razón que este trabajo analizó las principales variables involucradas en este proceso como es el tiempo, temperatura y dilución, las tres variables demostraron ser altamente significativas y la combinación de estas se asocia al grado de extracción de los compuestos.

En este estudio se observó que la combinación de tiempo de extracción de 10 h y temperatura de 50°C a una dilución de 1g de hoja em 50mL es el que se tuvo mayor eficiencia de extracción y mayor inhibición del radical ABTS (95%) y DPPH (48%). Tanto para UAE como

para MC se notó menor porcentaje de inhibición para el ensayo DPPH, infiriéndose que puede deberse a que el ensayo ABTS mide la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos; en cambio, el DPPH mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares (Mercado, 2013). En el extracto se encontró por HPLC, que contiene un gran número de flavonoides (Tabla 98) los cuales poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, por lo cual son considerados compuestos altamente polares.

En conclusión, los resultados indican que las técnicas asistidas como el ultrasonido son en la actualidad las que muestran una mayor eficiencia de extracción de componentes bioactivos, sin embargo, esta efectividad dependerá de las características de los compuestos a extraer y las condiciones a las que son sometidos dichos compuestos y la selección del método de extracción dependerá de la disponibilidad de los recursos, materiales, tiempo y presupuesto.

8. CAPITULO II DEL PROYECTO, INSTAURACIÓN DEL MODELO DE INFLAMACIÓN EN ROEDOR.

8.1 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1.1 DISEÑO DE DIETA PROINFLAMATORIA (DPI)

Se elaboró una dieta basada en la dieta occidental humana asociada a desarrollar obesidad y comorbilidades (Totsch et al., 2017), la cual se denominó dieta proinflamatoria (DPI), y su consumo desarrollará un estado inflamatorio crónico de bajo grado, que promueve la producción de citoquinas proinflamatorias ligadas a un estado de obesidad (Hotamisligil, 2006). DPI proporcionará una alta ingesta de energía (altas cantidades de grasa saturadas, monoinsaturadas y azúcares simples), sodio y glutamato monosódico.

En la Tabla 99 se muestran los sucedáneos utilizados para la formulación del DPI. Esta dieta se adaptó a las necesidades básicas de roedores con el aporte suficiente de vitaminas y minerales. El periodo de aplicación de la DPI fue de ocho semanas. Se agregaron tres componentes ligados a la dieta occidental y la obesidad; un alto consumo de grasas saturadas conduce a la instauración del síndrome metabólico, esteatosis hepática y resistencia a la

insulina en humanos y en ratas (Buettner et al., 2006). Por otro lado, el alto consumo de azúcares simples en la dieta favorece la persistencia de obesidad a través de cambios en el comportamiento dietético. Una dieta rica en azúcares simples en roedores se asoció a atracones continuos, exhibiendo conducta alterada en la saciedad, mayor motivación o ansiedad por la comida, generando persistencia de la hiperfagia en ratas (La Fleur et al., 2014). Por otro lado, el glutamato monosódico es potenciador del sabor añadido a comida de restaurantes, verduras enlatadas, sopas, carnes procesadas y otros alimentos, y su uso este arraigado a la cultura occidental.

Estudios indican que su consumo frecuente decrece las células β del páncreas, eleva niveles de colesterol, TNF- α y transaminasas. La adiponectina, reguladora de la oxidación de ácidos grasos y metabolismo energético disminuyó, así como la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, por consumo de glutamato monosódico (Hernández- Bautista et al., 2019).

Tabla 99. Sucedáneos utilizados para la formulación de DPI.

	Sucedáneos usados
Cubos purina	Cereales molidos
	Oleaginosas
	Harina de pescado
	Alfalfa
	Melaza de caña
	Vitaminas y minerales
Adicionados	Mantequilla
	Glutamato monosódico
	Azúcar refinada

En la Tabla 100 se muestra la composición nutrimental y de energía aportada por la DPI. Se estima un consumo inicial de 15 g (111 kcal/día/rata) de DPI hasta lograr 25 g de DPI por día/rata, llegando a un total de 184.4 kcal totales, que corresponde a un aumento del 59.45% de la DPI inicial. En la Tabla 101 se muestra la composición nutrimental y calorías de DPI.

Tabla 100. Composición de la DPI en porcentaje por fracción y macronutriente.

Características Bromatológicas de la DPI	
Fracción	%
Humedad	5.3
Grasa poliinsaturada	3
Grasa saturada	37
Cenizas	17.93
Fibra	2.69
Calcio	0.44
Proteína	10.3
Carbohidratos complejos	21.97
Carbohidratos simples	4.4

Tabla 101. Información nutricional DPI, por porción objetivo.

Información nutricional	Porción (25 g)	
1 porción	Kcal %	
Calorías totales por porción	184.4	
Grasa total (12 g)	108	58.5
Carbohidratos totales (13.35 g)	53.4	24.9
Azúcares añadidos (4.4 g)		
Proteínas (5.75 g)	23	12.47
Fibra (0.6 g)		

En la Figura 84 se muestra el pellet de la mezcla de sucedáneos de DPI, resultando, cubos de 25 g peso, los cuales se mantuvieron en continua producción durante la etapa experimental, siendo refrigeradas hasta su consumo por el modelo roedor.



Figura 84. Producto final de la elaboración de DPI.

Para el monitoreo de peso en este estudio se basó en las curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas macho Wistar (Cossio-Bolaños, 2013) el control de calidad de la medición del peso corporal de las ratas se describe en la Tabla 102.

<i>Edad (días)</i>	<i>L</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>P3</i>	<i>P10</i>	<i>P25</i>	<i>P50</i>	<i>P75</i>	<i>P90</i>	<i>P97</i>
21	0,38	62,71	0,16	44,40	50,10	56,20	62,70	69,70	77,20	85,10
28	0,59	101,47	0,15	73,30	82,30	91,70	101,50	111,70	122,30	133,30
35	0,79	143,12	0,13	105,90	118,00	130,40	143,10	156,00	169,20	182,50
42	0,98	185,78	0,12	141,00	155,90	170,80	185,80	200,70	215,70	230,70
49	11,63	226,30	0,11	176,30	193,20	209,90	226,30	242,60	258,60	274,60
56	13,04	263,28	0,10	210,10	228,30	246,00	263,30	280,30	296,90	313,30
63	13,89	295,93	0,09	241,00	259,80	278,10	295,90	313,30	330,40	347,10
70	14,16	323,68	0,08	267,80	286,90	305,50	323,70	341,40	358,80	375,80
77	13,89	346,57	0,08	290,10	309,40	328,20	346,60	364,60	382,30	399,70
84	13,19	365,46	0,08	308,20	327,60	346,70	365,50	383,90	402,10	420,00
91	12,28	380,98	0,08	322,40	342,20	361,70	381,00	400,00	418,90	437,60
98	11,14	393,78	0,08	333,30	353,60	373,80	393,80	413,40	433,40	453,00
105	10,07	404,79	0,08	342,00	363,00	383,90	404,80	425,60	446,60	467,00
112	10,09	415,12	0,08	349,70	371,50	393,30	415,10	436,90	458,70	480,50

Tabla 102. Valores de referencia del peso corporal en gramos, para ratas macho en función de edad cronológica.

Estos valores están distribuidos en percentiles en función de la edad cronológica (días). La edad que se consideró fue a partir de los 21 y hasta los 112 días de vida. En todos los percentiles, los valores se incrementaron con el transcurso de la edad. Se clasifican de la siguiente manera, mayor al percentil 90: estado de obesidad, percentil 75: sobrepeso, entre percentil 10 y 50: normopeso, menor de percentil 10: bajo peso.

En la Figura 84 se muestra una estimación del aumento de calorías en el estudio. Se estimó que para la semana 3 de inicio de aplicación de la dieta se alcanzaría un estado positivo de energía, llegando a un P75 para la semana 4 hasta un P90 para la semana 6 del estudio.

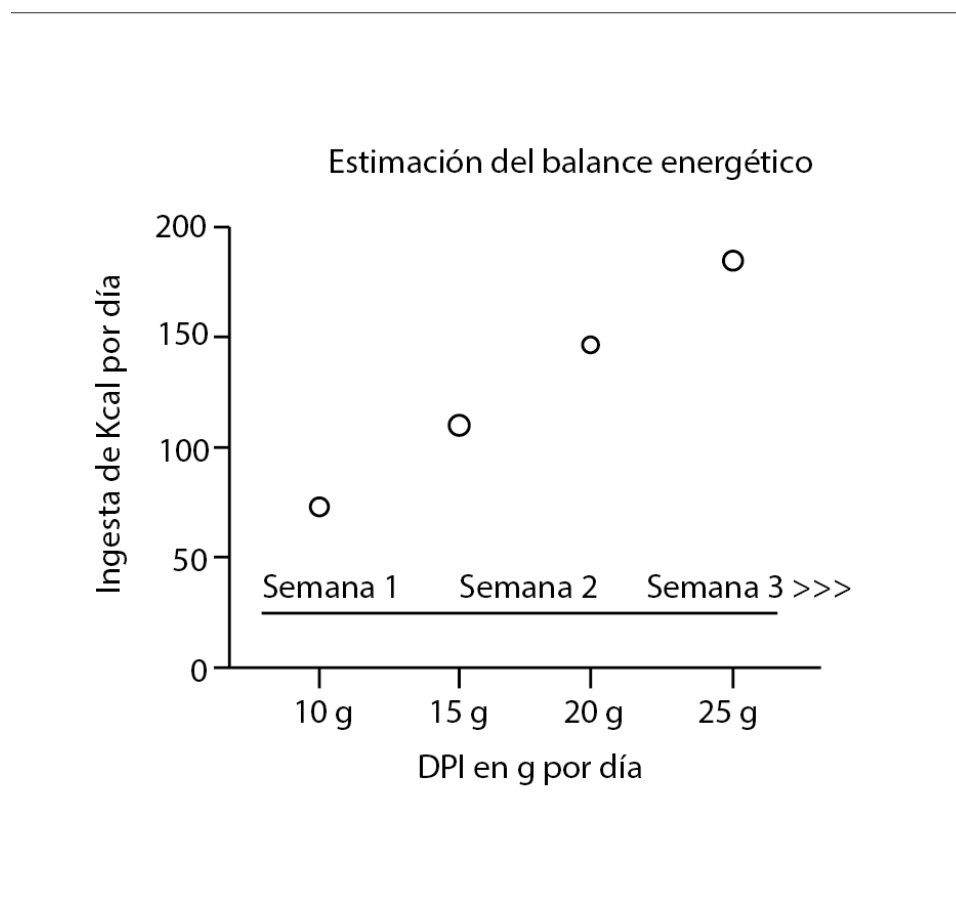


Figura 84. Estimación balance positivo energético DPI.

En la Figura 84 se muestra la estimación del aumento de peso por la aplicación de DPI. Se observó la instauración de obesidad, estimándose que se alcanzaría un peso de 300 g de peso por rata para la semana 3, correspondiente a un percentil 90–97, siendo un estado de obesidad en ratas. Se estimó llegar al estado de obesidad al finalizar la 4ta semana de inicio de la DPI.

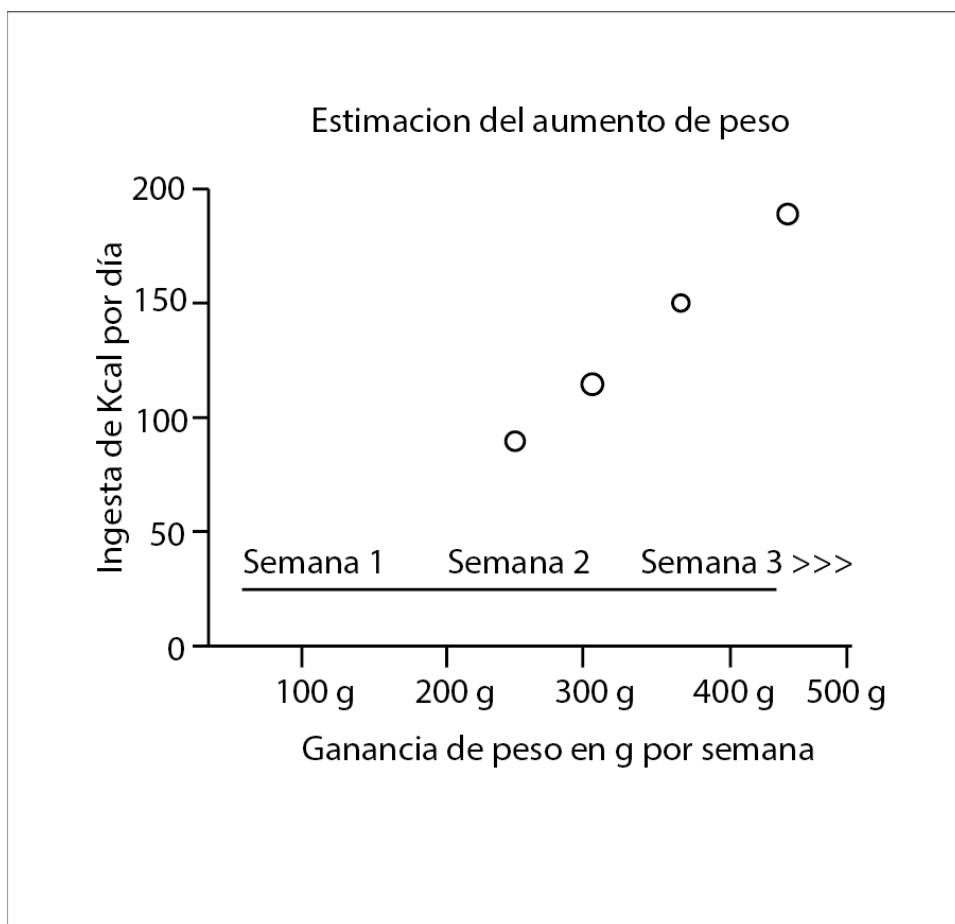


Figura 85. Desarrollo obesidad de acuerdo con las calorías ingeridas.

8.1.2 SELECCIÓN DE DOSIS Y REQUERIMIENTOS DE INSUMOS BIOLÓGICOS

La selección de dosis se basó en el índice NOAEL, el cual se refiere al mayor nivel de exposición sin efecto adverso observado. Para hojas de *Psidium guajava* se reporta un rango NOAEL de **50–5000 mg/kg de peso** (Babatola et al., 2019). En la Tabla 103 se muestran estudios con resultados significativos del uso de extractos y compuestos bioactivos en ratas.

Para el extracto acuoso se eligió la dosis de **500 mg/día** como dosis alta y **200 mg/día** como dosis baja. A continuación, se estiman las cantidades de dos componentes identificados por HPLC, en la fase II donde se encontró una concentración de 0.3258 mg/mL de extracto libre de quercetina y 4.533 mg/mL de extracto libre de ácido gálico. Previamente en la fase I del estudio se reportó que la concentración mayor de compuestos fenólicos en este proyecto fue de 125 mgEAg/mL. Para cumplir con el objetivo 2 se calcularon los mililitros de consumo de extracto acuoso de *P. guajava*.

<i>Compuesto bioactivo</i>	<i>Dosis</i>	<i>Tiempo (semanas)</i>	<i>Resultado</i>	<i>Autor</i>
Quercetina	2 mg/kg 10 mg/ kg *IV	10	Disminución de dislipidemia y presión arterial.	Rivera et al., 2012.
Quercetina Metanálisis	250 mg/día		Disminuyó estado inflamatorio en comorbilidades.	Guo, 2020.
Extracto acuoso de hoja de guayaba	125 mg/kg 250 mg kg 500 mg/kg	8	Disminuyó estrés oxidativo.	Diaz de Cerio et al., 2017.
Ácido gálico	50 mg/ kg 150 mg/kg	10	Disminuyó grasa hepática. Disminuyó colesterol total.	Hsu, et al., 2007.
Silimarina	150 mg/kg 300 mg/kg 500 mg / kg		Aumento en actividad de enzimas SOD, CAT, GPx. Hepatoprotector.	Pasaca et al., 2021.

Tabla 103. Extractos y compuestos bioactivos usados en ratas en estado inflamatorio.



Figura 85. Extractos acuosos de hoja de guayaba.

En la Figura 85 se aprecian las formulaciones de los tratamientos, los extractos presentan las siguientes características, textura uniforme, líquida sin residuos, de coloración verdosa, pH 4.13, sabor semi-amargo.

8.1.3 CALCULO MUESTRAL Y SELECCIÓN DEL NÚMERO DE ROEDORES

El tamaño de muestra se realizó con base al *cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales, valoración de incidencias (Rojo, 2014)*. A continuación, se detalla el cálculo de roedores con base a la siguiente fórmula:

$$X= N/ ((A/100) \times (B/100) \times (C/100) \dots)$$

Donde:

X = Número final de animales necesarios

N = Número mínimo estadístico que permite concluir los objetivos propuestos del proyecto

A = 100 - % de incidencia 1.

B = 100 - % de incidencia 2.

C = 100 - % de incidencia 3.

Estimación de la N mínima:

* N = 5 (Promedio de ratas encontrada en la literatura)

INCIDENCIA 1

$$A= 100 - 0\% = 100\%$$

(% de ratas que no desarrollará obesidad, 0% según literatura encontrada)

INCIDENCIA 2

$$B= 100 - 5\% = 95\%$$

(% de ratas que no mostró cambios bioquímicos en alguno de sus objetivos tratamiento)

INCIDENCIA 3

$$C = 100 - 5\% = 95\%$$

(Pérdida calculada por posibles pérdidas animales no atribuibles al procedimiento, sino al modelo animal, se estima un 1% a un 5%). Se elige 5% como el límite máximo.

Por lo tanto, la fórmula queda de la siguiente manera:

$$X = 5 / ((100/100) \times (95/100) \times (95/100))$$

$$X=5$$

Por lo tanto, los grupos se conformaron por 5 roedores, para limitar el uso de roedores. Las ratas se adquirieron en el Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro.

8.1.4 INTEGRACIÓN DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental formulado evaluó si existían diferencias significativas entre dosis alta y una baja del extracto acuoso, además infiere si existieran diferencias significativas en relación a los grupos control; comparó la acción antilipémica y antioxidante del extracto en ambas dosis frente a un antioxidante conocido, quercetina. Los grupos se muestran en la Tabla 104.

Tabla 104. Grupos de estudio modelo experimental.

Grupos	Compuesto bioactivo	Cantidad	Dieta	Percentil
Grupo 1	EAG	200 mg/día	DPI	P90
Grupo 2	EAG	500 mg/día	DPI	P90
Grupo 3	Q	200 mg/día	DPI	P90
Grupo 4	P	Agua <i>ad libitum</i>	DPI	P90
Grupo 5	C	Agua <i>ad libitum</i>	DEM	P50
Grupo 6	EAG	200 mg/día	DEM	P50
Etapas				
Peso Inicial		Es el primer peso obtenido a la llegada de los roedores.		

Peso de mantenimiento	<i>Es el peso obtenido durante la fase de adaptación con tipo de dieta estándar y agua ad libitum.</i>
Peso + 1 semana de DPI	<i>Es el peso obtenido a la primera semana de haber iniciado la instauración de la dieta proinflamatoria en los grupos de interés.</i>
Peso + 2 semanas de DPI	<i>Es el peso obtenido a las dos semanas de haber iniciado la instauración de la dieta proinflamatoria en los grupos de interés.</i>
Peso + 3 semanas de DPI	<i>Es el peso obtenido a las tres semanas de haber iniciado la instauración de la dieta proinflamatoria en los grupos de interés.</i>
Peso + 4 semanas de DPI	<i>Es el peso obtenido a las cuatro semanas de haber iniciado la instauración de la dieta proinflamatoria en los grupos de interés.</i>
Peso DPI + 1 Semana de tratamiento	<i>Es el peso obtenido a una semana de instauración de tratamiento de acuerdo al grupo interés y en la presencia de DPI.</i>
Peso DPI + 2 Semana de tratamiento	<i>Es el peso obtenido a dos semanas de instauración de tratamiento de acuerdo al grupo de interés y en la presencia de DPI.</i>

Abreviaturas, Extracto acuoso guayaba (EAG), Quercetina (Q), Placebo (P), Control (C) Dieta proinflamatoria (DPI)(PID), Dieta estándar de mantenimiento (DEM).

En la Figura 86, se muestra el diseño experimental completo.

Cronología del diseño Experimental

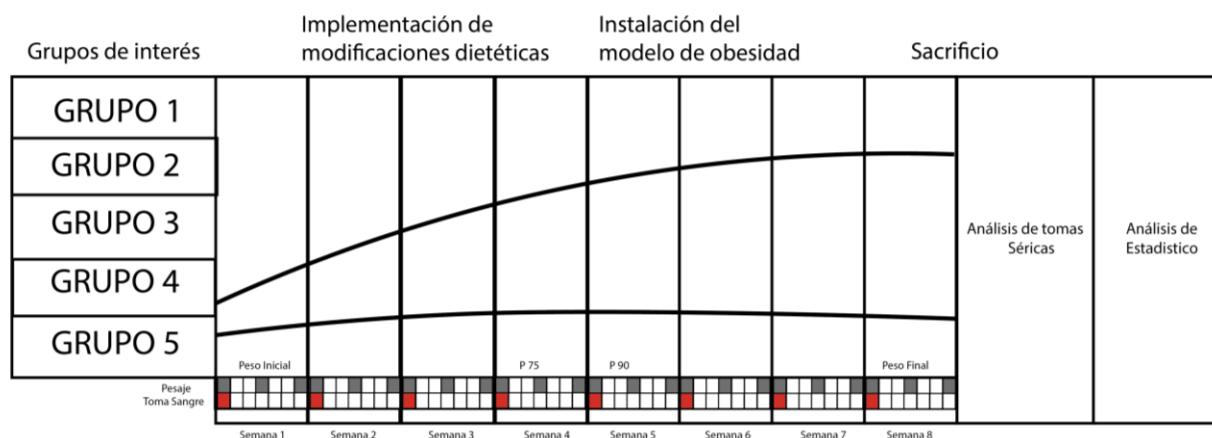


Figura 86. Diseño experimental del estudio de hojas de *Psidium guajava* en la disminución de los niveles de adipocinas proinflamatorias. 6 grupos experimentales, n= 30 ratas, 8 semanas de experimentación.

La etapa inicial consiste en el inicio de DPI, con un aumento progresivo de peso, hasta alcanzar un percentil 75 – 90, la semana 4, donde se pasa a la segunda etapa o mantenimiento de la obesidad llegando a la semana 8 del estudio. Desde el inicio de la primera etapa, se tomarán medidas de acuerdo con la siguiente frecuencia: medición de peso cada 3 días, toma de muestra sanguínea 3 a 5mL por rata 1 vez cada 2 semanas, generando 2 alícuotas, para su almacenamiento a -25°C para su posterior análisis. Toma de glucosa en ayuno, 1 vez por semana, durante 8 semanas. Cumplidas las 8 semanas se procesará y ejecutará el análisis estadístico de los resultados.

8.2 RESULTADOS CAPITULO II, MODELO DE INFLAMACIÓN EN ROEDOR.

8.2.1.PESO

Una de las variables más importantes en torno al desarrollo de la obesidad es el peso, por lo cual su medición se llevó a cabo en cada una de las etapas del tratamiento. En la Tabla 105 se muestra el resultado del análisis de medidas de tendencia central sobre la variable peso en gramos, de acuerdo con el grupo durante el periodo experimental.

Tabla 105. Medidas de tendencia central, variable peso.

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
Frecuencia		5	5	5	5	5	5
Peso Inicial	Media	430	442.4	440.4	437.4	437.2	431.4
	Std. Desviación	21.89	21.87	19.86	14.06	18.05	16.94
	Minimum	399	417	413	422	412	415
	Maximum	453	472	469	454	458	460
	Rango	54	55	56	32	46	45
	Media $\pm$ Std.	430 $\pm$ 21.89	442.4 $\pm$ 21.87	440.4 $\pm$ 19.86	437.4 $\pm$ 14.06	437.2 $\pm$ 18.05	431.4 $\pm$ 16.94
Peso de mantenimiento	Media	445.4	461.8	465.8	458	471.4	450
	Std. Desviación	11.84	29.78	30.09	33.84	20.79	27.45
	Minimum	435	425	448	413	451	429
	Maximum	460	503	519	501	505	498
	Rango	25	78	71	88	54	69

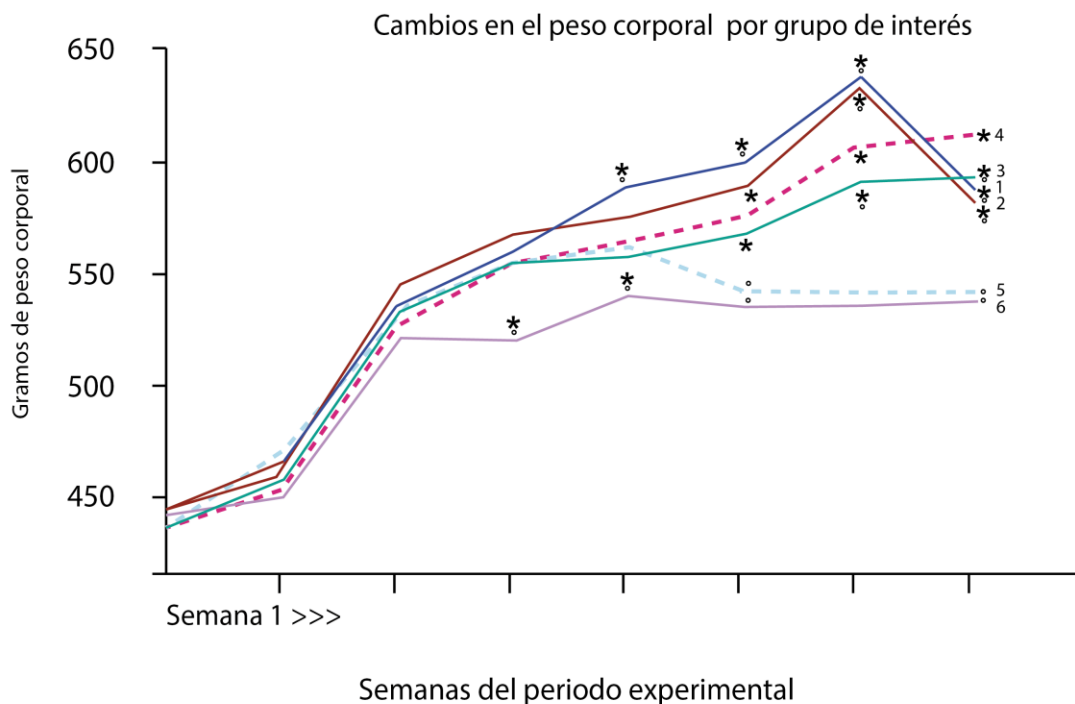
		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
Frecuencia		5	5	5	5	5	5
	Media $\pm$	445.4 $\pm$	461.8 $\pm$	465.8 $\pm$	458 $\pm$	471.4 $\pm$	450 $\pm$
	Std.	11.84	29.78	30.09	33.84	20.79	27.45
Peso + 1 semana de DPI	Media	535.4	545	533.2	527	546.6	522.6
	Std.	18.05	24.37	41.14	16.87	28.57	15.93
	Desviacion						
	Minimum	520	514	493	509	514	510
	Maximum	566	575	602	552	589	549
	Rango	46	61	109	43	75	39
	Media $\pm$	535.4 $\pm$	545 $\pm$	533.2 $\pm$	527 $\pm$	546.6 $\pm$	522.6 $\pm$
	Std.	18.05	24.37	41.14	16.87	28.57	15.93
Peso + 2 semanas de DPI	Media	560.4	566.4	554.2	555	553.6	520.6
	Std.	22.83	39.77	27.21	19.18	21.67	24.11
	Desviacion						
	Minimum	540	505	527	529	535	500
	Maximum	599	603	590	582	589	559

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
Frecuencia		5	5	5	5	5	5
Rango		59	98	63	53	54	59
Media $\pm$		560.4 $\pm$	566.4 $\pm$	554.2 $\pm$	555 $\pm$	553.6 $\pm$	520.6 $\pm$
Std.		22.83	39.77	27.21	19.18	21.67	24.11
Peso + 3 semanas de DPI	Media	588.6	576.2	558.4	566.4	562	539.6
	Std.	25.22	41.36	15.81	33.97	26.1	24.97
	Desviacion						
	Mínimum	566	511	539	520	535	515
	Máximum	632	617	576	612	599	578
	Rango	66	106	37	92	64	63
	Media $\pm$	588.6 $\pm$	576.2 $\pm$	558.4 $\pm$	566.4 $\pm$	562 $\pm$	539.6 $\pm$
Peso + 4 semanas de DPI	Std.	25.22	41.36	15.81	33.97	26.1	24.97
	Desviación						
	Mínimum	575	523	553	525	513	513
	Máximum	641	630	598	622	586	563

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
Frecuencia		5	5	5	5	5	5
Rango		66	107	45	97	73	50
Media $\pm$ Std.		598.4 $\pm$ 25.05	593.2 $\pm$ 43.05	571.2 $\pm$ 17.08	572.2 $\pm$ 37.02	542.4 $\pm$ 27.02	535.6 $\pm$ 22.11
Peso DPI + 1 Semana de tratamiento	Media	637.8	634.2	582	599.4	540.6	536.8
	Std. Desviación	36.8	26.77	31.39	22.6	30.79	25.97
	Mínimum	578	605	549	575	513	511
	Máximum	672	675	630	633	588	575
	Rango	94	70	81	58	75	64
	Media $\pm$ Std.	637.8 $\pm$ 36.8	634.2 $\pm$ 26.77	582 $\pm$ 31.39	599.4 $\pm$ 22.6	540.6 $\pm$ 30.79	536.8 $\pm$ 25.97
Peso DPI + 2 Semanas de tratamiento	Media	587.4	582.6	595	592.8	540.2	537.6
	Std. Desviación	26.58	17.49	17.76	40.33	33.38	31.88

	Grupo					
	1	2	3	4	5	6
Frecuencia	5	5	5	5	5	5
Mínimum	545	554	574	551	509	510
Máximum	610	600	613	639	596	582
Rango	65	46	39	88	87	72
Media $\pm$	587.4 $\pm$	582.6 $\pm$	595 $\pm$	592.8 $\pm$	540.2 $\pm$	537.6 $\pm$
Std.	26.58	17.49	17.76	40.33	33.38	31.88

En la Figura 87 se muestra de manera representativa los cambios obtenidos de la variable peso durante el periodo experimental.



El * indica una diferencias significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control DE + *agua ad libitum* (5).

El ° indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo de control DPI + *agua ad libitum* (4).

El + indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) exclusiva entre el grupo DPI + 200 EAG, y el grupo DPI+500 EAG, (1,2).

Figura 87. Cambio de peso durante el periodo experimental.

La Figura 87 muestra los grupos del diseño experimental en torno al cambio de la variable peso. El grupo 1 y 2 muestran una gran diferencia significativa en el cambio de peso en las diferentes etapas del diseño experimental, en comparación a los demás grupos de interés, mostrando un incremento continuo de peso alcanzando su límite superior a la primera semana del inicio del tratamiento con el extracto acuoso, y mostrando una disminución de peso hasta en un 8 a 10% en ambos tratamientos a las 2 semanas de inicio.

Prueba de hipótesis

		df	Error Cuadrático	F	p
Tratamientos		7	94,852.89	165.98	<.001
Within		210	3,714.19		
Error		203	571.48		

Tabla 105. Anova de las diferencias intergrupales respecto al peso durante el periodo experimental.

Prueba de hipótesis

Hipótesis nula

No hay diferencia entre cada una de las variables dependientes.

Hipótesis alternativa

Hay diferencia entre cada una de las variables dependientes.

Se acepta la hipótesis alternativa.

Los resultados encontrados, afirman que cada uno de los tratamientos utilizados, ejerce influencia significativa sobre el peso durante el periodo experimental.

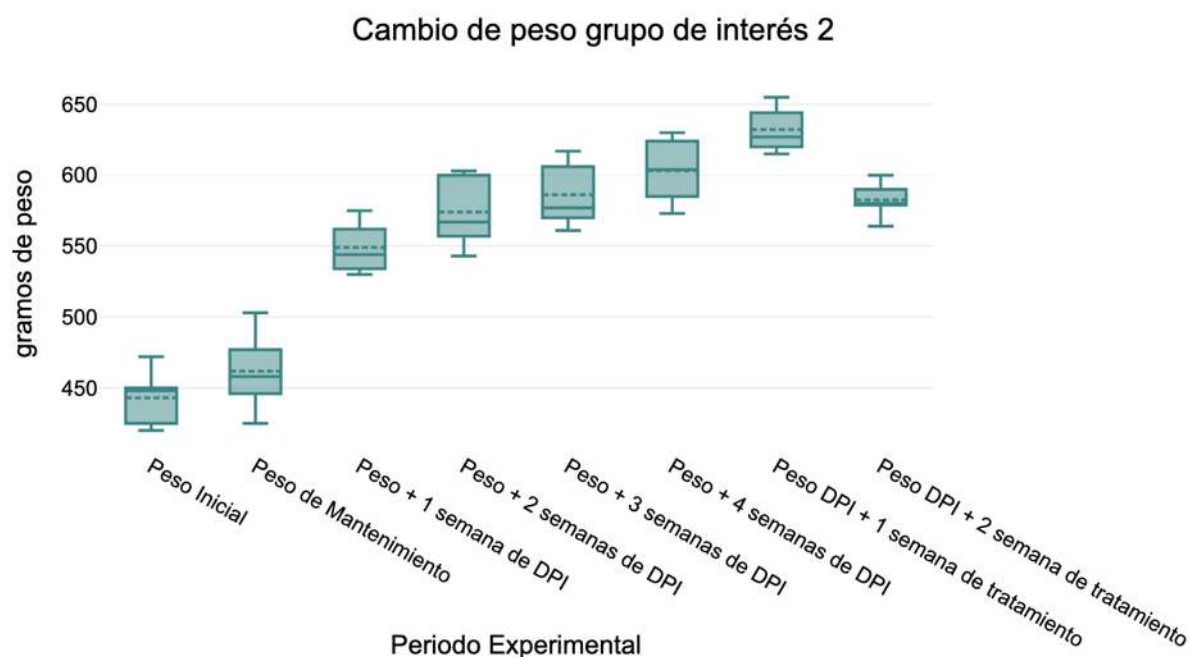


Figura 88. Aumento de peso corporal de acuerdo con el período experimental.

En la figura 88, se muestra el periodo de evolución del peso del grupo 2 de interés, es notable el cambio de peso en cada una de las etapas del estudio, se muestra que el peso inicial evoluciona hasta lograr un balance positivo en el peso alcanzando el pico más alto a la quinta semana del protocolo, esta semana es la primera semana donde hay toma de extracto acuoso a 500mg/kg/día, sin embargo, para sexta semana, es notable un cese del aumento ponderal con decremento del mismo llegando a una disminución del 8.2% para la última semana del protocolo.

Tabla 106. Medias y desviación estándar entre grupos de interés.

		Media dif.	Std. Error	p	95% CI Límite inferior	95% CI Límite superior
Peso Inicial	Peso Mantenimiento	-22.27	5.027	.003	-32.55	-11.99
Peso Inicial	Peso + 1 semana de DPI	-98.5	4.94	<.001	-108.6	-88.4
Peso Inicial	Peso + 2 semanas de DPI	-115.23	5.511	<.001	-126.5	-103.96
Peso Inicial	Peso + 3 semanas de DPI	-128.73	5.867	<.001	-140.73	-116.74
Peso Inicial	Peso + 4 semanas de DPI	-132.37	6.788	<.001	-146.25	-118.49
Peso Inicial	Peso DPI + 1 semana de tratamiento	-152	9.125	<.001	-170.66	-133.34
Peso Inicial	Peso DPI + 2 semanas de tratamiento	-136.13	6.858	<.001	-150.16	-122.11
Peso de Mantenimiento	Peso + 1 semana de DPI	-76.23	6.011	<.001	-88.53	-63.94
Peso de Mantenimiento	Peso + 2 semanas de DPI	-92.97	6.404	<.001	-106.06	-79.87
Peso de Mantenimiento	Peso + 3 semanas de DPI	-106.47	7.26	<.001	-121.31	-91.62

		Media dif.	Std. Error	p	95% CI Límite inferior	95% CI Límite superior
Peso de Mantenimiento	Peso + 4 semanas de DPI	-110.1	8.184	<.001	-126.84	-93.36
Peso de Mantenimiento	Peso DPI + 1 semana de tratamiento	-129.73	10.33	<.001	-150.86	-108.61
Peso de Mantenimiento	Peso DPI + 2 semanas de tratamiento	-113.87	8.361	<.001	-130.96	-96.77
Peso + 1 semana de DPI	Peso + 2 semanas de DPI	-16.73	3.152	.001	-23.18	-10.29
Peso + 1 semana de DPI	Peso + 3 semanas de DPI	-30.23	4.251	<.001	-38.93	-21.54
Peso + 1 semana de DPI	Peso + 4 semanas de DPI	-33.87	5.416	<.001	-44.94	-22.79
Peso + 1 semana de DPI	Peso DPI + 1 semana de tratamiento	-53.5	8.051	<.001	-69.96	-37.04
Peso + 1 semana de DPI	Peso DPI + 2 semanas de tratamiento	-37.63	6.424	<.001	-50.77	-24.5
Peso + 2 semanas de DPI	Peso + 3 semanas de DPI	-13.5	2.925	.002	-19.48	-7.52
Peso + 2 semanas de DPI	Peso + 4 semanas de DPI	-17.13	3.824	.003	-24.95	-9.31

		Media dif.	Std. Error	p	95% CI Límite inferior	95% CI Límite superior
Peso + 2 semanas de DPI	Peso DPI + 1 semana de tratamiento	-36.77	6.813	<.001	-50.7	-22.84
Peso + 2 semanas de DPI	Peso DPI + 2 semanas de tratamiento	-20.9	5.313	.013	-31.77	-10.03
Peso + 3 semanas de DPI	Peso DPI + 4 semanas de tratamiento	-3.63	2.791	1	-9.34	2.08
Peso + 3 semanas de DPI	Peso DPI + 1 semana de tratamiento	-23.27	6.36	.028	-36.27	-10.26
Peso + 3 semanas de DPI	Peso DPI + 2 semanas de tratamiento	-7.4	4.893	1	-17.41	2.61
Peso + 4 semanas de DPI	Peso DPI + 1 semana de tratamiento	-19.63	4.716	.007	-29.28	-9.99
Peso + 4 semanas de DPI	Peso DPI + 2 semanas de tratamiento	-3.77	3.991	1	-11.93	4.4
Peso DPI + 1 semana de tratamiento	Peso DPI + 2 semanas de tratamiento	15.87	5.556	.22	4.5	27.23

El resultado de las pruebas post Hoc indicó que existió diferencia significativa en grupos y tratamientos en el periodo experimental, por lo tanto, la hipótesis nula se rechaza.

8.2.1 GLUCOSA

En la Tabla 107 se muestran los resultados de las medias de grupos en estudio.

Tabla 107. Medidas de tendencia central variable, glucosa en ayuno.

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
Frecuencia		5	5	5	5	5	5
Glucosa Inicial	Media	125.8	117.2	126.4	125.2	122.8	123.4
	Std. Desviación	9.76	4.32	4.83	6.22	4.92	6.77
	Varianza	95.2	18.7	23.3	38.7	24.2	45.8
	Mínimum	113	112	121	117	118	112
	Máximum	135	122	132	132	129	129
	Media $\pm$ Std.	125.8 $\pm$ 9.76	117.2 $\pm$ 4.32	126.4 $\pm$ 4.83	125.2 $\pm$ 6.22	122.8 $\pm$ 4.92	123.4 $\pm$ 6.77
Glucosa En mantenimiento	Media	114.4	116.6	112.8	109.6	113.2	118.2
	Std. Desviación	12.48	12.54	12.64	9.26	15.12	8.35
	Varianza	155.8	157.3	159.7	85.8	228.7	69.7

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
	Frecuencia	5	5	5	5	5	5
	Mínimum	99	100	97	95	98	110
	Máximum	132	135	132	119	135	131
	Media $\pm$ Std.	114.4 $\pm$ 12.48	116.6 $\pm$ 12.54	112.8 $\pm$ 12.64	109.6 $\pm$ 9.26	113.2 $\pm$ 15.12	118.2 $\pm$ 8.35
Prueba de glucosa a las 3 semanas de DPI	Media	166.4	202	177.6	169.8	124	125.2
	Std. Desviación	4.39	14.97	8.99	5.02	9.97	5.76
	Varianza	19.3	224	80.8	25.2	99.5	33.2
	Mínimum	159	184	169	162	110	119
	Máximum	170	220	189	175	137	131
	Media $\pm$ Std.	166.4 $\pm$ 4.39	202 $\pm$ 14.97	177.6 $\pm$ 8.99	169.8 $\pm$ 5.02	124 $\pm$ 9.97	125.2 $\pm$ 5.76
Prueba glucosa a las 2 semanas del tratamiento	Media	127.6	143.8	146.4	178.4	116.6	118.2
	Std. Desviación	5.32	10.28	9.71	8.44	8.29	5.89

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
	Frecuencia	5	5	5	5	5	5
	Varianza	28.3	105.7	94.3	71.3	68.8	34.7
	Mínimum	121	131	133	169	106	110
	Máximum	134	155	156	192	126	125
	Media $\pm$ Std.	127.6 $\pm$ 5.32	143.8 $\pm$ 10.28	146.4 $\pm$ 9.71	178.4 $\pm$ 8.44	116.6 $\pm$ 8.29	118.2 $\pm$ 5.89

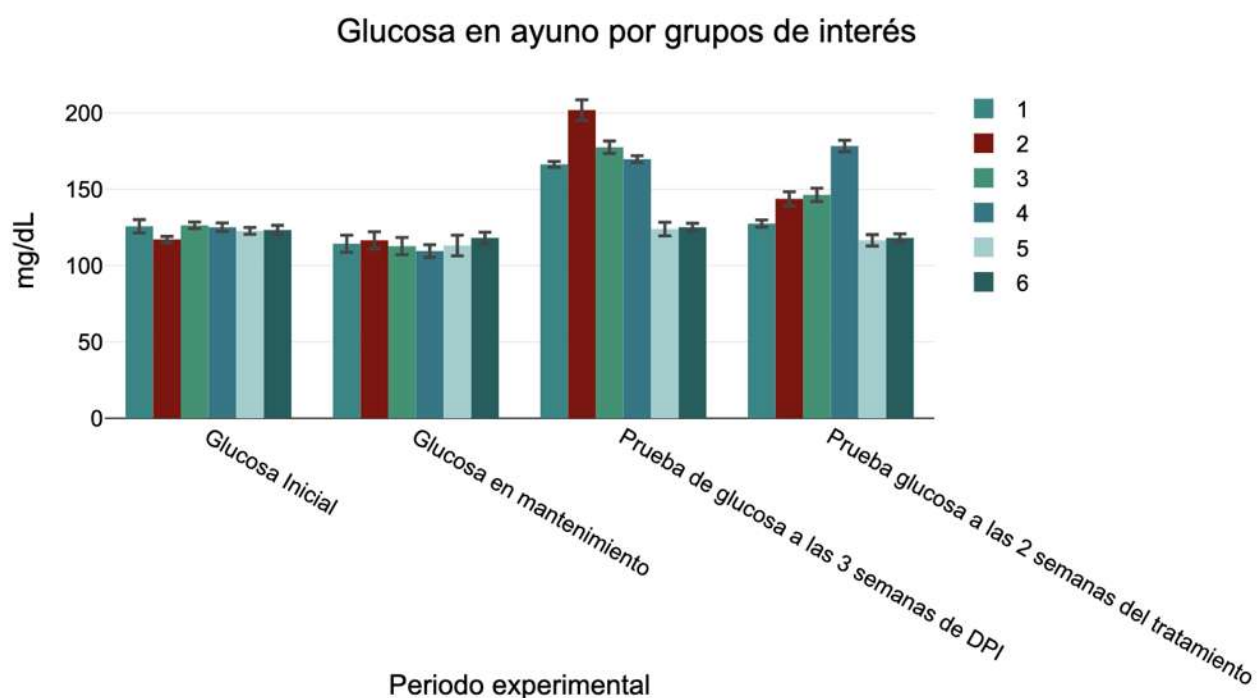


Figura 89. Detección de glucosa en ayuno durante el periodo experimental.

En la Figura 89. se observa el cambio en la glucosa en ayuno en el periodo experimental, los grupos 1, 2, 3, 4, mostraron un aumento de la glucosa en ayuno visible, para las 3 semanas

de inicio de la dieta proinflamatoria, en comparación a los demás grupos. Por otro lado, 1, 2, y 3, muestran el decremento de esta a las 2 semanas de iniciar los tratamientos. Es notable que grupo 4 perpetuo la elevación de glucosa en ayuno, hasta el final de la etapa experimental. Mientras que los grupos 5 y 6 mantuvieron constante la glucosa en ayuno durante todo el experimento.

Para las tres semanas de tratamientos los grupos de interés mostraron diferencia en sus medias, y rangos intercuartílicos, siendo muy pronunciado para los grupos 1, 2, y 3, en comparación a los demás grupos. El grupo control mostró un comportamiento estable en toda la etapa experimental, mientras que el grupo 4 presentó una media de glucosa muy por arriba de los demás grupos, y ese estado de hiperglucemia, fue afectado por la DPI y la falta de tratamiento antioxidante.

Prueba de hipótesis

Hipótesis Nula

No existe diferencia significativa entre los grupos con relación a la variable dependiente.

No existe diferencia significativa en la variable dependiente y el periodo experimental.

No existe efecto de interacción entre el tratamiento y la detección de glucosa en ayuno.

Hipótesis alternativa

Existe diferencia significativa entre los grupos con relación a la variable dependiente.

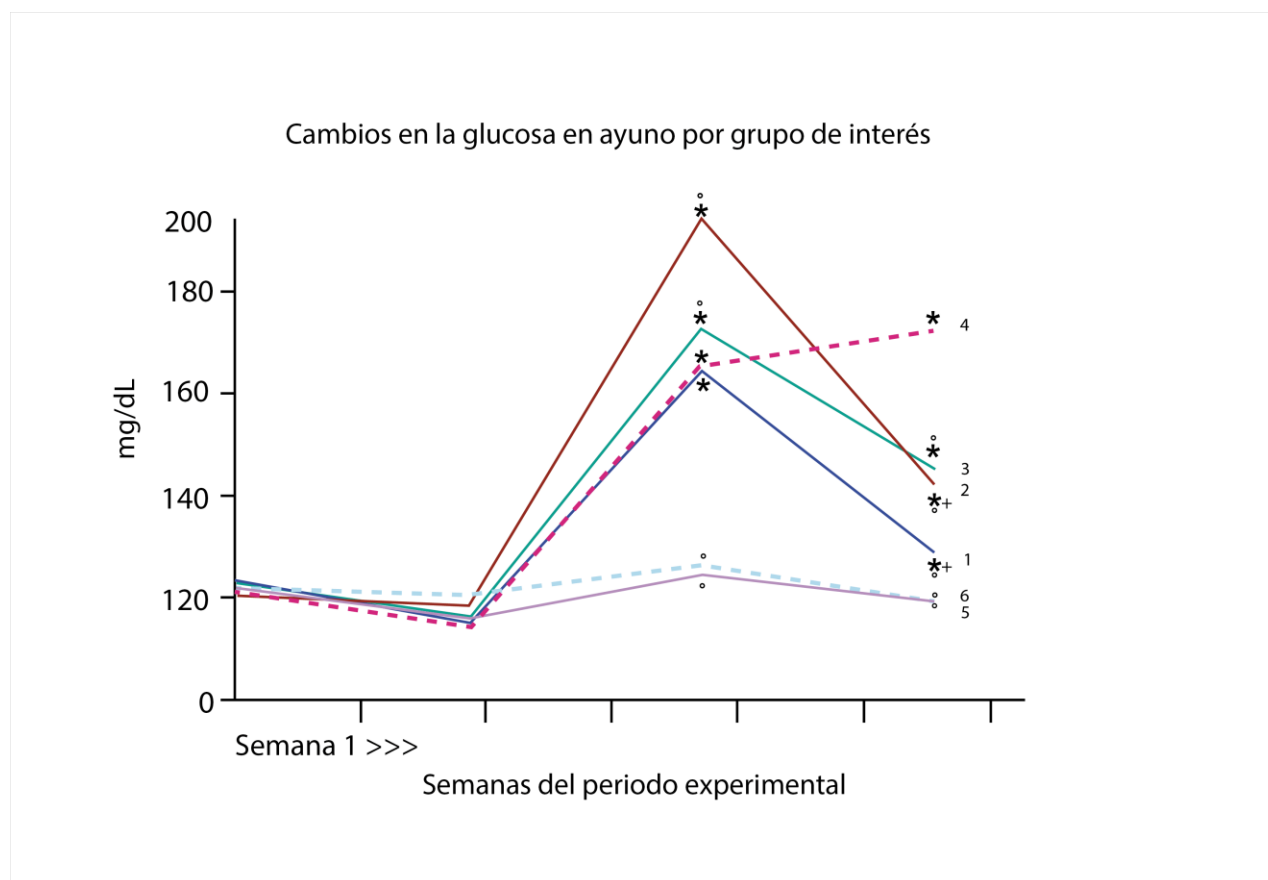
Existe diferencia significativa en la variable dependiente y el periodo experimental.

Existe efecto de interacción entre el tratamiento y la detección de glucosa en ayuno.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa.

	Glucosa Inicial	Glucosa En mantenimiento	Prueba de glucosa a las 3 semanas de DPI	Prueba glucosa a las 2 semanas del tratamiento	Total
1	125.8	114.4	166.4	127.6	133.55
2	117.2	116.6	202	143.8	144.9
3	126.4	112.8	177.6	146.4	140.8
4	125.2	109.6	169.8	178.4	145.75
5	122.8	113.2	124	116.6	119.15
6	123.4	118.2	125.2	118.2	121.25
Total	123.47	114.13	160.83	138.5	134.23

Tabla 108. Medias de grupo de acuerdo al periodo experimental.



El * indica una diferencias significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control DE + *agua ad libitum* (5).

El ° indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo de control DPI + *agua ad libitum* (4).

El + indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) exclusiva entre el grupo DPI + 200 EAG, y el grupo DPI+500 EAG, (1,2).

Figura 90. Cambios en el muestro de glucosa en el periodo experimental.

En la figura 90. Se observa el comportamiento de cada uno de los grupos durante el periodo experimental, se reporta que existe diferencia altamente significativa, en la tabla 109 se muestra el test de ANOVA. Conforme avanza las semanas de evolución del protocolo es notable como se modifican los niveles de las diferentes variables, los grupos que recibieron DPI para la segunda semana, muestran un aumento en los niveles de la glucosa en ayuno, entre grupos se notan diferencias significativas respecto al grupo control 6, observándose que la dieta afecta directamente en los niveles detectados, además es notable que para el término de del tratamiento, aún con consumo de DPI, el extracto afecta en la evolución de los niveles de glucosa, es visible, comparada con el grupo control 4, donde estos niveles se perpetúan para la última semana del protocolo, Se notan diferencias significativas en grupos 1, 2, en cuanto a la disminución de glucosa en ayuno.

	df	Media Cuadratica	F	p
Grupos	3	12,456.96	169.43	<.001
Grupo	5	2,744.29	24.77	<.001
A x B	15	1,588.34	21.6	<.001
Between	29	564.83		
Entre muestras	24	110.77		
Residuo	72	73.52		
Within	90	738.77		
Total	119	696.38		

Tabla 109. Anova, Detección de glucosa en ayuno.

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe diferencia altamente significativa, entre grupos y tratamientos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

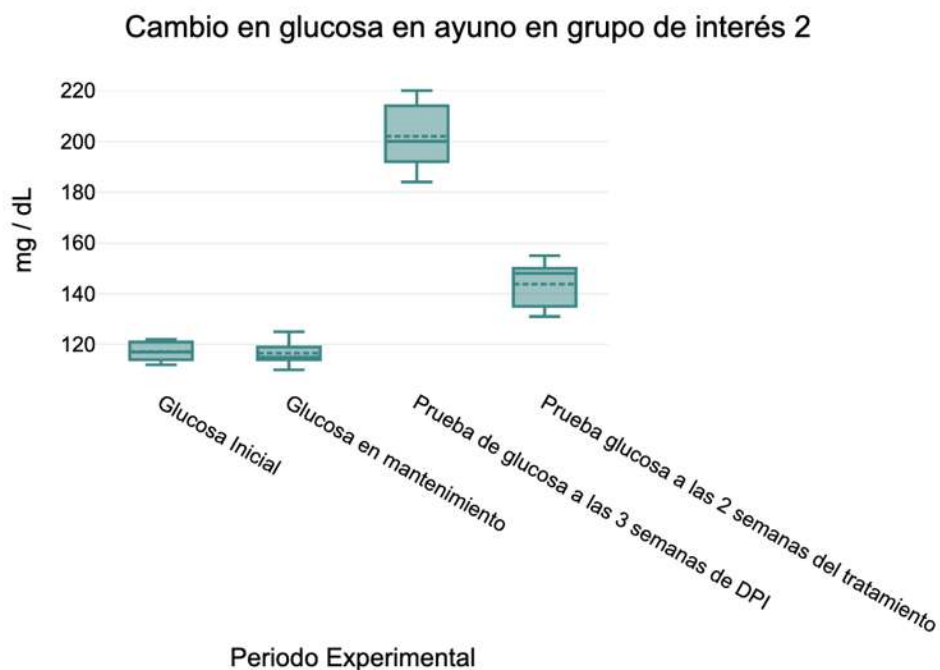


Figura 91. Box plot, cambio en la glucosa en ayuno a las 2 semanas de tratamiento.

En la Figura 91 se observó que existió diferencia en el comportamiento de la glucosa, a las dos semanas del tratamiento, las medias de grupo fueron altamente significativas. Se realizó la prueba post Hoc de Bon Ferroni, los resultados se muestran en la Tabla 110. El tratamiento 1 y 2 pertenecen al mismo grupo de medias, por lo que ambos extractos influyeron de la misma forma en la glucosa en ayuno aun cuando la dosis fue diferente.

		Media dif.	Std. Error	p	95% CI limite inferior	95% CI limite superior
1	2	-16.2	5.184	.069	-33.59	1.19
1	3	-18.8	5.184	.02	-36.19	-1.41
1	4	-50.8	5.184	<.001	-68.19	-33.41
1	5	11	5.184	.665	-6.39	28.39
1	6	9.4	5.184	1	-7.99	26.79
2	3	-2.6	5.184	1	-19.99	14.79
2	4	-34.6	5.184	<.001	-51.99	-17.21
2	5	27.2	5.184	<.001	9.81	44.59

		Media dif.	Std. Error	p	95% CI limite inferior	95% CI limite superior
2	6	25.6	5.184	.001	8.21	42.99
3	4	-32	5.184	<.001	-49.39	-14.61
3	5	29.8	5.184	<.001	12.41	47.19
3	6	28.2	5.184	<.001	10.81	45.59
4	5	61.8	5.184	<.001	44.41	79.19
4	6	60.2	5.184	<.001	42.81	77.59
5	6	-1.6	5.184	1	-18.99	15.79

Tabla 110. Bon Ferroni, post Hoc test.

8.2.3 TRIGLICÉRIDOS

En la Tabla 111 se muestran los resultados de las medias de los grupos en estudio.

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
	Frecuencia	5	5	5	5	5	5
Conteo de triglicéridos inicial	Media	123.4	109.6	119.4	112.8	123.2	111.2
	Std. Desviación	15.47	9.21	13.5	13.65	9.91	9.26
	Mínimum	104	98	100	99	109	100
	Máximum	145	121	136	135	135	122
	Media $\pm$ Std.	123.4 $\pm$ 15.47	109.6 $\pm$ 9.21	119.4 $\pm$ 13.5	112.8 $\pm$ 13.65	123.2 $\pm$ 9.91	111.2 $\pm$ 9.26

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
	Frecuencia	5	5	5	5	5	5
Triglicéridos en mantenimiento	Media	121.4	124.2	121.6	120.4	120.4	110.6
	Std. Desviación	8.08	6.1	8.85	8.85	9.34	14.15
	Mínimum	110	117	108	108	110	90
	Máximum	129	131	129	129	131	123
	Media $\pm$ Std.	121.4 $\pm$ 8.08	124.2 $\pm$ 6.1	121.6 $\pm$ 8.85	120.4 $\pm$ 8.85	120.4 $\pm$ 9.34	110.6 $\pm$ 14.15
Conteo de triglicéridos a las 3 semanas de DPI	Media	271.8	195.2	227.8	219.8	103.4	110.2
	Std. Desviación	84.32	12.19	37.61	32.43	20.31	9.42
	Mínimum	197	178	198	189	79	97
	Máximum	405	210	287	268	135	121
	Media $\pm$ Std.	271.8 $\pm$ 84.32	195.2 $\pm$ 12.19	227.8 $\pm$ 37.61	219.8 $\pm$ 32.43	103.4 $\pm$ 20.31	110.2 $\pm$ 9.42
Conteo de triglicéridos a	Media	163	69	112.2	280.8	103.8	56.6

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
Frecuencia		5	5	5	5	5	5
las 2 semanas del tratamiento							
	Std. Desviación	84.18	6.96	20.27	63.99	8.7	5.5
	Mínimum	102	59	91	207	95	50
	Máximum	305	77	144	378	115	65
	Media $\pm$ Std.	163 $\pm$ 84.18	69 $\pm$ 6.96	112.2 $\pm$ 20.27	280.8 $\pm$ 63.99	103.8 $\pm$ 8.7	56.6 $\pm$ 5.5

Tabla 111. Medidas de tendencia central variable en los valores de triglicéridos.

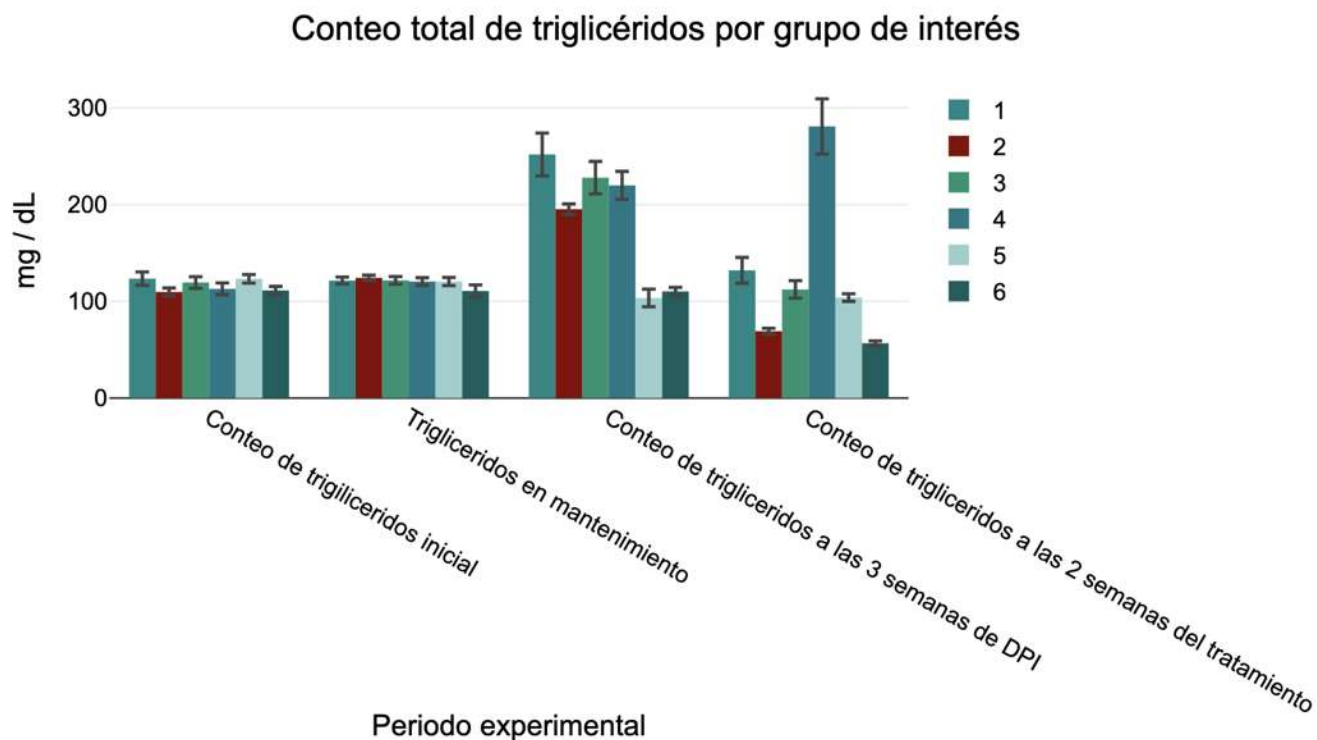


Figura 92. Conteo de triglicéridos durante el periodo experimental.

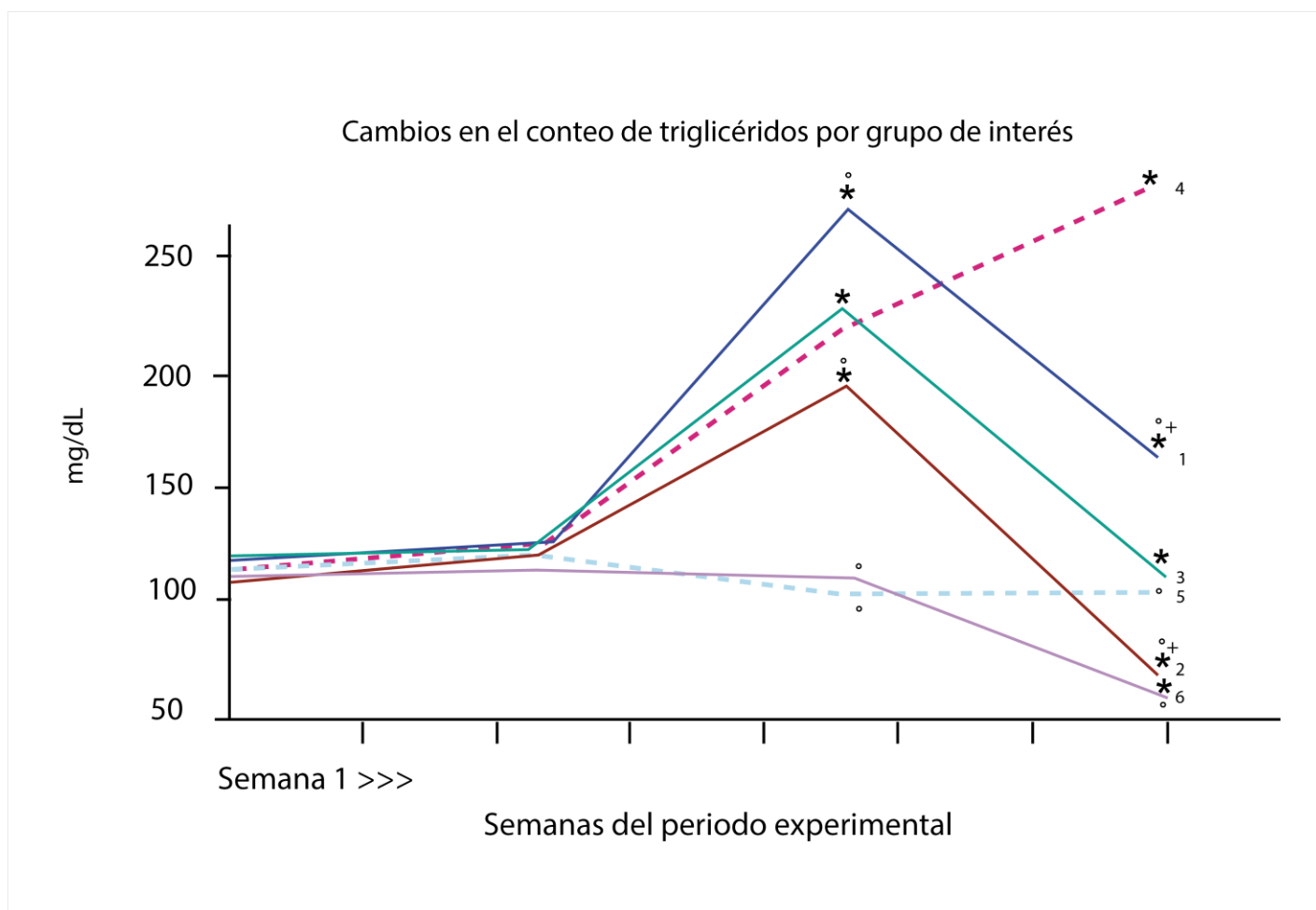
En la Figura 92 se observa que existieron diferencias entre cada uno de los grupos de estudio, y se muestra que también hubo diferencias significativas en torno al comportamiento interno de los grupos. 1,2,3,4, mostraron un aumento constante del conteo de triglicéridos a las 3 semanas del comienzo de la dieta proinflamatoria. 1,2,3, muestran una disminución de los triglicéridos a la segunda semana del inicio del tratamiento de antioxidantes, por lo cual se afirma, que la aplicación de los 3 tratamientos influyó en el comportamiento de los triglicéridos. Por otra parte, el grupo 4 evidencia que, DPI, perpetúa el estado de hipertrigliceridemia comparado con el grupo control, E; además resulta interesante que el extracto por sí solo tuvo un efecto directo en la disminución de los triglicéridos, independientemente del estado nutricional, esto fundamentado con el grupo 6.

Complementando lo anterior, en la Figura 95 se nota como cada uno de los tratamientos influyeron directamente en el conteo de triglicéridos. En cada una de las medias de grupo para los tiempos de primera toma y mantenimiento, pertenecen al mismo grupo de medias, por el

contrario, a partir del inicio del tratamiento se vio que la media de cada grupo aumento, exceptuando el grupo control o 5, y 6. De todos los grupos, 1, presento un rango intercuartílico más amplio, donde se visualiza la presencia de un alto conteo de triglicéridos, llegando a ser hasta un 49% más alto, en comparación al grupo 2, un 30% más alto en comparación, a 3, y un 34% más alto en comparación a 4. En la Tabla 113 se muestran las medias de cada uno de los grupos de interés por el periodo experimental completo.

	Conteo inicial triglicéridos	Triglicéridos en mantenimiento	Conteo de triglicéridos a las 3 semanas de DPI	Conteo de triglicéridos a las 2 semanas del tratamiento	Total
1	123.4	121.4	271.8	163	169.9
2	109.6	124.2	195.2	69	124.5
3	119.4	121.6	227.8	112.2	145.25
4	112.8	120.4	219.8	280.8	183.45
5	123.2	120.4	103.4	103.8	112.7
6	111.2	110.6	110.2	56.6	97.15
Total	116.6	119.77	188.03	130.9	138.83

Tabla 113. Medidas de tendencia central variable, conteo de triglicéridos.



El * indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control DE + *agua ad libitum* (5).

El ° indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo de control DPI + *agua ad libitum* (4).

El + indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) exclusiva entre el grupo DPI + 200 EAG, y el grupo DPI+500 EAG, (1,2).

Figura 93. Comportamiento del conteo triglicéridos durante el periodo experimental.

En la figura 93, es notable los cambios en el conteo de triglicéridos durante el periodo experimental, a partir de la semana 1, para los grupos 1,2,3,4, se nota un aumento fortuito de los niveles, a partir de la implementación de la DPI, es notable, comparando con el grupo 5, 6, los cuales recibieron una DE balanceada. Existen diferencias significativas entre los grupos, las significancias se muestran en la tabla 116., Para las últimas semanas donde ya se instauro el tratamiento se observa una disminución respecto al grupo control 4, por otro lado, también se nota, que el grupo 6 disminuye los niveles de triglicéridos de manera significativa de acuerdo al grupo control 5.

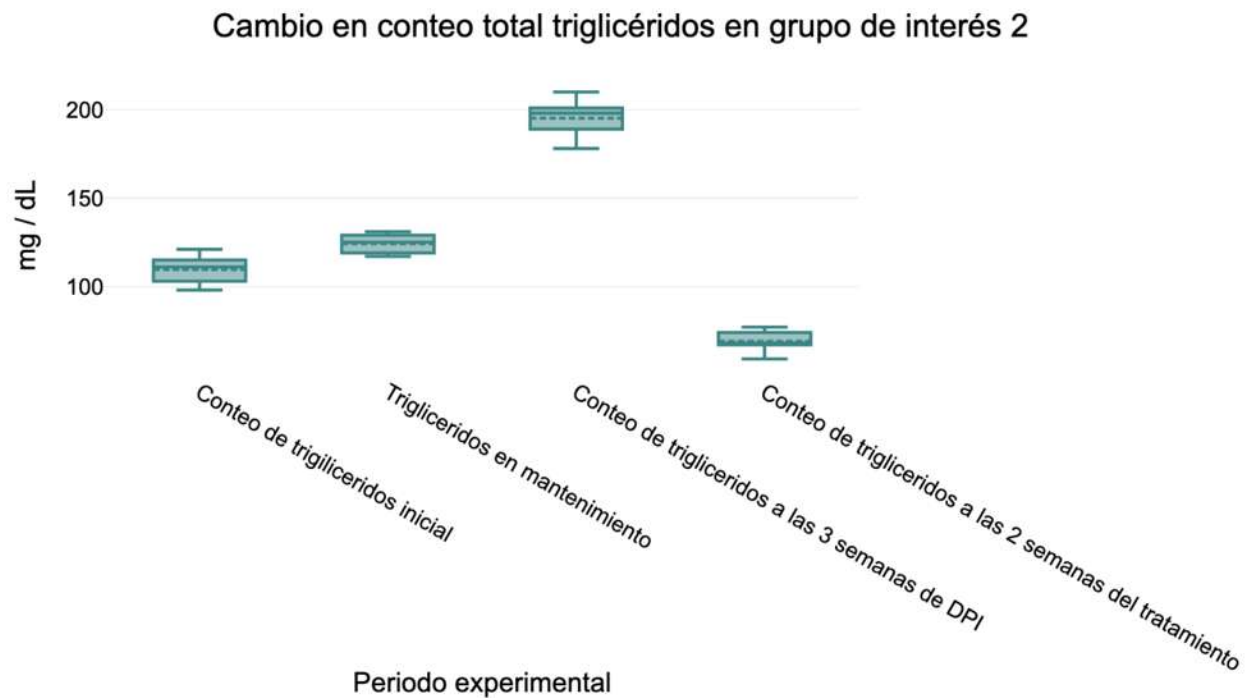


Figura 94. Box plot, conteo de triglicéridos en grupo 2 a través del periodo experimental.

Para verificar si el extracto acuoso de *Psidium guajava*, en ambas dosis, mostró efecto sobre el conteo de triglicéridos, se ejecutó Anova, junto con la prueba post hoc de Bon Ferroni, y se observó que existió diferencia altamente significativa. El extracto influyó directamente sobre los niveles de triglicéridos. Por otro lado, se muestra que la dosis administrada presentó medias diferentes, por lo cual el grupo 2, mostró mayor efectividad para disminuir el conteo de triglicéridos en la figura 94 se muestra el comportamiento específico del grupo, se observa gran efectividad en comparación a los grupos 1 y 3.

	df	Media Cuadrática	F	p
Between Groups	5	33,936.62	17.33	<.001
Within Groups	24	1,957.82		
Total	29			

Tabla 115. Análisis de varianza conteo de triglicéridos.

		media dif.	Std. Error	p	95% CI límite inferior	95% CI límite Superior
1	2	94	27.984	.039	0.1	187.9
1	3	50.8	27.984	1	-43.1	144.7
1	4	-117.8	27.984	.004	-211.7	-23.9
1	4	59.2	27.984	.674	-34.7	153.1
1	6	106.4	27.984	.013	12.5	200.3
2	3	-43.2	27.984	1	-137.1	50.7
2	4	-211.8	27.984	<.001	-305.7	-117.9
2	E	-34.8	27.984	1	-128.7	59.1
2	F	12.4	27.984	1	-81.5	106.3
3	D	-168.6	27.984	<.001	-262.5	-74.7
3	E	8.4	27.984	1	-85.5	102.3
3	F	55.6	27.984	.877	-38.3	149.5
4	E	177	27.984	<.001	83.1	270.9
4	F	224.2	27.984	<.001	130.3	318.1
5	F	47.2	27.984	1	-46.7	141.1

Tabla 116. Bon Ferroni Test conteo de triglicéridos.

8.2.3 CONCLUSIÓN GENERAL SOBRE PESO, GLUCOSA EN AYUNO, CONTEO TOTAL DE TRIGLICÉRIDOS

El extracto acuoso de *P. guajava* ejerció un efecto directo en las tres variables, peso, glucosa y triglicéridos. Ambas dosis de extracto de hoja de guayaba mostraron efectividad en las dosis de 200 mg/ kg y 500 mg/ kg. Por otro lado, el grupo quercetina mostró también efectividad, en la disminución de las variables en un 20% menos en comparación al límite inferior de los extractos acuosos de *P. guajava*. En el caso de triglicéridos se notó mayor disminución para el grupo 2 en la segunda semana del comienzo del tratamiento con un nivel de significancia menor de $p < 0.05$ comparado con el grupo 1 de tratamiento.

8.3 RESULTADOS ADIPOCINAS PROINFLAMATORIAS *IL-6*, *MCP-1*, *IFy* y *FNT α* EN MODELO ROEDOR.

8.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formaron los grupos de acuerdo con el diseño experimental anteriormente explicado. En las siguientes Figuras y Tablas se muestran los resultados de cada una de las variables de estudio, y se presentan de la siguiente manera.

- Primera etapa

T1 (Primera toma de sangre con una semana de aclimatación y dieta estándar).

- Segunda etapa, modificación dietética.

T2 DE (segunda toma de sangre con 2 semanas de permanencia con dieta estándar).

T2 DPI (segunda toma de sangre con 2 semanas de permanencia con dieta proinflamatoria).

- Tercera etapa, inicio de aplicación de tratamientos.

T3DE (Tercera toma de sangre con 3 semanas de permanencia con dieta estándar).

T3DPI (Tercera toma de sangre con 3 semanas de permanencia con dieta proinflamatoria).

T3DPIG200 (Tercera toma de sangre con 3 semanas de permanencia, dieta proinflamatoria y tratamiento de extracto de *Psidium guajava* a 200 mg/kg de peso).

T3DPIG500 (Tercera toma de sangre con 3 semanas de permanencia, dieta proinflamatoria y tratamiento de extracto de *Psidium guajava* a 500 mg/kg de peso).

T3DPIQ200 (Tercera toma de sangre con 3 semanas de permanencia, dieta proinflamatoria y tratamiento de quercetina a 200 mg/kg de peso).

T3DEG200 (Tercera toma de sangre con 3 semanas de permanencia, dieta estándar y tratamiento de extracto de *Psidium guajava* a 200 mg/kg de peso).

Los resultados se muestran en las siguientes páginas.

8.3.2 FACTOR NECROSIS TUMORAL ALFA

En la Figura 95 se muestran los resultados obtenidos de acuerdo al TNF- Alfa durante el periodo experimental de acuerdo a los grupos de interés.

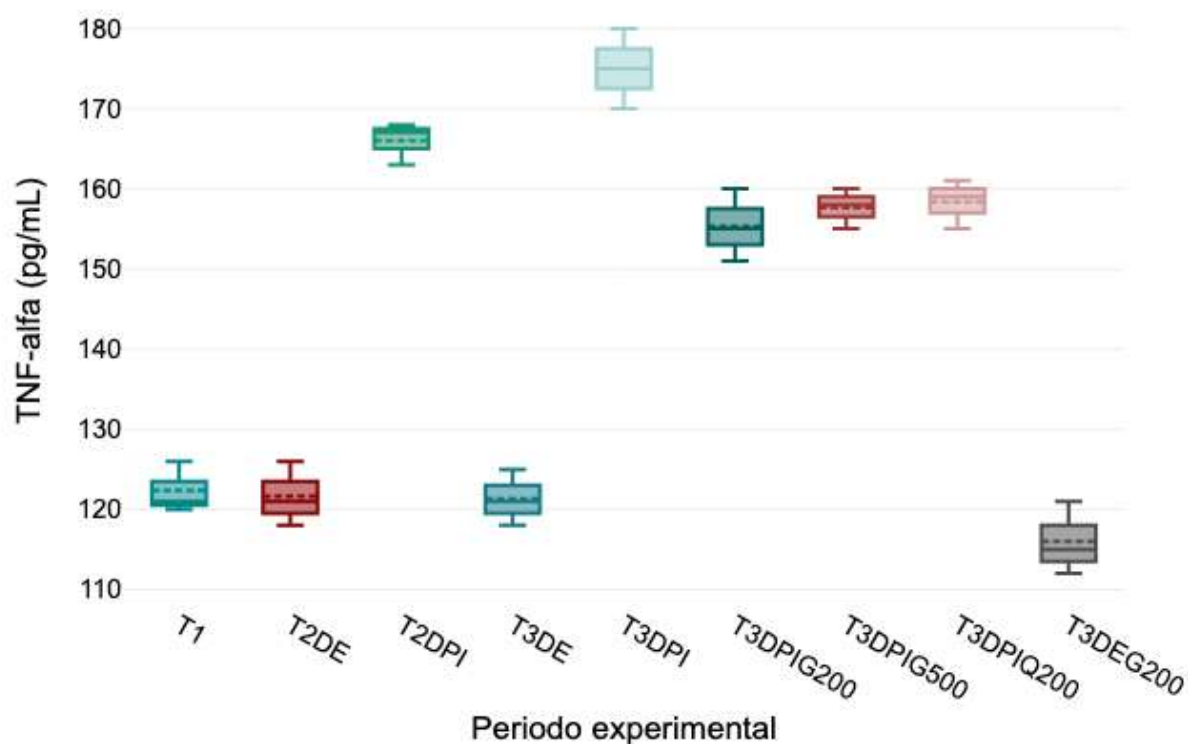


Figura 95. Determinación del factor de necrosis tumoral alfa en las diferentes etapas del estudio.

Se observa qué de acuerdo con el análisis realizado, existió diferencia significativa en cada una de las variables de estudio. Se realizó análisis de varianza, reportándose una significancia menor a <0.001 , Tabla 117, en el diseño experimental completo.

	df	Media Cuadratica	F	p
Periodo experimental	8	1586.65	111.56	$<.001$
Residual	18	14.22		
Total	26			

Tabla 117. Análisis de Varianza FNT alfa / Tiempo.

Posteriormente, para identificar las diferencias intergrupales se realizó la prueba de Bon Ferroni, y los resultados se muestran en la Tabla 118.

		Media Dif.	Std. Error	p	95% CI Límite Inferior	95% CI Limite Superior
T1	T2DE	0.67	3.079	1	-11.04	12.37
T1	T2DPI	-43.67	3.079	$<.001$	-55.37	-31.96
T1	T3DE	1	3.079	1	-10.7	12.7
T1	T3DPI	-52.67	3.079	$<.001$	-64.37	-40.96
T1	T3DPIG200	-33	3.079	$<.001$	-44.7	-21.3
T1	T3DPIG500	-35.33	3.079	$<.001$	-47.04	-23.63
T1	T3DPIQ200	-36	3.079	$<.001$	-47.7	-24.3
T1	T3DEG200	6.33	3.079	1	-5.37	18.04
T2DE	T2DPI	-44.33	3.079	$<.001$	-56.04	-32.63
T2DE	T3DE	0.33	3.079	1	-11.37	12.04
T2DE	T3DPI	-53.33	3.079	$<.001$	-65.04	-41.63

T2DE	T3DPIG2 00	-33.67	3.079	<.001	-45.37	-21.96
T2DE	T3DPIG5 00	-36	3.079	<.001	-47.7	-24.3
T2DE	T3DPIQ2 00	-36.67	3.079	<.001	-48.37	-24.96
T2DE	T3DEG2 00	5.67	3.079	1	-6.04	17.37
T2DPI	T3DE	44.67	3.079	<.001	32.96	56.37
T2DPI	T3DPI	-9	3.079	.327	-20.7	2.7
T2DPI	T3DPIG2 00	10.67	3.079	.099	-1.04	22.37
T2DPI	T3DPIG5 00	8.33	3.079	.521	-3.37	20.04
T2DPI	T3DPIQ2 00	7.67	3.079	.82	-4.04	19.37
T2DPI	T3DEG2 00	50	3.079	<.001	38.3	61.7
T3DE	T3DPI	-53.67	3.079	<.001	-65.37	-41.96
T3DE	T3DPIG2 00	-34	3.079	<.001	-45.7	-22.3
T3DE	T3DPIG5 00	-36.33	3.079	<.001	-48.04	-24.63
T3DE	T3DPIQ2 00	-37	3.079	<.001	-48.7	-25.3
T3DE	T3DEG2 00	5.33	3.079	1	-6.37	17.04
T3DPI	T3DPIG2 00	19.67	3.079	<.001	7.96	31.37
T3DPI	T3DPIG5 00	17.33	3.079	.001	5.63	29.04
T3DPI	T3DPIQ2 00	16.67	3.079	.001	4.96	28.37
T3DPI	T3DEG2 00	59	3.079	<.001	47.3	70.7

T3DPIG2 00	T3DPIG5 00	-2.33	3.079	1	-14.04	9.37
T3DPIG2 00	T3DPIQ2 00	-3	3.079	1	-14.7	8.7
T3DPIG2 00	T3DEG2 00	39.33	3.079	<.001	27.63	51.04
T3DPIG5 00	T3DPIQ2 00	-0.67	3.079	1	-12.37	11.04
T3DPIG5 00	T3DEG2 00	41.67	3.079	<.001	29.96	53.37
T3DPIQ2 00	T3DEG2 00	42.33	3.079	<.001	30.63	54.04

Tabla 118. Prueba de Bon Ferroni.

La Tabla 118 muestra las diferencias intergrupales para cada una de las etapas del estudio. Se observó que para las tomas control, T1, T2DE, T3DE, no existió diferencia significativa, por lo que se concluye que el Nivel de FNT alfa, se mantuvo constante durante todo el periodo experimental. Por otro lado, en la T2DPI se notó un aumento altamente significativo en comparación al grupo control (p-Valor .001), siendo del 34.5% a las 2 semanas del inicio de la DPI y un aumento del 7.4% extra posterior a 3 semanas más de DPI, por lo cual se concluyó que la DPI ejerció un efecto en los niveles de TNF alfa.

Para la etapa 3, el tratamiento ya está instaurado, los grupos controles tanto de DE como DPI mostraron las características esperadas, un conteo de triglicéridos adecuado para el grupo DE y un alto conteo de triglicéridos para el grupo DPI. Posteriormente al hacerse modificaciones en dicho esquema e inicia la toma del extracto, se apreciaron que existen diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos.

En cuanto a la efectividad del extracto, destaca la dosis de 200 mg/kg de peso corporal como el extracto que ejerció mayor disminución de los niveles de TNF alfa, con una efectividad de disminución del 11% a las 3 semanas de tratamiento. Los tratamientos T3DPIG500 y T3DPIQ200 presentaron disminución del 8.5% y 9.89%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con varias investigaciones donde el tratamiento más bajo en mg/kg de peso, mostró

una acción efectiva desde las dosis pequeñas. Por otro lado, el grupo que mantuvo DE, no mostro diferencia significativa (p-Valor 1) al aplicarse el tratamiento de 200 mg/Kg de peso corporal, por lo que se concluye que el sistema antioxidante tuvo un proceso de regulación para mantener un correcto estado de homeostasis.

8.3.3 INTERLEUCINA 6

En la Figura 97 se muestran los resultados obtenidos de acuerdo al conteo de interleucina 6 durante el periodo experimental de acuerdo a los grupos de interés.

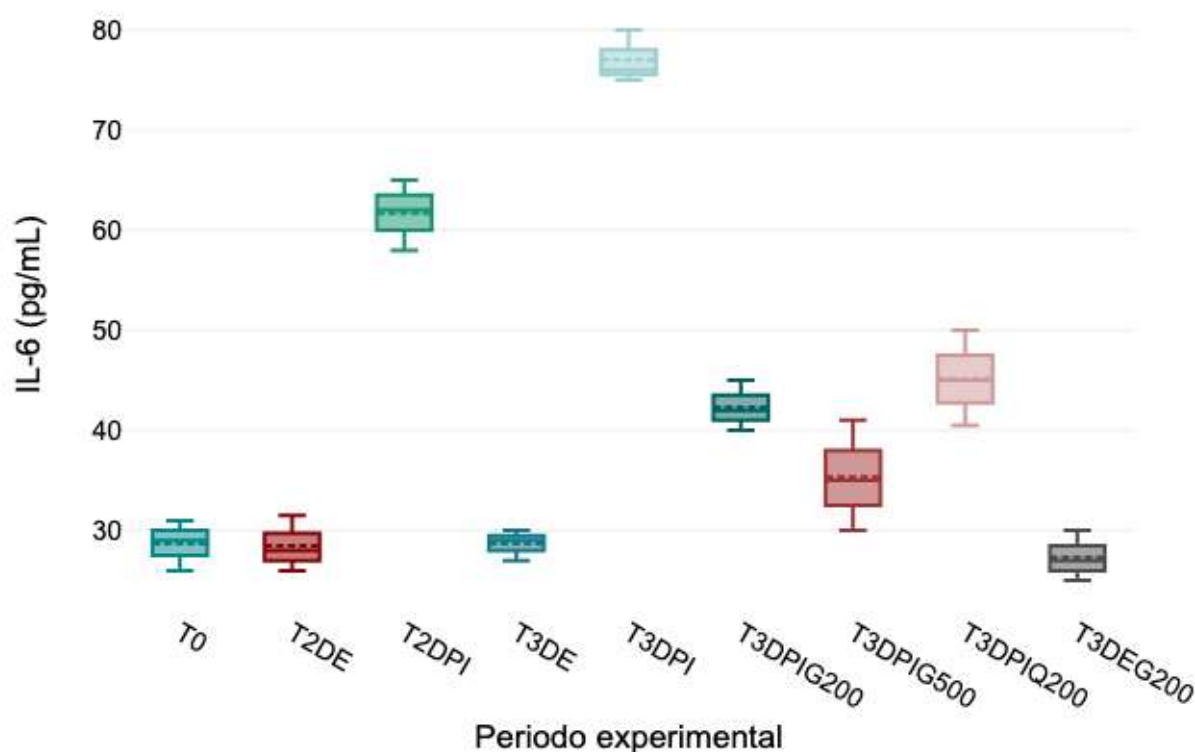


Figura 96. Determinación Interleucina 6 en las diferentes etapas del estudio.

De acuerdo con la Figura anterior, se observa, que existió diferencia significativa en el modelo experimental respecto a los niveles de interleucina 6 durante cada una de las etapas, reportándose un p-Valor <0.001 de acuerdo con el análisis de varianza mostrado en la Tabla 119.

	df	Media Cuadrática	F	p
Periodo experimental	8	906.77	80.54	<.001
Residual	18	11.26		
Total	26			

Tabla 119. Análisis de Varianza

		Media dif.	Std. Error	p	95% CI Límite Inferior	95% CI Límite Superior
T0	T2DE	0.17	2.74	1	-10.25	10.58
T0	T2DPI	-33	2.74	<.001	-43.41	-22.59
T0	T3DE	0	2.74	1	-10.41	10.41
T0	T3DPI	-48.33	2.74	<.001	-58.75	-37.92
T0	T3DPIG200	-13.67	2.74	.004	-24.08	-3.25
T0	T3DPIG500	-6.67	2.74	.922	-17.08	3.75
T0	T3DPIQ200	-16.5	2.74	.001	-26.91	-6.09
T0	T3DEG200	1.33	2.74	1	-9.08	11.75
T2DE	T2DPI	-33.17	2.74	<.001	-43.58	-22.75
T2DE	T3DE	-0.17	2.74	1	-10.58	10.25
T2DE	T3DPI	-48.5	2.74	<.001	-58.91	-38.09
T2DE	T3DPIG200	-13.83	2.74	.003	-24.25	-3.42
T2DE	T3DPIG500	-6.83	2.74	.813	-17.25	3.58
T2DE	T3DPIQ200	-16.67	2.74	<.001	-27.08	-6.25
T2DE	T3DEG200	1.17	2.74	1	-9.25	11.58

T2DPI	T3DE	33	2.74	<.001	22.59	43.41
T2DPI	T3DPI	-15.33	2.74	.001	-25.75	-4.92
T2DPI	T3DPIG2 00	19.33	2.74	<.001	8.92	29.75
T2DPI	T3DPIG5 00	26.33	2.74	<.001	15.92	36.75
T2DPI	T3DPIQ2 00	16.5	2.74	.001	6.09	26.91
T2DPI	T3DEG2 00	34.33	2.74	<.001	23.92	44.75
T3DE	T3DPI	-48.33	2.74	<.001	-58.75	-37.92
T3DE	T3DPIG2 00	-13.67	2.74	.004	-24.08	-3.25
T3DE	T3DPIG5 00	-6.67	2.74	.922	-17.08	3.75
T3DE	T3DPIQ2 00	-16.5	2.74	.001	-26.91	-6.09
T3DE	T3DEG2 00	1.33	2.74	1	-9.08	11.75
T3DPI	T3DPIG2 00	34.67	2.74	<.001	24.25	45.08
T3DPI	T3DPIG5 00	41.67	2.74	<.001	31.25	52.08
T3DPI	T3DPIQ2 00	31.83	2.74	<.001	21.42	42.25
T3DPI	T3DEG2 00	49.67	2.74	<.001	39.25	60.08
T3DPIG2 00	T3DPIG5 00	7	2.74	.716	-3.41	17.41
T3DPIG2 00	T3DPIQ2 00	-2.83	2.74	1	-13.25	7.58
T3DPIG2 00	T3DEG2 00	15	2.74	.001	4.59	25.41
T3DPIG5 00	T3DPIQ2 00	-9.83	2.74	.076	-20.25	0.58

T3DPIG5 00	T3DEG2 00	8	2.74	.329	-2.41	18.41
T3DPIQ2 00	T3DEG2 00	17.83	2.74	<.001	7.42	28.25

Tabla 120. Prueba de Bonferroni para diferencias intergrupales.

En la Tabla 120 se muestran las diferencias entre grupos. El grupo DE del tiempo de toma 1 a 3, no presento diferencias significativas en los niveles identificados de IL- 6, una vez instaurada la obesidad por la DPI. Se observaron diferencias significativas entre grupos DE y DPI, aumentando los niveles de IL-6 en un 29.4% al modificar la dieta en la primera etapa alcanzando un 6.2% más de aumento previo al inicio de los tratamientos. Posteriormente, al realizarse la intervención con el tratamiento seleccionado, se observó que para la toma 3, las diferencias intergrupales fueron muy evidentes, por lo cual se concluye que la dosis de 200 mg/ kg tanto de *Psidium guajava* como de quercetina, poseen un efecto en los niveles de IL-6, mostrando una disminución de 14.05% y 12.93%, respectivamente. Por otro lado, la dosis 500 mg/ kg en modelo DPI mostró una gran eficacia, 19.7% en la disminución de *IL-6* incluso de acuerdo con la Tabla 18, la disminución de IL-6 fue exitosa ya que no hubo diferencia en los niveles de IL-6 respecto a los grupos control (DE). La dosis de 200mg/kg modelo DE de *P. guajava* no reportó diferencias significativas. Se concluye que el tratamiento no ejerció efecto en los niveles de IL-6.

8.3.4 INTERFERÓN GAMMA

En la Figura 97 se muestran los resultados obtenidos de acuerdo al conteo de interferón gamma durante el periodo experimental de acuerdo a los grupos de interés.

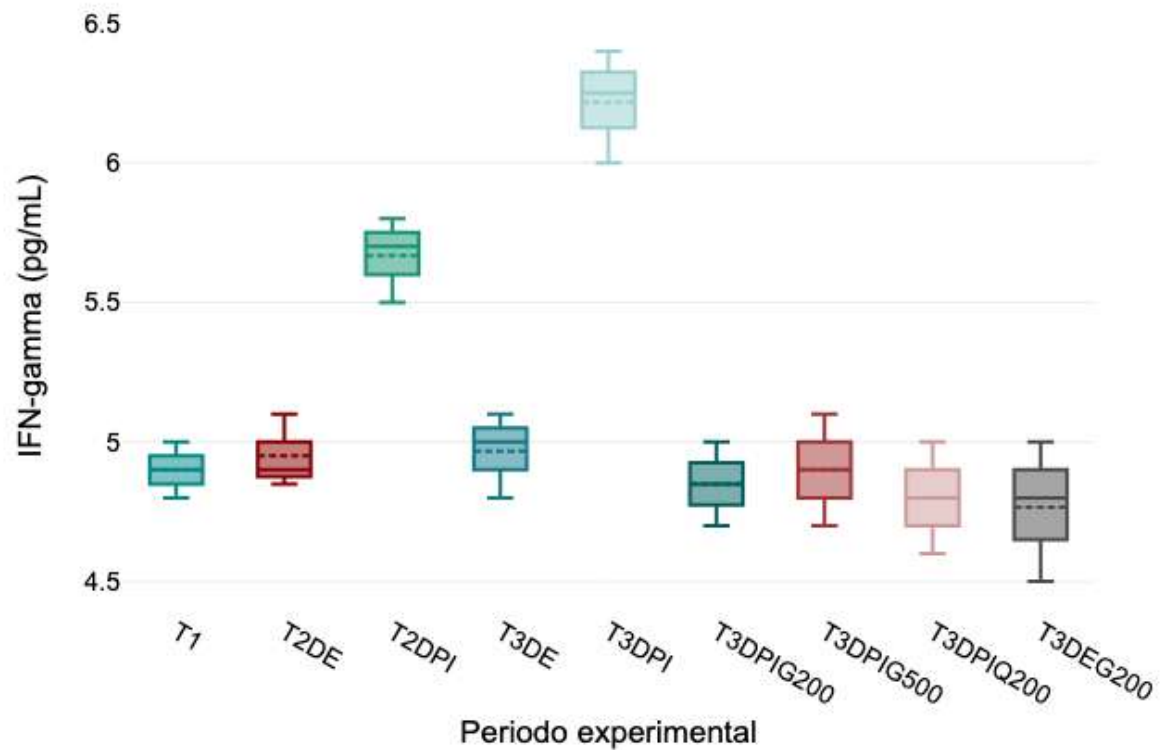


Figura 97. Determinación interferón gamma en las diferentes etapas del estudio.

De acuerdo con la Figura anterior, se observa, que existió diferencia significativa en el modelo experimental respecto a los niveles de interferón gamma.

	df	Media Cuadratica	F	p
Periodo experimental	8	0.73	23.44	<.001
Residual	18	0.03		
Total	26			

Tabla 121. Análisis de varianza.

		Mean diff.	Std. Error	p	95% CI lower limit	95% CI upper limit
T1	T2DE	-0.05	0.144	1	-0.6	0.5
T1	T2DPI	-0.77	0.144	.001	-1.31	-0.22
T1	T3DE	-0.07	0.144	1	-0.61	0.48
T1	T3DPI	-1.32	0.144	<.001	-1.86	-0.77
T1	T3DPIG2 00	0.05	0.144	1	-0.5	0.6
T1	T3DPIG5 00	0	0.144	1	-0.55	0.55
T1	T3DPIQ2 00	0.1	0.144	1	-0.45	0.65
T1	T3DEG2 00	0.13	0.144	1	-0.41	0.68
T2DE	T2DPI	-0.72	0.144	.004	-1.26	-0.17
T2DE	T3DE	-0.02	0.144	1	-0.56	0.53
T2DE	T3DPI	-1.27	0.144	<.001	-1.81	-0.72
T2DE	T3DPIG2 00	0.1	0.144	1	-0.45	0.65
T2DE	T3DPIG5 00	0.05	0.144	1	-0.5	0.6
T2DE	T3DPIQ2 00	0.15	0.144	1	-0.4	0.7
T2DE	T3DEG2 00	0.18	0.144	1	-0.36	0.73
T2DPI	T3DE	0.7	0.144	.004	0.15	1.25
T2DPI	T3DPI	-0.55	0.144	.046	-1.1	0
T2DPI	T3DPIG2 00	0.82	0.144	.001	0.27	1.36
T2DPI	T3DPIG5 00	0.77	0.144	.001	0.22	1.31
T2DPI	T3DPIQ2 00	0.87	0.144	.001	0.32	1.41

T2DPI	T3DEG2 00	0.9	0.144	<.001	0.35	1.45
T3DE	T3DPI	-1.25	0.144	<.001	-1.8	-0.7
T3DE	T3DPIG2 00	0.12	0.144	1	-0.43	0.66
T3DE	T3DPIG5 00	0.07	0.144	1	-0.48	0.61
T3DE	T3DPIQ2 00	0.17	0.144	1	-0.38	0.71
T3DE	T3DEG2 00	0.2	0.144	1	-0.35	0.75
T3DPI	T3DPIG2 00	1.37	0.144	<.001	0.82	1.91
T3DPI	T3DPIG5 00	1.32	0.144	<.001	0.77	1.86
T3DPI	T3DPIQ2 00	1.42	0.144	<.001	0.87	1.96
T3DPI	T3DEG2 00	1.45	0.144	<.001	0.9	2
T3DPIG2 00	T3DPIG5 00	-0.05	0.144	1	-0.6	0.5
T3DPIG2 00	T3DPIQ2 00	0.05	0.144	1	-0.5	0.6
T3DPIG2 00	T3DEG2 00	0.08	0.144	1	-0.46	0.63
T3DPIG5 00	T3DPIQ2 00	0.1	0.144	1	-0.45	0.65
T3DPIG5 00	T3DEG2 00	0.13	0.144	1	-0.41	0.68
T3DPIQ2 00	T3DEG2 00	0.03	0.144	1	-0.51	0.58

Tabla 122. Prueba de Bonferroni para diferencias intergrupales.

En la Tabla 121 se muestra el análisis de varianza, donde se observa que existió diferencia significativa en el modelo experimental, reportándose un valor de significancia

<0.0001. En la Figura 97 se muestran de manera gráfica los resultados obtenidos, se observan diferencias significativas entre grupo DE y DPI. Se aprecia que los niveles de interferón gamma aumentaron un 17.7% al modificarse la dieta alcanzando un 8.4% más previo al inicio de los tratamientos, y los grupos DPI control perpetuaron los niveles de la interleucina. Por otro lado, el grupo control DE se mantuvo constante durante el experimento, por lo que fue posible visualizar el comportamiento del extracto. Una vez iniciados los tratamientos se observó que existieron diferencias significativas en torno a los tratamientos, en cuanto a eficacia del extracto *Psidium guajava*, siendo observado que tanto la dosis de 200 mg/kg como de 500 mg/kg ejercieron un efecto positivo para disminuir los niveles de interferón gamma en un 21%; este mismo resultado fue notable para el grupo que recibió 200 mg/kg de quercetina, ya que de acuerdo al análisis post hoc, no existieron diferencias significativas entre los 3 tratamientos. Para el grupo que recibió el extracto de *P. guajava* en dieta estándar, no se mostraron diferencias significativas durante el periodo experimental.

8.3.5 MCP-1

Los resultados se muestran en la Figura 98, de acuerdo al conteo de MCP-1 durante el periodo experimental de acuerdo a los grupos de interés.

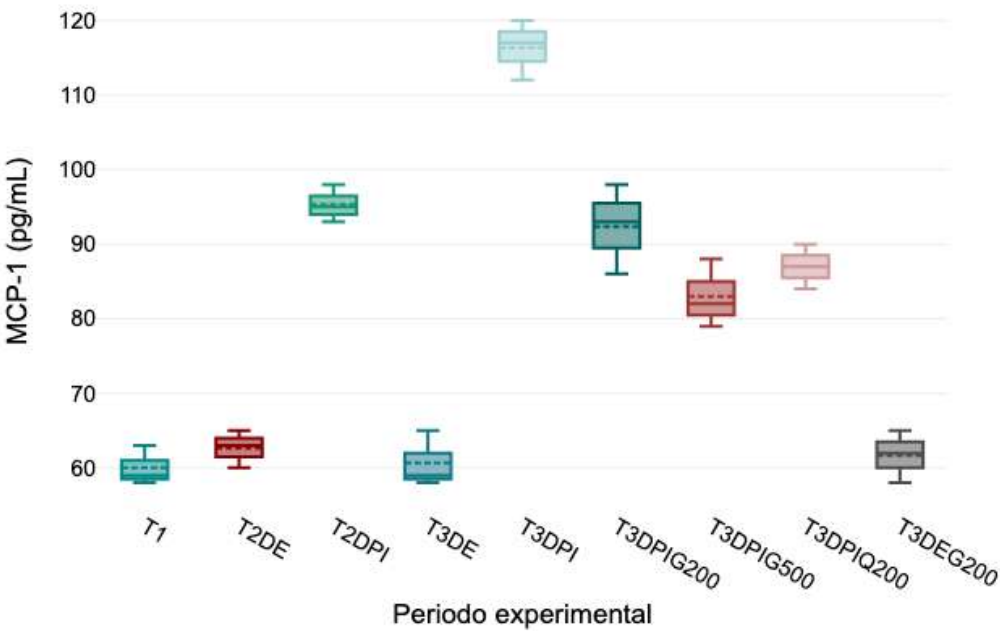


Figura 98. Determinación MCP-1 en las diferentes etapas del estudio.

	df	Media Cuadratica	F	p
Periodo experimental	8	1190.83	83.08	<.001
Residual	18	14.33		
Total	26			

Tabla 123. Análisis de varianza

De acuerdo con el análisis, se observa que existieron diferencias significativas en el modelo experimental, y se reporta una significancia menor a 0.001. Las diferencias entre grupos se muestran en la Tabla 124 de la siguiente sección.

		Mean diff.	Std. Error	p	95% CI lower limit	95% CI upper limit
T1	T2DE	-2.67	3.091	1	-14.42	9.08
T1	T2DPI	-35.33	3.091	<.001	-47.08	-23.58
T1	T3DE	-0.67	3.091	1	-12.42	11.08
T1	T3DPI	-56.33	3.091	<.001	-68.08	-44.58
T1	T3DPIG2 00	-32.33	3.091	<.001	-44.08	-20.58
T1	T3DPIG5 00	-23	3.091	<.001	-34.75	-11.25
T1	T3DPIQ2 00	-27	3.091	<.001	-38.75	-15.25
T1	T3DEG2 00	-1.67	3.091	1	-13.42	10.08
T2DE	T2DPI	-32.67	3.091	<.001	-44.42	-20.92
T2DE	T3DE	2	3.091	1	-9.75	13.75
T2DE	T3DPI	-53.67	3.091	<.001	-65.42	-41.92
T2DE	T3DPIG2 00	-29.67	3.091	<.001	-41.42	-17.92
T2DE	T3DPIG5 00	-20.33	3.091	<.001	-32.08	-8.58
T2DE	T3DPIQ2 00	-24.33	3.091	<.001	-36.08	-12.58
T2DE	T3DEG2 00	1	3.091	1	-10.75	12.75
T2DPI	T3DE	34.67	3.091	<.001	22.92	46.42
T2DPI	T3DPI	-21	3.091	<.001	-32.75	-9.25
T2DPI	T3DPIG2 00	3	3.091	1	-8.75	14.75
T2DPI	T3DPIG5 00	12.33	3.091	.031	0.58	24.08
T2DPI	T3DPIQ2 00	8.33	3.091	.532	-3.42	20.08

T2DPI	T3DEG2 00	33.67	3.091	<.001	21.92	45.42
T3DE	T3DPI	-55.67	3.091	<.001	-67.42	-43.92
T3DE	T3DPIG2 00	-31.67	3.091	<.001	-43.42	-19.92
T3DE	T3DPIG5 00	-22.33	3.091	<.001	-34.08	-10.58
T3DE	T3DPIQ2 00	-26.33	3.091	<.001	-38.08	-14.58
T3DE	T3DEG2 00	-1	3.091	1	-12.75	10.75
T3DPI	T3DPIG2 00	24	3.091	<.001	12.25	35.75
T3DPI	T3DPIG5 00	33.33	3.091	<.001	21.58	45.08
T3DPI	T3DPIQ2 00	29.33	3.091	<.001	17.58	41.08
T3DPI	T3DEG2 00	54.67	3.091	<.001	42.92	66.42
T3DPIG2 00	T3DPIG5 00	9.33	3.091	.265	-2.42	21.08
T3DPIG2 00	T3DPIQ2 00	5.33	3.091	1	-6.42	17.08
T3DPIG2 00	T3DEG2 00	30.67	3.091	<.001	18.92	42.42
T3DPIG5 00	T3DPIQ2 00	-4	3.091	1	-15.75	7.75
T3DPIG5 00	T3DEG2 00	21.33	3.091	<.001	9.58	33.08
T3DPIQ2 00	T3DEG2 00	25.33	3.091	<.001	13.58	37.08

Tabla 124. Prueba de Bonferroni para diferencias intergrupales.

En la Tabla 123 se muestra que existieron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Para el grupo DE, se reporta una significancia igual a 1, por lo cual se determina que este grupo se mantuvo constante en el nivel de MCP-1 durante el periodo experimental. Por

otra parte, al compararlo con el grupo DPI en sus diferentes tomas, se mostró que el aumento de dicha interleucina fue significativo, reportándose un aumento del 20% previo al inicio de los tratamientos (Tabla 124), por lo que se concluye que la DPI ejerció un efecto positivo en el aumento de MCP-1. Posteriormente, se analizó si la instauración de los tratamientos influyó en los niveles de MCP-1, y se encontró que el grupo T3DPIG200, al cual se le impartió una dosis de 200mg/kg de extracto de *P. guajava*, fue el grupo que obtuvo un nivel significativo en la disminución de la interleucina, siendo un 12.5% menor para las 3 semanas de permanencia en el tratamiento. Por otro lado, de acuerdo con la Tabla 124 se observó que los tratamientos T3DPIG500, T3DPIQ200 y T3DEG200 no se consideraron significativos y se concluye que no ejercieron efecto en la disminución de MCP-1.

8.3.5 DISCUSIÓN GENERAL CAPITULO II , MODELO DE INFLAMACIÓN EN ROEDOR.

El estudio reportó interesantes datos sobre el comportamiento e influencia de la dieta proinflamatoria en las mediciones de peso, glucosa en ayuno, triglicéridos, así como en los niveles de adipocinas proinflamatorias medidas.

Existió una relación concreta entre el consumo de DPI y la propagación de un estado de inflamación crónica de bajo grado, que se propago a un estado de obesidad, y que como consecuencia del aumento de la masa adipocitaria, el tejido adiposo fue quien promovió y reguló la producción de adipocinas, y estas contribuyeron al metabolismo y su regulación; sin embargo, al crecer la masa adiposa iniciaron diferentes procesos que modificaron los parámetros típicos como la glucosa en ayuno. Además, la DPI al ser rica en grasa y azúcares simples, demostró tener un aumento en el conteo de triglicéridos y por ende esta serie de factores favoreció un estado oxidativo-inflamatorio característico de este tipo de dietas, fenómeno que ha sido reportado por diversos grupos de estudio (Duan et al., 2018). Por otro lado, este estudio verificó la instauración del estado inflamatorio verificando los niveles de alteración de las adipocinas estudiadas, donde se observó que cada una de ellas fue modificada de acuerdo con el escenario de obesidad.

El papel de TNF alfa, IL-6, MCP-1 e interferón gamma encontrado, se vio afectado de acuerdo al aumento de peso reportado, donde se vio que la dieta produjo obesidad en el modelo roedor e instauró un cambio metabólico produciendo un aumento de los niveles de dichas adipocinas. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en la literatura, donde se liga un aumento en la masa adipocitaria, la cual está asociada al aumento en la producción de interleucinas proinflamatorias (Sethi et al., 2021).

Factores desencadenantes que inician la respuesta inflamatoria aún no están descritos completamente ya que son muy complejas. Se reporta que a medida que se extiende el tejido adiposo, se genera la disminución de la nutrición de los adipocitos y por consecuencia inicia un aumento de la muerte adipocitaria que favorece la producción de especies reactivas de oxígeno y este estado exacerbado sirve como señal, para reclutar otro tipo de interleucinas proinflamatorias como MCP-1, quien es producida por células endoteliales y macrófagos (Taylor et al., 2021).

Los macrófagos juegan un rol clave en el desarrollo de la obesidad, cambiando de un tipo inactivo (M2) generalmente presente en un tejido adiposo sano, a un tipo actividad (M1). Este tipo de macrófagos son altamente adaptables al entorno creciente en lípidos, y para mantener este ambiente, los M1 aumentan la adiposidad activando el metabolismo de lípidos lisosomales (Xu et al., 2013), esto podría considerarse como una respuesta fisiológica para amortiguar el aumento de las concentraciones de lípidos liberados por los adipocitos durante la obesidad. Estos macrófagos son generalmente estimulados por el tipo de citocinas T-Helper 1 (Th1), como el interferón gamma (IFN- γ) quien está asociado a la regulación de diversos quimioatrayentes derivados del tejido adiposo que actúan colectivamente en el reclutamiento de células inflamatorias locales, y muchos de estos están ligados al metabolismo de la glucosa y grasa (Rocha., 2008); es por esta razón que las investigaciones sobre el vínculo entre obesidad e inflamación han aumentado exponencialmente los últimos años. En la actualidad, existen diversos tratamientos para la obesidad, sin embargo, pocos han sido efectivos, debido a la creciente oferta de productos industrializados de alto consumo y el bajo apego al régimen alimenticio, lo que ha perpetuado a la obesidad como el problema de salud pública más importante de nuestra época.

Este proyecto muestra que el uso de extracto de hoja de *P. guajava* favorece la disminución de la respuesta inflamatoria causada por la obesidad en el modelo roedor. En el caso de extracto acuoso de este estudio, se observó que la mayor cantidad de componente bioactivo que se pudo identificar fue ácido gálico y quercetina, estos componentes contribuyen a la disminución de la respuesta inflamatoria, y se han descrito en la literatura, que los principales mecanismos contra la obesidad de las plantas incluyen la supresión del apetito, y la reducción de la absorción de lípidos y carbohidratos mediante la inhibición de la alfa amilasa y alfa glucosidasa (Yilmazer-Musa et al., 2012), así como inhibición de la lipasa pancreática (Ha et al., 2016). Además, se ha reportado que el consumo de estos biocomponentes favorece la inhibición de la adipogénesis y la lipogénesis mediante el silenciamiento de genes que regulan la expresión de PPAR γ 2 and C/EBP α ligados a obesidad, diabetes y dislipidemias, y por lo tanto inhiben la diferenciación y proliferación de adipocitos además de reducir la acumulación de estos (Rufino et al., 2021). Por lo tanto, influyen directamente en la regulación del metabolismo de los lípidos. Por otro lado, se ha descrito que estos biocomponentes favorecen el aumento del gasto de energético mediante la modulación de vía AMPK/PGC1 α y la regulación de genes termogénicos, aumentando consumo de oxígeno, la producción de dióxido de carbono, y el intercambio respiratorio (Zhang et al., 2016). Estos mecanismos traen por consecuencia un aumento en el gasto energético basal (Sandoval et al., 2020). Por último, la regulación del microbiota intestinal a través de la disminución de la relación *firmicutes* en torno a *bacteroidetes*, que recordemos un alto porcentaje de *firmicutes* está ligado a la aparición de diabetes, dislipemias, así como eventos vasculares. Por otro lado, se ha reportado un aumento en la población de *Akkermancia muciniphila* ligada a una mejora en el metabolismo de glucosa y lípidos (Rodríguez-Daza et al., 2023) y la disminución del proceso inflamatorio en la obesidad (Singh et al., 2020).

El extracto de *P. guajava*, como se comentó anteriormente, contiene gran cantidad de agentes antioxidantes, destacan la presencia de ácidos fenólicos como el ácido gálico, así como flavonoides, como quercetina. En la literatura se han descrito más de 70 componentes bioactivos en las hojas de guayaba (Díaz-de-Cerio., 2016). En este estudio se observó que las dosis a 200 mg por kg de peso corporal demostraron una gran eficiencia en la disminución de

las interleucinas inflamatorias. En torno a la decisión de la dosis, existe una gran variedad de criterios, y para este estudio, la dosis seleccionada se tomó en cuenta de acuerdo con la que tuviera un nivel sin efecto adverso, y el rango utilizado varió entre 50 y 5000 mg/kg/día (Díaz-de-Cerio et al., 2017). Por lo cual, las dosis seleccionadas cumplieron con el anterior criterio, y anteriormente ya se ha reportado que dosis efectivas van desde los 2 a los 500 mg/kg/día, mostrando efectos significativos en la disminución de la presión arterial (Rivera et al., 2012), triglicéridos, glucosa en ayuno, colesterol, peso (Guo et al., 2020) y estrés oxidativo (Gasmi et al., 2022).

En la actualidad, en el estudio de plantas con enfoque medicinal ha ido en incremento, ya que estas fuentes contienen gran cantidad de componentes bioactivos. En el estudio de las plantas se ha reportado que la mayor cantidad de estos compuestos se encuentra en las hojas, en comparación a frutos o flor (Ordoñez-Gómez et al., 2014), y por esta razón se eligieron las hojas como el sucedáneo para la extracción de dichos compuestos. Los resultados de este estudio demuestran que el extracto acuoso de *P. guajava* disminuyó la inflamación crónica de bajo grado mediante la disminución de adipocinas proinflamatorias, la obesidad, el conteo total de triglicéridos, y la glucosa en ayuno en ratas obesas alimentadas con una dieta proinflamatoria. Se expresa la necesidad de estudios futuros para comprender mejor el mecanismo involucrado en los efectos beneficiosos promovidos por la ingesta de extracto de *Psidium guajava*, especialmente en modelos roedores con obesidad.

9. CONCLUSIÓN GENERAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El extracto acuoso de hojas *Psidium guajava* obtenido por técnica asistida por ultrasonido, mostró una alta eficacia para disminuir la inflamación crónica de bajo grado mediante la disminución de los niveles de glucosa en ayuno, conteo de triglicéridos, peso corporal así como el decremento en los niveles adipocinas proinflamatorias IL-6, FNT α , MCP-1, e IFN- γ en el modelo roedor. En cuenta el perfil fitoquímico y los efectos beneficiosos demostrados, se sugiere que este sucedáneo puede ser utilizado potencialmente para el desarrollo de alimentos funcionales y productos farmacéuticos.

10. REFERENCIAS

- Armenta, S., Garrigues, S., Guardia, M. (2015). The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 71, pp.2–8. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.trac.2014.12.011>
- Awad, T.S., Moharram H.A., Shaltout O.E., Asker D., Youssef M.M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food : A review. *FRIN*, 48(2), pp.410–427. DOI:[10.1016/j.foodres.2012.05.004](http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.foodres.2012.05.004)
- Babatola, L.J., Oboh, G., Ademiluyi, A.O. (2019). Toxicological evaluation of aqueous extract of different varieties of guava (*Psidium guajava* Linn) leaves. *Comparative Clinical Pathology* 28, pp.1689–1697 <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03002-0>.
- Buettner, T., Parhofer, K.G., Woenckhaus M., Wrede C.E., Kunz-Schughart L.A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L.C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3):485-501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>
- Castoldi, A., Naffah de Souza, C., Saraiva Câmara, N.O., Moraes-Vieira, P.M. (2016). The macrophage switch in obesity development. *Frontiers in Immunology*. 6, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>
- Cossio-Bolaños, M., Gómez Campos, R., Vargas V., Rodrigo, H.F., Rosalvo, T., –Arruda, M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas macho Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), pp. 2151-2156. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6659>
- Chen, H.-Y., Yen, G.-C. (2007). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*, 101(2):686-694. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.047>
- Cruz, A. F., Lopes, M. A., Fontes, M. M., Fernandes, M. S., Cordeiro, S. C., Costa, D. C., ... & Santos, M. R. (2021). *Psidium guajava* L. leaves extract improves dyslipidemia and insulin resistance in a rat model of metabolic syndrome. *Journal of ethnopharmacology*, 272, pp.113902.
- Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2013) Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem*. 20 (4) pp. 1076-80. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.12.002.

Das, U. N. (2001). Is obesity an inflammatory condition?. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 17(11-12), 953–966. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(01\)00672-4](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(01)00672-4)

Díaz-de-Cerio, E., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Romero, M., Verardo, V., Segura-Carretero, S., Duarte, J., Galvez, J. (2017). The hypoglycemic effects of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extract are associated with improving endothelial dysfunction in mice with diet-induced obesity. *Food Research International*, 96: 64-71, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.019>.

Duan, Y., Zeng, L., Zheng, C., Song, B., Li, F., Kong, X., Xu, K. (2018). Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Frontiers in Immunology*. 13;9, pp.2649. doi: 10.3389/fimmu.2018.02649.

Encuesta nacional de salud y nutrición (2018). Obesidad en México. Recuperado el 23 de abril 2022
https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Ferrante, A.W. (2013). Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *Journal of Clinical Investigation*.123, pp.4992–3. doi:10.1172/JCI73658.

Freire, J., Abreu, C., Duarte, S., Paula, F., Lima, A. (2014). Evaluation of the protective effect of guava fruits and leaves on oxidative stress. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*. 36. pp.35-40. Doi:10.4025/actascibiolsoci.v36i1.19839.

Garcia-Castello, E., Rodriguez-Lopez, A.D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *Lebensmittel-Wissenschaftund-Technologie*. 64. pp. 1114-1122. 10.1016/j.lwt.2015.07.024.

Gasmi, A., Mujawdiya, P.K., Noor, S., Lysiuk, R., Darmohray, R., Piscopo, S., Lenchyk, L.; Antonyak, H.; Dehtiarova, K.; Shanaida, M. (2022). Polyphenols in metabolic diseases. *Molecules* , 27, pp. 6280. <https://doi.org/10.3390/molecules27196280>

Guo, Q., Li, F., Duan, Y. (2020). Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. *Science China Life Sciences*. **63**, pp. 866–874. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9591-5>

Hernández Bautista, R., Mahmoud, A., Königsberg, M., Norma E. López Díaz G., (2018). Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal

plants, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (111), pp. 503-516.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.108>.

Ha, M.T., Tran, M.H., Ah, K.J., Jo, K.J., Kim, J., Kim, W.D., Cheon, W.J., Woo, M.H., Ryu, S.H., Min, B.S. (2016). Potential pancreatic lipase inhibitory activity of phenolic constituents from the root bark of *Morus alba* L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26 (12). pp. 2788-2794. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.04.066.

Hsu, C. & Yen, G. (2007). Effect of gallic in high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*, 98(4), 727-735. Doi:10.1017/S000711450774686X

INEGI, (2017). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Recuperado el 10 de 04 de 2017, de Inegi/estadísticasportema: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=mamb351&s=est&c=35669>

Hotamisligil, G.S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.

Jayashree, T., Subramanian, S. P., & Ramalingam, S. (2020). Anti-obesity activity of aqueous extract of *Psidium guajava* leaves in high fat diet induced obese mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, pp.109626.

Jovanović A. (2016) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques, Separation and purification technology, S1383-5866(16)31842-1.

Kadam, S.U., O'Donnell, C., Kumar, T., Álvarez, C., (2015). Identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in food science & technology ultrasound applications for the extraction*, 46, pp.60–67. DOI:[10.1016/j.tifs.2015.07.012](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012)

Kamath, J., Rahul, N., Kumar, A.K., Lakshmi, M. (2014) *Psidium guajava* L: A review . *International Journal of Green Pharmacy*, 2 (1): 9-12. <https://doi.org/10.22377/ijgp.v2i1.386>

Kumar, M., Tomar, M., Amarowicz, R., Saurabh, V., Nair, M.S., Maheshwari, C., Sasi, M., Prajapati, U., Hasan, M., Singh, S., Changan, S., Prajapat, R.K., Berwal, M.K., Satankar, V. (2021). Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities. *Foods*. 10(4) pp. 752. doi: 10.3390/foods10040752.

König, A.; Schwarzing, B.; Stadlbauer, V.; Lanzerstorfer, P.; Iken, M.; Schwarzing, C.; Kolb, P.; Schwarzing, S.; Mörwald, K.; Brunner, S.; et al. (2019). Guava (*Psidium guajava*) fruit

extract prepared by supercritical CO₂ extraction inhibits intestinal glucose resorption in a double-blind, randomized clinical study. *Nutrients*, 11, pp.512. <https://doi.org/10.3390/nu11071512>

La Fleur, S., Luijendijk, M., van der Zwaal, E. *et al.* (2014). The snacking rat as model of human obesity: effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. *International Journal of Obesity*, 38:643–649 <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.159>

Lavilla, I., Bendicho, C. (2017) Chapter 11 — Fundamentals of Ultrasound-assisted extraction, water extraction of bioactive Compounds, *Elsevier*, pp.291-316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>.

Li, H., Wang, Q., Chen, P., Zhou, C., Zhang, X., & Chen, L. (2021). Ursodeoxycholic acid treatment restores gut microbiota and alleviates liver inflammation in non-alcoholic steatohepatic mouse model. *Frontiers in Pharmacology*, 12, pp. 788558. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.788558>

Li, Y., Bai, D., Lu, Y., Chen, J., Yang, H., Mu, Y., Xu, J., Huang, X., Li, L., (2022). The crude guava polysaccharides ameliorate high-fat diet-induced obesity in mice via reshaping gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213 pp. 234-246. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.130.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.

Liu, R., Mabury, S.A.(2020) Synthetic Phenolic Antioxidants: A review of environmental occurrence, fate, human exposure, and toxicity. *Critical Review in Environmental Science and Technology*, 54, pp.11706–11719 DOI: 10.1021/acs.est.0c05077 17.

Leisegang, K., Henkel, R., & Agarwal, A. (2019). Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact in the male reproductive system. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.—: 1989)*, 82(5), e13178. <https://doi.org/10.1111/aji.13178>

Lok, B.; Babu, D.; Tabana, Y.; Dahham, S.S.; Adam, M.A.A.; Barakat, K.; Sandai, D. (2023). The anticancer potential of *Psidium guajava* (gGuava) Extracts. *Life*, 13, pp. 346. <https://doi.org/10.3390/life13020346>.

Makkar, HPS., Blümmel, M., Borowy, NK., Becker K. (1993) Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, pp. 161–165. DOI:10.1002/jsfa.2740610205

Mercado-Mercado G , Carrillo L , Wall-Medrano A , López J y Álvarez-Parrilla E.(2013) Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutricion Hospitalaria*; 28(1):36-46. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>

Meullemiestre, A., Petitcolas E., Maache-Rezzoug Z., Chemat F., Rezzoug S.A., (2016). Ultrasonics Sonochemistry Impact of ultrasound on solid – liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste . Kinetics , optimization and large scale experiments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, pp.230–239. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.07.022>.

Muhammad N. Safdar, Tusneem K, Saqib J. (2017) Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques, *journal of food and drug analysis* 25: pp. 488 – 500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>

Muñiz-Márquez, D.B. et al., (2013) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L . and their antioxidant activity., *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, pp.1149–1154. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.008>

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2019). Obesidad y sobrepeso. Recuperado el 15 de marzo de 2022 de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

Ordoñez Gómez, E., León Arévalo, A. Reátegui Días, D., Sandoval Chacón, M. (2012) Cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante en hojas, corteza, flores y fruto de dos variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.) *Investigación y Amazonía* 2011; 1(2) pp. 48-52.

Ouchi, N., Parker, J., Lugus, J. et al. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*. 11, 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>

Randhir, R., Shetty, K. (2007) Mung beans processed by solid-state bioconversion improve phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, pp.197–204. DOI: 10.1016/j.ifset.2006.10.003

Re, R., Pellegrini, N., (1999) Proteggente A, Pannala A, Yang M, RiceEvans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, pp. 1231–1237 . DOI:10.1016/S0891- 5849(98)00315-3.

Rivera, L., Morón, T., Sánchez, M., Zarcuela, A., Galisteo, M. (2012). Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity*, 16 (9) :2081-7 <https://doi.org/10.1038/oby.2008.315>

Rocha, V. Z., Folco, E. J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A. H., & Libby, P. (2008). Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circulation research*, 103(5), 467–476. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.177105>

Rohm, T. V., Meier, D. T., Olefsky, J. M., Donath, M. Y. (2022). Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity*, 55(1), 31–55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.013>

Rojo, A., Cálculo de tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales, valoración de incidencias (2014) *Animales de laboratorio*, 62:31-33. https://www.uib.cat/digitalAssets/303/303729_2014_animaleslaboratorio_num62_31_33.pdf

Rodríguez-Daza, M.C., de Vos, W.M. (2023). Polyphenols as drivers of a homeostatic gut microecology and immuno-metabolic traits of *Akkermansia muciniphila*: From mouse to man. *Int. J. Mol. Sci.* 24, pp. 45. <https://doi.org/10.3390/ijms24010045>

C. Rodríguez-Pérez, R. Quirantes-Piné, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, (2015) Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves, *Industrial Crops and Products*, (66), pp. 246-254, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.002>.

Rufino, A. T., Costa, V. M., Carvalho, F., Fernandes, E. (2021). Flavonoids as antiobesity agents: A review. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), pp. 556–585. <https://doi.org/10.1002/med.21740>

Sandoval, V., Sanz-Lamora, H., Arias, G., Marrero, P. F., Haro, D., Relat, J. (2020). Metabolic impact of flavonoids consumption in obesity: from central to peripheral. *Nutrients*, 12(8), pp.2393. <https://doi.org/10.3390/nu12082393>

Sethi, J.K., Hotamisligil, G.S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab* 3, 1302–1312 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00470-z>

Shang, Y., Zhou, H., Hu, M., & Feng, H. (2020). Effect of diet on insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 105(10), pp. 3346–3360. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa425>

Singh, M., Thrimawithana, T., Shukla, R., Adhikari, B. (2020). Managing obesity through natural polyphenols: A review, *Future Foods*, (1–2), pp.100002, <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2020.100002>.

Shirsath, S.R.; Sonawane, S.H.; Gogate, P.R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* (53), pp.10–23. DOI:[10.1016/j.cep.2012.01.003](https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003)

Sookkhee, S., Charoenwongse, P., Sutawee, K., Chusri, S., Jirakulsomchok, D., & Wongpoomchai, R. (2019). Effects of *Psidium guajava* Linn. leaf tea on overweight women with abdominal obesity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of traditional and complementary medicine*, 9(2), pp.150-155.

Souri, M., Oktavia, S., & Ifora, I. (2021). Potential anti-inflammatory effects of *Psidium guajava* L.: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 9(2), pp. 47-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.22270/ajprd.v9i2.941>

Soria, A.C.; Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends Food Sci. Technol.* (21), pp. 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>

Souri, M., Oktavia, S., ifora, I. (2021). Potential anti-inflammatory effects of *Psidium guajava* L.: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 9(2), 47-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.22270/ajprd.v9i2.941>

Taylor, E. (2021) The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clinical Science (London)* (6) pp. 731–752. doi: <https://doi.org/10.1042/CS20200895>

Thaler, J.P., Yi, C. X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Nguyen, H. T. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1), pp.153-162. doi : [10.1172/JCI59660](https://doi.org/10.1172/JCI59660)

Tippens, P., E. (2009). Física: conceptos y aplicaciones: incluye manual de laboratorio (1A. ED., 3A. REIMP.). Bogotá: Mcgraw-Hill interamericana.

Totsch, Stacie K., Quinn, Tammie L., Strath, L.J., McMeekin, J., Cowell, R.M., Gower, B.,A., Sorge, R.E. (2017). The impact of the standard american diet in rats: Effects on behavior,

physiology and recovery from inflammatory injury. *Scandinavian Journal of Pain*, (17), pp. 316-324. <https://doi.org/10.1016/j.sipain.2017.08.009>

Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics sonochemistry*, 29, pp. 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.005>

Vinayagam, R., & Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism*, 12, pp. 60. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7>

Xu, X., Grijalva, A., Skowronski, A., van Eijk, M., Serlie, M. J., Ferrante, A. W., Jr (2013). Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metabolism*, 18(6), pp. 816–830. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.001>

Yilmazer-Musa, M., Griffith, A. M., Michels, A. J., Schneider, E., Frei, B. (2012). Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), pp. 8924–8929. <https://doi.org/10.1021/jf301147n>

Zhenfeng, Huang., You, Luo., Xuesen, Xia., Anping, Wu., Zhenqiang Wu. (2021). Bioaccessibility, safety, and antidiabetic effect of phenolic-rich extract from fermented *Psidium guajava* leaves. *Journal of Functional Foods*, (86). pp. 1756-4646. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104723>

Zhang, L., Han, Z., Granato, D. (2021). Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. *Advances in food and nutrition research*, 98, 1–33. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.004>

Zhang, Y., Gu, M., Cai, W., Yu, L., Feng, L., Zhang, L., Zang, Q., Wang, Y., Wang, D., Chen, H., Tong, Q., Ji, G., & Huang, C. (2016). Dietary component isorhamnetin is a PPAR γ antagonist and ameliorates metabolic disorders induced by diet or leptin deficiency. *Scientific Reports*, 6, pp. 19288. <https://doi.org/10.1038/srep19288>

| <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03002-0>