



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

**Determinación de compuestos bioactivos y actividad
antiinflamatoria de la decocción del filtrante de hojas
de *Annona muricata* y *Bixa orellana***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniera Agroindustrial

AUTOR

Zoraya Erica RAMOS BAUTISTA

ASESOR

Mg. Oscar Pedro SANTISTEBAN ROJAS

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ramos, Z. (2023). *Determinación de compuestos bioactivos y actividad antiinflamatoria de la decocción del filtrante de hojas de Annona muricata y Bixa orellana*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Zoraya Erica Ramos Bautista
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	75998524
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0002-6726-9381
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Oscar Pedro Santisteban Rojas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15592915
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5843-6355
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Edgar Orlando Nagles Vidal
Tipo de documento	Cédula de identidad
Número de documento de identidad	CO / 16232368
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	María Rosario Calixto Cotos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10710049
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Oscar Pedro Santisteban Rojas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15592915

Datos de investigación	
Línea de investigación	C.0.1.1. Productos naturales
Grupo de investigación	Natural Resources Research - Nature
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jirón Puno N° 1002 Latitud: -12.05523 Longitud: -77.02355
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Química orgánica http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01 Ingeniería de procesos http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.04.02



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia del **Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL**, la **Dra. MARÍA ROSARIO CALIXTO COTOS** (Miembro) y el **Mg. OSCAR PEDRO SANTISTEBAN ROJAS** (Asesor), habiendo presentado para el efecto la **TESIS**, titulada “**Determinación de compuestos bioactivos y actividad antiinflamatoria de la decocción del filtrante de hojas de *Annona muricata* y *Bixa orellana*”**, después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborada por la Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **RAMOS BAUTISTA ZORAYA ERICA**; para optar el **TITULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL**, acordando calificarlo con la **NOTA** de:

DECOCCAO

(LETRAS)

18

(NÚMEROS)

Lima, 18 de agosto del 2023

Dr. Edgar Orlando Nagles Vidal
Presidenta

Dra. María Rosario Calixto Cotos
Membro

Mg. Oscar Pedro Santisteban Rojas
Asesor

Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

EP DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. Facultad; Química e Ingeniería Química
2. Escuela Profesional: Ingeniería Agroindustrial
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad: **Director de la Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial**
4. Apellidos y Nombres de la autoridad académica: **Edgar Orlando Nagles Vidal**
5. Operador del programa informático de similitudes: **Turnitin**
6. Documento evaluado Tesis para título de pregrado: **“Determinación de compuestos bioactivos y actividad antiinflamatoria de la decocción del filtrante de hojas de *Annona muricata* y *Bixa orellana*”**
7. Autores del documento:
 - **RAMOS BAUTISTA Zoraya Erica**
8. Fecha de recepción del documento: **23/06/2023**
9. Fecha de aplicación del programa informático de similitudes: **27/06/2023**
10. Software utilizado: **Turnitin**
11. Configuración del programa detector de similitudes
 - Excluye textos entrecomillados
 - Excluye bibliografía
 - Excluye cadenas menores a 40 palabras
 - Otros criterios (especificar)
12. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes: **DOS POR CIENTO (2%)**
13. Fuentes originales de las similitudes encontradas: **ANEXO ADJUNTO**
14. Observaciones
15. Calificación de originalidad
 - Documento cumple criterios de originalidad, sin observaciones **(2%)**
16. Fecha del informe: **Lima 17/07/2023**



Firmado digitalmente por NAGLES VIDAL Edgar Orlando FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.07.2023 10:30:51 -05:00

Firma del evaluador

/cpa.



Firmado digitalmente por NAGLES VIDAL Edgar Orlando FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.07.2023 10:31:03 -05:00

Dr. Edgar Orlando Nagles Vidal
Director

DEDICATORIA

A Dios

A mi mamá (abuelita) Aydee Gervacio Cordova, por su apoyo incondicional, por estar siempre cuando la necesitaba, por guiarme durante mi etapa escolar y universitaria. Gracias por esos momentos agradables y por darme amor, paciencia, protección y salud.

A mi tía Yanina Bautista Gervacio por apoyarme y confiar en mí desde el principio que decidí postular a la universidad, por toda la confianza brindada, por el apoyo incondicional en mis estudios, y sobre todo por el amor y paciencia. Fuiste mi motor principal para llegar hasta aquí.

A mi mamá Rolinda Bautista Gervacio por darme la vida, por cuidarme y protegerme, por buscar maneras para estar juntas, por darme felicidad. Por tu preocupación y por estar pendiente de mí.

A mi tía Norma Bautista Gervacio por tu cariño brindado en mi niñez, no olvidare cuando jugábamos. Por estar conmigo cuando te necesitaba, fuiste uno de mis motores a seguir adelante, y por tu apoyo incondicional.

A mi tío Carlos Bautista Gervacio por apoyarme durante todo este tiempo, por tus consejos que me ayudaban a seguir adelante cuando ya no podía. Por no dejarme sola, y por todo aquello que me diste.

AGRADECIMIENTO

A mis abuelos Hipólito Bautista Requena y Aydee Gervacio por darme educación, comprensión, tranquilidad y amor. Por estar conmigo siempre. Me hacen enorgullecer.

A mi mamá Rolinda, mis tías Yanina y Norma, y mi tío Carlos Bautista Gervacio por su apoyo durante toda esta etapa y formar parte en mis experimentos.

A mi bisabuelo Gines Bautista Vicuña, por estar pendiente de mi avance, por sus consejos y apoyo en toda mi carrera profesional. Gracias por estar conmigo.

A mis hermanos Jairo y Gabriel Soto Bautista. Por su comprensión, apoyo y consejo.

A Edwin Bautista Vasquez por brindarme su apoyo en la etapa difícil que dependía la culminación de mi carrera hasta la actualidad.

A mi asesor Mg. Oscar Pedro Santisteban Rojas, por estar presente desde el principio del desarrollo de la investigación. Por su dedicación, esfuerzo, comprensión, exigencia y paciencia. Le estoy eternamente agradecido por toda la enseñanza brindada, apoyo y seguimiento durante la etapa de elaboración del presente estudio.

A Gustavo Adolfo Ruiz por su apoyo y disposición durante el desarrollo del trabajo

A Dra. Maria Rosario Calixto Cotos por su rigurosidad en sus observaciones para el logro de esta investigación.

A Dr. Cesar Fuertes Ruiton por su minuciosidad y valiosos aportes para la realización del presente investigación

A Sra. Secretaria de la E.P Ingeniería Agroindustrial Carmen Pedrahita por su manejo excepcional de la parte administrativa.

Al Director de la E.P Ingeniería Agroindustrial Orlando Nagles Vidal por autorizar mi ingreso a las instalaciones del laboratorio para llevar a cabo la presente investigación.

Al Ing. Leoncio Reyna Mariñas por su espíritu de colaborar y presto a apoyar.

A Erika Palomino Carhuallanqui y Walter Anglas Valqui, por su apoyo en las pruebas estadísticas.

A David Rojas por su colaboración en los análisis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE ANEXOS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. HIPOTESIS	11
III. OBJETIVOS	11
3.1 OBJETIVO GENERAL	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
IV. MARCO TEÓRICO	12
4.1 ANTECEDENTES	12
4.1.1 Antecedentes nacionales	12
4.1.2 Antecedentes internacionales	14
4.2 BASE TEÓRICA.....	16
4.2.1 Achiote (<i>Bixa orellana</i>)	16
4.2.2 Guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	19
4.2.3 Compuestos bioactivos	24
4.2.4 Polifenoles.....	24
4.2.5 Inflamación.....	28
4.2.6 Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).....	28
4.2.7 Infusión	29
4.2.8 Decocción.....	29
4.2.9 Filtrante	30
V. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	31
5.1 LUGAR DE EJECUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	31
5.2 MATERIALES Y EQUIPOS.....	31
5.2.1 Materia botánica	31
5.2.2 Materia biológica	31
5.2.3 Utensilios.....	31
5.2.4 Material de vidrio y afines	32
5.2.5 Equipos e instrumentos.....	32

5.2.6	Reactivos	33
5.3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	33
5.3.1	Determinación del porcentaje de agua en hojas de guanábana y achiote a 45 °C.	33
5.3.2	Obtención de la decocción e infusión en hojas de guanábana y achiote ..	34
5.3.3	Elaboración del filtrante a base de hojas de guanábana y achiote.....	34
5.3.4	Obtención de las decocciones de los filtrantes	38
5.3.5	Determinación de compuestos bioactivos mediante HPLC-DAD.	38
5.3.1	Determinación de la capacidad extractante en los filtrantes	39
5.3.2	Evaluación de la actividad antiinflamatoria del filtrante.	40
5.3.3	Análisis microbiológico del filtrante	43
5.3.4	Evaluación sensorial de la decocción del filtrante.....	43
5.3.5	Análisis estadístico	44
VI.	RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	45
6.1	Porcentaje de agua en las hojas frescas.....	45
6.2	Capacidad extractante en la decocción de los filtrantes.....	45
6.3	Determinación de compuestos bioactivos en las hojas de guanábana y achiote mediante HPLC-DAD.	46
6.4	Determinación de compuestos bioactivos en las decocciones de los filtrantes mediante HPLC-DAD.	54
6.4.1	Quercetina	55
6.4.2	Hesperidina.....	58
6.4.3	Epigallocatequina	60
6.5	Actividad antiinflamatoria del filtrante.....	63
6.6	Evaluación microbiológica del filtrante	67
6.7	Análisis sensorial de la decocción del filtrante	67
VII.	CONCLUSIONES	69
VIII.	RECOMENDACIONES	70
IX.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	71
X.	ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de achiote	17
Tabla 2 Clasificación taxonómica de guanábana.....	20
Tabla 3 Preparación tradicional de las partes de <i>Annona muricata</i>	23
Tabla 4 Criterio microbiológico en hierbas de uso alimentario para infusiones (té, mate, manzanilla, boldo, otros).....	30
Tabla 5 Formulaciones de los filtrantes	36
Tabla 6 Condiciones cromatográficas	39
Tabla 7 Grupos de trabajo para cada tratamiento	41
Tabla 8 Prueba hedónica	43
Tabla 9 Porcentaje de agua en la materia prima	45
Tabla 10 Capacidad extractante para cada filtrante	45
Tabla 11 Compuestos polifenólicos en el liofilizado de la infusión y decocción de hojas de guanábana y achiote	46
Tabla 12 Análisis de varianza de quercetina en formas de preparación y especie	48
Tabla 13 Análisis de varianza de hesperidina en formas de preparación y especie de planta.....	50
Tabla 14 Prueba de rangos múltiples de formas de preparación	51
Tabla 15 Análisis de varianza de epigallocatequina en forma de preparación y especie	52
Tabla 16 Prueba de rangos múltiples de formas de preparación.	52
Tabla 17 Compuestos polifenólicos en la decocción de los filtrantes	54
Tabla 18 Análisis de varianza de quercetina en filtrantes	55
Tabla 19 Pruebas de rangos múltiple de quercetina en filtrantes	55
Tabla 20 Análisis de varianza de hesperidina en filtrantes	58
Tabla 21 Análisis de varianza de epigallocatequina en filtrantes	60
Tabla 22 Criterio microbiológico del filtrante F2.....	67
Tabla 23 Evaluación de color, olor y sabor de la decocción del filtrante F2	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Planta de <i>Bixa orellana</i>	18
Figura 2 Distribución geográfica del cultivo de <i>Annona muricata</i>	20
Figura 3 Planta de <i>Annona muricata</i>	21
Figura 4 Estructura química de flavonoide.	25
Figura 5 Estructura química de quercetina.	26
Figura 6 Estructura química de hesperidina.	26
Figura 7 Estructura química de epigallocatequina.	28
Figura 8 Cromatógrafo líquido de alto rendimiento.	29
Figura 9 Flujoograma de elaboración de filtrante.	37
Figura 10 Evaluación de actividad antiinflamatoria del filtrante en <i>rattus norvigicus</i> . .	42
Figura 11 Concentración de quercetina en infusión y decocción en las hojas de guanábana y achiote.	48
Figura 12 Cromatograma de quercetina en infusión y decocción en hojas de guanábana y achiote.	49
Figura 13 Cromatograma de hesperidina en infusión y decocción en hojas de <i>Annona muricata</i> y <i>Bixa orellana</i>	51
Figura 14 Cromatograma de epigallocatequina en infusión y decocción en hojas de guanábana y achiote.	53
Figura 15 Contenido de quercetina en filtrantes.	56
Figura 16 Identificación de quercetina en filtrantes, empleando HPLC-DAD.	57
Figura 17 Concentración de hesperidina en filtrantes.	58
Figura 18 Cromatograma de hesperidina en filtrantes mediante HPLC-DAD.	59
Figura 19 Concentración de epigallocatequina en los filtrantes.	61
Figura 20 Cromatograma de epigallocatequina en filtrantes.	62
Figura 21 Efecto antiinflamatorio del filtrante F2 en modelo de edema pedal.	63
Figura 22 Porcentaje de inhibición de la inflamación producida por carragenina, mediante la prueba de edema pedal.	64
Figura 23 Curva de calibración de estándar de quercetina.	87
Figura 24 Curva de calibración de estándar de hesperidina.	87
Figura 25 Curva de calibración de estándar de epigallocatequina.	88
Figura 26 Elaboracion de filtrante a base de hojas de guanábana y achiote.	91
Figura 27 Infusión y decocción de hojas de guanábana.	94

Figura 28 Infusión y decocción de hojas de achiote.....	94
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Taxonomía de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).	79
Anexo 2. Taxonomía de <i>Bixa orellana</i> (Achiote).	80
Anexo 3. Certificado de análisis de quercetina.	81
Anexo 4. Certificado de análisis de hesperidina	83
Anexo 5. Certificado de análisis de epigallocatequina.	85
Anexo 6. Curvas de calibración de los estándares.....	87
Anexo 7. Certificado de compras de animales de experimentación.	89
Anexo 8. Análisis microbiológico.....	90
Anexo 9. Elaboración de filtrante.....	91
Anexo 10. Formato de evaluación sensorial.	92
Anexo 11. Decocción de filtrantes	93
Anexo 12. Decocción e infusión de hojas de guanábana y achiote.....	94

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo identificar y cuantificar los compuestos bioactivos tales como quercetina, hesperidina y epigallocatequina mediante HPLC-DAD en la decocción de los filtrantes elaborado a base de hojas de *Annona muricata* y *Bixa orellana*; así como también en la infusión y decocción de las hojas frescas de ambas, con el fin de establecer posibles relaciones. Además, se buscó establecer la capacidad antiinflamatoria de la decocción del filtrante, empleándose como prueba confirmatoria el test de edema pedal. También se realizó el análisis microbiológico correspondiente y la evaluación sensorial del filtrante seleccionado. Se elaboraron los filtrantes según las proporciones de 20:80 (F1), 40:60 (F2), 50:50 (F3), 60:40 (F4) y 80:20 (F5) de hojas de guanábana y achiote respectivamente.

Los resultados muestran mayor concentración de quercetina en la infusión de hojas de guanábana (15,998 µg/g) y achiote (210,207 µg/g). La mayor concentración de hesperidina se encontró en infusión con 163,455 µg/g en hojas de guanábana y 216,611 µg/g en achiote. Sin embargo, la decocción presentó mayor concentración de epigallocatequina encontrándose 32629,836 µg/g en hojas de achiote y 358,955 µg/g en hojas de guanábana. En la decocción de los filtrantes las concentraciones más altas de quercetina, hesperidina y epigallocatequina fueron F1 (1454,784 µg/g), F5 (16,468 µg/g) y F2 (1139,483 µg/g) respectivamente. El filtrante F2 mostró una moderada actividad antiinflamatoria, inhibió la inflamación en un 15%. Por otro lado, los agentes microbiológicos se encontraron dentro de los parámetros establecidos por NTS N° 071-V.01 MINSA/DIGESA. Finalmente, el filtrante F2 tuvo aceptación en los atributos color, olor y sabor, dado que obtuvo una valoración de “Me gusta”.

Se concluye que la decocción del filtrante F2 cuya proporción es 40:60 (hojas de guanábana: hojas de achiote) puede ser empleada para aliviar la inflamación de tejido muscular liso, como medicamento completamente natural, y esta actividad está relacionada con la presencia de los compuestos bioactivos de estudio.

Palabras clave: *Annona muricata*, *Bixa orellana*, infusión, decocción, filtrante, actividad antiinflamatoria.

ABSTRACT

The objective of this research was to identify and quantify the bioactive compounds of quercetin, hesperidin and epigallocatechin by means of HPLC-DAD in the decoction of the filtrates made from *Annona muricata* and *Bixa orellana* leaves; as well as in the infusion and decoction of the fresh leaves of both, in order to establish possible relationships. In addition, it was sought to establish the anti-inflammatory capacity of the filtrate decoction, using the pedal edema test as a confirmatory test. The corresponding microbiological analysis and sensory evaluation of the selected filtrate were also carried out. The filters were made according to the proportions of 20:80 (F1), 40:60 (F2), 50:50 (F3), 60:40 (F4) and 80:20 (F5) of soursop and achiote leaves, respectively.

The results show a higher concentration of quercetin in infusion in soursop (15,998 µg/g) and annatto (210,207 µg/g) leaves. The highest concentration of hesperidin was found in infusion with 163,455 µg/g in soursop leaves and 216,611 µg/g in achiote. However, the decoction presented a higher epigallocatechin concentration, finding 32629,836 µg/g in achiote leaves and 358,955 µg/g in soursop leaves. In the decoction of the filtrates, the highest concentrations of quercetin, hesperidin and epigallocatechin were F1 (1454,784 µg/g), F5 (16,468 µg/g) and F2 (1139,483 µg/g) respectively. The F2 filter showed moderate anti-inflammatory activity, inhibiting inflammation by 15%. On the other hand, the microbiological agents were within the parameters established by NTS N° 071-V.01 MINSA/DIGESA. Finally, the F2 filter was accepted in the color, smell and flavor attributes, since it obtained a rating of "I like it".

It is concluded that the decoction of the filter F2 whose ratio is 40:60 (soursop leaves: achiote leaves) can be used to alleviate inflammation of smooth muscle tissue, as a completely natural medicine, and this activity is related to the presence of the study bioactive compounds.

Keywords: *Annona muricata*, *Bixa orellana*, infusion, decoction, filtering, anti-inflammatory activity.

I. INTRODUCCIÓN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar los compuestos bioactivos con capacidad antiinflamatoria en la decocción del filtrante de las hojas de guanábana (*Annona muricata*) y achiote (*Bixa orellana*). Ambas plantas son señaladas por la cultura popular peruana, sudamericana y de los países tropicales del mundo como medicinales; guanábana como anticancerígeno, antiespasmódico, sedativo, antidiabético, vasodilatador y antihipertensivo; achiote para desórdenes de la próstata e inflamaciones internas, hipertensión arterial, colesterol elevado, obesidad, insuficiencia renal, eliminación de ácido úrico y enfermedades bacterianas, asimismo EsSalud (2014) recomienda tomar hojas de achiote para la próstata aliviando dolores, lo cual conlleva mayor consumo de hojas.

Las actividades medicinales de las hojas de achiote y guanábana, están en función a sus compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos, alcaloides, aceites esenciales, entre otros (Quilez *et al.*, 2015). Para la identificación de los compuestos bioactivos responsables de los beneficios de la salud de diferentes partes de la planta se utilizan diferentes disolventes. Los solventes utilizados en la extracción de metabolitos secundarios en diversos estudios son en su mayoría solventes apolares y en minoría los solventes polares. En general, los procedimientos de extracción incluyen maceración, digestión, decocción, infusión, percolación, extracciones asistida por ultrasonido y microondas. Asimismo, la forma de consumo mayoritario de las plantas medicinales y/o aromáticas son en infusiones y/o decocciones, siendo estas últimas más utilizadas en medicina tradicional. Dado la importancia medicinal, el método de extracción de los compuestos bioactivos más apropiado es la extracción acuosa ya sea por infusión o decocción.

Actualmente, existen empresas locales que comercializan hojas secas enteras o trituradas, empacadas y expandidas para su uso popular. Las hojas frescas en su mayoría se venden como infusión por los ambulantes como agua de tiempo. A nivel industrial, las hojas de diversas planta aromáticas y medicinales se comercializan en filtrantes ("bolsitas"), mayormente en polvo. Los filtrantes tienen la ventaja de fácil comercialización, sellado hermético, envasado adecuado lo cual no están en contacto directo con la luz, presentación acogedora y fácil elaboración.

Tomando en cuenta las propiedades benéficas de las hojas de guanábana y achiote, y su consumo por los pobladores. Se llevó a cabo la elaboración de filtrantes, por sus ventajas ya antes mencionada. Al elaborar filtrante de la mezcla de ambas plantas se estaría brindando facilidad de distribución y acceso a los consumidores, así como también por su facilidad de preparación para obtener la infusión/decocción, por lo cual los consumidores ya no tendrían el problema de realizar de manera casera. Por otro lado, se estaría utilizando un subproducto de ambas plantas, ya que se utiliza el fruto y semilla principalmente de guanábana y achiote respectivamente. A su vez, los productores de guanábana y achiote pueden incrementar sus ingresos económicos al tener un recurso más que comercializar.

A nivel nacional existen mínimos investigaciones sobre el uso de extractos acuosos de compuestos fenólicos en las hojas de guanábana (*Annona muricata*) y hojas de achiote (*Bixa orellana*). Conocer el compuesto bioactivo responsable de los beneficios del filtrante, infusión y decocción, es importante porque nos ayuda a saber la causa y efecto de estos mismos. Esto nos conlleva a realizar la presente investigación y posiblemente respaldar su uso popular con la determinación científica rigurosa de la

presencia de compuestos bioactivos que tienen actividad para las afecciones que se indican la cultura popular peruana y mundial

En base a lo anterior nos preguntamos: ¿contendrá la decocción de hojas de achiote y guanábana contenidas en el filtrante los compuestos bioactivos que tengan propiedades antiinflamatorias que respalden su uso popular?

II. HIPOTESIS

La decocción del filtrante a base de hojas *Annona muricata* y *Bixa orellana*, presenta compuestos bioactivos con actividad antiinflamatoria.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los compuestos bioactivos con actividad antiinflamatoria en la decocción del filtrante de hojas *Annona muricata* y *Bixa orellana*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los compuestos bioactivos como quercetina, hesperidina y epigallocatequina, en infusiones y decocciones en las hojas frescas de *Annona muricata* y *Bixa orellana* mediante HPLC-DAD.
- Elaborar un filtrante a base de hojas de *Annona muricata* y de *Bixa orellana*
- Cuantificar los compuestos bioactivos de quercetina, hesperidina y epigallocatequina, en las decocciones de los filtrantes de la mezcla de hojas de *Annona muricata* y *Bixa orellana* mediante HPLC-DAD.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del filtrante seleccionado mediante la técnica de edema pedal.
- Realizar el análisis microbiológico según NTS N° 071-V.01 MINSA/DIGESA y evaluación sensorial del filtrante seleccionado.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 ANTECEDENTES

4.1.1 Antecedentes nacionales

Quispe (2018), en su tesis Diagnóstico, Evaluación e instalación de una planta productora de bolsitas filtrantes de hojas de guanábana, Arequipa 2018, mostró que los filtrantes tuvieron una aceptación sensorial por los panelistas de la población de 20 a 74 años, además indico que es favorable la producción de filtrantes a base de hojas de guanábana debido a que existe un incremento 0.96% con la siembra de dicha planta y no generaría grandes impactos ambientales. A su vez menciona que la venta de 25 filtrantes sería de S/. 3.10 y lo cual generaría una ganancia al vendedor y por consiguiente al agricultor.

Mio y Cunyarache (2019), en su tesis titulada “Formulación y caracterización de un filtrante a partir de las hojas de guanábana (*Annona muricata* L.)”. Elaboraron filtrantes a partir de hojas de guanábana para tres estadios: brote, semimaduras y maduras. A las cuales se realizaron una evaluación sensorial y encontró que todos los filtrantes de diferentes estadios mostraron aceptabilidad en cuanto a parámetros de aroma, color y apariencia, sin embargo, el filtrante a base de hojas maduras tuvo mayor aceptación en el sabor. Este último presentó 46,16 mg ácido gálico/100 ml muestra de contenido de fenoles y 5,43 μ M Trolox/ml de capacidad antioxidante. Finalmente, realizaron un análisis microbiológico del filtrante y estuvo dentro de los límites permisibles según NTS N° 071 MINSA/DIGESA V-01 (2008).

Cayra (2019), en su investigación sobre Optimización de los parámetros de secado de hojas de guanábana (*Annona muricata* L.) sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante, evaluó la influencia del secado por aire caliente en el contenido

de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de la hoja de guanábana (*Annona muricata* L.). Para ello las hojas de guanábana son secadas a una temperatura de 50, 60 y 70 °C en un tiempo 60, 120 y 180 min. Como resultado obtuvo hojas secadas a 60 °C y 204 min presentaron mayor rendimiento, lo cual compuestos fenólicos $24,33 \pm 1,24$ (mg ácido gálico/100 g de muestra) y con una capacidad antioxidante de $84,35 \pm 2,09$ ($\mu\text{mol/g}$). Esto indica que hojas secadas a 45 °C no tendrá mayor pérdida de compuestos fenólicos.

Espichán y Veles (2022), en su tesis Estudio de pre factibilidad para la instalación de una planta de producción de filtrantes de hojas de achiote (*Bixa orellana* L.), evalúan la viabilidad de colocar una planta de filtrante de achiote en el distrito de Puente Piedra, Lima. Menciona una disponibilidad de 29,623 toneladas de hojas de achiote durante el año, lo cual hace que sea accesible para elaborar un filtrante. La temperatura de secado consta de tres etapas, primero a 60 °C, luego disminuye a 40°C finalmente a 50°C con una humedad de 10%. Además, la bolsa filtrante contiene 1 gramo de la muestra.

Suarez (2021), en su tesis, Determinación de metabolitos secundarios de hojas de once morfotipos de *Bixa orellana* L. por métodos espectrofotométricos, encuentra los valores de metabolitos secundarios en once morfotipos de achiote, y los valores máximos encontrados de metabolitos secundarios fueron 17567,004 mg/100g de polifenoles totales, 86,473 mg/100g de flavonoides, 11,210 mg/100g de antocianinas, 0,018 mg/100g de catequinas, 45,82 mg/100g de alcaloides y 577,741 mg/100g de saponinas.

Chabelón (2018), en su tesis “Efecto de la concentración del extracto acuoso liofilizado de *Bixa orellana* (Achiote) sobre su actividad antiinflamatoria”, evaluó los extractos acuosos en 4%, 6% y 8% de las hojas del achiote procedente del distrito de Iquitos en ratas de la especie *Mus m^usculus* de la cepa Balb/c, para encontrar su actividad inflamatoria. Los resultados mostraron una inhibición de inflamación en 52 % y 64 % en

las dos primeras horas al 4%. El porcentaje de inhibición fue 45 % y 78% en el extracto al 8% superando a las muestras de diclofenaco. Esto indica que los extractos acuosos de las hojas de achiote son potenciales antiinflamatorios.

4.1.2 Antecedentes internacionales

Quilez *et al.* (2015), en su artículo Validation of ethnopharmacological use as anti-inflammatory of a decoction from *Annona muricata* leaves, demuestran la actividad antiinflamatoria de la decocción de hojas de guanábana. Encuentran presencia de taninos, flavonoides, ácidos fenólicos y alcaloides en la decocción de las hojas de guanábana. Trabajaron con extractos acuosos de 250 mg/kg y 500 mg/kg de hojas de *Annona muricata* para verificar la actividad antiinflamatoria. Los resultados mostraron una mayor inhibición de la inflamación en el extracto 500 mg/kg con un $52,70 \pm 0,12$ %. Por otra parte, no presentó toxicidad las decocciones en estas dosis. Se concluye que la medicina tradicional si es un agente antiinflamatorio.

Oliveira *et al.* (2017), en su artículo Exploratory studies on the in vitro anti-inflammatory potential of two herbal teas (*Annona muricata* L. and *Jasminum grandiflorum* L.), and relation with their phenolic composition. Determinaron compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y encontraron presencia de ácido hidroxicinámico (=5-O-ácido cafeoilquínico) y cuatro flavonoles (quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-rutinósido y kaempferol-3-O-rutinósido) en el extracto acuoso del té de hojas de guanábana, siendo el más predominante ácido cafeoilquínico. El té de *annona muricata* sí tuvo actividad antiinflamatoria.

Nolasco *et al.* (2022), en su artículo *Annona muricata* leaves as a source of bioactive compounds: extraction and quantification using ultrasound, compararon el contenido de polifenoles mediante la extracción por ultrasonido con respecto a los

extractos de las decocciones e infusiones de hojas de *Annona muricata* de forma tradicional. Encontraron mayor contenido de epigallocatequina en la decocción ($0,74 \pm 0,04$ mg/100ml) en comparación a infusión ($0,52 \pm 0,34$ mg/100ml), pero no hubo diferencia significativa en ambos, sin embargo, mediante la extracción ultrasónica obtuvo $14,80 \pm 0,71$ mg/100ml. Todos los extractos presentaron 18 ácidos fenólicos, cinco flavonoides y un tanino elagico en diferentes concentraciones dando como ganador el extracto por ultrasonido. Se identificaron y cuantificaron en ultrasonido veinticuatro compuestos fenólicos, mientras que en los extractos de decocción e infusión se identificaron veintitrés y veintidós. Los componentes mayores fueron epigallocatequina ($14,80$ mg/100 ml), galocatequina con $7,59$ mg/100 ml y $7,01$ mg/100 ml respectivamente. Esto indica que tanto la decocción como infusión de las hojas de *annona muricata* pueden ser utilizados como productos medicinales.

Santana *et al.* (2021), en su artículo Evaluation of bioactive compounds, phytochemicals profile and antioxidant potential of the aqueous and ethanolic extracts of some traditional fruit tree leaves used in Brazilian folk medicine. Comparó el método de extracción de compuestos fenoles por infusión y etanol en hojas de ocho plantas entre ellas la guanábana (*Annona muricata*). Los compuestos polifenolicos por infusión presentaron mayor concentración con respecto a extracción por etanol. Polifenoles extraídas por infusión fueron catequina ($70,99 \pm 0,38$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido clorogénico ($859,42 \pm 11,45$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido p-cumárico ($231,46 \pm 0,41$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), epicatequina ($212,47 \pm 2,68$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), caempferol ($56,95 \pm 1,52$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), rutina ($4543,80 \pm 9,80$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); sin embargo en medio etanolito se encontraron: catequina ($14,26 \pm 0,14$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), caempferol ($14,91 \pm 8,15$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido p-cumárico ($218,60 \pm 15,42$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Munggarani *et al.* (2014), en su investigación *Bixa Orellana* L Leaf infusion as an Anti-inflammatory Agent in Carrageenan-induced Wistar Rats. Evaluaron la actividad

antiinflamatoria de 0,09g; 0,018g y 0,36g de infusión de hojas de achiote frente a carragenina. La infusión con la dosis de 0.018 g presentó mayor porcentaje de inhibición con 16,97% seguido por 0,09 g (10,96%) y 0,36 g (7,50%), comparado con diclofenaco (13,79%). Esto indica que las infusiones de hojas de achiote tienen propiedades antiinflamatorias.

Ijeoma *et al.* (2016), en su artículo Phytochemical and Proximate Analysis of Foliage and Seed of *Bixa orellana* Linn. Los perfiles fitoquímicos encontrados en extracto acuoso fueron taninos, flavonoide, glicosidos, fenoles y saponinas; y por extracción con etanol fueron alcaloide, saponina y tanino. Esta diferencia del contenido de los fotoquímicos, influye en las preparaciones medicinales tradicionales en el manejo de la enfermedad. Las hojas mostraron altas concentraciones de fenoles, flavonoides y taninos con respecto a las semillas.

4.2 BASE TEÓRICA

4.2.1 Achiote (*Bixa orellana*)

El achiote pertenece a la familia *Bixaceae*, del género *Bixa* (Tabla 1). Se le conoce con otros nombres populares como urucum y annato. Achiote es originaria de América del Sur y Centro. Esta planta se cultiva también en India, Kenia y África oriental. En cuanto a la producción y exportación, Perú es el líder en el ranking mundial (Stringheta *et al.*, 2018).

Tabla 1*Clasificación taxonómica de achote*

Taxonomía	
Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida (= Dicotyledoneae)
Orden	Violales
Familia	Bixaceae
Género	Bixa
Especie	<i>Orellana</i>

Fuente: Lista de Especies Galápagos (1959).

Esta planta se caracteriza por crecer hasta 9 m de altura. Presenta hojas alternas puntiagudas de color verde claro. Flores de color blanco y rosadas, dependiendo de la variedad. Frutos ovoides que contienen semillas responsables de la tinción de color rojo, cubiertos por espinas punzante como se observa en Figura 1. Los frutos en su primer estadio tienen color verde, en estadio maduro es de color marrón-naranja.

Figura 1

Planta de Bixa orellana.



Nota. A) Planta, B) Hojas, C) Flores, D) Semilla de *Bixa orellana*.

A nivel industrial, la semilla es el más comercializado debido a su pigmento rojo-naranja (bixina). Los pigmentos de las semillas en el ámbito de industrias alimentarias se utilizan en mantequilla, carnes, dulces, embutidos, entre otros (Stringheta *et al.* 2018). También es ampliamente utilizado en la industria textil, para tinción de prendas.

En la medicina popular, cada una de las partes de la planta tiene diferentes finalidades, siendo las hojas más utilizadas en etnobotánica. Diversos estudios etnofarmacológicos, reportan que las semillas, raíces, tallos y hojas se preparan en forma de decocción, maceración, infusión, jugo. La hoja es utilizada como antiinflamatorio,

antiasmático, antibacteriano, infección de garganta y enfermedades de la piel. La semilla como tónico gastrointestinal, antidiabético y para tratar quemaduras (Chavelon, 2018).

Las hojas de achiote son conocidos popularmente como la cura para la próstata, este conocimiento es respaldado por Seguro Social de Salud (EsSalud, 2014), que recomendó el consumo de hojas de achiote como un poderoso desinflamante de la próstata debido a la presencia de esteroides. Además, la presencia de flavonoides hace que sea un diurético y por consiguiente regula la función renal. De la misma manera Difadi (2015), menciona que el achiote ayuda a combatir o reducir la prostatitis y también ayuda a reducir infecciones de orina (cistitis). Por otro lado, EsSalud (2014) recomienda tomar como agua de tiempo para ello se tienen que colocar 20 gramos de hojas secas en un litro de agua.

4.2.2 Guanábana (*Annona muricata*)

Annona muricata también llamado graviola en portugués, pertenece a la familia de Annonaceae (Tabla 2). *Annona muricata* crece en África oriental y occidental, Australia, América del Norte, Centro y Sur, Asia templada y tropical, el Caribe, Mesoamérica y las islas del Pacífico centro-meridional (Figura 2), (Zubaidi *et al.*, 2023), a una altitud de 1200 m.s.n.m con temperaturas entre 25 y 28 °C, con humedad relativa entre 60 y 80% (Mutakin *et al.*, 2022. y Coria-Téllez *et al.*, 2018). Según MIDAGRI (2020), Lima, Ica, Loreto, Ucayali, Junín y La Libertad son los departamentos principales de producción de guanábana.

Tabla 2

Clasificación taxonómica de guanábana

Taxonomía	
Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida (= Dicotyledoneae)
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	<i>Annona</i>
Especie	<i>muricata</i>

Fuente: Lista de Especies Galápagos (1959).

Figura 2

Distribución geográfica del cultivo de Annona muricata.



Fuente: Zubaidi *et al.* (2023).

Guanábana es un árbol que alcanza un tamaño de 5-10 m de altura, dependiendo de especie, clima y manejo de cultivo. Las hojas son brillantes de color verde oscuro, obovadas y lisas. Las flores son hermafroditas. El fruto es de forma irregular, aromático, color verde con presencia de espinas externas, y contiene una pulpa blanca dulce. La morfología de *Annona muricata* se observa en la Figura 3.

Figura 3

Planta de Annona muricata.



Nota. A) Planta, B), Fruto, C), Flor y D) Hojas de *Annona muricata*.

Diferentes partes de guanábana son utilizados a nivel industrial y como medicina natural. El fruto es la parte de la planta más consumido en productos alimenticios y son utilizados en yogurts, confiterías, pastelería, entre otros.

En la medicina etnobotánica, las hojas de guanábana son ampliamente utilizadas como anticancerígeno, antidiabético, antibacteriano, resfriados y para reducir el dolor (Zubaidi *et al.*, 2023 y Abdul *et al.*, 2018). Las semillas son utilizadas como tratamientos antihelmínticos y antiparasitarios (Mutakin *et al.*, 2022). En la siguiente tabla se observa la aplicación tradicional de cada parte de la planta.

Tabla 3*Preparación tradicional de las partes de Annona muricata*

Partes de la planta	Tipo de enfermedad	Preparación
Raíz	Plaguicidas	Las raíces son secadas y cortadas en pequeños tamaños. Luego se hierve para obtener el extracto. La solución se cuele antes de consumir.
	Insecticidas	
Tallos	Inflamación	Los tallos son secadas y luego cortadas en pequeños tamaños. Se hierve hasta obtener el extracto, después separados por un
	Sedativo	
	Hipoglucémico	
	Hipertensión	
Fruto	Parasito intestinal	Las frutas son consumidas cuando están maduras y en jugo.
	Enfermedad hígado	
Semillas	Laxante	Las semillas se tuestan antes de triturarlas hasta convertir en polvo. Pueden ser usados oralmente o de manera tópico.
	Hipertensión	Las hojas son secadas en sombra y se muelen hasta convertirlas en polvo para reconstituirlas en agua. La mezcla se filtra para hacer soluciones libres de residuo.
Hojas	Diabetes	
	Asma	
	Insomnio	
	Cáncer	
	Dolor	

Fuente: Zubaidi *et al.* (2023).

4.2.3 Compuestos bioactivos

Los metabolitos secundarios o compuestos bioactivos son compuestos orgánicos, tienen actividad fisiológica, producidos por el metabolismo, entre ellos tenemos, polifenoles, saponinas, alcaloides, etc., tienen valores terapéuticos entre otros. Los usos etnomedicinales de las plantas son a causa de la presencia de estos metabolitos secundarios (Ordoñez *et al.*, 2018).

4.2.4 Polifenoles

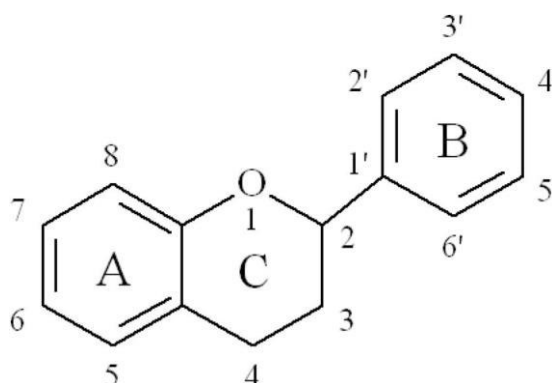
4.2.4.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos bioactivos ampliamente distribuidos, responsables del aroma, color, etc. de las plantas, semillas, frutas; también están presentes en bebidas como vinos y tés. Los flavonoides protegen a las plantas de diferentes agresiones, por ejemplo, estrés del factor externo.

El flavonoide (Figura 4) posee dos anillos benceno (A y B) que contienen generalmente hidroxilos, unidos por un pirano de tres átomos de carbono (C), a su vez puede estar conectado al anillo B en C-2 (flavona), en C-3 (isoflavona) y en C-4 (neoflavona). La posición del anillo B de catecol en el anillo C de pirano y el número y la posición de los grupos hidroxilo en el grupo de catecol del anillo B influyen en la capacidad antioxidante de los flavonoides (Dias *et al.*, 2021). Los flavonoides podrían clasificarse en flavonoles (p. ej., quercetina, rutina), flavanonas (naringenina, hesperidina), flavanoles (epicatequina, galocatequina), flavonas (luteolina, apigenina) y antocianinas (pelargonidina, malvidina) (Waheed *et al.*, 2020).

Figura 4

Estructura química de flavonoide.



Fuente: Waheed *et al.* (2020).

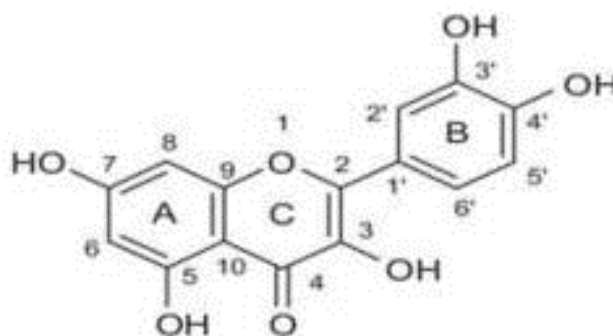
4.2.4.2 Quercetina

La quercetina (3,3,4,5,7-pentahidroxi flavona) es una aglicona perteneciente al grupo de flavonol. Es un metabolito secundario más abundante. La quercetina es un compuesto amargo de color amarillo limón brillante, su solubilidad en agua fría es nula/completamente insoluble, ligeramente soluble en agua caliente, pero altamente soluble en compuesto orgánicos, ejemplo: alcohol y lípidos (Deepika y Maurya, 2022), por lo tanto, una decocción extraería parcialmente de quercetina. Se encuentran en grandes concentraciones en manzanas, bayas, vegetales uvas, cebollas, té y tomates, así como muchas semillas, nueces, flores, cortezas y hojas (Li *et al.*, 2016). La quercetina se encuentra en las plantas en forma de glucósidos hidrofílicos.

La quercetina es un potente antioxidante debido a que elimina radicales libres y posiblemente tiene la capacidad de inhibir la xantina oxidasa (Deepika y Maurya, 2022). También tiene propiedad antiinflamatoria y antidiabético. La estructura química de quercetina se observa en la Figura 5.

Figura 5

Estructura química de quercetina.



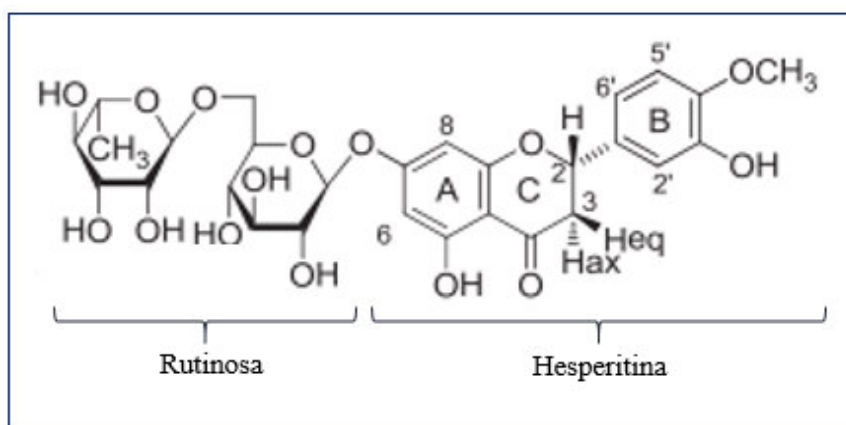
Fuente: Deepika y Maurya (2022).

4.2.4.3 Hesperidina

La hesperidina forma parte del grupo de los citroflavonoides, y se encuentra principalmente en frutos cítricos (Mao-Qiang *et al.*, 2019). La estructura de la hesperidina (Figura 6) contiene dos partes, una parte hidrofóbica que es la hesperitina y la otra hidrofílica llamado rutinosa (Nakayama *et al.*, 2014). Los puntos de fusión y ebullición de la hesperidina son 250 y 756,16 °C, respectivamente (Mao-Qiang *et al.*, 2019).

Figura 6

Estructura química de hesperidina.



Fuente. Nakayama *et al.* (2014).

La hesperidina en medio acuoso presenta baja solubilidad. La reacción de hesperidina con quitooligosacárido produce un complejo de hesperidina-quitooligosacárido, que lo hace soluble en agua. Nakayama *et al.* (2014) en su investigación indica que la presencia de epigallocatequina incrementa la solubilidad de hesperidina.

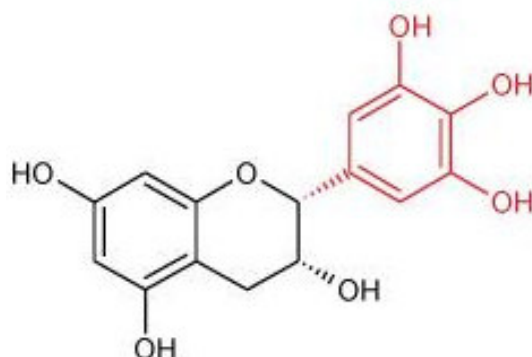
La hesperidina presenta propiedades antiinflamatorias esto se debe a hesperidina 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-ramnoglucosido, número CAS: 520-26-3 (Londono *et al.*, 2007). La hesperidina a condiciones de -20°C mantiene su estabilidad durante 2 años (Mao-Qiang *et al.*, 2019).

4.2.4.4 Epigallocatequina

Pertenece al grupo de catequina, a su vez a flavanoles. La solubilidad de epigallocatequina para una eficiente extracción, depende del tiempo, temperatura a la cual es sometida y el solvente. Kilel *et al.* (2013), menciona a EGC (epigallocatequina) responsable de proporcionar un ligero dulzor a las infusiones, todo contrario con galato de epigallocatequina que proporciona sabor astringente. Chu *et al.* (2017) indica que la epigallocatequina-3-galato presenta baja bioactividad mediante la administración oral. Legeay *et al.* (2015) encontró 279,87 +- 1,87 mg/ml de epigallocatequina en hojas de té verde. La estructura química de epigallocatequina se observa en la Figura 7.

Figura 7

Estructura química de epigalocatequina.



Fuente: Legeay *et al.*, 2015.

4.2.5 Inflamación

La inflamación es un mecanismo de defensa del sistema inmune frente a una agresión física, química o biológica, para inhibir al agente agresor. La inflamación se manifiesta como dolor, calor, enrojecimiento y tumor. Los mediadores de inflamación son lípidos (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos), aminoácidos modificados (histamina, serotonina) y pequeñas proteínas (citoquinas, factores de crecimiento, interleuquinas) (Chavelon, 2018).

4.2.6 Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

La cromatografía es una técnica analítica que logra la separación, identificación y cuantificación de los componentes químicos o analitos de una muestra.

HPLC es un método analítico en cuyo procedimiento la fase móvil, un solvente o mezcla de solventes, es inyectada a través de la fase estacionaria a alta presión y flujo constante. La fase estacionaria se elige de acuerdo a la polaridad o gradiente de polaridad con la cual se eluye. Para cuantificar un analito es necesario un estándar y que todos los demás componentes sean grado analítico HPLC (Skoog *et al.*, 2008).

Figura 8

Cromatógrafo líquido de alto rendimiento.



Nota. Equipo de marca SHIMADZU perteneciente al laboratorio LABICER, UNI.

4.2.7 Infusión

Una infusión consiste en agregar agua caliente ya sea al tallo, hoja, fruto, flor o raíz de la planta (motivo de estudio) y dejar reposar en un tiempo breve. La infusión por lixiviación en condiciones adecuadas extraerá compuestos solubles, principalmente polifenoles, con interés terapéutico.

4.2.8 Decocción

Consiste en hervir cualquier parte de la planta en un tiempo determinado, esta técnica conlleva mayor extracción de sustancias polares, pero también la pérdida de compuestos volátiles o termolábiles. Para extraer compuestos polares con este método de extracción se utiliza agua como solvente a una temperatura con tiempo moderado (Zhang *et al.*, 2018).

4.2.9 Filtrante

Las hojas, flores y tallos de plantas medicinales y aromáticas, envasadas en bolsitas porosas, se conocen como filtrantes. Los filtrantes en contacto con el agua caliente liberan sustancias solubles ricos en compuestos polifenólicos y otros, responsables de su olor, color y sabor.

Los filtrantes tienen que cumplir el criterio microbiológico según NTS N°071 MINSA/DIGESA V-01 aprobado por Resolución Ministerial N°591-2008/MINSA. En la tabla 4 se observa el límite de mohos y *enterobactereaceas* para infusiones.

Tabla 4

Criterio microbiológico en hierbas de uso alimentario para infusiones (té, mate, manzanilla, boldo, otros)

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Mohos	3	3	5	1	10 ²	10 ³
<i>Enterobactereaceas</i>	5	3	5	2	10 ²	10 ³

Fuente: NTS N° 071 MINSA/DIGESA-V.01.

V. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 LUGAR DE EJECUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La clasificación taxonómica fue realizada en el herbario de Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo 1 y Anexo 2). La parte experimental se realizó en los laboratorios de “Química Analítica” de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Laboratorio de “Química Orgánica” y “Farmacología experimental” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, la determinación y cuantificación de polifenoles se realizó en el Laboratorio de Investigaciones y Certificaciones, LABICER, de la Universidad Nacional de Ingeniería, UNI, Independencia.

5.2 MATERIALES Y EQUIPOS

5.2.1 Materia botánica

- Hojas de guanábana (*Annona muricata*) recolectadas de la ciudad de Huacho, Lima, 8 kg.
- Hojas de achiote (*Bixa orellana*) procedentes de la EP. Ingeniería Agroindustrial, UNMSM, San Juan de Lurigancho, 5 kg.

5.2.2 Materia biológica

8 ratas albinas machos (*Rattus norvegicus*) con 2 meses de edad adquiridas del Bioterio de Instituto Nacional de Salud-MINSA, Chorrillos.

5.2.3 Utensilios

- Cubetas
- Papel kraf
- Tamiz

- Colador
- Papel filtro termosellable
- Envase de plástico transparente.
- Tamiz N° 50

5.2.4 Material de vidrio y afines

- Beaker 500 ml.
- Probeta 100 ml.
- Bagueta.
- Pipeta de 5 ml, 10 ml.
- Luna de reloj.
- Placas de Petri.
- Capsulas de porcelana.
- Crisol de porcelana

5.2.5 Equipos e instrumentos

- Termómetro
- Balanza analítica (marca OHAUS)
- Estufa (marca kert laboratory odhg-905 heating drying owen)
- Liofilizador BIOBASE
- Refrigerador-congelador (marca Samsung)
- Pletismometro Digital LE 7500 - PANLAB
- Molino de cuchillas (licuadora Thomas 1000W)
- Selladora automática marca PFS plastic film sealer
- Cocinilla eléctrica marca DLAB
- HPLC SHIMADZU

5.2.6 Reactivos

- Agua
- Hipoclorito de sodio
- Carragenina al 1%
- Diclofenaco 25mg/ml
- Estándares de compuestos fenólicos: epigallocatequina, hesperidina y quercetina.

5.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.3.1 Determinación del porcentaje de agua en hojas de guanábana y achiote a 45 °C.

La determinación del porcentaje de agua de las hojas de guanábana y achiote se realizó siguiendo el método descrito por Tuesta, (2020) con algunas modificaciones. Las materias primas se colocaron sobre placas petri limpias y secas para registrar su peso en fresco en una balanza analítica marca OHAUS. Posteriormente se llevaron a una estufa y se controló la temperatura a 45 °C durante 48 horas, culminado el tiempo establecido, la muestra seca se transfirió a un desecador hasta su enfriamiento y posterior pesado.

El porcentaje de agua se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Agua} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Donde:

- Peso inicial: peso de la muestra fresca (g)
- Peso final: peso de la muestra seca (g)

5.3.2 Obtención de la decocción e infusión en hojas de guanábana y achiote

Para la decocción, las hojas frescas fueron introducidas por separado en un beaker con 200 ml de agua, posteriormente colocadas en una cocinilla eléctrica. Ambas muestras se hirvieron a una temperatura de 100 °C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo la solución fue transvasada en un envase de plástico transparente.

El proceso de obtención de infusión de las hojas frescas de guanábana consistió en agregar 200 ml de agua hirviente sobre esta y se dejó reposar en un periodo de tiempo de 10 minutos. De la misma manera se procedió con las hojas de achiote. Finalmente, ambas infusiones fueron enfriados en envases de plástico.

Las decocciones e infusiones de las hojas frescas de guanábana y achiote, fueron congelados en una refrigeradora Samsung a -20 °C durante 3 días, posteriormente fueron liofilizados durante 72 h. Los extractos liofilizados se mantuvieron en una estufa a 38°C hasta su posterior análisis.

5.3.3 Elaboración del filtrante a base de hojas de guanábana y achiote

Recepción

Las hojas de guanábana y achiote recolectadas de arbustos con 45 y 4 años de antigüedad respectivamente fueron transportadas al laboratorio de “Química Orgánica” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Selección

En esta operación se descartaron hojas que presentaban daños por insectos y aves, a su vez se retiraron materias extrañas. Se busca separar hojas en buen estado.

Lavado y desinfección

Las materias primas fueron lavadas minuciosamente con agua potable en cubetas, para retirar impurezas como tierra y polvo. Seguidamente las hojas de achiote, así como las hojas de guanábana fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a 8 ppm durante 3 minutos. Cada materia prima fue lavada y desinfectada por separado.

Oreado

Las hojas de cada materia prima inmediatamente después del proceso de desinfección fueron colocadas en colador y extendidas sobre papel kraft a una temperatura ambiente, para la eliminación del exceso de agua del lavado.

Secado

Inmediatamente después del oreado, las hojas de guanábanas y/o achiote fueron colocadas en estufa de aire caliente. Las condiciones de secado fueron 45°C durante 2 días.

Molienda

Se utilizó molino de cuchillas (licuadora Thomas 1000W) para la reducción de tamaño. La molienda de hojas de guanábana se realizó en un tiempo de 10 segundos. El tiempo utilizado para las hojas de achiote fue de 20 segundos. Para ambas muestras se utilizó una velocidad media.

Tamizado

Se utilizó tamiz N° 50 (0.3 mm o 300 µm) con lo cual se separó la muestra de tamaño deseado de las partículas de mayor tamaño.

Formulación de filtrantes

En esta etapa se realiza la mezcla de las hojas secas de achiote y guanábana tamizados en diferentes proporciones. En la tabla 5 se muestra las diferentes formulaciones de las hojas de guanábana y achiote.

Tabla 5

Formulaciones de los filtrantes

	Formulaciones				
Hojas de guanábana (%)	20	40	50	60	80
Hojas de achiote (%)	80	60	50	40	20

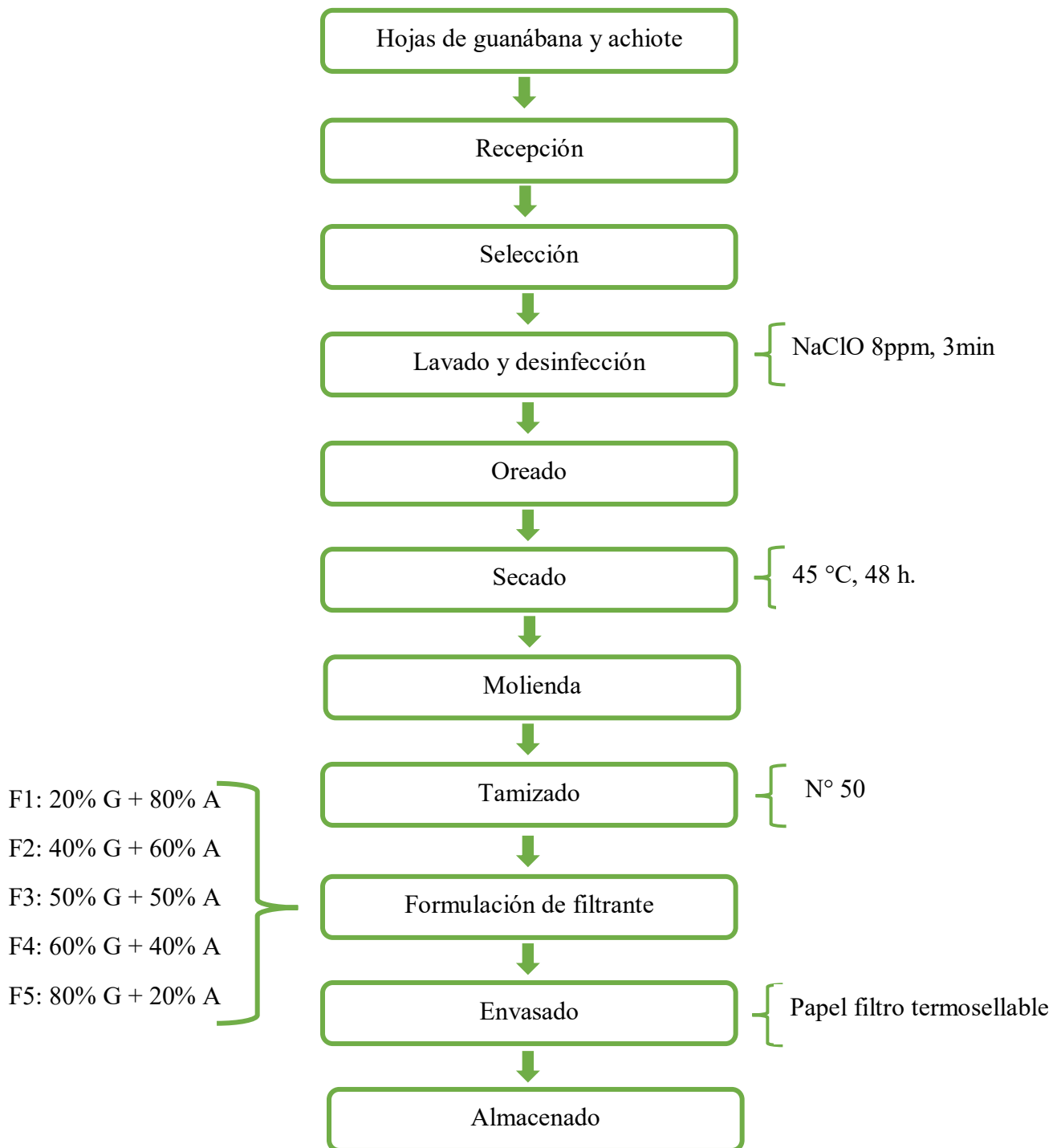
Envasado

Cada muestra fue envasada en bolsita filtrante de papel filtro biodegradable (6 x 7 cm) con hilo de algodón, posteriormente fueron selladas manualmente utilizando una selladora de bolsa marca PFS plastic film sealer.

Cada filtrante tuvo un peso final de 1,0 g. Se elaboraron 25 filtrantes por cada formulación. A continuación, en la Figura 9 se muestra el flujograma de la elaboración del filtrante de la combinación de las hojas de guanábana (*Annona muricata*) y achiote (*Bixa orellana*).

Figura 9

Flujograma de elaboración de filtrante.



Nota. G: hojas de guanábana; A: hojas de achiote.

5.3.4 Obtención de las decocciones de los filtrantes

En un beaker de 500 ml de capacidad se hirvió 200 ml de agua empleando una cocinilla eléctrica y se controló la temperatura de ebullición. Cuando la temperatura indicaba entre 98 °C - 100°C, se introdujo el filtrante (F1, F2, F3, F4 y F5), y con la ayuda de una bagueta se agitó periódicamente durante 10 minutos. Además, se controló que el volumen final se mantenga en 200 ml completando con agua hirviendo. Transcurrido el tiempo, el extracto resultante se colocó sobre envase de plástico y se dejó enfriar.

Finalmente, las decocciones de los cinco filtrantes (guanábana + achiote), fueron congelados (refrigeradora Samsung) a -20 °C durante 3 días, posteriormente fueron liofilizados durante 72 h. Los extractos liofilizados se mantuvieron en una estufa a 38°C hasta su posterior evaluación/análisis.

5.3.5 Determinación de compuestos bioactivos mediante HPLC-DAD.

Los compuestos bioactivos a identificar y cuantificar en el presente estudio fueron quercetina, hesperidina y epigallocatequina. Las muestras analizadas fueron las infusiones y decocciones de hojas frescas de guanábana y achiote. También se analizaron las decocciones de todos los filtrantes (F1, F2, F3, F4 y F5) elaborados en esta investigación. El equipo empleado fue HPLC-DAD y realizado en LABICER.

La cromatografía se realizó con Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento-HPLC (marca SHIMADZU) equipado con bomba cuaternaria LC-30AD, desgasificador DGU-20A5R, automuestreador SIL-30AC, detector de arreglo de diodos SPD- M30A y horno de columna CTO-20AC. Los análisis para quercetina y hesperidina, se llevaron a cabo en una columna mediterránea SEA18 5µm 25x0.46 (Teknokroma). El volumen de inyección fue de 20 µL y la temperatura de separación fue 40 °C. La velocidad de flujo de la fase móvil fue 1.0 mL/min y un gradiente lineal (10% de eluyente B a 5 min, 10-

30% B entre 5-35 min, 30-75% B entre 35-40 min, 75-10% B entre 40-45 min y 10% B entre 45-50 min). La fase móvil fue ácido fórmico 0.1% en H₂O (eluyente A) y acetonitrilo 100% (eluyente B). Para la detección de epigallocateína la condición utilizada fueron: temperatura de separación a 25 °C, velocidad de flujo 0,8 mL/min y fase móvil fue TFA 0,1 % en (MeOH 75% - H₂O 25%) con tiempo de corrida de 32,5 min. Los cromatogramas se registraron a 280 nm de longitud de onda. La condición cromatografía resumida se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Condiciones cromatográficas

Columna	Mediterránea SEA18 5µm 25x0.46 (Teknokroma)
Detector	Detector de arreglo de diodos
Bomba	Cuaternaria
Temperatura de columna	40 °C (Q y H); 25 °C (E)
Volumen de inyección	20 µL
Velocidad de flujo	1.0 mL/min (Q y H), 0.8 mL/min (E)
Fase móvil	A: Ácido fórmico 0.1% en H ₂ O B: Acetonitrilo 100%
Gradiente	10% B (5min), 10-30% B (5-35 min), 30-75% B (35-40 min), 75-10% B (40-45 min), 10% B (45-50 min)
Tiempo de corrida	50 min (Q y H); 32,5 min (E)
Longitud de onda UV	280 nm
Integración	Área vs Concentración

Nota. Q: Quercetina, H: Hesperidina y E: Epigallocatequina.

5.3.1 Determinación de la capacidad extractante en los filtrantes

Empleando una pipeta volumétrica se incorporó 25 ml de la decocción de cada uno de los filtrantes en una cápsula de porcelana limpia y seca. A continuación, la muestra fue colocada en una estufa a una temperatura de 45 °C durante 48 horas. La muestra seca

se retiró de la estufa, se colocó en un desecador y se registró su peso en una balanza analítica marca OHAUS. El resultado se obtuvo por diferencia de pesos.

5.3.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria del filtrante.

Se utilizó el filtrante F2 (40 % hojas guanábana + 60 % hojas achiote) para evaluar su capacidad antiinflamatoria utilizando la técnica de edema pedal.

Los animales sometidos a experimentación se mantuvieron en las instalaciones del bioterio de farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, a 20°C durante 8 días con alimento suficiente y agua *ad libitum*. Para la evaluación se utilizaron 8 ratas machos (*Rattus norvegicus*), con un peso entre 159 g y 240 g, sometida a ayuna 12 horas antes de iniciar el ensayo. Los animales fueron codificados para su identificación y posteriormente se pesaron cada uno de ellos en una balanza. Se dividieron al azar en 3 grupos. A continuación, se administró por vía oral, empleando la sonda nasogástrica, el extracto a evaluar, solución salina fisiológica, filtrante y diclofenaco. El grupo 1 sirvió como control y recibió solución salina fisiológica. El grupo 2 recibió diclofenaco y al grupo 3 se le administró 250 mg/kg del filtrante F2 (Tabla 7). Transcurrida una hora se inyectó carragenina al 1% en solución salina en la zona suplantaria de la pata derecha a todos los animales de experimentación. La medición del volumen de pata inflamada se realizó cada hora en un intervalo de tiempo de 4 horas, con el equipo pletismómetro (Figura 10).

El porcentaje de inhibición de la inflamación se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(Ct - Co)_{\text{control}} - (Ct - Co)_{\text{tratamiento}}}{(Ct - Co)_{\text{control}}} * 100$$

Donde:

Ct: es el volumen desplazado en un tiempo t.

Co: es el volumen desplazado en el inicio.

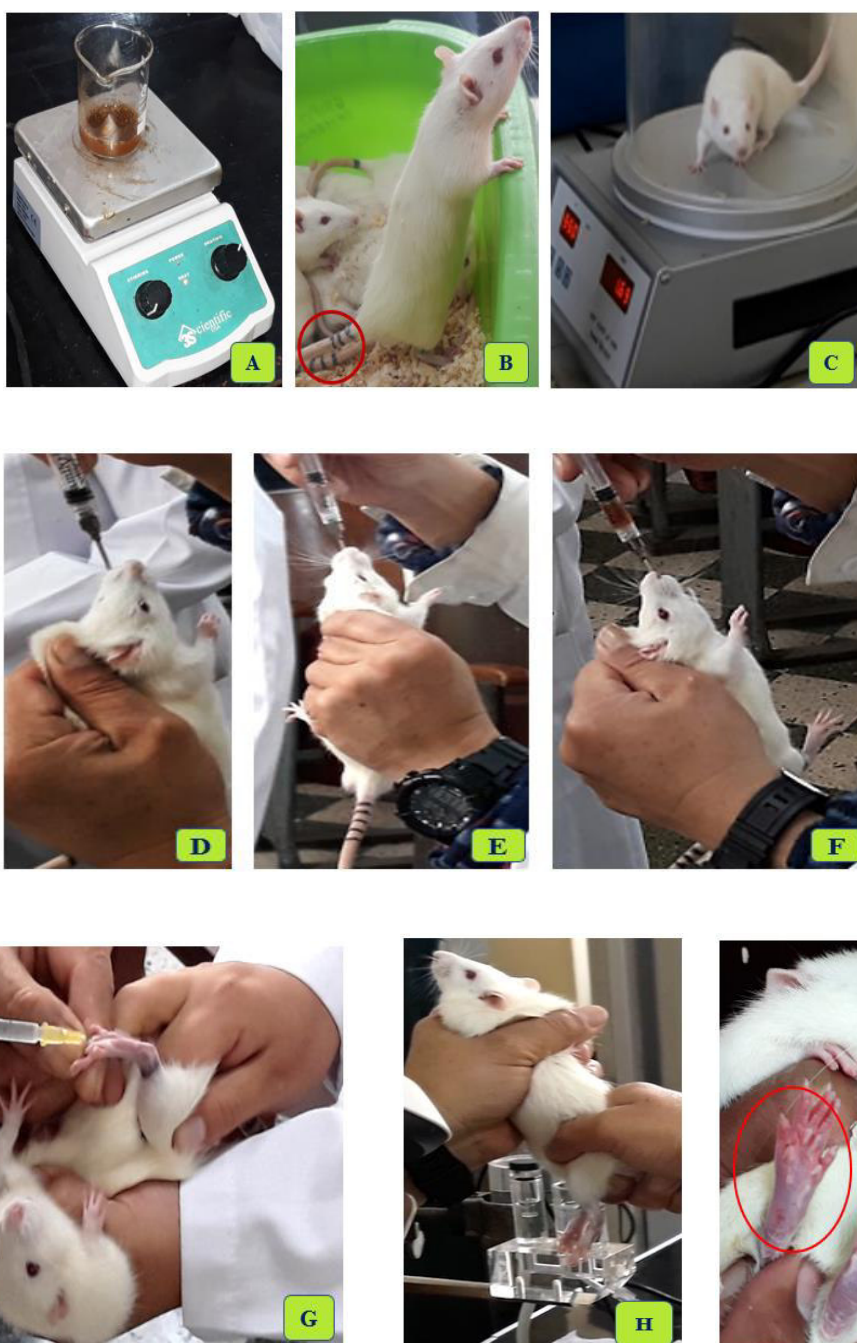
Tabla 7

Grupos de trabajo para cada tratamiento

Grupo	Tratamiento
1: 2 animales	Solución salina fisiológica (Agua)
2: 3 animales	Diclofenaco
3: 3 animales	F2 (40% hojas de guanábana + 60% hojas de achiote)

Figura 10

Evaluación de actividad antiinflamatoria del filtrante en Rattus norvegicus.



Nota. A) Decoccion del filtrante, B) Codificación, C) Peso, D) Agua, E) Diclofenaco y F) Filtrante, G) inyeccion con carragenina, H) Volumen de edema pedal y I) Inflamación de la pata derecha.

5.3.3 Análisis microbiológico del filtrante

El análisis microbiológico del filtrante F2, fue realizado en el CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO -CCA de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se analizó la presencia de mohos y *enterobactereaceas*, según NTS N°071 MINSA/DIGESA-V.01.

5.3.4 Evaluación sensorial de la decocción del filtrante

Para la evaluación sensorial se eligió el filtrante F2 (40% guanábana y 60% achiote). Para ello se seleccionaron 20 panelistas no entrenados sin distinción de edad o sexo. El filtrante se introdujo en un recipiente con agua y se dejó hervir durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se trasvasó a un vaso/taza para su degustación/evaluación. Se evitó agregar azúcar o edulcorantes para obtener resultados fidedignos. Finalmente, se entregó la encuesta de evaluación sensorial (Anexo 7), donde se enfatiza en los atributos como color, olor y sabor, para lo cual se utilizó la escala hedónica de 4 puntos.

A continuación, se muestra el significado de cada puntaje.

Tabla 8

Prueba hedónica

Puntaje	Significado
1	Me disgusta
2	No me gusta ni me disgusta
3	Me gusta
4	Me gusta mucho

5.3.5 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Statgraphics Centurion para el análisis estadístico correspondientes de las infusiones y decocciones de hojas frescas y filtrantes. Se utilizó ANOVA con nivel de significancia de 0.05 y prueba de rangos múltiples de Tukey para diferenciar entre grupos. Para actividad inflamatoria se utilizó regresión simple.

VI. RESULTADO Y DISCUSIÓN

6.1 Porcentaje de agua en las hojas frescas.

La Tabla 9 muestra los resultados del porcentaje de agua de las hojas frescas de guanábana y achiote.

Tabla 9

Porcentaje de agua en la materia prima

Materia prima	Porcentaje de agua
Hojas de guanábana (<i>Annona muricata</i>)	60,0%
Hojas de achiote (<i>Bixa orellana</i>)	62,0%

El contenido de agua encontrado en las hojas de guanábana fue 60,0 %, valor inferior a los resultados reportados por Vit, Santiago y Pérez-Pérez (2014) donde obtuvieron $62,64 \pm 0,03$ %. Sin embargo las hojas de achiote presentaron 62,0 % de agua.

6.2 Capacidad extractante en la decocción de los filtrantes

La Tabla 10 muestra la capacidad extractante para cada uno de los filtrantes (F1, F2, F3, F4 y F5). Se empleó un filtrante para 200 ml de agua.

Tabla 10

Capacidad extractante para cada filtrante

Filtrante	Capacidad extractante (g)
F1	0,214
F2	0,239
F3	0,245

F4	0,236
F5	0,324

Los resultados muestran que a mayor porcentaje de hojas de guanábana incrementa la masa extraída a través de la decocción.

6.3 Determinación de compuestos bioactivos en las hojas de guanábana y achiote mediante HPLC-DAD.

El método de extracción permite una mayor o menor concentración de compuestos y puede ser un diferenciador del contenido de compuestos polifenólicos. El presente estudio buscó determinar cómo el procedimiento de extracción, infusión o decocción influye en la concentración de los compuestos polifenólicos quercetina, hesperidina y epigallocatequina en las hojas frescas de *Annona muricata* y *Bixa orellana*. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

Compuestos polifenólicos en el liofilizado de la infusión y decocción de hojas de guanábana y achiote

Compuestos polifenólicos	Hojas de guanábana		Hojas de achiote	
	Infusión	Decocción	Infusión	Decocción
Quercetina (µg/g)	15,998	< 0,543	210,207	174,556
Hesperidina (µg/g)	163,455	149,506	216,611	131,764
Epigallocatequina (µg/g)	88,201	358,955	10068,568	32629,836

Nota. (µg/g) En extracto seco de las hojas de estudio.

El contenido de quercetina en la infusión de las hojas frescas de guanábana disminuye con el proceso de decocción. Así mismo, en las hojas de achiote se observa esta disminución de concentración conforme aumenta la temperatura y el tiempo de calentamiento. En el caso de guanábana su contenido disminuye drásticamente. Para el achiote la disminución es al 50%. De manera similar se observa para hesperidina en ambas hojas. Lo contrario ocurre para epigallocatequina en la infusión de guanábana, donde se observa que su concentración aumenta hasta cuatro veces. Nolasco-Gonzales *et al.* (2022), encontraron en la decocción ($0,74 \pm 0,04$ mg/g de extracto seco) e infusión ($0,52 \pm 0,34$ mg/g de extracto seco) de las hojas de guanábana. Estos resultados son menores encontrados en la presente investigación. En las hojas de achiote el contenido aumenta hasta en tres veces. Resulta muy conveniente la decocción para epigallocatequina. Legeay *et al.* (2015) encontraron concentraciones de epigallocatequina en la infusión de té verde ($279,87 \pm 1,87$ mg/ml) estos valores son mayores a los encontrados en la presente investigación

Tabla 12 muestra el análisis de varianza de quercetina, donde se evidencia que la forma de preparación (infusión y decocción) y la especie sí influyen significativamente ($p < 0.05$) en su concentración (Tabla 11, Figura 11). Esta diferencia puede deberse a la presencia de valina, 2-aminobutirato, prolina, ácido cítrico, ácido málico, epicatequina, glucosa, sacarosa, ácido clorogénico, ácido protocatequico y trehalosa presentes en las hojas (Fotaquis *et al.*, 2016). Además, la concentración de quercetina en las hojas de guanábana y achiote (especie) son altamente significativas. Sin embargo estos resultados son inferiores a los valores reportados por João *et al.* (2016), obteniendo $0,67$ mg/g y $0,62$ mg/g en infusión y decocción del té verde (*Camellia sinensis*) respectivamente.

Estudios previos reportan la presencia de catequina, caempferol, rutina, valina, ácido valínico, naringenina, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, epicatequina (Santana

et al., 2021) y acetogenina (Champy *et al.* (2005), ambos en extractos acuosos (decocción en hojas de *Annona muricata*). Balderrama-Carmona *et al.* (2020) encontró rutina (quercetina 3-O-rutinosido) como principal compuesto de quercetina en la decocción de hoja de *Annona muricata*, acetogenina monotetrahidrofurano (Roduan *et al.*, 2017)

Tabla 12

Análisis de varianza de quercetina en formas de preparación y especie

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos principales					
Formas de preparación	1958.84	1	1958.84	43.48	0.0001
Especie	101691.	1	101691.	2257.05	0.0000
Error	405.494	9	45.0548		
Total (Corregido)	104055.	11			

Nota. Formas de preparación (infusión y decocción) y Especie (hojas de guanábana y hojas de achiote).

Figura 11

Concentración de quercetina en infusión y decocción en las hojas de guanábana y achiote.

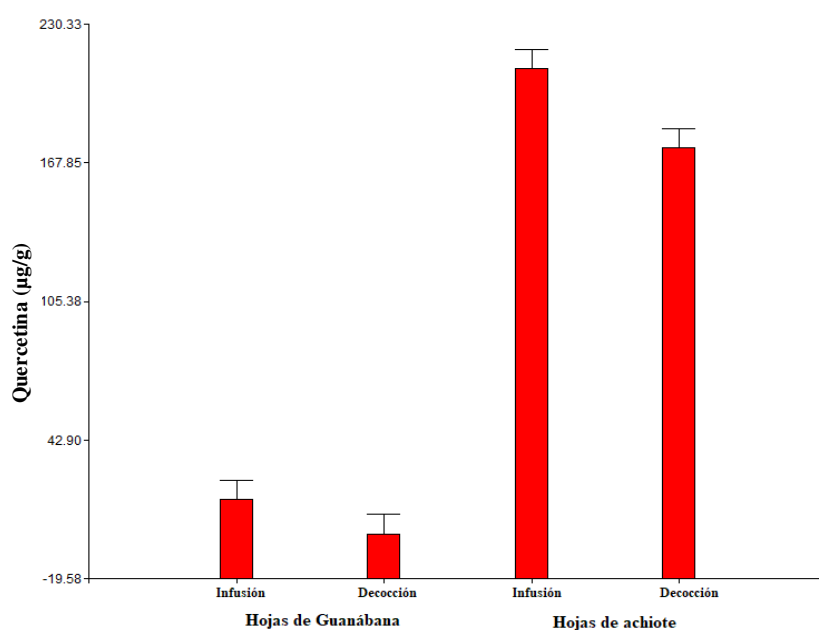
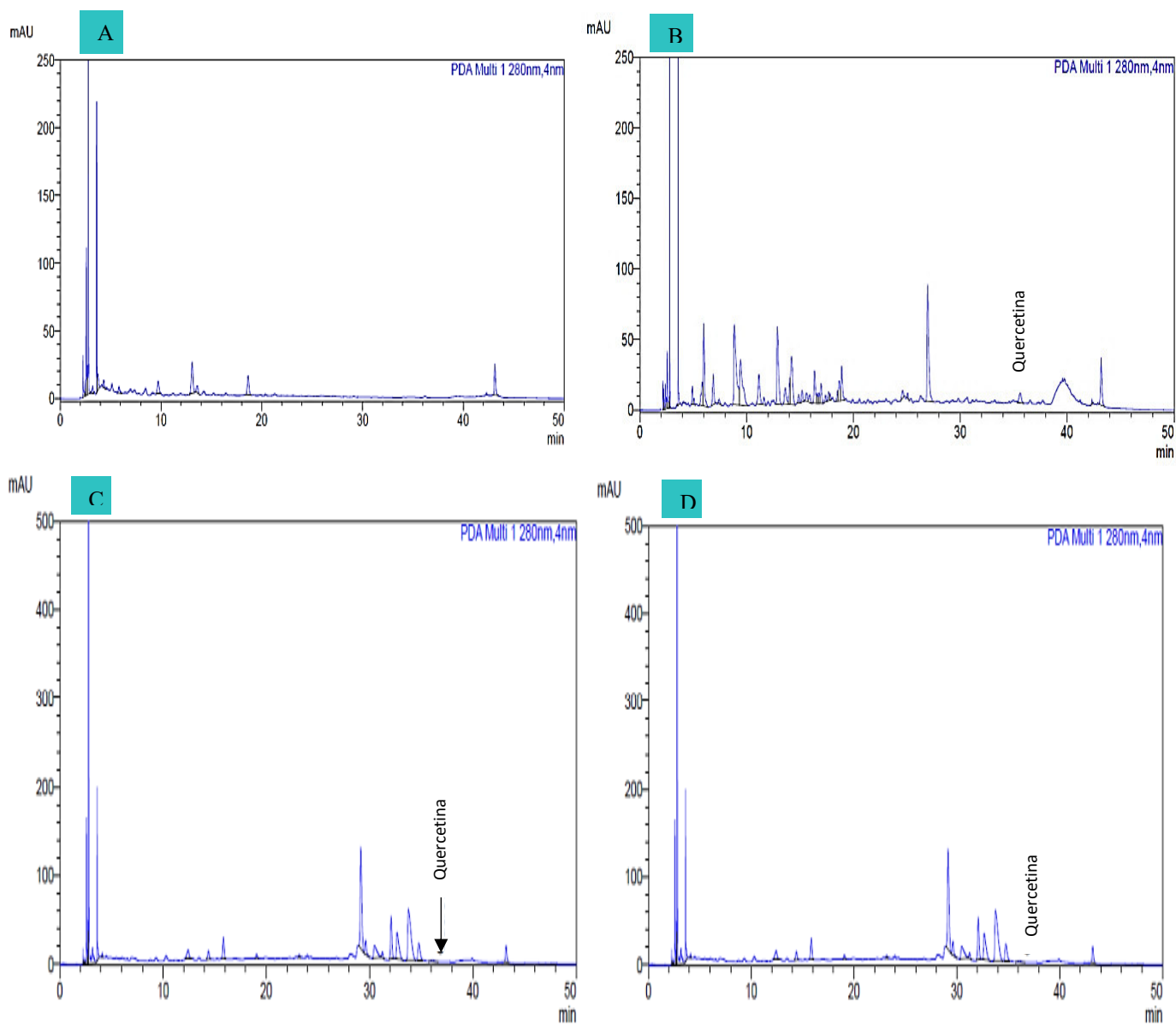


Figura 12

Cromatograma de quercetina en infusión y decocción en hojas de guanábana y achiote.



Nota. A) Decocción y B) Infusión de guanábana; C) Infusión y D) Decocción de achiote.

En la Figura 12 se observa la identificación de quercetina en decocción e infusión en hojas de guanábana y achiote. En la decocción de hojas de guanábana no se identificó quercetina (Figura 12A).

En la tabla 13 se puede observar que la concentración de hesperidina depende de la forma de extracción, infusión o decocción de manera significativa ($p < 0.05$), más no si se obtiene a partir de hojas de achiote o guanábana ($p > 0.05$).

Tabla 13

Análisis de varianza de hesperidina en formas de preparación y especie de planta

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Formas de preparación	7320.49	1	7320.49	17.38	0.0024
Especie	940.614	1	940.614	2.23	0.1693
Error	3791.36	9	421.262		
Total (corregido)	12052.5	11			

Nota. Forma de preparación (infusión y decocción) y Especie (hojas de guanábana y achiote).

La prueba de rangos múltiples indica que la concentración de hesperidina es significativamente mayor en infusión que cuando se obtiene por decocción (Tabla 14). La concentración de hesperidina en la cascaras de *Citrus unshi* sometidas a 90 °C (3100 µg/g de extracto seco) fueron superiores a las encontradas en la infusión de guanábana (163,455 µg/g) y de achiote (216,611 µg/g) del presente estudio. La exposición a temperatura elevada constante y a la luz, posiblemente haya generado la degradación de hesperidina. Pyrzyńska *et al.* (2022), reporta que la sonicación genera la degradación de hesperidina, el metanol lo descompone en 30 %, y a pH=9 genera su hidrolisis alcalina.

Tabla 14

Prueba de rangos múltiples de formas de preparación

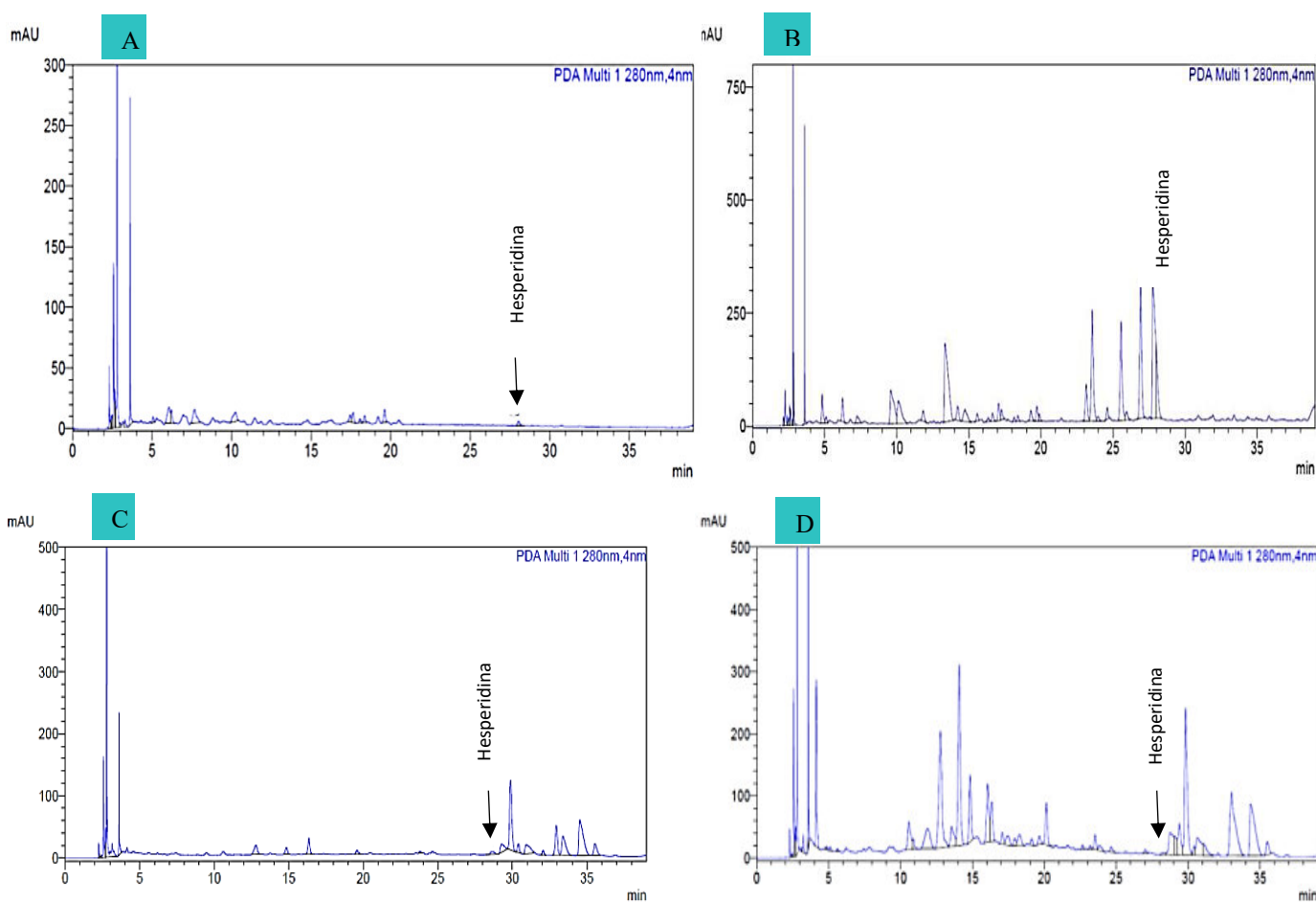
<i>Formas de preparación</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Decocción	6	140.635	8.37916	X
Infusión	6	190.033	8.37916	X

Nota. X no paralelas indica significancia, al 95% de confianza.

La identificación de hesperidina se muestra en la figura 13.

Figura 13

Cromatograma de hesperidina en infusión y decocción en hojas de Annona muricata y Bixa orellana.



Nota. A) Infusión y B) decocción de *Annona muricata*; C) Infusión y D) decocción de *Bixa orellana*.

Tabla 15*Análisis de varianza de epigalocatequina en forma de preparación y especie*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Formas de preparación	3.90976E8	1	3.90976E8	9.43	0.0133
Especie	1.33888E9	1	1.33888E9	32.30	0.0003
Error	3.73075E8	9	4.14528E7		
Total (corregido)	2.10293E9	11			

Nota. Formas de preparación (infusión y decocción) y Especie (hojas de guanábana y achiote).

La tabla 15 nos muestra el análisis de varianza para epigalocatequina, nos indica que la forma de preparación (infusión y decocción) desempeña un papel importante en la determinación de la concentración de epigalocatequina, porque existe una diferencia significativa entre ambas ($p < 0.05$). Además, las hojas de las diferentes especies influyen significativamente en la concentración de epigalocatequina ($p < 0.05$). En la decocción se obtienen mayores concentraciones de epigalocatequina (Tabla 16).

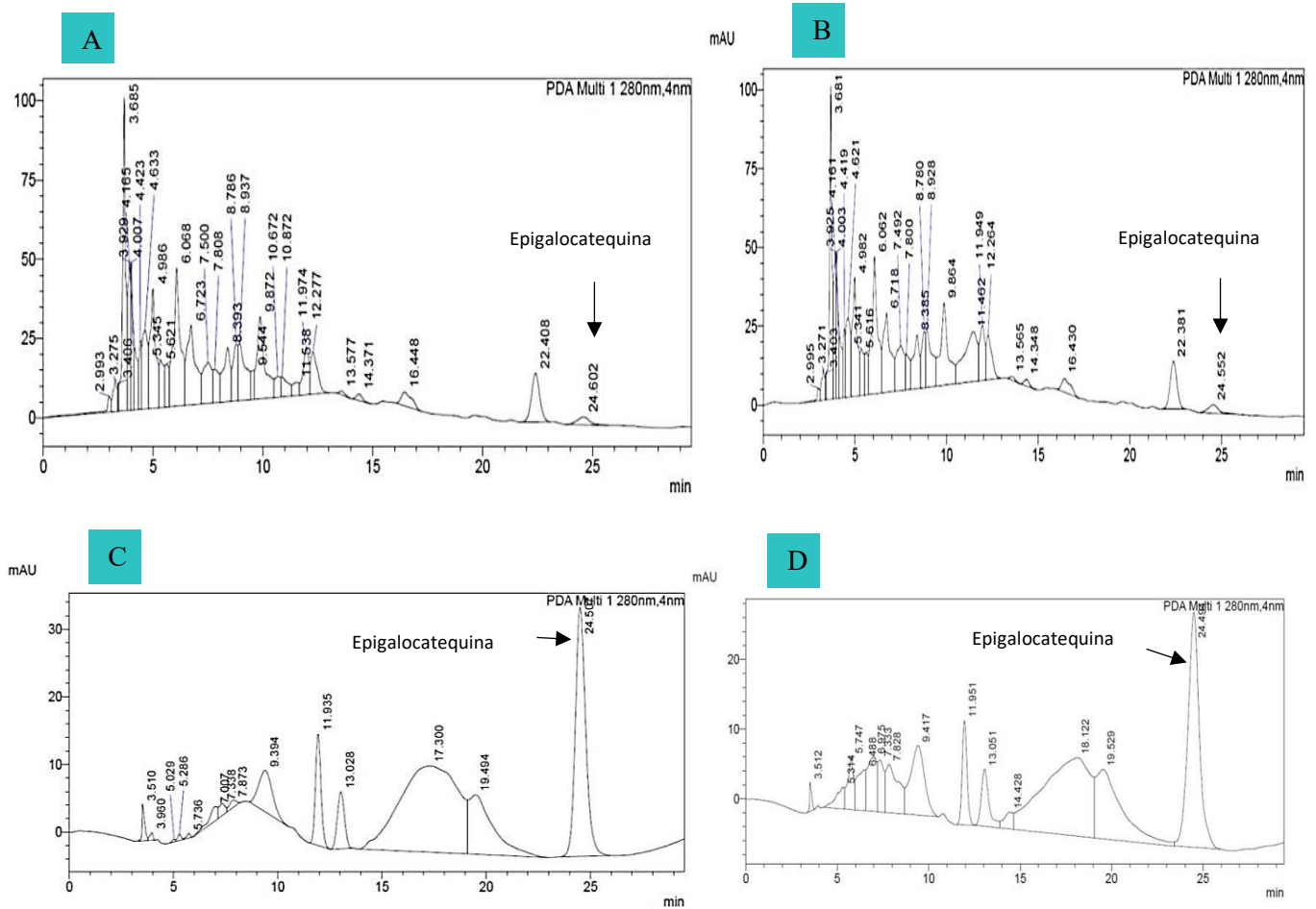
Tabla 16*Prueba de rangos múltiples de formas de preparación.*

Formas de preparación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Infusión	6	5078.38	2628.46	X
Decocción	6	16494.4	2628.46	X

Nota. X no paralelas indica significancia, al 95% de confianza.

Figura 14

Cromatograma de epigalocatequina en infusión y decocción en hojas de guanábana y achiote.



Nota. A) Decocción y B) infusión de *Annona muricata*; C) Infusión y D) decocción de *Bixa orellana*.

La Figura 14 muestra los cromatogramas de epigalocatequina en la infusión y decocción en las hojas de *Annona muricata* y *Bixa orellana*.

En el presente estudio, la concentración de epigalocatequina se incrementa por la decocción independientemente del material estudiado. Se encuentra en mayor concentración en la decocción de achiote. Pan *et al.* (2018) menciona que la epigalocatequina es favorecida por la temperatura, y a mayor tiempo de exposición existe mayor liberación de las estructuras de los fenoles unidos al aglicón. Fotaquis *et al.* (2016),

en su investigación de 10 plantas encontró mayor contenido de epicatequina en la decocción de 15 minutos con respecto a la infusión.

Kilel *et al.* (2013) afirma que las hojas no expuestas directamente a la luz del sol contienen menos catequina que las hojas expuestas a la luz solar. Esto explica la mayor concentración de epigallocatequina en hojas de achiote. Cabe recordar que las hojas de achiote y guanábana fueron recolectadas de diferentes lugares, además las hojas de achiote fueron recolectadas en pleno verano de una planta de 4 años de edad, mientras que las hojas de guanábana fueron recolectadas de una planta de 45 años de edad (las hojas no estaban expuestas directamente al sol). Por lo tanto, uno de los factores que influye en la concentración de polifenoles es el lugar de cultivo, edad y ubicación de las hojas en la planta.

6.4 Determinación de compuestos bioactivos en las decocciones de los filtrantes mediante HPLC-DAD.

Tabla 17

Compuestos polifenólicos en la decocción de los filtrantes

Compuestos polifenólicos	Filtrantes				
	F1	F2	F3	F4	F5
Quercetina (µg/g)	1454,784	903,482	727,405	666,319	248,01
Hesperidina (µg/g)	< 0,304	< 0,304	< 0,304	11,779	16,468
Epigallocatequina (µg/g)	< 2,653	1139,483	465,64	45,919	48,618

Nota. (µg/g) En extracto seco de los filtrantes.

6.4.1 Quercetina

Se utilizó el análisis HPLC-DAD para identificar y cuantificar los compuestos bioactivos en los filtrantes a base de hojas de guanábana y achiote. Los resultados de concentración de quercetina expresada en $\mu\text{g/g}$ se muestran en la Tabla 17. La identificación de quercetina en filtrantes se observa en la Figura 16. El contenido de quercetina es altamente significativo ($p < 0.05$) en todo los filtrantes (Tabla 18).

Tabla 18

Análisis de varianza de quercetina en filtrantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.30185E6	4	575463.	29181.04	0.0000
Intra grupos	197.205	10	19.7205		
Total (Corr.)	2.30205E6	14			

Nota. Nivel de confianza 95%.

En la Tabla 19 y Figura 15, se observa que ningún filtrante es significativo a otro filtrante.

Tabla 19

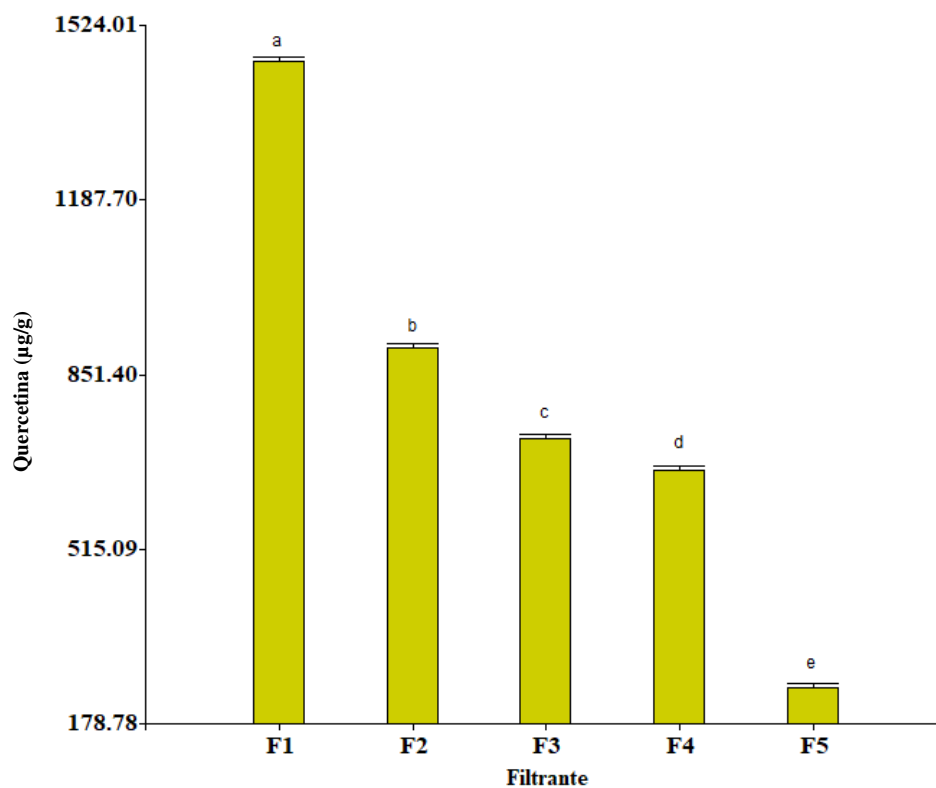
Pruebas de rangos múltiple de quercetina en filtrantes

<i>Mezcla de hojas</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
F5	3	248.01	X
F4	3	666.319	X
F3	3	727.405	X
F2	3	903.482	X
F1	3	1454.78	X

Nota. X no paralelas indica significancia. Ninguno de los grupos es significativo entre sí.

Figura 15

Contenido de quercetina en filtrantes.



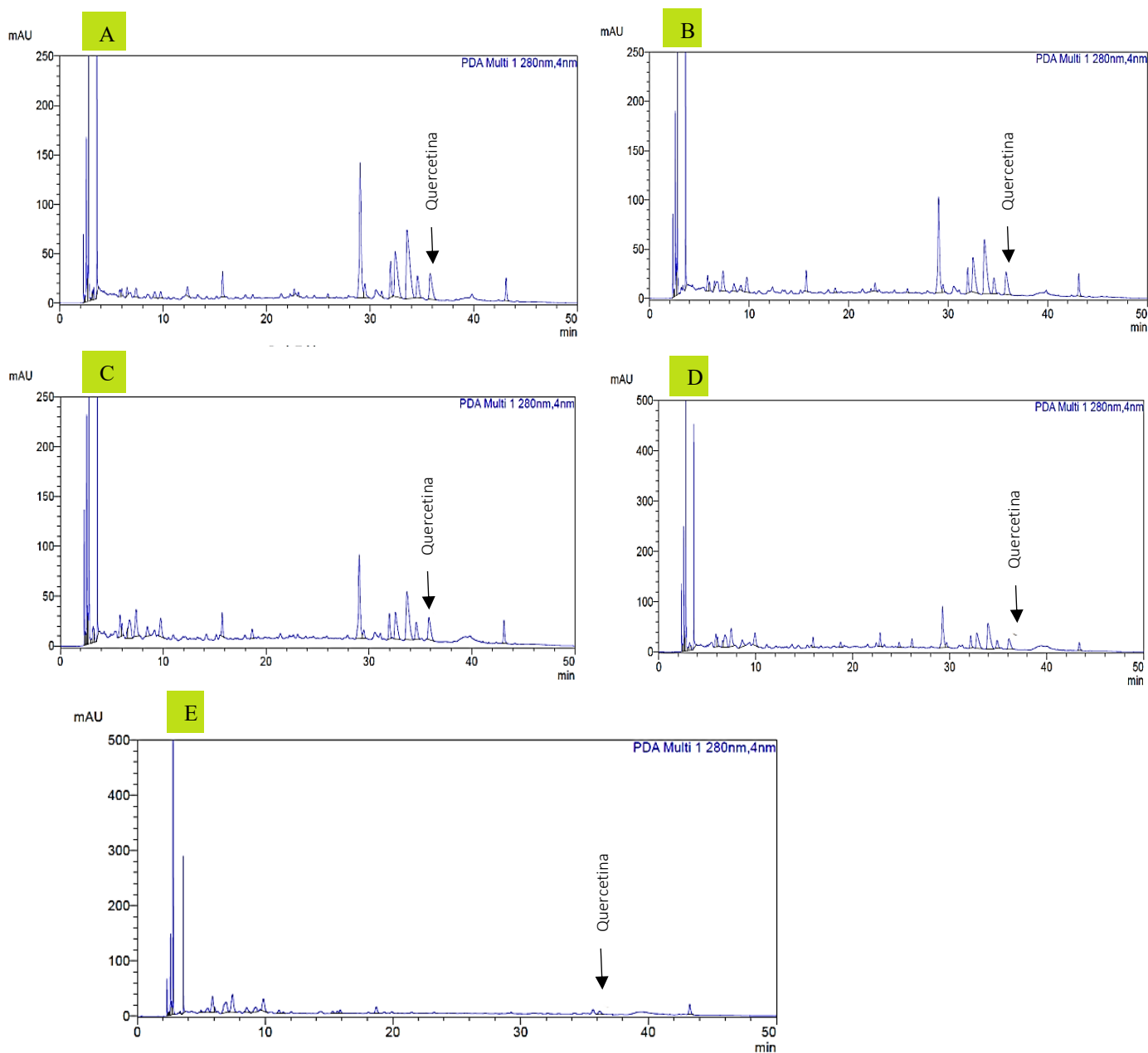
Nota. Letras comunes no son significativamente diferentes.

En la Figura 15 se observa mayor concentración de quercetina en filtrante F1. La concentración va disminuyendo conforme disminuye la proporción de achiote (*Bixa orellana*). Cabe recordar que F1 es 20% hojas de guanábana + 80% hojas de achiote, y la proporción va en aumento a base de hojas de guanábana hasta el filtrante F5 (80% hojas de guanábana + 20% hojas de achiote). El filtrante F1 presentó concentraciones más elevadas y F5 valores más bajos de quercetina, superando los valores reportados por João *et al.* (2016), en decocción (0,62 mg/g) del té verde (*Camellia sinensis*). Oliveira *et al.* (2017) reportó presencia de quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-rutinósido y kaempferol-3-O-rutinósido y ácido hidroxicinámico, siendo esta última más predominante en te de hojas de *Annona muricata*. Del análisis de estos

resultados, se puede decir que las hojas de *Bixa orellana* (achiote) son responsables de brindar quercetina a los filtrantes.

Figura 16

Identificación de quercetina en filtrantes, empleando HPLC-DAD.



Nota. A) Filtrante F1; B) Filtrante F2; C) Filtrante F3; D) Filtrante F4 y E) Filtrante F5.

6.4.2 Hesperidina

En la Figura 17 se observa claramente la variación de la concentración de hesperidina en los filtrantes. Los resultados obtenidos mostraron, mayor contenido de hesperidina en el filtrante F5 (16,468 $\mu\text{g/g}$) seguido por filtrante F4 (11,779 $\mu\text{g/g}$). Las concentraciones más bajas de hesperidina se encontraron en los filtrantes F1, F2 y F3 y no son significativamente diferentes. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todo los filtrantes (Tabla 20).

Tabla 20

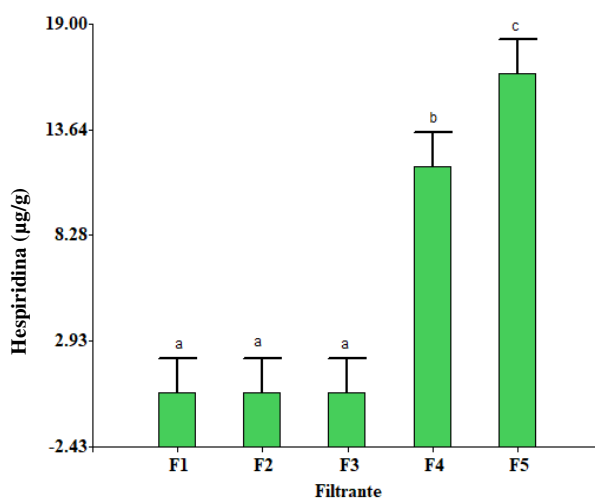
Análisis de varianza de hesperidina en filtrantes

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	720.503	4	180.126	194.38	0.0000
Intra grupos	9.26676	10	0.926676		
Total (Corr.)	729.77	14			

Nota. Nivel de confianza al 95%.

Figura 17

Concentración de hesperidina en filtrantes.

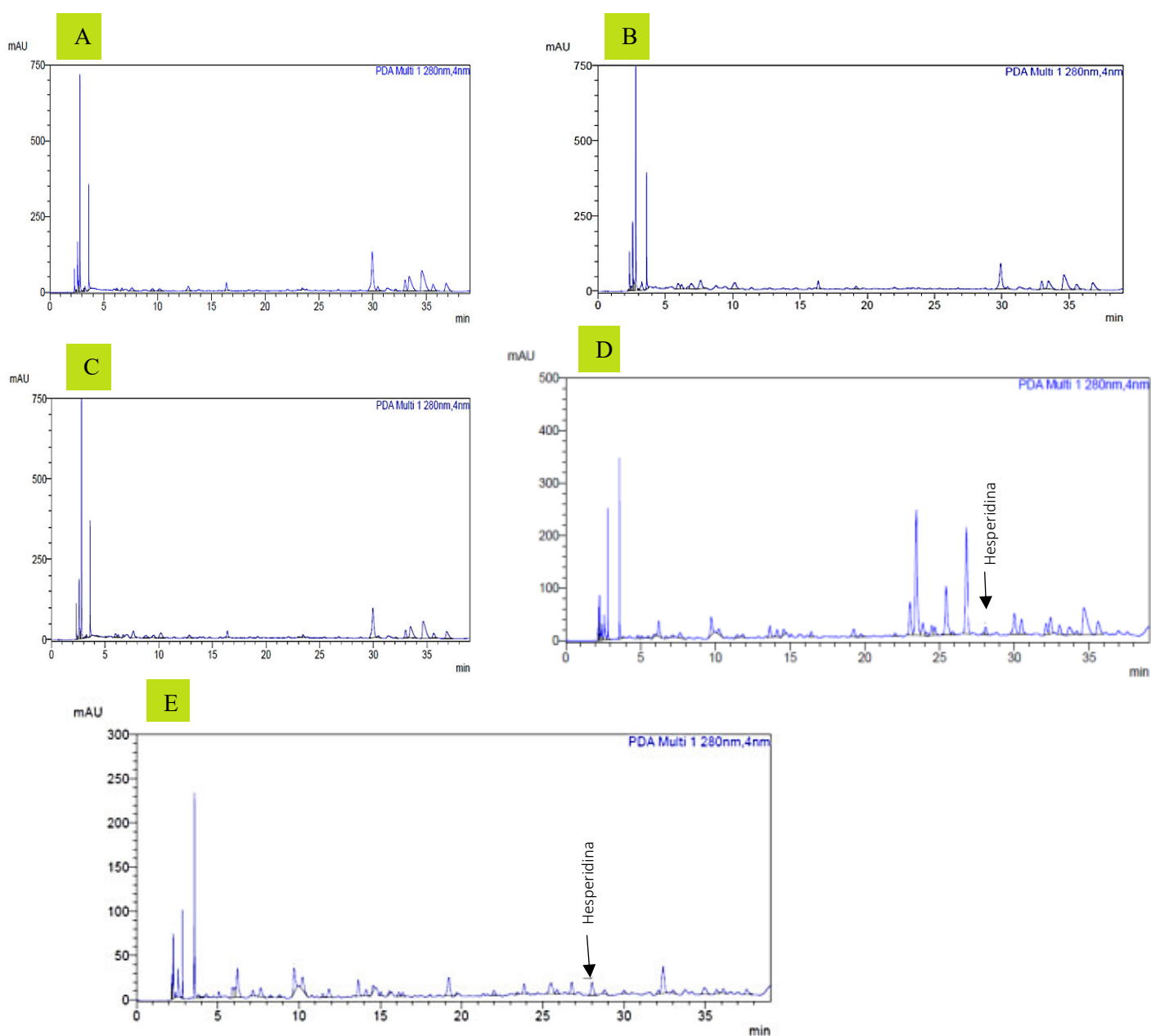


Nota. Letras iguales no son significativamente diferentes.

En los filtrantes F1, F2 y F3 posiblemente hubo una degradación durante su extracción. Además, su baja solubilidad en el agua, condicionó las pequeñas cantidades reportadas en la Tabla 17 y Figura 18. Nakayama *et al.* (2014) reportan que la parte hidrofóbica de hesperidina formaron enlaces con polifenoles presentes en guanábana, lo cual influiría en su extracción.

Figura 18

Cromatograma de hesperidina en filtrantes mediante HPLC-DAD.



Nota. A) Filtrante F1; B) Filtrante F2; C) Filtrante F3; D) Filtrante F4 y E) Filtrante F5.

6.4.3 Epigallocatequina

La concentración de epigallocatequina identificada y cuantificada por HPLC-DAD en todos los filtrantes se muestra en Tabla 17. El cromatograma de epigallocatequina se muestran en la Figura 20. El contenido de epigallocatequina en el filtrante F2 fue 1139,483 $\mu\text{g/g}$, obteniéndose mayores valores con respecto a los demás filtrantes. La concentración de epigallocatequina encontrados en los filtrante F4 y F5 son muy similares (F4, 45,919 $\mu\text{g/g}$; F5, 48,618 $\mu\text{g/g}$). Estos valores no presentan diferencias significativas para estos tres filtrantes (F1, F4 y F5), Figura 19. Por otro lado, todo los filtrantes sí presentaron diferencias significativas con un nivel de confianza de 95% (Tabla 21).

Tabla 21

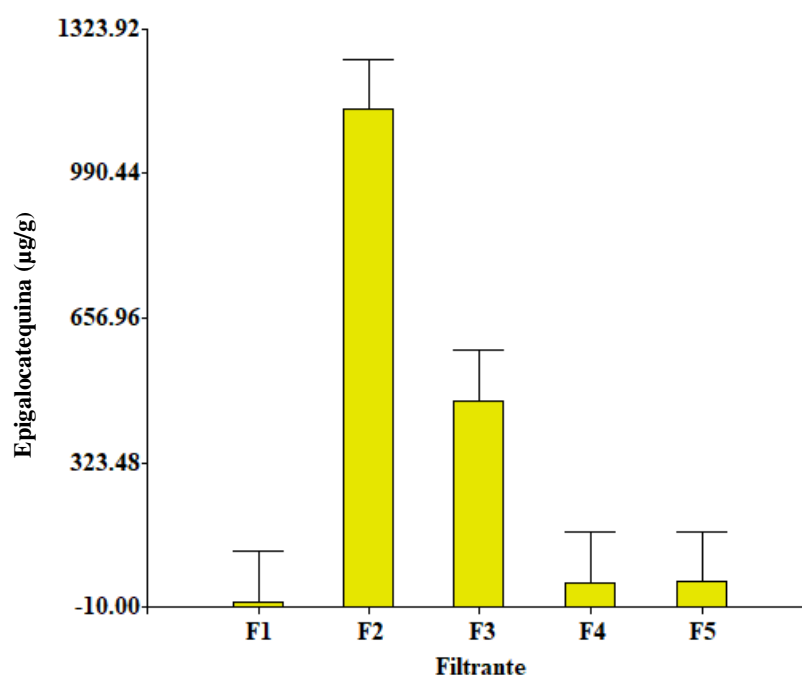
Análisis de varianza de epigallocatequina en filtrantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.82044E6	4	705110.	378.40	0.0000
Intra grupos	18633.8	10	1863.38		
Total (Corr.)	2.83907E6	14			

Nota. Nivel de confianza al 95%.

Figura 19

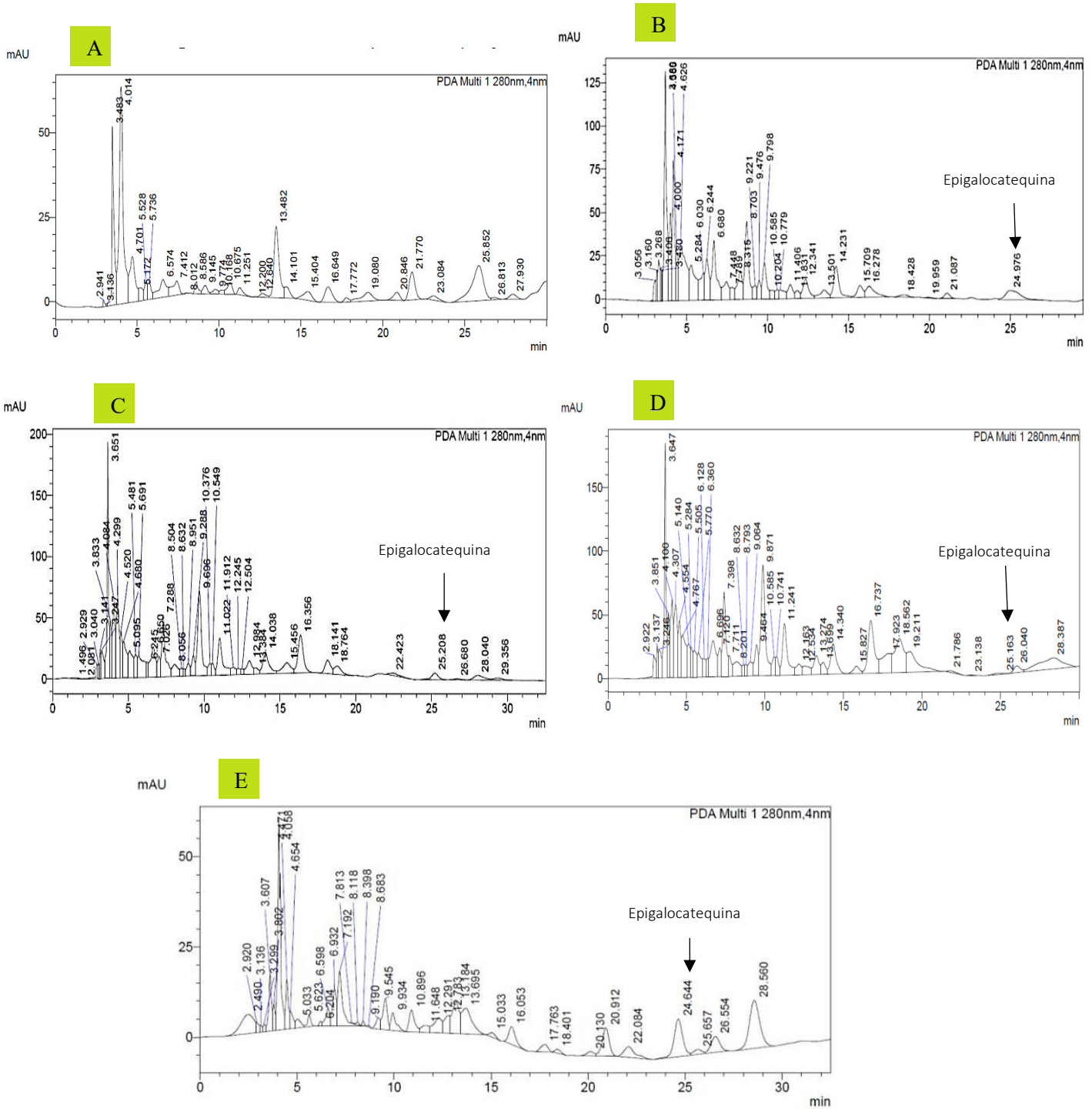
Concentración de epigalocatequina en los filtrantes.



El contenido de epigalocatequina depende de la temperatura y tiempo de extracción, grado de división de la hoja y la especie. Esto se ve reflejado en los estudios de Pan *et al.* (2018), cuando comparó el contenido de epigalocatequina en las infusiones de te (molido/polvo, entera y trituradas) encontrando mayores valores de epigalocatequina en hojas de te molidas a una extracción de 100°C. En esta investigación, la poca presencia de epigalocatequina en los filtrantes diferentes a F2, puede deberse a la reorganización de las estructuras. Los galatos de catequinas son altamente solubles en agua, mientras que la catequina es poco soluble (Hanh *et al.*, 2018). Kilel *et al.* (2013), menciona que la epigalocatequina es la responsable de proporcionar un ligero dulzor. Por lo tanto el filtrante F2 al contener mayor concentración de epigalocatequina comparado con los demás filtrantes, posiblemente no es astringente.

Figura 20

Cromatograma de epigalocatequina en filtrantes



Nota. A) Filtrante F1; B) Filtrante F2; C) Filtrante F3; D) Filtrante F4 y E) Filtrante F5.

6.5 Actividad antiinflamatoria del filtrante

La Figura 21 muestra el gráfico de efecto antiinflamatorio del filtrante F2, el volumen de la inflamación subplantar de la pata derecha del reactivo biológico. La pendiente de diclofenaco es 0,0393, del filtrante es 0,143 y del agua es 0,2165. Esto indica que el diclofenaco presentó mayor capacidad para inhibir la inflamación, seguido por el filtrante.

Figura 21

Efecto antiinflamatorio del filtrante F2 en modelo de edema pedal.

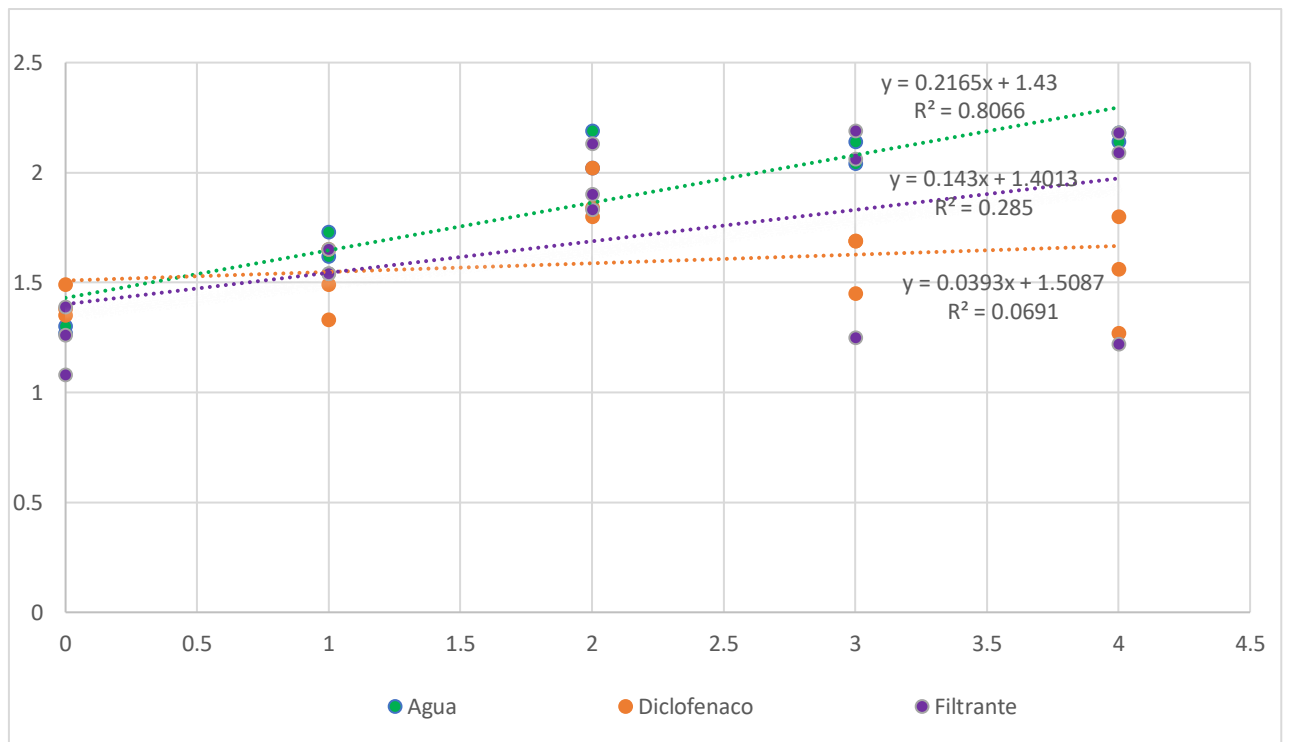
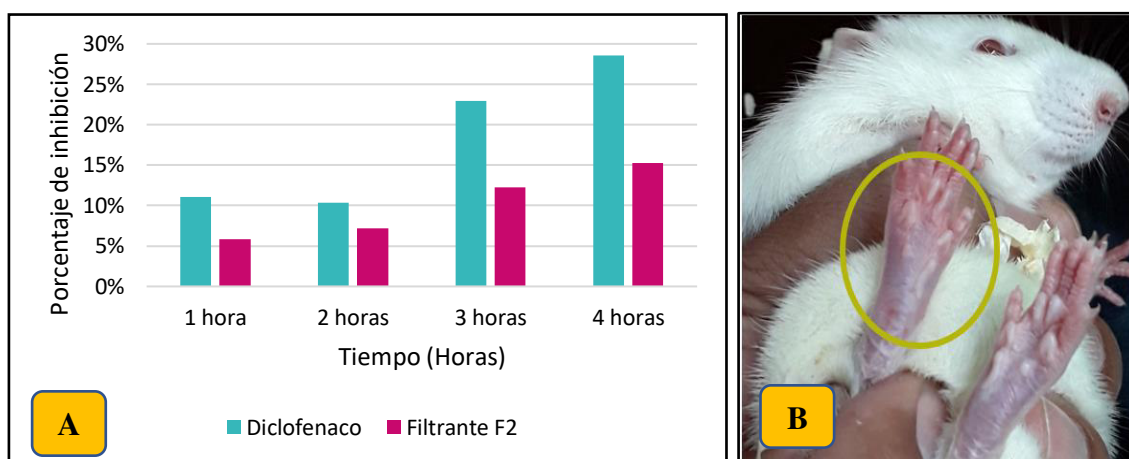


Figura 22

Porcentaje de inhibición de la inflamación producida por carragenina, mediante la prueba de edema pedal.



La Figura 22 A, muestra el porcentaje de inhibición de la inflamación generada por la inyección de λ -carragenina al 1%, 250 mg/kg del filtrante y 50 mg/kg del diclofenaco. El porcentaje de inhibición de la inflamación aumenta con el transcurrir las horas, alcanzando mayor actividad antiinflamatoria a las 4 horas de iniciada la evaluación. El porcentaje de inhibición de inflamación de diclofenaco fue 29% y del filtrante 15%. En la Figura 22 B, se observa las características propias de inflamación, enrojecimiento de la zona evaluada.

La capacidad antiinflamatoria del extracto en estudio está influenciada por la naturaleza del solvente, ya que compuestos polifenólicos, tienen mayor afinidad con los solventes polares como el agua, etanol. La actividad antiinflamatoria de la decocción del filtrante F2 tuvo valores bajos comparados con los valores reportados por Quilez *et al.* (2015), en su estudio con hojas de guanábana, reportaron con la misma dosis 25,85% a la tercera hora de su evaluación, aunque ésta disminuyó a 7,59% a la quinta hora de evaluación. Munggarani *et al.* (2014), en su investigación de la infusión de hojas de

achiote encontraron 16,97% de inhibición frente a carragenina, superando a diclofenaco, 13,79 %.

Se sabe que el fármaco diclofenaco ejerce su efecto antiinflamatorio, inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) al inhibir la síntesis de prostanoïdes (Alfaro y Davis, 2023). La actividad antiinflamatoria del filtrante se debe a sus compuestos bioactivos, entre ellos, flavonoides, ácidos fenólicos y taninos (Norliyana *et al.*, 2023 y Quilez *et al.*, 2015). La investigación de Oliveira *et al.* (2017), reporta a quercetina como principal responsable de la actividad antiinflamatoria del té de hojas de guanábana, esto debido al unión del enlace C₂=C₃ a la enzima fosfolipasa (catecol en el anillo B, beneficio). Por otro lado, Cercato *et al.*, (2021), indica que la actividad antiinflamatoria está asociada a la capacidad antioxidante, debido a que la infusión de *Annona muricata* redujo al hidroperóxido y aumentó la actividad de catalasa. La rutina (quercetina 3-O-rutenósido) presente en la decocción de *Annona muricata*, es responsable de brindar protección contra estrés oxidativo (Balderrama-Carmona *et al.*, 2020). Ordoñez *et al.* (2018), sostiene que son los compuestos polifenólicos presentes en el filtrante de hojas de achiote los responsables de su capacidad antioxidante, entre ellos procianidinas y ácidos fenólicos. Determinó que el filtrante de achiote presenta mayor capacidad antioxidante que los filtrantes de anís, manzanilla, muña, te negro, té verde y hierba luisa.

Varios estudios han reportado que los polifenoles, flavonoides y acetogeninas presentes en las hojas de guanábana poseen propiedades antiinflamatorias. Las acetogeninas se caracterizan por ser apolares en su mayoría, un ejemplo es la anonacina (acetogenina monotetrahidrofurano) que tiene la característica de ser relativamente polar (Roduan *et al.*, 2017). Se cree que la anonacina es neurodegenerativa (Abdul, 2018). Champy *et al.* (2005) encontraron 140 µg (0,14 mg) de anonacina en una taza de infusión

o decocción de las hojas de guanábana. Según Machado de Moraes *et al.*, (2016), encontraron 0,65 $\mu\text{g/g}$ -peso seco de anonacina en la infusión de los filtrantes de 2,5 g de hojas mientras que los filtrante de 5g contienen 0,33 $\mu\text{g/g}$ -peso seco de anonacina. Sin embargo, Nolasco-González *et al.* (2022) reporta la nula concentración en decocción e infusión de hojas de guanábana. Larbi *et al.*, 2011 (citado por Abdul *et al.* 2018), encontraron que cantidades mayores a 5 g/kg tenia efecto toxico y recomienda consumir máximo 1 g/kg del extracto acuoso de hojas de *Annona muricata*. En esta investigación no se determinó la concentración de anonacina, los estudios previos indican que el filtrante de 1g no contiene anonacina en concentraciones con potencial toxico. Estos hallazgos confirman que las decocciones del filtrante F2 no contienen este metabolito, por lo tanto, es recomendable consumirlo como decocción por su actividad antiinflamatoria.

Estudios previos del extracto acuoso del polvo de hojas de *Bixa Orellana*, indican que su capacidad antiinflamatoria se debe a la presencia de flavonoides responsables de inhibir la producción de COX-2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), mientras tanto los taninos disminuyeron ROS, además es capaz de formar complejos con proteínas, polisacáridos, alcaloides, minerales y ácidos nucleicos (Munggarani *et al.* 2014).

De lo anterior, el filtrante F2 tiene actividad antiinflamatoria por los polifenoles quercetina y epigallocatequina identificados y cuantificados los cuales inhiben los mecanismos de los procesos inflamatorios. La composición química encontrada en la decocción del filtrante F2 dependen de la temperatura y duración del proceso de extracción.

6.6 Evaluación microbiológica del filtrante

Se realizaron los análisis microbiológicos correspondientes al filtrante F2 (40% guanábana + 60% achiote). Los resultados de dichos análisis se muestran a continuación.

Tabla 22

Criterio microbiológico del filtrante F2

Criterio microbiológico	Valor encontrado	Límite permitido*
Mohos	$< 10^2$	10^2
<i>Enterobactereaceas</i>	21	10^2

Nota. (*) según NTS N° 071-MINSA/DIGESA V-01.

Los resultados microbiológicos de mohos y *enterobactereaceas* en el filtrante F2 se encontraron dentro de los parámetros establecidos por Norma Técnica Sanitaria N° 071-MINSA/DIGESA V-01. Por lo tanto, se puede asegurar que el filtrante es apto para consumo humano, y los parámetros utilizados para la elaboración del filtrante son adecuados. La presencia de mohos y *enterobactereaceas*, en estas cantidades no presentan un riesgo para la salud. Por consiguiente, el filtrante es inocuo y de calidad.

6.7 Análisis sensorial de la decocción del filtrante

En la Tabla 23, se observa los resultados de la evaluación de análisis sensorial del filtrante de hojas de guanábana y achiote. El atributo color presentó un valor de 3,2 que está en el rango de “Me gusta”. El atributo olor obtuvo un valor de 3 y el atributo sabor presentó un valor de 2,85 calificándose el filtrante como “Me gusta”. Estos resultados muestran la aceptación de los panelistas ante el filtrante F2. Además, los beneficios potenciales inducen una mayor apreciación. De la misma manera, Mio y Cunyurache (2019) y Tuesta (2020) encontraron aceptabilidad en filtrantes a base de hoja de guanábana y achiote, respectivamente.

Tabla 23

Evaluación de color, olor y sabor de la decocción del filtrante F2

	Color	Olor	Sabor
Valor	3,2	3	2,85

Nota. 1. Me disgusta; 2. No me gusta ni me disgusta; 3. Me gusta; 4. Me gusta mucho

VII. CONCLUSIONES

- La elaboración de un filtrante en base a hojas de achiote y guanábana, F2, con peso neto de un gramo, es un producto adecuado para el consumo de la población dado a su comodidad de uso y fácil acceso. El secado y la molienda son necesarios y convenientes para la conservación del producto.
- El seguimiento de los compuestos bioactivos de quercetina, hesperidina y epigallocatequina a través de su cuantificación empleando HPLC-DAD, ha sido idóneo, ya que nos ha permitido conocer la concentración en las hojas frescas de ambas plantas. La mayor concentración de quercetina y hesperidina se encontró en la infusión, mientras que la decocción favorece el aumento de la concentración de epigallocatequina.
- La concentración de quercetina se identificó en todo los filtrantes estudiados. Los filtrantes F1, F2 y F3 no mostraron la presencia de hesperidina. Los filtrantes F2 y F3 presentaron mayor concentración de epigallocatequina.
- La actividad antiinflamatoria evaluada en el filtrante F2 fue aproximadamente el 50% del diclofenaco. El filtrante F2 presentó 15% de inhibición inflamatoria y diclofenaco 29%. Esta actividad se sustenta en la presencia de los polifenoles determinados en el filtrante.
- El filtrante F2 cumple los parámetros microbiológicos establecidos según NTS N° 071-MINSA/DIGESA V-01. Además, presentó aceptabilidad en cuanto a las características color, olor y sabor, deduciéndose que los potenciales usuarios consumirían de buen grado.

VIII. RECOMENDACIONES

- Producir un filtrante de un gramo de masa cuya proporción sea 60% de hojas secas de achiote y 40% de hojas secas de guanábana y comercializarlo a nivel local.
- Que el consumo del filtrante en mención se realice a través de infusión empleando los mismos parámetros, agua hirviendo durante 10 minutos. Este procedimiento permite mayores beneficios que la decocción del mismo.
- Que se realicen mayores estudios de compuestos bioactivos en infusión y decocción en filtrantes variando los parámetros tiempo y temperatura, para determinar las condiciones ideales de uso.
- Que sea la UNMSM la que registre este producto resultado de la presente investigación.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdul, S., Jantan, I., Haque, A. y Arshad, L. (2018). Exploring the Leaves of *Annona muricata* L. as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 661. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00661>
- Alfaro, RA. y Davis, DD. 2023. *Diclofenac*. [Updated 2023 May 22]. StatPearls [Ineternet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557879>.
- Balderrama-Carmona, A., Silva-Beltrán, N., Gálvez-Ruiz, J., Ruíz-Cruz, S., Chaidez-Quiroz, C., y Morán-Palacio, E. (2020). Antiviral, Antioxidant, and Antihemolytic Effect of *Annona muricata* L. Leaves Extracts. *Plants*, 9(12), 1650. <https://doi.org/10.3390/plants9121650>
- Cayra, D. (2019). *Optimización de los parámetros de secado de hojas de guanábana (Annona muricata L.) sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante*. [Tesis de grado, Universidad Peruana Unión]. <http://hdl.handle.net/20.500.12840/2122>
- Cercato, L., Araújo, J., Oliveira, A., Melo, A., Lima, B., Edmilson WP dos Santos, E., Agenor G. dos S. Neto, Ricardo LC de Albuquerque-Júnior, Duarte, M., Araujo, A., Silva, A., Renata Grespan, R., Correa, C., y Camargo, E. (2021). Reduced cutaneous inflammation associated with antioxidant action after application of the aqueous extract of *Annona muricata* leaves. *Inflammopharmacol*, 29, 307-315 <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00735-1>
- Champy, P., Melot, A., Gue´rineau, V., Gleye, C., Fall, D., Hoglinger, G., Hocquemiller, R., (2005). Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical Parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord*, 20, 1629–1633.

- Chavelon, E. (2018). “Efecto de la concentración del extracto acuoso liofilizado de *Bixa Orellana* (achiote) sobre su actividad antiinflamatoria”. [Tesis de grado, Universidad Alas Peruanas]. <https://hdl.handle.net/20.500.12990/8468>.
- Chu, C., Deng, J., Man, Y. y Qu, Y. (2017). Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *BioMed Research International*, pp-9. <https://doi.org/10.1155/2017/5615647>
- Coria-Téllez, A., Montavo-Gonzales, E., Yahia, E. y Obledo-várquez, E. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662-691. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Deepika y Maurya, P. (2022). Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*, 27(8), 2498. <https://doi.org/10.3390/molecules27082498>
- Diaz, M., Pinto, D. y Silva, A. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Moléculas*, 26 (17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Difadi. (2015, 23 de octubre). Achiote, planta medicinal para prostatitis, dolor de cabeza, infección de garganta y de orina. *Fundación Caja Rural Burgos*. <https://fundacioncajaruralburgos.es/achiote-planta-medicinal-para-prostatitis-dolor-de-cabeza-infeccion-de-garganta-y-de-orina/>
- Espichán, P. y Veliz, L. (2022). *Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta de producción de filtrantes de hojas de achiote (Bixa orellana L.)* [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Industrial, Universidad de Lima]. <https://hdl.handle.net/20.500.12724/16330>

- Fotakis, C., Tsigrimani, D., Tsiaka, T., Lantzouraki, D., Strati, I., Makris, C., Tagkouli, D., Proestos, C., Sinanoglou, V., y Zoumpoulakis, P. (2016). Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry*, 211, 963-971. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.124>.
- Gatsou, D, Rosnay, G., Dieudonne, C. y Yanou, N. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory potential of aqueous extracts of leaves, barks and roots of *Bixa orellana* L. (Bixaceae) on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Avicenna Journal Phytomedicine*, 10(4): 428-439. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430966/>
- Hanh, T., Kang, H., Kim, S., Pal, K., y Kim, D. (2018). Glucosides of Catechin and Epigallocatechin Gallate: Enzymatic Synthesis to Improve Its Biological Activity. *Enzymes in Food Technology*, 277-299. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_14
- Ijeoma, D., Olaseike, I., Daramola F.Y. Omonhinmin A. Conrad. (2016). Phytochemical and Proximate Analysis of Foliage and Seed of *Bixa orellana* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 36(2), 247-251.
- João, M; Neves, V., Martins, A., Rauter, A., Neng, N., Nogueirab, M., João, V., Barreira, L., y Custódio, L. (2016). In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 200, 322–329. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.048>
- Kilel, CE., Faraj, A.K., Wanyokob, JK., Wachirab, F. y Mwingirwac, V. (2013). Green tea from purple leaf coloured tea clones in Kenya- their quality characteristics. *Food Chemistry*, 141 (2), 769-775. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.051>

- Legeay, S., Rodier, M., Fillon, L., Faure, S. y Clere, N. (2015). Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 7, 5443-5468. <http://doi.org/10.3390/nu7075230>
- Li, Y., Yao, J. han, C., Yang, J., Chaudhry, M., Wang, S., Liu, H., y Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
- Lista de Especies de Galapagos. (1959). Fundación Charles Darwin. <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=207>
- Mao-Qiang, M., Yang, B. y Elias, P. (2019). Benefitf of Hesperidin for Cuteous Functions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, ID 2676307. <https://doi.org/10.1155/2019/2676307>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego [MIDAGRI]. (2021, agosto 31). *En 2020 el Perú produjo 8731 toneladas de guanábana*. Agraria.pe Agencia agraria de noticias. <https://agraria.pe/noticias/en-2020-el-peru-produjo-8-731-toneladas-de-guanabana-25285>
- Mio, V. y Cunyarache, D. (2017). “*Formulación y caracterización de un filtrante a partir de las hojas de guanábana (Annona muricata L.)*” [Tesis de grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. <https://hdl.handle.net/20.500.12893/1803>
- Munggarani, S. Rohmawaty, E. y Nusjirwan, R. (2014). Bixa Orellana L Leaf infusion as an Anti-inflammatory Agent in Carrageenan-induced Wistar Rats. *Althea Medical Journal*, 1(2). <http://doi.org/10.15850/amj.v1n2.347>
- Mutakin, M., Fauziati, R., Fadhilah, F., Zuhrotun, A., Riezki, A., y Hadisaputri, Y. (2022). Pharmacological Activities of Soursop (*Annona muricata* Lin.). *Molecules*, 27(4):1201. <http://doi.org/10.3390/molecules27041201>

- Nakayama, H., Tanaka, T., Miyata, Y., Saito, Y., Matsui, T., Aramaki, S., Nagata, Y., Tamaru, S., and Tanaka, K. (2014). Development of soluble hesperidin-containing fermented tea made from unripe mandarin orange fruits and third crop green tea leaves. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, *67*, 95-103. <https://doi.org/10.4327/jsnfs.67.95>
- Nolasco-Gonzales, Y., Chacón, M., Ortiz-Basurto, R., Aguilera-Aguirre, S., Gonzáles, G., Rodríguez, C., Navarro-Cortez, M., García, H., García-Magaña, M., Meza-espinoza, L., y Montalvo-González, E. (2022). Annona muricata Leaves as a Source of Bioactive Compounds: Extraction and Quantification Using Ultrasound. *Horticulturae*, *8* (7), 560. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070560>
- NTS, N°071-MINSA/DIGESA-V.01. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Ministerio del Perú. Lima, Perú.
- Oliveira, A., Sá, I., Pereira, D., Goncalves, R., Andrade, P. y Valentao, P. (2017). Exploratory Studies on the in Vitro Anti-inflammatory Potential of Two Herbal Teas (*Annona muricata* L. and *Jasminum grandiflorum* L.), and Relation with Their Phenolic Composition. *Chemistry Biodiversity*, *14*. <https://doi:10.1002/cbdv.201700002>.
- Ordoñez, E., Villanueva, J. y Reátegui, D. (2018). Antioxidant and total polyphenols activity of fresh, dry and commercial herbal infusions. *Investigación y Amazonía, Tingo María, Perú*, *8*(5), 26-39.
- Pan, J., Jiang, Y., Lv, Y., Li, M., Zhang, S., Liu, J, Zhu, Y. y Zhang, H. (2018). Comparison of the main compounds in Fuding White tea infusions from various

- tea types. *Food Scie Biotechnol*, 27(5), 1311-1318.
<https://doi.org/10.1007/s10068-018-0384-3>
- Pyrzynska, K. (2022). Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients*, 14 (12), 2387. <https://doi.org/10.3390/nu14122387>
- Quilez, A., Montserrat-de la Paz, De la Puerta, R., Fernández-Arche, M. y García-Giménez, M. (2015). Validation of ethnopharmacological use as anti-inflammatory of a decoction from *Annona muricata* leaves. *African Journals of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(4), 14-20.
<https://doi.org/10.4314/ajtcam.v12i4.314>
- Quispe, R. (2018). *Diagnóstico, evaluación e instalación de una planta productora de bolsitas filtrantes de hojas de guanábana, Arequipa 2018*. [Tesis de pregrado, Universidad Alas Peruanas]. <https://hdl.handle.net/20.500.12990/4924>.
- Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA. Normas y Documentos Legales-Ministerio de Salud-Plataforma del Estado Peruano.
<https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/248013-459-2008-minsa>
- Roduan, M., Abd, R., Sulaimana, H. y Mohtarrudinb, N. (2017). *Annona muricata* leaves extracts prevent DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis via modulating antioxidants enzymes system in ICR mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 481–488. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.133>
- Santana J., Romy Gleyse Chagas, R., Ribeiro, Y., Pedreira, J., Santos de Oliveira, C., Carvalho, N., y Narain, N. (2021). Evaluation of bioactive compounds, phytochemicals profile and antioxidant potential of the aqueous and ethanolic extracts of some traditional fruit tree leaves used in Brazilian folk medicine. *Food Research International*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110282>

- Seguro Social de Salud [EsSalud]. (2014, diciembre 4). EsSalud recomienda el consumo de achiote para ayudar a desinflamar la próstata y vías urinarias. Accesado: 21 de mayo de 2023. <http://www.essalud.gob.pe/essalud-recomienda-el-consumo-de-achiote-para-ayudar-a-desinflamar-la-prostata-y-vias-urinarias/>
- Skoog, D., Holler, J., Crouch R., (2008). *Principio de análisis instrumental*. México D. F., México: Cengage Learning Editores.
- Stringheta, P., Silva, P. y Costa, A. (2018). *Annatto/Urucum— Bixa Orellana. Exotics Fruits*, 23-30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00006-X>
- Suárez, M. (2021). *Determinación de metabolitos secundarios de hojas de once morfotipos de Bixa orellana L. por métodos espectrofotométricos* [Tesis de grado, Universidad Nacional De La Amazonía Peruana]. <https://hdl.handle.net/20.500.12737/7236>
- Tuesta, Z. (2020). *Efecto de temperatura de secado y evaluación de la capacidad antioxidante de la hoja de achiote (Bixa Orellana L.) para la utilización en la elaboración de filtrante en la provincia de Coronel Portillo* [Tesis de grado, Universidad Nacional de Ucayali]. <http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/3905>
- Vit, P., Santiago, B. y Pérez-Pérez, EM (2014). Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*, 39(5), 350-353. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33930879008>
- Waheed Janbi AH, Kamboh AA, Saeed M, Xiaoyu L, BiBi J, Majeed F, Naveed M, Mughal MJ, Korejo NA, Kamboh R, Alagawany M, Lv Huixia. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening

diseases. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(2) 140-153.
<https://doi.org/10.22038/IJBMS.2019.35125.8353>.

Zhang, Q., Lin, L-G. y Ye, W-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13:20.
<https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zubaidi, S., Mohd Nani H, Ahmad Kamal MS, Abdul Qayyum T, Maarof S, Afzan A, Mohmad Misnan N, Hamezah HS, Baharum SN, Mediani A. (2023). *Annona muricata*: Comprehensive Review on the Ethnomedicinal, Phytochemistry, and Pharmacological Aspects Focusing on Antidiabetic Properties. *Life*, 13(2):353.
<https://doi.org/10.3390/life13020353>.

X. ANEXOS

Anexo 1. Taxonomía de *Annona muricata* (Guanábana).



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

CONSTANCIA N°045-USM-NHN-2022

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama estéril), recibida de la tesista **Zoraya Erica RAMOS BAUTISTA, y Oscar Pedro Santisteban Rojas (Asesor)** de la Facultad de Química e Ingeniería Química, EP Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Annona muricata*** L. y tiene la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016):

ORDEN: MAGNOLIALES

FAMILIA: ANNONACEAE

GENERO: *Annona*

ESPECIE: *Annona muricata* L.

Nombre vulgar: "guanabana".

Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 08 de junio 2022


Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USHFE)

A circular stamp with the text 'MUSEO DE HISTORIA NATURAL' at the top and 'Herbario San Marcos - USM' at the bottom. In the center is a coat of arms.

JAC/ddb

Anexo 2. Taxonomía de *Bixa orellana* (Achiote).



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”

CONSTANCIA N°044-USM-NHN-2022

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama fértil), recibida de la tesista **Zoraya Erica RAMOS BAUTISTA, y Oscar Pedro Santisteban Rojas (Asesor)** de la Facultad de Química e Ingeniería Química, EP Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Bixa orellana*** L. y tiene la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016):

ORDEN: MALVALES

FAMILIA: BIXACEAE

GENERO: *Bixa*

ESPECIE: *Bixa orellana* L.

Nombre vulgar: “achiote”.

Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 08 de junio 2022


Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) - JEFE


JAC/ddb

Anexo 3. Certificado de análisis de quercetina.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO LABICER
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



INFORME DE ENSAYO N° 0349 – 23 – LABICER

1. **DATOS DEL CLIENTE**
- 1.1 NOMBRE / RAZÓN SOCIAL : ZORAYA ERICA RAMOS BAUTISTA
1.2 D.N.I / R.U.C. : 75998524
1.3 DIRECCIÓN : --
2. **CRONOGRAMA DE FECHAS**
- 2.1 FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA : 17 / 11 / 2022
2.2 FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYO : 22 / 11 / 2022 al 30 / 03 / 2023
2.3 FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME : 05 / 04 / 2023
3. **ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE QUERCETINA POR HPLC-DAD
4. **DATOS DE LA MUESTRA**
- 4.1 TIPO DE MUESTRA : EXTRACTO DE PLANTAS LIOFILIZADAS
4.2 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 10 MUESTRAS DE EXTRACTO DE PLANTAS LIOFILIZADAS
4.3 DESCRIPCIÓN :

MUESTRA	IDENTIFICACIÓN
M1	g: 0.2 a: 0.8
M2	g: 0.6 a: 0.4
M3	g: 0.5 a: 0.5
M4	g: 5%
M5	g: 0.4 a: 0.6
M6	g: 0.8 a: 0.2
M7	g: d: ff
M8	g: inf: ff
M9	a: inf: ff
M10	a: d: 10°

- 4.4 OBSERVACIONES (SI APLICA) : --
5. **LUGAR Y RECEPCIÓN DE ANALISIS** : LABORATORIO LABICER – UNI
6. **CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 21.5°C; Humedad relativa: 63%

7. RESULTADOS

7.1 RENDIMIENTO DE LAS FASES SEGÚN POLARIDADES DE LA MUESTRA

MUESTRA	RENDIMIENTO DE LA FASE (%)			
	ÉTER DE PETRÓLEO (A)	CLOROFORMO (B)	BUTANOL (C)	ACUOSA (D)
M1	3.73	1.18	3.55	60.99
M2	0.56	0.54	2.44	71.40
M3	0.31	0.37	1.67	69.22
M4	0.27	0.70	7.05	62.61
M5	0.32	0.88	5.61	61.08
M6	0.21	0.25	1.57	76.18
M7	2.04	0.93	2.10	89.35
M8	3.56	1.16	2.03	84.81
M9	0.12	0.04	8.14	63.37
M10	0.19	0.04	21.52	64.76



TABLA N°3. Resultado Promedio de Quercetina en las muestras

Muestra	Masa inicial, g	Concentración fase butanol, ug/g	Concentración fase acuosa, ug/g	Concentración, ug/g
M1	0.3884	1311.087	2308.759	1454.784
M2	0.5403	< 0.543	933.157	666.319
M3	0.5449	597.582	1036.387	727.405
M4	0.4835	1129.648	4031.298	2603.506
M5	0.2513	724.468	1412.573	903.482
M6	0.4723	< 0.543	325.556	248.010
M7	0.4958	< 0.543	< 0.543	< 0.543
M8	0.4385	788.202	< 0.543	15.998
M9	0.2517	365.220	284.777	210.207
M10	0.513	< 0.543	269.557	174.556



Anexo 4. Certificado de análisis de hesperidina



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO LABICER
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



INFORME DE ENSAYO N° 0314 – 23 – LABICER

1. **DATOS DEL CLIENTE**
 - 1.1 NOMBRE / RAZÓN SOCIAL : ZORAYA ERICA RAMOS BAUTISTA
 - 1.2 D.N.I / R.U.C. : 75998524
 - 1.3 DIRECCIÓN : --
2. **CRONOGRAMA DE FECHAS**
 - 2.1 FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA : 17 / 11 / 2022
 - 2.2 FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYO : 22 / 11 / 2022 al 22 / 03 / 2023
 - 2.3 FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME : 31 / 03 / 2023
3. **ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE HESPERIDINA POR HPLC-DAD
4. **DATOS DE LA MUESTRA**
 - 4.1 TIPO DE MUESTRA : EXTRACTO DE PLANTAS LIOFILIZADAS
 - 4.2 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 10 MUESTRAS DE EXTRACTO DE PLANTAS LIOFILIZADAS
 - 4.3 DESCRIPCIÓN :

MUESTRA	IDENTIFICACIÓN
M1	g: 0.2 a: 0.8
M2	g: 0.6 a: 0.4
M3	g: 0.5 a: 0.5
M4	g: 5%
M5	g: 0.4 a: 0.6
M6	g: 0.8 a: 0.2
M7	g: d: ff
M8	g: inf: ff
M9	a: inf: ff
M10	a: d: 10'

- 4.4 OBSERVACIONES (SI APLICA) : --
5. **LUGAR Y RECEPCIÓN DE ANALISIS** : LABORATORIO LABICER – UNI
6. **CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 21.5°C; Humedad relativa: 63%
7. **RESULTADOS**
 - 7.1 **RENDIMIENTO DE LAS FASES SEGÚN POLARIDADES DE LA MUESTRA**

MUESTRA	RENDIMIENTO DE LA FASE (%)			
	ÉTER DE PETRÓLEO (A)	CLOROFORMO (B)	BUTANOL (C)	ACUOSA (D)
M1	3.73	1.18	3.55	60.99
M2	0.56	0.54	2.44	71.40
M3	0.31	0.37	1.67	69.22
M4	0.27	0.70	7.05	62.61
M5	0.32	0.88	5.61	61.08
M6	0.21	0.25	1.57	76.18
M7	2.04	0.93	2.10	89.35
M8	3.56	1.16	2.03	84.81
M9	0.12	0.04	8.14	63.37
M10	0.19	0.04	21.52	64.76

TABLA N°3. Resultado Promedio de Hesperidina en las muestras

Muestra	Masa inicial, g	Concentración fase butanol, ug/g	Concentración fase acuosa, ug/g	Concentración, ug/g
M1	0.3884	< 0.304	< 0.304	< 0.304
M2	0.5403	482.121	< 0.304	11.779
M3	0.5449	< 0.304	< 0.304	< 0.304
M4	0.4835	609.501	586.977	410.469
M5	0.2513	< 0.304	< 0.304	< 0.304
M6	0.4723	1051.081	< 0.304	16.468
M7	0.4958	7127.404	< 0.304	149.506
M8	0.4385	5685.843	56.658	115.403
M9	0.2517	70.976	332.702	216.611
M10	0.513	223.324	129.259	131.764



Anexo 5. Certificado de análisis de epigalocatequina.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO LABICER
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



INFORME DE ENSAYO N° 0143 – 23 – LABICER

1. **DATOS DEL CLIENTE**
 - 1.1 NOMBRE / RAZÓN SOCIAL : ZORAYA ERICA RAMOS BAUTISTA
 - 1.2 D.N.I / R.U.C. : 75998524
 - 1.3 DIRECCIÓN : --
2. **CRONOGRAMA DE FECHAS**
 - 2.1 FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA : 17 / 11 / 2022
 - 2.2 FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYO : 22 / 11 / 2022 al 23 / 02 / 2023
 - 2.3 FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME : 24 / 02 / 2023
3. **ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE EPIGALOCATEQUINA POR HPLC-DAD
4. **DATOS DE LA MUESTRA**
 - 4.1 TIPO DE MUESTRA : EXTRACTO DE PLANTAS LIOFILIZADAS
 - 4.2 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 10 MUESTRAS DE EXTRACTO DE PLANTAS LIOFILIZADAS
 - 4.3 DESCRIPCIÓN :

MUESTRA	IDENTIFICACIÓN
M1	g: 0.2 a: 0.8
M2	g: 0.6 a: 0.4
M3	g: 0.5 a: 0.5
M4	g: 5%
M5	g: 0.4 a: 0.6
M6	g: 0.8 a: 0.2
M7	g: d: ff
M8	g: inf: ff
M9	a: inf: ff
M10	a: d: 10'

- 4.4 OBSERVACIONES (SI APLICA) : --
5. **LUGAR Y RECEPCIÓN DE ANALISIS** : LABORATORIO LABICER – UNI
6. **CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 21.5°C; Humedad relativa: 63%
7. **RESULTADOS**
 - 7.1 **RENDIMIENTO DE LAS FASES SEGÚN POLARIDADES DE LA MUESTRA**

MUESTRA	RENDIMIENTO DE LA FASE (%)			
	ÉTER DE PETRÓLEO (A)	CLOROFORMO (B)	BUTANOL (C)	ACUOSA (D)
M1	3.73	1.18	3.55	60.99
M2	0.56	0.54	2.44	71.40
M3	0.31	0.37	1.67	69.22
M4	0.27	0.70	7.05	62.61
M5	0.32	0.88	5.61	61.08
M6	0.21	0.25	1.57	76.18
M7	2.04	0.93	2.10	89.35
M8	3.56	1.16	2.03	84.81
M9	0.12	0.04	8.14	63.37
M10	0.19	0.04	21.52	64.76

TABLA N°3. Resultado Promedio de Epigallocatequina galato en las muestras

Muestra	Masa inicial, g	Concentración fase butanol, ug/g	Concentración fase acuosa, ug/g	Concentración, ug/g
M1	0.3884	< 2.653	< 2.653	< 2.653
M2	0.5403	1879.545	< 2.653	45.919
M3	0.5449	2319.780	616.694	465.640
M4	0.4835	1938.182	6664.579	4309.121
M5	0.2513	2824.965	1605.993	1139.483
M6	0.4723	3108.108	< 2.653	48.698
M7	0.4958	997.019	378.332	358.955
M8	0.4385	4345.618	< 2.653	88.201
M9	0.2517	114408.537	1184.223	10068.568
M10	0.513	118406.929	11038.474	32629.836

Anexo 6. Curvas de calibración de los estándares.

Figura 23

Curva de calibración de estándar de quercetina.

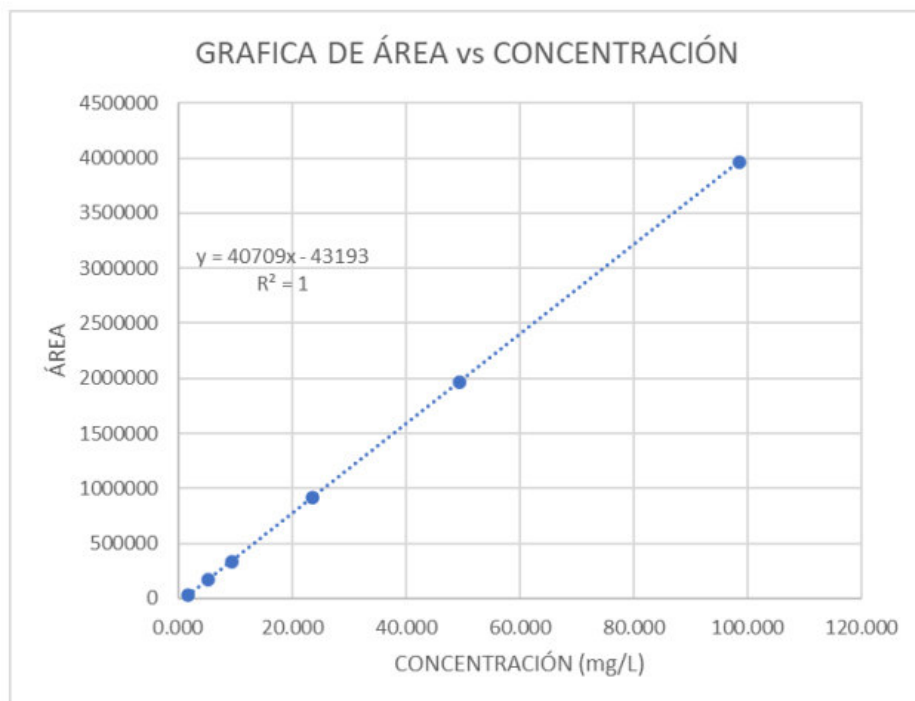


Figura 24

Curva de calibración de estándar de hesperidina.

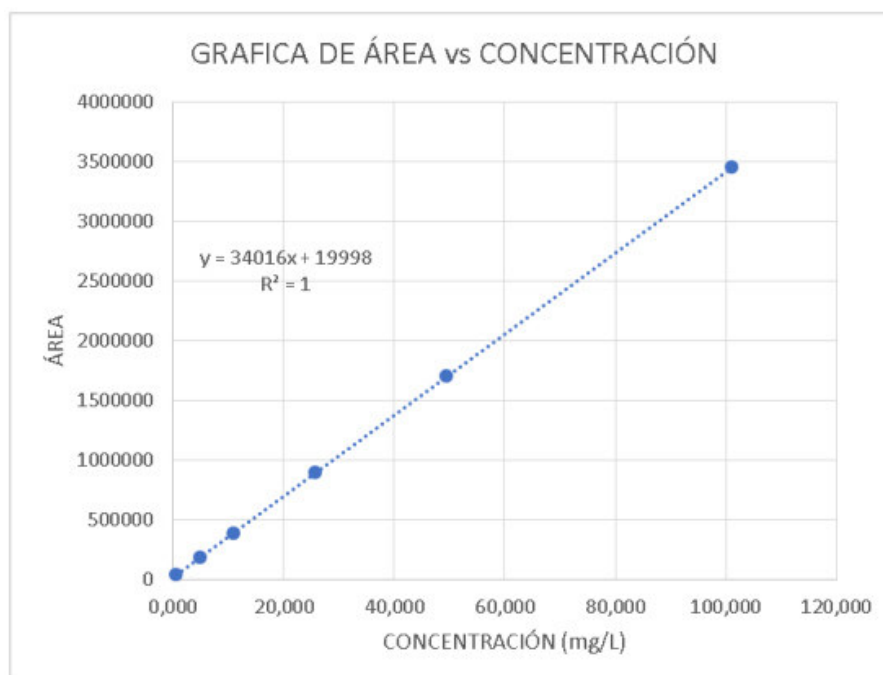
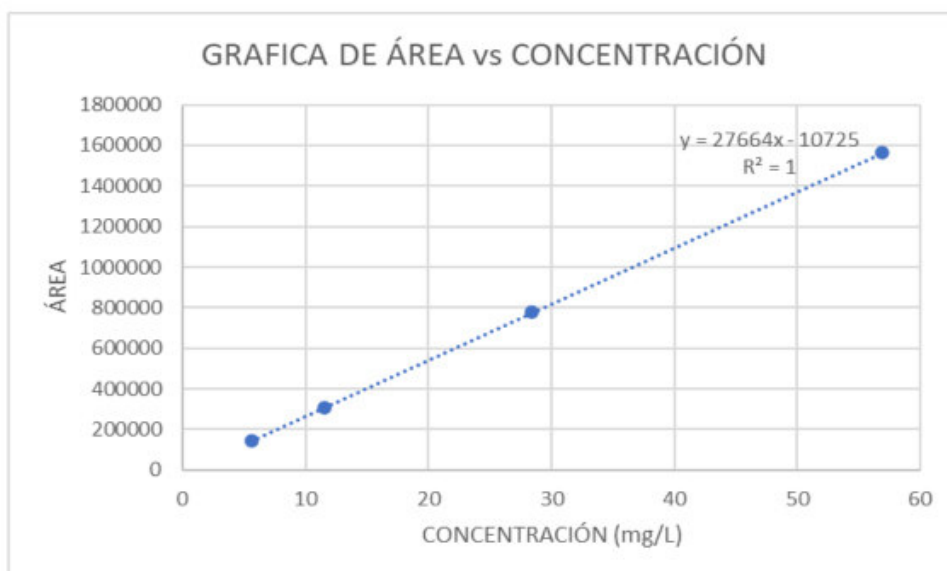


Figura 25

Curva de calibración de estándar de epigallocatequina.



Anexo 7. Certificado de compras de animales de experimentación.

	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO
CERTIFICADO SANITARIO N° 109- 2022	
Producto : Rata albina	Lote N° : R – 10- 2022
Especie : <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad : 08
Cepa : Holtzman	Edad : 2 meses
Peso : 150 a 200 gr.	Sexo : Macho
Guía de Remisión : 040061	Destino : Santisteban Rojas, Oscar
Fecha : 09-09-2022	
El Médico Veterinario, que suscribe, Jorge Ruiz Alarcón Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.	
*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.	
Chorrillos, 14 de octubre del 2022	
(Fecha de emisión del certificado)	 M.V. Jorge Ruiz Alarcón. C.M.V.P. 5052
NOTA: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.	

Anexo 8. Análisis microbiológico.

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS (Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA) FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO – CCA		
REPORTE DE ANÁLISIS N° 00132-CCA-2023			
ORDEN DE ANÁLISIS	: 0114-2023		
SOLICITADO POR	: ZORAYA ERICA RAMOS BAUTISTA		
DIRECCIÓN	: FRANCISCO VALLEJO-429, SAN JUAN DE MIRAFLORES		
MUESTRA	: FILTRANTE		
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	: 04 envases de plástico y rotulado a mano.		
VARIEDAD RECEPCIONADA	: -		
CANTIDAD	: 65 sobres filtrantes		
FECHA DE RECEPCIÓN	: 09 de mayo de 2023		
FECHA DE FABRICACIÓN	: -		
FECHA DE VENCIMIENTO	: -		
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS			
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO			
PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
Recuento de mohos	-	ICMSF	< 10 ² UFC/g
Recuento de enterobacteriáceas	-	ICMSF	21 UFC/g

Lima, 01 de junio de 2023


Q.F. Paul Ivan Gutiérrez-Pescano
Director del Centro de Control Analítico





"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Av. Pisco N° 1007, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú. Telfs.: (511) 328-4737 / 328-4739. Fax: (511) 619-7000 Anexo 4819. Ap. Postal 4559 - Lima 1.

Anexo 9. Elaboración de filtrante.

Figura 26

Elaboración de filtrante a base de hojas de guanábana y achiote.



Nota. A) y B) Recolección de materia prima; C) lavado de hojas; D) desinfección; E) Oreado; F) Secado; G) Molienda; H) e I) Formulación; J) Sellado; y K) Filtrantes.

Anexo 10. Formato de evaluación sensorial.

TEST DE EVALUACIÓN SENSORIAL DEL FILTRANTE

Nombre: Fecha:

Por favor observe y pruebe el filtrante elaborado a base de hojas de guanábana y achiote.

En la siguiente tabla, se muestra la valoración para cada puntaje, para su evaluación.

Puntaje	Valoración
1	Me disgusta
2	Ni me gusta ni me disgusta
3	Me gusta
4	Me gusta mucho

A continuación, colocar un aspa “X” dentro del casillero en blanco de acuerdo al grado de su aceptabilidad de la evaluación del atributo sensorial (color, olor y sabor) del filtrante.

Atributo sensorial	Calificación			
	1	2	3	4
Color				
Olor				
Sabor				

Muchas gracias

Anexo 11. Decocción de filtrantes

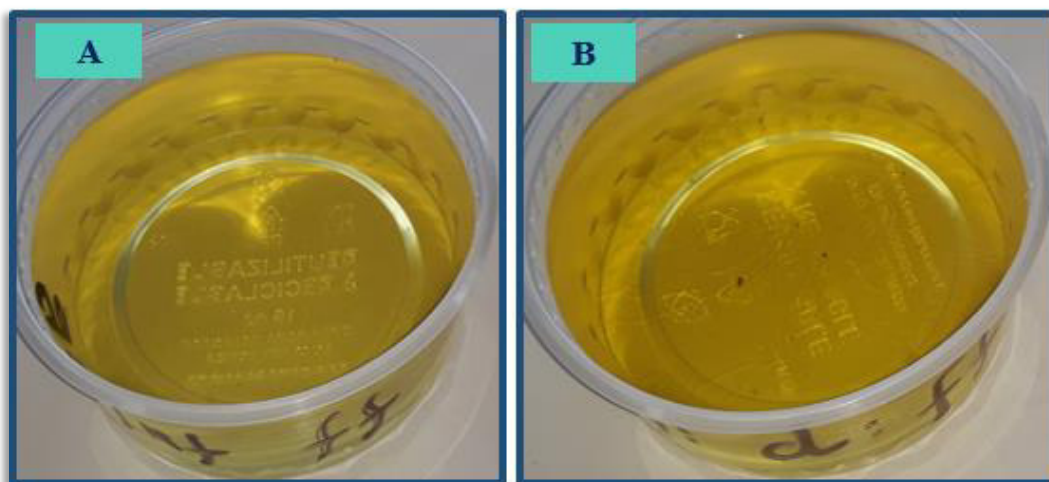


Nota. A) y B) Preparación de decocción del filtrante; C) Enfriado; D) Congelado; E) y F) Liofilizado; G) Almacenado

Anexo 12. Decocción e infusión de hojas de guanábana y achiote

Figura 27

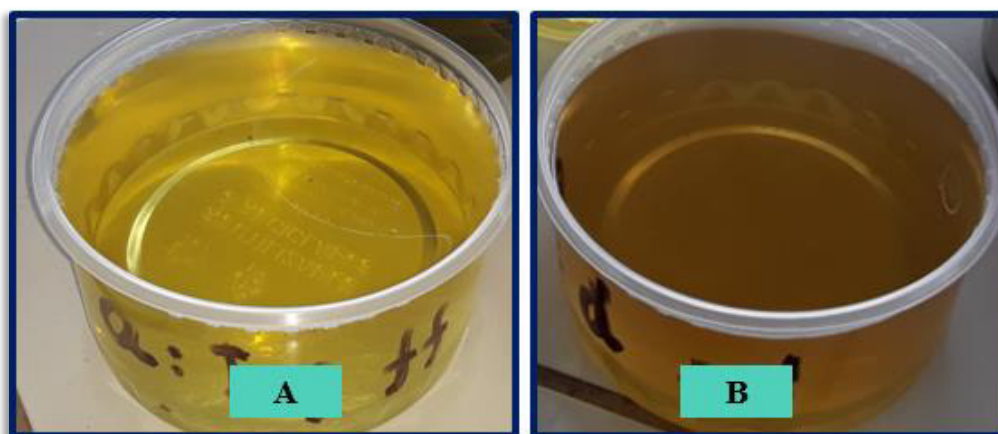
Infusión y decocción de hojas de guanábana



Nota. A) Infusión y B) Decocción.

Figura 28

Infusión y decocción de hojas de achiote



Nota. A) Infusión y B) Decocción.