

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



TESIS

Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución en tándem, MS/MS, de cinco especies del género *Mutisia*

PRESENTADA POR LA BACHILLER:

Dina Pillco Paulo

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO

ASESOR: Dr. Carlos Alberto Serrano Flores

COASESOR: Dr. Gari Vidal Ccana Ccapatinta

Financiado por el Programa de
Fortalecimiento Yachayninchis
Wiñarinampaq

Cusco - Perú

2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, asesor del trabajo de investigación/tesis titulado: **“Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución en tándem, MS/MS, de cinco especies del género *Mutisia*”**

Presentado por: **DINA PILLCO PAULO** con Nro. de DNI: **71641921**, para optar el título profesional/grado académico de **QUÍMICO** Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por **1** veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de **7 %**

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera hoja del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 10 de febrero de 2023



Firma

Post firma.....CARLOS A. SERRANO F.

Nro. de DNI23833584.....

ORCID del Asesor 0000-0003-0462-709X

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: <https://unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:199878561?locale=es>

NOMBRE DEL TRABAJO

TESIS 230123.pdf

AUTOR

Dina Pillco

RECUENTO DE PALABRAS

20721 Words

RECUENTO DE CARACTERES

118812 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

137 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

4.9MB

FECHA DE ENTREGA

Jan 23, 2023 3:13 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jan 23, 2023 3:15 AM GMT-5**● 7% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

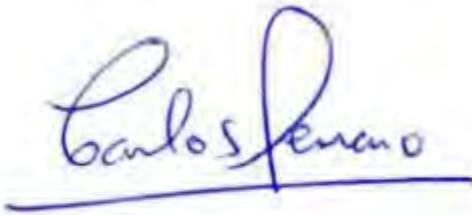
- 7% Base de datos de Internet
- 0% Base de datos de publicaciones

● Excluir del Reporte de Similitud

- Base de datos de Crossref
- Base de datos de trabajos entregados
- Material citado
- Fuentes excluidas manualmente
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)

Testimonio:

Doy fe que Carlos A. Serrano F. , asesor de la tesis , ha efectuado procedimiento turnitin, mediante correo institucional UNSAAC:

A handwritten signature in blue ink that reads "Carlos Serrano". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

PRESENTACIÓN

Señor decano de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Señores miembros del jurado

En cumplimiento con lo exigido por el reglamento de Grados y Tesis de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, pongo en vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

“Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución en tándem, MS/MS, de cinco especies del género *Mutisia*”

El presente trabajo tiene por objetivo determinar el perfil de componentes fenólicos presentes en las cinco especies de género *Mutisia*.

Bach. DINA PILLCO PAULO

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a Dios primeramente quien ilumina y guía mi camino.

Con todo el cariño a mi querida madre Paulina Paulo Chávez, mis hermanas, cuñados y sobrinos, quienes me apoyaron incondicionalmente, alentaron y aconsejaron en este camino estudiantil sin ellos hubiera sido imposible llegar hasta el final de este largo andar. A mi querido enamorado por brindarme su apoyo en todo tiempo.

Al doctor Carlos Alberto Serrano Flores, por su apoyo y atención, que siempre me estaba orientando y motivando, ante cualquier dificultad en todo el proceso de la tesis.

Al ingeniero Mario Cumpa Cayuri, que en vida siempre me recordaba, que nunca desmayara en el logro de mis objetivos.

A la memoria de mi padre Santiago Pillco Ramos, por ayudarme a dar mis primeros pasos en la educación y por ese amor que siempre tuviste para tus hijas, que desde el cielo estás viéndome y por eso te dedico este éxito.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceras muestras de AGRADECIMIENTO a todas las personas que me brindaron su apoyo con el desarrollo de esta tesis, deseo agradecer especialmente:

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, que gracias al fondo canon mediante el programa YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ, nos brindaron el apoyo para el desarrollo del proyecto de investigación titulado “Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem de especies nativas del Cusco del Género *Mutisia* (*Mutisieae*, *Mutisioideae*, *Asteraceae*)” y la presente tesis.



A los docentes de la Escuela Profesional de Química de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, por haberme acogido y brindado los conocimientos necesarios durante el periodo de mi formación profesional.

A mis asesores de tesis Doctor Carlos Alberto Serrano Flores y Doctor Gary Vidal Ccana Ccapatinta, de forma especial por su tiempo, capacidad y conocimiento al orientarme durante el desarrollo de la presente tesis, así también por haber tenido paciencia para guiarme en el logro de los objetivos trazados.

A la comisión dictaminadora integrada por la Mgt. Yolanda Callo Choquevilca y Dra. Celina Luizar Obregón, por sus valiosas y oportunas sugerencias que permitió mejorar el contenido y presentación de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

PRESENTACIÓN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XVII
ABREVIACIONES.....	XIX
RESUMEN	XX
ABSTRACT.....	XXI
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	2
FORMULACIÓN DE PROBLEMA.....	3
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
JUSTIFICACIÓN.....	4
HIPÓTESIS.....	5
VARIABLES	5
VARIABLES DEPENDIENTES	5
VARIABLES INDEPENDIENTES	5

CAPITULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1	Antecedentes.....	6
1.2	Bases Teóricas.....	9
1.2.1	Plantas de Género <i>Mutisia</i>	9
1.2.1.1	Distribución geográfica del género <i>Mutisia</i>	9
1.2.1.2	Relaciones Generales y Evolución del Género <i>Mutisia</i>	10
1.2.1.3	Clasificación Botánica de las Cinco Especies de Género <i>Mutisia</i>	11
1.2.1.4	<i>Mutisia acuminata</i> var. <i>Hirsuta</i> Meyen.....	12
1.2.1.4.1	Distribución de la Especie.....	12
1.2.1.5	<i>Mutisia cochabambensis</i> Hieron	12
1.2.1.5.1	Distribución de la Especie.....	12
1.2.1.6	<i>Mutisia lanata</i> Ruiz López & Pavón.....	13
1.2.1.6.1	Distribución de la especie.....	13
1.2.1.7	<i>Mutisia orbignyana</i> Wedd., Chlor.....	13
1.2.1.7.1	Distribución de la Especie.....	13
1.2.1.8	<i>Mutisia venusta</i> S. F. Blake.....	14
1.2.1.8.1	Distribución de la Especie.....	14
1.2.2	LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	15
1.2.2.1	FLAVONOIDES	16
1.2.2.2	ÁCIDOS HIDROXICINNÁMICOS.....	16
1.2.2.3	CUMARINAS	16
1.2.2.4	CUMESTANOS.....	17

1.2.3	LA PROPIEDAD ANTIOXIDANTE.....	17
1.2.4	RADICALES LIBRES	18
1.2.5	TÉCNICAS INSTRUMENTALES	20
1.2.5.1	ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE	20
1.2.5.2	CROMATOGRAFÍA EN EL PLANO.....	20
1.2.5.3	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDOS (LC).....	21
1.2.5.3.1	FASE MÓVIL	22
1.2.5.3.2	FASE ESTACIONARIA.....	22
1.2.5.4	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	22

CAPITULO II

2 METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1	Tipo de Estudio.....	24
2.2	Materiales, Equipos y Reactivos	24
2.2.1	Materiales.....	24
2.2.2	Equipos.....	25
2.2.3	Estándares y Reactivos.....	25
2.3	Diseño Experimental	26
2.4	Recolección de Muestras y Ubicación Geográfica.....	28
2.4.1	Obtención de Extractos Etanólicos y Acetato de Etilo	29
2.4.2	Obtención del Extracto Seco y su Porcentaje	29
2.5	Procedimiento Experimental y Método.....	30
2.5.1	Análisis Cuantitativo Preliminar de los Extractos Etanólicos	30
2.5.1.1	Determinación de Fenoles Totales: Método de Folin-Ciocalteu	30

2.5.1.1.1	Elaboración de la Curva de Calibración con Ácido Gálico para Determinación de Fenoles Totales.....	31
2.5.1.1.2	Determinación de Fenoles Totales en los Extractos Etanólicos de las Cinco Especies.....	31
2.5.1.2	Determinación de Flavonoides Totales: Métodos del Cloruro de Aluminio...	33
2.5.1.2.1	Elaboración de la Curva de Calibración para la Determinación de Flavonoides Totales	34
2.5.1.2.2	Determinación de Flavonoides Totales en los Extractos Etanólicos de las Cinco Especies.....	34
2.5.1.3	Determinación de Ácidos Hidroxicinnámicos Totales: Método de Arnow	36
2.5.1.3.1	Elaboración de la Curva de Calibración con Ácido Cafeico para la Determinación de Ácidos Hidroxicinnámicos Totales	37
2.5.1.3.2	Determinación de Ácidos Hidroxicinnámicos en los Extractos Etanólicos de las Cinco Especies.....	38
2.5.2	Análisis de Capacidad Antioxidante.....	39
2.5.2.1	Determinación de Capacidad Antioxidante: Método de Azul de Molibdeno .	39
2.5.2.1.1	Elaboración de la Curva de Calibración para la Determinación de Capacidad Antioxidante.....	40
2.5.2.1.2	Determinación de Capacidad Antioxidante en los Etanólicos de las Cinco Especies.....	41
2.5.3	Cromatografía en Capa Fina de los Extractos Etanólicos al 96%, 70% y 50%.....	42
2.5.4	Cromatografía UHPLC-DAD Cualitativo de los Extractos Etanólicos al 70%.....	43
2.5.5	Cromatografía UHPLC-MS/MS de los Extractos Etanólicos al 70%.....	44

2.5.6	Metodología para la Purificación de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios ..	46
2.5.6.1	Metodología para la Identificación y Cuantificación de Compuesto A en las Cinco Especies de <i>Mutisia</i>	47
2.5.6.2	Metodología para la Identificación y Cuantificación del Compuesto B en las Cinco Especies de <i>Mutisia</i>	48

CAPITULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1	Porcentaje de Extracto Seco en las Cinco Especies de Género <i>Mutisia</i>	49
3.2	Análisis Cuantitativo Preliminar	50
3.3	Análisis de Capacidad Antioxidante	51
3.4	Perfil Cromatográfico en Capa Fina de Sustancias Fenólicas.....	54
3.5	Perfil de Sustancias Fenólicas por Cromatografía Líquida con Detección UV (UHPLC- DAD).....	55
3.6	Perfil de Sustancias Fenólicas por Cromatografía Líquida Asociada a Espectrometría de Masas (UHPLC-MS/MS).....	59
3.6.1	Principales Constituyentes de Acuerdo con los Espectros de UHPLC-MS/MS....	60
3.7	Purificación de Metabolitos Secundarios Mayoritarios	63
3.7.1	¹ HRMN del Compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano).....	65
3.7.2	¹³ CRMN del Compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano).....	66
3.7.3	Cromatograma de UHPLC y Espectro UV de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano	69
3.7.4	Cromatograma y Espectro de Masas (UHPLC-MS/MS) de 11,12- dihidroxi-5- metilcumestano en las cinco especies.....	70
3.7.5	¹ HRMN del Compuesto B (5-metilcumarina-4-glucósido)	72

3.7.6	¹³ CRMN del Compuesto B (5-metilcumarina-4-glucósido)	73
3.7.7	Cromatograma UHPLC-DAD y espectro de 5-metilcumarina-4-glucósido	76
3.7.8	Cromatograma y Espectro de Masas (UHPLC-MS/MS) de 5-metilcumarina-4-glucósido en las cinco especies	77
3.8	Cuantificación del 11, 12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido en las cinco especies de <i>Mutisia</i>	78
3.8.1	Curva de Estandarización de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano.....	78
3.8.2	Curva de Estandarización de 5-metilcumarina-4-glucósido	79
3.9	Variación de Concentración de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido en tres Épocas distintas de <i>Mutisia acuminata</i> de Pomacanchi.....	82
CONCLUSIONES		83
RECOMENDACIONES		85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		86
ANEXOS.....		93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Los principales componentes encontrados en la subfamilia <i>Mutisioideae</i> (<i>Asteraceae</i>)	2
Figura 2 Distribución geográfica de género <i>Mutisia</i>	10
Figura 3 Esquema de secciones evolutivas.....	11
Figura 4 <i>Mutisia acuminata</i> (R. y P.) (var. <i>Hirsuta</i>).....	12
Figura 5 <i>Mutisia cochabambensis</i> Hieron	13
Figura 6 <i>Mutisia lanata</i> (R. y P.).....	13
Figura 7 <i>Mutisia orbignyana</i> Wedd.....	14
Figura 8 <i>Mutisia venusta</i> S. F. Blake.....	14
Figura 9 Estructuras de compuestos fenólicos.....	15
Figura 10 Reacción de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (radical libre) con fenol (antioxidante) y su estabilidad	19
Figura 11 Espectrofotometría UV-visible	20
Figura 12 Cromatografía de capa fina y la separación de componentes	21
Figura 13 Componentes principales de un cromatógrafo de alta resolución HPLC.....	22
Figura 14 Componentes generales de un espectrómetro de masas.....	23
Figura 15 Procedimiento experimental realizado.....	27
Figura 16 Recolección de las especies <i>Mutisia acuminata</i> y <i>Mutisia cochabambensis</i>	28
Figura 17 Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu	30
Figura 18 Curva de calibración de fenoles totales utilizando el estándar de ácido gálico.	32

Figura 19 Reacción entre el flavonol quercetina y cloruro de aluminio.....	33
Figura 20 Curva de calibración de flavonoides totales utilizando el estándar de quercetina.	35
Figura 21 Reacción de ácido cafeico con el reactivo de Arnow.....	36
Figura 22 Curva de calibración de ácidos hidroxicinnámicos totales utilizando el estándar de ácido cafeico	39
Figura 23 Reacción de determinación de antioxidante por el método de azul de molibdeno	40
Figura 24 Curva de calibración de capacidad antioxidante utilizando el estándar ácido ascórbico	42
Figura 25 Diagrama de resultados de análisis cuantitativo preliminar de fenoles, flavonoides, ácidos hidroxicinnámicos totales y capacidad antioxidante	53
Figura 26 Cromatograma de agliconas libres de los extractos etanólicos de las cinco especies	54
Figura 27 Cromatograma de glicósidos de los extractos etanólicos de las cinco especies.....	54
Figura 28 Cromatograma por UHPLC-DAD del extracto etanólico al 70% de <i>Mutisia acuminata</i>	56
Figura 29 Espectro UV de ácido 5-cafeoilquínico en extracto etanólico de <i>Mutisia acuminata</i> ..	57
Figura 30 Espectro UV de quercetina en extracto etanólico de <i>Mutisia acuminata</i>	58
Figura 31 Perfil de sustancias fenólicas por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) ESI-.....	59
Figura 32 Cromatograma de purificación de metabolitos mayoritarios revelado en lámpara UV a 366nm	63
Figura 33 Cristales de las fracciones de B,C y D (compuesto A)	64
Figura 34 Cristales de la fracción E (compuesto B).....	64

Figura 35 Espectro de ¹ HRMN del compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano)	65
Figura 36 Espectro ¹³ CRMN del compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano).....	66
Figura 37 Estructura química del compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano)	67
Figura 38 Cromatograma de UHPLC de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y espectro UV	69
Figura 39 Cromatograma de UHPLC-MS/MS de 11,12- dihidroxi-5-metilcumestano	70
Figura 40 Planteamiento de fragmentación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano	71
Figura 41 ¹ HRMN del compuesto B (5-metilcumarina-4-glucósido)	72
Figura 42 ¹³ CRMN del compuesto B (5-metilcumarina-4-glucósido)	73
Figura 43 Estructura química tentativo del compuesto B (5-metilcumarina -4-glucósido)	74
Figura 44 Cromatograma de UHPLC de 5-metilcumarina-4-glucósido y espectro UV.....	76
Figura 45 Cromatograma de UHPLC-MS/MS de 5-metilcumarina-4-glucósido.....	77
Figura 46 Curva de calibración para la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano	79
Figura 47 Curva de calibración para la cuantificación de 5-metilcumarina-4-glucósido.....	80
Figura 48 Variación del contenido de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4- glucósido de Mutisia acuminata de Pomacanchi con el tiempo	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Radicales Libres del oxígeno	18
Tabla 2 Elaboración de curva de calibración para la determinación de fenoles totales.....	31
Tabla 3 Determinación de fenoles totales en los extractos etanólicos.	31
Tabla 4 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con ácido gálico para fenoles totales.	32
Tabla 5 Elaboración de la curva de calibración con quercetina para la determinación de flavonoides totales	34
Tabla 6 Determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos de las cinco especies....	35
Tabla 7 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con quercetina para flavonoides totales	35
Tabla 8 Elaboración de la curva de calibración con ácido cafeico para la determinación de ácidos hidroxicinámicos.....	37
Tabla 9 Determinación de ácidos hidroxycinnámicos en los extractos etanólicos de las cinco especies.	38
Tabla 10 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con ácido cafeico para ácidos hidroxycinnámicos totales.	38
Tabla 11 Elaboración de la curva de calibración con ácido ascórbico para la determinación de antioxidante.....	40
Tabla 12 Determinación de capacidad antioxidante en los extractos etanólicos de las cinco especies	41

Tabla 13 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con ácido ascórbico para capacidad antioxidante.....	41
Tabla 14 Estándares utilizados en el análisis cualitativo de sustancias fenólicas en los cinco extractos etanólicos.....	43
Tabla 15 Gradiente de fase móvil para el análisis cualitativo de sustancias fenólicas en los extractos etanólicos.....	44
Tabla 16 Gradiente de fase para el análisis de sustancias fenólicas por cromatografía de UHPLC-MS/MS.....	45
Tabla 17 Gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo para la purificación de fracción de acetato de etilo.....	46
Tabla 18 Gradiente de fase móvil para la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano	47
Tabla 19 Gradiente de fase móvil para la cuantificación de 5-metilcumarina-4-glucósido	48
Tabla 20 Porcentaje de extracto etanólico seco de las cinco especies.....	49
Tabla 21 Resultados del análisis cuantitativo preliminar de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales	50
Tabla 22 Resultado de capacidad antioxidante en los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50%....	51
Tabla 23 Perfil de Sustancias Fenólicas por Cromatografía Líquida con Detección de UV (UHPLC-DAD) de los Extractos Etanólicos al 70 %.....	56
Tabla 24 Principales constituyentes identificados de las cinco especies de <i>Mutisia</i>	60
Tabla 25 Señales de RMN de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano.....	68
Tabla 26 Señales de RMN experimentales de 5-metilcumarina-4-glucósido.....	75

Tabla 27 Curva de estandarización para la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano..	78
Tabla 28 Curva de calibración de para la cuantificación de 5-metilcumarina-4-glucósido	79
Tabla 29 Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y de 5-metilcumarina-4-glucósido ...	80
Tabla 30 Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido en otras muestras de las mismas especies en estudio	81
Tabla 31 Variación de contenido de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido de <i>Mutisia acuminata</i> de Pomacanchi.....	82

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Certificado de la clasificación botánica de las cinco especies de género <i>Mutisia</i> . Cusco, 2022.....	93
Anexo 2 Recolección de muestras y secado	94
Anexo 3 Fotografía de molienda y la obtención de extractos etanólicos de las cinco especies	94
Anexo 4 Análisis cuantitativo preliminar de fenoles totales	95
Anexo 5 Análisis cuantitativo preliminar de ácidos hidroxicinnámicos en los extractos etanólicos.	95
Anexo 6 Análisis cuantitativo preliminar de ácidos hidroxicinnámicos totales de los extractos etanólicos.	95
Anexo 7 Resultados de obtención de porcentaje de extracto seco de los cinco especies	96
Anexo 8 Datos y resultado obtenidos del análisis de fenoles totales.	97
Anexo 9 Datos y resultado obtenidos del análisis de flavonoides totales	97
Anexo 10 Datos y resultados obtenidos del análisis de ácidos hidroxicinnámicos totales.	98
Anexo 11 Datos y resultados obtenidos del análisis de capacidad antioxidante.	98
Anexo 12 Materiales utilizados en el análisis de sustancias fenólicas de cromatografía de cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50 %.....	99
Anexo 13 Fotografías de Cromatogramas obtenidas por cromatografía de capa fina.....	99
Anexo 14 Cromatograma de análisis UHPLC-DAD en extracto etanólicos de <i>Mutisia acuminata</i>	100
Anexo 15 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de <i>Mutisia cochabambensis</i>	102

Anexo 16 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de <i>Mutisia lanata</i>	102
Anexo 17 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de <i>Mutisia venusta</i>	103
Anexo 18 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de <i>Mutisia orbignyana</i>	103
Anexo 19 Los cinco Cromatogramas y espectros de masa UHPLC-MS/MS.	104
Anexo 20 Cromatogramas y los espectros UV de la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5- metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido.....	114

ABREVIACIONES

Ma: *Mutisia acuminata*

Mc: *Mutisia cochabambensis*

Ml: *Mutisia lanata*

Mo: *Mutisia orbignyana*

Mv: *Mutisia venusta*

UV: Ultravioleta

DPN: Diccionario de productos naturales

QU: Quercetina

AG: Ácido gálico

AC: Ácido cafeico

AA: Ácido ascórbico

kV: kilo voltios

mAU: Mili unidades de absorbancia

DHMC: 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano

MCG: 5-metilcumarina-4-glucósido

DAD: Detector de arreglo de diodos.

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue determinar la naturaleza de los componentes fenólicos en cinco especies del género *Mutisia*: *Mutisia acuminata* var. *Hirsuta* Meyen, *Mutisia cochabambensis* Hieron., *Mutisia lanata* Ruiz López & Pavón, *Mutisia orbignyana* Wedd. y *Mutisia venusta* S.F. Blake. Para tal fin se realizó el análisis cuantitativo preliminar de: Fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinnámicos totales y la capacidad antioxidante total, análisis cromatográfico por capa fina, también se realizó la identificación de sustancias fenólicas por cromatografía líquida con detección UV (UHPLC-DAD) y cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) en los extractos etanólicos de las especies mencionadas, lográndose aislar el 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido los mismos que fueron cuantificados en las cinco especies. Este trabajo de investigación, en el que se obtiene el perfil de componentes fenólicos en las cinco especies de género *Mutisia*, ayudará a las siguientes investigaciones, así como también a la comprensión quimiofenética y metabolómica del género, además contribuirá para validar su empleo en medicina tradicional y en la preparación de fitomedicamentos.

Palabras clave: *Mutisia*, Sustancias fenólicas, flavonoides, cumarinas, Cromatografía, Espectrometría de masas.

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the nature of the phenolic components in five species of the genus *Mutisia*: *Mutisia acuminata* var. *Hirsuta* Meyen, *Mutisia cochabambensis* Hieron, *Mutisia lanata* Ruiz López & Pavón, *Mutisia orbignyana* Wedd. and *Mutisia venusta* S.F. Blake. For this purpose, preliminary quantitative analysis of total phenols, total flavonoids, total hydroxycinnamic acids and total antioxidant capacity, as well chromatographic analysis by thin layer, the identification of phenolic substances by liquid chromatography with UV detection (UHPLC-DAD) and liquid chromatography associated with mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) in the ethanolic extracts of the species mentioned was also carried out. The 11,12-dihydroxy-5-methylcoumarin and 5-methylcoumarin-4-glucoside were isolated in *M. orbignyana* and quantified in the five species of *Mutisia*. This research work, in which the profile of phenolic compounds in the five species of the genus *Mutisia* is obtained, will help further research, as well as the chemophenetic and metabolomic understanding of the genus, and will also contribute to validate their uses in traditional medicine and in the preparation of phytomedicines.

Keywords: *Mutisia*, Phenolic substances, flavonoids, coumarins, Chromatography, Mass spectrometry.

INTRODUCCIÓN

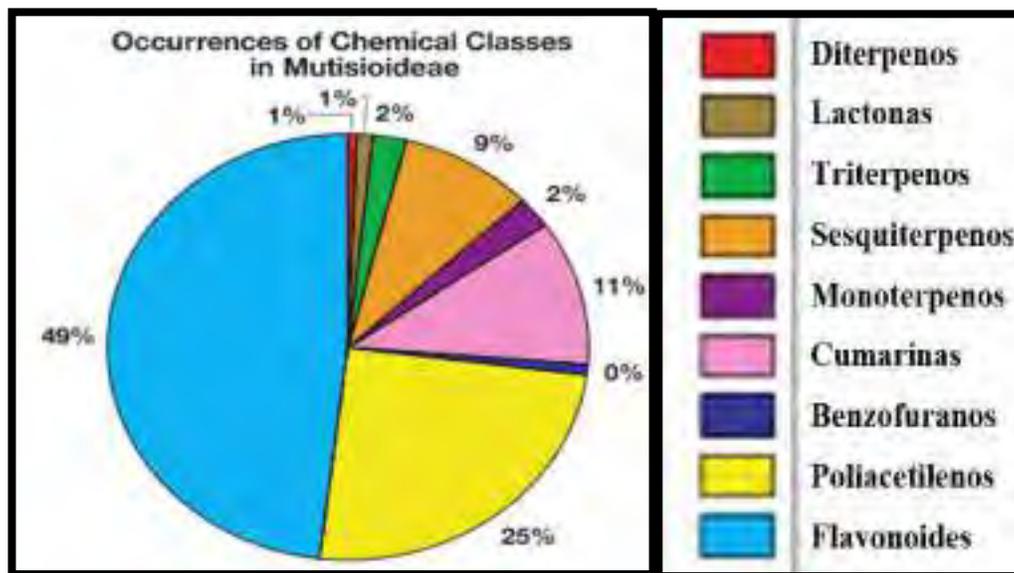
El género botánico *Mutisia* pertenece a la familia *Asteraceae*, subfamilia *Mutisioideae*, tribu *Mutisieae*, sub-tribu *Mutisiinae*. Actualmente este género contiene más de 60 especies, en su mayoría arbustos o lianas, distribuidas principalmente en los Andes de Chile, Argentina, Perú y Bolivia, pero también en la región sur del Brasil y en áreas aledañas de Uruguay y Paraguay. En el Perú están registradas 15 especies de este género, y para el Cusco se han reportado cuatro especies: *Mutisia acuminata* var. *Hirsuta* Meyen (Cabrera, 1965), *Mutisia cochabambensis* Hieron, *Mutisia lanata* Ruiz López & Pavón y *Mutisia venusta* S.F. Blake (Ferreyra & Macbride, 1995). De estas especies se destaca la *Mutisia acuminata*, comúnmente conocida en la región como “*chinchirkuma*, *chinchilkuma*”, la infusión y decocción de sus hojas y flores es ampliamente utilizadas para tratar síntomas de enfermedades respiratorias (tos, catarros, resfríos), lavado de heridas, afecciones renales, etc., en la medicina tradicional de los pobladores de la región Cusco (Daily *et al.*, 1988; Roersch, 1994). La *Mutisia cochabambensis*, conocida tradicionalmente como “*wayurkuma*”, también forma parte de la farmacopea tradicional andina por sus propiedades analgésicas. La infusión de las hojas y flores de esta especie es usada para lavar la cabeza a fin de aliviar sus dolores (Roersch, 1994). A pesar de su importancia en la medicina tradicional de la región y su potencial económico intrínseco, se conoce muy poco sobre los constituyentes fitoquímicos presentes en estas especies medicinales y en otras de la región Cusco. Estudios etnofarmacológicos como el de Roersch en 1992 han demostrado la importancia de estas especies y sugieren que nuevas investigaciones deban realizarse con énfasis en estudios fitoquímicos y farmacológicos (Roersch, 1994). Por otro lado, es posible encontrar en la literatura estudios sobre la composición química de especies chilenas.(Zdero *et al.*, 1988; Viturro *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta que las propiedades farmacológicas de las plantas medicinales están relacionadas con su

composición química, en esta tesis se planteó estudiar la composición fitoquímica de cinco especies del género *Mutisia*, utilizando cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas y espectroscopia ultravioleta.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En la revisión de la bibliografía especializada se encuentran los estudios realizados solo de las especies *Mutisia acuminata*, *Mutisia cochabambensis* y *Mutisia orbignyana*, pero no se tiene reportes de investigaciones sobre la composición química de *Mutisia lanata* ni *Mutisia venusta*, procedentes del Perú, razón por la cual se plantea el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Figura 1 *Los principales componentes encontrados en la subfamilia Mutisioideae (Asteraceae)*



NOTA. Los principales componentes encontrados en la subfamilia *Mutisioideae* según

(Funk *et al.*, 2009).

Según la OMS hasta 80% de la población sigue utilizando la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones de medicar. En los países ricos, muchas

personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que lo natural es sinónimo de inocuo. Pero en la actualidad cuanto más aumenta el uso de las medicinas tradicionales o alternativas, también aumenta el número de informes sobre reacciones adversas (OMS, 2004).

Para la comunidad científica es muy importante determinar el análisis fitoquímico cuantitativo preliminar, capacidad antioxidante y el perfil de componentes de fenólicos de las plantas de género *Mutisia*, y demostrar que son de gran importancia para utilizarlas en la medicina convencional, y de un conocimiento tradicional empírico sean valoradas como plantas medicinales con actividad terapéutica de gran importancia. Se sabe por ejemplo que *M. acuminata* se utiliza para el tratamiento de enfermedades del riñón y del hígado y *M. cochabambensis* es particularmente indicada para el tratamiento del dolor de cabeza (Daily *et al.*, 1988; Roersch, 1994).

FORMULACIÓN DE PROBLEMA

El problema se basa en la necesidad de contar con datos científicos, registros cualitativos y cuantitativos de los componentes fenólicos de las cinco especies de género *Mutisia*. Para que dichas informaciones ayuden a la correcta interpretación. ¿Cuál es la composición fenólica de las cinco especies de género *Mutisia*?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinación del perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución en tándem, MS/MS, de cinco especies del género *Mutisia*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar el análisis cuantitativo preliminar de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinnámicos totales en extractos etanólicos al 96%, 70% y 50% de las cinco especies de género *Mutisia* las cuales son: *M. acuminata* var. *Hirsuta* Meyen, *M. cochabambensis* Hieron, *M. lanata* Ruiz López & Pavón, *M. orbignyana* Wedd., Chlor. y *M. venusta* S. F. Blake.
2. Analizar la capacidad antioxidante en los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50%.
3. Definir el perfil de sustancias fenólicas por cromatografía en capa fina en los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50%.
4. Identificar sustancias fenólicas por cromatografía líquida con detección UV (UHPLC-DAD) en los extractos etanólicos al 70% y extractos de acetato de etilo.
5. Identificar componentes fenólicos por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) en extractos etanólicos al 70%.
6. Aislar y cuantificar metabolitos secundarios mayoritarios en las cinco especies de género *Mutisia*.

JUSTIFICACIÓN

Además, de entender la diversidad química de las especies medicinales del género *Mutisia*, (*Mutisia acuminata* y la *Mutisia cochabambensis*), se establecieron las bases químicas y se dieron

soporte científico y valor a los usos tradicionales de estas especies en la medicina tradicional de las poblaciones de la región Cusco. Por otro lado, es importante destacar que estas especies, en especial la *Mutisia acuminata*, crecen espontáneamente por lo que pueden ser aprovechadas en grandes cantidades en las diferentes provincias de la región Cusco. Esta especie soporta largos periodos sin lluvias, de 6 a 10 meses, y florece en el periodo seco entre mayo y agosto. Estas características agronómicas, y por sus propiedades terapéuticas, demuestran el potencial económico de esta especie. Es así que, el logro de los objetivos de la presente tesis sementará las bases científicas para el mejor aprovechamiento económico de esta especie y para la posible elaboración de fitomedicamentos a base de extractos acuosos y etanólicos químicamente estandarizados de *Mutisia acuminata*, *Mutisia cochabambensis* y porque no también a partir de *Mutisia orbignyana*.

HIPÓTESIS

Las cinco especies del género *Mutisia* presentan similar variedad de compuestos fenólicos.

VARIABLES

VARIABLES DEPENDIENTES

Perfil de componentes fenólicos presentes en las cinco especies de género *Mutisia*.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Los extractos etanólicos y acetato de etilo de las cinco especies del género *Mutisia* en estudio.

CAPITULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Condoli, (2019), CONTENIDO DE FENOLES TOTALES, FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ATOMIZADO DE LAS HOJAS DE *MUTISIA MATHEWSII* HOOK & ARN. “CHINCHILCUMA”, AYACUCHO - 2018. Se evaluó extracto de etanólico al 70% de *Mutisia mathewsii* las características organolépticas y fisicoquímicas, los metabolitos secundarios principales hallados fueron: Esteroides, flavonoides y taninos. Se cuantificaron fenoles y flavonoides mediante el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente; encontrándose 263,3 mg de fenoles totales equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto atomizado (EAG/g EA) y 171,3 mg de flavonoides totales equivalentes de rutina por gramo de extracto atomizado (ERu/g EA). También determino la actividad antioxidante hallando $228,8 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$; $246,3 \pm 4,19 \mu\text{g/mL}$ y $56,5 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ frente al radical DPPH, ABTS y FRAP.

Flores *et al.*, (2009), UN GLUCÓSIDO DE 5-METILCUMARINA Y UN DERIVADO DE CUMESTANO DE *MUTISIA ORBIGNYANA*. Realizaron el estudio en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Mutisia orbignyana* recolectadas del altiplano Bolivia, encontraron dos compuestos mayoritarios: (1) mutisifurocumarina y (2) 5-metilcumarina-4- β -glucósido y presentaron por primera vez la asignación completa de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto (2), así como algunas reasignaciones del espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto (1), aplicando técnicas de RMN 2D. Además, se midió el efecto antiproliferativo sobre las células de cáncer de colon (Caco-2) y el efecto de barrido mediante la prueba ABTS. Los

resultados mostraron una interesante actividad de barrido y un efecto no proliferativo sobre las células de cáncer de colon.

Vituro *et al.*, (2004), 5-METILCUMARANONAS DE MUTISIA FRIESIANA Y SU BIOACTIVIDAD. En el extracto metanólico de las partes aéreas del arbusto *Mutisia friesiana* Además de las mutisicumaranonas A (1) y B (2) conocidas, se produjo dos nuevos compuestos 5-metilcumaranonas, las mutisicumaranonas C (3) y D (4). Sus estructuras se dilucidaron mediante métodos espectroscópicos. Los datos de RMN ^{13}C de las mutisicumaranonas A y B se presentan por primera vez. Todos los compuestos mostraron actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno

Serrano, (2002), COMPONENTES DE MUTISIA COCHABAMBENSIS (HIERONYMUS). A partir del extracto acuoso de *Mutisia cochabambensis* (Hieronymus) obtuvo cuatro glicósidos de flavonol: Quercetin-3-O- β -D-galactósido, isorhamnetin-3-O- β -D-galactósido, quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosido y quercetin-3'-O- α -L-arabinofuranósido, también se determinó en el extracto acuoso y metanólico, utilizando cromatografía HPLC la presencia del ácido clorogénico.

Vituro *et al.*, (2001) FURANONAS DIASTEREOMÉRICAS ANTIFÚNGICAS DE MUTISIA FRIESIANA: DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS CONFORMACIONAL. Dos furanonas diastereoméricas, la (4S,5S)-5-(4-metil-3-pentenil)-4-hidroxi-5-metildihidrofurano-2-ona **1** y la (4S,5R)-5-(4-metil-3-pentenil)-4-hidroxi-5-metildihidrofurano-2-ona **2** se aislaron por primera vez a partir del arbusto *Mutisia friesiana*. La estereoquímica relativa de **1** y **2** se determinó a partir de datos de RMN NOESY y se confirmó mediante una combinación de modelos moleculares (mecánica molecular y cálculos de orbitales moleculares ab initio) y datos de RMN. La comparación entre los datos experimentales y ^1H - ^1H

calculadas reveló que ambas furanonas existen en un equilibrio de dos conformadores estables del anillo de cinco miembros. La aplicación del método de Mosher sugiere que ambas furanonas diastereoméricas tienen la misma configuración (S) en C-(4) y son epímeros en C-(5).

Daily *et al.*, (1988), NUEVOS DERIVADOS DE CROMONA, CUMARINA Y CUMESTANO DE *MUTISIA ACUMINATA* VAR. *HIRSUTA*. DE *MUTISIA ACUMINATA* (ASTERACEAE). Se aislaron tres compuestos conocidos, quercetina-3-glucurónido, L-inositol y arbutina, y tres nuevos compuestos fenólicos, 2-hidroxi-5-metil-cromona-2- β -D-glucopiranosido, 11,12-hidroxi-5-metilcumestano y 2',4':4,5-furocumarina. El compuesto 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano mostró actividad biológica en la prueba de leucocitos-5-lipoxigenasa y en el sistema de hepatocitos primarios cultivados.

Zdero *et al.*, (1988). OTROS DERIVADOS DE LA 5-METILCUMARINA DE *MUTISIA ORBIGNYANA*. De las partes aéreas de *Mutisia orbignyana* se extrajeron, tras separaciones muy prolongadas timol metil éter, arbutina isoramnetina, ramnazina y grandes cantidades de quercetina, 24 derivados de 4-hidroxi-5-metilcumarinas, los derivados 4-*O*-geranilo, **1**, **2**, **2a**, **4**, **4a**, **5**, **6** y **8**, los derivados nerílicos **3**, **3a** y **7**, los derivados con dobles enlaces reordenados 9% **16**, los compuestos de anillo de oxígeno **17-19**, el derivado **20** y la cumarina **21** tetracíclica. Algunos de estos fueron aislados tras la acetilación de los compuestos naturales, como **2a**, **4a**, **9a**, **10a**, **12a**, **15a** y **16a** son los acetatos correspondientes y **5a**, **8a**, **10a**, **11a** and **14a** los diacetatos, las estructuras se elucidaron mediante técnicas de RMN de alto campo y algunas transformaciones químicas.

Zdero *et al.*, (1986), OTRAS 5-METIL CUMARINAS Y OTROS CONSTITUYENTES DE LA *SUBTRIBU MUTISIINAE*. La investigación de cuatro especies de la subtribu. Mutisiinae proporcionó ocho nuevos monoterpenos, siete 5-metil cumarinas, dos 5-metil cromonas

estrechamente relacionadas, dos derivados del cumarina, un derivado de p-hidroxi acetofenona y un nuevo C₁₄-acetileno. Las estructuras se dilucidaron mediante métodos espectroscópicos y algunas transformaciones químicas.

1.2 Bases Teóricas

1.2.1 Plantas de Género *Mutisia*

Antiguamente estas plantas de género *Mutisia* se conocían con el nombre de “*chinchil*”, arbusto silvestre de tallo corto y hojas lanceoladas, cuya flor conocida como “*chinchil wayta*” es de color rojo pálido. Pero la ciencia botánica la ha registrado como *chinchilkuma* o *chinchirkuma*, especie *Mutisia Hirsuta*, género *Mutisia*, familia de las *Asteráceas*, indicando que es un arbusto de flores rojas o amarillas cuya infusión es una medicina efectiva para curar la anemia y corregir el funcionamiento de los riñones (Daily *et al.*, 1988; Roersch, 1994).

Las flores de estas plantas de género *Mutisia* eran utilizadas por los antiguos indígenas como adorno en la cabeza, de allí viene la denominación “*chinchircuma*”, que quiere decir “*lleva la flor chinchir en la cabeza*”, por la inclusión de “*uma*” (cabeza) a la estructura del término original; así lo daba entender Fray Diego González Holguín, quien en su Vocabulario de la lengua general de todo el Perú llamada lengua *Qquichua*, o del Inca (1608), registró la primera definición: “*Chinchircuma*. Una flor amarilla que es plumaje”.

1.2.1.1 Distribución geográfica del género *Mutisia*

El género *Mutisia* se encuentra distribuido principalmente en los Andes de Chile, Argentina, Perú, Bolivia, Colombia y Ecuador, pero también en la región sur del Brasil; en áreas aledañas de Uruguay y Paraguay (Cabrera, 1965). Las zonas con mayor diversidad de *Mutisias* están en el sur de Chile y en el sur de Ecuador (Moreira *et al.*, 2020).

Figura 2 Distribución geográfico de género Mutisia



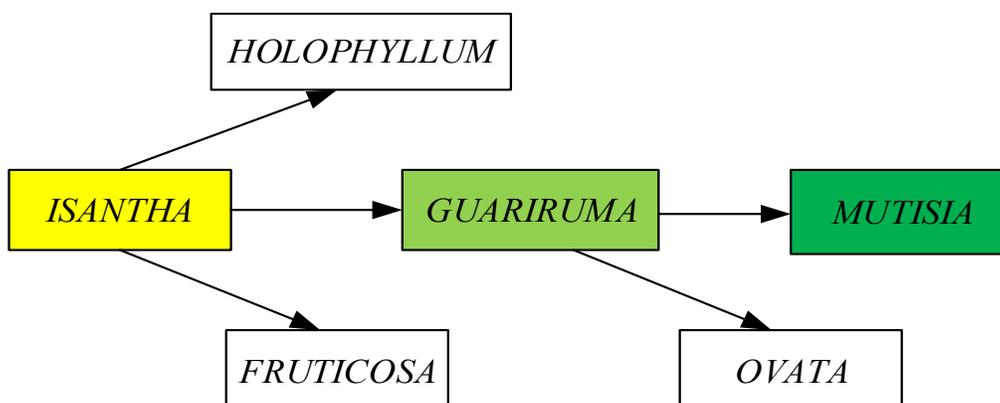
Nota. Distribución geográfica de género *Mutisia* (Cabrera, 1965)

1.2.1.2 Relaciones Generales y Evolución del Género *Mutisia*

Según (Cabrera, 1965), las especies más primitivas serían las de la sección *Isantha*. De estas derivarían otras secciones *Holophilum*, *Fruticosa* y *Guariruma*, y de la última las secciones *Ovata* y *Mutisia* que sería la más evolucionadas. El desarrollo evolutivo de las secciones se basa

fundamentalmente en detalles morfológicos; de hojas simples primitivas a hojas compuestas evolucionadas; desde arbustos hacia enredaderas, de capítulos pequeños a capítulos grandes, de hojas sin zarcillos a hojas con zarcillos; entre los más notables. La figura 3 describe la evolución de las secciones de *Mutisia* planteada:

Figura 3 Esquema de secciones evolutivas



Nota. Esquema de secciones evolutivas según (Cabrera, 1965)

De las cinco plantas en estudio, *M. orbignyana* pertenece a la sección más primitiva *Isantha*; mientras que, *M. cochabambensis* está en *Guariruma* – precisamente el nombre de esta sección deriva del vocablo quechua *Wayurkuma* que es el nombre de *M. cochabambensis* en Cusco. En cambio, *Mutisia acuminata*, *M. lanata* y *M. venusta* están en la sección más evolucionada, *Mutisia*.

1.2.1.3 Clasificación Botánica de las Cinco Especies de Género *Mutisia*

La clasificación botánica de las cinco especies, según el sistema de clasificación de: Cabrera, (1965); Ferreyra & Macbride, (1995); Katinas *et al.*, (2008); Mandel *et al.*, (2019); Katinas & Funk, (2020); Moreira *et al.*, (2020) es la siguiente:

Familia: *Asteraceae*.

Subfamilia: *Mutisioideae*.

Tribu: *Mutisieae*

Subtribus: *Adenocaulinae, Mutisiinae, Gerberinae*

Géneros: *Brachyclados, Chaetanthera, Lulia, Mutisia, Oriastrum, Pachylaena*

Las muestras colectadas se compararon con las imágenes descritas por (Cabrera, 1965; Ferreyra & Macbride, 1995).

1.2.1.4 *Mutisia acuminata* var. *Hirsuta* Meyen

1.2.1.4.1 Distribución de la Especie

Se encuentra en la sierra en los valles interandinos del centro y sur del Perú, entre 2000-3600 m.s.n.m.

Situación: Arbusto silvestre (Figura 4).

Figura 4 *Mutisia acuminata* (R. y P.) (var. *Hirsuta*)



1.2.1.5 *Mutisia cochabambensis* Hieron

1.2.1.5.1 Distribución de la Especie

Esta especie se encuentra distribuida en la cordillera andina, del sureste del Perú hasta el oeste y el centro de Bolivia (3200-3700 m.s.n.m).

Situación: *Mutisia cochabambensis* se asemeja mucho a *Mutisia mandoniana* Wedd. Pero difiere en que posee hojas brevemente pecioladas y estrictamente glabras (Figura 5).

Figura 5 *Mutisia cochabambensis* Hieron



1.2.1.6 *Mutisia lanata* Ruiz López & Pavón

1.2.1.6.1 Distribución de la especie

Conocida desde el centro de Perú hasta Bolivia (1800-3400 m.s.n.m.).

Situación: *Mutisia lanata* se distingue fácilmente por su hábito tomentoso, sus flores rojas del rayo y sus flores bajas del disco de color amarillo. (Figura 6).

Figura 6 *Mutisia lanata* (R. y P.).



1.2.1.7 *Mutisia orbignyana* Wedd., Chlor

1.2.1.7.1 Distribución de la Especie

Conocida desde el sur de Perú hasta Bolivia y el norte de Argentina (3400-4000 m.s.n.m.).

Situación: Arbustos erectos (Figura 7).

Figura 7 *Mutisia orbignyana* Wedd.



1.2.1.8 *Mutisia venusta* S. F. Blake

1.2.1.8.1 Distribución de la Especie

Conocida en la Cordillera andina del sur del Perú (3400-4000 m.s.n.m.).

Situación: *Mutisia venusta* se parece más a *Mutisia acuminata*, de la que se diferencia por tener involucres más largos (Figura 8).

Figura 8 *Mutisia venusta* S. F. Blake

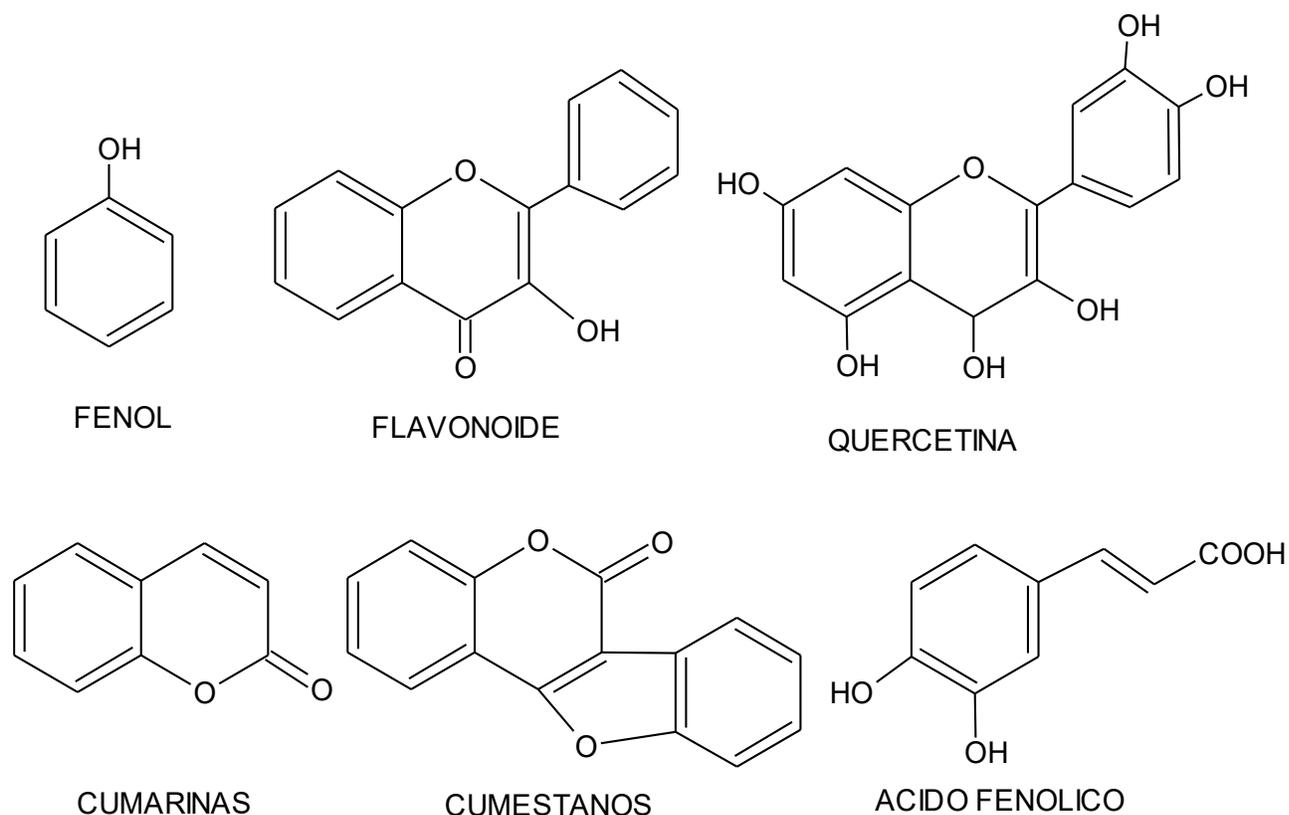


1.2.2 LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Ellos son productos del metabolismo secundario de las plantas, que son determinantes en la calidad sensorial y nutrición de las frutas, verduras y otras plantas. Muchas de las actividades biológicas de los compuestos fenólicos se atribuyen a su capacidad antioxidante.

Los compuestos fenólicos muestran un anillo aromático que tiene uno o más grupos hidroxilos y su estructura puede variar desde una molécula fenólica simple a la de un complejo de alto peso molecular, como un polímero de masa, tales como los taninos condensados (Amaya & Portillo, 2013).

Figura 9 Estructuras de compuestos fenólicos



1.2.2.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos fenólicos que están presentes en vegetales, frutas como pigmentos naturales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos con excelentes propiedades antioxidantes (Martínez *et al.*, 2002).

1.2.2.2 ÁCIDOS HIDROXICINNÁMICOS

Son compuestos aromáticos con una cadena lateral de tres carbonos (C6-C3), como el: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, y los ácidos sinápicos, que pertenecen a los ácidos fenólicos, pueden estar presentes en las plantas en formas libres y ligadas. Los ácidos fenólicos se pueden clasificar en dos subgrupos en ácidos hidroxibenzoicos y hidroxicinnámicos (Amaya & Portillo, 2013).

1.2.2.3 CUMARINAS

Las cumarinas son una familia de compuestos cuya estructura básica corresponde a la lactona heterocíclica 2H-1-benzopirán-2-ona (Pérez Cruz, 2016). Estructuralmente, el anillo de cumarina consiste en un grupo fenilo fusionado con un anillo de pirona, con el grupo carbonilo (C=O) en la posición C-2 y un doble enlace C=C, en la posición C-3. Los derivados del anillo de cumarina han despertado un gran interés en diversos campos de la investigación dado a sus múltiples aplicaciones. En el ámbito de la medicina forma parte de diversos compuestos anticancerígenos, antioxidantes, antifúngicos, anticoagulantes, antiinflamatorios, antivirales, y antibacteriales (Tato, 2020).

Las 5-metilcumarinas también se encuentran en las tribus *Mutisieae*, *Onoserideae* y *Nassauvieae* que pertenecen a subfamilia *Mutisioideae*, familia *Asteraceae*, las cumarinas sustituidas por

prenilo y geranilo predominan en las especies de *Mutisieae* mientras que en las tribus *Onoserideae* y *Nassauvieae*, los compuestos presentan principalmente unidades sesquiterpénicas unidades a C-3 y C-4 de la molécula a-pirona (Vestena *et al.*, 2022).

1.2.2.4 CUMESTANOS

Los cumestanos naturales son un conjunto de metabolitos secundarios aromáticos policíclicos derivados de plantas que se caracterizan por la presencia de un sistema de cuatro anillos heterocíclicos oxigenados compuesto por una fracción de cumarina y una fracción de benzofurano que comparten un enlace C=C. Recientemente, se ha prestado cada vez más atención a la investigación del potencial medicinal de los cumestanos, en particular el cumestrol, la wedelolactona, la psoralidina y el glicrol, en diversas enfermedades, los cumestanos aislados de varias fuentes vegetales durante el periodo 1956 – 2020 se recolectaron 120 moléculas y se clasificaron en, cumestanos esqueléticos, dimetilpiranocumestanos, furanocumestanos, cumestanos O-glucosilados etc. Con sus actividades biológicas como estrogénicos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antiosteoporóticos, organoprotectores, neuroprotectores, antidiabéticos, antioxidantes, etc, (Tu *et al.*, 2021).

1.2.3 LA PROPIEDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal forma que un antioxidante actúa, primordialmente, debido a su capacidad para reaccionar con radicales libres (Londoño, 2012).

Los antioxidantes son captadores de radicales libres y por esto retrasan o inhiben la fase de iniciación del proceso de oxidación (Alamed *et al.*, 2009).

1.2.4 RADICALES LIBRES

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicál, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cerca al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar (Gutiérrez, 2002)

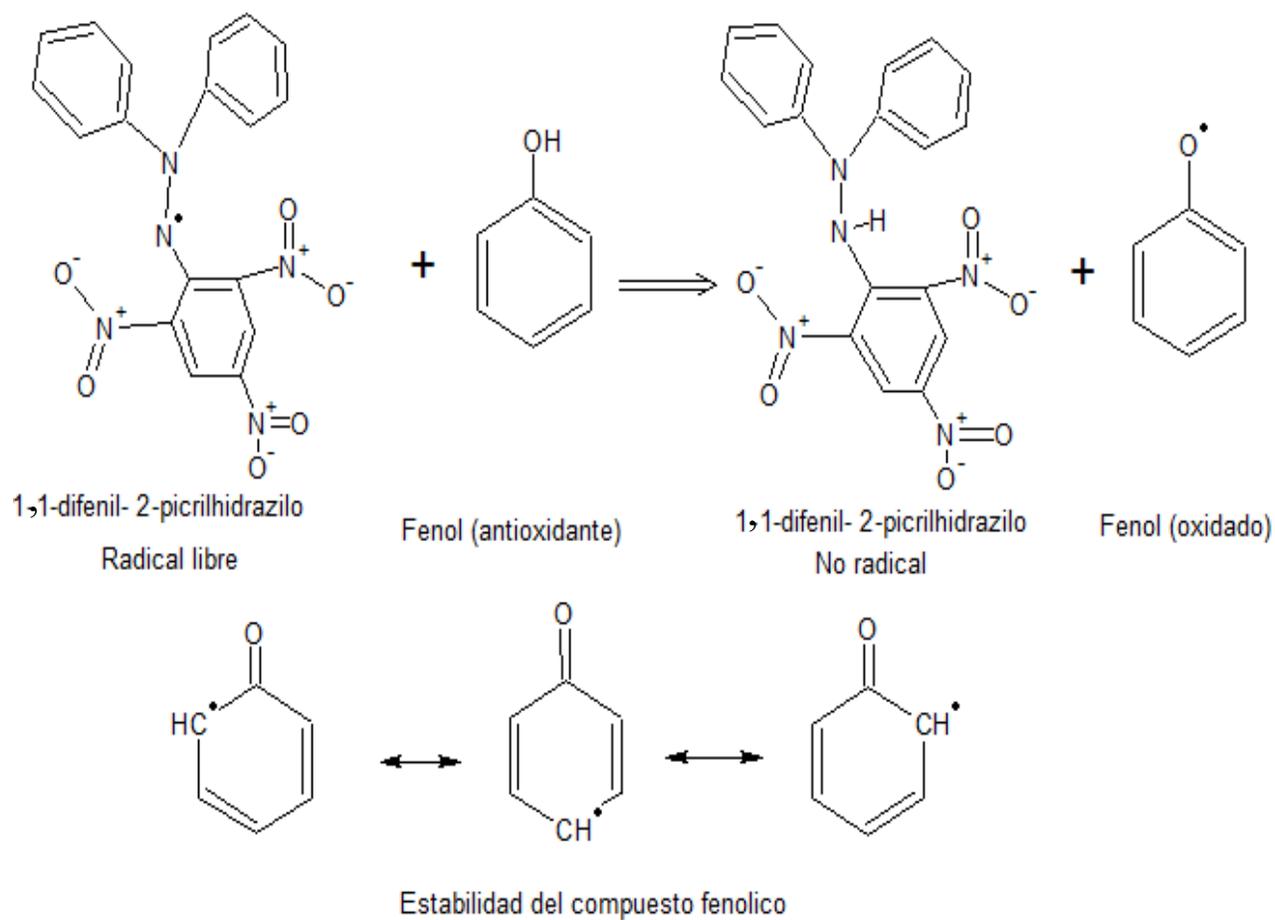
Las principales especies radicalares reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son, según (Gutiérrez, 2002):

Tabla 1 *Radicales Libres del oxígeno*

Especies de oxígeno reactivo (ROS)			
RADICAL LIBRES		No radicales	
Hidroxilo	(HO•)	Oxígeno molecular	$^1\text{O}_2$
Superóxido	($\text{O}_2\cdot^-$)	Ozono	O_3
Peróxido	($\text{ROO}\cdot$)	Peróxido de hidrógeno	(H_2O_2)
Oxígeno nítrico	($\text{NO}\cdot$)	Peroxinitrito	NO_3

Mecanismo de Reacción de radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo con fenol (antioxidante) y la estabilidad del compuesto fenólico.

Figura 10 Reacción de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (radical libre) con fenol (antioxidante) y su estabilidad



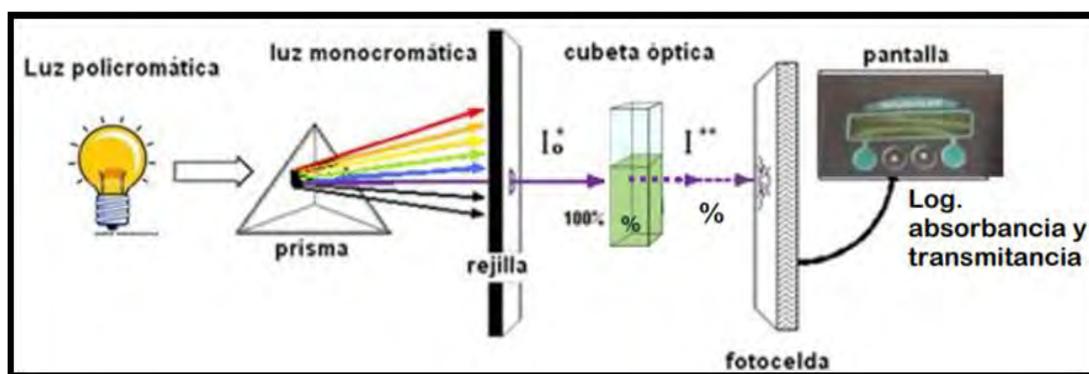
Nota. Mecanismo de reacción de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (radical libre) con fenol (antioxidante) y su estabilidad (Torres *et al.*, 2019).

1.2.5 TÉCNICAS INSTRUMENTALES

1.2.5.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Laime, 2016).

Figura 11 Espectrofotometría UV-visible



Nota. Partes de la espectrometría UV-visible (Laime, 2016).

1.2.5.2 CROMATOGRAFÍA EN EL PLANO

Es una técnica de separación en la que la fase estacionaria es un plano o está sobre un plano. Este plano puede ser un papel utilizado como tal, o impregnado con una sustancia a modo de lecho estacionario (cromatografía en papel, PC), o bien una capa de partículas sólidas que recubren un soporte, como por ejemplo una placa de vidrio (cromatografía en capa fina, TLC). A veces, la cromatografía en plano se denomina también cromatografía de lecho abierto (Ettre, 1995).

Figura 12 Cromatografía de capa fina y la separación de componentes



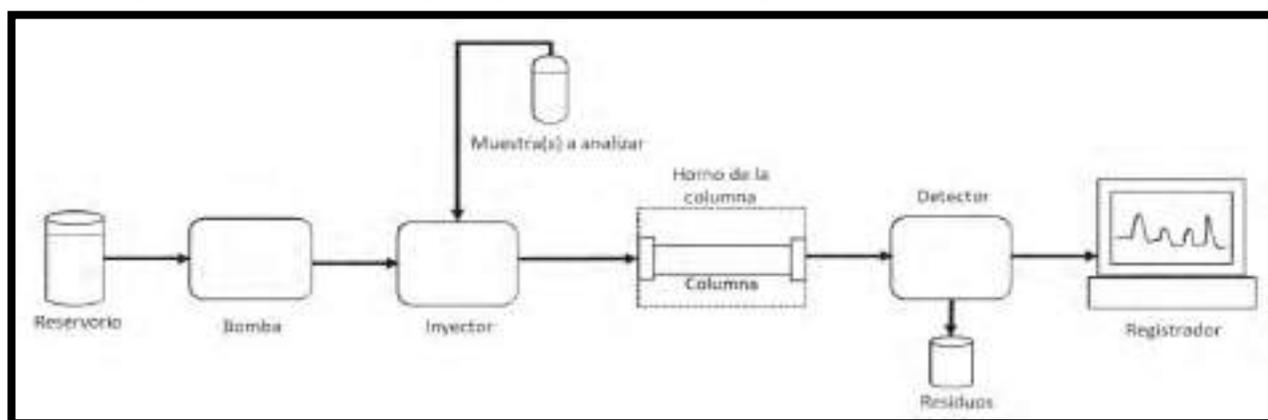
Nota. Cromatografía de capa fina y la separación de componentes según (Sgariglia *et al.*, 2010).

1.2.5.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDOS (LC)

La técnica de cromatografía líquida que se basa en un método físico de separación de analitos polares, de polaridad intermedia o de baja volatilidad. La separación es posible gracias a la distinta afinidad que presentan los analitos entre dos fases inmiscibles. La fase estacionara es un sólido (columna) y la fase móvil es un líquido (eluyente). La fase móvil pasa a través de la columna en condiciones de alta presión impulsada por una bomba, a lo largo de la columna no deben producirse impulsos, para ello el instrumento cuenta con un amortiguador de impulsos. Cuanto más alta sea la presión mayor será la capacidad separativa (resolución cromatográfica) del instrumento, diferenciando así entre HPLC (de sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography) y UHPLC (de sus siglas en inglés, Ultra High Pressure Liquid Chromatography) (Hichou, 2017).

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son: Las fuerzas de dispersión de London, las interacciones dipolo, las interacciones por puente de hidrógeno, interacciones dieléctricas y las interacciones electrostáticas, cualquier variación de estas fuerzas afectará directamente el grado de separación obtenido (Fallon, 1987).

Figura 13 Componentes principales de un cromatógrafo de alta resolución HPLC



Nota. Los componentes principales de un cromatógrafo de alta resolución HPLC según (Giri, 2015).

1.2.5.3.1 FASE MÓVIL

Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía líquida son las siguientes: Disolver la muestra, no degradar o disolver la fase estacionaria, tener baja viscosidad, ser compatible con el tipo de detector utilizado y tener una polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna (Berrocal & Medina, 2008)

1.2.5.3.2 FASE ESTACIONARIA

La fase estacionaria es una de las dos fases que forman un sistema cromatográfico. Puede ser un sólido, un gel, o un líquido. Si es un líquido, puede estar adherido sobre un sólido. Este sólido puede o no contribuir al proceso de separación. El líquido también se puede unir químicamente al sólido o inmovilizarse sobre él (fase inmovilizada). La expresión lecho cromatográfico o sorbente, se puede emplear como término general para denominar cualquiera de las diferentes formas en las que se presenta la fase estacionaria (Ettre, 1995).

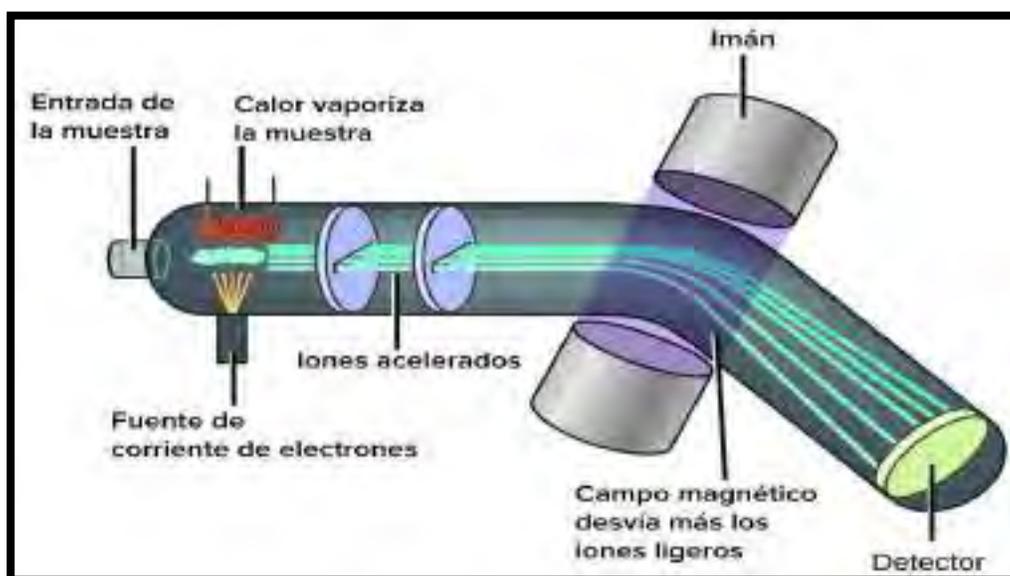
1.2.5.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos. Para elucidar la estructura y

propiedades químicas de las moléculas requiere pequeñas cantidades de muestra. La muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad. Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa (Pallás, 2008).

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica muy potente, que acoplada a GC o LC puede ser utilizada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar materiales conocidos y elucidar la estructura química de las moléculas (Hichou, 2017).

Figura 14 Componentes generales de un espectrómetro de masas



Nota. Los componentes generales de un espectrómetro de masas según (Camacho, 2018).

CAPITULO II

2 METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Tipo de Estudio

La investigación es de tipo descriptivo y experimental, se trata de análisis fitoquímico cualitativo y cuantitativo. La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Bioproductos y Bioprocesos que pertenece al Departamento Académico de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Los análisis cromatográficos UHPLC-DAD se ejecutaron en el Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC. Los análisis UHPLC-DAD-MSMS se llevaron a cabo en el laboratorio de Farmacognosia, Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo-USP, Brasil. Los experimentos de RMN fueron hechos en el Servicio de Espectroscopía RMN del Departamento de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

2.2 Materiales, Equipos y Reactivos

2.2.1 Materiales

- Frascos de color ámbar de 25mL de capacidad.
- Frascos viales de 5mL de capacidad.
- Viales de HPLC.
- Tijeras.
- Pinza.
- Espátula.
- Micropipetas 20-200 μ L; 100-1000 μ L.
- Puntas para micropipetas.
- Pipetas graduadas.
- Propipetas o succionador.
- Filtros y jeringas UptiDisc aplicado para pequeña cantidad de muestra.

- Tubos de ensayo de vidrio.
- Vasos de precipitado 500 mL, 200 mL, 100 mL y 50 mL.
- Pizetas.
- Embudos de vidrio.
- Algodón
- Papel toalla.
- Cromatofolios SiGelG60F₂₅₄ Merck.
- Cámara cromatográfica de vidrio con tapa.
- Rociador de vidrio para TLC Camag, con Erlenmeyer de 100mL.

2.2.2 Equipos

- Espectrofotómetro visible, ThermoScientific Genesys 30.
- Sistema cromatográfico DAD-UHPLC, Ultimate 3000- ThermoScientific
- Cromatografó líquido asociado a espectrómetro de masas, UHPLC-MS/MS, Ultimate 3000- ThermoScientific – Orbitrap-Exactive Plus - ThermoScientific.
- Espectrómetro RMN de 400 MHz- Bruker.
- Balanza analítica (10mg a 210g).
- Licuadora doméstica.
- Estufa de 20°C a 400°C, Memmert UNB.
- Lámpara de rayos UV de longitud onda dual 254 nm/366 nm, Camag.
- Baño ultrasonido (Jeio Tech).

2.2.3 Estándares y Reactivos

- Ácido gálico de 98 % (Merck).
- Ácido cafeico 97% (Merck).
- Quercetina de 95% HPLC (Merck).

- Ácido ascórbico 99% (Merck)
- Alcohol etílico de 96% (C₂H₅OH).
- Difetilborinato de etanolamina (revelador).
- Solución al 5% de cloruro férrico (FeCl₃) Q. P.
- Cloroformo (CHCl₃) Q.P.
- Acetona (C₃H₆O) Q.P.
- Ácido fórmico (CH₂O₂) Q.P.
- Acetonitrilo (CH₃CN) Q.P.
- Éter de petróleo (destilado entre 20-40°C)
- Acetato de etilo (C₄H₈O₂) Q. P.
- Metanol (CH₃OH) Q. P.
- Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) Q. P.
- Fosfato de sodio (Na₃PO₄) Q. P.
- Molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) Q. P.
- Ácido acético (CH₃COOH) Q. P.

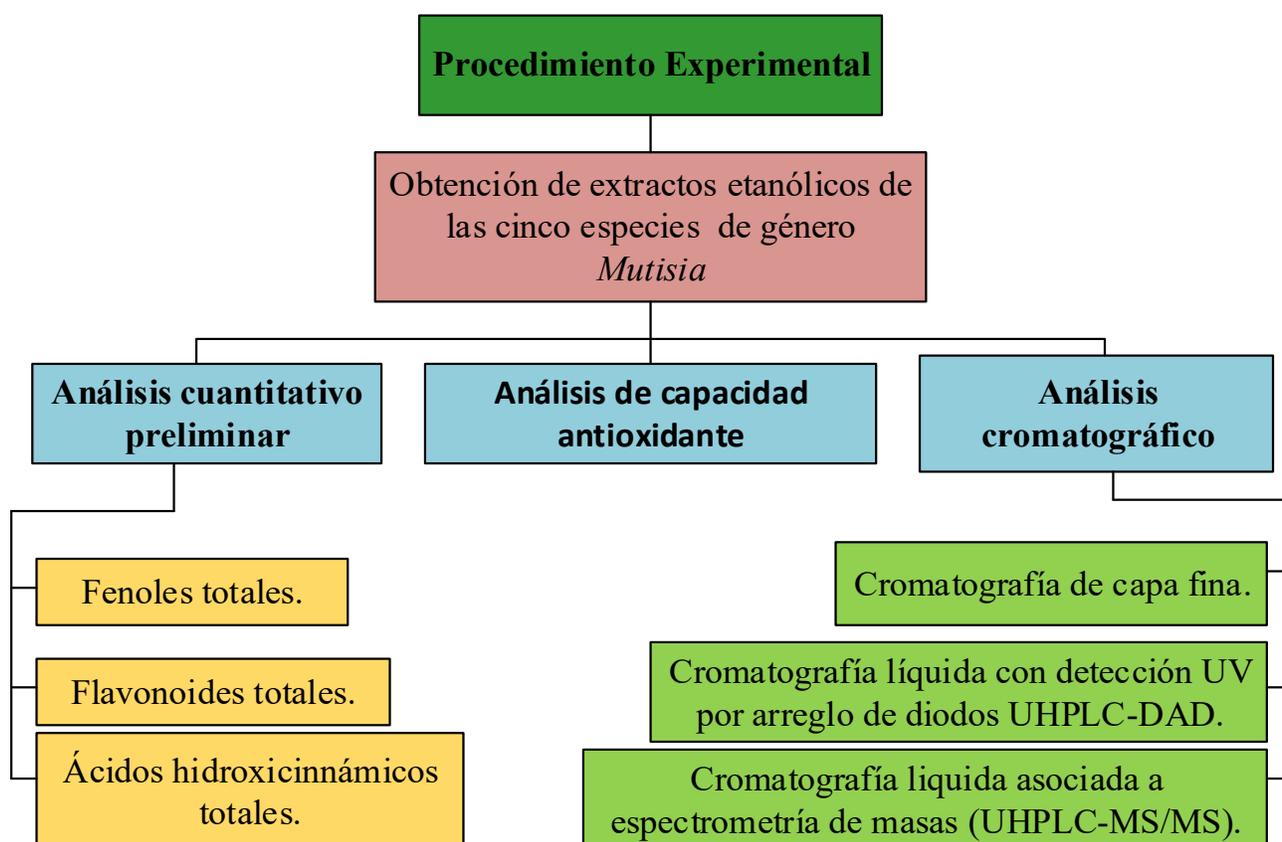
2.3 Diseño Experimental

El presente trabajo de investigación de las cinco especies del género *Mutisia* se desarrolló considerando las siguientes etapas (figura 15):

1. Recolección de las cinco especies de género *Mutisia*.
2. Identificación botánica de las cinco especies en estudio.
3. Secado y Molienda de las muestras.
4. Obtención de los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50%.
5. Determinación del porcentaje de extractos seco.
6. Análisis cuantitativo preliminar de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinnámicos.

7. Análisis de capacidad antioxidante en los extractos etanólicos.
8. Análisis de perfil de sustancias fenólicas por cromatografía en capa fina.
9. Análisis de perfil de sustancias fenólicas por cromatografía líquida con detección UV por arreglo de diodos UHPLC-DAD.
10. Perfil de sustancias fenólicas cualitativo por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS).

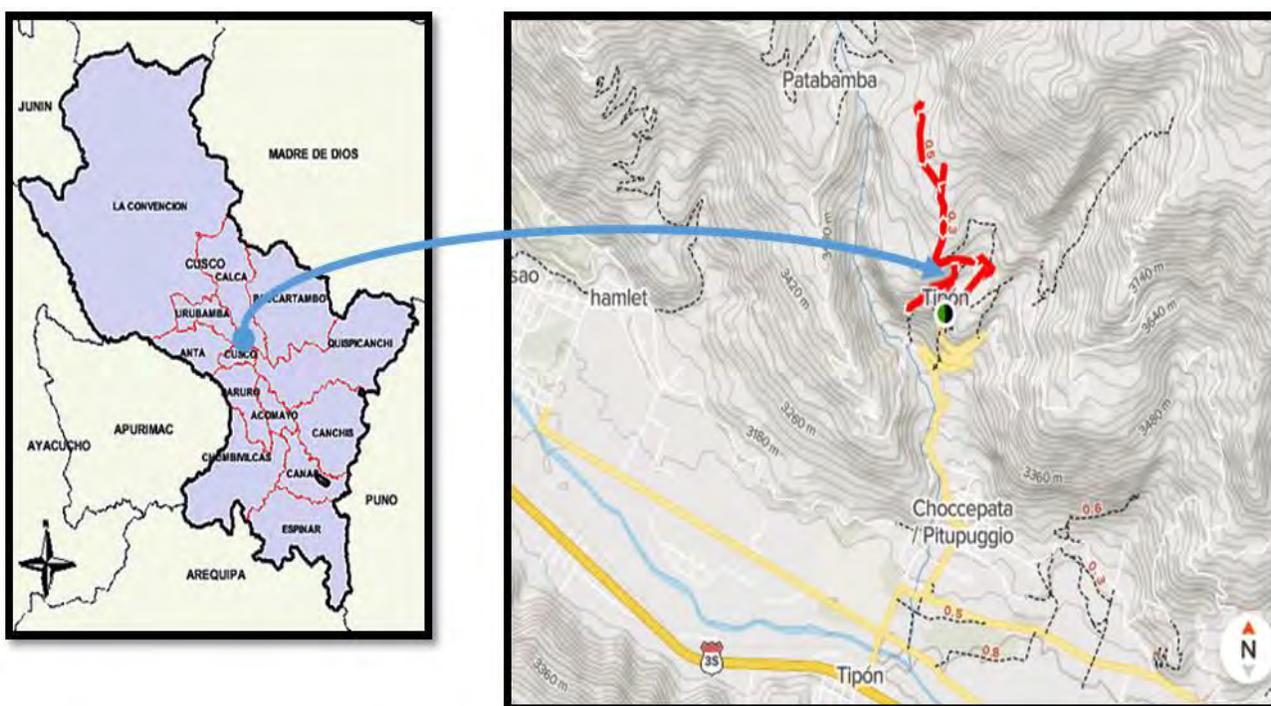
Figura 15 Procedimiento experimental realizado.



2.4 Recolección de Muestras y Ubicación Geográfica

Se recolectaron las partes aéreas, que incluyeron las hojas y flores, de las especies de género *Mutisia*, utilizando el método de muestreo aleatorio. Las especies *M. acuminata* y *M. cochabambensis* se recolectaron en zonas próximas al sitio arqueológico de Tipón, provincia del Cusco a una altura de 3480 y 3650 m.s.n.m. La muestra de *M. lanata* en el sector Mandor, Lares, provincia de Calca a 2600 m.s.n.m, *Mutisia orbignyana* se recolectó en el distrito de Yunga, provincia de General Sánchez Cerro – Moquegua a 3750 m.s.n.m. *M. venusta* se recolectó en alrededores de Huaytampo, provincia de Urubamba - Cusco a 2800 m.s.n.m. También se recolectaron algunas muestras de *Mutisias* de especies *acuminata*, provincia de Acomayo - Pomacanchi a 3700 m.s.n.m, y de la zona de Occopata, provincia Cusco, a 3800 m.s.n.m, y *M. orbignyana* de Chivay- Arequipa a 3650 m.s.n.m.

Figura 16 Recolección de las especies *Mutisia acuminata* y *Mutisia cochabambensis*



Una parte de muestras recolectadas se herborizó en el herbario Vargas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco para su identificación botánica, y lo demás fue colocados sobre papel y periódicos, extendidos para lograr un secado uniforme.

2.4.1 Obtención de Extractos Etanólicos y Acetato de Etilo

Luego del secado de las hojas de las cinco especies de *Mutisia* se molieron utilizando una licuadora hasta pulverizar y se tamizaron por malla 42 apertura de 0.355 mm. Para la preparación de los extractos etanólicos se pesó 0.5g de cada muestra los cuales se llevaron a macerar en un frasco de vidrio con 20mL de etanol al 96%, 70% y 50% por 4 días. Después se procedió a filtrar utilizando una filtración simple (acondicionado con algodón y papel filtro) con ayuda de una pipeta pasteur se tomó el sobrenadante, este proceso se realizó hasta agotar el extracto y por último se aforó a 60 mL.

Para la preparación de extractos de acetato de etilo, se pesaron 100mg de cada muestra, se adicionaron más 2 mL de AcOEt y se sometió por 2 minutos al ultrasonido hasta agotar el extracto, luego se evaporó el extracto a sequedad, se desengrasó con 2 porciones de 5 mL de Eter de petrolio. El residuo se disolvió en 2 mL de MeOH y se filtró a un vial de rosca, de HPLC, utilizando un filtro de 0.22 μ m.

2.4.2 Obtención del Extracto Seco y su Porcentaje

Para obtener el porcentaje del extracto seco, se tomó 12 mL del extracto aforado, luego se llevó a secar en tres viales a una temperatura de 40°C, hasta evaporar completamente. Cuyo promedio de los tres pesos en gramos y sabiendo que para preparar los extractos se pesó 0.5 g de muestra se determinó el porcentaje de extracto seco, los resultados se presentan en la tabla 20.

Fórmula utilizada para el cálculo del porcentaje de extracto seco:

$$\text{Porcentaje de ext. seco (\%)} = \left(\frac{\frac{\text{g ext. seco} \times \text{Vol. aforo}}{\text{Vol. evaporado}}}{\text{peso de muestra}} \right) \times 100$$

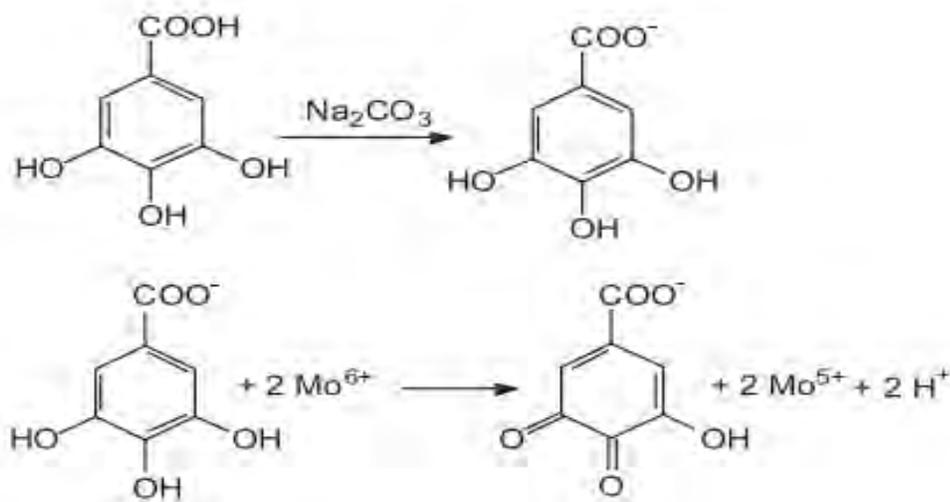
2.5 Procedimiento Experimental y Método

2.5.1 Análisis Cuantitativo Preliminar de los Extractos Etanólicos

2.5.1.1 Determinación de Fenoles Totales: Método de Folin-Ciocalteu

Se empleó el método de Folin-Ciocalteu descrito por (Curifuta *et al.*, 2012), es una determinación espectrofotométrica de fenoles totales en el que el reactivo amarillo de Folin-Ciocalteu (wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico) reacciona con restos fenólicos dando color azul, cuyo espectro de absorción presenta un máximo a 765nm.

Figura 17 Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu



Nota. Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu según (Oliveira *et al.*, 2009).

Procedimiento

Preparación de Reactivos

- El reactivo de Folin-Ciocalteu se diluyó 1:10 en agua.
- Solución de carbonato de sodio al 10 %.

- La solución del estándar de ácido gálico se pesó 10mg y se aforó a 10 mL con etanol al 96 % se diluyó 1 mL de la solución preparada aforándola a 10 mL para obtener 0.1mg/mL de concentración.

2.5.1.1.1 Elaboración de la Curva de Calibración con Ácido Gálico para Determinación de Fenoles Totales

La tabla 2 muestra las concentraciones y volúmenes de la solución estándar de ácido gálico utilizados para la curva de calibración de fenoles totales.

Tabla 2 Elaboración de curva de calibración para la determinación de fenoles totales.

Estándar y reactivos	A	B	C	D	E	F
Ácido gálico (µL)	0	20	40	60	80	100
Ácido gálico (µg)	0	2	4	6	8	10
Reactivo de folin-ciocalteau (µL)	100	100	100	100	100	100
carbonato de sodio al 10%(µL)	200	200	200	200	200	200
Agua (µL)	2000	1980	1960	1940	1920	1900

2.5.1.1.2 Determinación de Fenoles Totales en los Extractos Etanólicos de las Cinco Especies

Se realizó una dilución de 1:10 para cada extracto con etanol y para la cuantificación se tomó 100 µL de esta dilución.

Tabla 3 Determinación de fenoles totales en los extractos etanólicos.

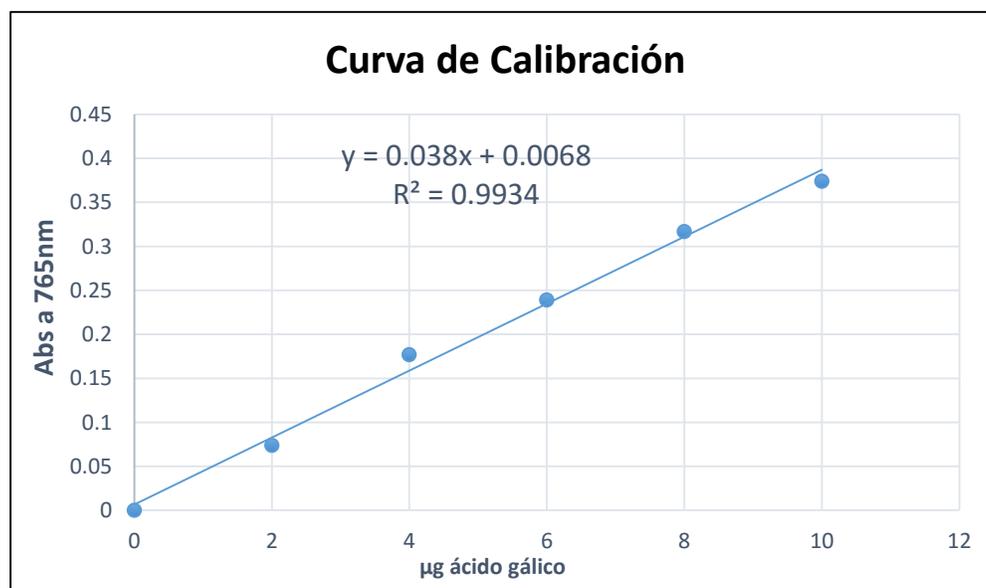
Extractos y reactivos	Volúmenes para la reacción
(µL) de los extractos etanólicos diluidos	100
Reactivo de folin-ciocalteau. (µL)	100
carbonato de sodio al 10%(µL)	200
Agua (µL)	1900

Se dejó reaccionar en un lugar oscuro por 30 min, después se procedió a medir las absorbancias por espectrofotometría UV-visible a 765 nm y los resultados se muestra en la tabla 21.

Tabla 4 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con ácido gálico para fenoles totales.

Ácido Gálico µg	Absorbancia 765 nm
0	0
2	0.074
4	0.177
6	0.239
8	0.317
10	0.374

Figura 18 Curva de calibración de fenoles totales utilizando el estándar de ácido gálico.



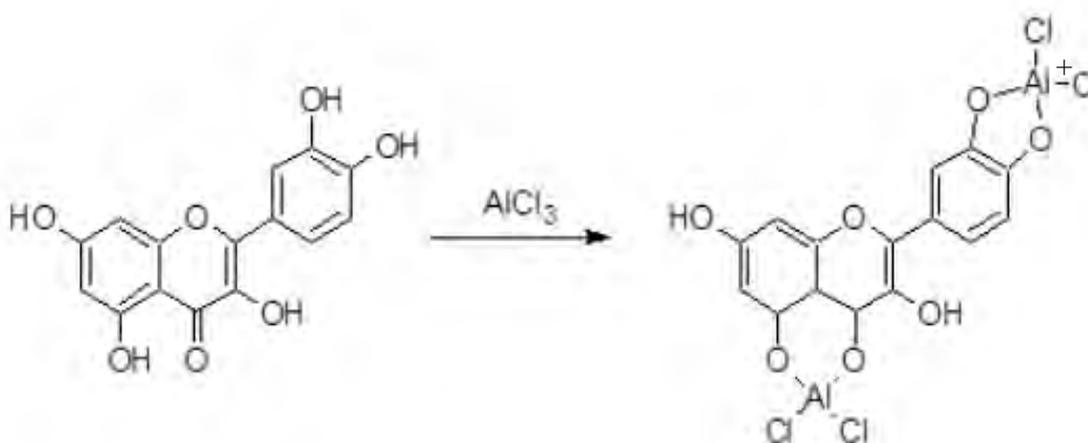
El contenido de fenoles totales de los extractos se calculó utilizando la ecuación de regresión lineal con las absorbancias obtenidas. La concentración en µg de AG en 10 µL y fueron expresados en µg equivalentes de ácido gálico por 100 µg de extracto.

$$\mu\text{g AG en } 100\mu\text{g Ext.} = \left[\frac{\mu\text{g AG en } 10 \mu\text{L}}{\mu\text{g de ext. seco en } 10 \mu\text{L}} \right] \times 100$$

2.5.1.2 Determinación de Flavonoides Totales: Métodos del Cloruro de Aluminio

Se empleó el método de cloruro de aluminio descrito por (Cimpoiu *et al.*, 2011), este método se basa en la reacción de los iones de aluminio con las moléculas de flavonoides en condiciones básicas. Los productos de esta reacción son quelatos rojos de aluminio-flavonoides capaces de absorber a una cierta longitud de onda. La intensidad de color y la sensibilidad del método dependen del número de grupos hidroxilo en la molécula de flavonoides y de las propiedades de los iones de aluminio

Figura 19 Reacción entre el flavonol quercetina y cloruro de aluminio



Nota. Reacción entre el flavonol quercetina y cloruro de aluminio según (Badami *et al.*, 2018).

Procedimiento

Preparación de Reactivos

- La solución de cloruro de aluminio al 10 %.
- Solución de acetato de sodio de 0.1 M.

- Se pesó del estándar de quercetina 10 mg y se aforó a 10 mL con etanol al 96%, luego se diluyó 1mL de la solución preparada aforando a 10mL para obtener 0.1 mg/mL de concentración.

2.5.1.2.1 Elaboración de la Curva de Calibración para la Determinación de Flavonoides Totales

La tabla 5 muestra las concentraciones y volúmenes de la solución estándar quercetina para la curva de calibración de flavonoides totales.

Tabla 5 *Elaboración de la curva de calibración con quercetina para la determinación de flavonoides totales*

Estándar y reactivos	A	B	C	D	E	F	G
Quercetina (μL)	0	100	200	300	600	800	1000
Quercetina μg	0	10	20	30	60	80	100
AlCl₃ al 10%(μL)	100	100	100	100	100	100	100
Acetato de sodio 0.1M (μL)	100	100	100	100	100	100	100
Agua (mL)	5.8	5.7	5.6	5.5	5.2	5	4.8

2.5.1.2.2 Determinación de Flavonoides Totales en los Extractos Etanólicos de las Cinco Especies

La tabla 6 muestra los volúmenes de los extractos y reactivos utilizados para la determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50% de las cinco especies.

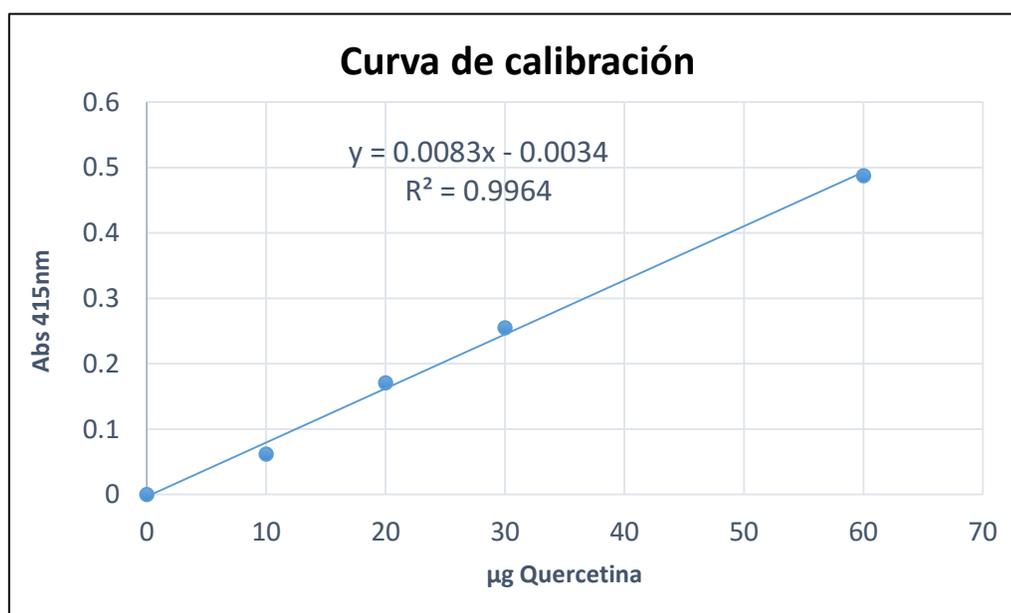
Tabla 6 Determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos de las cinco especies

Extractos y reactivos	Volúmenes para la reacción
(μL) de los extractos etanólicos	50
AlCl_3 10% (μL)	100
Acetato de sodio 0.1M (μL)	100
Agua (mL)	5.8

Luego se procedió a medir las absorbancias a una longitud de onda de 415nm.

Tabla 7 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con quercetina para flavonoides totales

Quercetina μg	Absorbancia 415 nm
0	0
10	0.062
20	0.171
30	0.255
60	0.488

Figura 20 Curva de calibración de flavonoides totales utilizando el estándar de quercetina.

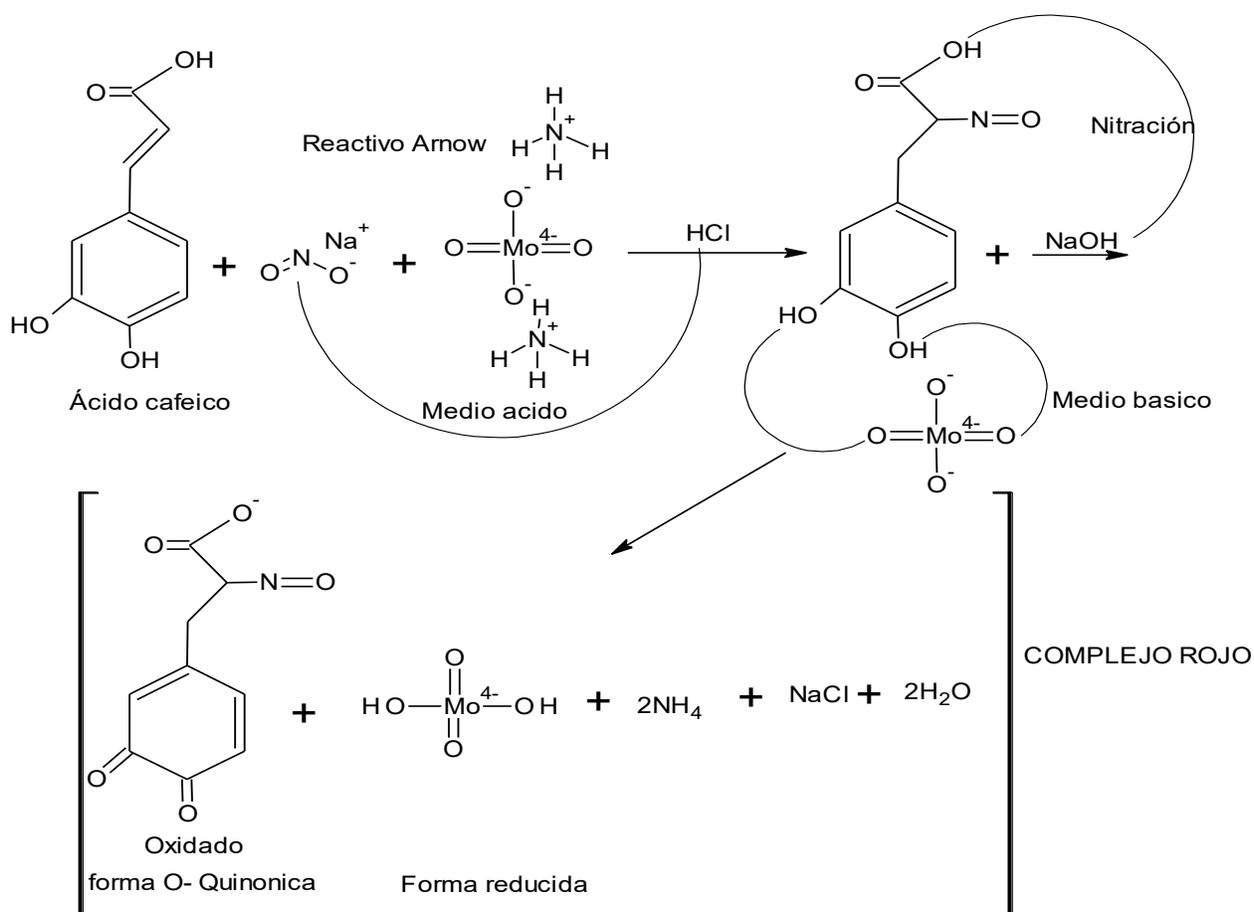
El contenido de flavonoides totales de los extractos se calculó utilizando la ecuación de regresión lineal con las absorbancias obtenidas, la concentración en μg de quercetina en $10 \mu\text{L}$, posteriormente fueron expresados en μg de equivalentes de quercetina por $100 \mu\text{g}$ de extracto los resultados se muestran en la tabla 21.

$$\mu\text{g Qu en } 100\mu\text{g Ext.} = \left[\frac{\mu\text{g Qu en } 50 \mu\text{L}}{\mu\text{g de ext. seco en } 50 \mu\text{L}} \right] \times 100$$

2.5.1.3 Determinación de Ácidos Hidroxicinnámicos Totales: Método de Arnow

El método se basó en la reacción de los ácidos hidroxicinnámicos en medio ácido con el reactivo de Arnow, que presenta una coloración amarilla y cambia anaranjado en medio alcalino, cuyo espectro de absorción presenta un máximo en 505 nm (Matkowski *et al.*, 2008).

Figura 21 Reacción de ácido cafeico con el reactivo de Arnow



Procedimiento

Preparación de Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico 0.5 M.
- Solución de hidróxido de sodio al 10 %.
- El reactivo Arnow se preparó disolviendo 10 g de nitrito de sodio y 10 g de molibdato de amonio aforado a 100 mL.
- Estándar de ácido cafeico se pesó 10 mg y se aforo a 10 mL con etanol de 96 %, luego se diluyó 1 mL de la solución estándar aforando a 10 mL para obtener 0.1mg/mL de concentración

2.5.1.3.1 Elaboración de la Curva de Calibración con Ácido Cafeico para la

Determinación de Ácidos Hidroxicinnámicos Totales

La tabla 8 muestra las concentraciones y volúmenes de la solución estándar ácido cafeico reactivos para la curva de calibración de flavonoides totales.

Tabla 8 Elaboración de la curva de calibración con ácido cafeico para la determinación de ácidos hidroxicinnámicos

Estándar y reactivos	A	B	C	D	E	F
Estándar ácido cafeico (µL)	0	100	200	300	400	500
HCl 0.5M (mL)	2	2	2	2	2	2
Reactivo Arnow (mL)	2	2	2	2	2	2
NaOH 10% (mL)	2	2	2	2	2	2
Agua (mL)	5	4.9	4.8	4.7	4.6	4.5

2.5.1.3.2 Determinación de Ácidos Hidroxicinnámicos en los Extractos Etanólicos de las Cinco Especies

La tabla 9 muestra los volúmenes de los extractos y reactivos utilizados para la determinación de ácidos hidroxicinnámicos totales en los extractos etanólicos al 96 %, 70 % y 50 % de las cinco especies.

Tabla 9 Determinación de ácidos hidroxicinnámicos en los extractos etanólicos de las cinco especies.

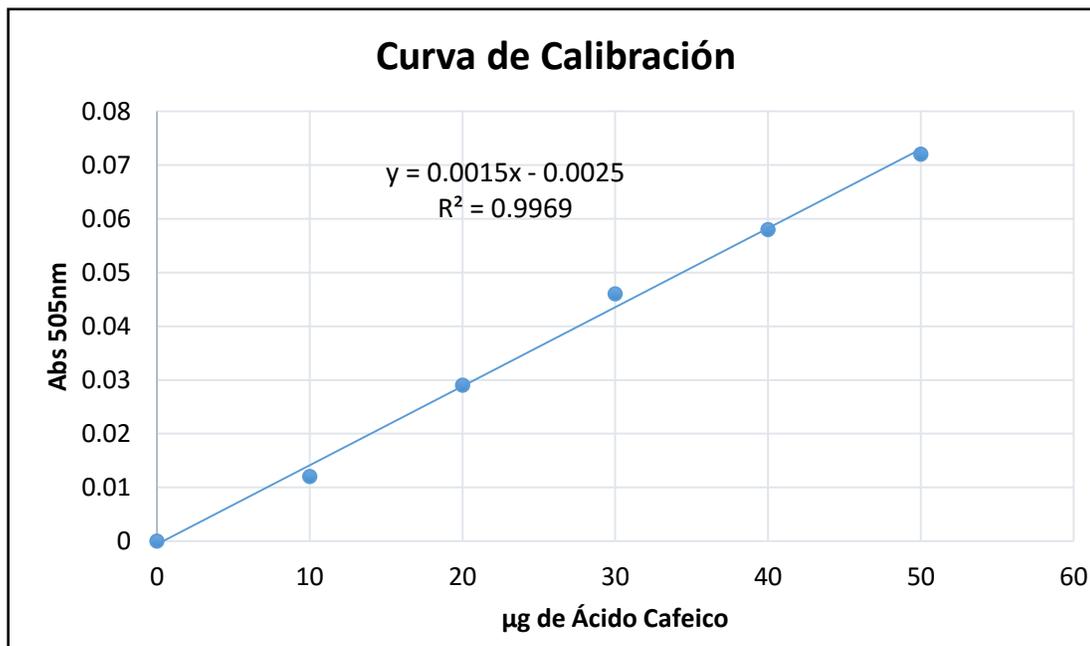
Muestra y reactivos	Volúmenes para la reacción
(μ L) de los extractos etanólicos	50
HCl 0.5M (mL)	2
Reactivo Arnou (mL)	2
NaOH 10% (mL)	2
Agua (mL)	4.95

Luego se midió las absorbancias por espectrofotometría de UV-visible a 505nm.

Tabla 10 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con ácido cafeico para ácidos hidroxicinnámicos totales.

Ácido cafeico μg	Absorbancia 505 nm
0	0
10	0.012
20	0.029
30	0.046
40	0.058
50	0.072

Figura 22 Curva de calibración de ácidos hidroxicinnámicos totales utilizando el estándar de ácido cafeico



El contenido de ácidos hidroxicinnámicos totales de los extractos se calculó utilizando la ecuación de regresión lineal con las absorbancias obtenidas, la concentración en μg de AC en 10μL y fueron expresados en μg de equivalentes de ácido cafeico por 100μg de extracto y los resultados se muestran en la tabla 21.

$$\mu\text{g AC en } 100\mu\text{g Ext.} = \left[\frac{\mu\text{g AC en } 10 \mu\text{L}}{\mu\text{g de ext. seco en } 10 \mu\text{L}} \right] \times 100$$

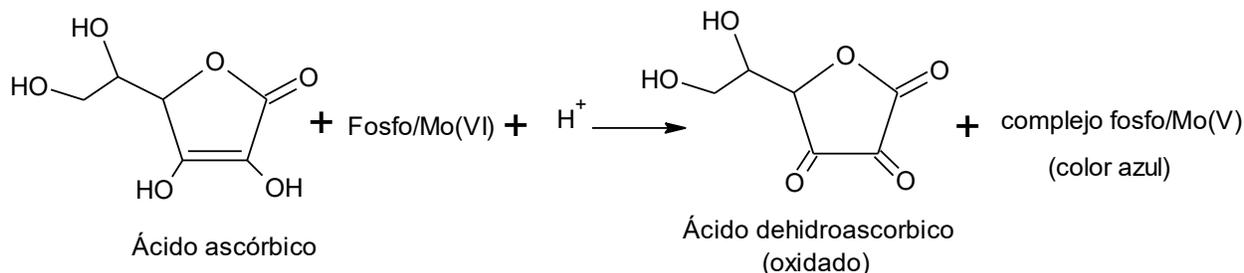
2.5.2 Análisis de Capacidad Antioxidante

2.5.2.1 Determinación de Capacidad Antioxidante: Método de Azul de Molibdeno

En este estudio se utilizará un método espectrofotométrico muy sencillo, basado en la formación de un complejo coloreado (azulado) de fosfato y molibdeno (V). El fundamento del método radica en la capacidad de los antioxidantes de reducir el molibdeno (VI) a molibdeno (V),

el cual, en presencia de fosfato a pH ácido, forma un complejo fosfomolibdico de color azul cuyo espectro de absorción presenta un máximo a 695 nm.

Figura 23 Reacción de determinación de antioxidante por el método de azul de molibdeno



Procedimiento

Preparación de Reactivos

- Solución estándar de vitamina C (ácido ascórbico), se pesó 100mg y se aforo en una fiola de 100 mL. Luego se diluyó 1: 10 que corresponde a una concentración de 100µg/mL.
- Solución de reactivo fosfomolibdato, se pesó 4.66g de molibdato de amonio, también se pesó 10.64g de Na₃PO₄ ·12H₂O y se medió H₂SO₄ 32.61mL y se aforo a un litro.

2.5.2.1.1 Elaboración de la Curva de Calibración para la Determinación de Capacidad

Antioxidante

La tabla 11 muestra las contracciones y volúmenes de la solución estándar ácido ascórbico para la curva de calibración de capacidad antioxidante.

Tabla 11 Elaboración de la curva de calibración con ácido ascórbico para la determinación de antioxidante.

Estándar y reactivos	A	B	C	D	E	F
Estándar ácido ascórbico(µL)	0	100	300	500	600	500
H ₂ O (mL)	1	1	1	1	1	1
Reactivo fosfomolibdato de amonio (mL)	1	1	1	1	1	1

Para que se complete la reacción se dejó por media hora en la estufa a 80 °C, luego se añadió 5 mL de agua destilada para la dilución.

2.5.2.1.2 Determinación de Capacidad Antioxidante en los Etanólicos de las Cinco Especies

La tabla 12 muestra los volúmenes de los extracto y reactivos utilizados para la determinación de capacidad antioxidante en los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50%.

Tabla 12 Determinación de capacidad antioxidante en los extractos etanólicos de las cinco especies

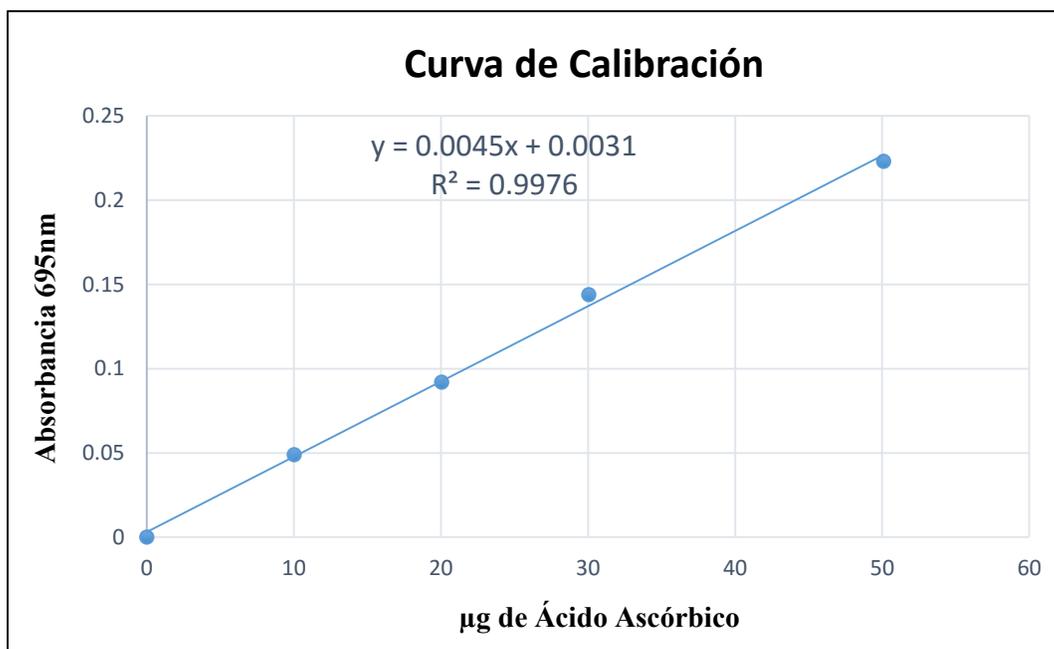
Estándar y reactivos	Volúmenes para la reacción
Estándar ácido ascórbico(μL)	50
H ₂ O (mL)	1
Reactivo fosfomolibdato de amonio (mL)	1

Para que se complete la reacción se dejó por media hora en la estufa a 80 °C, luego se añadió 5 mL de agua destilada para la dilución y se midió las absorbancias a 695 nm.

Tabla 13 Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración con ácido ascórbico para capacidad antioxidante.

Ácido ascórbico μg	Absorbancia 695 nm
0	0
10	0.049
20	0.092
30	0.144
50	0.223

Figura 24 Curva de calibración de capacidad antioxidante utilizando el estándar ácido ascórbico



El contenido de capacidad antioxidante de los extractos se calculó utilizando la ecuación de regresión lineal con las absorbancias obtenidas, la concentración en µg de ácido ascórbico en 10 µL, posteriormente fueron expresados en µg equivalentes de ácido ascórbico por 100µg de extracto seco, los resultados se muestran en tabla 22.

$$\mu\text{g AA en } 100\mu\text{g Ext.} = \left[\frac{\mu\text{g AA en } 10 \mu\text{L}}{\mu\text{g de ext. seco en } 10 \mu\text{L}} \right] \times 100$$

2.5.3 Cromatografía en Capa Fina de los Extractos Etanólicos al 96%, 70% y 50%

El análisis de agliconas libres por cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en cromatoplasmas de Silica Gel G60 como fase estacionaria, y como fase móvil una mezcla de CHCl_3 : Me_2CO : HCOOH (75:16.5:8.5); mientras que para la determinación cualitativa de glicósidos se

utilizó una mezcla de AcOEt: HCOOH: AcOH: H₂O (100:11:11:26) como fase móvil. En ambos las cromatoplasmas fueron reveladas con:

- Solución de FeCl₃ (5%).
- Difetilborinato de etanolamina (1%) en metanol.

Los resultados se muestran en las figuras 26 y 27.

2.5.4 Cromatografía UHPLC-DAD Cualitativo de los Extractos Etanólicos al 70%

Para el análisis de sustancias fenólicas por cromatografía de UHPLC-DAD se utilizaron los siguientes estándares.

Tabla 14 Estándares utilizados en el análisis cualitativo de sustancias fenólicas en los cinco extractos etanólicos.

Sustancia	Máximos de absorción	Referencia
Ácido 3-cafeoilquínico	218, 242, 326	Vinayagam & Sudha,(2015)
Ácido 5-cafeoilquínico		
Ácido 4-cafeoilquínico		
Quercetina-3-O-hexósido	204, 256, 355,4	Gaitén et al., (2010)
Quercetina	204, 255, 369	

Con la siguiente metodología:

- Columna: Zorbax RPC₁₈ 100 x 2.1 mm x 1.8µm.
- Flujo: 0.4mL/min
- Temperatura: 35°C
- Tiempo: 20min
- Fase móvil:
 - Ácido fórmico CH₂O₂ al 0.1% en agua.
 - Acetonitrilo (CH₃CN).

Gradiente:*Tabla 15 Gradiente de fase móvil para el análisis cualitativo de sustancias fenólicas en los extractos etanólicos*

Minutos	0	5	10	12	15	17	19	20
% a)	98	70	20	20	0	0	98	98
% b)	2	30	80	80	100	100	2	2

Paralelamente se determinó los espectros de absorción UV (200-400nm): 254, 330, 280 y 370nm, resultados en la figura 28 y tabla 23.

2.5.5 Cromatografía UHPLC-MS/MS de los Extractos Etanólicos al 70%

El análisis por cromatografía líquida asociado con la espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-MS/MS) y la detección ultravioleta se llevaron a cabo en sistema de Thermo Scientific (USA), compuesto por dos bombas cuaternarias Accela 1250, acopladas a un detector de diodos Accela, y un espectrómetro de masas Thermo Scientific Exactive Plus equipado con un analizador de masas tipo Orbitrap, sincronizado por el software Xcalibur 3.1.66.10 (2015).

Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que el análisis UHPLC-DAD:

- Columna: Kinetex XB-C18 (1.7 μ m, 150 \times 2.1 mm) acoplada a una columna de protección compatible
- Flujo: 400 μ L
- Temperatura: 35°C
- Tiempo: 40 min
- Fase móvil:
 - a) Agua con ácido fórmico CH₂O₂ al (0.1%).
 - b) Acetonitrilo (CH₃CN) con ácido fórmico CH₂O₂ al 0.1%.

Gradiente:*Tabla 16 Gradiente de fase para el análisis de sustancias fenólicas por cromatografía de UHPLC-MS/MS*

Minutos	0	30	33	35	40
% a)	98	70	0	0	98
% b)	2	30	100	100	2

- La longitud de onda de exploración del detector DAD se ajustó de 190 a 600 nm.
- Estándar de ácido 5-*O*-cafeoilquinico grado HPLC (Merck)

El espectrómetro de masas funcionó bajo un cambio rápido de polaridad (modo negativo), con resolución de 70,000 unidades en los modos MS y MS/MS con las siguientes condiciones:

- Modo de ionización por electroaspersión (ESI).
- Voltaje de pulverización de 3.2 kV en modo negativo,
- Temperatura capilar de 320 ° C
- Rango de exploración de 100 a 1,500 m/z.

La fragmentación MS/MS fue realizada por el método de disociación por colisión (HCD) en modo negativo. Los cromatogramas obtenidos por UHPLC-MS/MS fueron explorados para extraer los espectros de MS y MS/MS.

Se elaboró una tabla de los tiempos de retención de los compuestos identificados en las especies estudiadas, los resultados se encuentran en la figura 31 y tabla 24

Fórmulas de los cálculos:

$$\text{Masa experimental} = (m_i - A \text{ de hidrógeno})$$

$$\Delta \text{ppm} = \left(\frac{m_{\text{ex}} - m_t}{m.} \right) \times 10^6$$

Datos:

m UHPLC-MS/MS: Masa obtenida por el software Xcalibur sincronizado con UHPLC MS/MS

m: Masa monoisotópico.

A: Masa atómica de hidrógeno (1.0078).

Δ ppm: Error de medición de la masa.

2.5.6 Metodología para la Purificación de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios

Las hojas secadas de *M. orbignyana* se pesaron 50 g, se pulverizaron en un molino de cuchillas y se tamizaron. Se extrajeron por maceración con etanol al 96% (6 veces, relación planta/disolvente 1:5 g/mL). El disolvente se destilo a presión reducida utilizando un rotavapor para obtener 12,3 g de extracto seco. Este extracto se disolvió en agua caliente (300mL), se filtró y se partió con acetato de etilo (EtOAc, 3 veces de 100 mL). La fracción de EtOAc se trató entonces con MgSO₄ para eliminar el agua residual y luego se evaporó para obtener 5g de fracción. Esta fracción se mezcló además con sílice (5 g) y luego se sometió a cromatografía VLC con gel de sílice como fase estacionaria (tamaño de partícula de 50 μ m, 20×85 mm) y como fase móvil éter de petróleo y acetato de etilo con una gradiente de polaridad creciente:

Tabla 17 Gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo para la purificación de fracción de acetato de etilo.

FASE MOVIL	A (200ml)	B (200ml)	C (200mL)	D (200mL)	E (100mL)
Éter de petróleo (ml)	180	160	140	120	0
Acetato de etilo (ml)	20	40	60	80	100

Las fracciones fueron eluidas y aplicadas en una cromatoplaque de SilicaGel G60 con una mezcla de solventes $\text{CHCl}_3:(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{H}_2\text{CO}_2$ (75:16:5:1,7) como fase móvil y placas de sílice como fase estacionaria, los resultados se encuentran en figura 32.

2.5.6.1 Metodología para la Identificación y Cuantificación de Compuesto A en las Cinco Especies de *Mutisia*

La cuantificación de compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano) en las cinco especies de género *Mutisia* se realizó en los extractos etanólico al 70% y extractos en acetato de etilo, para ello se utilizó la siguiente metodología y la columna con las características correspondientes:

- Columna: Zorbax RPC_{18} 100 x 2.1 mm x 1.8 μm .
- Flujo: 0.3 mL/min
- Temperatura: 40 °C
- Tiempo: 15 min
- Fase móvil:
 - a) CH_2O_2 al (0.1 %) en agua.
 - b) CH_2O_2 al (0.1 %) en MeCN.

Gradiente:

Tabla 18 Gradiente de fase móvil para la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano

Minutos	0	3	5	7	9	11	13	15
% a)	90	50	30	20	20	0	0	90
% b)	10	50	70	80	80	100	100	10

Para la detección UV se utilizó las siguientes longitudes de onda; 345; 280; 246 y 210 nm.

Los resultados se presentan en la tabla 29 y 30.

2.5.6.2 Metodología para la Identificación y Cuantificación del Compuesto B en las Cinco

Especies de *Mutisia*

La cuantificación de 5-metilcumarina-4-glucósido en las cinco especies de género *Mutisia* se realizó en los extractos etanólicos al 70%. Siguiendo las siguientes condiciones:

- Columna: Zorbax RPC₁₈ 4.6 x 100 mm x 1.8 µm.
- Flujo: 0.4 mL/min
- Temperatura: 35 °C
- Tiempo: 20 min
- Fase móvil:
 - a) Ácido fórmico CH₂O₂ al (0.1%) en agua.
 - b) Acetonitrilo (CH₃CN).

Gradiente:

Tabla 19 Gradiente de fase móvil para la cuantificación de 5-metilcumarina-4-glucósido

Minutos	0	5	10	12	15	17	19	20
% a)	98	70	20	20	0	0	98	98
% b)	2	30	80	80	100	100	2	2

Para la detección UV se utilizó las siguientes longitudes de onda: 280, 345, 254 y 330 nm. Los resultados se muestran en la figura 29 y 30

CAPITULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Porcentaje de Extracto Seco en las Cinco Especies de Género *Mutisia*

El porcentaje de extracto seco en las cinco plantas de género *Mutisia* estudiadas con etanol de 96%, 70% y 50 % se muestra tabla 20.

Tabla 20 Porcentaje de extracto etanólico seco de las cinco especies

Nº	Nombre de las especies	Extracto etanólico (%)	Porcentaje de extracto seco
1	<i>Mutisia acuminata</i>	Ma - 96	17.07 ± 0.002
2	<i>Mutisia acuminata</i>	Ma - 70	38.64 ± 0.001
3	<i>Mutisia acuminata</i>	Ma - 50	39.60 ± 0.002
4	<i>Mutisia cochabambensis</i>	Mc - 96	11.69 ± 0.002
5	<i>Mutisia cochabambensis</i>	Mc -70	25.18 ± 0.001
6	<i>Mutisia cochabambensis</i>	Mc -50	28.70 ± 0.002
7	<i>Mutisia lanata</i>	Ml - 96	7.48 ± 0.004
8	<i>Mutisia lanata</i>	Ml -70	21.59 ± 0.001
9	<i>Mutisia lanata</i>	Ml -50	25.17 ± 0.003
10	<i>Mutisia orbignyana</i>	Mo - 96	24.58 ± 0.003
11	<i>Mutisia orbignyana</i>	Mo - 70	44.32 ± 0.001
12	<i>Mutisia orbignyana</i>	Mo - 50	45.60 ± 0.005
13	<i>Mutisia venusta</i>	Mv - 96	8.99 ± 0.002
14	<i>Mutisia venusta</i>	Mv - 70	24.29 ± 0.001
15	<i>Mutisia venusta</i>	Mv - 50	27.56 ± 0.002

Los mayores porcentajes de extracción corresponden al 50 % y 70 % de *Mutisia orbignyana* con 45.60 % y 44.32 % respectivamente siendo que los extractos con 50 % de etanol, en las cinco especies, resultan ser los de mayor extracción.

3.2 Análisis Cuantitativo Preliminar

El contenido de fenoles totales, flavonoides totales y ácidos hidroxycinnámicos totales de los extractos etanólicos de las cinco especies *Mutisia* se muestra en la tabla 21.

Tabla 21 Resultados del análisis cuantitativo preliminar de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxycinnámicos totales

N°	Extracto etanólico (%)	Fenoles Totales (µg AG/100 µg de extractos etanólicos)	Flavonoides totales (µg Qu/100 µg de extractos etanólicos)	Ácidos hidroxycinnámicos totales (µg AC/100 µg de extractos etanólicos)
1	Ma - 96	16.26±0.001	0.44±0.004	4.75±0.001
2	Ma - 70	38.14±0.004	5.32±0.002	15.77±0.002
3	Ma - 50	11.39±0.001	1.91±0.004	5.31±0.001
4	Mc - 96	20.25±0.002	7.97±0.003	14.11±0.001
5	Mc - 70	28.12±0.004	8.49±0.002	11.58±0.001
6	Mc - 50	14.67±0.001	9.84±0.003	18.96±0.001
7	MI - 96	22.27±0.001	2.09±0.002	9.44±0.002
8	MI - 70	17.04±0.002	8.60±0.001	1.75±0.002
9	MI - 50	13.29±0.001	2.65±0.003	7.37±0.001
10	Mo - 96	13.55±0.001	2.34±0.005	5.42±0.001
11	Mo - 70	18.69±0.004	3.65±0.001	4.76±0.001
12	Mo - 50	18.44±0.002	5.82±0.003	17.32±0.002
13	Mv - 96	20.02±0.001	1.33±0.003	6.42±0.002
14	Mv - 70	32.74±0.002	4.26±0.001	4.16±0.005
15	Mv - 50	12.85±0.001	1.68±0.003	4.98±0.001

AG = Acido gálico

Qu = Quercetina

AC = Acido cafeico

Las muestras analizadas poseen una cantidad importante de fenoles, los extractos etanólicos al 70% de *M. acuminata*, *M. venusta* y *M. cochabambensis* presentan alto contenido de fenoles totales en relación a los otros extractos con valores de 38.14 µg/100µg, 32.74 µg/100µg y 28.12 µg/100µg respectivamente. En la determinación de flavonoides totales con mayor contenido son los extractos de *M. cochabambensis* al 50 %, 70 %, 96 % y *M. lanata* al 70 %, encontrándose

9.84 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$, 8.60 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$, 8.49 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ y 7.97 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$. En los resultados de ácidos hidroxicinnámicos los extractos con mayor contenido son *M. cochabambensis* al 50%, *M. orbignyana* 50 %, *M. acuminata* 70 %, *M. cochabambensis* al 96% con valores de 18.86, 17.32 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de extracto seco respectivamente, son comparables con los resultados obtenidos por Condoli, (2019), en su investigación de fenoles y flavonoides totales en extractos atomizados de las hojas de *Mutisia mathewsii* Hook & Arn. de 26.23 y 17.13 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ EA respectivamente.

3.3 Análisis de Capacidad Antioxidante

El contenido de capacidad antioxidante en los extractos etanólicos de las cinco especies *Mutisia* se muestra en la tabla 22.

Tabla 22 Resultado de capacidad antioxidante en los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50%

N°	Extracto etanólico (%)	Capacidad antioxidante total μg de AA/ 100 μg de extracto)
1	Ma - 96	11.49 \pm 0.02
2	Ma - 70	16.78 \pm 0.01
3	Ma - 50	9.59 \pm 0.01
4	Mc - 96	16.17 \pm 0.01
5	Mc - 70	12.58 \pm 0.01
6	Mc - 50	11.44 \pm 0.04
7	Ml - 96	14.70 \pm 0.01
8	Ml - 70	7.65 \pm 0.01
9	Ml - 50	10.64 \pm 0.01
10	Mo - 96	9.09 \pm 0.02
11	Mo - 70	7.85 \pm 0.01
12	Mo - 50	14.45 \pm 0.02
13	Mv - 96	12.16 \pm 0.05
14	Mv - 70	17.71 \pm 0.02
15	Mv - 50	11.78 \pm 0.01

AA = Ácido Ascórbico

Los extractos etanólicos de las cinco especies poseen una cantidad importante de capacidad antioxidante, los extractos etanólicos al 70% de *M. venusta* y *M. acuminata*, seguidos los extractos etanólicos al 96 % de *M. cochabambensis* presentan alto contenido de 17.71, 16.78 y 16.17 $\mu\text{g}/100$ μg de extracto seco comparado los resultados de Condoli, (2019) en extractos atomizados de las hojas de *Mutisia mathewsii* Hook & Arn. Con concentraciones de $22.88 \pm 0,36$ $\mu\text{g}/\text{mL}$; $24.63 \pm 4,19$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ y $5.65 \pm 0,52$ $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ frente al radical DPPH, ABTS y FRAP respectivamente, los resultados son menores en el presente trabajo esto se debe el método utilizado y estándares.

El siguiente diagrama muestra la variación de las concentraciones de fenoles, flavonoides, ácidos hidroxicinnámicos totales y capacidad antioxidante.

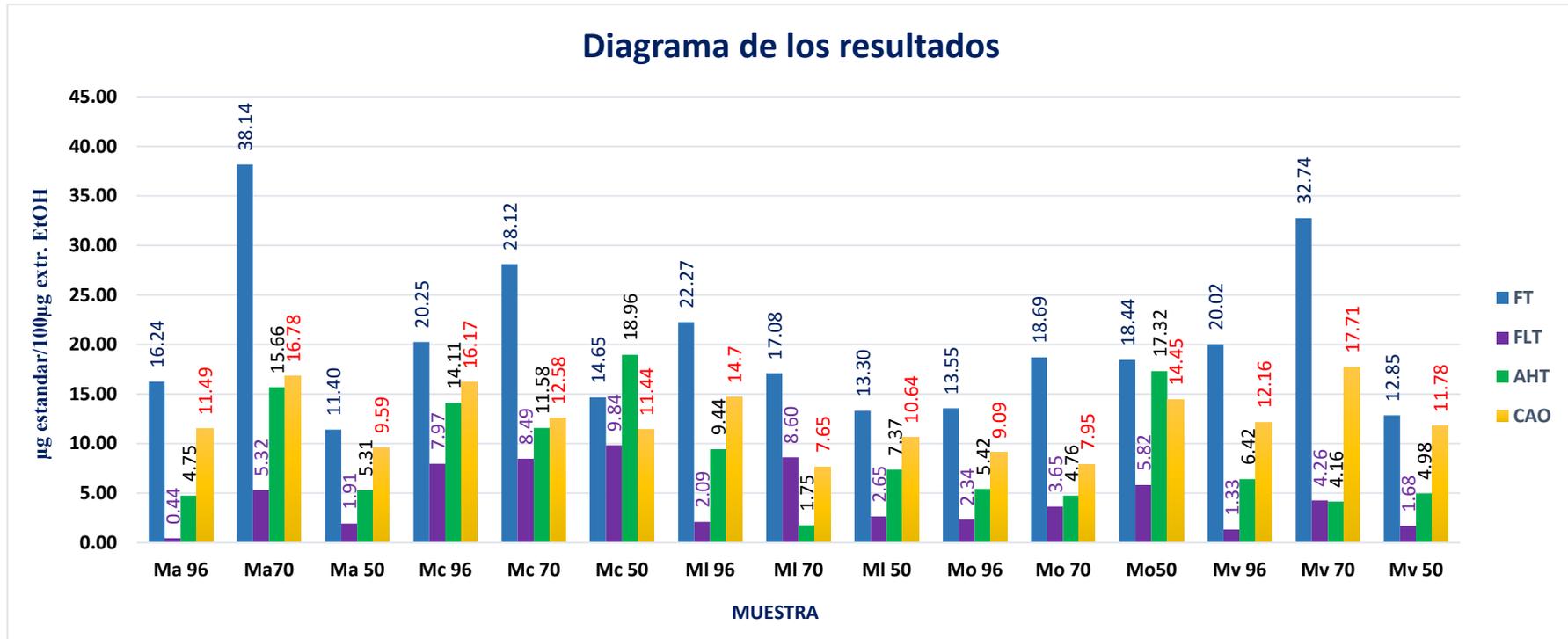


Figura 25 Diagrama de resultados de análisis cuantitativo preliminar de fenoles, flavonoides, ácidos hidroxicinnámicos totales y capacidad antioxidante

Donde:

- FT= Fenoles totales.
- FLT= Flavonoides totales.
- AHT = Ácidos hidroxicinnámicos totales.
- CAO = Capacidad antioxidante.

3.4 Perfil Cromatográfico en Capa Fina de Sustancias Fenólicas

Figura 26 Cromatograma de agliconas libres de los extractos etanólicos de las cinco especies

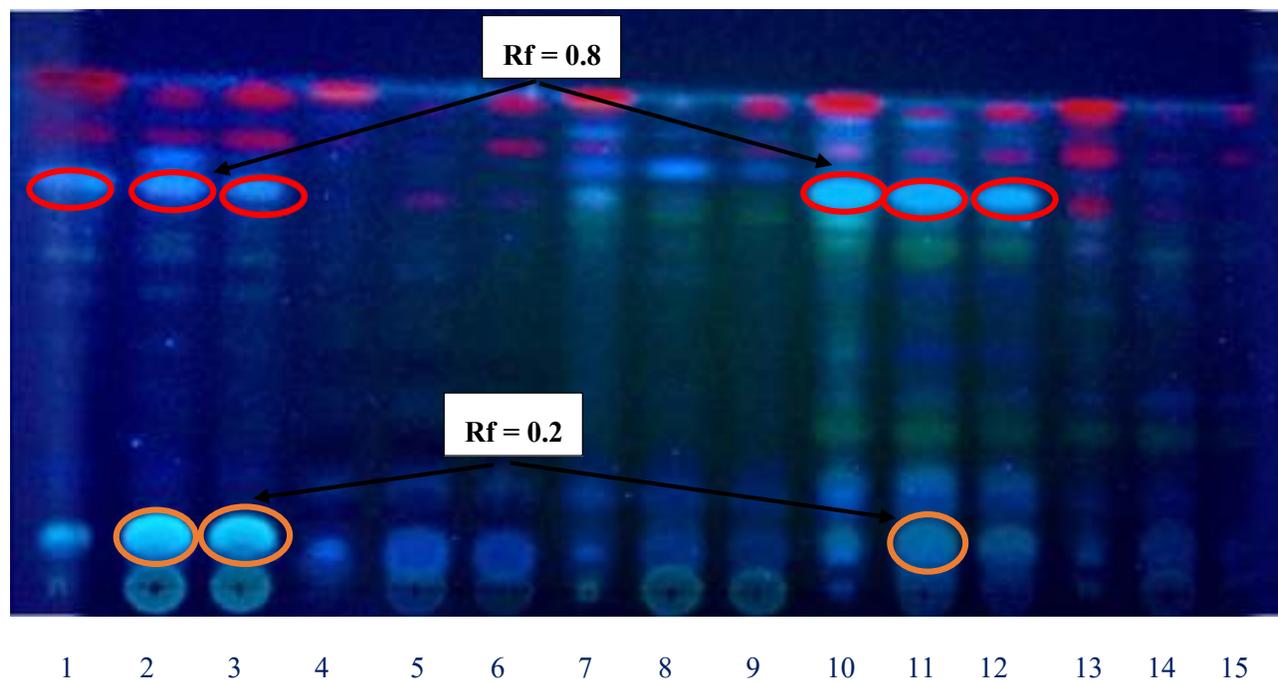
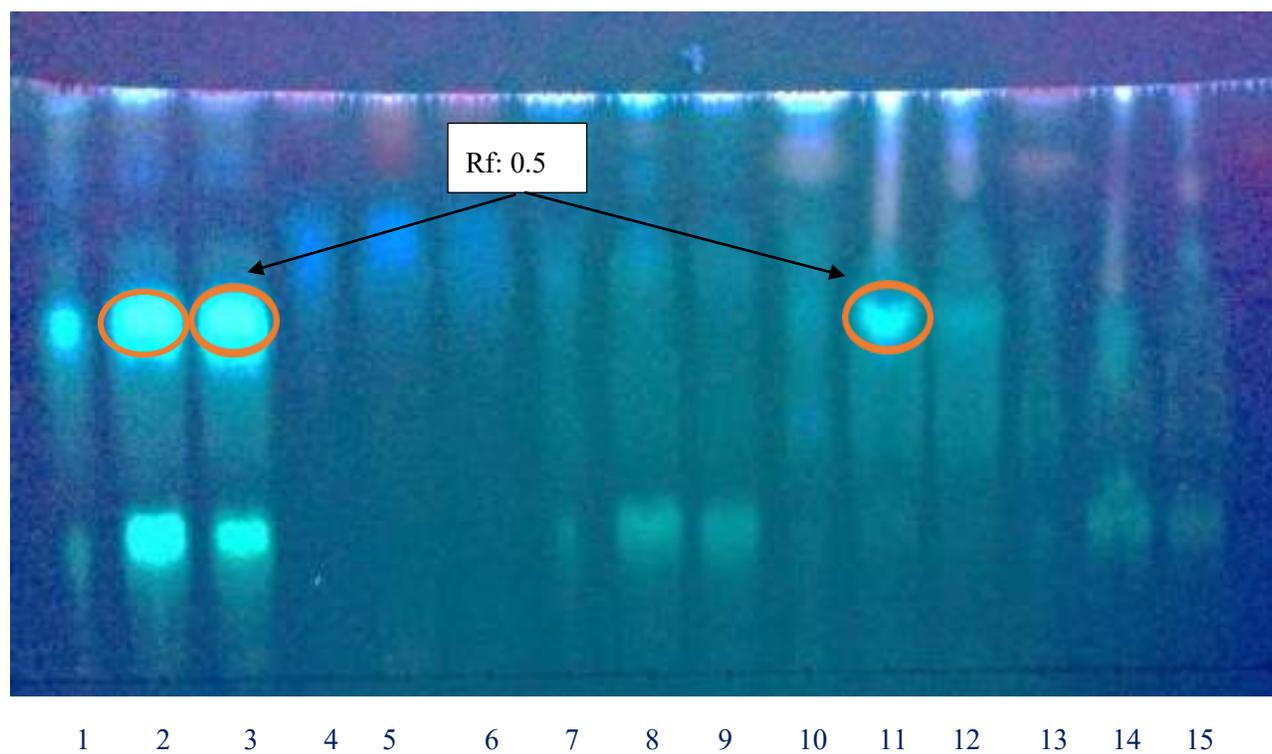


Figura 27 Cromatograma de glicósidos de los extractos etanólicos de las cinco especies



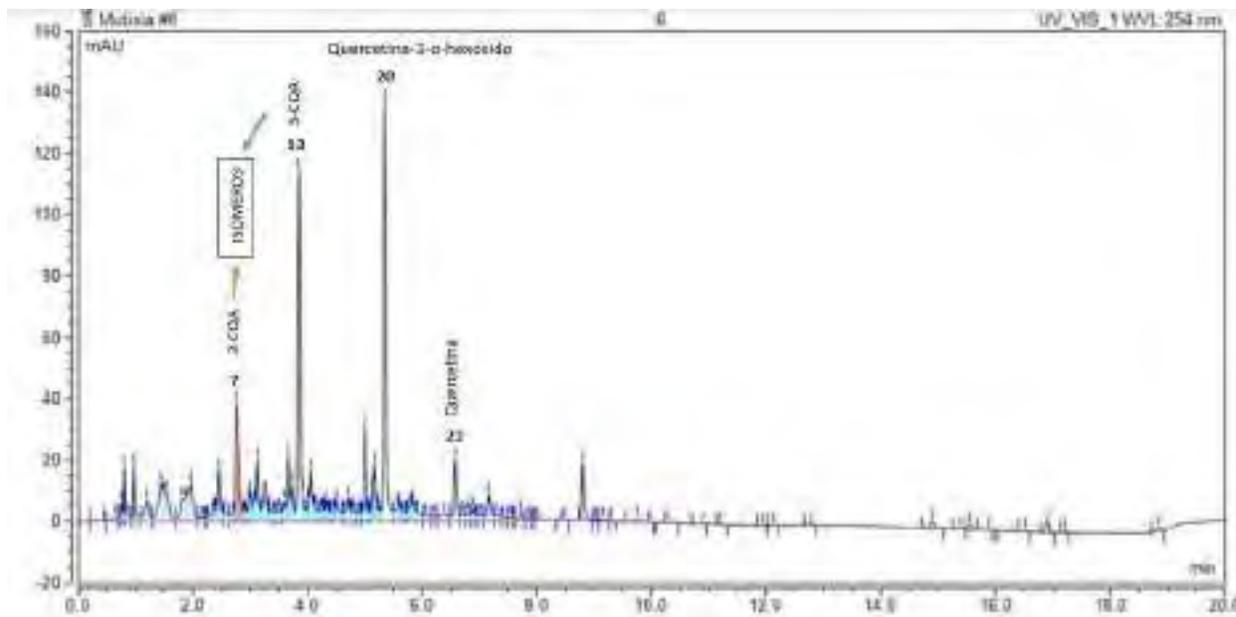
Las figuras 26 y 27 son los cromatogramas, revelados con difenilborinato de etanolamina, utilizando fase móvil de agliconas y glicósidos, respectivamente. En el cromatograma de las agliconas, las zonas celestes generalmente derivados de ácidos hidroxicinnámicos o fenoles no flavonoides-con Rf 0.8 y 0.2, son particularmente discernibles. Además, se aprecian zonas amarillas-naranjas que son típicos de flavonoides. En el cromatograma de glicósidos aparecen señales celestes intensas en 1, 2, 3 y 11 con Rf de 0.5. Los resultados de la cromatografía de capa fina indica que los extractos etanólicos de las cinco especies tienen una mezcla de metabolitos. Según Martínez & María, (2019), el grado de elución de las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado y según (Huayhua & Moya, 2018), los componentes de la muestra recorren por la placa a diferentes velocidades que dependen de su solubilidad y de su grado de retención por la fase estacionaria.

3.5 Perfil de Sustancias Fenólicas por Cromatografía Líquida con Detección UV (UHPLC-DAD)

La información que provee la cromatografía en capa fina es limitada entonces fue conveniente caracterizar los extractos al 70 % por UHPLC-DAD, se eligió el extracto en etanol al 70% pues los resultados del análisis cuantitativo preliminar muestran mayor concentración de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinnámicos totales con respecto a los otros extractos en etanol del 96 y 50%.

En el siguiente cromatograma (figura 28) se presenta el perfil de sustancias fenólicas por UHPLC-DAD en el extracto al 70% de *M. acuminata*.

Figura 28 Cromatograma por UHPLC-DAD del extracto etanólico al 70% de *Mutisia*



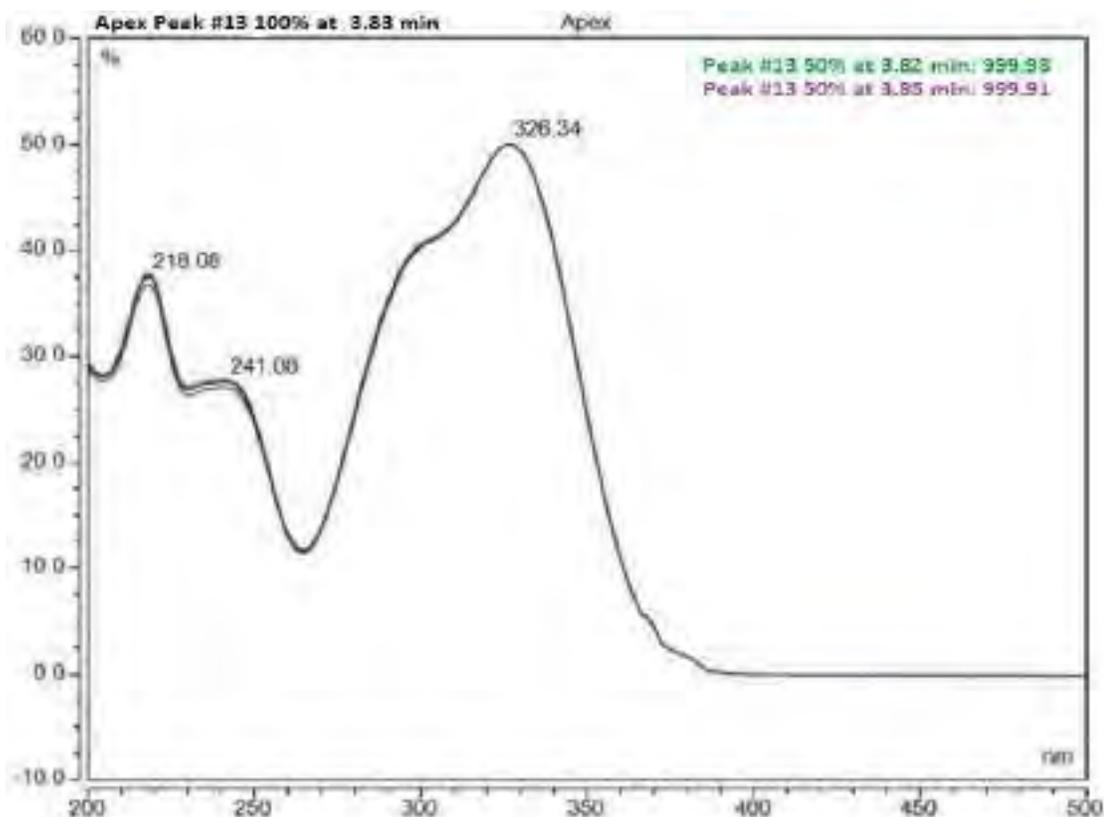
La tabla 23 muestra tentativamente los resultados de análisis del perfil cromatográfico con detección de UV (HPLC-DAD) empleando diferentes estándares. Se observa que los extractos etanólicos al 70% evaluados, contienen ácidos cafeoilquínicos y quercetina libre y glicosilada.

Tabla 23 Perfil de Sustancias Fenólicas por Cromatografía Líquida con Detección de UV (UHPLC-DAD) de los Extractos Etanólicos al 70 %.

Sustancia	tR	máximos de absorción de espectro UV experimentales	Especies				
			Ma	Mc	Ml	Mo	Mv
Ácido 3-cafeoilquínico	3.3	217.91, 236.89, 325.48	+	+	-	-	-
Ácido 5-cafeoilquínico	3.9	218.8, 241.36, 326.57	+	+	+	-	-
Quercetina-3-O-hexósido	5.3	204.1, 256.61, 355.60	+	+	+	+	+
Ácido 4-cafeoilquínico	5.8	218.18, 242.22, 328.06	-	-	+	+	+
Quercetina	7.2	204, 255.5, 372	+	+	+	+	+

Espectro UV de cromatograma figura 28 del extracto etanólico al 70% de *Mutisia acuminata* con tiempo de retención 3.83min que corresponde al pico 13

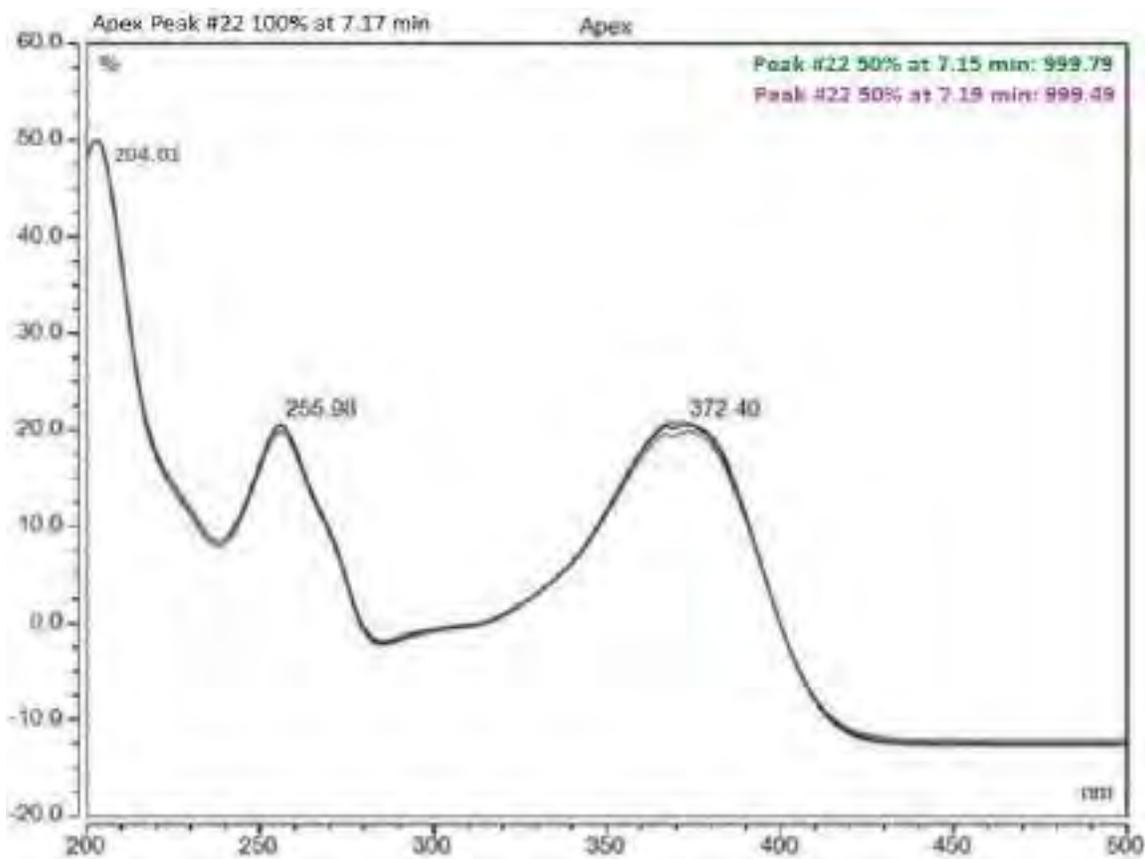
Figura 29 Espectro UV de ácido 5-cafeoilquinico en extracto etanólico de Mutisia acuminata



Espectro UV experimental que representa los isómeros de ácidos monocafeoilquinicos como el ácido 3-cafeoilquinico y ácido 5-cafeoilquinico con tiempo de retención de 3.83min, presentes en los extractos etanólicos al 70% de *Mutisia acuminata*, comparados con los estándares utilizados y la referencia según (Vinayagam & Sudha, 2015), presentan máximos de absorción a 218, 242, 326 nm, esto confirma que el extracto contiene los ácidos monocafeoilquinicos, aunque el tiempo de retención varía en algunos, esto se debe a las condiciones de la metodología y características de la columna.

Espectro UV de cromatograma figura 28 del extracto etanólico al 70% de *Mutisia acuminata* con tiempo de retención 7.17 min que corresponde al pico 22

Figura 30 Espectro UV de quercetina en extracto etanólico de Mutisia acuminata

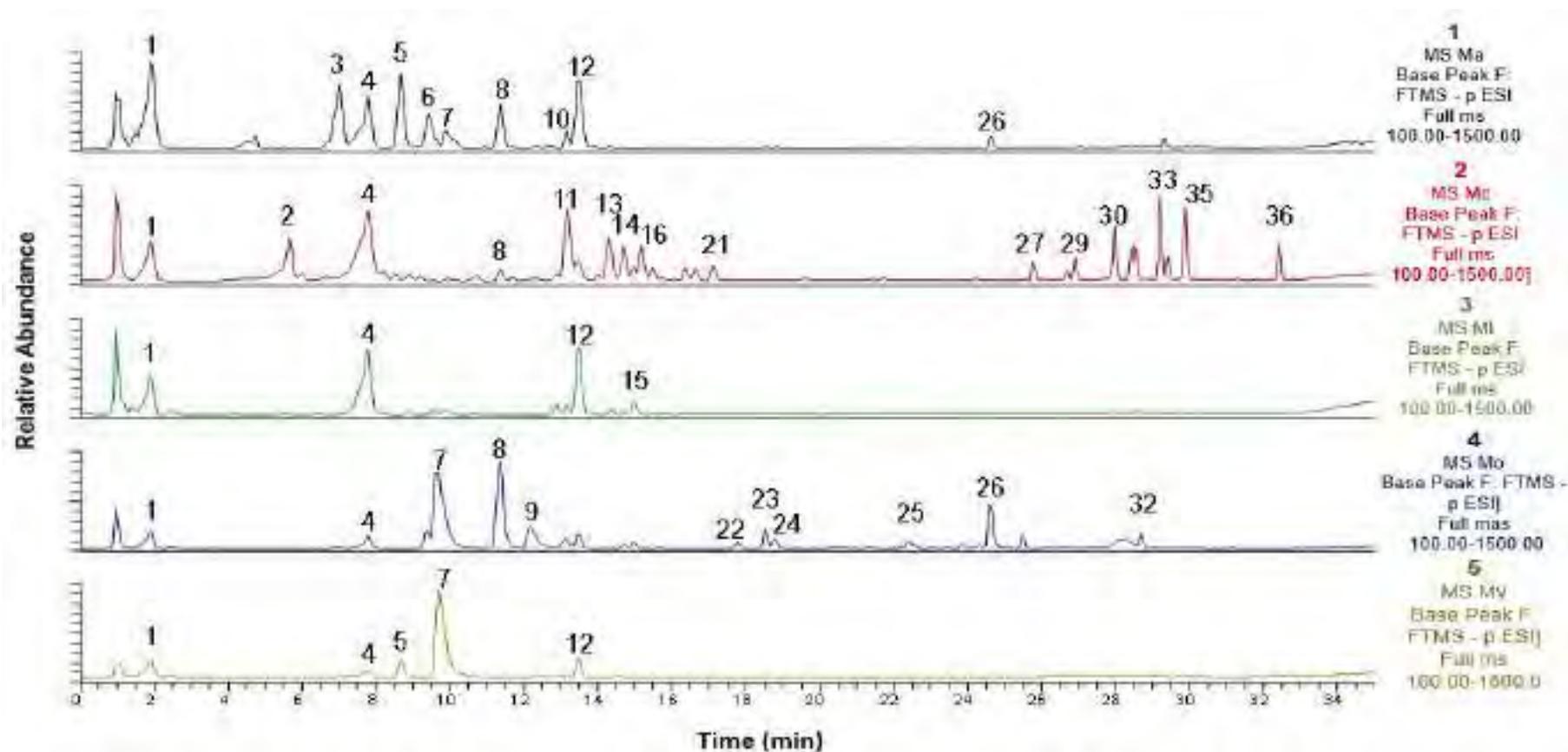


Espectro UV experimental de quercetina presente en extracto etanólico al 70% de *Mutisia acuminata*, el pico 22 en el cromatograma, figura 30, con tiempo de retención de 7.17 min, comparados con los estándares utilizados y la referencia según Gaitén et al., (2010), presentan máximos de absorción a 204, 256, 369 respectivamente, confirman que el extracto etanólico de *Mutisia acuminata* contiene quercetina.

3.6 Perfil de Sustancias Fenólicas por Cromatografía Líquida Asociada a Espectrometría de Masas (UHPLC-MS/MS)

En la figura 31 se muestran los cromatogramas de los cinco extractos etanólicos al 70%, con el detector Orbitrap en el modo ESI+/-, donde *M. acuminata* (1), *M. cochabambensis* (2), *M. lanata* (3) *M. orbignyana* (4) y *M. venusta* (5).

Figura 31 Perfil de sustancias fenólicas por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) ESI-



*El detalle de cada cromatograma y su espectro de masa se muestra en anexos.

3.6.1 Principales Constituyentes de Acuerdo con los Espectros de UHPLC-MS/MS

La visualización de los espectros MS/MS implicó visualízalos con el software Thermo Xcalibur 3.1.66.10 (2015) a partir de los archivos *Raw* preferentemente al modo ESI-. Los resultados aparecen en la tabla 24.

Tabla 24 Principales constituyentes identificados de las cinco especies de *Mutisia*

No	RT	[M-H] ⁻			Formula Molecular	Identificación tentativa	Muestras				
		Masa Experimental	Masa Teórico	Δ ppm			MA	MC	ML	MO	MV
1	1.9	317.0872	317.0871	0.32	C ₁₃ H ₁₈ O ₉	No identificado	+	+	+	+	+
2	5.69	353.0871	353.0872	0.28	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	-	+	-	-	-
3	6.92	399.0567	399.0564	-0.75	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₂	No hay resultados en DPN	+	-	-	-	-
4	7.77	353.0875	353.0872	-0.85	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	+	+	+	+	+
5	8.64	383.0619	383.0615	-1.04	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁	No identificado	+	-	-	-	+
6	9.4	221.0073	221.0086	5.88	C ₁₀ H ₆ O ₆	Ácido dihidroxicumarínico-carboxílico	+	-	-	+	-
7	9.7	251.0184	251.0192	3.19	C ₁₁ H ₈ O ₇	No identificado	+	-	-	+	+
8	11.37	383.0984	383.0978	-1.57	C ₁₆ H ₁₈ O ₈ + CH ₂ O ₂	5-metilcumarina-4-glucósido (aducto del ácido fórmico)	+	+	-	+	-
9	12.25	235.0232	235.0243	4.68	C ₁₁ H ₈ O ₆	No identificado	-	-	-	+	-
10	13.11	609.1479	609.1455	-3.94	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido	+	+	+	+	+
11	13.18	463.0885	463.0876	-1.94	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	-	-	+	-	-
12	13.5	477.0677	477.0669	-1.68	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	Quercetina 3- <i>O</i> -glucurónido	+	+	+	+	+
13	14.35	433.0777	433.0771	-1.39	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	Pentósido de quercetina	-	+	-	-	-
14	14.7	433.0777	433.0771	-1.39	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	Pentósido de quercetina	-	+	-	-	-

15	14.9	515.1202	515.1189	-2.52	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Ácido 3,5- <i>O</i> -Dicafeoilquínico	-	+	-	-	-
16	15.18	477.1043	477.1033	-2.10	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Hexósido de isoramnetina	-	+	-	-	-
17	15.5	477.1044	477.1033	-2.31	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Hexósido de isoramnetina	-	+	-	-	-
18	16.03	515.1205	515.1189	-3.11	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Ácido 4,5- <i>O</i> -Dicafeoilquínico	-	+	-	-	-
19	16.4	447.0936	447.0928	-1.79	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Glucósido flavonoide	-	+	-	-	-
20	16.72	447.0938	447.0928	-2.24	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Glucósido flavonoide	-	+	-	-	-
21	17.16	447.0939	447.0928	-2.46	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Glucósido flavonoide	-	+	-	-	-
22	17.76	287.0556	287.0555	0.35	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	Eriodictyol	+	+	+	+	+
23	18.52	175.0395	175.0392	1.71	C ₁₀ H ₈ O ₃	4-Hidroxi-5-metilcumarina	-	-	-	+	-
24	18.80	301.0349	301.0355	-1.99	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	+	+	+	+	+
25	22.49	315.0505	315.0507	-0.63	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Isoramnetina	+	+	+	+	+
26	24.57	281.0445	281.045	1.78	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	11,12-Dihidroxi-5-metilcumestán	+	+	+	+	+
27	25.75	425.1972	425.1964	-1.88	C ₂₅ H ₃₀ O ₆	No identificado	-	+	-	-	-
28	26.74	425.1975	425.1964	-2.59	C ₂₅ H ₃₀ O ₆	No identificado	-	+	-	-	-
29	26.94	409.2021	409.2015	-1.47	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	No identificado	-	+	-	-	-
30	27.96	411.2175	411.2172	-0.73	C ₂₅ H ₃₂ O ₅	No identificado	-	+	-	-	-
31	28.40	409.2021	409.2015	-1.47	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	No identificado	-	+	-	-	-
32	28.56	327.1595	327.1597	0.61	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	Mutisicumarina A o isómero	+	+	-	+	-
33	29.21	395.2225	395.2223	-0.51	C ₂₅ H ₃₂ O ₄	5-metil-2,8-dihidroxi-3-farnesilcromo	-	+	-	-	-
34	29.41	393.2074	393.2066	-2.03	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	Mutisicumarina C	-	+	-	-	-
35	29.93	311.1644	311.1647	0.96	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	4-geraniloxi-5-metilcumarina	-	+	-	-	-
36	32.42	379.2278	379.2273	-1.32	C ₂₅ H ₃₂ O ₃	5-metil-4-hidroxi-3-farnesilcumarina	-	+	-	-	-

De acuerdo a la figura 31 en los cromatogramas de los extractos etanólicos al 70%, de las cinco especies, en el modo ESI- utilizando el pico base para rango de trabajo de 100 a 1500 m/z se detectan 36 señales de las cuales 27 han sido tentativamente identificadas.

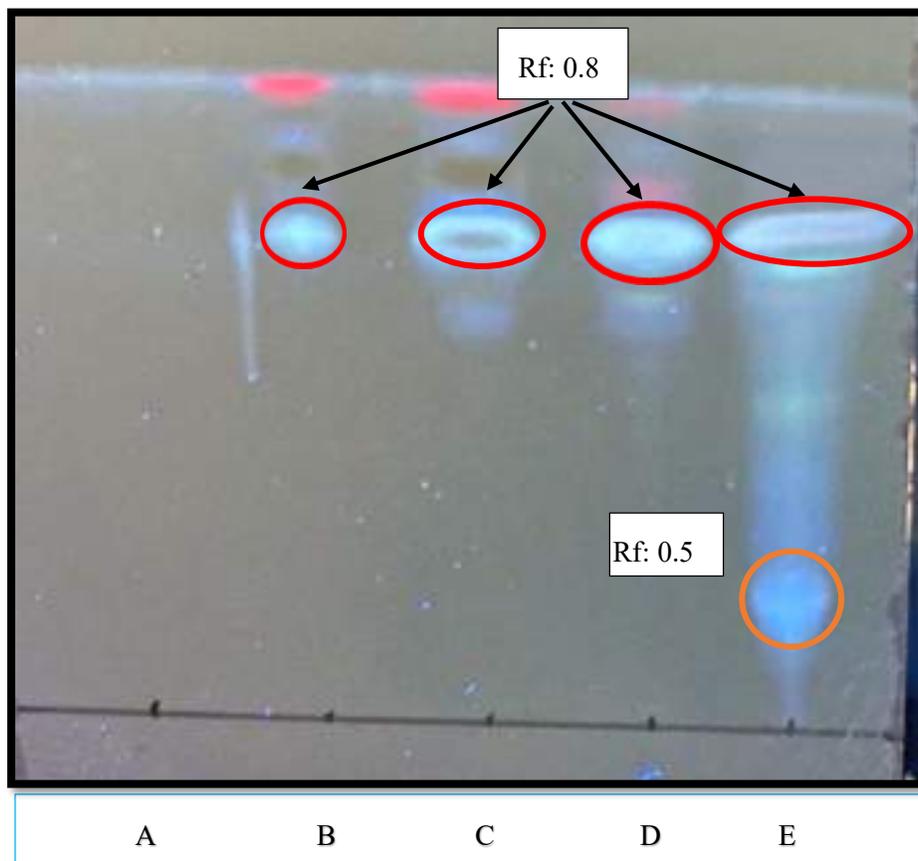
Primero por comparación con el estándar utilizado se identificaron los derivados del éster del ácido cafeico, ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**2**), ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**4**), 3,5-*O*-dicafeoilquínico (**15**), ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico (**18**); así como los flavonoides quercetina 3-*O*-rutinósido (**10**), quercetina 3-*O*-glucósido (**11**) y quercetina 3-*O*-glucurónido (**12**). Además, los compuestos **13**, **14**, **16**, **17**, **19**, **20** y **21** se identificaron como glucósidos flavonoides, por comparación de sus datos de MS y fórmulas moleculares con los resumidos en el diccionario de productos naturales (DNP), igualmente el eriodictiol (**22**), la quercetina (**24**) y la isorhamnetina (**25**). Los siguientes compuestos se identificaron por comparación de sus datos masas y fórmulas con la bibliografía publicado de las investigaciones en género *Mutisia*: los compuestos (**8**) y (**26**) con Daily et al., (1988) y Flores et al. (2009), asimismo (**23**), (**36**) y (**33**) con Zdero et al., (1986), también (**32**) y (**34**) con Viturro et al. (2004) y finalmente (**35**) con Zdero et al. (1988).

Adicionalmente se observa que los siguientes compuestos están presentes en las cinco especies: ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**4**), Quercetina 3-*O*-rutinósido (**10**), Quercetina 3-*O*-glucurónido (**12**), eriodictiol (**22**), la quercetina (**24**), isorhamnetina (**25**) y 11,12-Dihidroxi-5-metilcumestán (**26**).

3.7 Purificación de Metabolitos Secundarios Mayoritarios

Se trabajó según la metodología de 2.5.6 descrita en la parte experimental de aislamiento de extracto etanólico al 96% de *Mutisia orbignyana* se muestra el siguiente cromatograma de capa fina, figura 32.

Figura 32 Cromatograma de purificación de metabolitos mayoritarios revelado en lámpara UV a 366nm



Según este cromatograma se separaron dos metabolitos mayoritarios presentes en *Mutisia orbignyana*. De acuerdo a la cromatografía las fracciones B, C y D se agruparon por similitud del Rf, eliminándose el disolvente y luego se trató con etanol caliente y frío para la cristalización, y de igual manera se trató a la fracción E.

Figura 33 Cristales de las fracciones de B,C y D (compuesto A)



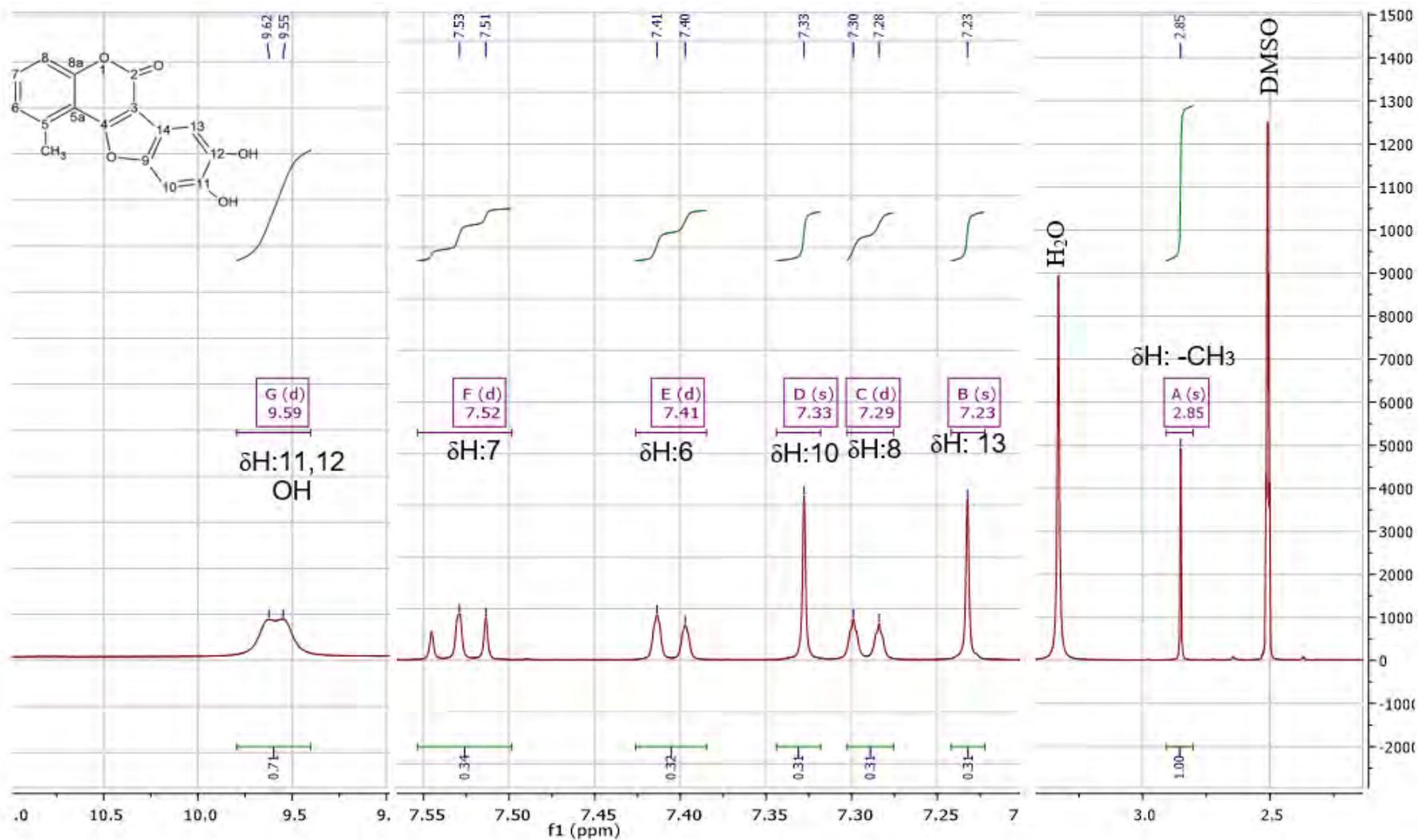
Figura 34 Cristales de la fracción E (compuesto B)



Las figuras 33 y 34 muestran los cristales de **A** que se obtuvo 17.1 mg con rendimiento 0.034% y de **B** se obtuvo 27mg con 0.054%, los mismos se llevaron para el análisis de RMN a la Pontificia Universidad Católica del Perú para poder identificar y garantizar que tipo de compuesto está presente en las especies de género *Mutisia*.

3.7.1 ^1H RMN del Compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano)

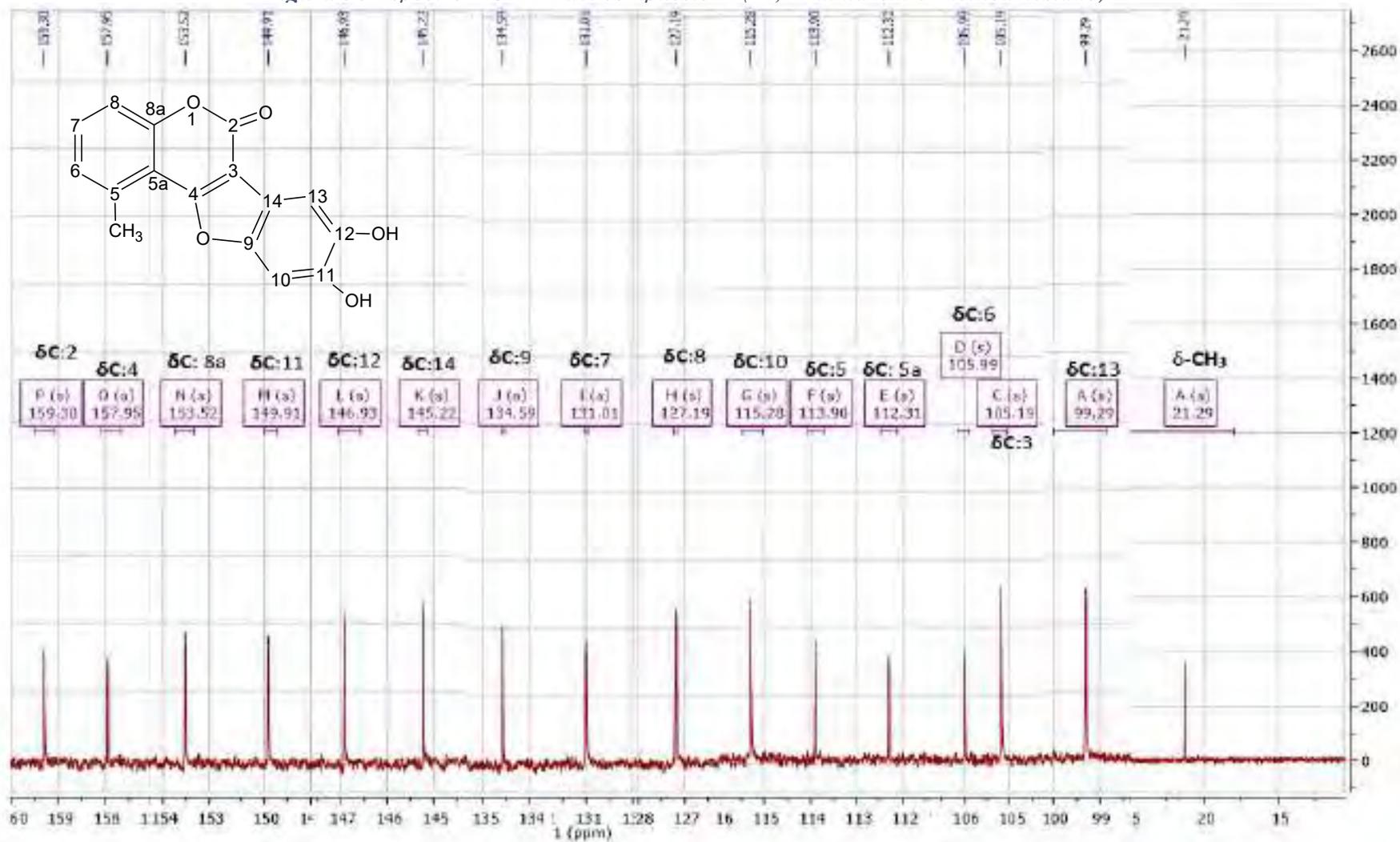
Figura 35 Espectro de ^1H RMN del compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano)



Nota. figura 35 representa ^1H RMN del compuesto A en DMSO- d_6 a 500 MHz

3.7.2 ^{13}C RMN del Compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano)

Figura 36 Espectro ^{13}C RMN del compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano)



Nota. figura 36 representa ^{13}C RMN del compuesto A en DMSO- d_6 a 125 MHz

Los cristales del compuesto (A) obtenido son de color amarillo pálido. La espectrometría de masas de alta resolución sincronizada con el software Xcalibur sugirió que la composición elemental es $C_{16}H_{10}O_5$, seguido con la búsqueda en el diccionario de productos naturales y para garantizar el compuesto tentativo se muestra los resultados experimentales de 1H -RMN y ^{13}C -RMN comparados con los datos experimentales según (Flores, 2009) (Daily, 1988). (véase las Tabla 25)

Se muestra la siguiente estructura del compuesto A correspondiente a 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano la numeración se siguió según Daily et al. (1988)

Figura 37 Estructura química del compuesto A (11,12-dihidroxi-5-metilcumestano)

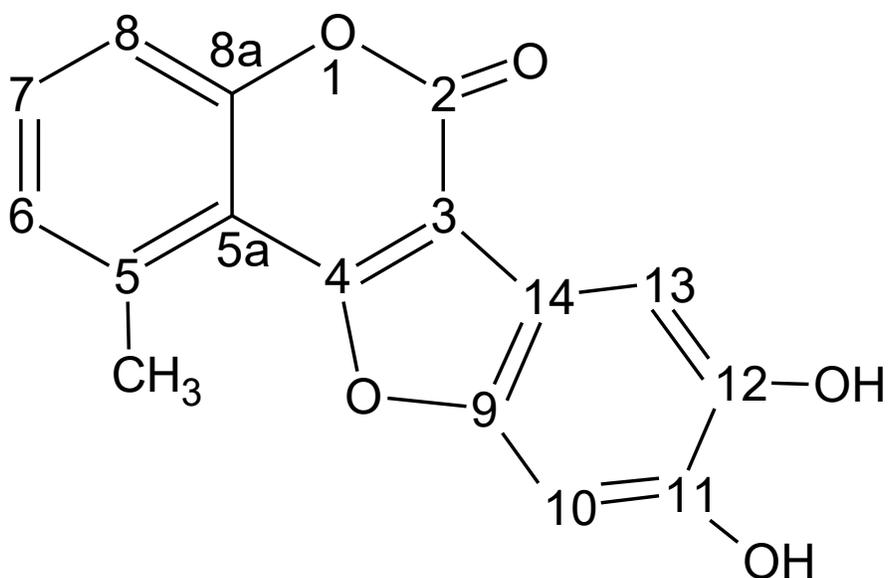


Tabla 25 Señales de RMN de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano.

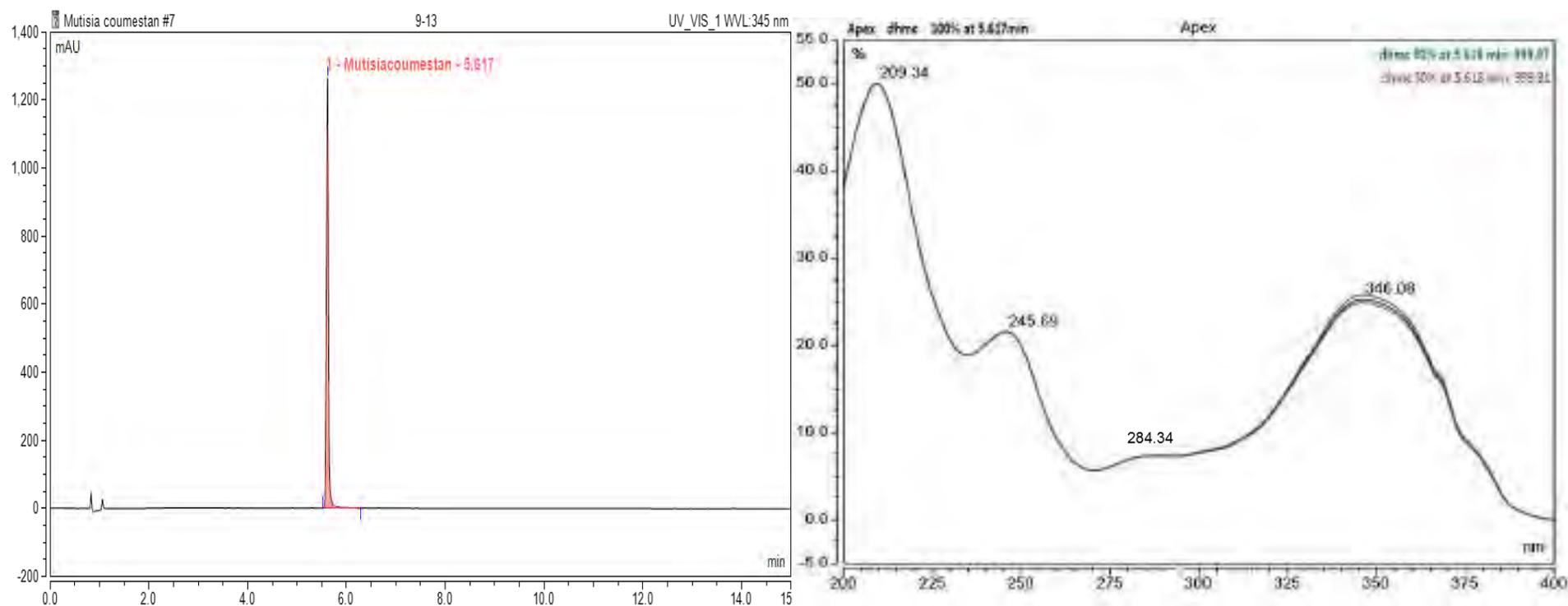
RMN de 11,12dihidroxi-5-metilcoumestano						
Nº	$\delta^{13}\text{C}$ RMN Experimental en DMSO-d ₆ a 125 MHz	$\delta^{13}\text{C}$ RMN Experimental (Flores,2009) en DMSO-d ₆ a 100 MHz	$\delta^{13}\text{C}$ RMN Experimental (Daily, 1988) en DMSO-d ₆ a 125 MHz	$\delta^1\text{H}$ RMN Experimental en DMSO-d ₆ a 500 MHz	$\delta^1\text{H}$ RMN Experimental (Flores,2009) en DMSO-d ₆ 400 MHz)	$\delta^1\text{H}$ RMN Experimental (Daily, 1988) en DMSO-d ₆ 500 MHz
2	159.3	158.8	158.7			
3	105.2	104.4	104.8			
4	157.9	157.4	157.3			
5a	112.3	111.8	111.8			
5	113.9	113.4	113.5			
6	105.9	105.5	105.5	7.41	7.23	7.35
7	131.0	130.5	130.3	7.53	7.47	7.48
8	127.2	126.7	126.6	7.29	7.34	7.23
8a	153.5	153.0	153.0			
-CH ₃	21.3	20.8	20.7	2.85	2.79	2.80
9	134.6	134.1	134.1			
10	115.3	114.7	114.7	7.30	7.29	7.33
11	149.9	149.4	149.5			
12	146.9	146.4	146.6	9.59		8.30
13	99.3	98.8	98.8			
14	145.2	144.7	144.8	7.23	7.19	7.21

* Datos experimentales del análisis del RMN fueron comparados con los datos experimentales según (Flores et al. 2009; Daily et al. 1988)

Los datos del análisis del RMN interpretados de acuerdo a la estructura química como la posición, los protones presentes, el número de núcleos, las características de las señales espectrales como simples, dupletes, tripletes, etc. coinciden con los datos experimentales de las referencias mencionadas, que corresponden al compuesto orgánico de 11,12-hidroxi-5-metilcumestano.

3.7.3 Cromatograma de UHPLC y Espectro UV de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano

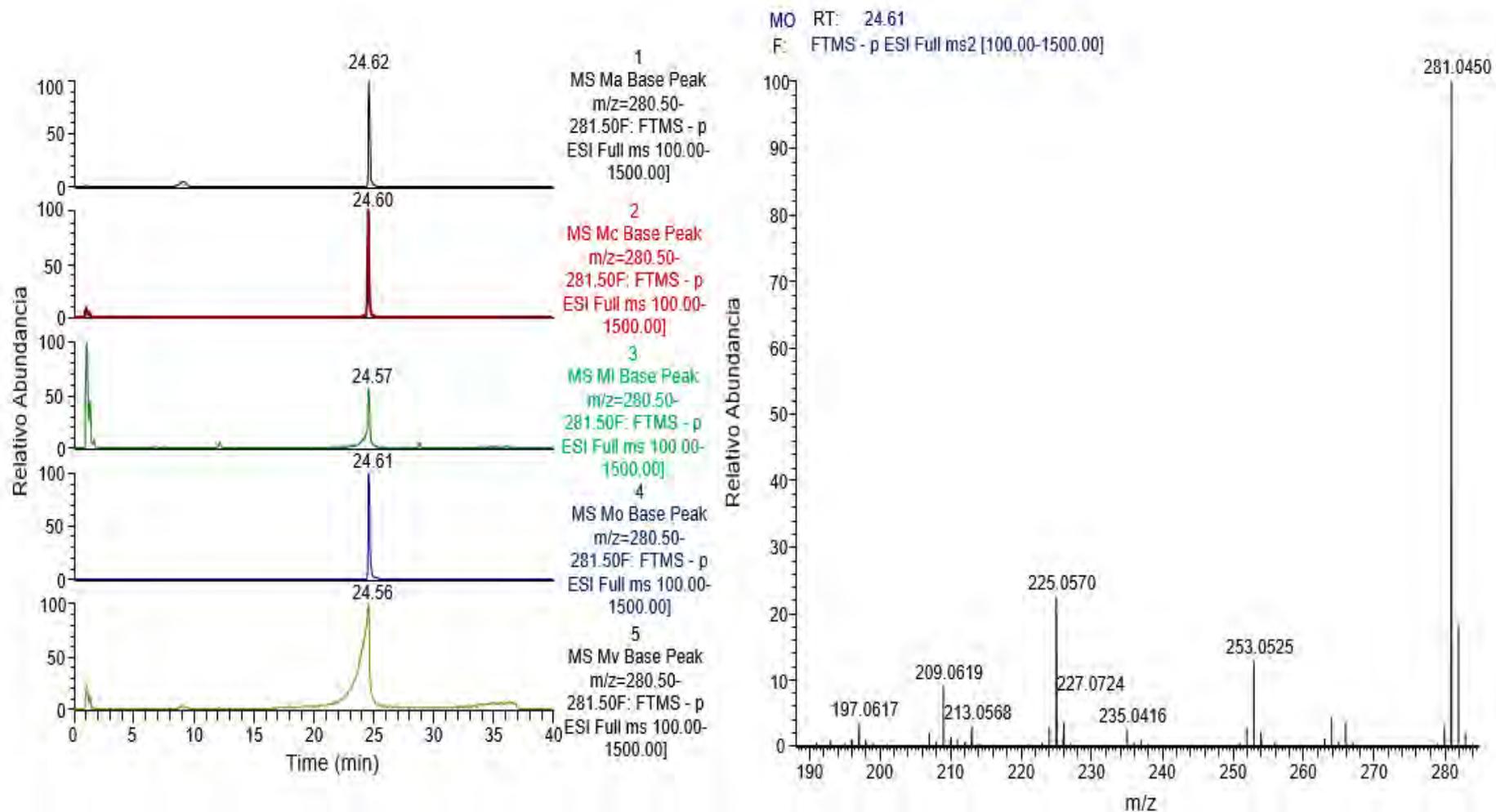
Figura 38 Cromatograma de UHPLC de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y espectro UV



También la purificación del 11, 12-dihidroxi-5-metilcumestano se comprobó por medio de la cromatografía de UHPLC-DAD con la metodología descrito en la parte experimental. En la figura 38 se muestran el cromatograma y el espectro UV con máximos de absorción (209.34; 245.69, 346.08) experimentales, que coinciden con el anexo 14 análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de *Mutisia acuminata*.

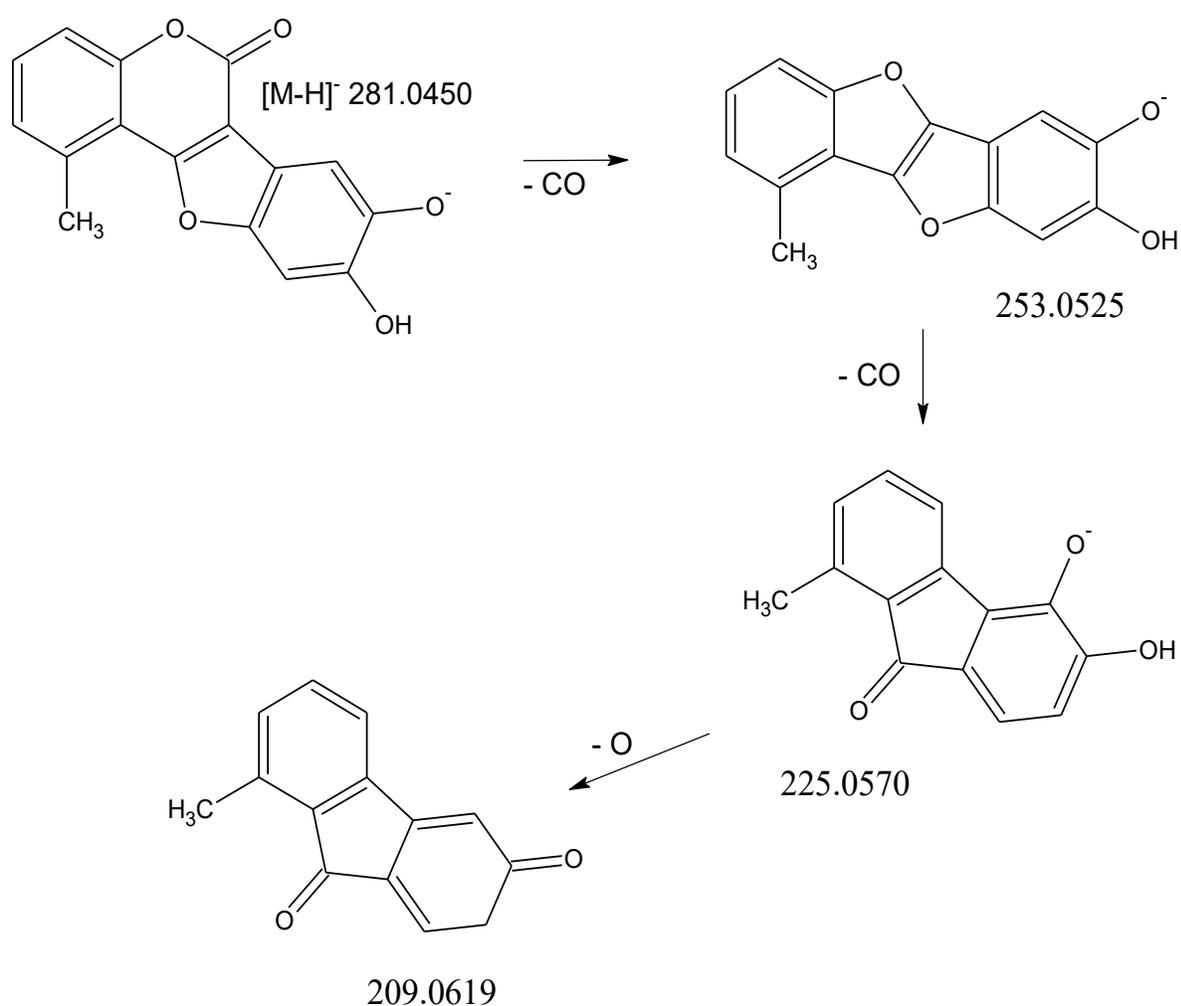
3.7.4 Cromatograma y Espectro de Masas (UHPLC-MS/MS) de 11,12- dihidroxi-5-metilcumestano en las cinco especies

Figura 39 Cromatograma de UHPLC-MS/MS de 11,12- dihidroxi-5-metilcumestano



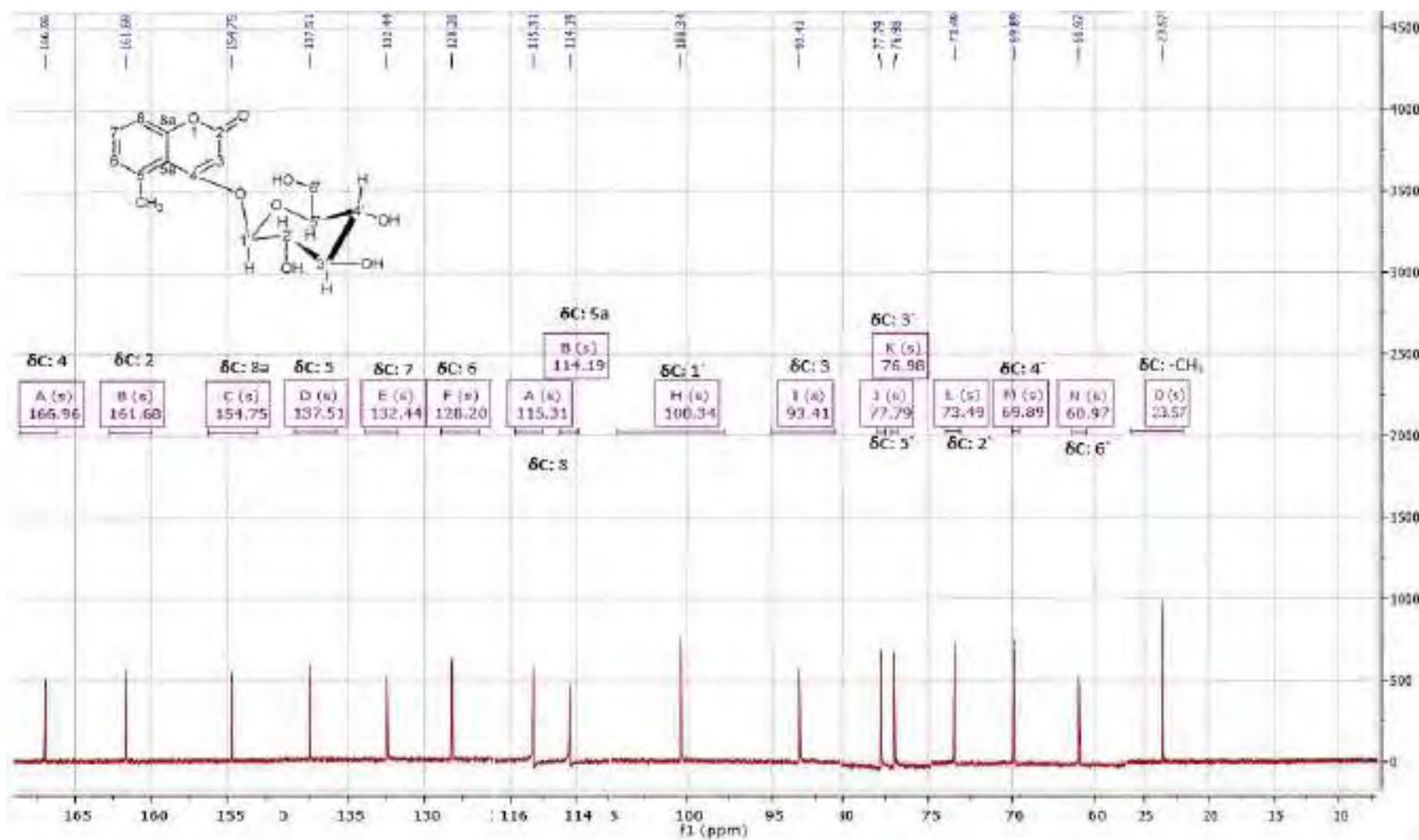
Después de comprobar el compuesto (A) se pasó a comparar los cromatogramas de UHPLC-MA/MS se observa que los extractos de las cinco especies estudiadas mostraron la presencia de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano por la alta sensibilidad del equipo. En algunos casos como *M. cochabambensis*, *M. lanata* y *M. venusta* con concentraciones bajísimas solo detectables con un Orbitrap. Así mismo se plantea la fragmentación de acuerdo al espectro de masas que aparece en la figura 40.

Figura 40 Planteamiento de fragmentación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano



3.7.6 ^{13}C RMN del Compuesto B (5-metilcumarina-4-glucósido)

Figura 42 ^{13}C RMN del compuesto B (5-metilcumarina-4-glucósido)



Nota. figura 42 representa ^{13}C RMN del compuesto B en DMSO- d_6 a 125 MHz

Los cristales obtenidos del compuesto (**B**) tienen la forma de agujas y color blanco. La espectrometría de masas de alta resolución sincronizada con el software Xcalibur sugirió la composición elemental $C_{17}H_{20}O_{10}$, consiguientemente la búsqueda en el diccionario de productos naturales y para afirmar el compuesto tentativo se muestra 1H -RMN y ^{13}C -RMN con los datos experimentales según Flores *et al*, (2009) (véase la tabla 26).

La estructura química de 5-metilcumarina-4-glucósido con la numeración según Flores *et al*, (2009).

Figura 43 Estructura química tentativo del compuesto **B** (5-metilcumarina -4-glucósido)

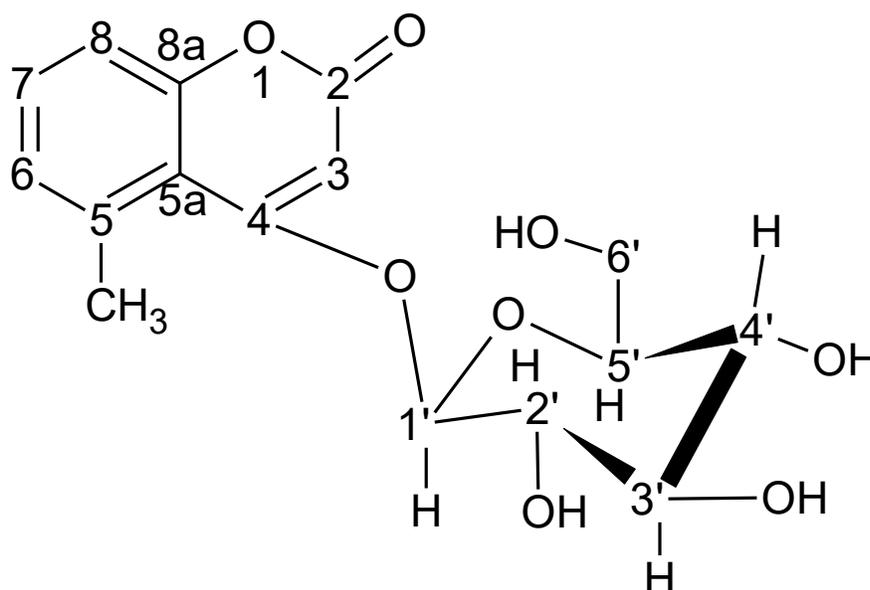


Tabla 26 Señales de RMN experimentales de 5-metilcumarina-4-glucósido.

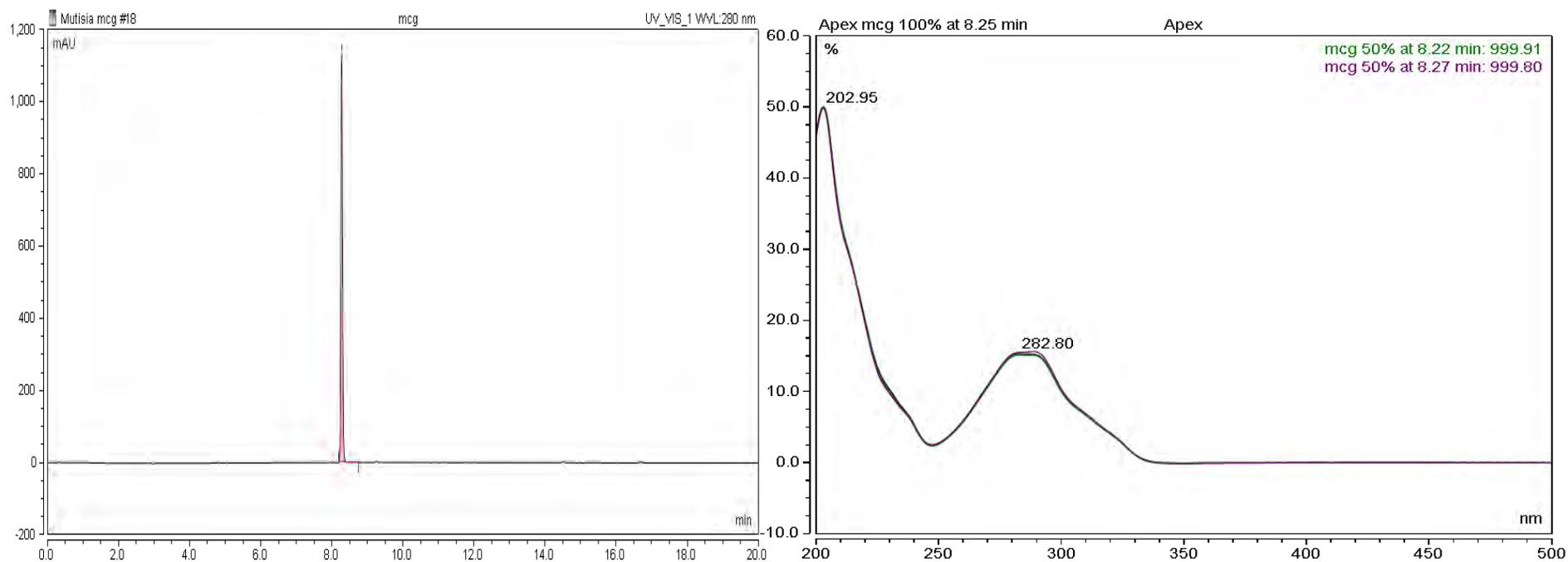
RMN de 5-metilcumarina -4-glucósido				
Nº	$\delta^{13}\text{C}$ RMN Experimental en DMSO-d₆ a 125 MHz	$\delta^{13}\text{C}$ RMN Experimental Flores, (2009) en DMSO-d₆ a 100 MHz	$\delta^1\text{H}$ RMN Experimental en DMSO-d₆ a 500 MHz	$\delta^1\text{H}$ RMN Experimental Flores, (2009) en DMSO-d₆ a 400 MHz
2	161.68	161.3		
3	93.41	93.0	5.98	5.97
4	166.96	166.6		
5a	114.19	113.8		
5	137.51	137.1		
6	128.2	127.8	7.16	7.14
7	132.44	132	7.51	7.49
8	115.31	114.9	7.25	7.22
8a	154.75	154.3		
-CH ₃	23.57	23.2	2.71	2.69
1'	100.34	99.9	5.2	5.19
2'	73.49	73.1	3.41	3.4
3'	76.98	76.6	3.39	3.35
4'	69.89	69.5	3.2	3.2
5'	77.79	77.4	3.49	3.5
6'	60.97	60.6	3.72	3.72
OH-2'			5.50	5.51
OH-3'			5.48	5.22
OH-4'			5.1	5.13
OH-6'			4.63	4.65

* Datos experimentales comparados con los datos experimentales según (Flores et al., 2009).

Los datos del análisis del RMN interpretados de acuerdo a la estructura química como la posición, los protones presentes, el número de núcleos, las características de las señales espectrales como simples, dupletes, tripletes, etc. coinciden con los datos experimentales de referencia mencionada, que corresponden al compuesto orgánico de 5-metilcumarina-4-glucósido.

3.7.7 Cromatograma UHPLC-DAD y espectro de 5-metilcumarina-4-glucósido

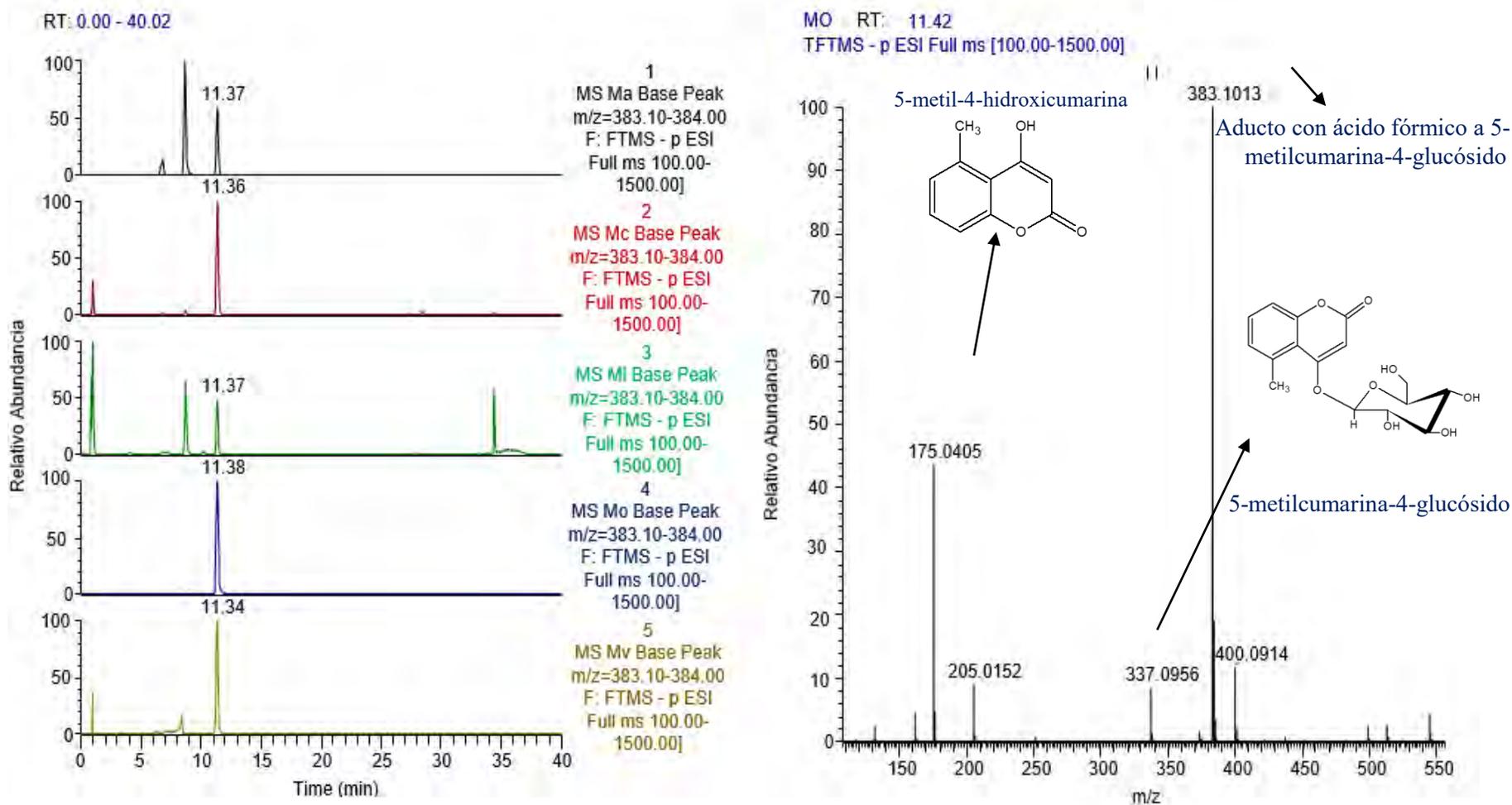
Figura 44 Cromatograma de UHPLC de 5-metilcumarina-4-glucósido y espectro UV



También la purificación del 5-metilcumarina-4-glucósido se comprobó por medio de la cromatografía de UHPLC-DAD con la metodología descrito en la parte experimental, en las siguientes figuras 44 se muestra el cromatograma y el espectro UV con máximos de absorción de 202.95 y 282.80 nm que coinciden con el anexo 14, análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de *Mutisia acuminata*.

3.7.8 Cromatograma y Espectro de Masas (UHPLC-MS/MS) de 5-metilcumarina-4-glucósido en las cinco especies

Figura 45 Cromatograma de UHPLC-MS/MS de 5-metilcumarina-4-glucósido



Después de comprobar el compuesto (**B**) se pasó a comparar los cromatogramas de UHPLC-MA/MS se observa que los extractos etanólicos al 70% de las cinco especies estudiadas mostraron la presencia de 5-metilcumarina-4-glucósido por la alta sensibilidad del equipo. Así mismo se plantea la fragmentación de acuerdo al espectro de masas que aparece en la figura 45.

3.8 Cuantificación del 11, 12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido en las cinco especies de *Mutisia*

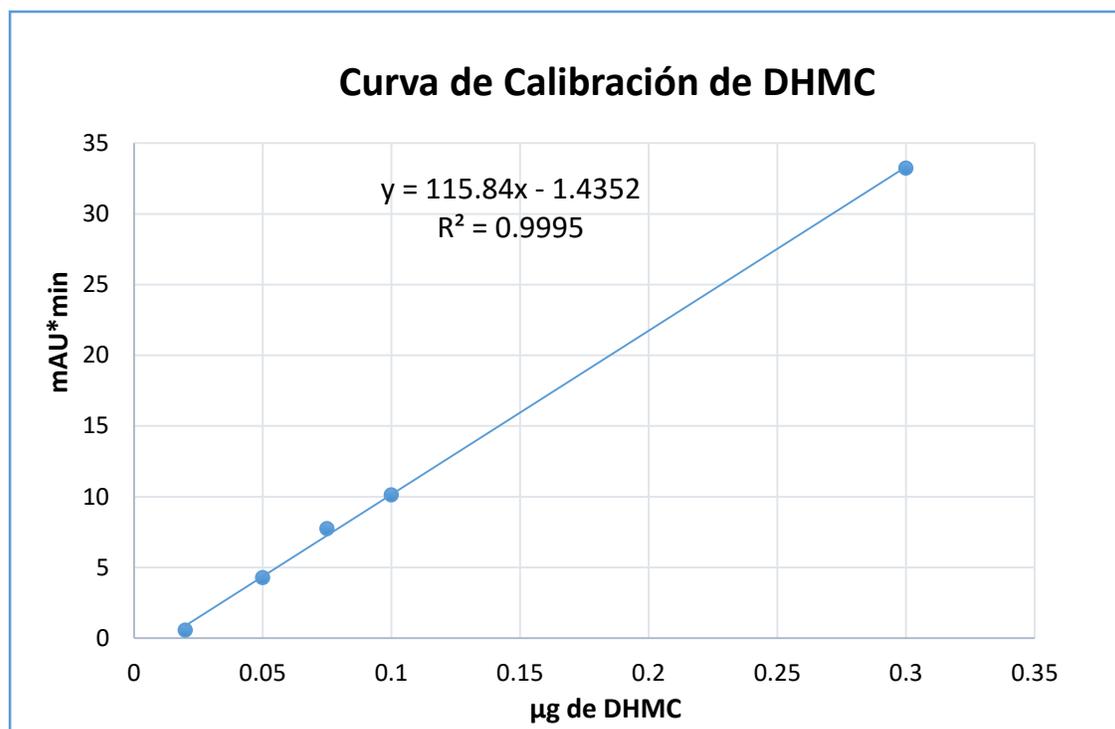
La cuantificación de los dos compuestos se realizó con los métodos cromatográficos empleados para cada una, para ello se utilizaron como estándar los productos purificados, se construyó una curva de calibración para cada compuesto y de acuerdo a ella se obtuvo el contenido en porcentaje respecto a planta seca.

3.8.1 Curva de Estandarización de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano

Tabla 27 Curva de estandarización para la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano

µg de DHMC	mAU*min
0.02	0.5753
0.05	4.2876
0.075	7.7379
0.1	10.1179
0.3	33.2371

Figura 46 Curva de calibración para la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano

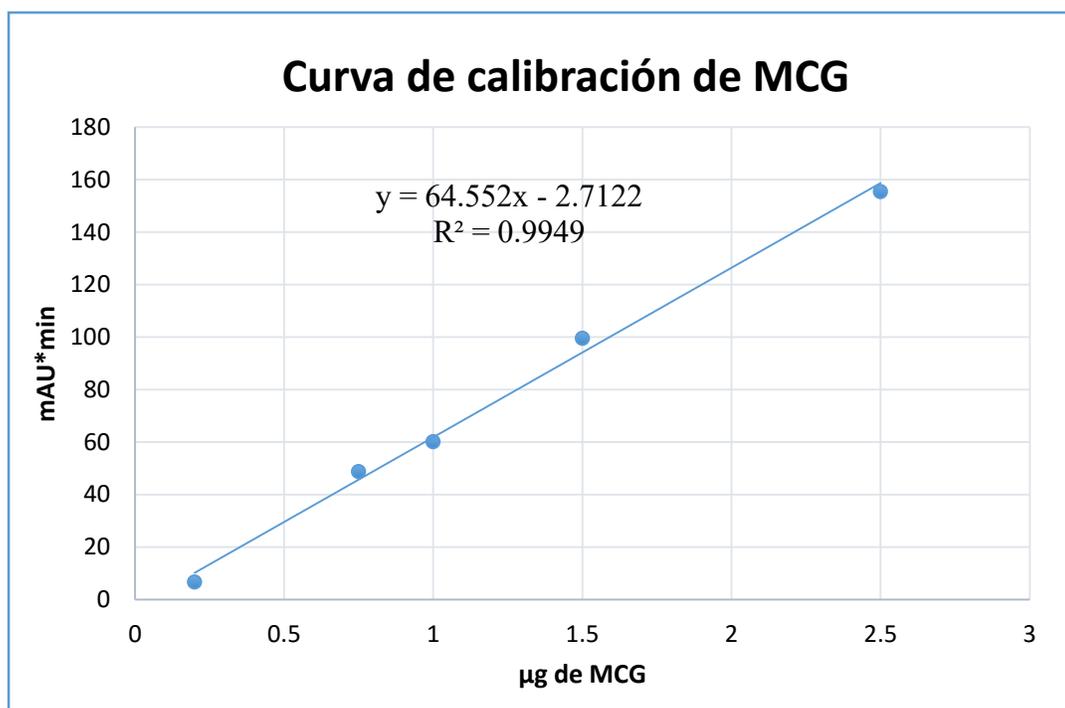


3.8.2 Curva de Estandarización de 5-metilcumarina-4-glucósido

Tabla 28 Curva de calibración de para la cuantificación de 5-metilcumarina-4-glucósido

µg MCG	mAU*min
0.2	6.614
0.75	48.7655
1	60.1371
1.5	99.5519
2.5	155.4547

Figura 47 Curva de calibración para la cuantificación de 5-metilcumarina-4-glucósido



El porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido, en la tabla 29.

Tabla 29 Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y de 5-metilcumarina-4-glucósido

N°	Muestra	Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano en extractos de AcOEt	Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano en extractos etanólicos al 70%	Porcentaje de 5-metilcumarina-4-glucósido en extractos etanólicos al 70%
1	Ma	0.34	0.08	0.36
2	Mc	0	0	0
3	Ml	0	0	0.05
4	Mo	1.02	0.68	4.76
5	Mv	0	0	0.06

Además de las cinco especies en estudio se analizaron otras muestras ver la tabla 30.

Tabla 30 Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido en otras muestras de las mismas especies en estudio

N°	Muestra (lugar, fecha)	Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano en extractos de AcOEt	Porcentaje de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano en extractos etanólicos al 70%	Porcentaje de 5-metilcumarina-4-glucósido en extractos etanólicos al 70%
1	Ma (Occopata 20/08/21)	0.04	0.05	0.18
2	Ma(Pomacanchi 24/08/21)	0.02	0.06	0.23
3	Ma (Chivay 29/09/21)	0.04	0.30	0.36
4	Mo (Chivay 29/09/21)	0.96	1.2	3.77
5	Ma (Tipón 17/09/21)	0.1	0.36	0.27
6	Mc (Tipón 17/09/21)	0	0	0
7	Ma(Pomacanchi 02/02/22)	0.75	0.12	2.22
8	Ma(Pomacanchi 25/04/22)	0.79	0.37	0.69

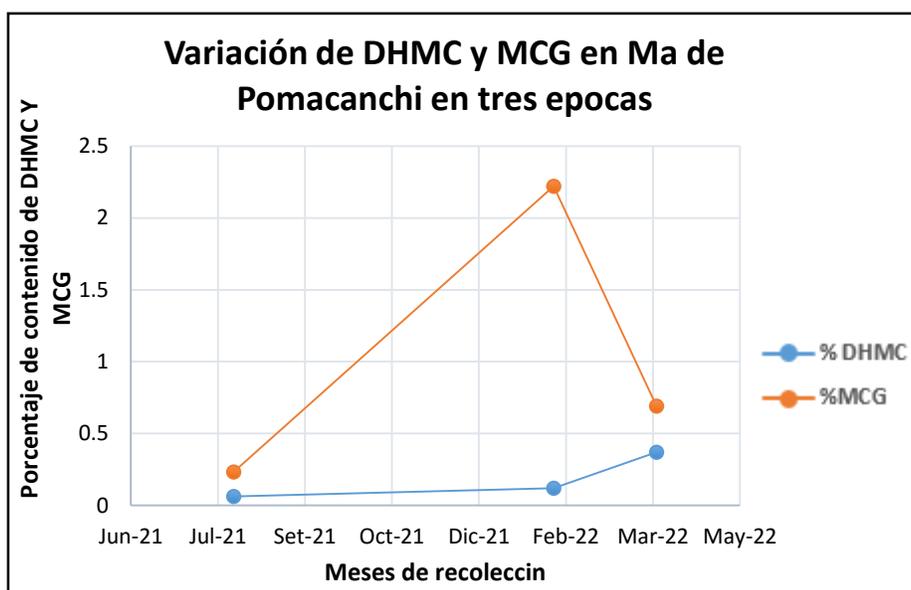
Los resultados de las tablas 29 y 30 muestran que *M. orbignyana* es rica en ambas sustancias seguido de *M. acuminata*, Además, los extractos etanólicos al 70% de *M. lanata* y *M. venusta*, contienen una pequeña concentración de MCG. Mientras que *M. cochabambensis* no muestra DHMC tampoco MCG. Por otro lado, las concentraciones de DHMC y MCG en *M. acuminata* y *M. orbignyana* provenientes de diferentes lugares y épocas de recolección tienen contenidos variables de estos dos metabolitos. Particularmente en el caso de *Mutisia acuminata* proveniente de Pomacanchi se ha podido observar que sus contenidos de DHMC y MCG varían según la época del año.

3.9 Variación de Concentración de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido en tres Épocas distintas de *Mutisia acuminata* de Pomacanchi

Tabla 31 Variación de contenido de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido de *Mutisia acuminata* de Pomacanchi

Mes	Época	% DHMC	%MCG
Ago-21	Floración	0.06	0.23
Feb-22	Prefloración	0.12	2.22
Abr-22	Floración	0.37	0.69

Figura 48 Variación del contenido de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido de *Mutisia acuminata* de Pomacanchi con el tiempo



La cuantificación de las muestras de Pomacanchi con distintas fechas de recolección mostró que la concentración del 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y de la 5-metilcumarina-4-glucósido según la figura dinámica ayuda a ubicar el momento preciso de cosecha de planta y realizar extracción máxima. Por otro lado, la concentración de MCG en *Mutisia orbignyana* es de 4.76% resultado de HPLC es comparable con 0.57% que se aislaron a partir de *Vernonia glaberima* (*Cichorioideae, Asteraceae*), que es una planta africana con efectos sobre cánceres humanos (Alhassan et al., 2018).

CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos al 70% de *M. acuminata* y *M. venusta* tienen mayor contenido de fenoles totales con valores 38.14 y 32.71 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de extracto seco respectivamente. El mayor contenido de flavonoides y ácidos hidroxycinnámicos totales corresponde al extracto etanólico al 50% de *Mutisia cochabambensis* encontrándose 9.83 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ y 18.96 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de extracto seco.
2. La mayor capacidad antioxidante corresponde a los extractos etanólicos al 70 % de *M. venusta* y *M. acuminata* con 17.65 y 16.79 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de extracto seco, respectivamente.
3. Por cromatografía de capa fina se observó que, los que presentan mayor intensidad y número de zonas son los extractos etanólicos de *M. orbignyana* y *M. acuminata*.
4. Mediante cromatografía líquida con detección ultravioleta mediante arreglo de diodos, los metabolitos secundarios más notables son los isómeros de ácidos monocafeoilquinicos y los derivados de quercetina.
5. Los cromatogramas de UHPLC-MS/MS y sus espectros ha permitido identificar tentativamente 27 compuestos sobre 36 señales.
6. A partir del extracto etanólico de *Mutisia orbignyana*, por cromatografía de columna y recristalización en etanol, se aisló 0.034% de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 0.054% de 5-metilcumarina-4-glucósido. En los extractos de etanol al 70% se cuantificó el 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido por cromatografía líquida con detección ultra violeta UHPLC-DAD utilizando los compuestos aislados como estándares, donde, la especie *M. orbignyana* muestra las mayores concentraciones de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano con 0.68% seguido de *M. acuminata* en plena floración con 0.37%. Mientras que la 5-metilcumarina-4-glucósido también predomina en *M. orbignyana* con

4.76% y en *M. acuminata* a plena floración con 0.69%, esta sustancia también se detectó en las especies *M. lanata* y *M. venusta*. En *M. cochabambensis* no se encontró ninguno de los dos compuestos.

RECOMENDACIONES

1. Divulgar a la población a través de los canales correspondientes que hay especies de *Mutisia* que poseen compuestos fenólicos muy importantes con posible de capacidad antioxidante que podrían mejorar la salud humana, notablemente *M. acuminata*, *M. cochabambensis* y *M. orbignyana*.
2. Realizar la actividad antioxidante en los extractos etanólicos y acuosos de las cinco especies utilizando diferentes métodos como DPPH, ABTS y FRAP.
3. Se debe insistir en los estudios de antihepatotoxicidad del DHMC y también respecto a otras propiedades farmacológicas.
4. No se conoce ninguna propiedad farmacológica del MCG por lo que se recomienda su farmacología experimental.
5. Se debe incidir en estudios de variación de concentración metabólica (DHMC y MCG) en las especies de *Mutisia acuminata* y *Mutisia orbignyana*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). *Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969-2976. <https://doi.org/10.1021/jf803436c>
- Alhassan, A. M., Ahmed, Q. U., Latip, J., Shah, S. A. A., Khan, A. 'a. Y. F., Sarian, M. N., Wahab, R. A., Taher, M., Abdullahi, M. I., & Khatib, A. (2018). *Phytoconstituents from Vernonia glaberrima Welw. Ex O. Hoffm. Leaves and their cytotoxic activities on a panel of human cancer cell lines*. *South African Journal of Botany*, 116, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.391>
- Amaya, R. L. M., & Portillo, M. C. E. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible* [Bachelor, Universidad de El Salvador]. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5311/>
- Badami, P. A., Barraza, J. D., Suarez, I. E., Vásquez, A. B., Salguero, A. R., Boggetti, H. J., & González, E. A. (2018). *Extracción con fluido supercrítico de polifenoles de suncho dulce (Tessaria dodoneifolia) de Santiago del Estero. Comparación con métodos convencionales*. *Quebracho (Santiago del Estero)*, 26(2), 60-60. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1851-30262018000200060&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Berrocal Q., J., & Medina J., J. (2008). *Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550 mg. Tableta por cromatografía líquida de alta performance*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/865>

- Cabrera, A. L. (1965). *Revision del genero Mutisia (Compositae)*.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Revision+del+genero+Mutisia+%28Compositae%29&author=Lulio+Cabrera%2C+Angel.&publication_year=1965
- Camacho, M. A. (2018). *Espectrometría de masas (MS); fundamento y equipos*.
<https://blog.analitek.com/espectrometria-de-masas-ms-fundamento-y-equipos-0-1>
- Cimpoi, C., Cristea, V.-M., Hosu, A., Sandru, M., & Seserman, L. (2011). *Antioxidant activity prediction and classification of some teas using artificial neural networks*. *Food Chemistry*, 127(3), 1323-1328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.091>
- Condoli, R. R. (2019). *Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de Mutisia mathewsii Hook & Arn. "Chinchilcuma", Ayacucho—2018*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
<http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4409>
- Curifuta, M., Pardenilla, J. V., Sanchez, J., Contreras, A., Salazar, L. A., & Alvear, M. (2012). *The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance*. *Ciencia e Investigación Agraria: Revista Latinoamericana de Ciencias de La Agricultura*, 39(2), 347-359.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5343400>
- Daily, A., Seligmann, O., Nonnenmacher, G., Fessler, B., Wong, S. M., & Wagner, H. (1988). *New chromone, coumarin, and coumestan derivatives from Mutisia acuminata var. Hirsuta*. *Planta Medica*, 54(1), 50-52. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962334>
- Ettre, L. S. (1995). *Nomenclatura para cromatografía*. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
https://secyta.es/sites/default/files/docs/books/Libro_Completo_Nomenclatura.pdf

- Fallon, A. (1987). *Applications of HPLC in biochemistry* A. Fallon, R.F.G. Booth, and L.D. Bell. Elsevier.
- Ferreira, R., & Macbride, J. F. (1995). *Flora of Peru* (pp. 1-120). Field Museum of Natural History. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.2604>
- Flores, Y., Rodrigo, G., Mollinedo, P., Akesson, B., Sterner, O., & Almanza, G. R. (2009). *A 5-Methylcoumarin Glucoside and a Coumestan Derivative from Mutisia Orbignyana*. *Revista Boliviana de Química*, 26(1), 21-26.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0250-54602009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Bayer, R. J. (2009). *Compositae*.
https://drive.google.com/file/d/1qmE8lmcwoxmko3qPwDVTNCjBVgX-qTK9/view?usp=drive_web&usp=embed_facebook
- Gaitén, Y. I. G., Martínez, M. M., & Henriques, T. (2010). *Análisis de flavonoides en una fracción butanólica obtenida de Phyllanthus orbicularis HBK.* 7.
- Giri, D. (2015). *High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications - Laboratoryinfo*. <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
- Gutiérrez, V. (2002). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Hichou Moreno, S. (2017). *Distribución de pesticidas en sistemas de abejas, polen, cera y miel. Análisis por LC-MS/MS*. <http://repositorio.ual.es/handle/10835/6453>

- Huayhua, C. M. L., & Moya, T. G. H. (2018). *Extracción, purificación y caracterización físicoquímica de los compuestos volátiles del tocoma fulva (arequipensis)*. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/5171>
- Katinas, L., & Funk, V. A. (2020). *An updated classification of the basal grade of Asteraceae (= Compositae): From Cabrera's 1977 tribe Mutisieae to the present*. *New Zealand Journal of Botany*, 58(2), 67-93. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2020.1718168>
- Katinas, L., Pruski, J., Sancho, G., & Tellería, M. C. (2008). *The Subfamily Mutisioideae (Asteraceae)*. *Botanical Review*, 74(4), 469-716. <https://www.jstor.org/stable/40389335>
- Laime Mita, S. E. (2016). *Propuesta de análisis de Wolfram en minerales de baja ley por espectrofotometría UV-visible* [Thesis]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/11713>
- Londoño L, J. (2012). *Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Corporación Universitaria Lasallista. <http://repository.lasallista.edu.co/dspace//handle/10567/133>
- Mandel, J. R., Dikow, R. B., Siniscalchi, C. M., Thapa, R., Watson, L. E., & Funk, V. A. (2019). *A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28), 14083-14088. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903871116>
- Martínez, G., & María, E. (2019). *Determinación de glicirricina en alimentos empleando técnicas cromatográficas*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/121673>
- Martínez Flórez, S., González Gallego, J., & Culebras, J. M. (2002). *Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes*. *Nutr. Hosp.*, 8.

- Matkowski, A., Tasarz, P., & Szypuła, E. (2008). *Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae*. 10.
- Moreira, A., Scherson, R. A., Luebert, F., Román, M. J., Monge, M., Diazgranados, M., & Silva, H. (2020). *Biogeography, phylogenetic relationships and morphological analyses of the South American genus Mutisia L.f. (Asteraceae) shows early connections of two disjunct biodiversity hotspots*. *Organisms Diversity & Evolution*, 20(4), 639-656.
<https://doi.org/10.1007/s13127-020-00454-z>
- Oliveira, A. C. de, Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). *Fontes vegetais naturais de antioxidantes*. *Química Nova*, 32, 689-702.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>
- OMS. (2004). *Fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales*. WHO; World Health Organization. <https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/index.html>
- Pallás, V. (2008). *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. Mundi-Prensa Libros.
- Pérez Cruz, K. A. (2016). *Síntesis, caracterización electroquímica y reactividad con anión superóxido de nuevas cumarinas híbridas*.
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/142363>
- Roersch, C. (1994). *Plantas medicinales en el Sur Andino del Perú*. Königstein [etc.] : Koeltz Scientific Books. <https://repository.ubn.ru.nl/handle/2066/145903>
- Serrano, F. C. A. (2002). *Componentes de Mutisia cochabambensis (Hieronymus) [Wayurkuma, Chinachinchircoma, chinchilkuma, wayrumo chincherkuma]*.
<https://books.google.com.pe/books?id=VqeTrgEACAAJ>

- Sgariglia, M. A., Soberon, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). *Cromatografía: Conceptos y aplicaciones*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/75465>
- Tato Martínez, M. (2020). *Síntesis de cumarinas sustituidas mediante reacciones de acoplamiento cruzado con organometálicos de indio(III)*.
file:///C:/Users/Usuario/Downloads/TatoMartinez_Manuel_MemoriaTFM_2020.pdf
- Torres, O., Urrego, R., Echeverri, Z. J. J., & López, A. (2019). *Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos*. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(2), 433-459.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>
- Tu, Y., Yang, Y., Li, Y., & He, C. (2021). *Naturally occurring coumestans from plants, their biological activities and therapeutic effects on human diseases*. *Pharmacological Research*, 169, 105615. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105615>
- Vestena, A., Meirelles, G., Zuanazzi, J., & Poser, G. (2022). *Taxonomic significance of coumarins in species from the subfamily Mutisioideae, Asteraceae*. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09828-x>
- Vinayagam, A., & Sudha, P. N. (2015). *Separation and identification of phenolic acid and flavonoids from Nerium indicum flowers*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(1), 91. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.151603>
- Vituro, C. I., de la Fuente, J. R., & Maier, M. S. (2004). *5-Methylcoumaranones from Mutisia friesiana and Their Bioactivity*. *Journal of Natural Products*, 67(5), 778-782.
<https://doi.org/10.1021/np0304058>

- Vituro, C. I., Maier, M. S., Stortz, C. A., & de la Fuente, J. R. (2001). *Antifungal diastereomeric furanones from Mutisia friesiana: Structural determination and conformational analysis*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12(7), 991-998. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(01\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(01)00163-X)
- Vituro, C., Molina, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (1999). *Free radical scavengers from Mutisia friesiana (asteraceae) and Sanicula graveolens (apiaceae)*. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199908/09\)13:5%3C422::AID-PTR462%3E3.0.CO;2-M](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1099-1573(199908/09)13:5%3C422::AID-PTR462%3E3.0.CO;2-M)
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M., & Robinson, H. (1986). *Further 5-methyl coumarins and other constituents from the subtribe mutisiinae*. *Phytochemistry*, 25(2), 509-516. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85512-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85512-0)
- Zdero, C., Bohlmann, F., & Solomon, J. (1988). *Further 5-methylcoumarin derivatives from Mutisia orbignyana*. *Phytochemistry*, 27(3), 891-897. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)84114-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)84114-1)

ANEXOS

Anexo 1 Certificado de la clasificación botánica de las cinco especies de género *Mutisia*.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA**

CERTIFICACION

El que suscribe, Profesor Investigador Asociado del Herbario Vargas (CUZ) certifica que la Alumna: Dina Pillco Paulo con Código 151106 de la Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias. Ha sometido a consulta muestras botánicas colectadas para su determinación, las que al ser diagnosticadas, para la clasificación APG IV (Angiosperm Phylogenetic Group) corresponden a:

- 1. *Mutisia acuminata* var. *Hirsuta* (R. et P.)**
- 2. *Mutisia cochabambensis* Hieronymus**
- 3. *Mutisia lanata* (R. et P.)**
- 4. *Mutisia orbignyana* Weddel**
- 5. *Mutisia venusta* S.F. Blake**

Lo que se certifica para los fines concernientes al caso.

Cusco, abril del 2022

Washington Galiano Sánchez M. Sc.,
Prof. Principal Dpto. Académico de Biología

Anexo 2 Recolección de muestras y secado



Anexo 3 Fotografía de molienda y la obtención de extractos etanólicos de las cinco especies



Anexo 4 *Análisis cuantitativo preliminar de fenoles totales*



Anexo 5 *Análisis cuantitativo preliminar de ácidos hidroxycinnámicos en los extractos etanólicos.*



Anexo 6 *Análisis cuantitativo preliminar de ácidos hidroxycinnámicos totales de los extractos etanólicos.*



Anexo 7 Resultados de obtención de porcentaje de extracto seco de los cinco especies .

N°	Nombre	Extracto etanólicos	Peso de muestra	peso de vial con muestra evaporada	peso de vial vacío	muestra seca (g)	%de extracto seco
1	<i>Mutisia acuminata</i>	Ma - 96	0.5006	9.9279	9.9222	0.0057	17.1
2	<i>Mutisia acuminata</i>	Ma - 70	0.5007	10.1625	10.1496	0.0129	38.6
3	<i>Mutisia acuminata</i>	Ma - 50	0.5000	7.8428	7.8296	0.0132	39.6
4	<i>Mutisia cochabambensis</i>	Mc - 96	0.5002	8.9907	8.9868	0.0039	11.7
5	<i>Mutisia cochabambensis</i>	Mc - 70	0.5003	17.0048	16.9964	0.0084	25.2
6	<i>Mutisia cochabambensis</i>	Mc - 50	0.5016	8.6863	8.6767	0.0096	28.7
7	<i>Mutisia lanata</i>	MI - 96	0.5007	9.9689	9.9664	0.0025	7.5
8	<i>Mutisia lanata</i>	MI - 70	0.5002	11.011	11.0038	0.0072	21.6
9	<i>Mutisia lanata</i>	MI - 50	0.5004	16.0364	16.028	0.0084	25.2
10	<i>Mutisia orbignyana</i>	Mo - 96	0.5004	10.1189	10.1107	0.0082	24.6
11	<i>Mutisia orbignyana</i>	Mo - 70	0.5008	13.1859	13.1711	0.0148	44.3
12	<i>Mutisia orbignyana</i>	Mo - 50	0.5000	9.5553	9.5401	0.0152	45.6
13	<i>Mutisia venusta</i>	Mv - 96	0.5002	16.3385	16.3355	0.003	9.0
14	<i>Mutisia venusta</i>	Mv - 70	0.5001	10.21	10.2019	0.0081	24.3
15	<i>Mutisia venusta</i>	Mv - 50	0.5007	15.4287	15.4195	0.0092	27.6

Anexo 8 Datos y resultado obtenidos del análisis de fenoles totales.

Muestra	Absorbancias promedio	µg extracto/50 µL	µg extracto/10 µL	µg AG en 10 µL	µg AG en 100 µg extracto
1	0.322	255	51.1	8.29	16.24
2	0.384	130	26	9.92	38.14
3	0.375	425	85	9.69	11.40
4	0.272	173	34.5	6.99	20.25
5	0.333	153	30.5	8.58	28.12
6	0.373	329	65.8	9.65	14.65
7	0.212	121	24.25	5.40	22.27
8	0.197	146	29.25	5.00	17.08
9	0.243	234	46.75	6.22	13.30
10	0.317	301	60.2	8.15	13.55
11	0.309	213	42.6	7.96	18.69
12	0.314	219	43.8	8.08	18.44
13	0.178	113	22.5	4.51	20.02
14	0.200	78	15.5	5.08	32.74
15	0.270	270	53.9	6.93	12.85

Anexo 9 Datos y resultado obtenidos del análisis de flavonoides totales

Muestra	Absorbancias promedio	µg extracto/50 µL	µg en 50µL	µg en 100µg
1	0.006	255	1.133	0.44
2	0.054	130	6.916	5.32
3	0.064	425	8.120	1.91
4	0.111	173	13.743	7.97
5	0.104	153	12.940	8.49
6	0.265	329	32.337	9.84
7	0.018	121	2.538	2.09
8	0.101	146	12.578	8.60
9	0.048	234	6.193	2.65
10	0.055	301	7.036	2.34
11	0.061	213	7.759	3.65
12	0.102	219	12.739	5.82
13	0.009	113	1.494	1.33
14	0.024	78	3.301	4.26
15	0.034	270	4.546	1.68

Anexo 10 Datos y resultados obtenidos del análisis de ácidos hidroxycinnámicos totales.

Muestra	Absorbancias promedio	µg AC en 50 µL	µg extracto en 50 µL	µg AC/100 µg extracto
1	0.016	12.111	255	4.75
2	0.033	23.89	152.5	15.66
3	0.031	22.56	425	5.31
4	0.034	24.33	172.5	14.11
5	0.024	17.67	152.5	11.58
6	0.091	62.33	328.75	18.96
7	0.015	11.44	121.25	9.44
8	0.001	2.56	146.3	1.75
9	0.023	17.22	233.75	7.37
10	0.022	16.33	301.25	5.42
11	0.013	10.11	212.5	4.76
12	0.054	37.89	218.75	17.32
13	0.008	7.22	112.5	6.42
14	0.002	3.22	77.5	4.16
15	0.018	13.44	270	4.98

Anexo 11 Datos y resultados obtenidos del análisis de capacidad antioxidante.

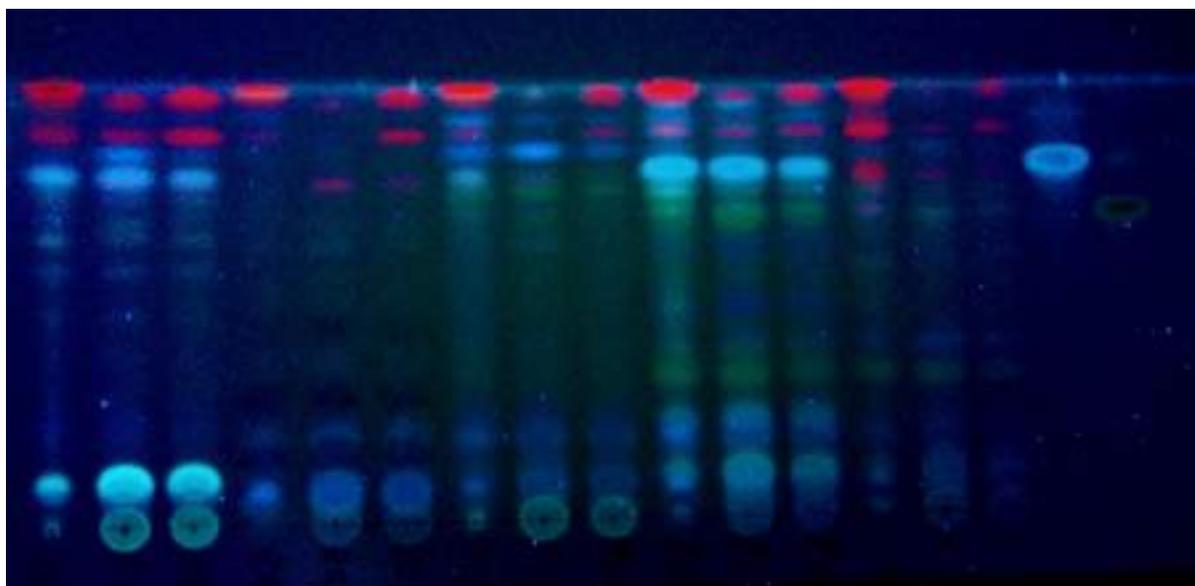
Muestra	Absorbancias promedio	µg ácido ascórbico/ 50 µL	µg extracto en 50 µL	µg ácido ascórbico/ 100 µg de extracto)
1	0.14	29.31	255	11.49
2	0.10	21.83	130	16.79
3	0.19	40.79	425	9.60
4	0.13	27.90	172.5	16.18
5	0.09	19.16	152.5	12.57
6	0.17	37.61	328.75	11.44
7	0.08	17.83	121.25	14.70
8	0.05	11.16	146.25	7.63
9	0.12	24.87	233.75	10.64
10	0.13	27.39	301.25	9.09
11	0.08	17.09	212.5	8.04
12	0.15	31.61	218.75	14.45
13	0.06	13.68	112.5	12.16
14	0.06	13.68	77.5	17.65
15	0.15	31.83	270	11.79

Anexo 12 Materiales utilizados en el análisis de sustancias fenólicas de cromatografía de cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos al 96%, 70% y 50 %.

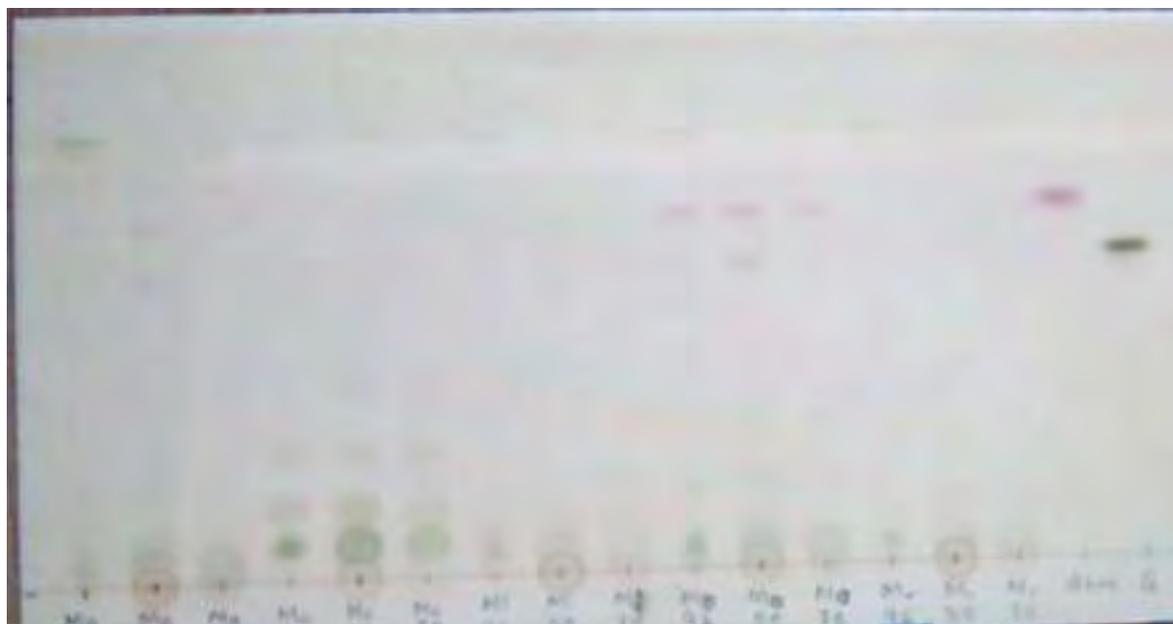


Anexo 13 Fotografías de Cromatogramas obtenidas por cromatografía de capa fina

Cromatograma de agliconas libres utilizando como estándar el 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano visualizado en lámpara de rayos UV con una longitud de onda de 366nm y revelado con difenilborinato de etanolamina.

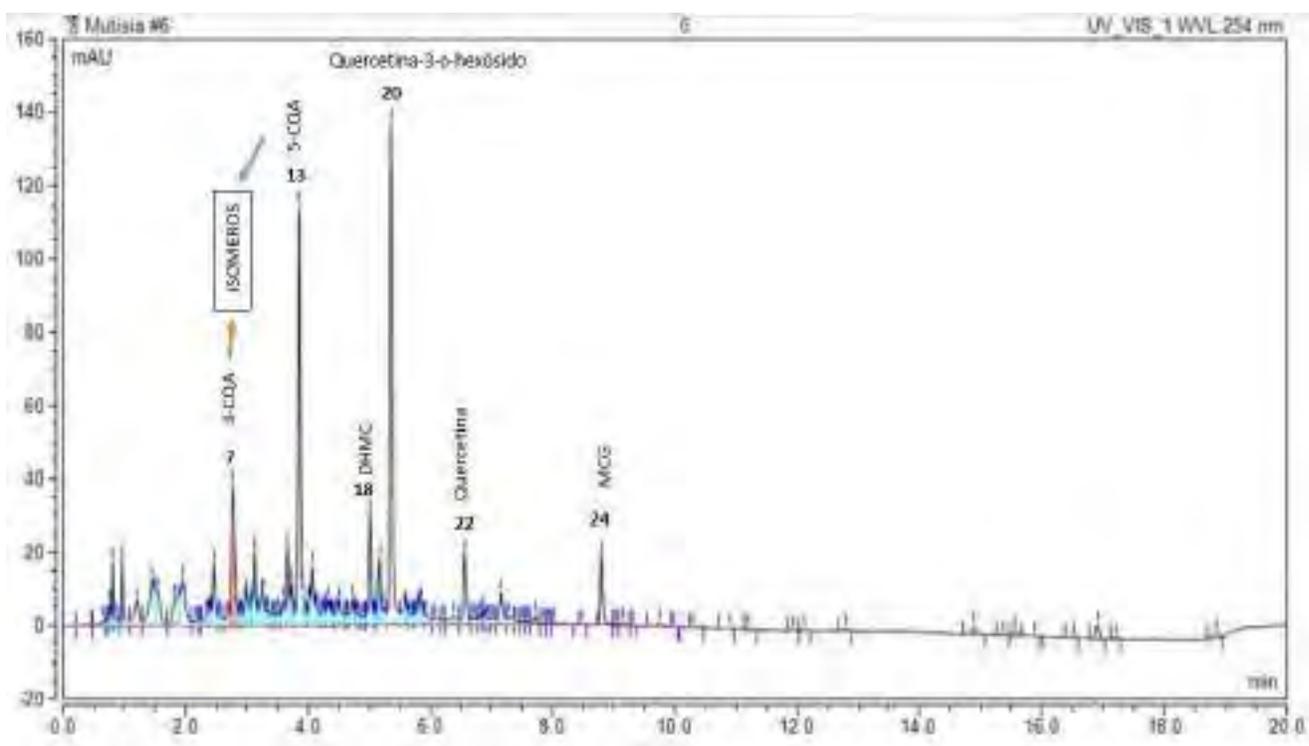


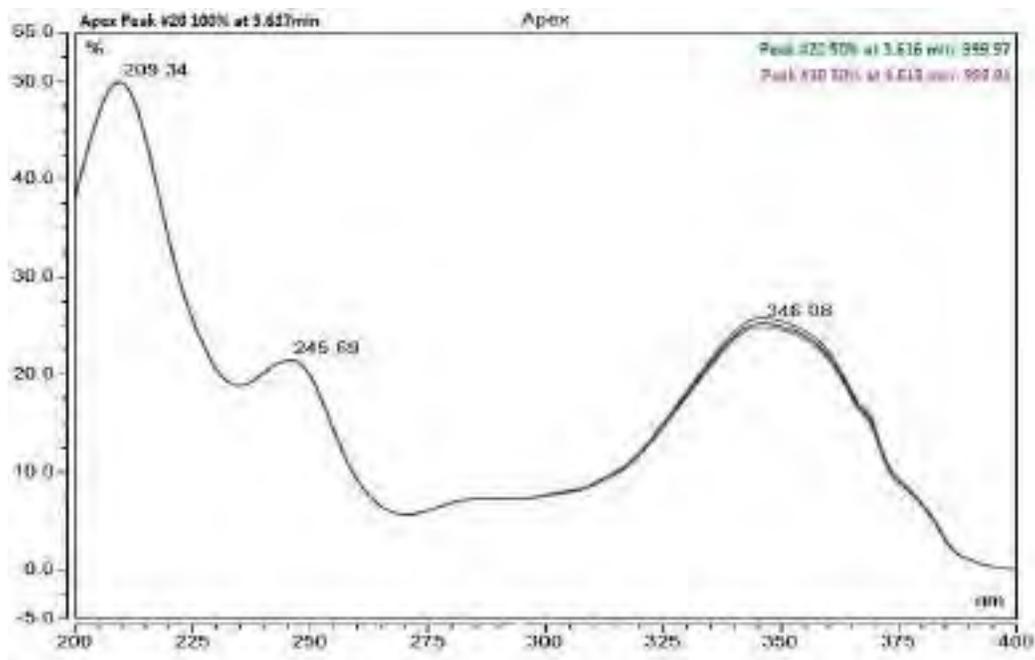
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 DHMC QU



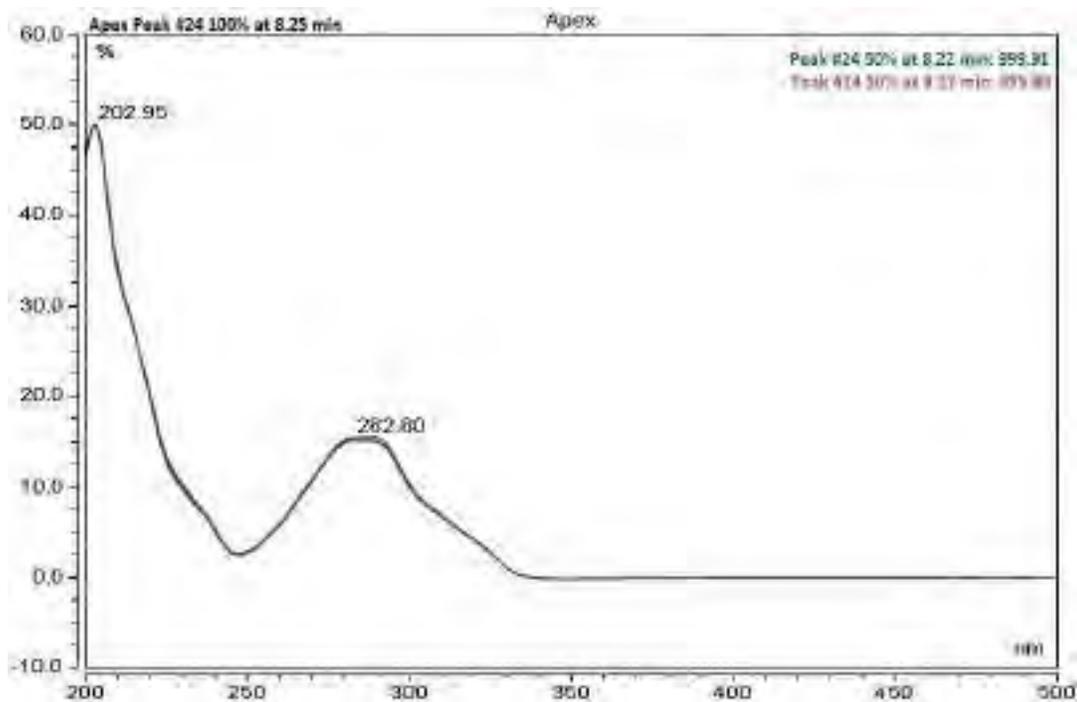
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 DHMC QU
 Cromatograma del análisis de agliconas libres revelado con FeCl_3 al 5% con el estándar de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano.

Anexo 14 Cromatograma de análisis UHPLC-DAD en extracto etanólicos de *Mutisia acuminata*.



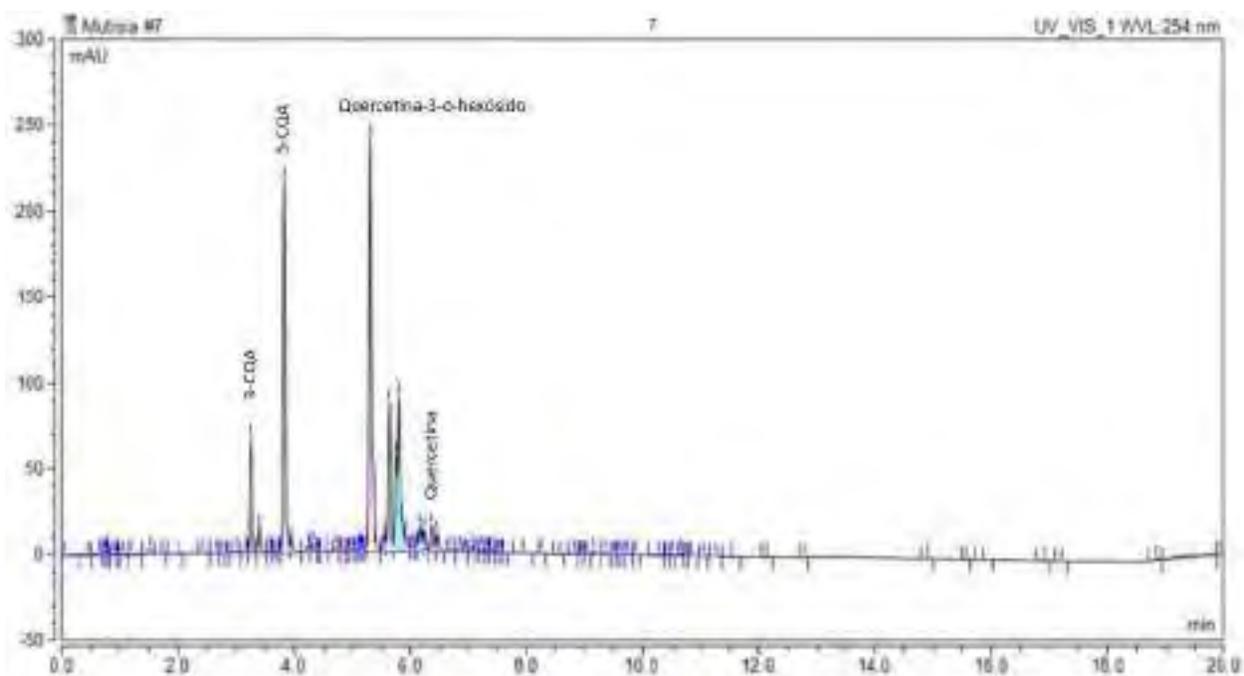


Espectro UV experimental de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano presente en extracto etanólico al 70% de *Mutisia acuminata*, el pico 20 en el cromatograma, Anexo 14, con tiempo de retención de 5.617 min, presentan máximos de absorción a 209.34, 245.69, 346.08 nm.

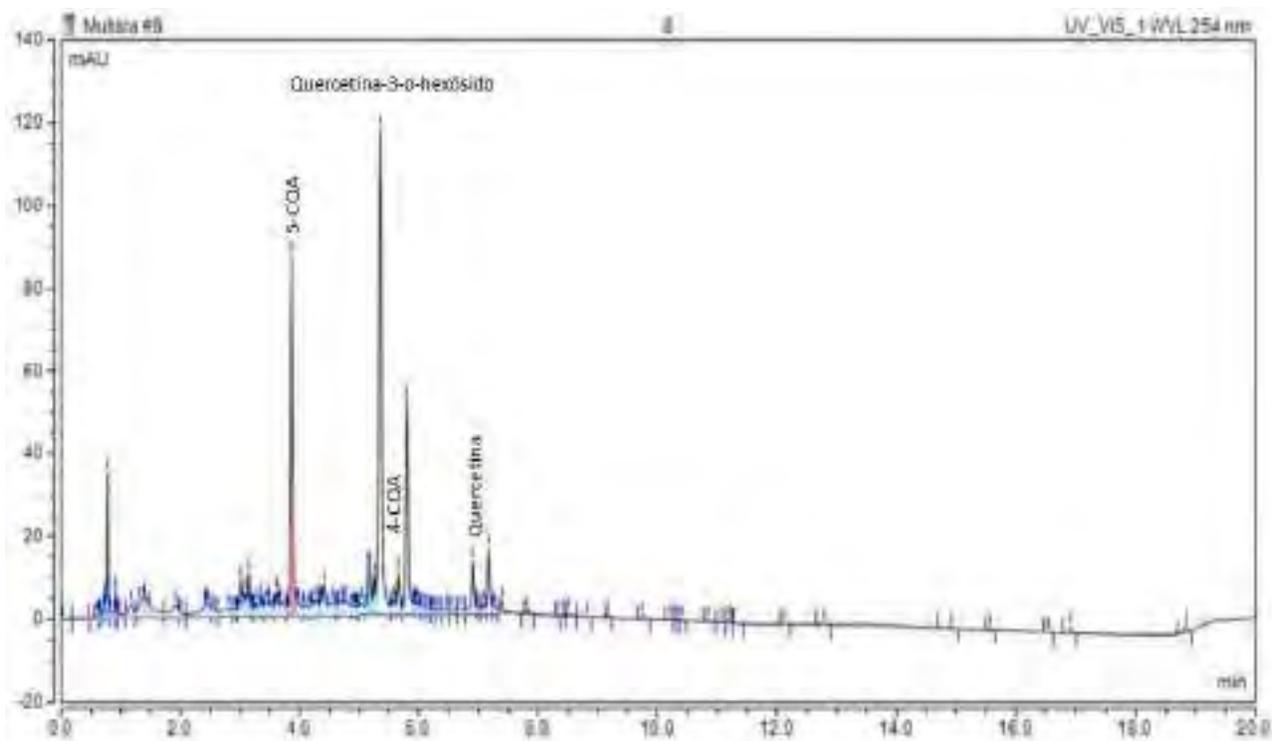


Espectro UV experimental de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano presente en extracto etanólico al 70% de *Mutisia acuminata*, el pico 20 en el cromatograma, Anexo 14, con tiempo de retención de 8.25 min, presentan máximos de absorción a 209.34, 245.69, 346.08 nm

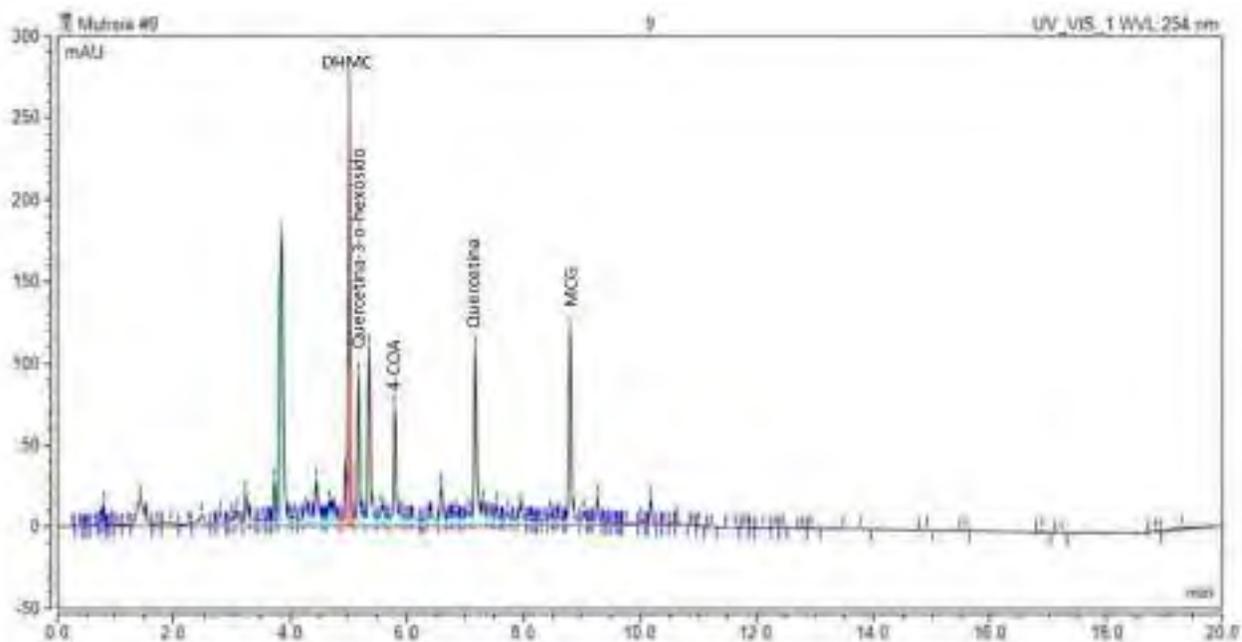
Anexo 15 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de *Mutisia cochabambensis*



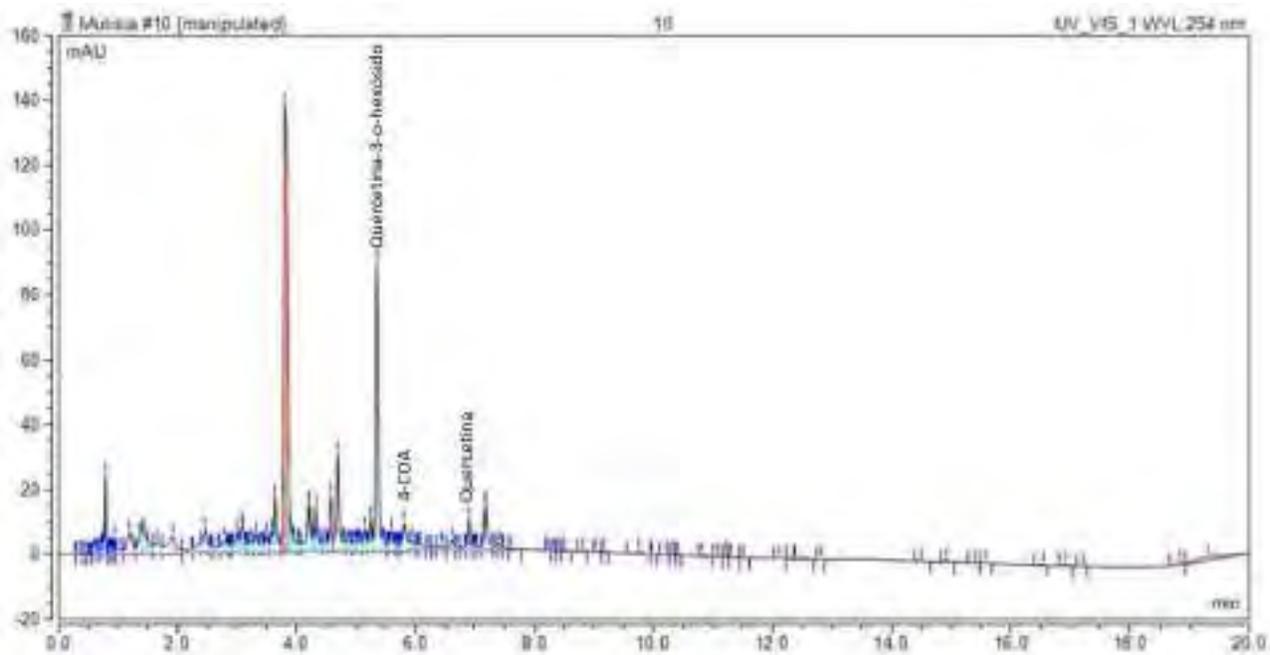
Anexo 16 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de *Mutisia lanata*



Anexo 18 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de *Mutisia orbignyana*



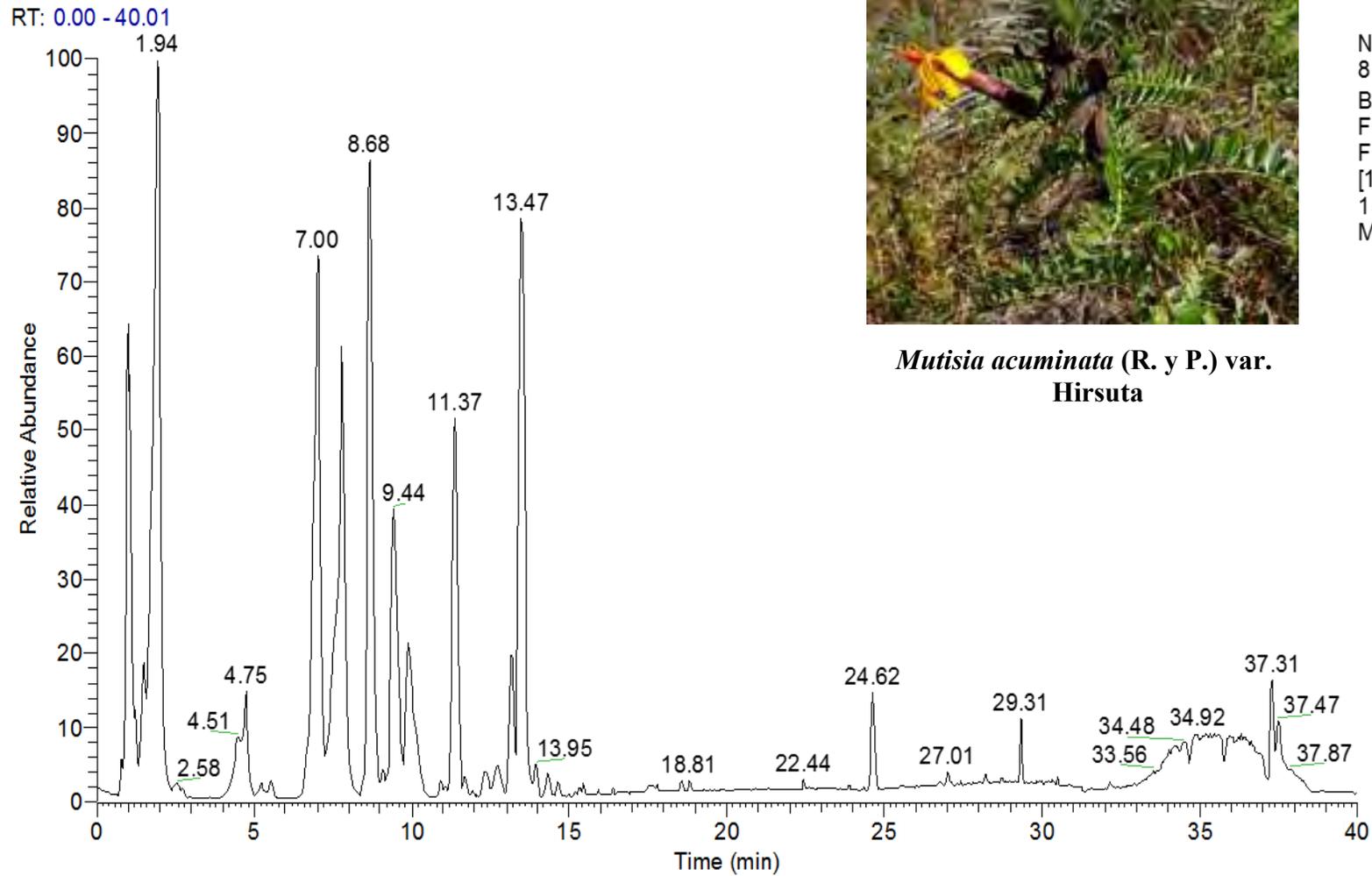
Anexo 17 Análisis UHPLC-DAD en extracto etanólico al 70% de *Mutisia venusta*



Anexo 19 Los cinco Cromatogramas y espectros de masa UHPLC-MS/MS.

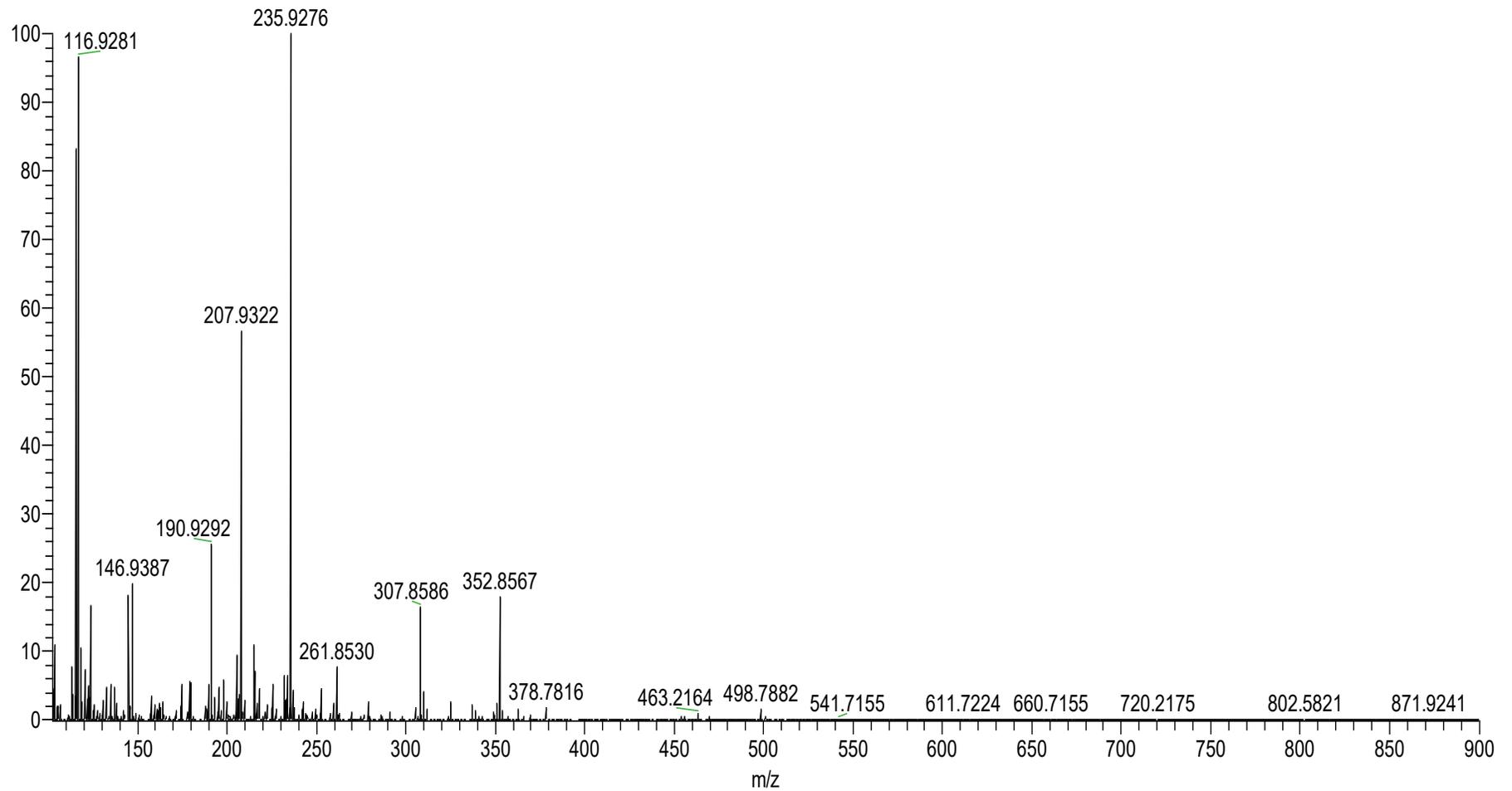
Cromatogramas UHPLC-MS/MS de las cinco especies estudiadas.

Cromatograma UHPLC-MS/MS de *Mutisia acuminata* (R. y P.) var. *Hirsuta*



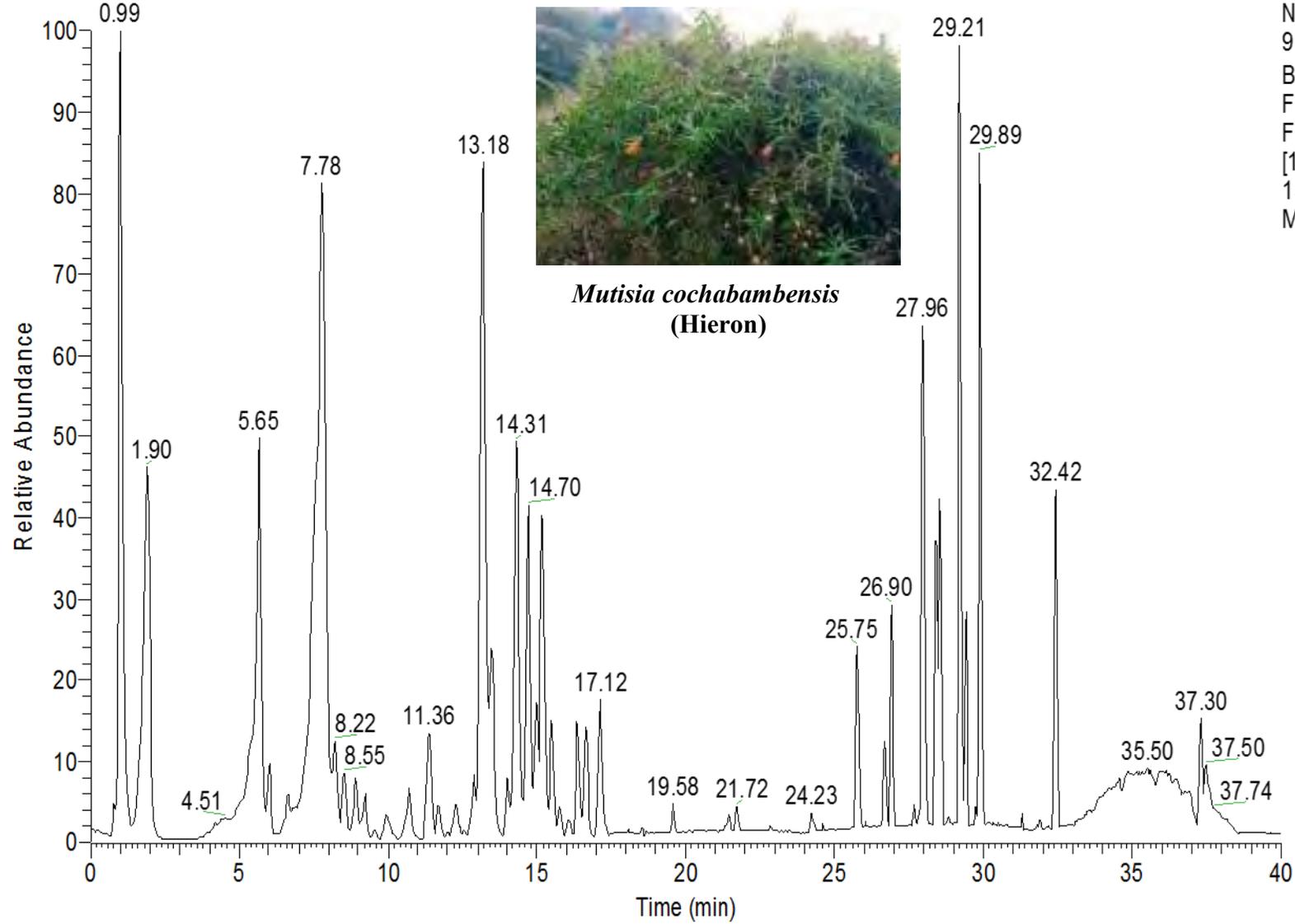
Espectro de masas *Mutisia acuminata* (R. y P.) var. *Hirsuta*

MA #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.45E7
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1500.00]



Cromatograma UHPLC-MS/MS *Mutisia cochabambensis* (Hieron)

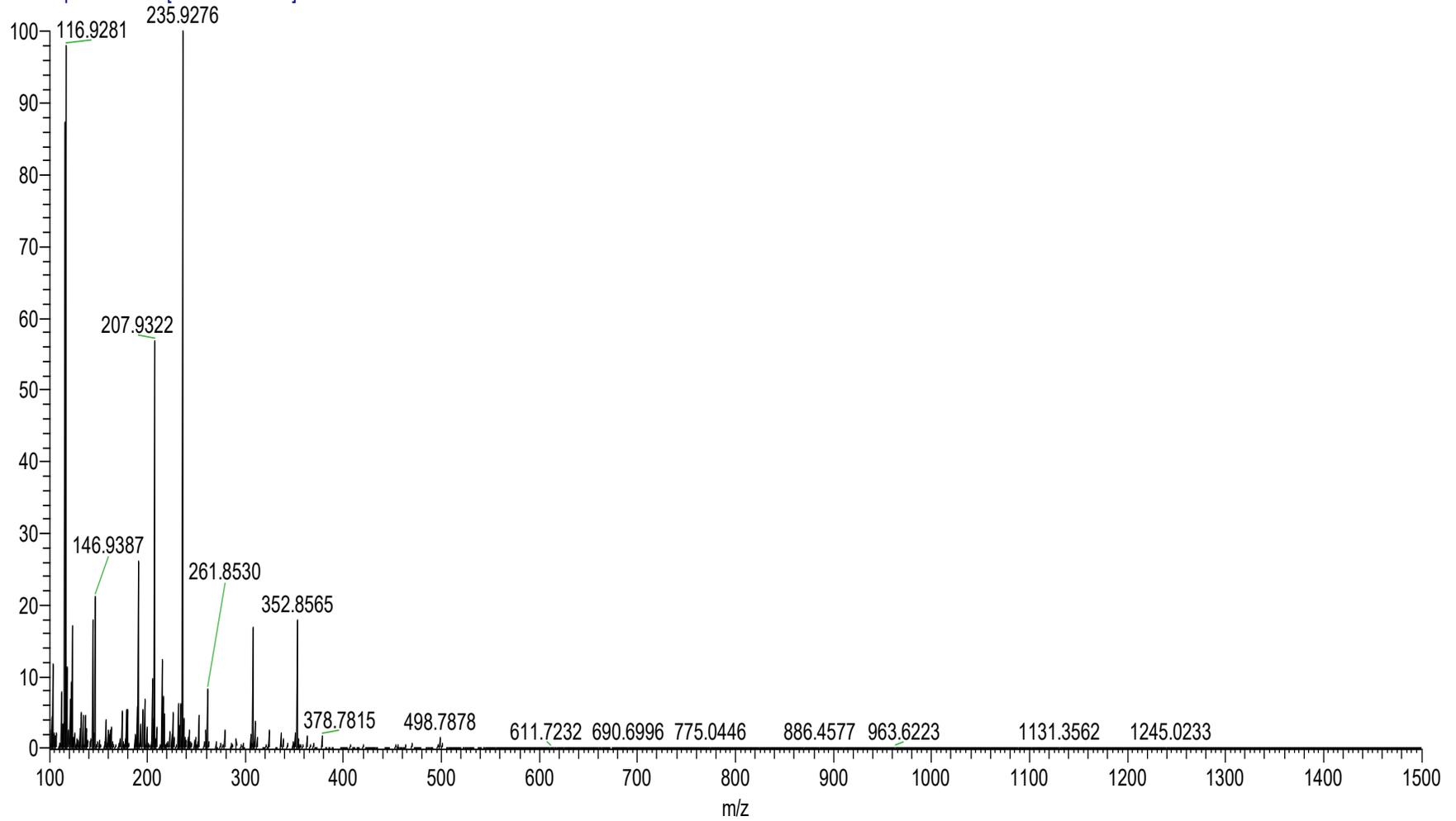
RT: 0.00 - 40.02



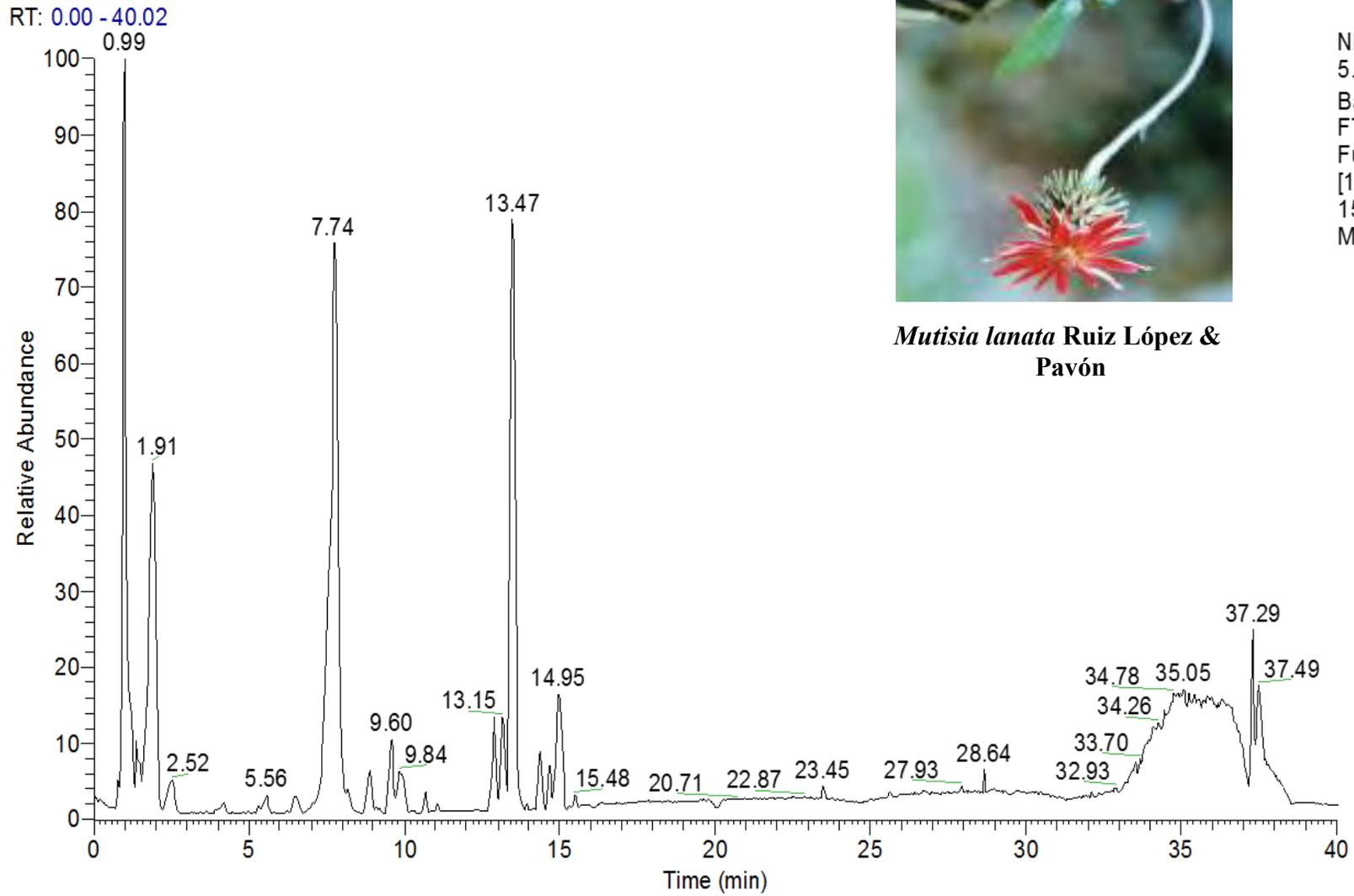
NL:
9.46E8
Base Peak F:
FTMS - p ESI
Full ms
[100.00-
1500.00] MS
MC

Espectro de masas de *Mutisia cochabambensis* (Hieron)

MC #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.37E7
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1500.00]



Cromatograma UHPLC-MS/MS de *Mutisia lanata* Ruiz López & Pavón

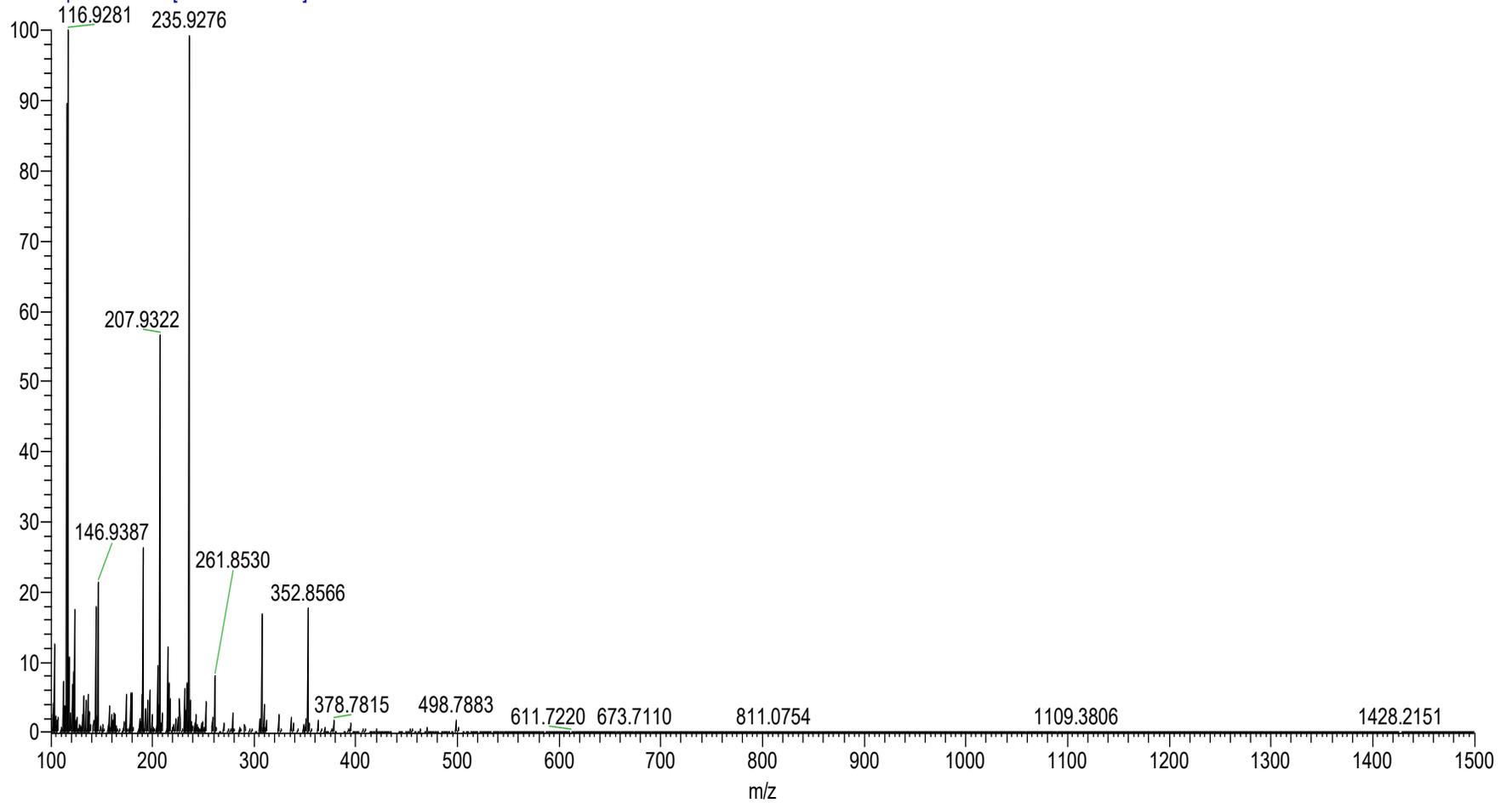


***Mutisia lanata* Ruiz López & Pavón**

NL:
5.37E8
Base Peak F:
FTMS - p ESI
Full ms
[100.00-
1500.00] MS
ML

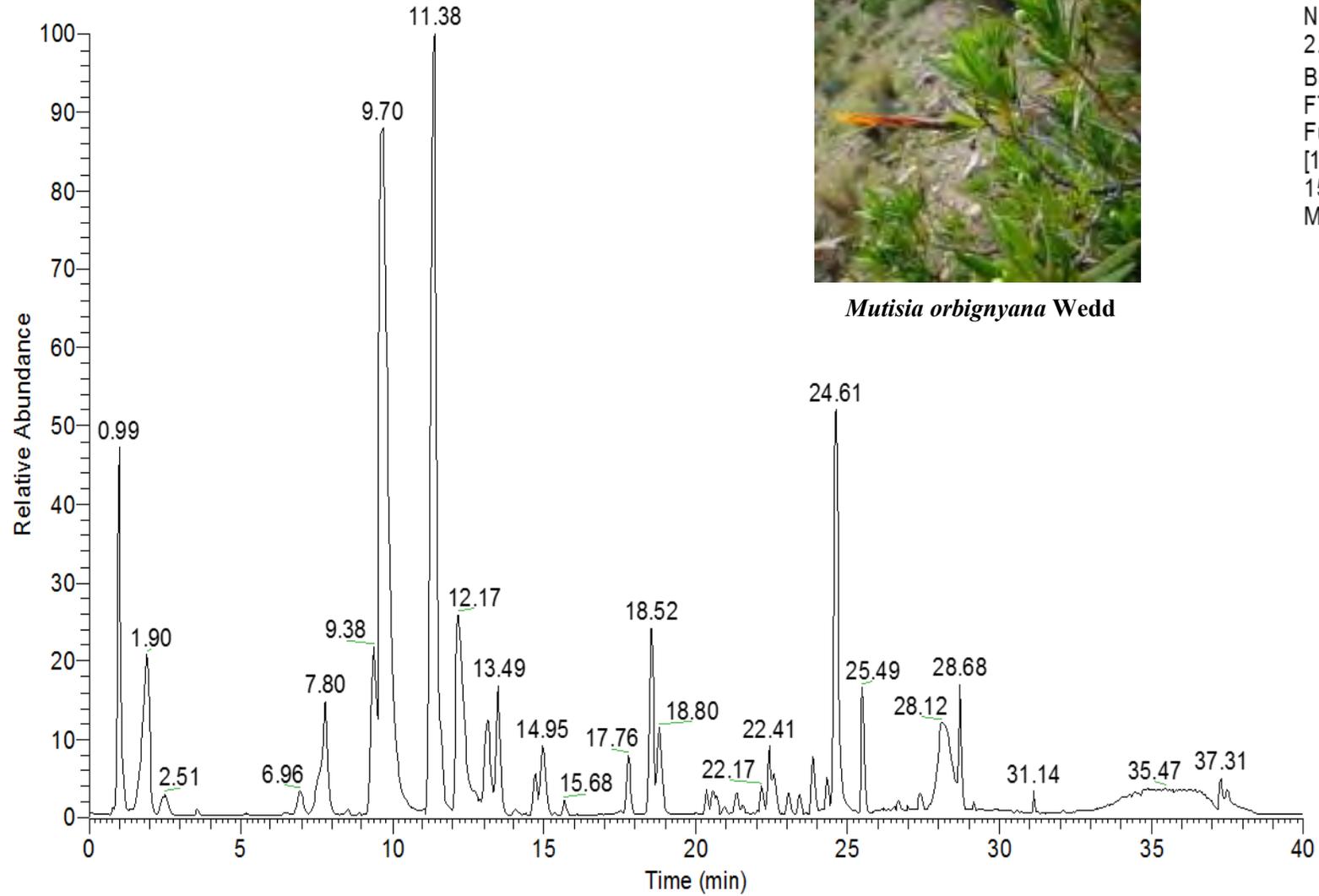
Espectro de masas de *Mutisia lanata* Ruiz López & Pavón

ML #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.37E7
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1500.00]



Cromatograma UHPLC-MS/MS de *Mutisia orbignyana* Wedd

RT: 0.00 - 40.01

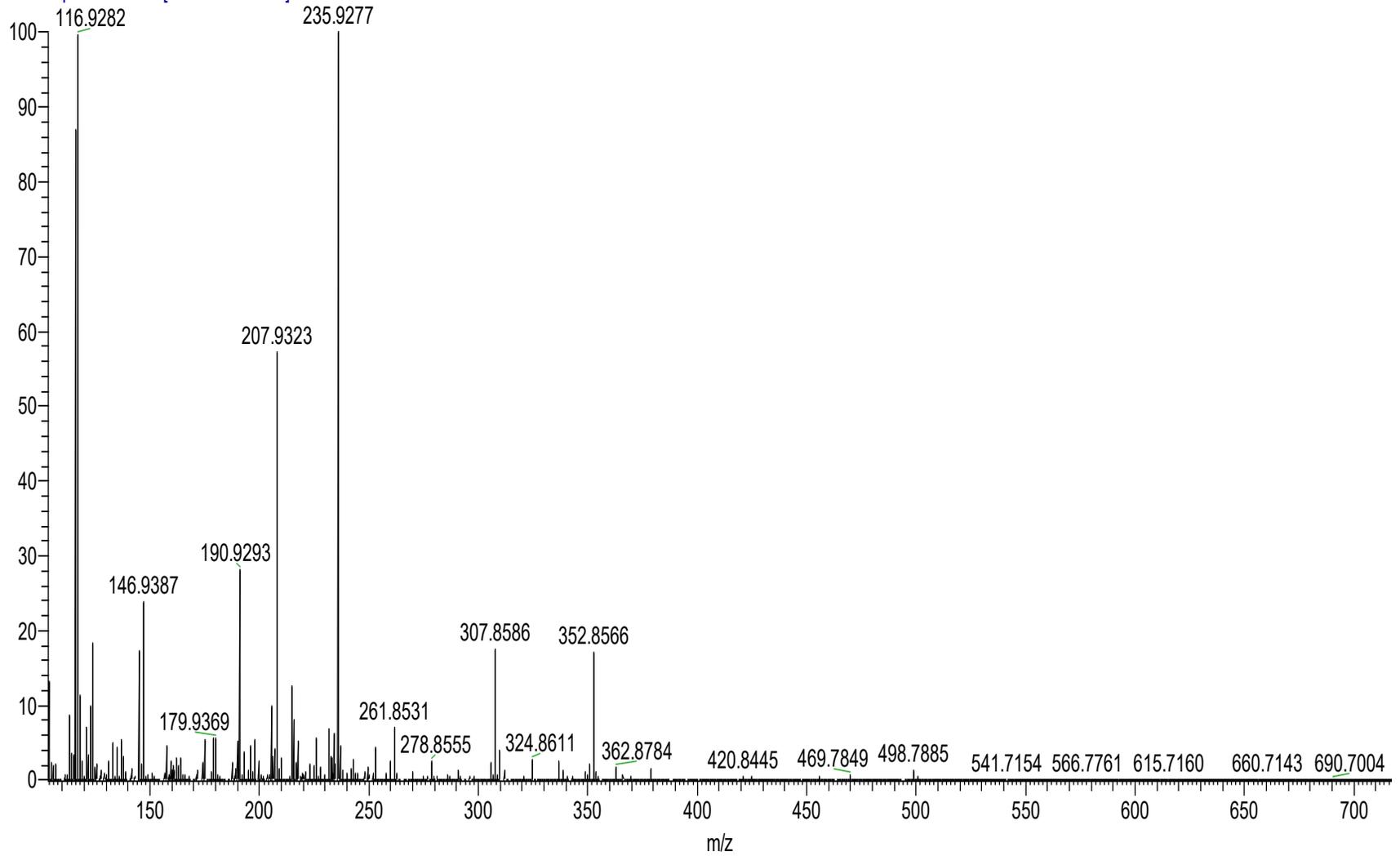
***Mutisia orbignyana* Wedd**

NL:
2.41E9
Base Peak F:
FTMS - p ESI
Full ms
[100.00-
1500.00] MS
MO

Espectro de masas de *Mutisia orbignyana* Wedd

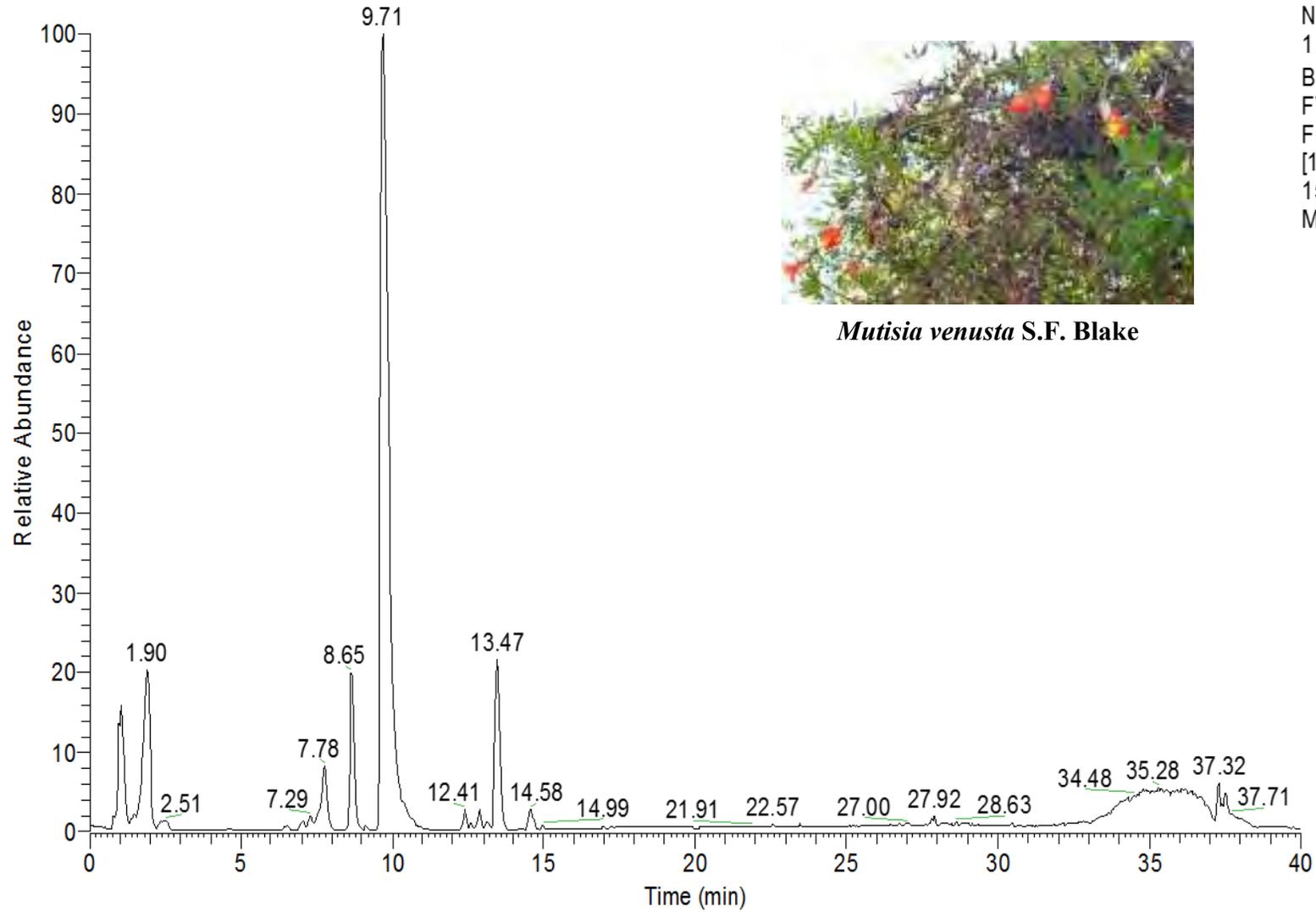
MO#2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.33E7

T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1500.00]



Cromatograma UHPLC-MS/MS de *Mutisia venusta* S.F. Blake

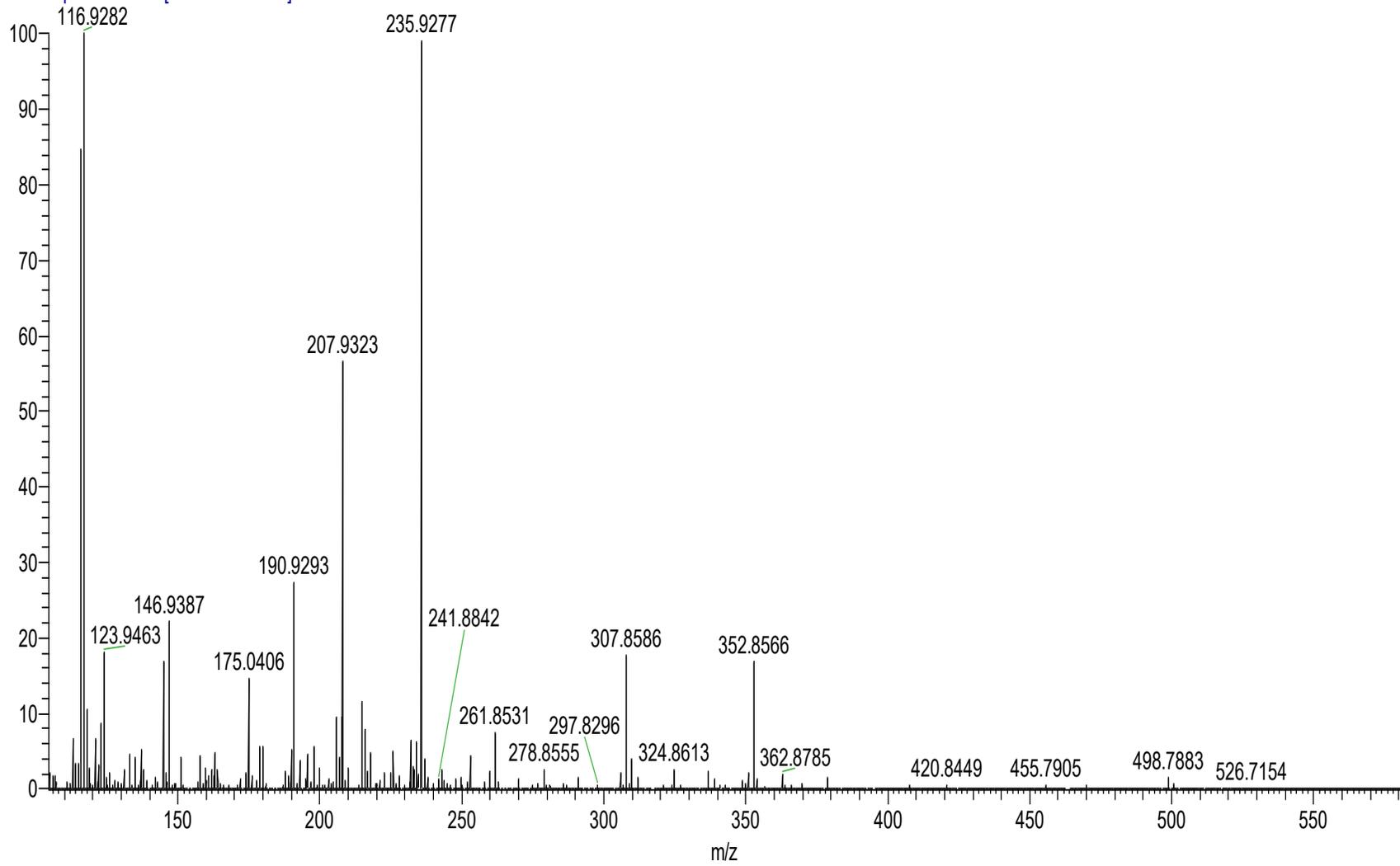
RT: 0.00 - 40.02

***Mutisia venusta* S.F. Blake**

NL:
1.78E9
Base Peak F:
FTMS - p ESI
Full ms
[100.00-
1500.00] MS
MV

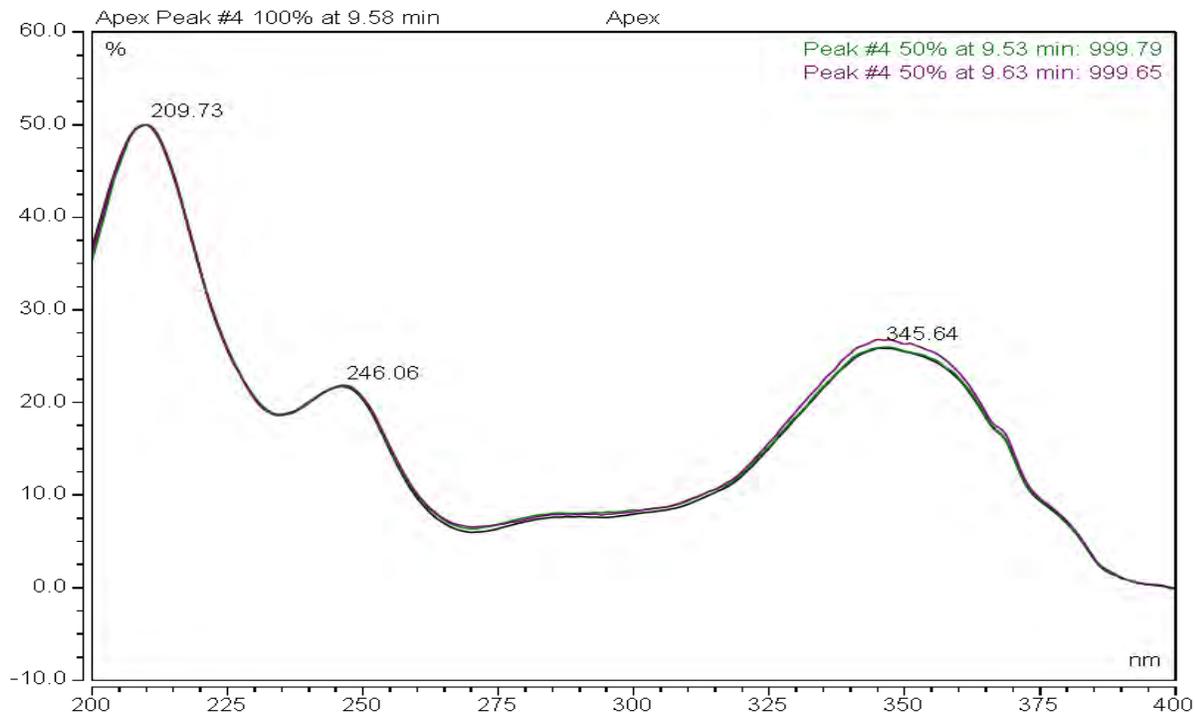
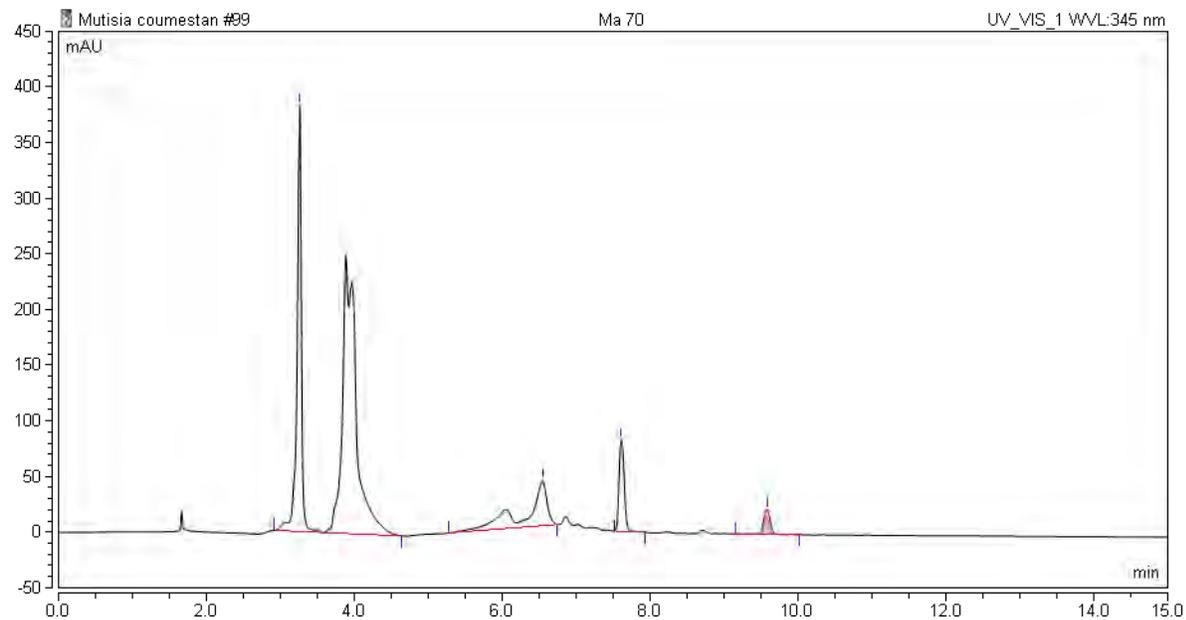
Espectro de masas de *Mutisia venusta* S.F. Blake

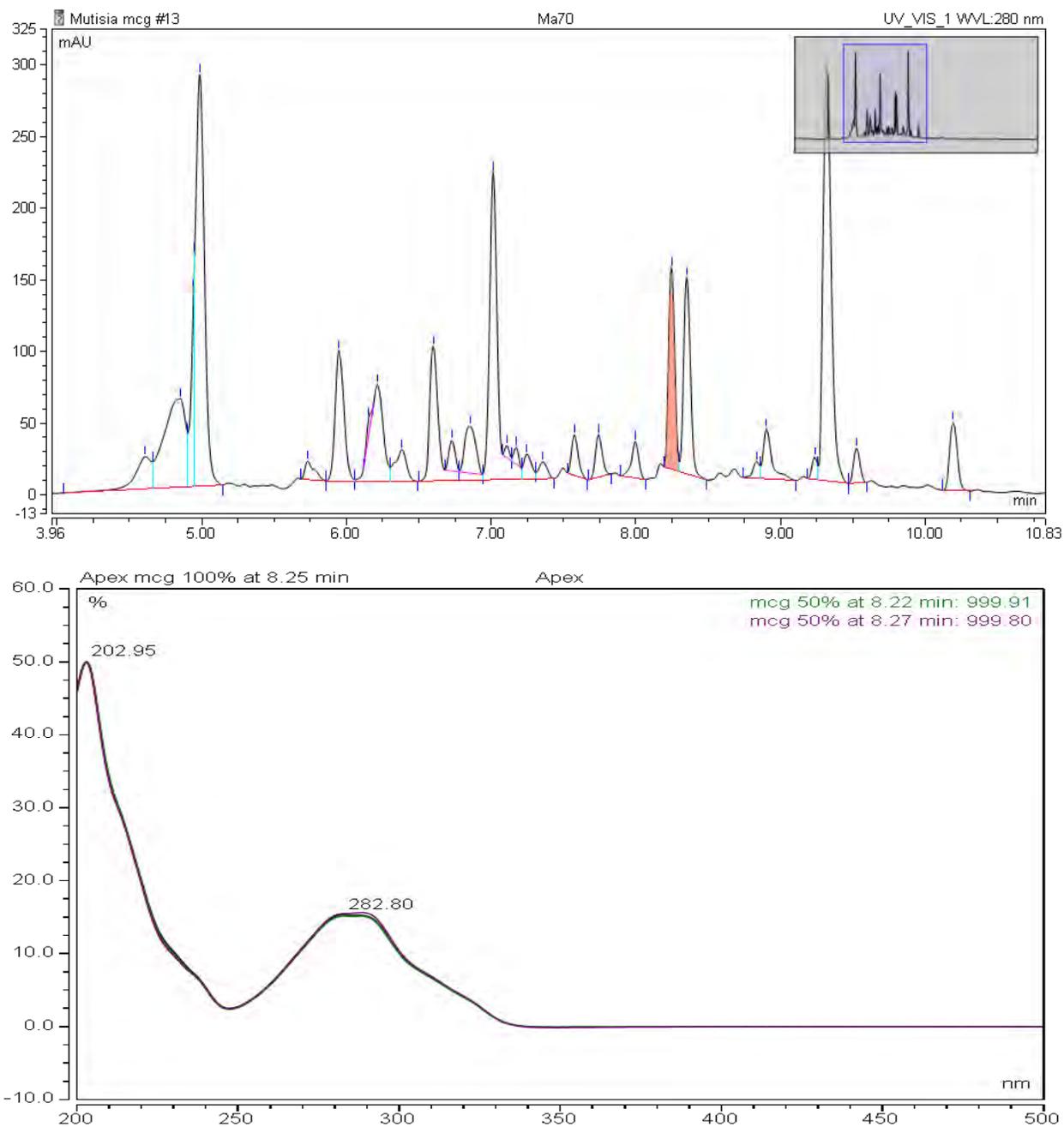
MV #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.40E7
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1500.00]



Anexo 20 Cromatogramas y los espectros UV de la cuantificación de 11,12-dihidroxi-5-metilcumestano y 5-metilcumarina-4-glucósido

***Mutisia acuminata* (Ma)**

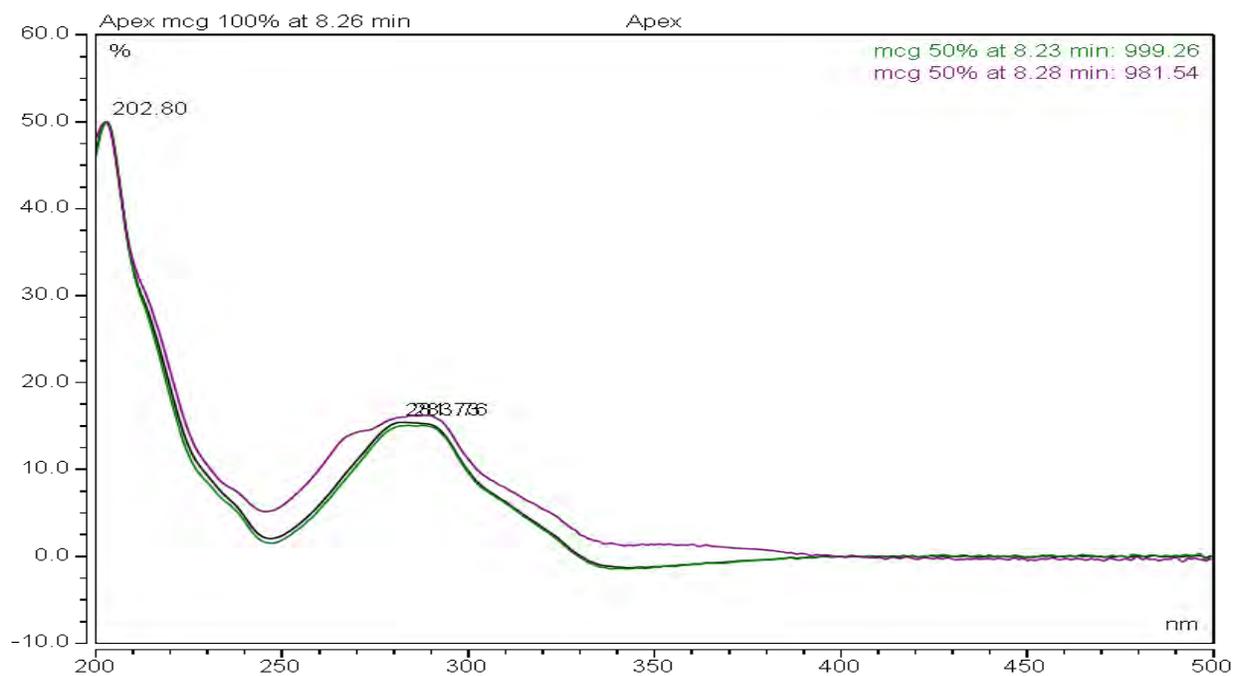
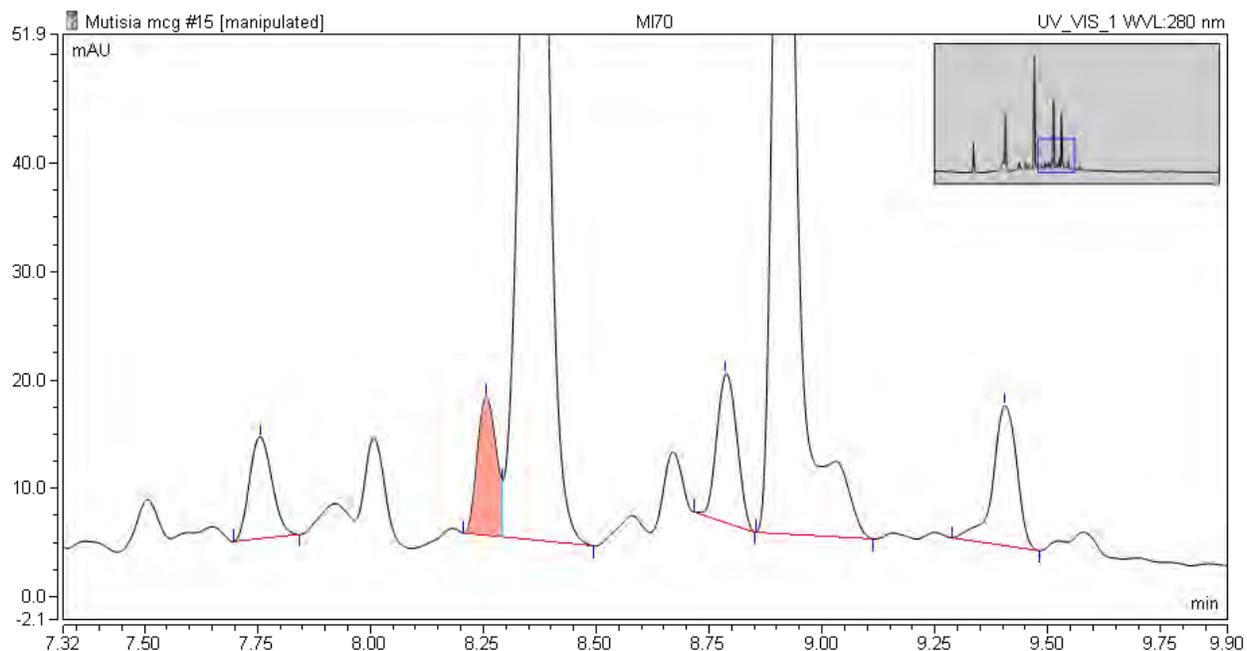




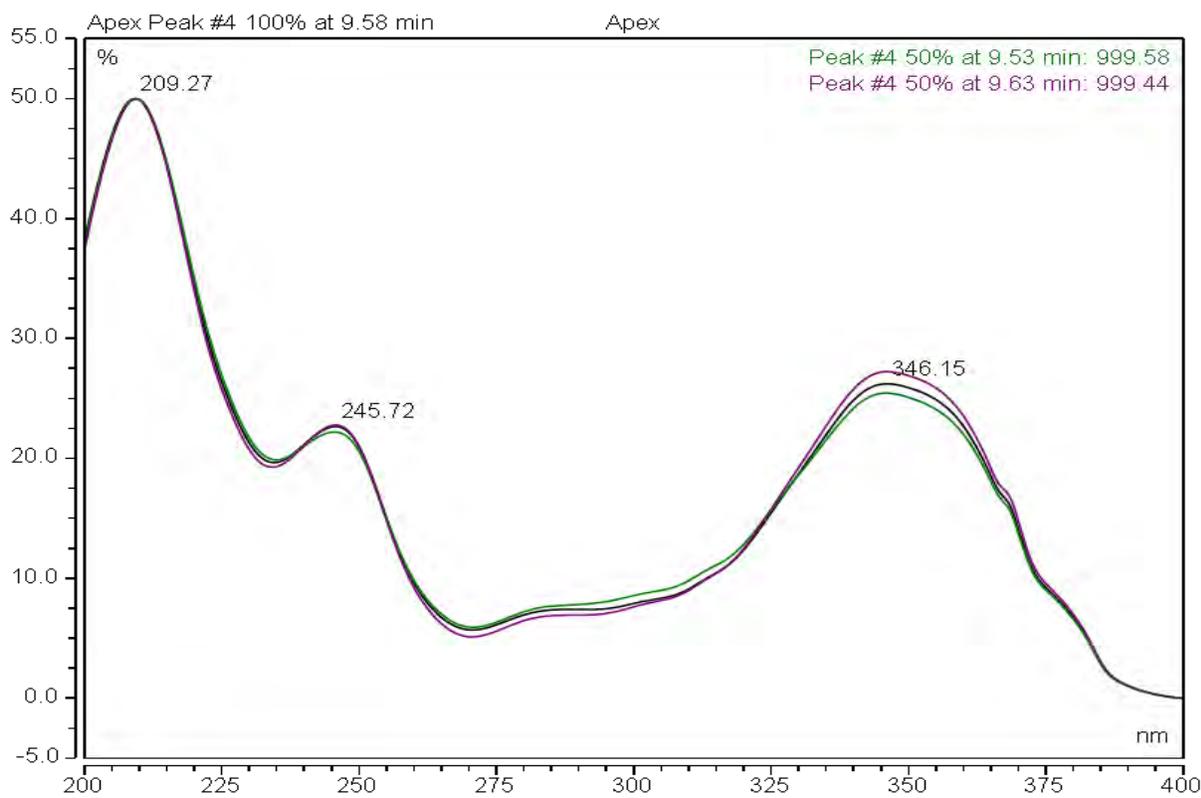
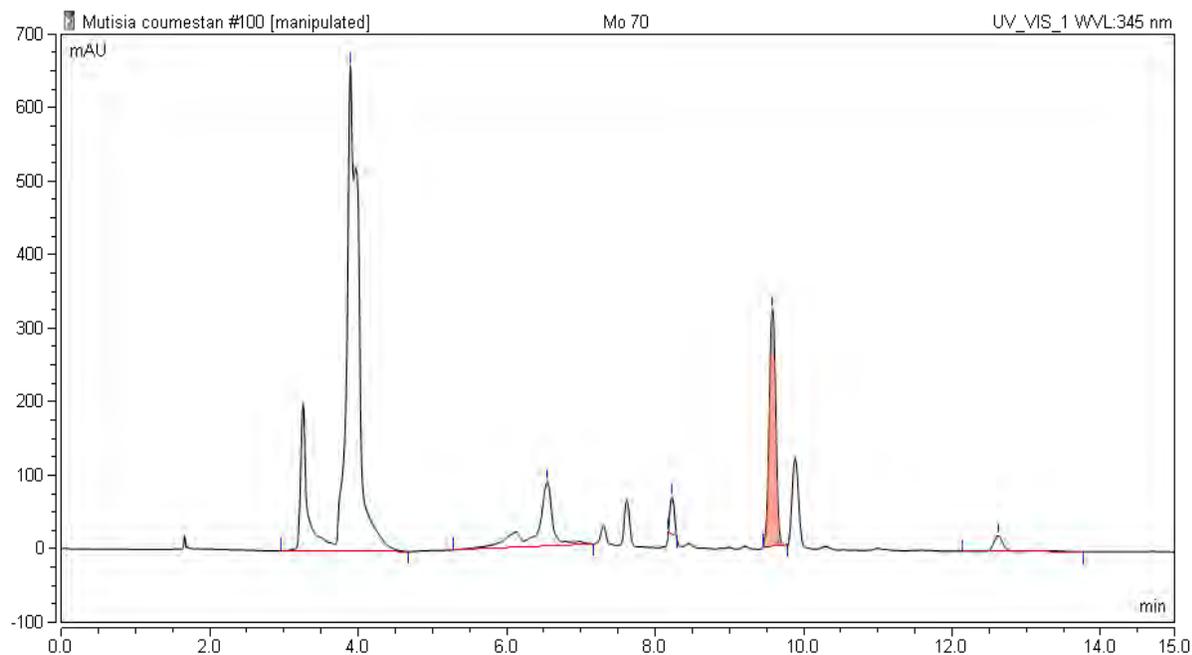
Los cromatogramas y los espectros UV de la cuantificación de los dos productos en *Mutisia acuminata*.

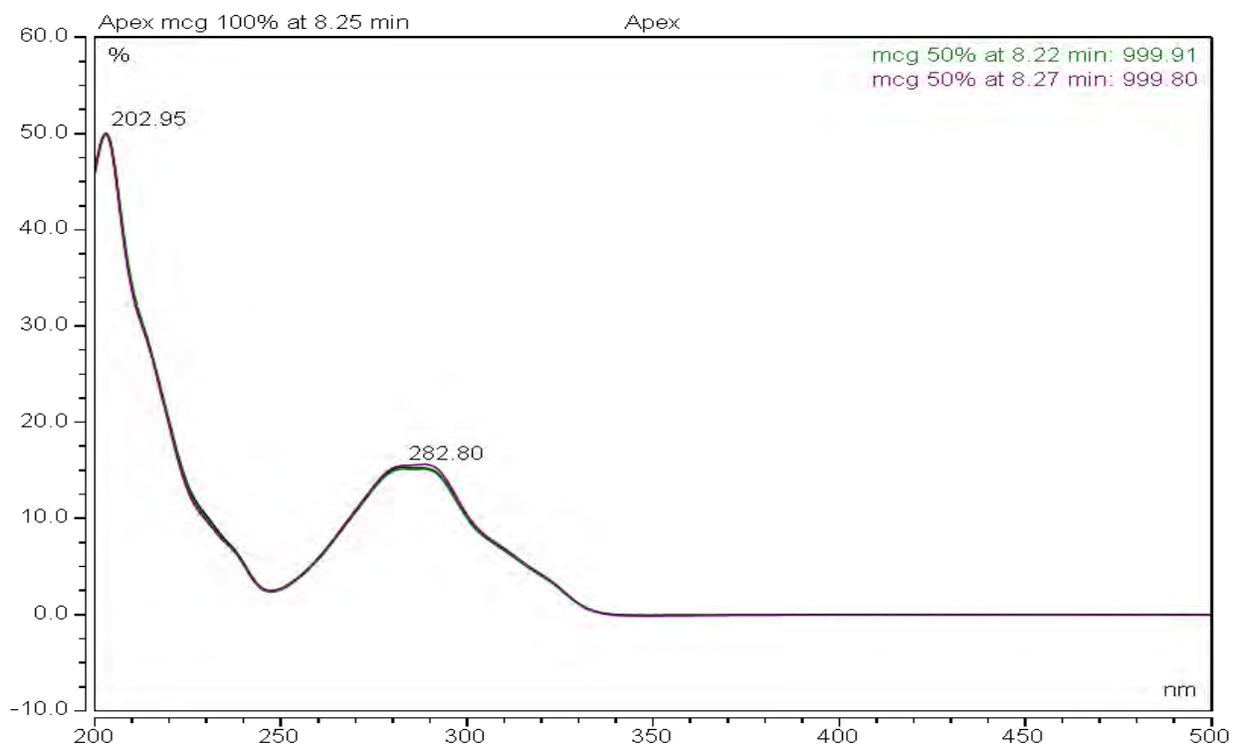
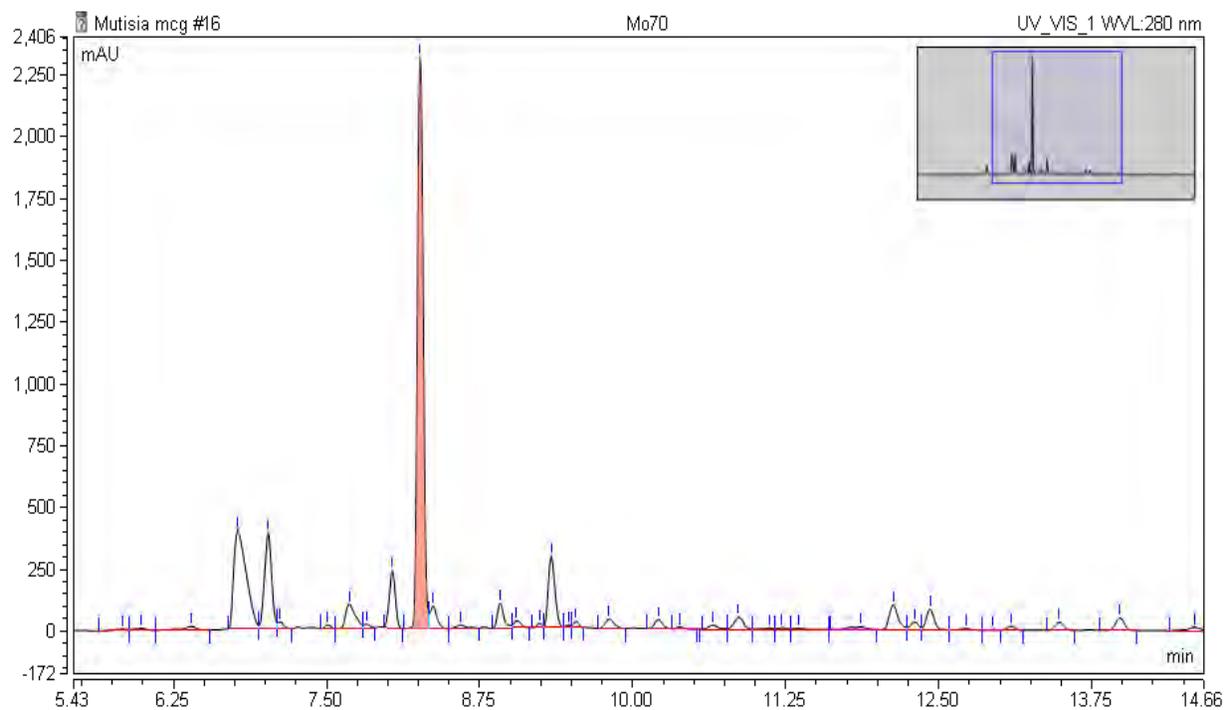
***Mutisia Cochabambensis* (Mc)**

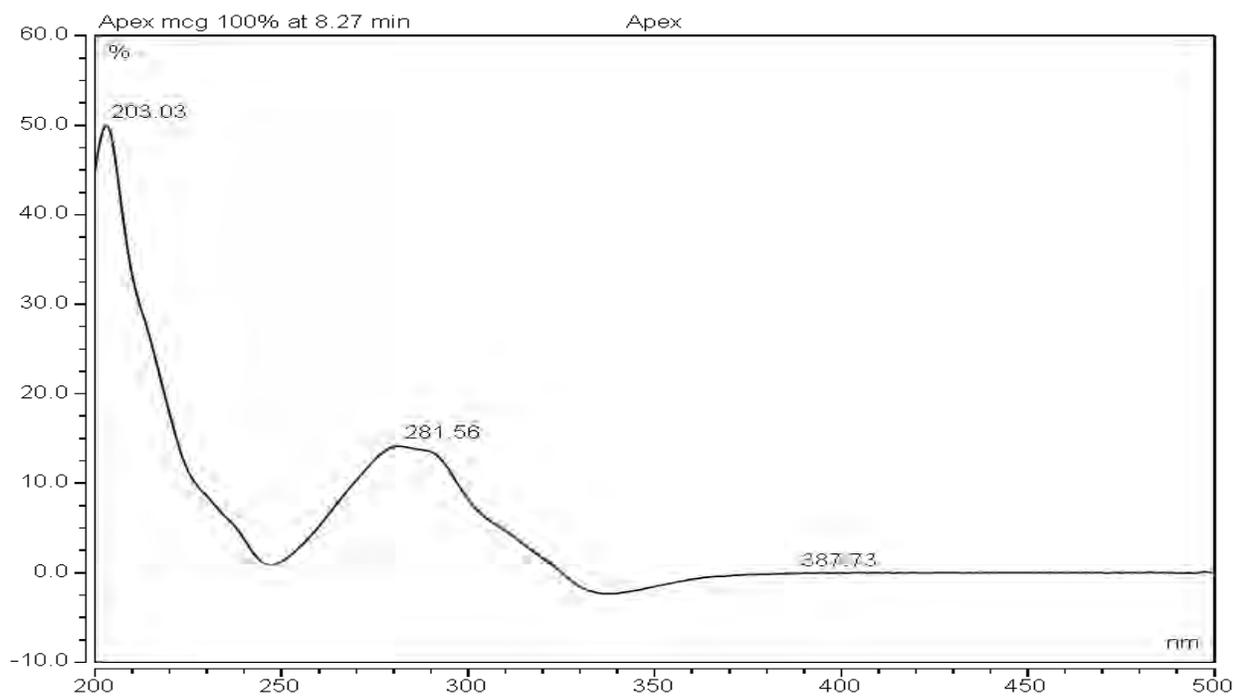
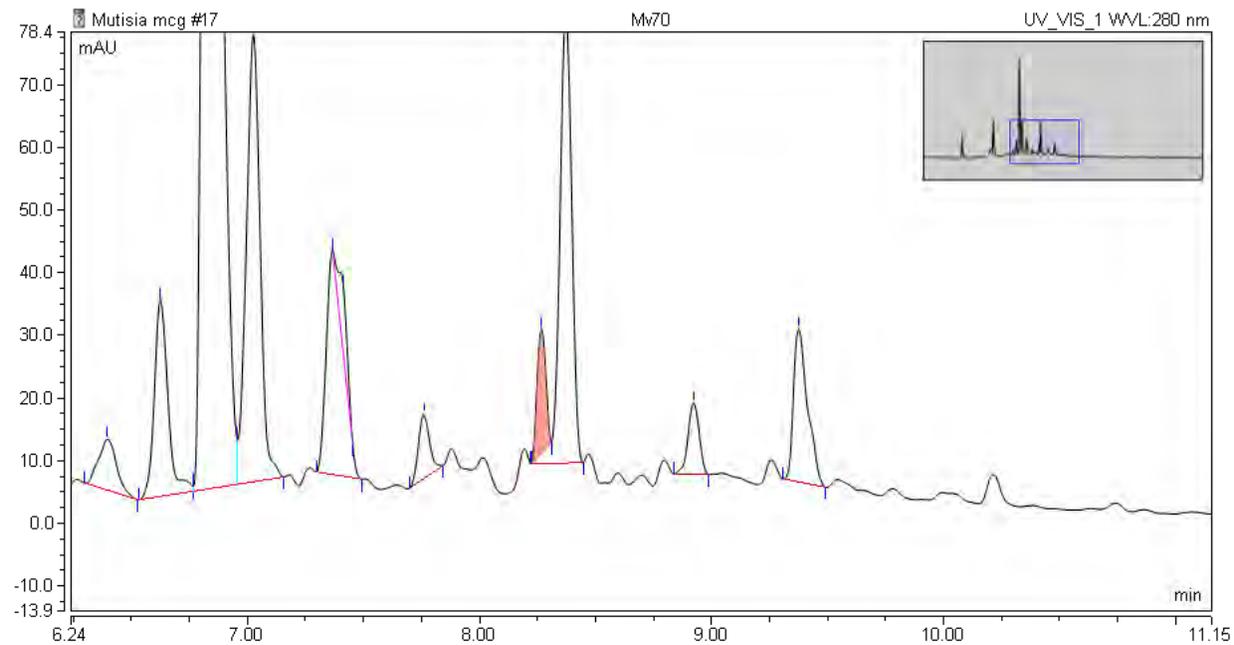
En la cuantificación de los dos compuestos los extractos de *Mutisia cochabambensis* resulto negativo.

***Mutisia lanata* (MI)**

Los extractos de *Mutisia lanata* en la cuantificación de 11,12-hidroxi-5-metilcumestano se mostró negativo, y cuantificación de 5-metilcumarina -4-glucósido se muestran el cromatograma y espectros de UV.

***Mutisia orbignyana* (Mo)**



***Mutisia venusta* (Mv)**

Los extractos de *Mutisia venusta* en la cuantificación de 11,12-hidroxi-5-metilcumestano se mostró negativo, y cuantificación de 5-metilcumarina -4-glucósido se muestran el cromatograma y espectros de UV.



Magdalena Del Mar, 06 de Diciembre del 2022

RD N° D000154-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF

VISTOS:

La solicitud de autorización de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales de flora silvestre, presentada por el señor Carlos Alberto Serrano Flores identificado con DNI N° 23833584, mediante la solicitud s/n registrada el 10 de agosto de 2022 con expediente N° 2022-30649, para el desarrollo del proyecto "**Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem de especies peruanas del género *Mutisia* (*Mutisieae*, *Mutisioideae*, *Asteraceae*)**"; así como, el Informe Técnico N° D0009-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF-IAC de fecha 02 de diciembre de 2022,y,

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66 de la Constitución Política del Perú, señala que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación, siendo el Estado soberano en su aprovechamiento; asimismo, en su artículo 68, se dispone que es obligación del Estado promover la conservación de la diversidad biológica;

Que, en mérito a la Decisión 391, adoptada el 2 de julio de 1996 por los países miembros de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, actualmente: Comunidad Andina de Naciones, integrada por Perú, Colombia, Bolivia y Ecuador; se estableció el Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos, el cual tiene por objeto regular el acceso a los recursos genéticos de los países miembros y sus productos derivados;

Que, el artículo 1 de la citada norma, referido a la Autoridad Nacional Competente, establece que, es la entidad u organismo público estatal designado por cada País Miembro, autorizado para proveer el recurso genético o sus productos derivados y por ende suscribir o fiscalizar los contratos de acceso, realizar las acciones previstas en este régimen común y velar por su cumplimiento;

Que, el artículo 16 de la citada norma, indica que todo procedimiento de acceso requerirá la presentación, admisión, publicación y aprobación de una solicitud, así como la suscripción de un contrato, emisión y publicación de la correspondiente resolución, aunado al registro declarativo de los actos vinculados con dicho acceso;

Que, por su parte, de acuerdo al Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se Deriven



de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica (Protocolo de Nagoya)¹, reconoce la importante contribución de la transferencia de tecnología y la cooperación al desarrollo sostenible, para crear capacidad de investigación e innovación que añada valor a los recursos genéticos en los países en desarrollo, conforme a los artículos 16 y 19 del Convenio de Diversidad Biológica;

Que, mediante el artículo 13 de la Ley N° 29763 “Ley Forestal y de Fauna Silvestre”, se dispuso la creación del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) como organismo público técnico especializado, con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura, constituyéndose en la Autoridad Nacional Forestal y de Fauna Silvestre;

Que, el literal c) del artículo 4 de la mencionada Ley, establece que, el patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación está constituido entre otros, por la diversidad biológica forestal y de fauna silvestre, incluyendo sus recursos genéticos asociados;

Que, mediante el Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM se aprobó el Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados, el cual tiene como finalidad regular las disposiciones referidas al acceso a los recursos genéticos y sus derivados establecidas en la Decisión 391, en concordancia con lo establecido por el Protocolo de Nagoya, identificándose como autoridad nacional competente, entre otros, al SERFOR del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, para el Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, incluyendo los parientes silvestres de especies cultivadas; así como los microorganismos asociados a dicho Patrimonio, que se encuentran en el territorio nacional, que comprende a las áreas de conservación regional y áreas de conservación privada;

Que, de acuerdo al numeral 31.1 del artículo 31 del precitado reglamento, establece que, las Autoridades Nacionales Competentes autorizan la colecta o extracción del recurso biológico que contiene los recursos genéticos en el mismo procedimiento administrativo del acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales;

Que, a través del literal j) del artículo 14 de la Ley Forestal y de Fauna Silvestre, establece que, son funciones del SERFOR, entre otros, gestionar, promover y administrar el régimen común sobre acceso a los recursos genéticos de los recursos forestales y de fauna silvestre en el marco de la Decisión 391 del Acuerdo de Cartagena y demás normas nacionales vinculadas;

Que, conforme a lo dispuesto en el artículo 154 del Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado mediante Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, establece que cuando la investigación científica del patrimonio

¹ Firmado por el Perú el 04 de mayo de 2011 y aprobado mediante Resolución Legislativa N° 30217 del 03 de julio de 2014 y ratificado mediante Decreto Supremo N° 029-2014-RE el 04 de julio de 2014.



de forestal involucre el acceso a los recursos genéticos, el investigador debe suscribir un contrato de acceso con el SERFOR;

Que, en concordancia con el artículo 35² del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y derivados, que señala que la eficacia de las autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales se encuentran sujetas a la suscripción de un contrato, según el formato simplificado aprobado por Resolución Ministerial N° 006-2022-MINAM;

Asimismo, en aplicación del literal g) del artículo 55 del Reglamento de Organización y Funciones del SERFOR, aprobado mediante Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI; es función de la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio de Forestal (DGSPF), entre otras, elaborar, aprobar y suscribir los contratos para actividades de acceso a recursos genéticos de especies de flora silvestre;

Que, mediante el artículo 2 de la Resolución de Dirección General N° D000627-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS, de fecha 15 de noviembre de 2021, la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre delegó en la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal, la función de otorgar permisos de investigación o de difusión cultural con o sin colecta de flora silvestre y sus recursos genéticos, prevista en el literal g) del artículo 53 del Reglamento de Organización y Funciones del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI; delegación efectuada en aplicación del numeral 78.1 del artículo 78 del Texto Único Ordenado - TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS;

Que, en ese contexto, solicitud s/n registrada el 10 de agosto de 2022 con expediente N° 2022-30649, Carlos Alberto Serrano Flores identificado con DNI N° 23833584, solicitó desarrollar un estudio sobre flora silvestre del género *Mutisia*: *Mutisia acuminata*, *Mutisia cochabambensis*, *Mutisia lanata*, *Mutisia orbignyana*, *Mutisia venusta* y *Mutisia wurdackii* procedentes de condiciones in situ de los departamentos de Cusco, Moquegua y Amazonas, en el marco del proyecto “**Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem de especies peruanas del género *Mutisia* (*Mutisieae*, *Mutisioideae*, *Asteraceae*)**”; por el periodo de doce (12) meses;

Que, desarrollar un proyecto de investigación científica sin fines comerciales relacionado a la búsqueda de nuevas especies líquénicas que abundan en nuestro país y que aún han sido poco exploradas;

² Reglamento de acceso a los recursos genéticos y derivados, aprobado por Decreto Supremo N°019-2021-MINAM
“Artículo 35.- Eficacia de las autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales
La eficacia de las autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales se encuentra sujeta a la suscripción de un contrato entre el solicitante y la Autoridad Nacional Competente. Emitida la respectiva autorización, la Autoridad Nacional Competente suscribe con el solicitante el contrato de acceso, según el formato simplificado aprobado”.



Que, el administrado sostiene que las muestras a depositar tendrán el destino Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo como especímenes de respaldo, el mismo que cuenta con registro de Institución Científica Nacional Depositaria de Material Biológico-ICNDMB N° AUT-ICND-2021-003, mediante Resolución de Dirección General N° D0000617-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS;

Que, se solicita la colecta de los recursos biológicos de las especies flora silvestre del género *Mutisia*: *Mutisia acuminata*, *Mutisia cochabambensis*, *Mutisia lanata*, *Mutisia orbignyana*, *Mutisia venusta* y *Mutisia wurdackii*, en el marco de lo dispuesto en el artículo 31 del Reglamento de acceso a los Recursos Genéticos y sus Derivados;

Que, en el actual Texto Único de Procedimientos Administrativos - TUPA del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2016-MINAGRI y modificado por Resolución Ministerial N° 613-2016-MINAGRI, Resolución Ministerial N° 026-2019-MINAGRI, Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000103-2020-MINAGRI-SERFOR-DE y Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000099-2021-MIDAGRI-SERFOR-DE; no se contempla el procedimiento de autorización para acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales;

Que, en observancia del principio de impulso de oficio, previsto en el numeral 1.3 del artículo IV del Título Preliminar del TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General; se colige que, las autoridades deben dirigir e impulsar de oficio el procedimiento y ordenar la realización o práctica de los actos que resulten convenientes para el esclarecimiento y resolución de las cuestiones necesarias;

Que, por tanto, la solicitud que nos ocupa ha sido evaluada en aplicación de los requisitos exigidos en el numeral 27.1 del artículo 27 del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados;

Cabe mencionar que el expediente presentado por el administrado, está conformado por la solicitud de autorización de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales de las especies de flora silvestre, el cual está acompañado por los documentos que sustentan los requisitos presentados, y la colecta de material biológico de flora silvestre, los cuales están en concordancia con el artículo 27 del Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados, y del numeral 31.1 del artículo 31 del citado reglamento, que establece que, las Autoridades Nacionales Competentes autorizan la colecta o extracción del recurso biológico que contiene los recursos genéticos en el mismo procedimiento administrativo del acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales y en el marco de la Resolución de Dirección General N° D000627-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS;

Que, en ese sentido, a través del Informe Técnico N° D0009-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF-IAC, emitido el 02 de diciembre de 2022, se exponen los actuados durante el desarrollo del procedimiento de atención de la solicitud antes citada,



así como su evaluación; informe que se encuentra conforme y cuyo contenido forma parte integrante de la presente resolución;

Que, tras el análisis de las conclusiones y recomendaciones expuestas en el referido informe técnico, se desprende, entre otros, lo siguiente: i) la solicitud presentada por el señor Carlos Alberto Serrano Flores identificado con DNI N° 23833584, reúne las condiciones mínimas y cumple con todos los requisitos para el otorgamiento de la autorización requerida, por lo que procede otorgar la autorización de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales de flora silvestre para el desarrollo del Proyecto “Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem de especies peruanas del género *Mutisia* (Mutisieae, Mutisioideae, Asteraceae)” por el periodo de doce (12) meses, según el cronograma de trabajo del proyecto de investigación presentado; y en consecuencia para su formalización la suscripción del contrato de acceso; ii) Los recursos biológicos que contienen a los recursos genéticos y sus derivados corresponden a *Mutisia*: *Mutisia acuminata*, *Mutisia cochabambensis*, *Mutisia lanata*, *Mutisia orbignyana*, *Mutisia venusta* y *Mutisia wurdackii*, procedentes de condiciones in situ de los departamentos de Cusco, Moquegua y Amazonas; iii) los métodos descritos en el plan de investigación se contempla la colecta de material biológico del género *Mutisia* para realizar las actividades de acceso a los recursos genéticos y sus derivados; iv) se recomienda autorizar la colecta de muestras de flora silvestre para la ejecución del presente proyecto; v) El usuario ha cumplido en presentar la propuesta de distribución de beneficios no monetarios; v) no se requiere del contrato accesorio con una Institución Nacional de Apoyo ni con el proveedor, propietario del recurso o material biológico que contiene el recurso genético al que se accederá; vi) No se presenta petición de confidencial; x) el proyecto de investigación no ha requerido de la recopilación del conocimiento colectivo o tradicional de alguna comunidad por no ser parte de los objetivos del proyecto;

Que, de conformidad con la Decisión 391 “Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos”; el Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados, aprobado por Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM; en ejercicio de la función delegada a través del artículo 2 de la Resolución de Dirección General N°D000627-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS; la Resolución Ministerial N° 006-2022-MINAM, en el marco de lo previsto en la Décima Séptima Disposición Complementaria Final del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados; la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre; el Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado por Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI; el TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado mediante Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; así como, en ejercicio de las atribuciones conferidas por el artículo 56 del Reglamento de Organización y Funciones del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI;

SE RESUELVE:



Artículo 1.- AUTORIZAR la colecta del material biológico de las especies de flora silvestre objeto de la investigación y el acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales de flora silvestre, a favor del señor Carlos Alberto Serrano Flores identificado con DNI N° 23833584, por el periodo de doce (12) meses, en virtud de las consideraciones expuestas en la presente resolución, correspondiéndole el **Código de Autorización N° CTO-ARG-2022-0006**.

Artículo 2.- AUTORIZAR la suscripción del Contrato entre señor Carlos Alberto Serrano Flores y la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal de la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, en virtud de las consideraciones expuestas en la presente resolución.

Artículo 3.- Autorizar la colecta de muestras biológicas de flora silvestre como se detalla en la Tabla 1, para el desarrollo del proyecto de investigación “Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem de especies peruanas del género *Mutisia* (*Mutisieae*, *Mutisioideae*, *Asteraceae*)” cuyo propósito es desarrollar un proyecto de investigación científica sin fines comerciales relacionado a entender de la diversidad química de estas especies, lo cual permitirá establecer las bases científicas a nivel químico para así dar soporte y valor a los usos tradicionales de estas especies en la medicina tradicional de las poblaciones de la región Cusco, Moquegua, entre otras, y así mejorar el aprovechamiento económico de esta especie y para la posible elaboración futura de fitomedicamentos a base de extractos acuosos y alcohólicos químicamente estandarizados.

Tabla 1. Muestras biológicas autorizadas para ser colectados ex situ durante el desarrollo del proyecto de investigación

Punto de muestreo	Localidad	Distrito	Provincia	Departamento	Coordenadas UTM		
					Zona	Este	Norte
<i>Mutisia acuminata</i>	Tlópón	Oropesa	Quispicanchis	Cusco	19K	198807	8494789.8
<i>Mutisia cochabambensis</i>	Tlópón	Oropesa	Quispicanchis	Cusco	19K	198807	8494789.8
<i>M. lanata</i>	Mandor	Lares	Calca	Cusco	18K	716479.8	8506687.8
<i>M. venusta</i>	Miskipuquio	Ollantaytambo	Urubamba	Cusco	18K	781807.3	8539286
<i>M. orbignyana</i>	Cercanías a Yunga	Yunga	General Sánchez Cerro	Moquegua	19K	321837.8	8208218.4
<i>M. wuerdackii</i>	Cercanías Pueblo Cocachimba	Valera	Bongará	Amazonas	18K	278705.9	9312426.2

Fuente: Elaboración DGSPF-SERFOR

La presente autorización no habilita la exportación de muestras forestales. En caso se requiera exportar las muestras obtenidas, el usuario y el equipo de investigación identificado en la presente resolución, podrán gestionar el correspondiente Permiso de Exportación ante el SERFOR a través de la Ventanilla Única de Comercio Exterior - VUCE. Los ejemplares únicos de los grupos taxonómicos colectados y



holotipos solo pueden ser exportados en calidad de préstamo, debiéndose contar con el documento que acredite la recepción de las muestras en el país correspondiente, el permiso de exportación y pasar el control respectivo.

Artículo 4.- Autorizar la participación de los investigadores propuestos para integrar el equipo de investigación, conforme se detalla a continuación:

Tabla 2. Relación de investigadores que participarán en el Proyecto

Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Documento de Identidad	Cargo en el Equipo	Etapas en la que participa	Funciones a realizar dentro de cada etapa	Institución de Procedencia
Carlos Alberto Serrano Flores	Peruana	DNI N° 23833584	Responsable del proyecto	Participa en todas las etapas del proyecto. Análisis fitoquímico y cromatográfico. Redacción de las publicaciones	Responsable del Proyecto; dirigir la investigación, participar en todas las etapas del mismo, realizar los análisis químicos y cromatográficos; redactar los informes y publicaciones.	Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC)
Dina Pillco Paulo	Peruana	DNI N° 71641921	Tesista	Participa en todas las etapas del proyecto. Análisis fitoquímico y cromatográfico Redacción de la Tesis	Ejecución de los procedimientos de laboratorio. Redacción de informes de laboratorio y de la tesis final.	
Gari Vidal Ccana Ccapatinta	Peruana	DNI N° 45542234	Mentor	Participa en todas las etapas del proyecto.	Evaluación de los análisis. Redacción de las publicaciones.	Farmacia Solidaridad

Fuente: Elaboración DGSPF-SERFOR

Artículo 5.- Para el presente proyecto se tiene previsto realizar las actividades del proyecto en cuatro (04) instituciones científicas, de acuerdo con el detalle de la Tabla 4.

Tabla 4. Relación de instituciones científicas que participarán en el Proyecto de investigación

Nombre de la Institución	Dirección	Actividades del proyecto a ser realizadas
Laboratorio de Química Orgánica y Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC)	Av. de la Cultura Nro. 733 - Cusco	- Perfil de sustancias fenólicas por cromatografía en capa delgada y la cromatografía líquida asociada espectroscopia ultravioleta (UHPLC- DAD) -Actividad antioxidante de los extractos
Laboratorio de cromatografía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia	Av. Honorio Delgado 430 Urb Ingeniería - SMP	Perfil de sustancias fenólicas por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS)
Herbarium Truxillense (HUT) es una unidad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo	San Martín 392, Trujillo	-identificación taxonómica -Depósito de muestras herborizadas



Artículo 6.- Se reconoce el origen peruano de los recursos genéticos autorizados y siendo el Estado Peruano el único titular de los recursos biológicos y los recursos genéticos contenidos, objeto del proyecto de investigación autorizado, obtenidas a través de las muestras colectadas, independientemente que sean conservados en condiciones *ex situ*, dentro o fuera del país.

Artículo 7.- El señor Carlos Alberto Serrano Flores deberá de compartir de manera justa y equitativa los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos y derivados, con condiciones mutuamente acordadas, de acuerdo al siguiente detalle:

Tabla 6. Beneficios no monetarios propuestos para el Estado peruano en la autorización de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales

Tipo	Beneficios propuestos	Propuesta de ejecución
Obligatorios	Difusión de resultados de la investigación a actores relevantes, incluyendo a los proveedores del recurso biológico, de acuerdo con lo establecido en las autorizaciones y contratos.	Los resultados de este proyecto serán difundidos a través de un evento virtual o presencial dirigido a la academia y/o público en general en la UNSAAC. No descartamos la posibilidad de presentar dichos resultados en otros eventos donde se permita dar a conocer nuestros resultados.
	Colaboración, cooperación y/o contribución a la formación y capacitación o entrenamiento de actores relevantes, especialistas y/o técnicos.	No solamente se capacitará a la tesista en los análisis fitoquímicos y cromatográficos. Sino también estos procedimientos se utilizarán en asignaturas como “química de productos naturales”, “cromatografía” y “seminario”.
Opcionales	Participación de tesis o estudiantes nacionales en el proyecto.	Un tesista de Química de la UNSAAC
	Acceso para los investigadores nacionales involucrados en el proyecto a las colecciones <i>ex situ</i> y a bases de datos de las colecciones de recursos genéticos de las instituciones que forman parte del proyecto.	Las muestras estarán disponibles en el Herbarium Truxillense de Universidad Nacional de Trujillo para ser utilizadas en futuras investigaciones.
	Acceso a la información científica pertinente a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, incluidos inventarios biológicos y estudios taxonómicos.	Una publicación en revista especializada. Se espera que información botánica y fitoquímica generada induzca a cultivo e incorporación de estas especies como medicinales y porque no ornamentales.



Artículo 8.- De generarse eventuales derechos de propiedad intelectual, en el presente proyecto de investigación para el que se autoriza el acceso a los recursos genéticos y sus derivados, se deberá reconocer el derecho del usuario de tramitar los derechos de propiedad intelectual que le corresponda.

Artículo 9.- De acuerdo con las consideraciones expuestas en la presente resolución el señor Carlos Alberto Serrano Flores tiene el derecho de acceder a los recursos genéticos, mediante su obtención, utilización, conservados en condiciones *ex situ*, con fines de investigación, sin fines comerciales.

Artículo 10.- En el marco de la autorización, los derechos del señor Carlos Alberto Serrano Flores son los siguientes:

- a) Acceder a los recursos genéticos contenidos en el material biológico de las especies autorizadas a coleccionar y utilizar, para el cumplimiento de los objetivos presentados en el proyecto de investigación, en el marco de las condiciones y términos de la autorización o contrato.
- b) Ser asistido por el SERFOR, para el cumplimiento de sus obligaciones.

Artículo 11.- De acuerdo con las consideraciones expuestas en la presente resolución, el señor Carlos Alberto Serrano Flores tiene las siguientes obligaciones:

- a) Implementar las medidas de seguridad y eliminación de impactos que se puedan producir por el desarrollo de las actividades propias de la investigación, tales como las relacionadas con la toma de datos, tratamiento y transporte de muestras, transporte de equipos, personal, entre otros que pudieran significar un riesgo a las muestras.
- b) Presentar al SERFOR informes anuales de avances y/o resultados, así como las publicaciones generadas a partir de las investigaciones realizadas, en el marco de las obligaciones contenidas en la autorización de acceso.
- c) Proporcionar los beneficios no monetarios establecidos en la presente autorización.
- d) Informar al SERFOR cualquier cambio o modificación a lo establecido en la autorización de acceso.
- e) Incluir en las publicaciones, investigaciones y resultados la procedencia de los recursos genéticos y sus derivados accedidos, así como la referencia a la autorización o contrato correspondiente.
- f) Facilitar al SERFOR la integridad de la información en idioma español, relativa a los propósitos, riesgos o implicaciones del acceso, incluyendo los eventuales usos de los recursos genéticos; así como, la información relativa a los antecedentes, estado de la ciencia o de otra índole, que contribuya al mejor conocimiento de la situación relativa a los recursos genéticos, dentro y fuera del territorio nacional.
- g) Patentar únicamente los productos o procedimientos que hayan sido obtenidos o desarrollados a partir de Recursos Genéticos o de sus productos derivados.
- h) Entregar al SERFOR, al término de la investigación el Informe Final con los



resultados obtenidos y posibles desarrollos científicos y de aplicación futura, dentro de un plazo que no exceda de los dos (02) meses contados desde su finalización respecto del proyecto de investigación científica autorizado, de acuerdo a los términos señalados en el Anexo 1. Dicho Informe Final debe contener las publicaciones que realice en base a los recursos genéticos accedidos; al tratarse de publicaciones, éstas se harán con conocimiento previo del SERFOR debiendo, en este caso, reconocerse expresamente el origen de los recursos genéticos accedidos, asimismo, entregar conjuntamente con el informe Final, el cumplimiento de los beneficios no monetarios.

Artículo 12.- En el desarrollo de la autorización de acceso otorgado mediante la presente resolución, se encuentra prohibido:

- a) Ceder o transferir a terceros, sin autorización del SERFOR, el acceso, manejo o utilización de los recursos genéticos autorizados.
- b) Reclamar cualquier tipo de propiedad sobre el recurso genético per se o sus derivados.
- c) Utilizar los recursos genéticos accedidos para fines distintos a lo establecido en la autorización o contrato de acceso.

Artículo 13.- Si en la ejecución de la autorización otorgada se generan o produjeran datos, información o un descubrimiento con potencial comercial o industrial que se requiera utilizar, el usuario deberá solicitar al SERFOR la suscripción de un contrato de acceso con fines comerciales de acuerdo con el procedimiento establecido en el Reglamento de acceso, en el que se establecerán las condiciones mutuamente acordadas y participación en los beneficios.

Artículo 14.- Efectuar la investigación científica autorizada sin transgredir las medidas y restricciones dictadas por el Gobierno, en atención a la actual Emergencia Sanitaria declarada por Decreto Supremo N° 008-2020-SA (incluyendo sus normas complementarias y ampliaciones), así como al Estado de Emergencia Nacional declarado por Decreto Supremo N° 016-2022-PCM (incluyendo sus normas complementarias y ampliaciones), debido a las graves circunstancias que afectan la vida de las personas a consecuencia del brote del COVID-19, e Implementar, en lo que resulte aplicable, las medidas dispuestas en los numerales 8, 11, 12, 12.1 y 12.1.3 del "Protocolo para la implementación de medidas de vigilancia, prevención y control frente al COVID-19 en las actividades de fauna silvestre", aprobado por Resolución Ministerial N° 0177-2020-MINAGRI, de fecha 31 de julio de 2020.

Artículo 15.- El señor Carlos Alberto Serrano Flores, responden solidariamente por el daño que se ocasione al recurso genético contenido en el material biológico de flora silvestre autorizado, siempre que fuera derivado del incumplimiento de alguna de las obligaciones prevista en la presente resolución.

Artículo 16.- Una vez culminada las actividades del acceso a los recursos



genéticos y sus derivados, el usuario será responsable del destino final del material genético utilizado, conforme lo dispuesto en el artículo 5 de la presente resolución.

Artículo 17.- La contravención a las obligaciones y/o condiciones establecidas en la presente resolución podrá ser pasible de determinación de responsabilidades administrativas conforme a lo establecido en el anexo 5 del Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM.

Artículo 18.- Notificar la presente resolución y el Informe Técnico N° D0009-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS, al señor Carlos Alberto Serrano Flores para su conocimiento y fines.

Artículo 19.- Remitir la presente resolución y el Informe Técnico N° D0009-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS, a la Dirección de Información y Registro del SERFOR, para su correspondiente registro; así como, a la Dirección de Control de la Gestión del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, para la fiscalización de su cumplimiento, de ser el caso.

Artículo 20.- Remitir copia de la presente Resolución a la Oficina de Servicios al Usuario y Trámite Documentario, para su custodia y archivo en el repositorio digital.

Artículo 21.- Disponer la publicación de la presente resolución en el portal web del SERFOR: www.gob.pe/serfor.

Regístrese, comuníquese y publíquese,

Documento Firmado Digitalmente

HENRY SANABRIA VILLALVA

Director

Dirección de Gestión Sostenible del
Patrimonio Forestal

Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

ANEXO 1

FORMATO DE INFORME ANUAL DE AVANCES Y/O RESULTADO DE LA AUTORIZACIÓN DE ACCESO SIN FINES COMERCIALES

En orden de dar cumplimiento a los compromisos asumidos en la Autorización de acceso a los recursos genéticos y/o sus derivados sin fines comerciales, el investigador responsable deberá presentar los resultados de la investigación autorizada, teniendo en cuenta lo siguiente:

Entregar a la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal del SERFOR los informes anuales de avances y/o resultados en idioma español como resultado del acceso a los recursos genéticos. Dicha información podrá ser entregada en formato digital a través del aplicativo de la mesa de partes virtual del SERFOR (<https://apps.serfor.gob.pe/mesadepartesvirtual/#/>) o físico en formato impreso en mesa de partes presencial del SERFOR (Av. Javier Prado Oeste 2442, Magdalena del Mar). Para ello, el informe a presentar deberá contar con el siguiente formato:

- Número de contrato de acceso a los recursos genéticos.
- De ser el caso, indicar el número de **Adenda** que acredite las modificaciones realizadas al contrato.
- Indicar el número de resolución que autoriza la investigación que involucra la colecta y/o el número del permiso de exportación (de corresponder)
- Descripción general de la metodología aprobada en el marco del contrato de acceso y de los lugares en donde fue realizado el acceso a los recursos genéticos de las especies autorizadas.
- Resultados o avances del proyecto en el marco de los objetivos propuestos.
- Detalle de los beneficios generados del acceso a los recursos genéticos en el marco de la autorización de acceso sin fines comerciales.

Detalle de los beneficios otorgados en el marco del contrato de acceso suscrita

Nº	Beneficio identificado durante la ejecución del proyecto	Tipo beneficio	Detalle del otorgamiento
1	Beneficio 1	No monetario/ Monetario	Beneficiario, fecha de ejecución, tipo de actividad u otra información a considerar
2	Beneficio 2	No monetario/ Monetario	
3	Beneficio 3	No monetario/ Monetario	
...	Otros beneficios generados o identificados		

- Conclusiones
- Anexos (de ser necesario, adicionar los anexos que considere el investigador).
 - Publicación científica (se podrá adjuntar el enlace de acceso al artículo, DOI, etc.).
 - Tesis de pre o posgrado o el link del repositorio en donde se encuentra depositado.
 - Constancias de depósito.
 - Permiso de exportación para muestras de especies CITES y no CITES con fines de investigación.
 - Material Fotográfico (formato original, para fines de difusión del proyecto respetando los derechos de autor).



Herbarium Truxillense (HUT)
Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo – Perú



“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”

Constancia N° 02-2023-HUT-Fac. CC.BB-UNT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO,

Da Constancia:

Que este despacho ha recibido de parte del Señor Carlos Alberto Serrano Flores, identificado con DNI N° 23833584, la donación de seis (06) muestras botánicas de herbario correctamente herborizadas y determinadas taxonómicamente, correspondientes al Proyecto: “Perfil de componentes fenólicos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem de especies peruanas del género *Mutisia* (Mutisieae, Mutisioideae, Asteraceae)” colectadas bajo RD N° D000154-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF, y que se indican a continuación:

Especies	Número HUT	Localidad	Distrito	Provincia	Dpto.	Coordenadas UTM	
						Este	Norte
<i>Mutisia acuminata</i> var. <i>hirsuta</i> (Meyen) Cabrera	63681	C.A. Tipón	Oropesa	Quispicanchis	Cusco	198807	8494789.8
<i>Mutisia cochabambensis</i> Hieron.	63682	C.A. Tipón	Oropesa	Quispicanchis	Cusco	198807	8494789.8
<i>Mutisia lanata</i> Ruiz & Pav.	63683	Mandor, cerca de Lares. Distrito Lares	Lares	Calca	Cusco	716479.8	8506687.8
<i>Mutisia orbignyana</i> Wedd.	63684	Bajando a pueblo de Yunga	Yunga	General Sánchez Cerro	Moquegua	321837.8	8208218.4
<i>Mutisia venusta</i> S.F. Blake	63685	Quebrada Huaytampo	Ollantaytambo	Urubamba	Cusco	781807.3	8539286
<i>Mutisia wurdackii</i> Cabrera	63686	Camino a catarata Gocta	Valera	Bongará	Amazonas	278705.9	9312426.2

Se agradece al Sr. Serrano Flores por tan importante y valiosa colección botánica y expide la presente Constancia para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 01 de marzo de 2023

cc. Herbario HUT

