

ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA- FACULTAD DE CIENCIAS-
UNIVERSIDAD DE CHILE



VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE QUÍMICA DE CUATRO ESPECIES DEL BOSQUE SIEMPREVERDE DE AYSÉN

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

Francisco Nicolás Quinán Cárdenas

Director de Seminario de Título: Dr. Oney Oscar Ramírez Rodríguez

Co-directora de Seminario de Título: Dra. Merly de Armas Ricard

Profesora Patrocinante: Dra. Julieta Laura Orlando

2021
Santiago de Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Francisco Nicolás Quinán Cárdenas**

VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE QUÍMICA DE CUATRO ESPECIES DEL BOSQUE SIEMPREVERDE DE AYSÉN

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

Director Seminario de Título: _____
Dr. Oney Ramírez Rodríguez

Co-Directora Seminario de Título: _____
Dra. Merly de Armas

Profesora Patrocinante: _____
Dra. Julieta Orlando

Presidenta Comisión Evaluadora: _____
Dra. María Cecilia Rojas

Integrante Comisión Evaluadora: _____
Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

Santiago de Chile, 25 de enero del 2021

BIOGRAFÍA



Francisco Nicolás Quinán Cárdenas

Nació el 11 de septiembre de 1991, en la ciudad de Puerto Aysén. Hijo de María Cárdenas Agüero y José Quinán Teigüel, hermano de Cristian, Andrea, Eduardo y Cristina. Desde chico fue criado con comidas y costumbres chilotas. Empezó sus estudios en la Escuela Básica Ribera Sur, a una cuadra de su casa. Allí empezaron sus cuestionamientos acerca de la relación de las personas con su ambiente, cuando un día, una profesora lo sacó de la sala, junto a sus compañeros, con dirección al arroyo del abuelo “Lalo” para limpiar el lugar de la basura. En el Liceo San José U.R. descubrió su gusto por la Ciencia, en especial por la Química, gracias al entusiasmo de la profesora Nury Valdés. Realizó sus estudios de pregrado en la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en la ciudad de Santiago. Allí, fuera de clases y fuera de los pastos del Campus Juan Gomez Millas, trabajó en la extracción y caracterización de metabolitos secundarios de *Adesmia boronioides* (paramela), en el laboratorio de Química de productos naturales con el Dr. Patricio Rivera y el Dr. Carlos Areche. También estudió la absorción de cobre (II) desde una matriz de suelo *por Allium ampeloprasum* (ajo chilote), en el laboratorio de Química Orgánica y Ambiental con la profesora Ms. Sylvia Copaja. Obtuvo el grado de Licenciado en Ciencias Ambientales con mención en Química el año 2019. Ese mismo año regresa a su región para concluir con sus estudios de pregrado en la naciente Universidad de Aysén, bajo la dirección del Dr. Oney Ramirez y la Dra. Merly de Armas, en el laboratorio de Química y Bioquímica.

Dedicado a mis padres, María y José, y mis hermanos Cristian, Andrea, Eduardo y Dani.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre, por ser un ejemplo de persona. Gracias a su apoyo pude realizar estos estudios en la ciudad de Santiago. A mis hermanos y mi prima Silvia Ester Quinán, por su apoyo y cariño.

A los profesores Patricio Rivera, Carlos Areche, Sylvia Copaja, Oney Ramirez y Merly de Armas, por permitirme trabajar en sus laboratorios, por compartir y enseñarme parte de sus conocimientos.

A Carla Bastías y Emilie Sallé, dos mujeres que también me enseñaron y apoyaron en este proceso.

A los amigos de Aysén y las Gradas, con quienes mi estadía en Santiago también supo de deporte y distensión.

A Carla Valderrama y Margarita del Carmen Olivares, dos personas que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme. Ambas de gran vocación y humanidad.

A la Abuela, de gran sabiduría y bondad con la cual compartí vecindad en Peñalolén. Sus ricas cazuelas también me inspiraron.

Si Dios está en todas partes, entonces está en todas las personas, en todos los animales y plantas, en el alimento, en el suelo, el agua y el aire. En este sentido, le agradezco a Dios.

Este Seminario de título fue financiado gracias al proyecto FIC-Aysén 2017 (BIP 40000496-0) y al programa de movilidad nacional de pregrado CUECH.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. BOSQUE SIEMPREVERDE DE AYSÉN Y CAMBIO CLIMÁTICO.	1
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO POR GENERACIÓN DE ROS EN RESPUESTA A FACTORES ABIÓTICOS.	3
1.3. RESPUESTA ANTIOXIDANTE QUÍMICA DE LAS PLANTAS ANTE ESTRÉS AMBIENTAL.	6
1.4. METABOLITOS SECUNDARIOS ANTIOXIDANTES.	7
1.5. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES A ESTUDIAR.	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. SITIOS DE MUESTREO.....	14
3.2. RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.	16
3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.	16
3.3.1. <i>Preparación de extractos</i>	16
3.3.2. <i>Preparación de disoluciones madre</i>	17
3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	17
3.4.1. <i>Contenido total de fenoles</i>	18
3.4.2. <i>Contenido total de flavonoides</i>	18
3.4.3. <i>Capacidad antioxidante por apagamiento de radicales libres (DPPH)</i>	19
3.4.4. <i>Capacidad antioxidante por reducción del ión cúprico (CUPRAC)</i>	20
3.5. ANÁLISIS DE VARIABLES AMBIENTALES.	22
3.5.1. <i>Temperaturas</i>	23
3.5.2. <i>Precipitaciones</i>	24
3.5.3. <i>Índices de Radiación Ultravioleta</i>	25
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES EN ETANOL.....	27
4.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.	27
4.2.1. <i>Contenido total de fenoles</i>	28
4.2.2. <i>Contenido total de flavonoides</i>	31
4.2.3. <i>Capacidad antioxidante por apagamiento del radical libre DPPH</i>	34
4.2.4. <i>Capacidad antioxidante medida por reducción del ión cúprico (CUPRAC)</i>	38
4.3. ANÁLISIS POR ESPECIE DE LAS CORRELACIONES ENTRE ENSAYOS Y VARIABLES AMBIENTALES.	42
4.4. ANÁLISIS POR SITIO DE LAS CORRELACIONES ENTRE ENSAYOS Y VARIABLES AMBIENTALES.	46
5. DISCUSIÓN	50
6. CONCLUSIONES	59
7. BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXO DE SEMINARIO	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo.....	15
Tabla 2. Descripción de los sitios de muestreo	15
Tabla 3. Disoluciones de los extractos utilizados para cada ensayo.	17
Tabla 4. Fechas de muestreo y periodo de 30 días previos	22
Tabla 5. Temperaturas estacionales promedio.	23
Tabla 6. Cantidad de agua precipitada en Puerto Aysén en el periodo previo al muestreo.	24
Tabla 7. Índice de radiación ultravioleta acumulada.....	25
Tabla 8. Rendimiento del extracto etanólico.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.....	9
Figura 2. Flavonoides detectados en hojas de <i>Nothofagus betuloides</i> y <i>Nothofagus nitida</i>	10
Figura 3. Apagamiento del radical 2,2-difenil-1-picrylhidracilo (DPPH).	20
Figura 4. Reducción del ión cúprico en el complejo con neocuproína.....	22
Figura 5. Variación y comparación interespecie del contenido total de fenoles.....	28
Figura 6. Variación y comparación intraespecie del contenido total de fenoles.....	30
Figura 7. Variación y comparación interespecie del contenido total de flavonoides.	32
Figura 8. Variación y comparación intraespecie del contenido total de flavonoides.	33
Figura 9. Variación y comparación interespecie de la capacidad antioxidante (DPPH).	35
Figura 10. Variación y comparación intraespecie de la capacidad antioxidante medida por apagamiento del radical DPPH.	36
Figura 11. Variación y comparación interespecie de la capacidad antioxidante medida por CUPRAC.	39
Figura 12. Variación y comparación intraespecie de la capacidad antioxidante medida por CUPRAC.	40
Figura 13. Promedios del contenido de metabolitos secundarios antioxidantes y capacidad antioxidante.	42
Figura 14. Correlación entre la capacidad antioxidante del extracto foliar de <i>Rhaphitamnus spinosus</i> y el promedio de agua caída 5 días antes del muestreo.	43
Figura 15. Correlación entre ensayos del contenido de metabolitos y capacidad antioxidante en relación a las variables ambientales para extractos de <i>Nothofagus betuloides</i>	45
Figura 16. Correlaciones entre la capacidad antioxidante del extracto foliar del sitio R.s2 (<i>Rhaphitamnus spinosus</i>) y el promedio de agua caída 5 días antes de cada muestreo.	47
Figura 17. Correlación entre los ensayos del extracto foliar del sitio N.b1 (<i>Nothofagus betuloides</i>) y las variables ambientales.	48
Figura 18. Correlación entre ensayos del extracto foliar del sitio N.n1 (<i>Nothofagus nitida</i>) y las variables ambientales.....	49
Figura 19. Variación del contenido de metabolitos y la capacidad antioxidante.....	56
Figura 20. Capacidad antioxidante (CUPRAC) del sitio R.s2 (<i>Rhaphitamnus spinosus</i>) y su relación con el índice de radiación UV-B acumulado 5 días antes del muestreo.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- dm** = Masa seca del extracto (dry mass, por sus siglas en inglés)
- EC** = Equivalente de catequina
- F-C** = Folin-Ciocalteu
- GAE** = Equivalente de ácido gálico (siglas en inglés de Gallic Acid Equivalent)
- IUV** = Índice de radiación ultravioleta
- Lat** = Latitud geográfica
- Lon** = Longitud geográfica
- M.S.** = Metabolitos secundarios
- m.s.n.m.** = Metros sobre el nivel del mar
- N. betuloides*** = *Nothofagus betuloides*
- N. nitida*** = *Nothofagus nitida*
- N.M.** = No muestreado
- R. spinosus*** = *Rhaphitamnus spinosus*
- RNRS** = Reserva Nacional Río Simpson
- ROS** = Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés de Reactive Oxygen Species)
- TFC** = Contenido total de flavonoides (siglas en inglés de Total Flavonoid Content)
- TPC** = Contenido de total de fenoles (siglas en inglés de Total Phenolic Content)
- V18** = Verano del 2018 (El resto de las estaciones del año; O18, I18, P18)
- V19** = Verano del 2019 (El resto de las estaciones del año; O19, I19, P19)
- W. trichosperma*** = *Weinmannia trichosperma*

RESUMEN

El bosque siempreverde de Aysén, al igual que todos los ecosistemas, está sujeto a la variación estacional de condiciones ambientales tales como la temperatura, las precipitaciones, la radiación UV-B, la intensidad de la luz, etc., las cuales podrían alcanzar valores extremos por efectos del cambio climático. Específicamente, se ha reportado que las temperaturas extremas, la falta o exceso de agua y los altos niveles de radiación UV-B e intensidad de la luz, causan estrés oxidativo en las plantas por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ante esta situación, estos organismos generan una respuesta al estrés abiótico activando sus sistemas antioxidantes enzimático y no enzimático. El aumento del contenido de polifenoles es una de las respuestas no enzimáticas al estrés oxidativo. Estos compuestos son una amplia familia de metabolitos secundarios, que incluye flavonoides, cumarinas, entre otros. Diversos estudios informan el aumento en la concentración de compuestos fenólicos en plantas luego de haber sido expuestas a condiciones de estrés abiótico. En este sentido, al conocer la respuesta antioxidante estacional de las plantas, es posible establecer las condiciones ambientales que las afectan y así poder predecir su respuesta a los cambios en las condiciones ambientales derivados del cambio climático. Por lo anterior, en esta investigación se propuso estudiar la relación entre la concentración de polifenoles, flavonoides, la capacidad antioxidante de los extractos foliares de cuatro especies nativas (*Rhaphithamnus spinosus*, *Nothofagus betuloides*, *Nothofagus nitida* y *Weinmannia trichosperma*) del bosque siempreverde de Aysén (Reserva Nacional Río Simpson) y la variación de las condiciones ambientales (temperaturas, precipitaciones e índices de

radiación UV-B) durante las cuatro estaciones de dos años consecutivos (2018-2019). La cuantificación total de flavonoides y polifenoles se realizó mediante los métodos del cloruro de aluminio y Folin-Ciocalteu, respectivamente. El análisis de la capacidad antioxidante se realizó mediante el método de apagamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y mediante la reducción del ión cúprico del complejo con neocuproína (CUPRAC). Se encontró que los extractos foliares de todas las especies experimentan cambios estacionales significativos en su respuesta antioxidante. Incluso, se observó que en algunas especies la respuesta antioxidante depende de la ubicación de los individuos en el bosque. En cuanto a la relación entre la respuesta antioxidante y las variables ambientales, se encontró que las especies de dosel, *Nothofagus betuloides* y *Nothofagus nitida*, mostraron una disminución de su capacidad antioxidante aquellos días de altas temperaturas (>13 °C) y de mayor radiación UV-B acumulada en un mes, sugiriendo que un aumento de temperatura, dentro de los rangos estudiados, no es una condición de estrés para estas especies. Por otra parte, *Rhaphitamnus spinosus* aumentó su capacidad de evitar el daño oxidativo provocado por radicales libres a medida que aumentó la cantidad de agua caída en un periodo de cinco días antes de la toma de muestra. Este resultado sugiere una mayor susceptibilidad de esta especie a experimentar estrés oxidativo ante las intensas lluvias o en suelos inundados. Finalmente, *W. trichosperma* fue la especie que presentó el mayor contenido total de fenoles y la mayor capacidad antioxidante (DPPH y CUPRAC). Su respuesta antioxidante química no se correlacionó con ninguna de las variables ambientales estudiadas.

ABSTRACT

The evergreen forest of Aysén, like all ecosystems, is subject to seasonal variation in environmental conditions such as temperature, rainfall, UV-B radiation, light intensity, etc., which could reach extreme values due to the effect of climate change. Specifically, it has been reported that extreme temperatures, lack or excess of rainfall, and high levels of UV-B radiation and light intensity, cause oxidative stress in plants by the generation of reactive oxygen species (ROS). In this context, these organisms generate a response to abiotic stress by activating their enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. Increased polyphenol content is one of the non-enzymatic responses to oxidative stress. These compounds are a wide family of secondary metabolites, which includes flavonoids, coumarins, among others. Several studies report the increase in the concentration of phenolic compounds in plants after being exposed to abiotic stress conditions. Moreover, by knowing the seasonal antioxidant response of plants, it is possible to establish the environmental conditions that affect them, and thus, to be able to predict their response to changes in environmental conditions derived from climate change. Therefore, the aim of this research was to study the relationship between the concentration of polyphenols, the total flavonoid content, the antioxidant capacity of the foliar extracts of four native species (*Rhaphithamnus spinosus*, *Nothofagus betuloides*, *Nothofagus nitida* and *Weinmannia trichosperma*) of the evergreen forest of Aysén (Río Simpson National Reserve) and the variation in environmental conditions (temperatures, rainfall and UV-B radiation indices) throughout the years 2018 and 2019. The total flavonoid and phenolic

contents were performed by the aluminum chloride and Folin-Ciocalteu methods, respectively. The analysis of the antioxidant capacity was carried out using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical quenching method (DPPH) and by reducing copper (II) from the complex with neocuproin (CUPRAC). The foliar extracts of all species exhibit significant seasonal changes in their antioxidant response. It was even observed that in some species the antioxidant response depends on the location of the individuals in the forest. Regarding the relationship between antioxidant response and environmental variables, it was found that the canopy species, *Nothofagus betuloides* and *Nothofagus nitida*, showed a decrease in their antioxidant capacity on days of high temperatures (> 13 °C) and higher UV-B radiation accumulated in a month. This suggests that an increase in temperature, within the ranges studied, is not a stressful condition for these species. Besides, *Rhaphitamnus spinosus* increased its ability to prevent oxidative damage caused by free radicals as rainfall increased in a five-day period prior to sampling. This result suggests a greater susceptibility of this species to oxidative stress due to intense rains. *W. trichosperma* showed the highest total phenolic content and antioxidant capacities (DPPH and CUPRAC). There was no correlation between its antioxidant response and any of the environmental variables analyzed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bosque siempreverde de Aysén y Cambio Climático.

En Chile, los bosques nativos cubren aproximadamente 136.000 km², y de esta superficie, unos 35.055 km² corresponden al tipo siempreverde (CONAF, 2017), también conocido como bosque templado valdiviano. Sólo en la región de Aysén, se concentra un 37 % de la superficie nacional de bosque nativo (Bachmann, 2009) y un 54 % del bosque siempreverde nacional (CONAF, 2017), siendo este último caracterizado por poseer un alto grado de vida silvestre (Álvarez y col., 2010; Ramírez y col., 2014), y por lo cual ha sido clasificado entre las 200 ecorregiones biológicamente más valiosas y en peligro crítico del mundo, que requieren una acción de conservación inmediata (Olson y Dinerstein, 1998). La alta biodiversidad que compone este bosque cumple un papel fundamental en el funcionamiento y la resiliencia de este ecosistema. Sin embargo, al igual que todos los ecosistemas del planeta, está sujeto a la variación estacional de condiciones ambientales tales como la temperatura, precipitación y radiación ultravioleta, así como la acentuación de estas variables debido al calentamiento global. En este último aspecto, a mediano y largo plazo, el consensuado pronóstico sobre el cambio climático señala un aumento en la concentración de CO₂ atmosférico y consecuentemente de la temperatura en la superficie de la Tierra, así como también eventos meteorológicos extremos más recurrentes, por ejemplo, olas de calor, sequías, heladas e inundaciones (Mittler y Blumwald, 2010; IPCC, 2014). Este escenario, podría tener consecuencias no deseadas en los bosques ubicados en las altas latitudes del mundo (IPCC, 2014).

Se ha reportado que a pesar de que estos eventos extremos suelen ser de corta duración, estos causan estrés oxidativo y reducciones significativas en la productividad de los cultivos y árboles (Ciais y col., 2005; Zinta y col., 2014), ya que éstos ven sobrepasada su capacidad de adaptación (Jentsch y col., 2011). De hecho, se ha reportado que uno de los efectos más importantes del estrés relacionado con el cambio climático, a nivel molecular, es el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de las células vegetales (Farnese y col., 2016). En América del Sur, las selvas tropicales amazónicas ya han experimentado graves sequías junto con altas temperaturas debido al calentamiento global, lo que ha generado una disminución de la biomasa neta y una mayor mortandad (Jiménez-Muñoz y col., 2016). En el caso de la región de Aysén (43–49 °S, Chile), un análisis de tendencia de temperatura en el periodo 2001-2016 mostró una tasa de calentamiento de +0,78 °C/década ($p \leq 0,05$), un enverdecimiento de +0,01/década para el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI; $p \leq 0,05$) sobre la zona occidental, y una tendencia al secado sobre la zona oriental ($p \leq 0,05$). Las anomalías de temperatura mínima mostraron un aumento de aproximadamente 4,5 °C durante el período bajo análisis (Olivares-Contreras y col., 2019).

En este escenario, toma importancia el estudio molecular de las especies arbóreas, que por cierto cumplen un rol fundamental en la mitigación de los efectos del cambio climático. Ya en el año 1993, Chapin y sus colaboradores indicaron que la comprensión de cómo las plantas responden a las fluctuaciones en las condiciones ambientales es crucial para predecir las respuestas de las plantas y los ecosistemas al cambio climático (Chapin y col., 1993).

1.2. Estrés oxidativo por generación de ROS en respuesta a factores abióticos.

Las ROS son especies reactivas del oxígeno formadas por la transformación redox incompleta de este elemento, en general, poseen una vida media corta y una alta reactividad química. En plantas, las que se generan con mayor frecuencia son el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), aunque también se encuentra el oxígeno singlete (1O_2). En condiciones fisiológicas, son indispensables para el metabolismo celular adecuado, regulando procesos como la proliferación celular, la diferenciación celular, las reacciones de señalización y la muerte celular programada (Karpínski y col., 2013; Foyer y Noctor, 2013; Mittler, 2017; Gilroy y col., 2016). En cuanto a su función como moléculas de señalización, estas especies participan en procesos biológicos como la defensa ante patógenos, tolerancia al estrés abiótico, regulación estomática, desarrollo, crecimiento y expansión celular (Blomster y col., 2011; Rhoads y col., 2006; Sierla y col., 2013; Susuki y col., 2011). Sin embargo, su producción y acumulación debe controlarse estrictamente, debido a su alta reactividad y toxicidad en mayores concentraciones. El desequilibrio entre su producción y la defensa antioxidante puede dañar lípidos (peroxidación lipídica), proteínas, ácidos nucleicos e incluso conducir a la destrucción oxidativa de la célula en un proceso denominado estrés oxidativo (Mittler, 2002; Frohnmeyer y Staiger, 2003). En las células vegetales, la peroxidación autocatalítica de los lípidos y pigmentos de la membrana puede provocar pérdida de la semipermeabilidad de ésta, lo que altera sus funciones (Xu y col., 2006).

En el entorno natural, las plantas están expuestas simultáneamente a una variedad de condiciones tanto bióticas como abióticas que pueden ser desfavorables, generando así estrés

biótico o abiótico, respectivamente. En la célula y ante situaciones de estrés abiótico, las principales fuentes de ROS son: fotorrespiración excesiva, actividad de NADPH oxidasa (NOX), β -oxidación de ácidos grasos y trastornos en las cadenas de transporte de electrones de mitocondrias y cloroplastos (Apel y Hirt, 2004; AbdElgawad y col., 2015; Kangasjärvi y col., 2012). De hecho, debido a que el estado redox de los cloroplastos y los peroxisomas [dos de los principales sitios de producción de ROS (Wrzaczek y col., 2013)] está afectado por la fotorrespiración, las tensiones ambientales que afectan a ésta; por ejemplo, altas o bajas temperaturas, sequía o inundación, radiación excesiva y salinidad; disminuyen la conductancia estomática y, por lo tanto, influyen en su homeostasis redox. Además, estas tensiones ambientales también inducen la formación de ROS directa o indirectamente en el apoplasto, la membrana plasmática, las mitocondrias, y el retículo endoplasmático, debido a la acción de otras vías de señalización (Carvalho, 2008; Lattanzio, 2013; Hideg y col., 2013; Farnese y col., 2016; Corpas y col., 2015).

Ya sea ante estrés térmico, hídrico o por radiación UV-B, el daño en la planta está determinado por la especie, la etapa de crecimiento de ésta, el tejido expuesto, el grado de temperatura o flujo de radiación, y el tiempo de exposición (Sung y col., 2003; Larkindale y col., 2005; Patel et al., 2014; Brown y col., 2008). Cuando la condición ambiental genera estrés en la planta, se afecta el crecimiento, desarrollo y su distribución geográfica.

En el caso de estrés térmico, cada planta tiene una temperatura óptima específica a la cual su crecimiento progresa a una velocidad máxima (Hatfield y Prueger, 2015). Se ha reportado que tanto bajas como altas temperaturas pueden generar la reducción del crecimiento de las plantas, la pérdida de agua, alteración del sistema fotosintético y estrés oxidativo debido a la producción excesiva de ROS en las hojas (Dorigan y col. 2019; Li y col., 2018;

Hasanuzzaman y col., 2013; Vacca y col., 2006). Por otro lado, tanto la falta como el exceso de agua, también generan estrés oxidativo. Ya sea en sequía o inundación, la formación de peróxido de hidrógeno es una de las primeras respuestas, ya que actúa como una molécula señalizadora importante que se transmite desde la raíz a las hojas para provocar el cierre de estomas. A medida que se prolonga el estrés, este oxidante provoca peroxidación lipídica y la consecuente destrucción de la membrana celular, afectando así la permeabilidad selectiva de ésta (Tewari & Mishra, 2018; Striker & Colmer, 2017; Colmer & Voesenek, 2009). En cuanto a la radiación UV, altos niveles de radiación UV-B (280-315 nm; McKenzie y col., 2011) provocan la reducción de la fotosíntesis neta (Allen y col., 1997; Kakani y col., 2004), daños al fotosistema II (Nedunchezian y Kulandaivelu, 1996; Hideg y col., 2006), la disminución de la concentración de clorofila (Li y col., 2000b; Alexieva y col., 2001; Ambasht y Agrawal, 2003) y una excesiva producción de ROS, lo cual en poco tiempo anula la capacidad antioxidante (Hideg y col., 2013). Es por ello que el incremento en las tasas de esta radiación puede afectar a los ecosistemas naturales (Rousseaux y col., 2004), y, debido al agujero en la capa de ozono, puede ser un factor especialmente importante de estudiar en el hemisferio sur (Kerr y McElroy, 1993; Madronich y col., 1995; Rozema y col., 2002). En el sur de Chile, las dosis medias diarias de UV-B son más altas que las de otros países en latitudes similares en el hemisferio sur, por ejemplo, Australia y Nueva Zelanda (Seckmeyer y col., 1995; McKenzie y col., 1996; Lovengreen y col., 2000; Huovinen y col., 2006).

1.3. Respuesta antioxidante química de las plantas ante estrés ambiental.

Para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo y asegurar la supervivencia y adaptación a los cambios ambientales, las plantas responden aumentando su capacidad para eliminar ROS activando sus sistemas antioxidantes enzimático y no enzimático (Wang y col., 2019). El primero basado en la actividad de las enzimas desintoxicantes de ROS, por ejemplo, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas (Choudhury y col., 2017); y el segundo basado en la producción de moléculas antioxidantes como: ascorbato, glutatión, carotenoides, tocoferoles, polifenoles, entre otros (Cheng y col., 2018). Halliwell y Gutteridge (2007) definieron un antioxidante como una sustancia que, cuando está presente en una concentración baja en comparación con la de un sustrato oxidable en el medio, inhibe la oxidación del sustrato. Bajo esta definición, los compuestos fenólicos se consideran antioxidantes naturales y se ha relacionado el aumento en su biosíntesis en condiciones de estrés severo, cuando la actividad de las enzimas antioxidantes, consideradas la primera línea de defensa contra ROS, disminuye (Fini y col., 2011; Gharibi y col., 2019). Se ha documentado que estos compuestos se acumulan en respuesta a condiciones de estrés por temperatura (altas, bajas o congelamiento), falta de agua, salinidad, metales pesados, herbicidas y altos niveles de radiación UV-B, contribuyendo a la adaptación de las plantas a ambientes desfavorables (Sharma y col., 2019; Pott y col., 2019; Müller-Xing y col., 2014; Mouradov y Spangenberg, 2014; Agati y col., 2012; Pollastri & Tattini, 2011). Por ejemplo, Rivero y col., (2001) encontraron que el estrés por temperatura alta en *Lycopersicon esculentum* L. (tomate) ocurrió a los 35 °C, y en sandía *Citrullus lanatus* (Thunb.), por baja temperatura a los 15 °C. En ambos casos el estrés térmico se indujo por un periodo de 30 días y conllevó la acumulación de compuestos fenólicos. Por

otro lado, se ha demostrado que el estrés por congelamiento en plantas también provoca el aumento en las concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides (Hashempour y col., 2014; Ahmed y col., 2015). Respecto al estrés hídrico, Yordanova y col., (2004) encontraron que plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) sometidas durante 120 h a inundación (hipoxia), mostraron una mayor formación de ROS y una limitación del sistema de defensa antioxidante enzimático. En cuanto al estrés por radiación UV-B, a bajas tasas es capaz de promover cambios metabólicos, por ejemplo, aumentando la biosíntesis de compuestos fenólicos (Ulm y Nagy, 2005; Jenkins y Brown, 2008). Se ha reportado la acumulación de glucósidos de flavonol, los cuales se producen en las vacuolas de las células epidérmicas y subepidérmicas y protegen a las plantas al actuar como pantallas protectoras, debido a su capacidad para la absorber la radiación de alta energía a 250-270 y 335-360 nm (Emiliani y col., 2013; Hectors y col., 2014; Winkel-Shirley, 2002). Los altos flujos de radiación UV-B pueden impulsar la excesiva producción de ROS que pueden derivar en la muerte celular.

1.4. Metabolitos secundarios antioxidantes.

Las plantas, como organismos autótrofos, producen todos los compuestos orgánicos necesarios para soportar su vida. Estos metabolitos se clasifican en primarios y secundarios. Estos últimos tienen una gran variedad de funciones beneficiosas para ellas en su interacción con el ambiente (Bennett y col., 1994; Wink, 2008). Es por ello que la acumulación de estas sustancias suele depender de factores ambientales tales como la temperatura, precipitaciones, radiación ultravioleta, luz, salinidad y disponibilidad de nutrientes en el suelo. En la mayoría de las plantas, un cambio en un factor individual puede alterar el contenido de metabolitos secundarios (M.S.), incluso si otros factores permanecen constantes (Wink, 2008). Estos

M.S. se sintetizan a partir de metabolitos primarios como el acetyl-CoA e intermediarios de la glicólisis, el ciclo de Krebs y la ruta del ácido shikímico. Estas vías, en combinación, producen una enorme diversidad de estructuras químicas y actualmente se han identificado unas 140.000 (Wink, 2008; Grace, 2005).

Un grupo de metabolitos secundarios son los polifenoles. Estos están formados por uno o más grupos hidroxilo enlazados a un anillo aromático (Croteau y col., 2000), los cuales pueden estar metilados y/o glicosilados. En las plantas, la gran mayoría son biosintetizados en la vía fenilpropanoide, que transforma la fenilalanina y la tirosina, obtenidas en la vía del ácido shikímico, a una serie de compuestos fenólicos (Hahlbrock y Scheel, 1989; Naikoo y col., 2019), que se pueden dividir en cinco subgrupos: ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, ligninas y taninos (Gumul y col., 2007). Estos compuestos cumplen diversas funciones fisiológicas en las plantas, necesarias para su supervivencia y adaptación a los cambios ambientales (Sharma y col., 2019), que incluye la defensa contra herbívoros y patógenos, soporte mecánico, atrayendo polinizadores y dispersores de frutas, absorbiendo radiación ultravioleta dañina o reduciendo el crecimiento de plantas competidoras cercanas (Taiz & Zeiger, 2010). Ante estrés ambiental, la función antioxidante de estos compuestos está dada por el hecho de que son excelentes eliminadores de radicales libres, reductores y agentes quelantes de metales de transición, evitando así la oxidación de las biomoléculas. Los radicales fenoxilo son menos reactivos que los otros radicales libres del oxígeno, teniendo menor potencial de reducción, debido a la presencia del anillo aromático que estabiliza al electrón desapareado por resonancia (Grace, 2005; Bors y col., 1990, 1994). Foti (2007) destacó que los fenoles tienen la capacidad de ralentizar la formación de radicales

libres, así como también quelar metales como el hierro, manganeso y cobre. Esta última capacidad evita la reacción de Fenton (Rice-Evans y col., 1997).

Dentro de los polifenoles, la clase más estudiada son los flavonoides, su estructura básica se compone de dos anillos de benceno (anillos A y B) conectados por tres carbonos que forman un anillo de pirano (anillo C) (Figura 1; Lattanzio, 2013; Das y col., 2017). Su síntesis en plantas ocurre a partir de intermediarios de la ruta fenilpropanoide y de la ruta del policétido, para formar el esqueleto C6–C3–C6 (flavan), característico de todos los flavonoides (Winkel-Shirley, 2001).

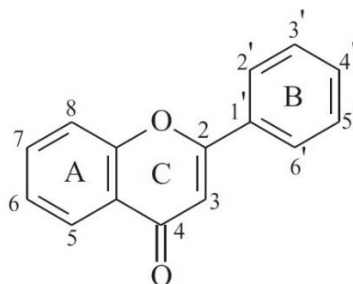


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.

Se ha demostrado que la actividad antioxidante de los flavonoides incluye: (1) eliminación de ROS debido a su bajo potencial redox (Shokoohinia y col., 2015), reduce los radicales libres altamente oxidados mediante la donación de hidrógeno (Kovacic y Somanathan, 2011); (2) supresión de la generación de ROS por inhibición de enzimas y quelación de elementos traza (Catapano y col., 2017; Nile y col., 2016; Pollastri y Tattini, 2011).

De las especies del bosque siempreverde de Aysén que se mostrarán en este trabajo y a las que se le ha estudiado el contenido de flavonoides en las hojas, tanto en *Nothofagus betuloides* como en *Nothofagus nitida*, se detectó la presencia de kaempferol,

dihidrokaempferol, quercitrina y rutina (Benoit y col., 1964). El kaempferol y la rutina son conocidos antioxidantes con actividad antiinflamatoria, que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y verduras (De Melo y col., 2009). El primero se produce mediante la introducción de un doble enlace en la posición C2-C3 en el esqueleto del dihidrokaempferol por la actividad de la flavonol sintasa (fig. 2a; M Calderon-Montano y col., 2011). El segundo es un flavonide glicosilado al que además se le atribuyen propiedades antitumorales, antibacterianas, antivirales y antihipertensivas (fig. 2b; Yang y col, 2008).

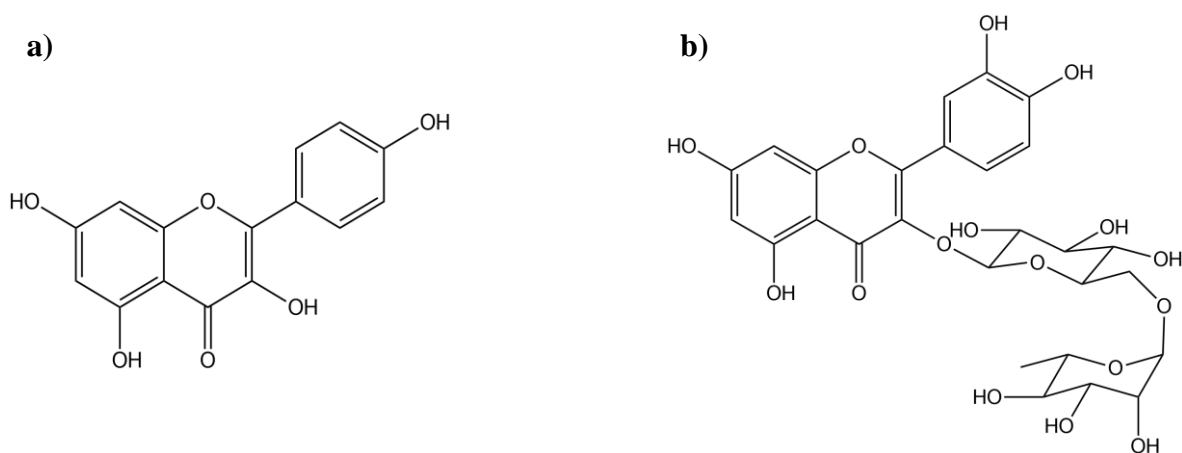


Figura 2. Flavonoides detectados en hojas de *Nothofagus betuloides* y *Nothofagus nitida*. a) Kaempferol; b) Rutina (Quercetina-3-O-Rutinoso).

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo se propone estudiar la variación estacional de la respuesta antioxidante química de cuatro especies del bosque siempreverde de Aysén, a lo largo de dos años consecutivos (2018-2019). Esta respuesta considera los cambios en el contenido total de polifenoles, el contenido total de flavonoides, y la capacidad antioxidante de sus extractos foliares. Esto permitirá generar datos sobre el comportamiento de estas especies a nivel molecular y empezar a entender la relación de sus cambios con las variables

ambientales. Esto se podría utilizar como un método de monitoreo ambiental del estrés al que está siendo sometida una especie, o también, para proyectar los posibles efectos de eventos meteorológicos extremos sobre las especies de este bosque.

1.5. Descripción de las especies a estudiar.

***Rhaphitamnus spinosus* (Juss.) Moldenke (Espino)**

Es un árbol siempreverde endémico de Chile, conocido comúnmente como espino negro, huallún o arrayán macho, es perteneciente de la familia *Verbenaceae* y habita en un rango altitudinal de 0 a 1.000 m.s.n.m., desde la cordillera de la Costa hasta la precordillera andina, entre las regiones de Coquimbo y Aysén (30,4 - 46,85° S; Heusser, 2003; Rodríguez y col., 2018). Mide hasta 7 m de alto, con corteza agrietada y ramosa. Desarrolla hojas pequeñas que en su cara superior lucen de tono verde oscuro y blanquecino en el envés; desde la axila de éstas crecen espinas amarillas que pueden llegar hasta los 2 cm de largo (Vega Belmar, 2018).

***Nothofagus betuloides* (Mirb.) Blume (Coigüe de Magallanes)**

Árbol siempreverde, conocido comúnmente como Coigüe de Magallanes, se encuentra en Chile desde 40°40' a 56° S (Moore 1983). Su elevación varía desde el nivel del mar cerca de su límite sur hasta 1.200 m cerca de su límite norte (Veblen y col., 1977). Generalmente se encuentra en elevaciones más altas y en suelos mejor drenados que *Nothofagus nitida* (Veblen y col., 1996).

***Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser (Coigüe de Chiloé)**

Árbol siempreverde endémico de Chile de follaje denso y oscuro, conocido comúnmente como Coigüe de Chiloé. Crece hasta los 35 m de altura y su tronco alcanza unos 2 m de diámetro. Crece desde el nivel del mar hasta los 700 m.s.n.m. entre las provincias de Valdivia y el sur de la región de Aysén, sobre todo en la Cordillera de la Costa (40°20' S - 48°30' S; Heusser, 2003). Habita en lugares de gran humedad y alta precipitación (>2.500 mm) (Veblen y col., 1982; Weinberger, 1973), sobre terrenos llanos y suelos de turbera o pantanosos. Es la única especie de *Nothofagus* ausente en las laderas orientales de los Andes, ya que se comporta de manera similar a las especies extremadamente tolerantes a la sombra, como *Podocarpus nubigena* Lindl. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Veblen y col., 1996).

***Weinmannia trichosperma* Cav. (Tineo)**

Es un árbol de hoja perenne conocido comúnmente como Tineo, Tenío o Palo santo. En Chile crece entre las regiones del Maule y Magallanes (35,6 - 48,8° S; Rodríguez y col., 2018; Heusser, 2003), desde el nivel del mar hasta los 1.000 m.s.n.m. Ha sido clasificado como intolerante a la sombra (Donoso, 1989), de crecimiento lento y con una longevidad superior a los 730 años.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la variación estacional de la respuesta antioxidante química de cuatro especies del bosque siempreverde de Aysén y establecer su relación con las temperaturas, precipitaciones y radiación UV-B de la zona.

2.2. Objetivos específicos

1. Recolectar muestras foliares de *Rhaphithamnus spinosus* (Espino), *Nothofagus betuloides* (Coigüe de Magallanes), *Nothofagus nitida* (Coigüe de Chiloé) y *Weinmannia trichosperma* (Tineo).
2. Obtener extractos etanólicos de las muestras foliares.
3. Medir la respuesta antioxidante química de los extractos.
4. Recopilar datos de variables ambientales de la zona.
5. Establecer correlaciones entre la respuesta antioxidante química y las variables ambientales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sitios de muestreo

Se realizó muestreo estacional durante los años 2018 y 2019 en la Reserva Nacional Río Simpson (RNRS), ubicada en el kilómetro 37 de la ruta que une las ciudades de Coyhaique y Puerto Aysén, a unos 100 m.s.n.m. con montañas que alcanzan los 1800 m.s.n.m. En esta parte de la región y según la clasificación de Köppen-Geiger, existe un clima templado altamente lluvioso con veranos cálidos (Kottek y col., 2006). Allí, las muestras foliares de *Rhaphitamnus spinosus* fueron recolectadas de árboles ubicados a unos 74 m.s.n.m., en las cercanías al sendero “El pescador”, el cual posee una extensión de unos 2,5 km (Tabla 1). Al recorrer este sendero se observa un bosque siempreverde del tipo Nordpatagónico (43°20' a 47°30' S: Veblen y col., 1996), con presencia de especies como *Nothofagus dombeyi*, *Nothofagus nitida*, *Nothofagus betuloides*, *Laureliopsis philippiana*, *Embothrium coccineum*, *Rhaphithamnus spinosus*, *Fuchsia magellanica*, *Chusquea quila*, *Amomyrtus luma* y *Podocarpus nubigenus*, así como plantas epífitas, trepadoras, arbustos, helechos y hierbas típicas de los bosques valdivianos (Niemeyer y Teillier, 2007). Las muestras de *Nothofagus nitida*, *Nothofagus betuloides* y *Weinmannia trichosperma* fueron tomadas en una zona más alta (114-150 m.s.n.m.) ubicada entre 150 y 400 metros hacia el noreste del sendero (Tabla 1), a lo largo de un transecto paralelo al arroyo “La Cascada”. La descripción de los sitios se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo.

Especie	Sitio	Coordenada geográfica
<i>Rhaphithamnus spinosus</i>	R.s1	45°27'39.5"S 72°19'52.0"W
	R.s2	45°27'40.0"S 72°19'50.0"W
	R.s3	45°27'44.4"S 72°19'27.0"W
<i>Nothofagus betuloides</i>	N.b1	45°27'39.8"S 72°19'24.4"W
	N.b2	45°27'37.4"S 72°19'23.2"W
	N.b3	45°27'33.5"S 72°19'20.7"W
<i>Nothofagus nitida</i>	N.n1	45°27'39.8"S 72°19'24.4"W
	N.n2	45°27'37.4"S 72°19'23.2"W
	N.n3	45°27'35.8"S 72°19'22.4"W
<i>Weinmannia trichosperma</i>	W.t	Transecto desde el sitio N.n3 el sitio N.b3

Tabla 2. Descripción de los sitios de muestreo.

Sitio	Descripción
R.s1	Ubicado a unos 15 metros al norte del río Simpson, este sitio se encuentra bajo el dosel de <i>Nothofagus dombeyi</i> . La muestra presenta árboles de 2 a 3 metros de altura.
R.s2	Ubicado a unos 30 metros al norte del río Simpson, al lado oeste presenta un bosque de <i>Nothofagus dombeyi</i> . Los espinos que conforman esta muestra son de 2 a 3 m de altura y están expuestos al sol por el lado noreste.
R.s3	Sitio sombreado ubicado bajo un denso dosel de <i>N. dombeyi</i> y <i>Laurelipsis philippiana</i> . Los espinos que conforman esta muestra son de 1 a 3 metros de altura.
N.b1	Presenta árboles de unos 20 m de alto formando parte del dosel del bosque. Estos árboles están expuestos al sol por el lado oeste, ubicados junto al cauce del arroyo "La Cascada".
N.b2	Presenta árboles de unos 20 m de alto expuestos al sol por el lado oeste, también se encuentra al borde del arroyo "La Cascada".
N.b3	Presenta árboles de unos 15 a 20 m de alto, siendo partes del dosel del bosque, con troncos de unos 40 cm de diámetro y descubiertos por el lado oeste. El sitio se encuentra al lado del arroyo "La Cascada", que suele mantener vientos frescos.
N.n1	Presenta árboles de 3 y 4 m de altura, todos descubiertos de vegetación por el lado sur poniente y ubicados al borde del arroyo.
N.n2	Presenta árboles entre 4 y 12 m de altura, ubicados a unos 15 m al noreste del sitio N.n1, más alejados de la orilla del arroyo "La cascada". Estos árboles están descubiertos del dosel por el lado sureste.
N.n3	Ubicado junto al cauce del arroyo "La Cascada", formado por árboles de entre 3 y 7 metros de altura, cubiertos por el dosel del bosque por el Este.
W.t	Los árboles de tino muestreados son renovales que miden de 1 a 3 metros de altura, todos ubicados en un sitio sombreado bajo el dosel de coigües (<i>N. betuloides</i> y <i>N. dombeyi</i>).

*Descripción realizada durante el muestreo de primavera del año 2019 (tabla 4).

3.2. Recolección y procesamiento de muestras.

Las muestras foliares se recolectaron de 4 o más árboles de una misma especie, con el mismo estado fenológico, presentes en un sitio de aproximadamente 20 m x 20 m, rodeando cada árbol y a una altura máxima de 3 m sobre el nivel del suelo. Una vez obtenidas las muestras, éstas se limpiaron y fueron puestas a secar en estufa a 40 ± 2 °C hasta alcanzar masa constante. Luego de haber secado las hojas, éstas fueron trituradas en molinillo hasta alcanzar un polvo homogéneo.

3.3. Preparación de las muestras.

3.3.1. Preparación de extractos

Para realizar los extractos de las muestras se pesaron 10 g de hoja seca molida y se agregaron a 65 mL de etanol absoluto (EMPLURA ® Merck 8.18760.2500) contenidos en un matraz con tapa esmerilada de 100 mL. Esta mezcla se agitó a 150 rpm durante 18 h y a una temperatura de 25 °C. Posteriormente, la mezcla se filtró y al filtrado se le evaporó el disolvente a vacío para obtener el extracto seco, que se conservó a -20 °C hasta su utilización.

El rendimiento de la extracción se calculó según la ecuación (1).

$$(1) \quad \text{Rendimiento del extracto (\%)} = \frac{\text{Masa del extracto seco (g)} \times 100}{\text{Masa de hoja seca (g)}}$$

3.3.2. Preparación de disoluciones madre

Para la preparación de la solución madre se pesaron 20 mg del extracto seco y se diluyeron en 10 mL de etanol absoluto. Ya disuelto el sólido, éste fue filtrado con papel de 150 mm Ø (Cat No 1001-150 Qualitative circles Whatman) y aforado hasta un volumen final de 25 mL. Cada solución madre fue diluida sucesivamente en matraces aforados de 2 mL hasta 256 veces (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256). Para los análisis de las distintas especies se usaron determinadas diluciones de la solución madre (1:1) (tabla 3).

Tabla 3. Disoluciones de los extractos utilizados para cada ensayo.

Especie	TPC	TFC	DPPH	CUPRAC
<i>R. spinosus</i>	1:2, 1:4, y 1:8	1:1, 1:2 y 1:4	De 1:4 a 1:256	1:8 y 1:16
<i>N. nitida</i>	1:2, 1:4 y 1:8	1:1 y 1:2	De 1:4 a 1:256	1:8 y 1:16
<i>N. betuloides</i>	1:4, 1:8 y 1:16	1:1 y 1:2	De 1:4 a 1:256	1:8 y 1:16
<i>W. trichosperma</i>	1:8, 1:16 y 1:32	1:1 y 1:2	De 1:4 a 1:256	1:16, 1:32 y 1:64

Ensayos: **TPC**: Contenido Total de Fenoles; **TFC**: Contenido Total de Flavonoides; **DPPH**: Capacidad antioxidante por apagamiento del radical DPPH; **CUPRAC**: Capacidad reductora del ión cúprico.

3.4. Análisis de las muestras

A las 65 muestras tomadas se les realizó la medición del contenido total de fenoles y el contenido total de flavonoides, considerados metabolitos secundarios antioxidantes. Además, se realizó la medición de la capacidad antioxidante total de las muestras por dos métodos distintos, uno basado en la medición del consumo de radicales (apagamiento) cuando el extracto antioxidante se añade a un medio que contiene el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), y el otro basado en correlacionar la cantidad total de antioxidantes con la capacidad reductora del ión cúprico (CUPRAC). Todos los análisis realizados para cada muestra, blanco o control positivo se hicieron por triplicado.

3.4.1. Contenido total de fenoles

La determinación del contenido total de fenoles se basó en el ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu (F-C), siguiendo los protocolos descritos por Ainswoth y col., (2007) y Bridi y col., (2019), con algunas modificaciones. En resumen, la mezcla de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% (v/v) y el extracto de hojas disuelto en etanol (muestra) se incubó en una placa de 96 pocillos, durante 5 minutos y a 25 °C. Después de eso, se añadió carbonato de sodio 350 mM. La mezcla final se incubó durante 2 horas y se determinó la absorbancia a 765 nm usando un espectrofotómetro para microplacas (EPOCH 2, BioTek). Se realizó una curva de calibración con disoluciones de ácido gálico (15-75 µg/mL). Los resultados se expresan como medias [miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE, siglas en inglés de Gallic Acid Equivalents) por gramo de extracto seco (mg GAE/g dm)] ± desviación estándar (DE) de tres determinaciones independientes.

La reacción química de este ensayo se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino (pH 10) desde el ión fenolato hacia el reactivo F-C mediante una reacción de tipo óxido/reducción (Magalhaes y col., 2010), lo que provoca la formación de un complejo [posiblemente $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$] de Mo(V), que presenta una coloración azul y cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 765 nm (Chen y col., 2015; Margraf y col., 2015; Everette y col., 2010).

3.4.2. Contenido total de flavonoides

El contenido total de flavonoides se determinó utilizando el método descrito por Dewanto y col., (2002), con algunas modificaciones. En resumen, en una placa de 96 pocillos, se añadieron 50 µL de la muestra [o solución de (+)-catequina (estándar) o etanol (blanco)],

seguido de 105 μL de disolución de nitrito de sodio (4,54 mg/mL) y se incubó la mezcla durante 5 minutos a 25 °C. Luego, se añadieron 20 μL de la disolución de cloruro de aluminio (50 g/L) y la mezcla se incubó durante 6 minutos. Después de eso, se añadieron 75 μL de la solución de hidróxido de sodio (0,5 M) y se volvió a agitar vigorosamente durante 2 minutos. La absorbancia se midió inmediatamente respecto al blanco a 510 nm. La curva estándar se preparó con (+)-catequina (25-100 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se expresan como medias (miligramos de equivalentes de catequina por gramo de extracto seco) \pm DE de dos determinaciones independientes.

Este método colorimétrico se basa en la reacción de los flavonoides con el sistema cromogénico $\text{NaNO}_2\text{-Al(III)-NaOH}$ (Zhishen y col., 1999). Básicamente, los flavonoides reaccionan con el ácido nitroso produciendo compuestos flavonoides nitrosos, los cuales forman complejos con los iones de aluminio (Zhu y col., 2010).

3.4.3. Capacidad antioxidante por apagamiento de radicales libres (DPPH)

La capacidad de apagamiento del radical libre DPPH se determinó siguiendo el método descrito por Ben Mrid y col., (2019) y Hartwig y col., (2012), con algunas modificaciones. En resumen, las muestras o el control positivo (Trolox) se mezclaron con una solución de DPPH recién preparada (120-140 μM). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 25 °C e inmediatamente se midió la absorbancia a 517 nm. En cada experimento se realizó una curva de calibración con DPPH como estándar (de 20 a 140 μM) para cuantificar su concentración restante. Los análisis a cada muestra corresponden a 5 disoluciones estudiadas por triplicado. Los datos se expresan como valor medio ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE. El porcentaje de actividad de eliminación de DPPH se determinó mediante la ecuación (2):

$$(2) \quad \% \text{ Capacidad de apagamiento de DPPH} = \left(\frac{C(\text{DPPH})_{\text{blanco}} - C(\text{DPPH})_{\text{muestra}}}{C(\text{DPPH})_{\text{blanco}}} \right) \times 100$$

El IC₅₀ de cada muestra corresponde a la cantidad de extracto requerido para apagar el 50 % del DPPH.

Este ensayo se basa en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno desde un compuesto antioxidante (AH) hacia el radical libre (figura 3). En el ensayo se mide la absorbancia a 517 nm (máximo de absorción del DPPH) y se observa la disminución de esta absorbancia como consecuencia del consumo de la especie radicalaria.

Reacción química propuesta

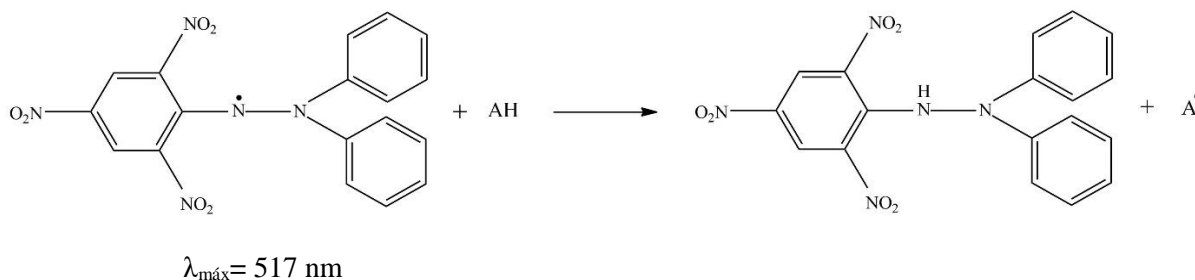


Figura 3. Apagamiento del radical 2,2-difenil-1-picrylhidracilo (DPPH) por una molécula antioxidante (AH).

3.4.4. Capacidad antioxidante por reducción del ión cúprico (CUPRAC)

La CUPRAC se determinó mediante el método descrito por Apak y col., (2006 y 2008) y Deng y col., (2016), con algunas modificaciones. En resumen, para la realización de este ensayo se utilizó: solución acuosa de sulfato de cobre (II) 10 mM, solución tampón de acetato de amonio 1 M (pH 7), solución de neocuproína en etanol 7,5 mM y solución de ácido gálico en etanol 20 µg/mL (control positivo). En una celda de 96 pocillos se agregaron 45 µL de la

disolución de cobre (II), 45 µL de neocuproína, 45 µL de disolución tampón, 50 µL de agua destilada y 45 µL de la muestra (o 45 µL de blanco o 45 µL de control positivo). En el espectrofotómetro, la placa se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se le midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente de ácido gálico, en miligramos equivalente de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg GAE/g dm). La curva de calibración del ácido gálico se realizó utilizando concentraciones de este compuesto entre 1 y 25 µg/mL. Se prefirió utilizar el método con ácido gálico en lugar del método con trolox porque el ácido gálico es un producto natural, mientras que Trolox es un equivalente sintético del α -tocoferol.

Los valores se expresan como medias \pm DE de dos determinaciones independientes.

$$(3) \quad \frac{mg(GAE)}{m_{es}} = \frac{r C_{GAC} V_s}{1.000 m_{es}}$$

Dónde:

r: factor de dilución de la muestra medida en relación con la solución madre (1:1).

C_{GAC}: concentración de ácido gálico obtenida por interpolación en la curva de calibración (µg/mL).

V_s: Volumen del estándar original (mL).

m_{es}: Masa de extracto seco (g).

Reacción química propuesta

El ensayo CUPRAC se basa en la medición de la absorbancia del complejo formado entre la neocuproína y el ion cobre (I), obtenido este último por reducción del ion cobre (II) en presencia de compuestos antioxidantes y/o reductores (AOX: figura 4). El máximo de absorción del complejo de Cu(I) se registra a una longitud de onda de 450 nm.

Neocuproína: 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina

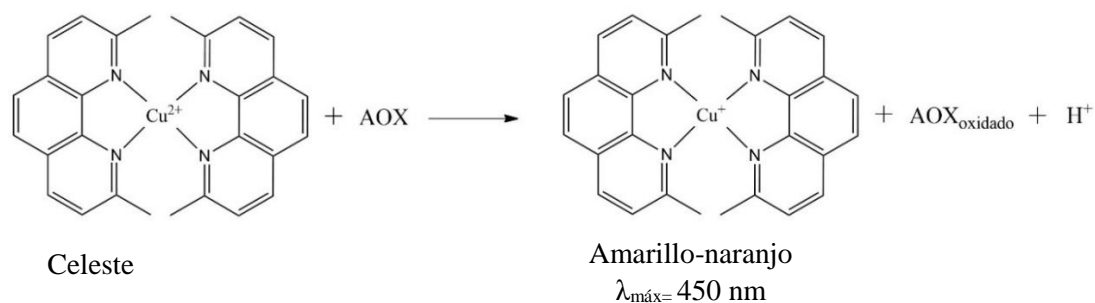


Figura 4. Reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) en el complejo con neocuproína por acción de una molécula antioxidante (AOX).

3.5. Análisis de variables ambientales.

Las fechas de muestreo y el periodo de treinta días previos, considerados para la obtención de los datos meteorológicos, se muestran en la tabla 4. Los datos diarios de las variables ambientales (temperatura, precipitaciones e índice de radiación UV-B) de estos treinta días se encuentran en las tablas A10, A11 y A12 del anexo. Para el análisis de correlaciones se consideran las medias o las acumulaciones de cada una de estas variables en tres periodos distintos previos al muestreo (5, 10 y 30 días). En el caso de las temperaturas también consideran las bajas o altas temperaturas, con el criterio que es descrito en la sección 3.5.1.

Tabla 4. Fechas de muestreo y periodo de 30 días previos.

Estación del año	Fecha de muestreo	Periodo de 30 días previos al muestreo
Verano 2018	25 y 26 de enero 2018	28/12/2017 al 26/01/2018
Otoño 2018	12 de mayo 2018	13/04/2018 al 12/05/2018
Invierno 2018	19 de julio 2018	20/06/2018 al 19/07/2018
Primavera 2018	7 y 8 de octubre 2019	8/09/2018 al 7/10/2018
Verano 2019	17 de enero 2019	19/12/2018 al 17/01/2019
Otoño 2019	19 de abril 2019	21/03/2019 al 19/04/2019
Invierno 2019	23 de julio 2019	24/06/2019 al 23/07/2019
Primavera 2019	30 de octubre 2019	1/10/2019 al 30/10/2019

3.5.1. Temperaturas

Los datos de las temperaturas promedio diarias se obtuvieron desde la estación de monitoreo Puerto Aysén Ad. (código 450001) de la dirección Meteorológica de Chile (Lat -45.399444 Lon -72.677221), ubicada a 11 m.s.n.m. El equipo de medición es una estación automática marca Campbell Scientific con data loggers CR1000 y sensor de Temperatura y Humedad marca Vaisala modelo HMP155.

Se consideraron las temperaturas diarias promedios de los 5, 10 y 30 días anteriores al muestreo (tabla 5). De los promedios estacionales del periodo de estudio (2018-2019) se obtuvo la mínima promedio (6°C) y la máxima promedio (13°C). Aquellos días en que la temperatura promedio fue menor que la mínima promedio, se les considera días de bajas temperaturas. Por otro lado, a los días en que la temperatura promedio superó la máxima promedio, se les considera de altas temperaturas. En aquellos días en que no existía el valor de la temperatura media, ésta se calculó promediando los 24 valores entregados por hora (de 00:00 a 23:00 h) en el registro histórico de la página web de la dirección meteorológica de Chile (<https://climatologia.meteochile.gob.cl>).

Tabla 5. Temperaturas estacionales promedio.

	Promedio 5 días previos [°C]	Promedio 10 días previos [°C]	Promedio 30 días previos			Periodo 30 días previos	
			T _{mínima} [°C]	T _{máxima} [°C]	T _{media} [°C]	N° días bajas T	N° días altas T
Verano 2018	13,5	14,74	10,41	18,36	14,09	2	30
Otoño 2018	8,44	7,52	5,96	12,29	8,44	16	9
Invierno 2018	2,72	3,99	1,09	7,57	3,71	30	0
Primavera 2018	8,00	6,97	4,65	11,33	7,37	20	4
Verano 2019	13,44	12,02	8,85	16,62	12,48	3	26
Otoño 2019	10,30	9,93	8,92	14,93	11,35	4	23
Invierno 2019	3,94	4,67	2,70	7,47	4,61	29	0
Primavera 2019	7,44	8,79	5,59	13,77	9,09	14	15
Promedio 2018- 2019	-	-	6,02 ~ 6,00	12,80 ~ 13,00	-	-	-

3.5.2. Precipitaciones

Los datos de las precipitaciones promedio diarias se obtuvieron desde la estación de monitoreo Puerto Aysén Ad, antes ya referenciada. El equipo de medición es una estación automática marca Campbell Scientific con data loggers CR1000 y sensor Marca Texas Instrument TX525WS. Se consideró esta estación de monitoreo porque es la más cercana a la RNRS, se encuentra ubicada al Oeste de ésta y es paso obligado de las nubes provenientes de la costa que son empujadas por los vientos predominantes (SW) durante los años 2018 y 2019 (DGAC Chile, 2020). Se consideraron las precipitaciones diarias promedio y acumulada de los 5, 10 y 30 días previos al muestreo (tabla 6). Los detalles se encuentran en la tabla A11 del anexo. En esta tabla, el valor diario considera las precipitaciones (mm) durante 24 horas hasta las 12:00 h del día en cuestión.

Aquellos datos no encontrados en la plataforma de la Dirección Meteorológica de Chile fueron obtenidos desde la plataforma virtual “Sala de lluvias” del Instituto de ciencias de la ingeniería de la Universidad de O’Higgins en conjunto con el Centro de Ciencias del Clima y la Resiliencia (CR2) (<https://saladelluvias.herokuapp.com>).

Tabla 6. Precipitaciones en Puerto Aysén en el periodo previo al muestreo.

	5 días previos		10 días previos	30 días previos	
	Promedio agua caída [mm]	Agua caída acumulada [mm]	Agua caída acumulada [mm]	Promedio agua caída [mm]	Agua caída acumulada [mm]
Verano 2018	0,6	3,1	5,4	4,5	135,0
Otoño 2018	5,9	29,5	30,5	10,6	319,4
Invierno 2018	0,0	0,0	29,0	6,7	200,1
Primavera 2018	2,9	14,4	29,0	6,9	180,6
Verano 2019	1,3	6,7	29,3	5,2	156,4
Otoño 2019	11,6	46,3	120,2	6,5	189,6
Invierno 2019	4,9	24,5	113,2	8,2	244,7
Primavera 2019	11,3	56,6	65,2	4,0	119,0

En el análisis de correlaciones no se usa el promedio de agua caída 10 días previos al muestreo debido a que esta muestra una tendencia similar al agua caída acumulada.

3.5.3. Índices de Radiación Ultravioleta

Los promedios diarios del Índice de Radiación Ultravioleta (IUV) se obtuvieron desde la estación Teniente Vidal, Coyhaique Ad. (código 450004) de la dirección Meteorológica de Chile (Lat -45.59083° Lon -72.10222°) a una altura de 299 m.s.n.m. Se considera esta estación por ser la más cercana a la RNRS con instrumentos de medición adecuado. El equipo de medición de radiación UV-B es marca YES modelo UVB-1.

Se debe tener en cuenta que el IUV es una medida de la energía del sol en el rango UV-B (280-320 nm) que llega a la superficie de la Tierra. Se representa por valores enteros del 1 al 11 o más. El índice 1 corresponde a 100 Joules por metro cuadrado durante 1 hora, el 2 corresponde a 200 Joules, etc. En este sentido, como el efecto de la radiación UV se puede evidenciar por el flujo y el periodo en que ésta incide en la planta, se consideró la acumulación de estos flujos durante tres periodos distintos; 5, 10 y 30 días (tabla 7).

Tabla 7. Índices de radiación ultravioleta acumulada.

Estación	Índice de radiación UV-B acumulada 5 días previos	Índice de radiación UV-B acumulada 10 días previos	Índice de radiación UV-B acumulada 30 días previos
Verano 2018	50	100	310
Otoño 2018	11	20	77
Invierno 2018	6	11	33
Primavera 2018	29	53	134
Verano 2019	56	105	312
Otoño 2019	16	34	129
Invierno 2019	9	16	37
Primavera 2019	37	73	187

3.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el programa para Windows Graphpad prism 8.0.1. Tanto la variación como la comparación intra e interespecies, de los cuatro ensayos, se analizaron mediante ANOVA de una vía por el método paramétrico Bonferroni, al cual se aplicó un 99 % de confianza. Para *R. spinosus*, *N. betuloides* y *N. nitida*, la comparación interespecie considera la respuesta antioxidante entre una especie y otra, en una misma estación del año. Por otro lado, debido a que se muestreó un único sitio para *W. trichosperma*, se comparó a ésta con las otras especies, utilizando los datos de aquellos sitios que presentaron la mayor concentración de metabolitos o la mayor capacidad antioxidante. En ese sentido, se usó N.b1, N.n1 y R.s2 en todos los ensayos. El valor p de significancia estadística para cada análisis de variación y comparación interespecie e intraespecie de los ensayos, se muestra en las tablas A13; A14; A15; A16 y A17 del anexo.

Tanto para el estudio de la relación entre ensayos, como para el estudio de la relación entre la respuesta antioxidante química de cada especie con las variables ambientales, se usó el coeficiente de correlación de Pearson, considerando un 95 % de confianza. Se hace énfasis y grafican sólo aquellas correlaciones significativas ($p < 0,05$) y se muestra el valor del índice de correlación (r). La línea mostrada en los gráficos de correlación entre los ensayos y las variables ambientales se muestra únicamente para graficar la tendencia de los datos.

4. RESULTADOS

4.1. Extracción de metabolitos solubles en etanol.

En la tabla 8 se muestra el porcentaje de la masa del extracto obtenido respecto a la cantidad de hoja seca usada para su preparación. Del total de muestras posibles de tomar (80), se recolectaron 65.

Tabla 8. Rendimiento del extracto etanólico calculado según ecuación (1).

Sitio	V18 (%)	O18 (%)	I18 (%)	P18 (%)	V19 (%)	O19 (%)	I19 (%)	P19 (%)	% promedio ± DE
R.s1	2,3	3,0	5,0	3,7	8,6	3,1	4,2	4,9	4,4 ± 1,8
R.s2	2,4	5,8	8,6	9,2	16,3	5,4	7,1	6,5	7,7 ± 3,8
R.s3	1,4	N.M	4,9	3,3	7,8	N.M	4,7	5,0	4,5 ± 1,9
N.b1	5,8	10,0	13,7	12,5	15,0	N.M	14,7	14,1	12,3 ± 3,1
N.b2	N.M	10,8	14,2	10,9	14,3	N.M	9,4	N.M	11,9 ± 2,0
N.b3	N.M	9,7	13,0	11,0	16,8	N.M	11,5	14,2	12,7 ± 2,3
N.n1	3,3	6,4	9,8	4,9	8,0	N.M	7,7	7,2	6,8 ± 2,0
N.n2	4,6	5,4	9,5	6,5	7,8	N.M	7,4	6,7	6,8 ± 1,5
N.n3	N.M	N.M	8,5	5,6	10,6	N.M	6,6	7,8	7,8 ± 1,7
W.t	N.M	8,4	14,0	11,5	12,9	N.M	11,0	12,5	11,7 ± 1,8

N.M.: No muestreado

En promedio y en orden decreciente, el contenido de metabolitos solubles en etanol, por masa de hoja seca y para cada especie fue: *N. betuloides* (12,3%), *W. trichosperma* (11,7%), *N. nitida* (7,1%) y *R. spinosus* (5,5%).

4.2. Análisis de las muestras.

Las curvas de calibración de los ensayos y sus respectivas tablas de datos se encuentran en las figuras A1-A5 y tablas A1, A3, A5, A6 y A8 del anexo, respectivamente.

Para la determinación del contenido total de fenoles, flavonoides y la capacidad reductora del ión cúprico, se realizaron curvas de calibración al momento del análisis. Las tablas de resultados de cada ensayo también se encuentran en la sección 1 del anexo. En el estudio interespecie de *R. spinosus*, *N. betuloides* y *N. nitida*, los promedios estacionales de cada especie se obtuvieron a partir de los tres sitios de muestreo. Para *W. trichosperma* en cambio, el promedio corresponde a la respuesta de un único sitio.

4.2.1. Contenido total de fenoles

En la figura 5, se muestra la variación y comparación estacional interespecie del Contenido Total de Fenoles (TPC, por sus siglas en inglés), medidos como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE, por sus siglas en inglés) por gramo de extracto seco (mg GAE/g dm). En la figura 6, se muestra la variación y comparación intraespecie del TPC. Los valores p de significancia estadística se muestra en las tablas 13A-17A del anexo.

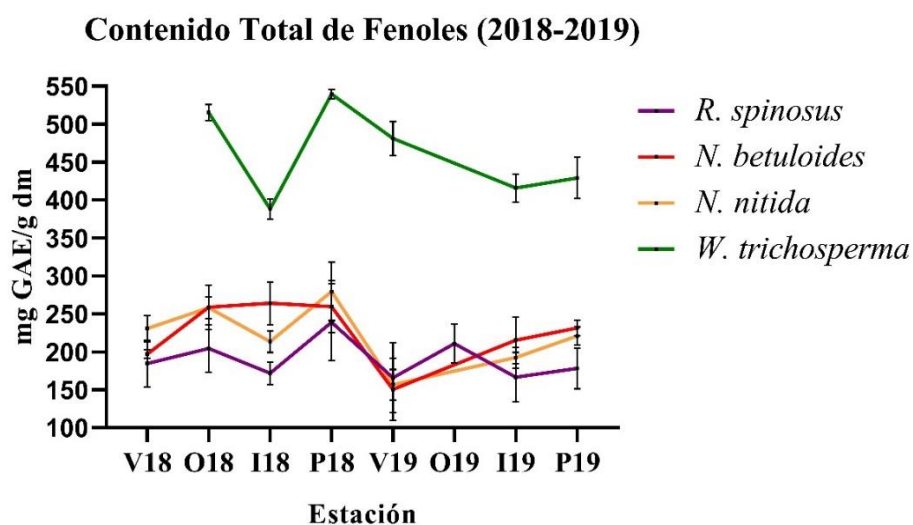


Figura 5. Variación y comparación interespecie del contenido total de fenoles. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019.

R. spinosus presentó un aumento significativo de su TPC en la primavera del 2018 ($239,0 \pm 46,9$ mg GAE/g dm), en donde alcanzó su máximo registrado, y luego disminuyó significativamente en verano del 2019 ($165,9 \pm 88$ mg GAE/g dm). El TPC de la primavera del 2018 fue significativamente mayor a la del 2019. *N. betuloides* aumentó significativamente su TPC en otoño del 2018 ($258,0 \pm 25,8$ mg GAE/g dm) y se mantuvo constante hasta la primavera. En el verano, esta especie disminuyó significativamente su TPC, alcanzando su mínimo ($150,5 \pm 36,7$ mg GAE/g dm). El TPC de *Nothofagus nitida*, aumentó significativamente en otoño, disminuyó en invierno, aumentó a su máximo en primavera ($279,6 \pm 35,5$ mg GAE/g dm) y volvió a disminuir significativamente en el verano del 2019, en donde alcanzó su mínimo ($156,8 \pm 12,1$ mg GAE/g dm). Pese a que aumentó su TPC en la primavera del 2019, ésta fue menor a la del 2018. *W. trichosperma* presentó una disminución significativa de su capacidad antioxidante en invierno del 2018, hasta su mínimo ($388,1$ mg GAE/g dm), un aumento hasta su máximo en primavera del 2018 ($539,6$ mg GAE/g dm) y una disminución en el verano del 2019. En general, las dos especies de *Nothofagus* presentaron una variación estacional del TPC similar, sólo se diferenciaron significativamente en invierno del 2018.

Tanto en P18 como en V19, no existieron diferencias significativas entre *R. spinosus*, *N. betuloides* y *N. nitida*. *W. trichosperma*, por su parte, se diferenció significativamente de las otras especies en todas las estaciones.

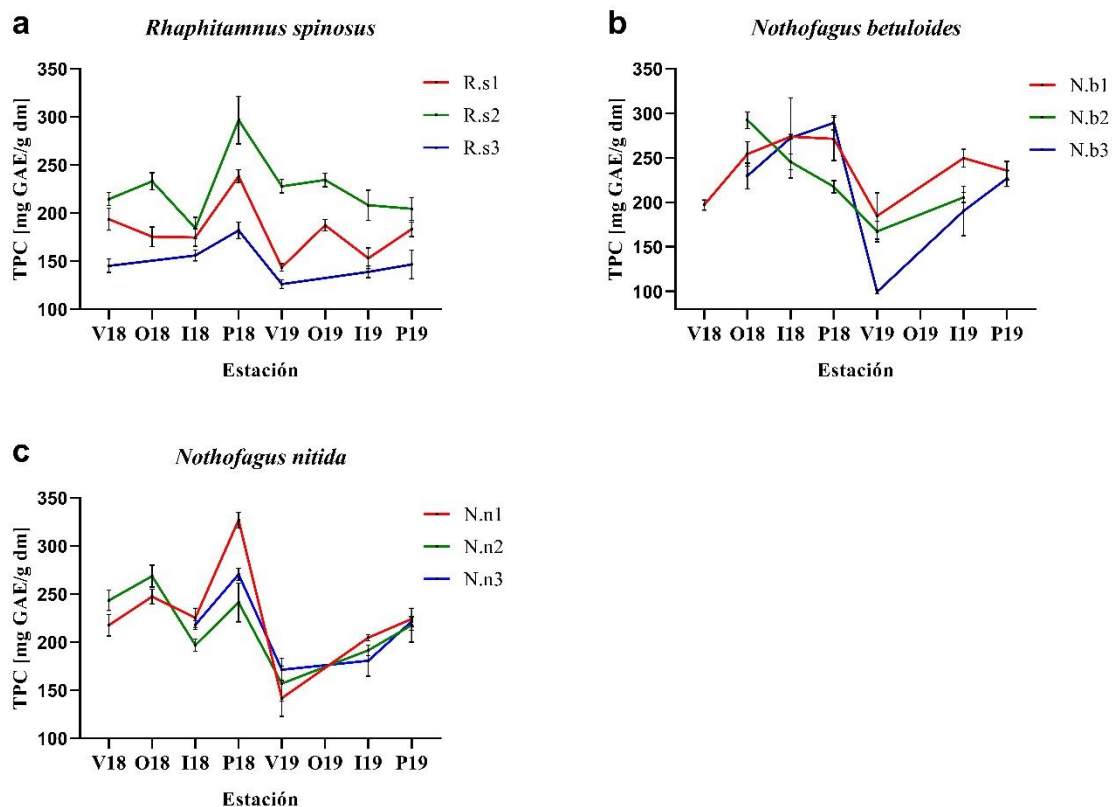


Figura 6. Variación y comparación intraespecie del contenido total de fenoles. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019. (a) Sitios de *Rhapitamnus spinosus* (R.s1, R.s2 y R.s3); (b) Sitios de *Nothofagus betuloides* (N.b1, N.b2 y N.b3); (c) Sitios de *Nothofagus nitida* (N.n1, N.n2 y N.n3).

En la figura 6a se observa que para *R. spinosus* el TPC está entre 126,2 y 296,8 mg GAE/g dm. En todas las estaciones, R.s2 tuvo el mayor TPC y R.s3 el menor, mientras que R.s1 tuvo un comportamiento intermedio. Todos los sitios aumentaron significativamente su TPC en la primavera del 2018, en donde alcanzaron su máximo, y luego disminuyeron significativamente el verano del 2019. Así mismo, todos los sitios disminuyeron significativamente su TPC entre la primavera del 2018 y la del 2019. R.s2 fue el único sitio

que no disminuyó significativamente su TPC entre V18 y V19. En general, en todas las estaciones hubo diferencias significativas del TPC entre algún sitio y otro.

En la figura 6b se observa que para *N. betuloides* el TPC está entre 99,6 y 292,3 mg GAE/g dm. Todos los sitios disminuyeron significativamente su TPC el verano del 2019, en donde alcanzaron su mínimo. Tanto N.b1 como N.b3, disminuyeron significativamente su TPC entre la primavera del 2018 y la del 2019. Por otro lado, N.b1 fue el único sitio que no disminuyó significativamente su TPC entre el invierno del 2018 y el del 2019. El invierno del 2018 fue la única estación en donde no se registraron diferencias significativas del TPC entre un sitio y otro.

En la figura 6c se observa que para *N. nitida* el TPC está entre 141,8 y 326,9 mg GAE/g dm. Todos los sitios aumentaron significativamente su TPC en primavera del 2018, y luego lo disminuyeron el verano del 2019, en donde alcanzaron su mínimo. N.n2 fue el único sitio que no disminuyó significativamente su TPC entre la primavera del 2018 y la del 2019. La primavera del 2018, fue la única estación en la que los tres sitios se diferenciaron significativamente entre sí.

4.2.2. Contenido total de flavonoides

En la figura 7, se muestra la variación y comparación estacional interespecie del Contenido Total de Flavonoides (TFC, por sus siglas en inglés), medidos como miligramos equivalentes de catequina (EC) por gramo de extracto seco (mg EC/g dm). En la figura 8, se muestra la variación y comparación intraespecie del TFC. Los valores p de significancia estadística se muestra en las tablas 13A-17A del anexo.

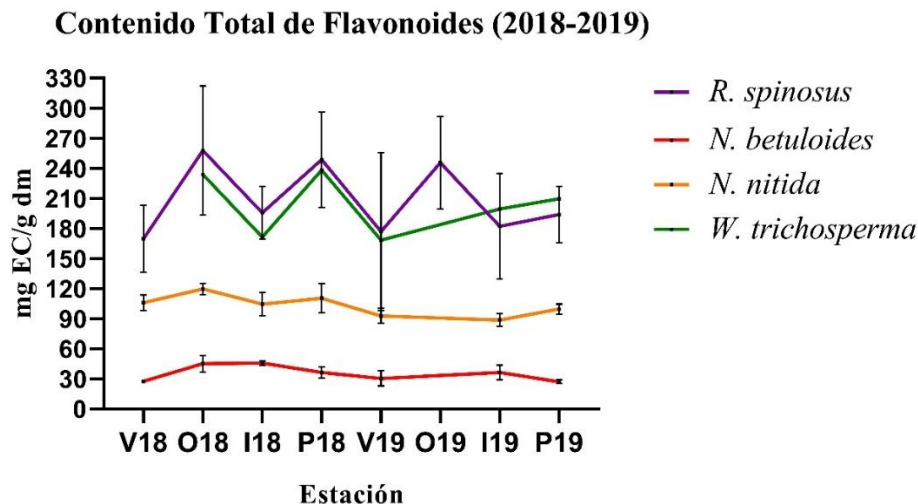


Figura 7. Variación y comparación interespecie del contenido total de flavonoides. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019.

R. spinosus alcanzó su mínimo TFC el verano del 2018 ($169,8 \pm 27,3$ mg EC/g dm) y aumentó significativamente, a su máximo, en otoño ($257,8 \pm 45,5$ mg EC/g dm). En verano del 2019, presentó una disminución significativa de su TFC. *N. betuloides* presentó un aumento significativo de su TFC en otoño del 2018 ($45,3 \pm 6,8$ mg EC/g dm), en donde se mantuvo constante hasta el invierno. Esta fue la única especie que no disminuyó significativamente su TFC el verano del 2019. *N. nitida* alcanzó su máximo TFC el otoño del 2018 ($119,7 \pm 4,0$ mg EC/g dm) y disminuyó significativamente el invierno ($104,5 \pm 9,6$ mg EC/g dm). Otra disminución significativa de su TFC la presentó el verano del 2019 ($92,89 \pm 6,2$ mg EC/g dm). Alcanzó su mínimo TFC el invierno del 2019 ($88,6 \pm 5,1$ mg EC/g dm), que fue significativamente menor al del invierno del 2018. *W. trichosperma* disminuyó significativamente su TFC el invierno del 2018, aumentó a su máximo en primavera ($230,4$ mg EC/g dm) y volvió a disminuir en verano del 2019, a su mínimo ($168,3$ mg EC/g dm). El TFC del invierno del 2018 y la primavera del 2019, fue significativamente menor al del

invierno del 2019 y la primavera del 2018, respectivamente. Entre *R. spinosus*, *N. betuloides* y *N. nitida* hubo diferencias significativas del TFC en todas las estaciones. Entre *W. trichosperma* y las otras especies, únicamente no se encontró diferencia significativa con *R. spinosus* (R.s2), en la primavera del 2019.

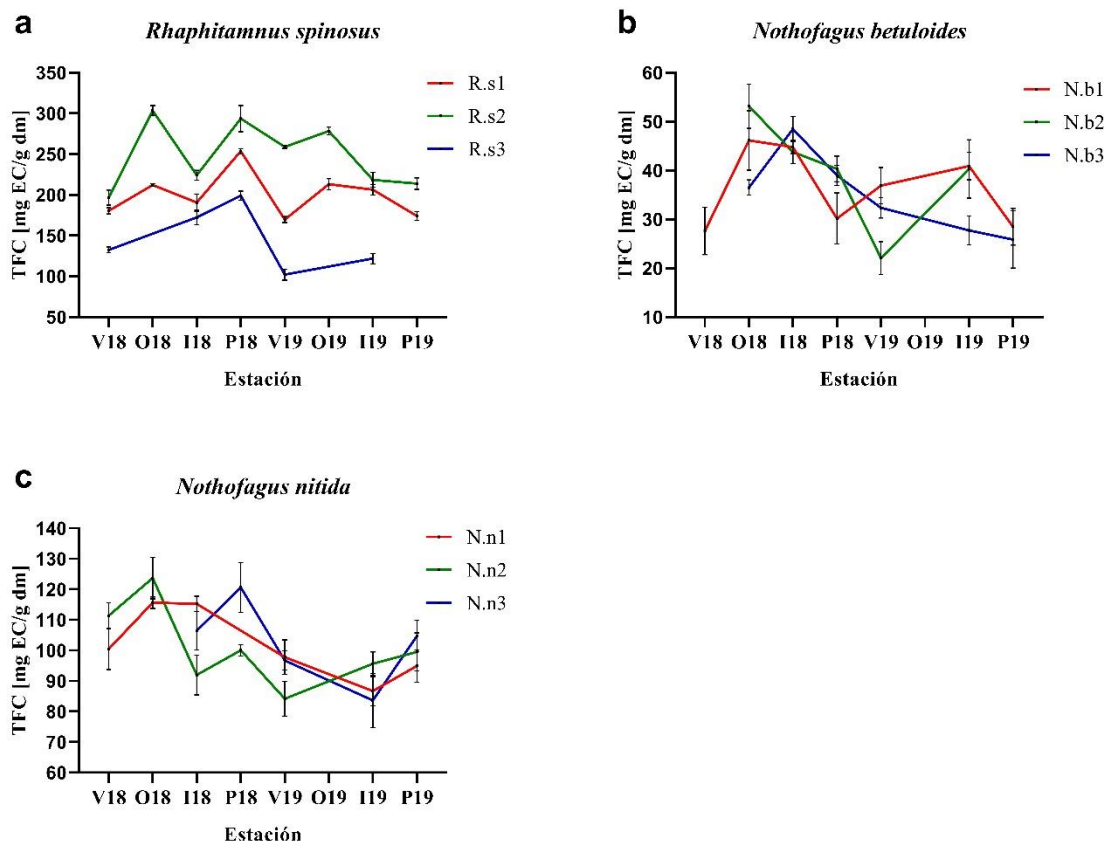


Figura 8. Variación y comparación intraespecie del contenido total de flavonoides. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019. (a) Sitios de *Rhaphitamnus spinosus* (R.s1, R.s2 y R.s3); (b) Sitios de *Nothofagus betuloides* (N.b1, N.b2 y N.b3); (c) Sitios de *Nothofagus nitida* (N.n1, N.n2 y N.n3).

En la figura 8a se observa que en *R. spinosus* el TFC está entre 102,1 y 303,3 mg EC/g dm. En todas las estaciones, R.s2 alcanzó el mayor TFC y R.s3 el menor. Tanto R.s1 como R.s2,

aumentaron significativamente su TFC el otoño del 2018 y lo disminuyeron en invierno. Todos los sitios aumentaron significativamente su TFC en la primavera del 2018, y luego lo disminuyeron el verano del 2019. Tanto R.s1 como R.s3 alcanzaron su máximo y mínimo TFC en estas estaciones, en cambio R.s2 alcanzó su mínimo TFC el verano del 2018 y el máximo en otoño del mismo año. En todas las estaciones hubo alguna diferencia significativa del TFC entre un sitio y otro.

En la figura 8b se observa que en *N. betuloides* el TFC está entre 22,1 y 53,1 mg EC/g dm. Tanto N.b1 como N.b2 alcanzaron su máximo TFC el otoño del 2018. N.b1 y N.b3 disminuyeron significativamente su TFC la primavera del 2018. Sólo N.b2 disminuyó significativamente su TFC el verano del 2019. Por otra parte, sólo en invierno del 2018 no hubo diferencias significativas del TFC entre un sitio y otro.

En la figura 8c se observa que en *N. nitida* el TFC está entre 83,6 y 123,7 mg EC/g dm. N.n1 y N.n3 disminuyeron significativamente su TFC entre el invierno del 2018 y el del 2019, alcanzando su mínimo. N.n2 disminuyó significativamente su TFC entre el verano del 2018 y el 2019, hasta su mínimo. N.n2 y N.n3 disminuyeron significativamente su TFC el verano del 2019. Solo se registró diferencia significativa entre un sitio y otro, en el invierno del 2018, y fue entre N.n1 y N.n2.

4.2.3. Capacidad antioxidante por apagamiento del radical libre DPPH.

En la figura 9, se muestra la variación y comparación estacional interespecie de la capacidad antioxidante, medida por apagamiento del radical DPPH. En la figura 10, se muestra la variación y comparación intraespecie de esta capacidad antioxidante. Estos resultados se

expresan como IC₅₀ (µg de extracto/mL de solución madre), o sea, la cantidad de extracto necesaria para apagar la mitad del DPPH agregado inicialmente. Los valores p de significancia estadística se muestra en las tablas 13A-17A del anexo.

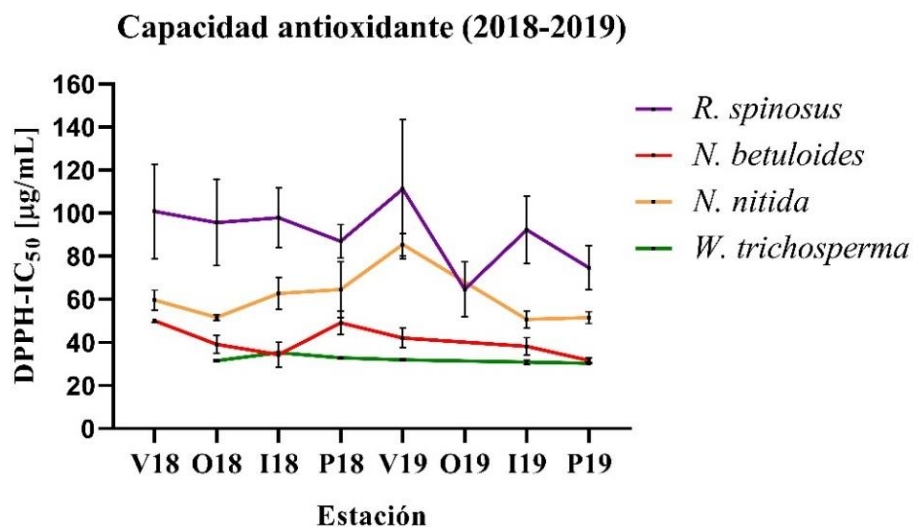


Figura 9. Variación y comparación interespecie de la capacidad antioxidante medida por apagamiento del radical DPPH. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019.

R. spinosus presentó un aumento significativo de su capacidad antioxidante medida por apagamiento del radical DPPH, desde su mínimo IC₅₀ registrado el verano del 2019 ($111,3 \pm 30,5$ µg/mL) hasta su máximo en otoño ($64,8 \pm 11,5$ µg/mL). *N. betuloides* tuvo una disminución significativa de su capacidad antioxidante en la primavera del 2018 ($49,2 \pm 5,0$ µg/mL), incluso esta fue significativamente menor que la primavera del 2019 ($31,7 \pm 0,9$ µg/mL). *N. nitida* presentó una disminución significativa de su capacidad antioxidante el verano del 2019, en donde alcanzó su IC₅₀ mínimo ($85,5 \pm 4,3$ µg/mL). Ésta incluso fue significativamente menor a la del verano del 2018. La capacidad antioxidante del invierno y primavera del 2018 fue significativamente menor a la de las mismas estaciones en el 2019.

W. trichosperma disminuyó significativamente su capacidad antioxidante en invierno del 2018 y la aumentó en primavera del 2018. Su capacidad antioxidante en invierno y primavera del 2019, fue mayor a la misma estación en el 2018.

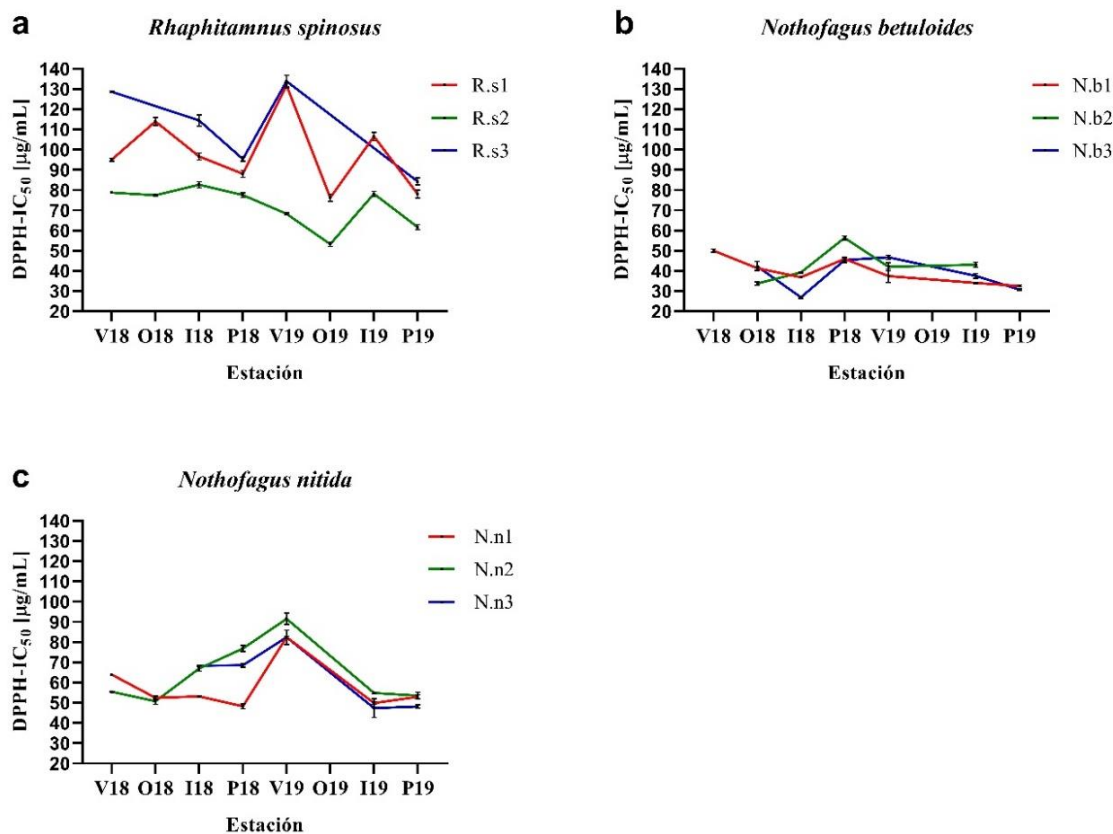


Figura 10. Variación y comparación intraespecie de la capacidad antioxidante medida por apagamiento del radical DPPH. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019. (a) Sitios de *Rhaphtamnus spinosus* (R.s1, R.s2 y R.s3); (b) Sitios de *Nothofagus betuloides* (N.b1, N.b2 y N.b3); (c) Sitios de *Nothofagus nitida* (N.n1, N.n2 y N.n3).

Prácticamente, en todas las estaciones muestreadas hubo diferencias significativas entre *R. spinosus* y las dos especies de *Nothofagus*. Sólo en el verano del 2019 no hubo diferencias

significativas entre *R. spinosus* y *N. nitida*. Entre *N. betuloides* y *N. nitida*, estos se diferenciaron significativamente en I18, P18, V19 y P19. *W. trichosperma* se diferenció significativamente de *R. spinosus* y *N. nitida*, en todas las estaciones. Entre *W. trichosperma* y *N. betuloides*, no hubo diferencia significativa en: I18, V19, I19 y P19.

La figura 10a muestra la capacidad antioxidante por apagamiento del radical DPPH, medido en IC₅₀, de *R. spinosus* observándose que se encuentra entre 133,9 y 53,3 µg/mL. En todas las estaciones, R.s2 presentó la mayor capacidad antioxidante y R.s3 la menor. R.s1 tuvo cambios significativos en todas las estaciones. En invierno del 2018, mientras R.s1 aumentó significativamente su capacidad antioxidante, R.s2 la disminuyó. En primavera del 2018 y 2019, los tres sitios aumentaron su capacidad antioxidante. En el verano del 2019, mientras R.s1 y R.s3 disminuyeron su capacidad antioxidante, R.s2 aumentó. R.s1 y R.s2 aumentaron significativamente su capacidad antioxidante en otoño, y disminuyeron en invierno del 2019. En todas las estaciones, R.s2 presentó diferencias significativas en su capacidad antioxidante respecto a los otros sitios. Sólo en verano y primavera del 2019, no hubo diferencia significativa entre R.s1 y R.s3.

La variación de la capacidad atrapadora de radical libre DPPH de *N. betuloides* se muestra en la figura 10b, observándose valores de IC₅₀ en un rango entre 56,3 y 26,9 µg/mL. En invierno del 2018, mientras N.b2 disminuyó significativamente su capacidad antioxidante, N.b3 aumentó. En primavera del 2018, los tres sitios disminuyeron significativamente su capacidad antioxidante, y al verano del 2019, N.b1 y N.b2 la aumentaron. Solamente en invierno del 2018, todos los sitios se diferenciaron significativamente entre sí.

En la figura 10c se muestran los valores de la capacidad antioxidante por apagamiento del radical DPPH, medido en IC₅₀, de *N. nitida*, observándose estos entre 91,6 y 47,4 µg/mL. En

primavera del 2018, mientras N.n1 aumentó significativamente su capacidad antioxidante hasta su máximo, N.n2 disminuyó. Todos los sitios disminuyeron significativamente su actividad antioxidante el verano del 2019, en donde alcanzaron su mínimo. A su vez, la capacidad antioxidante de los tres sitios en invierno del 2019 fue mayor a la del invierno 2018. Por otra parte, solo en primavera del 2018, todos los sitios se diferenciaron significativamente entre sí.

4.2.4. Capacidad antioxidante medida por reducción del ión cúprico (CUPRAC)

En la figura 11, se muestra la variación y comparación estacional interespecie de la capacidad antioxidante, medida por la capacidad del extracto diluido para reducir el ión cúprico en el complejo con neocuproína. Los resultados se expresan en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg GAE/g dm). Los valores p de significancia estadística se muestra en las tablas 13A-17A del anexo. En la figura 12 se muestra la variación y comparación estacional intraespecie de esta capacidad antioxidante.

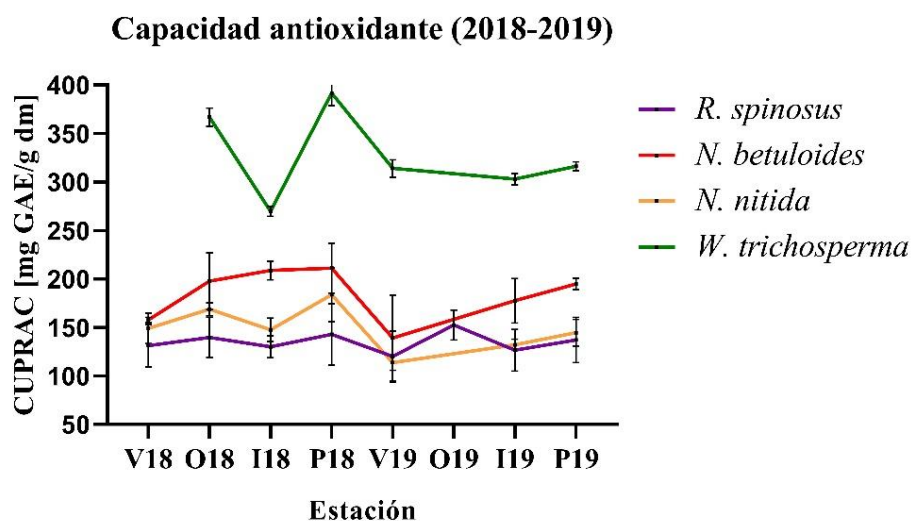


Figura 11. Variación y comparación interespecie de la capacidad antioxidante medida por CUPRAC. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019.

R. spinosus no presentó variación estacional significativa en su capacidad antioxidante (CUPRAC). *N. betuloides* por su parte, tuvo una disminución significativa de ésta el verano del 2019 ($139,0 \pm 42,5$ mg GAE/g dm). *N. nitida* aumentó su capacidad antioxidante a su máximo en la primavera del 2018 ($183,7 \pm 26,3$ mg GAE/g dm) y luego la disminuyó hasta su mínimo el verano del 2019 ($113,7 \pm 7,3$ mg GAE/g dm). La capacidad antioxidante de *N. nitida* en el verano y la primavera del 2018, fue significativamente mayor a las mismas estaciones en el 2019. *W. trichosperma* presentó una disminución significativa en su capacidad antioxidante el invierno del 2018 ($269,8$ mg GAE/g dm), en donde alcanzó su mínimo, y luego tuvo un aumento en primavera del 2018, en donde alcanzó su máximo ($391,6$ mg GAE/g dm). En el verano del 2019 volvió a disminuir significativamente su capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante de *W. trichosperma* en la primavera del 2018, fue significativamente superior a la misma estación el 2019, lo mismo que para el invierno del 2019 respecto al del 2018. *N. betuloides* y *N. nitida* se diferenciaron significativamente en invierno (2018 y 2019), y en primavera del 2019. En los dos veranos muestreados no se registraron diferencias significativas entre la capacidad antioxidante de *R. spinosus*, *N. betuloides* y *N. nitida*. *W. trichosperma*, por su parte, se diferenció significativamente de las otras especies en todas las estaciones.

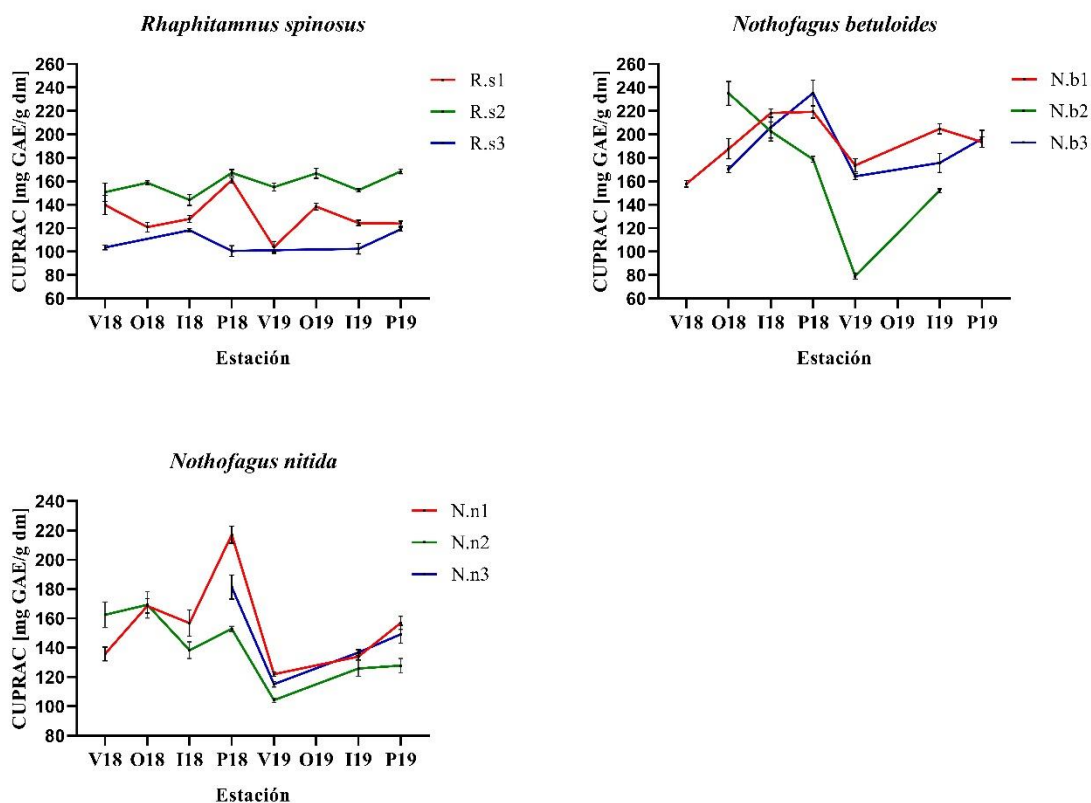


Figura 12. Variación y comparación intraespecie de la capacidad antioxidante medida por CUPRAC. En el eje x se muestran las estaciones desde el verano del 2018 a la primavera del 2019. (a) Sitios de *Rhaphitamnus spinosus* (R.s1, R.s2 y R.s3); (b) Sitios de *Nothofagus betuloides* (N.b1, N.b2 y N.b3); (c) Sitios de *Nothofagus nitida* (N.n1, N.n2 y N.n3).

R. spinosus presentó una capacidad antioxidante, medida por CUPRAC, entre 100,5 y 168,4 mg GAE/g dm (figura 12a). En todas las estaciones, R.s2 presentó la mayor capacidad antioxidante, R.s3 la menor ($R.s2/R.s3=1,47$ veces en promedio) y R.s1 presentó una respuesta intermedia. Todos los sitios experimentaron cambios significativos en su capacidad antioxidante en la primavera del 2018, mientras R.s1 y R.s2 la aumentaron, R.s3 la disminuyó. El verano del 2019, tanto R.s1 como R.s2, disminuyeron significativamente su capacidad antioxidante. En otoño del 2019, R.s1 aumentó significativamente su capacidad

antioxidante, y ésta a su vez, fue mayor a la del otoño del 2018. El invierno del 2019, R.s1 y R.s2 disminuyeron significativamente su capacidad antioxidante. En primavera del 2019, R.s2 y R.s3 aumentaron significativamente su capacidad antioxidante. Para R.s3, esta última, fue significativamente mayor que la primavera del 2018. En todas las estaciones muestreadas, hubo diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de R.s2 y R.s3. Por otro lado, entre R.s1 y R.s2, no hubo diferencias significativas en su capacidad antioxidante en verano ni en primavera del 2018. Lo mismo ocurrió entre R.s1 y R.s3, tanto en verano como en primavera del 2019.

N. betuloides presentó una capacidad antioxidante, medida como masa equivalente de ácido gálico, entre 79,1 y 235,3 mg GAE/g dm (figura 12b). En el invierno del 2018, mientras N.b1 y N.b3 aumentaron significativamente su capacidad antioxidante, N.b2 la disminuyó. En la primavera del 2018, mientras N.b3 aumentó significativamente su capacidad antioxidante, N.b2 la disminuyó. A su vez, la capacidad antioxidante de N.b3, en esa estación, fue significativamente mayor a la del 2019. En el verano del 2019, los tres sitios disminuyeron significativamente su capacidad antioxidante, y para N.b1, tal capacidad fue mayor a la del verano del 2018. En general, N.b2 se diferenció significativamente de los otros sitios, sólo en invierno del 2018, no se registraron diferencias entre un sitio y otro. N.b1 y N.b3 se diferenciaron únicamente el invierno del 2019.

N. nitida presentó una capacidad antioxidante entre 104,1 y 217,1 mg GAE/g dm (figura 12c). N.n1 aumentó su capacidad antioxidante el otoño del 2018. N.n2 la disminuyó en el invierno de ese año. En primavera del 2018, tanto N.n1 como N.n3 alcanzaron su máxima capacidad antioxidante. En verano del 2019, todos los sitios disminuyeron significativamente su capacidad antioxidante, hasta su mínimo. N.n1 aumentó significativamente su capacidad

antioxidante en la primavera del 2019. Para las muestras recogidas, en todas las estaciones se registró diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de N.n2 y N.n3.

4.3. Análisis por especie de las correlaciones entre ensayos y variables ambientales.

A continuación se muestra, para los extractos foliares de las cuatro especies, el contenido promedio de metabolitos secundarios antioxidantes, la capacidad antioxidante promedio (figura 13), las correlaciones entre los ensayos y las correlaciones de estos ensayos con las variables ambientales (temperatura (°C), precipitaciones (mm) y índices de radiación UV-B). Las tablas de datos con los resultados del análisis de correlaciones se muestran en las tablas 18A-25A del anexo.

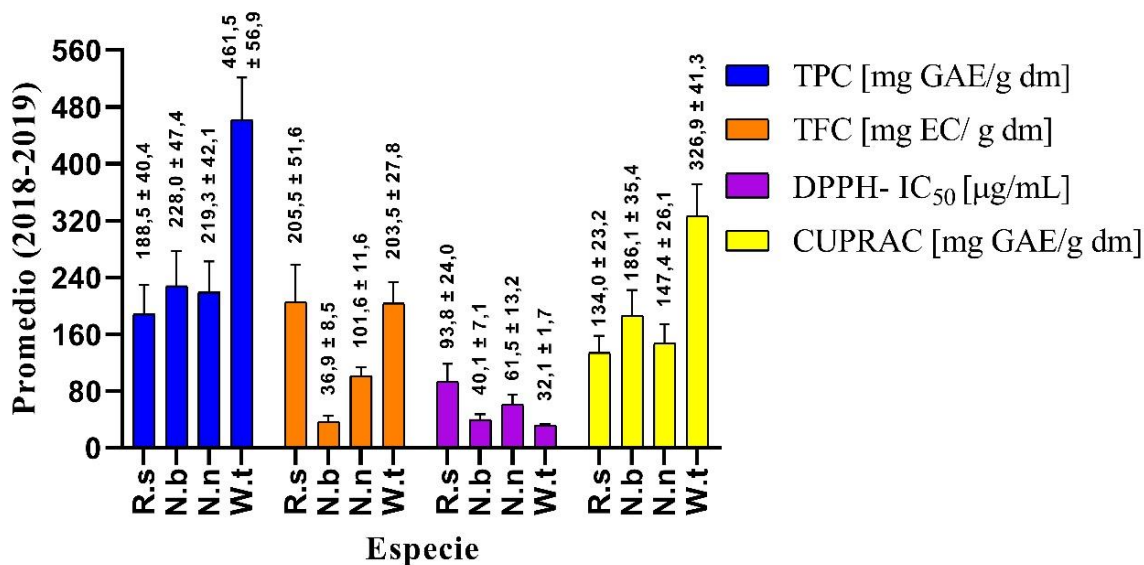


Figura 13. Promedio del contenido de metabolitos secundarios antioxidantes y la capacidad antioxidante de los extractos foliares de cada especie. En el eje x se muestran las siglas del nombre de cada especie estudiada.

Rhaphitamnus spinosus: A pesar de que el TPC de *W.trichosperma* es en promedio 2,4 veces mayor que el de *R. spinosus*, el TFC promedio de estos es similar, unas 5,6 veces al de *N. betuloides* y el doble que el de *N. nitida*. Además, presenta una gran variabilidad del TFC, la cual se ve reflejada en la gran desviación estándar que presentan sus datos. En esta especie, el TPC está correlacionado directa y significativamente por el TFC ($r=0,9167$; $p=0,0014$). A su vez, estos flavonoides están relacionados con la capacidad antioxidante (CUPRAC) ($r=0,7941$; $p=0,0186$). También se encontró una correlación positiva entre la capacidad antioxidante medida por apagamiento del radical DPPH y la capacidad antioxidante medida por CUPRAC ($r=-0,7816$; $p=0,0220$). Esto podría ser indicio de que la respuesta antioxidante de la planta incluye tanto evitar el daño provocado por los radicales libres como revertir el daño oxidativo. En cuanto a la correlación de los ensayos de esta especie con las variables ambientales, se encontró una correlación positiva entre el promedio y la cantidad de agua caída 5 días antes a cada muestreo ($r=-0,8279$; $p=0,0112$), con el aumento de la capacidad antioxidante del extracto foliar (DPPH) (figura 14).

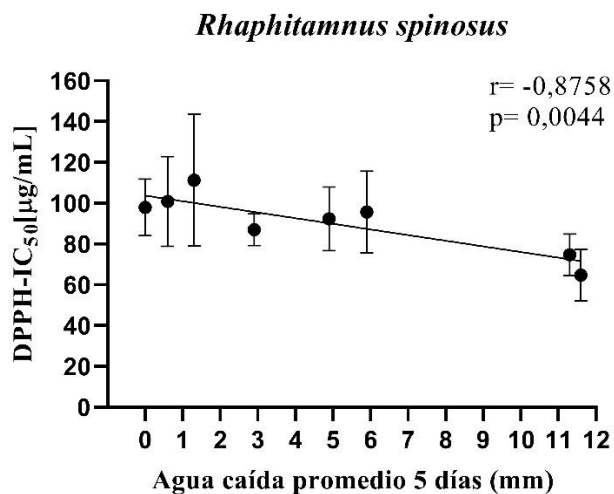


Figura 14. Correlación entre la capacidad antioxidante del extracto foliar de *Rhaphitamnus spinosus* y el promedio de agua caída 5 días previos a cada muestreo.

Nothofagus betuloides: La capacidad antioxidante (DPPH y CUPRAC) del extracto foliar de esta especie es solamente superada por la de *W. trichosperma*. No se encontró correlación significativa entre el TPC y el TFC, lo que es un indicativo de que el contenido total de fenoles no está dado por el contenido de flavonoides. En cambio, sí se encontró una correlación positiva entre el TPC y la capacidad antioxidante (CUPRAC) ($r=0,9759$; $p=0,0002$). En cuanto a la relación entre los ensayos de esta especie con las variables ambientales, se encontró una correlación negativa entre el TFC y el índice de radiación UV-B acumulada a 5, 10 y 30 días previos al muestreo, siendo mayor la correlación a los 10 días (figura 15a). Por otro lado, el TFC se correlacionó positivamente con la cantidad de agua caída 30 días previos al muestreo (figura 15c). El TPC también se correlacionó negativamente con la cantidad de radiación UV-B acumulada a 5 y 30 días previos al muestreo, siendo mayor esta última (figura 15b).

En el periodo de 30 días previos al muestreo, la capacidad antioxidante de los extractos, medida por CUPRAC, se correlacionó negativamente tanto con la radiación UV-B acumulada ($r=-0,7577$; $p=0,0485$) como con la cantidad de días con altas temperaturas ($>13^{\circ}\text{C}$) (Figura 15d). En este sentido, y como era de esperar, los días de altas temperaturas presentaron una correlación positiva con la cantidad de radiación UV-B acumulada ($r=0,8780$; $p=0,0041$) en ese mismo periodo.

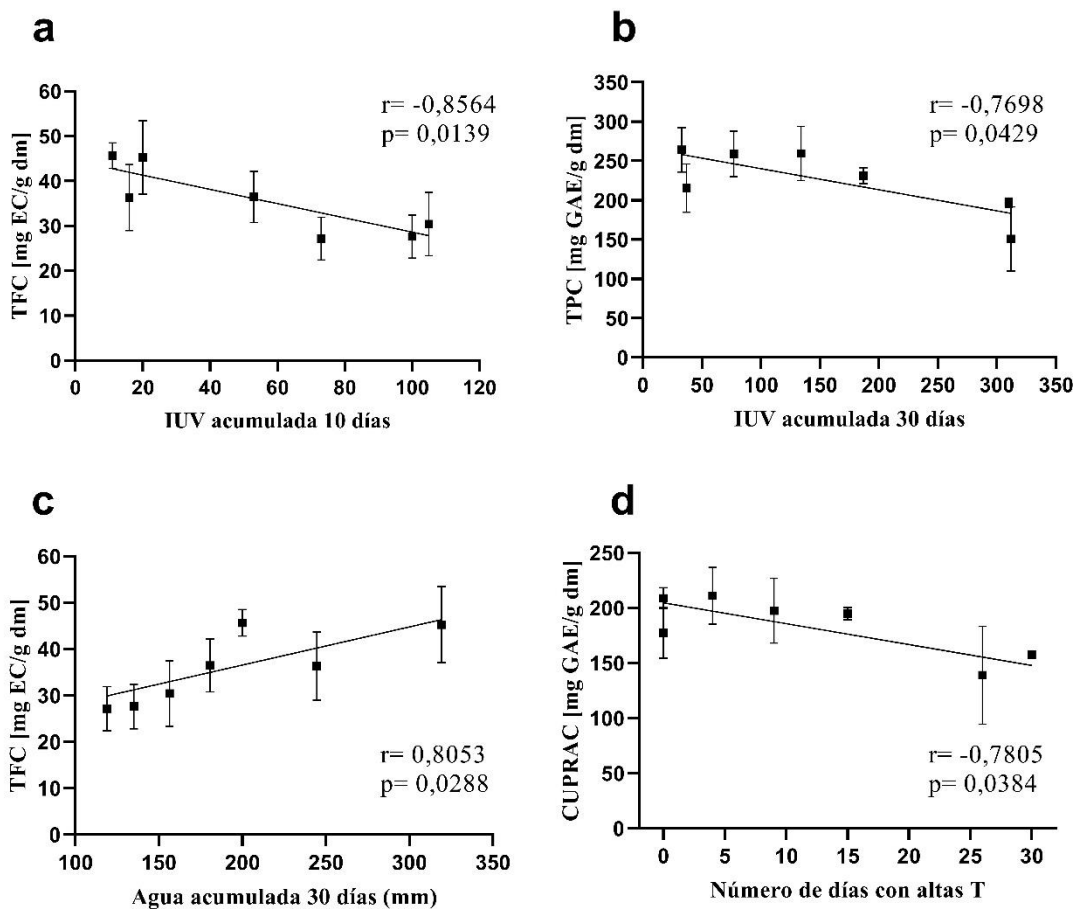


Figura 15. Correlación entre ensayos y las variables ambientales, para los extractos foliares de *Nothofagus betuloides*. a) TFC en relación a la cantidad de radiación UV-B acumulada 10 días antes de cada muestreo; b) TPC en relación a la cantidad de radiación UV-B acumulada 30 días antes de cada muestreo; c) TFC en relación a la cantidad de agua precipitada 30 días antes de cada muestreo; d) Capacidad de reducción del ión cúprico en relación a la cantidad de días con altas temperaturas ($<13^{\circ}\text{C}$) en el mes anterior a cada muestreo.

Nothofagus nitida: Esta especie presentó una correlación positiva entre el TPC y la capacidad antioxidante (CUPRAC) ($r=0,9912$; $p<0,0001$). A diferencia de *N. betuloides*, *N. nitida* sí presentó una correlación directa y significativa entre el TPC y el TFC ($r=0,8299$; $p=0,0209$). A su vez, este contenido de flavonoides no sólo determina el contenido de fenoles,

si no que además está relacionado con la capacidad antioxidante medida por CUPRAC ($r=0,8292$; $p=0,0211$). No se encontró correlación entre los ensayos por especie y las variables ambientales.

Weinmannia trichosperma: Cabe destacar que el TPC promedio de *W. trichosperma* es más del doble que el de las otras especies. Cerca del 46% del extracto corresponde a estos metabolitos. A su vez, esta especie presenta la mayor capacidad antioxidante (DPPH y CUPRAC), seguida de *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus*. Pese a que el TPC no estuvo determinado por el TFC, ambos presentaron correlación positiva con la capacidad antioxidante medida por CUPRAC ($r=0,9454$; $p=0,0044$ y $r=0,8705$; $p=0,0241$, respectivamente). No se encontró correlación entre los ensayos de esta especie y las variables ambientales.

4.4. Análisis por sitio de las correlaciones entre ensayos y variables ambientales.

A continuación, se muestran las correlaciones significativas encontradas entre los ensayos para cada sitio y las variables ambientales. Las tablas de datos con los resultados del análisis de correlaciones se muestran en las tablas 18A-25A.

***Rhaphitamnus spinosus* (R.s2)**: La capacidad antioxidante de los extractos foliares de este sitio, medida tanto por el apagamiento del radical DPPH como por CUPRAC, se correlacionó positivamente con el promedio de agua caída 5 días antes al muestreo (figura 16). Esta

correlación significativa de la capacidad antioxidante también se aprecia con la cantidad de agua precipitada acumulada 5 días antes de cada muestreo (DPPH: $r=-0,7498$; $p=0,0322$ y CUPRAC: $r=0,7615$; $p=0,0282$). Por otro lado, no se encontró correlación significativa entre las variables ambientales y el TPC o TFC.

R.s2

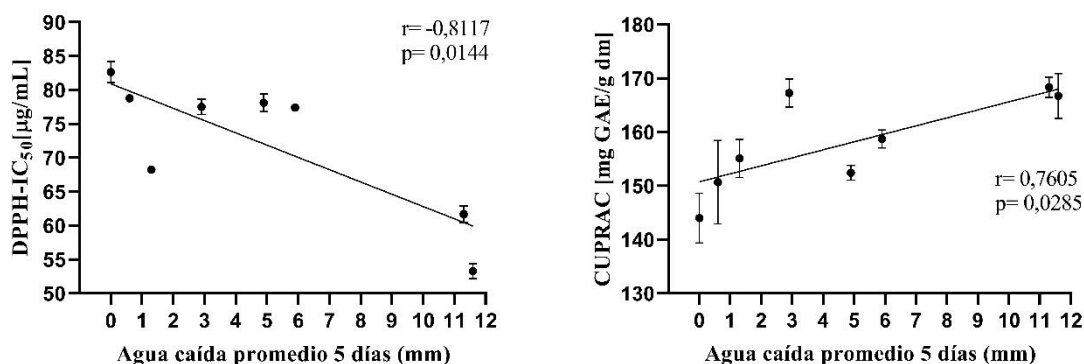


Figura 16. Correlaciones entre la capacidad antioxidante del extracto foliar del sitio R.s2 (*Rhaphitamnus spinosus*) y el promedio de agua caída 5 días antes de cada muestreo.

***Nothofagus betuloides* (N.b1):** En este sitio, tanto el TPC como la capacidad antioxidante medida por CUPRAC de los extractos foliares, mostraron una correlación negativa con el aumento de las temperaturas y la radiación UV-B acumulada (figura 17). Para ambos ensayos, se encontró correlación con la temperatura media a los 5, 10 y 30 días previos al muestreo, siendo la mayor a los 10 días (figura 17a y 17b). En cuanto a la radiación UV-B, el TPC se correlacionó con su acumulación los 5, 10 y 30 días previos a cada muestreo, siendo la mayor esta última (figura 17c). La capacidad antioxidante (CUPRAC), en cambio, sólo se correlacionó con la radiación UV-B acumulada 30 días previos a cada muestreo ($r=-$

0,8048; $p=0,0290$). El TFC presentó una correlación positiva con la cantidad de agua caída acumulada 30 días antes del muestreo (figura 17d).

N.b1

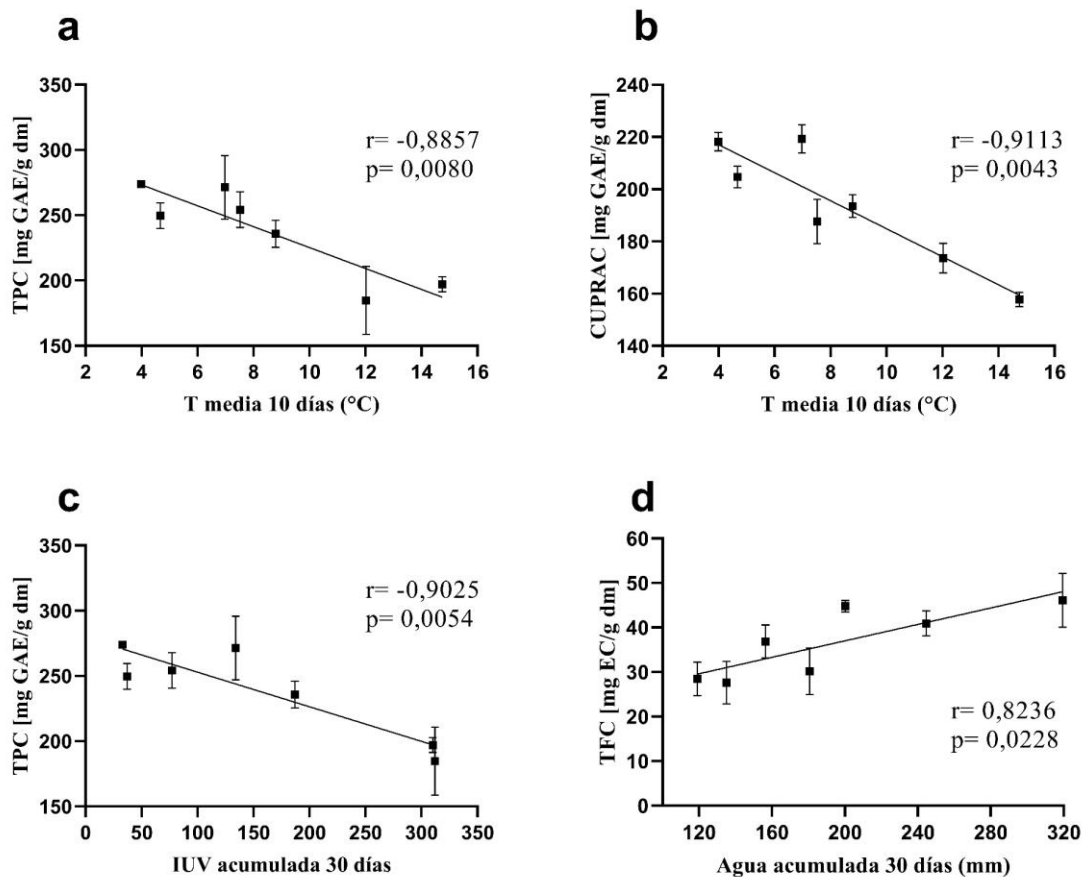


Figura 17. Correlación entre los ensayos del extracto foliar del sitio N.b1 (*Nothofagus betuloides*) y las variables ambientales.

Nothofagus nitida (N.n1): Este sitio presentó una correlación positiva entre la disminución de la capacidad antioxidante (DPPH) y el aumento en la cantidad de días con altas temperatura (>13 °C). Lo mismo ocurre entre esta capacidad antioxidante y el índice de radiación UV-B acumulado 30 días antes del muestreo (figura 18). Al evaluarse la relación

entre estas variables ambientales, se encontró una correlación positiva y significativa entre la cantidad de días con altas temperaturas y la cantidad de radiación UV-B acumulada 30 días antes de cada muestreo ($r=0,8780$; $p=0,0041$).

N.n1

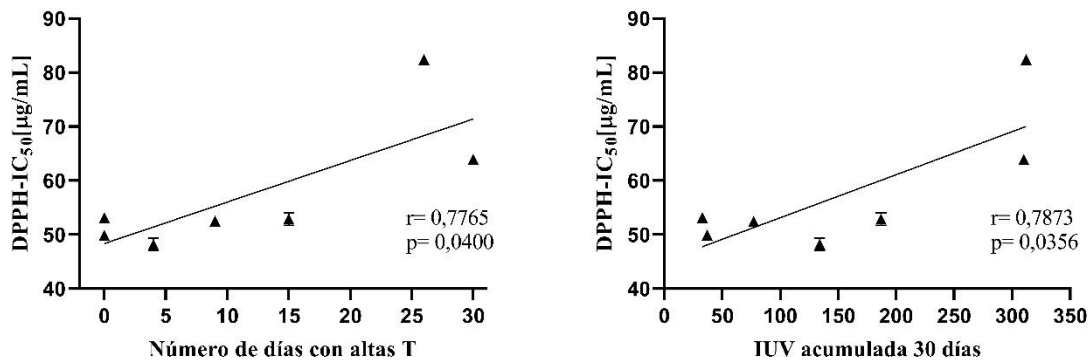


Figura 18. Correlación entre la capacidad de apagamiento del radical DPPH del sitio N.n1 (*Nothofagus nitida*) y las variables ambientales.

5. DISCUSIÓN

Rhaphitamnus spinosus

La correlación positiva entre el aumento en la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos foliares de *Rhaphitamnus spinosus* y la cantidad de agua caída 5 días antes del muestreo, puede ser indicador de la susceptibilidad de esta especie a experimentar estrés oxidativo en suelos inundados. Ya se ha descrito que esta especie suele estar presente en bosques secos y a elevaciones muy bajas en los Andes (Crawford y col., 1993).

Cuando se evaluó la respuesta antioxidante por sitios, se encontró que, en todas las estaciones, las plantas expuestas directamente al sol (R.s2) presentaron un mayor rendimiento del extracto etanólico, una mayor concentración de metabolitos secundarios antioxidantes (TPC y TFC) y una mayor capacidad antioxidante que aquellos que estaban en la sombra, bajo el dosel de *Nothofagus dombeyi*. Por su parte, y en todas las estaciones muestreadas, las plantas de R.s3 presentaron el menor contenido de metabolitos secundarios antioxidantes (TPC y TFC) y la menor capacidad antioxidante (DPPH y CUPRAC). Esto podría explicarse por su menor exposición a condiciones ambientales más estresantes, debido a que se encuentran protegidas bajo un denso dosel de *N. dombeyi* y *Laureliopsis philippiana*. Pese a que los tres sitios alcanzaron su máximo TPC y TFC en la primavera de 2018, el máximo rendimiento de sus extractos se alcanzó en el verano de 2019. Por otro lado, de los tres sitios estudiados, sólo R.s2 presentó una correlación positiva entre el aumento de la capacidad antioxidante, medida por DPPH y CUPRAC, y el aumento del promedio de agua caída 5 días antes del muestreo.

En este sentido, es posible indicar que, en este sitio, *R. spinosus* puede experimentar estrés oxidativo ante las intensas lluvias y que en un periodo de cinco días ya se activa su sistema antioxidante químico, tanto para evitar el daño oxidativo (DPPH) como para revertirlo (CUPRAC). Es probable que este sitio, al estar más expuesto a la radiación solar (fuera del bosque), deba sortear condiciones más inclementes que estimulan su respuesta antioxidante química, basada en la producción de compuestos fenólicos, de los cuales, los flavonoides juegan un papel directo en la capacidad de revertir el daño oxidativo de esta especie.

Se sugiere estudiar la relación entre la capacidad antioxidante (CUPRAC) de R.s2 con el índice de radiación UV-B acumulada cinco días antes del muestreo, no asumiendo una dependencia lineal entre éstas, como se asume con la correlación de Pearson (figura 20). Ello en vista de que fue el único sitio que aumentó significativamente su capacidad antioxidante (DPPH) en el verano de 2019, mientras que los otros dos (R.s1 y R.s3), la disminuyeron significativamente.

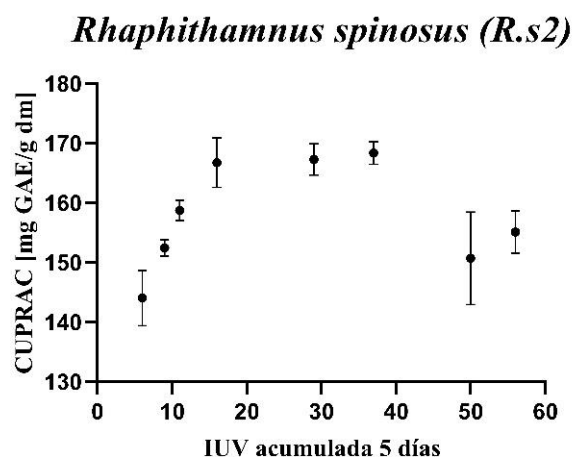


Figura 20. Capacidad antioxidante (CUPRAC) del sitio R.s2 (*Rhaphithamnus spinosus*) y su relación con el índice de radiación UV-B acumulado 5 días antes de cada muestreo.

Nothofagus betuloides

La capacidad de revertir el daño oxidativo (CUPRAC) en esta especie aumentó a medida que disminuyeron los días con altas temperaturas. Lo que sugiere un mayor estrés oxidativo a bajas temperaturas. Los M.S. encargados de revertir este daño, los fenoles, disminuyeron su concentración a medida que aumentó la radiación UV-B acumulada. Esto podría indicar que este factor ambiental no es causante de estrés oxidativo y que su correlación negativa puede estar dada por su relación con la temperatura como efecto de la mayor irradiación solar. Esto, debido a que se encontró una correlación positiva entre la radiación UV-B acumulada y la temperatura media. Al respecto, Reyes-Díaz y col., (2005), describieron que para *N. dombeyi* y *N. nitida*, en general, la mortalidad de las plántulas, causada por las heladas o el exceso de luz, es lo que determina sus patrones de regeneración y, por lo tanto, su distribución geográfica. Si se considera que *N. betuloides* tiene un comportamiento similar a estas dos especies de la familia *Fagaceae*, es posible indicar que las bajas temperaturas es la condición que podría determinar la distribución de esta especie.

Por otro lado, el hecho de que *N. betuloides* alcanzara la menor capacidad antioxidante anual en verano, podría explicarse por la priorización del crecimiento de la planta debido a las condiciones favorables de la época (Yadav, 2010). Szeicz (1997), desarrolló dos cronologías de *N. betuloides* en las zonas costeras de la región de Aysén (45-46° S), demostrando que esta especie presenta una correlación positiva entre el crecimiento y las temperaturas de principios de verano (diciembre-enero) y una correlación negativa con las precipitaciones para los meses de noviembre, diciembre y enero. Este autor expresa que estas tendencias pueden indicar una reducción en el crecimiento debido a suelos saturados, o pueden estar relacionadas con una mayor nubosidad y, por lo tanto, niveles reducidos de radiación solar.

En este trabajo, también se encontró que el TFC aumenta a medida que se incrementa la cantidad de agua caída 30 días antes del muestreo, y disminuye a medida que aumenta el IUUV acumulado en 5 y 10 días. El hecho de que estos M.S. no estén relacionados con la capacidad antioxidante de las hojas, podría sugerir un predominio del sistema antioxidante enzimático en estas condiciones o que esta situación no sea causal de estrés para esta especie.

Cabe señalar que además se encontró una correlación negativa entre la cantidad de agua caída 30 días y la radiación UV-B acumulada a 5 y 10 días previos a cada muestreo. No se encontró reportes en la bibliografía respecto al aumento en el contenido de flavonoides en las hojas de una planta tras estrés por inundación, tampoco la disminución de estos M.S. ante el aumento del flujo de radiación UV-B. Al contrario, sí existe evidencia de la disminución en el TFC en las hojas de las plantas ante estrés por inundación (Lin y col., 2006), o el aumento de estos metabolitos ante el incremento del flujo de radiación UV-B.

Cuando se realizó el estudio por sitio, sólo N.b1 mostró correlación negativa entre su TPC y su capacidad antioxidante (CUPRAC) con las variables relacionadas a los días soleados, como son la temperatura y la radiación UV-B. Este sitio, al igual que los otros dos, está descubierto del dosel de coigües por el lado Oeste, pero se encuentra protegido de los vientos frescos del arroyo “La cascada”, lo que podría explicar su mayor afectación a los cambios de temperatura. Por otro lado, pese a que los tres sitios alcanzan su mayor porcentaje de rendimiento del extracto el verano del 2019, estos alcanzan su mínimo TPC en la misma estación. Un análisis cromatográfico de los extractos etanólicos de esta especie podría ayudar a esclarecer el o los grupos de moléculas que aumentan en verano.

Nothofagus nitida

A diferencia de *N. betuloides*, en esta especie el contenido de flavonoides determina el contenido total de fenoles y también la capacidad de revertir el daño oxidativo (CUPRAC). No se encontró correlación significativa entre los ensayos por especie con las variables ambientales. En cuanto al estudio por sitios, tanto el aumento en la cantidad de días con altas temperaturas, como el aumento en la cantidad de radiación UV-B acumulada, se correlacionaron significativa y positivamente con la disminución de la capacidad antioxidante (DPPH) del sitio N.n1. Pese a que no se encontró correlación significativa entre esta capacidad antioxidante y las bajas temperaturas, el valor p fue bastante bajo ($r=-0,7449$; $p=0,0547$). Este sitio además presentó su máximo rendimiento del extracto el invierno del 2018, estación que registró las menores temperaturas estacionales. Todo esto puede ser indicador de la susceptibilidad de esta especie a experimentar estrés oxidativo ante heladas. Ya se ha descrito que *N. nitida* está distribuido geográficamente en áreas con humedad constante y condiciones térmicas intermedias (Veblen y col., 1996).

Cuando se estudió la relación entre las variables ambientales, el índice de radiación UV-B acumulada treinta días antes de cada muestreo se correlacionó tanto con el número de días con bajas temperaturas como con el número de días con altas temperaturas, mostrando una correlación negativa y positiva, respectivamente.

Se sugiere estudiar la relación entre la capacidad antioxidante (DPPH) de los árboles de este sitio y los eventos de bajas temperaturas, considerando otras temperaturas y periodos de exposición.

Weinmannia trichosperma

Para esta especie, se sugiere estudiar la relación entre la capacidad antioxidante (DPPH) de *W. trichosperma* con la cantidad de agua caída cinco días antes del muestreo, no asumiendo una dependencia lineal entre éstas, como se asume con la correlación de Pearson. También se sugiere el estudio de la respuesta antioxidante de esta especie en otros ambientes, con exposición directa al sol y a diferentes estados fenológicos. Ello serviría para entender mejor su comportamiento en otros ambientes. Cabe señalar que el sitio donde se muestreó a *W. trichosperma*, es un lugar sombreado, bajo el dosel de Coigües, y las muestras recolectadas provienen de renovales de hasta 3 metros de alto. Por otro lado, se ha descrito a esta especie como intolerante a la sombra (Donoso, 1989). Es posible que, en este sitio, el mayor contenido de M.S. antioxidantes (TPC y TFC) de *W. trichosperma* respecto a las otras especies, esté asociado a algún grado de estrés ambiental.

5.1. Análisis de la variabilidad en la respuesta antioxidante química

Entender la respuesta antioxidante química de una especie a los cambios ambientales, podría ayudar a predecir su respuesta ante eventos meteorológicos extremos. En este sentido, con el fin de estudiar la variabilidad en la respuesta antioxidante química de las especies, se realizó la figura 19. Para cada especie, se calculó la variación de la respuesta (Δ) a partir de la diferencia entre el máximo y el mínimo valor medido en cada ensayo. Esto ayuda a representar la amplitud de la respuesta antioxidante química. Para *R. spinosus*, *N. betuloides* y *N. nitida*, el delta considera las diferencias entre tres sitios, en todas las estaciones (8 para

R. spinosus y 7 para las otras especies). En el caso de *W. trichosperma*, este parámetro representa a un único sitio en siete estaciones. Por lo tanto, no se comparó a *W. trichosperma* con el resto de las especies debido a que un único sitio no representa el mismo número de individuos ni área.

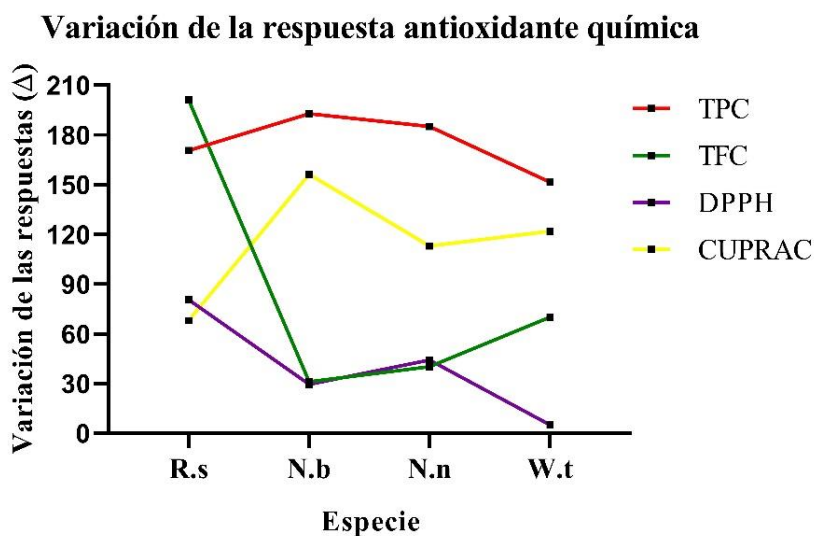


Figura 19. Variación del contenido de metabolitos y la capacidad antioxidante. En el eje x se muestran las siglas de los nombres de cada especie estudiada.

En la figura 19, se aprecia que *Rhaphitamnus spinosus* es la especie que presenta la mayor amplitud en la producción de flavonoides y en la capacidad antioxidante (DPPH), respecto a las dos especies de *Nothofagus*. Por otro lado, pese a que las dos especies de *Nothofagus* presentaron un delta similar en cuanto al TPC, TFC y DPPH, *N. betuloides* presentó una mayor amplitud en la capacidad de revertir el daño oxidativo (CUPRAC). Al ser una especie de dosel, esta capacidad es bastante útil para soportar los cambios estacionales en las condiciones ambientales, además de revertir de mejor manera el daño provocado por eventos meteorológicos extremos. En el caso de *W. trichosperma*, su baja amplitud en la capacidad de evitar el daño oxidativo provocado por radicales libres (DPPH) y alta amplitud en la

capacidad para reducir especies oxidadas (CUPRAC), puede ser índice estar en condiciones de estrés oxidativo.

De acuerdo con Garreaud (2018), se proyectan condiciones más secas que las actuales para el norte de la Patagonia chilena durante el siglo XXI, como consecuencia del aumento del forzamiento radiativo por causas antropogénicas. La superposición de eventos de El Niño en este clima alterado puede resultar en una mayor frecuencia de sequías extremas y alteraciones ambientales. Es más, Olivares-Contreras y col., (2019), estimaron que la temperatura en la región de Aysén presenta una tasa de calentamiento de $+0,78$ °C/década y, las anomalías de temperatura mínima, un aumento de alrededor de $+4,5$ °C/década. En este escenario, si consideramos que la tasa de calentamiento se mantiene constante en la región, es posible indicar que al año 2050 exista una temperatura promedio anual aproximada de 11 °C, y que para el año 2080 ésta sea de unos $13,4$ °C. Estas condiciones más cálidas y secas para los bosques de la zona occidental de la región podrían beneficiar la sobrevivencia de especies susceptibles de experimentar estrés oxidativo ante heladas e intensas precipitaciones, como lo son *N. betuloides* y *R. spinosus*, respectivamente. Por otro lado, pese a que en la zona norte de la Patagonia argentina, las condiciones más cálidas y secas durante el siglo pasado (desde 1950), causaron la muerte forestal (Suarez y col., 2004, Villalba y Veblen, 1998), falla en la regeneración del bosque (Tercero-Bucardo y col., 2007) y brotes de insectos defoliadores (Paritsis y Veblen, 2011, Piper y col., 2015), no está claro cómo el cambio climático podría afectar el bosque patagónico chileno, que experimenta condiciones oceánicas y más húmedas (Garreaud y col., 2013). Este estudio es un buen acercamiento para conocer el contenido de metabolitos y la respuesta antioxidante química de estas cuatro especies, en distintas condiciones ambientales. Esto permite que se pueda proyectar de mejor

forma la restauración con especies mejor adaptadas a las condiciones ambientales predominantes de una zona a otra. También permite tener una línea de base sobre el estado actual de estas cuatro especies del bosque de la Reserva Nacional Río Simpson. A futuro, conocer la respuesta antioxidante química de estos sitios, permitiría conocer la evolución del grado de estrés ambiental al que estarían o no siendo sometidas.

6. CONCLUSIONES

Todas las especies sufrieron cambios estacionales en su respuesta antioxidante química, incluso en una misma especie hubo diferentes respuestas entre un sitio y otro.

El estudio de las correlaciones entre la respuesta antioxidante química y las variables ambientales es un método que podría ayudar a evaluar los posibles impactos de los eventos meteorológicos extremos sobre el bosque siempreverde.

Si bien en la región de Aysén, por efectos del cambio climático, se prevén condiciones ambientales que favorecerían el crecimiento de las plantas, como lo son el aumento de las temperaturas y la disminución de las abundantes lluvias, se debe considerar el aumento en la frecuencia de eventos meteorológicos extremos como un factor que podría afectar la capacidad de respuesta de ciertas especies del bosque siempreverde.

En este sentido, *Rhaphitamnus spinosus* mostró ser susceptible a sufrir estrés oxidativo ante intensas precipitaciones durante cinco días. Al mismo tiempo en que su capacidad de apagamiento de radicales libres aumentó, su capacidad reductora también. Esta última, asociada al contenido de flavonoides, siendo incluso, la especie con el mayor contenido promedio de estos metabolitos. Las especies del género *Nothofagus* mostraron ser susceptibles a sufrir estrés oxidativo ante heladas y bajos niveles de radiación solar durante treinta días. Aunque en el caso de *N. nitida*, dependió de la ubicación de los individuos. La capacidad reductora en *N. betuloides* estuvo asociada al contenido de fenoles, y en el caso de *N. nitida*, al contenido de flavonoides. Por su parte, *W. trichosperma* fue la especie que presentó el mayor contenido de fenoles y la mayor capacidad antioxidante (DPPH y CUPRAC).

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdelgawad, H., Farfan-Vignolo, E. R., de Vos, D., & Asard, H. (2015). Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Science*, 231, 1-10.

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76.

Ahmed, N. U., Park, J. I., Jung, H. J., Hur, Y., & Nou, I. S. (2015). Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. *Functional & integrative genomics*, 15(4), 383-394.

Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.

Allen, D. J., McKee, I. F., Farage, P. K., & Baker, N. R. (1997). Analysis of limitations to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B. *Plant, Cell & Environment*, 20(5), 633-640.

Álvarez, M., San Martín, C., Novoa, C., Toledo, G., & Ramírez, C. (2010). Diversidad florística, vegetacional y de hábitats en el archipiélago de los chonos:(región de Aisen, Chile). In *Anales del Instituto de la Patagonia* (Vol. 38, No. 1, pp. 35-56). Universidad de Magallanes.

Ambasht, N. K., & Agrawal, M. (2003). Effects of enhanced UV-B radiation and tropospheric ozone on physiological and biochemical characteristics of field grown wheat. *Biologia Plantarum*, 47(4), 625-628.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International journal of food sciences and nutrition*, 57(5-6), 292-304.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Celik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413-419.

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.

Bachmann, P.M., 2009. Comparación de la exportación de nitrógeno desde un ecosistema forestal versus in ecosistema pastoral, a través de la aplicación de modelos de simulación. Tesis para optar al grado de Magíster en ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Bautista, I., Boscaiu, M., Lidón, A., Llinares, J. V., Lull, C., Donat, M. P., & Vicente, O. (2016). Environmentally induced changes in antioxidant phenolic compounds levels in wild plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(1), 9.

Ben Mrid, R., Bouchmaa, N., Bouargalne, Y., Ramdan, B., Karrouchi, K., Kabach, I., ... & Nhiri, M. (2019). Phytochemical characterization, antioxidant and in vitro cytotoxic activity evaluation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* needles and berries. *Molecules*, 24(3), 502.

Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.

Benoit, I., Bhakuni, D. S., & Silva, M. (1964). Flavonoids of *Nothofagus* species of Chile. *Science*, 146, 1685.

Blomster, T., Salojärvi, J., Sipari, N., Brosché, M., Ahlfors, R., Keinänen, M., ... & Kangasjärvi, J. (2011). Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 157(4), 1866-1883.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). [36] Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*, 186, 343-355.

Bors, W., Michel, C., & Saran, M. (1994). [41] Flavonoid antioxidants: Rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods in enzymology*, 234, 420-429.

Bridi, R., Atala, E., Pizarro, P. N., & Montenegro, G. (2019). Honeybee pollen load: phenolic composition and antimicrobial activity and antioxidant capacity. *Journal of natural products*, 82(3), 559-565.

Brown, B. A., & Jenkins, G. I. (2008). UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant physiology*, 146(2), 576-588.

Carvalho, M. H. C. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal. Behav.* 3, 156-165.

- Catapano, M. C., Tvrđý, V., Karlíčková, J., Migkos, T., Valentová, K., Kren, V., et al. (2017). The stoichiometry of isoquercitrin complex with iron or copper is highly dependent on experimental conditions. *Nutrients* 9:1193.
- Chapin, F. S., Rincon, E., & Huante, P. (1993). Environmental responses of plants and ecosystems as predictors of the impact of global change. *Journal of Biosciences*, 18(4), 515-524.
- Chen, L. Y., Cheng, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food chemistry*, 170, 10-15.
- Cheng, L., Han, M., Yang, L. M., Li, Y., Sun, Z., & Zhang, T. (2018). Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi under drought stress. *Industrial Crops and Products*, 122, 473-482.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- Ciais, P., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogée, J., Allard, V., ... & Valentini, R. (2005). Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, 437(7058), 529-533.
- Colmer, T. D., & Voesenek, L. A. C. J. (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36(8), 665-681.
- Corpas, F. J., Gupta, D. K., & Palma, J. M. (2015). Production sites of reactive oxygen species (ROS) in organelles from plant cells. In *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress* (pp. 1-22). Springer, Cham.
- Corporación Nacional Forestal. (2017, 21 agosto). *CONAF*. www.conaf.cl. <https://www.conaf.cl/nuestros-bosques/bosques-en-chile/catastro-vegetacional/>
- Crawford, D. J., Stuessy, T. F., Rodriguez, R., & Rondinelli, M. (1993). Genetic diversity in *Rhaphithamnus venustus* (Verbenaceae), a species endemic to the Juan Fernandez Islands. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 23-28.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Das, A., Majumder, D., & Saha, C. (2017). Correlation of binding efficacies of DNA to flavonoids and their induced cellular damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170, 256-262.
- De Melo, G. O., Malvar, D. D. C., Vanderlinde, F. A., Rocha, F. F., Pires, P. A., Costa, E. A., ... & Costa, S. S. (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 228-232.

Deng, L. L., Taxipalati, M., Que, F., & Zhang, H. (2016). Physical characterization and antioxidant activity of thymol solubilized Tween 80 micelles. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.

DGAC, 2020. *Portal De Servicios Climáticos - Dirección Meteorológica De Chile*. [online] Climatologia.meteochile.gob.cl. Available at:

<https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/anual/vientoPredominanteAnual10Direcciones/450001/2019>. [Accessed 19 August 2020].

Donoso, Z. (1989). Basic information for the silviculture of the evergreen forest type. *Bosque*, 10(1-2), 37-53.

Dorigan de Matos Furlanetto, A. L., Valente, C., Martinez, G. R., Merlin Rocha, M. E., Maurer, J. B. B., & Cadena, S. M. S. C. (2019). Cold stress on *Araucaria angustifolia* embryogenic cells results in oxidative stress and induces adaptation: implications for conservation and propagation. *Free radical research*, 53(1), 45-56.

Emiliani, J., Grotewold, E., Ferreyra, M. L. F., & Casati, P. (2013). Flavonols protect *Arabidopsis* plants against UV-B deleterious effects. *Molecular Plant*, 6(4), 1376-1379.

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8139-8144.

Farnese, F. S., Menezes-Silva, P. E., Gusman, G. S., & Oliveira, J. A. (2016). When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 7, 471.

Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., & Tattini, M. (2011). Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(5), 709-711.

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry*, 73(2), 627-650.

Foti, M. C. (2007). Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1673-1685.

Foyer, C. H., & Noctor, G. (2013). Redox signaling in plants.

Frohnmeier, H., & Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant physiology*, 133(4), 1420-1428.

Garreaud, R., Lopez, P., Minvielle, M., & Rojas, M. (2013). Large-scale control on the Patagonian climate. *Journal of Climate*, 26(1), 215-230.

Garreaud, R. D. (2018). Record-breaking climate anomalies lead to severe drought and environmental disruption in western Patagonia in 2016. *Climate Research*, 74(3), 217-229.

Gharibi, S., Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, G., Talebi, M., & Matkowski, A. (2019). The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech. f. *Phytochemistry*, 162, 90-98.

Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant physiology*, 171(3), 1606-1615.

Grace, S. C. (2005). Phenolics as antioxidants. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, 141-168.

Gumul, D., Korus, J., & Achremowicz, B. (2007). The influence of extrusion on the content of polyphenols and antioxidant/antiradical activity of rye grains (*secale cereale* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(4), 103-111.

Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual review of plant biology*, 40(1), 347-369.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Hartwig, V. G., Brumovsky, L. A., Fretes, R. M., & Boado, L. S. (2012). A novel procedure to measure the antioxidant capacity of yerba maté extracts. *Food Science and Technology*, 32(1), 126-133.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2013). Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. *Abiotic stress-Plant responses and applications in agriculture*, 13, 169-205.

Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Ghazvini, R. F., & Sohani, M. M. (2014). The physiological and biochemical responses to freezing stress of olive plants treated with salicylic acid. *Russian journal of plant physiology*, 61(4), 443-450.

Hatfield, J. L., & Prueger, J. H. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and climate extremes*, 10, 4-10.

Hectors, K., Van Oevelen, S., Geuns, J., Guisez, Y., Jansen, M. A., & Prinsen, E. (2014). Dynamic changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum*, 152(2), 219-230.

Heusser, C. J. (2003). Ice age southern Andes: a chronicle of palaeoecological events. Elsevier.

Hideg, É., Rosenqvist, E., Váradi, G., Bornman, J., & Vincze, É. (2006). A comparison of UV-B induced stress responses in three barley cultivars. *Functional Plant Biology*, 33(1), 77-90.

Hideg, É., Jansen, M. A., & Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates?. *Trends in plant science*, 18(2), 107-115.

Huovinen, P., Gómez, I., & Lovengreen, C. (2006). A five-year study of solar ultraviolet radiation in Southern Chile (39° S): potential impact on physiology of coastal marine algae?. *Photochemistry and Photobiology*, 82(2), 515-522.

IPCC (2014) Climate change 2014: Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., ... & van Ypserle, J. P. (2014). Synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (p. 151). Ipc.

Jenkins GI, Brown BA (2007) UV-B perception and signal transduction. In GC Whitelam, KJ Halliday, eds, *Light and Plant Development*, Vol 30. Blackwell Publishing, Oxford, pp 155–182

Jentsch, A., Kreyling, J., Elmer, M., Gellesch, E., Glaser, B., Grant, K., ... & Beierkuhnlein, C. (2011). Climate extremes initiate ecosystem-regulating functions while maintaining productivity. *Journal of ecology*, 99(3), 689-702.

Jiménez-Muñoz, J. C., Mattar, C., Barichivich, J., Santamaría-Artigas, A., Takahashi, K., Malhi, Y., ... & Van Der Schrier, G. (2016). Record-breaking warming and extreme drought in the Amazon rainforest during the course of El Niño 2015–2016. *Scientific reports*, 6(1), 1-7.

Joshi, M., Hawkins, E., Sutton, R., Lowe, J., Frame, D. (2011) Projections of when temperature change will exceed 2 °C above pre-industrial levels. *Nat. Clim. Chang.* 1 (8), 407–412.

Kakani, V. G., Reddy, K. R., Zhao, D., & Gao, W. (2004). Senescence and hyperspectral reflectance of cotton leaves exposed to ultraviolet-B radiation and carbon dioxide. *Physiologia plantarum*, 121(2), 250-257.

Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E. M., & Noctor, G. (2012). Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1619-1636.

Karpiński, S., SZECHYŃSKA-HEBDA, M. A. G. D. A. L. E. N. A., Wituszyńska, W., & Burdiak, P. (2013). Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant, Cell & Environment*, 36(4), 736-744.

Kerr, J. B., & McElroy, C. T. (1993). Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science*, 262(5136), 1032-1034.

Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., & Rubel, F. (2006). World map of the Köppen-Geiger climate classification updated.

Kovacic, P., & Somanathan, R. (2011). Cell signaling and receptors with resorcinols and flavonoids: redox, reactive oxygen species, and physiological effects. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 31(4), 265-270.

Larkindale, J., Mishkind, M., & Vierling, E. (2005). Plant responses to high temperature. *Plant abiotic stress*, 100, 144.

Lattanzio V. Phenolic Compounds: Introduction. In: Ramawat K.G., Mérillon J.-M., editors. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2013. pp. 1543–1580.

Li, X., Ahammed, G. J., Li, Z. X., Zhang, L., Wei, J. P., Yan, P., ... & Han, W. Y. (2018). Freezing stress deteriorates tea quality of new flush by inducing photosynthetic inhibition and oxidative stress in mature leaves. *Scientia Horticulturae*, 230, 155-160.

Li, Y.A., Zu, Y.Q., Chen, J.J., Chen, H.Y., Yang, J.L., Hu, Z.D., (2000). Intraspecific differences in physiological response of 20 wheat cultivars to enhanced ultraviolet- B radiation under field conditions. *Environ. Exp. Bot.* 44, 95–103.

Zu, Y., Li, Y., Chen, J., & Chen, H. (2004). Intraspecific responses in grain quality of 10 wheat cultivars to enhanced UV-B radiation under field conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 74(2-3), 95-100.

Lin, K. H., Chao, P. Y., Yang, C. M., Cheng, W. C., Lo, H. F., & Chang, T. R. (2006). The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. *Botanical Studies*, 47(4), 417-426.

Lovengreen, C., Fuenzalida, H., & Villanueva, L. (2000). Ultraviolet solar radiation at Valdivia, Chile (39.8 S). *Atmospheric environment*, 34(24), 4051-4061.

Madronich, S. (1993). The atmosphere and UV-B radiation at ground level. In *Environmental UV photobiology* (pp. 1-39). Springer, Boston, MA.

M Calderon-Montano, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(4), 298-344.

Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441-447.

- Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. *Journal of Food Science*, 80(11), C2397-C2403.
- McKenzie, R. L., Bodeker, G. E., Keep, D. J., Kotkamp, M., & Evans, J. (1996). UV radiation in New Zealand: north-to-south differences between two sites, and relationship to other latitudes. *Weather and Climate*, 17-26.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology*, 61, 443-462.
- Moore, D. M. (1983). *Flora of Tierra del Fuego*. Flora of Tierra del Fuego.
- Mouradov, A., & Spangenberg, G. (2014). Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in plant science*, 5, 620.
- Müller-Xing, R., Xing, Q., & Goodrich, J. (2014). Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. *Frontiers in plant science*, 5, 474.
- Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., ... & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview. *Plant signaling molecules*, 157-168.
- Nedunchezian, N., Kulandaivelu, G., (1996). Effects of UV-B enhanced radiation on ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase in leaves of *Vigna sinensis* L. *Photosynthetica*, 25(3), 431-435.
- Niemeyer, H. M., & Teillier, S. (2017). Aromas de la flora nativa de Chile.
- Nile, S. H., Ko, E. Y., Kim, D. H., & Keum, Y. S. (2016). Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 50-55.
- Olivares-Contreras, V. A., Mattar, C., Gutiérrez, A. G., & Jiménez, J. C. (2019). Warming trends in Patagonian subantarctic forest. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 76, 51-65.
- Olson, D. M., & Dinerstein, E. (1998). The Global 200: a representation approach to conserving the Earth's most biologically valuable ecoregions. *Conservation biology*, 12(3), 502-515.

Paritsis, J., & Veblen, T. T. (2011). Dendroecological analysis of defoliator outbreaks on *Nothofagus pumilio* and their relation to climate variability in the Patagonian Andes. *Global Change Biology*, 17(1), 239-253.

Patel, P. K., Singh, A. K., Tripathi, N., Yadav, D., & Hemantaranjan, A. (2014). Flooding: abiotic constraint limiting vegetable productivity. *Advances in Plants and Agriculture Research*, 1(3), 96-103.

Piper, F. I., Gundale, M. J., & Fajardo, A. (2015). Extreme defoliation reduces tree growth but not C and N storage in a winter-deciduous species. *Annals of botany*, 115(7), 1093-1103.

Pollastri, S., & Tattini, M. (2011). Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany*, 108(7), 1225-1233.

Pott, D. M., Osorio, S., & Vallarino, J. G. (2019). From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Frontiers in plant science*, 10, 835.

Ramirez, C., Ortiz, I., San Matin, C., Vidal, O., Alvarez, M., Perez, Y., y col., (2014). Estudio preliminar de la biodiversidad vegetal terrestre en el Estero Walker (Región de Aysén, Chile): utilizando líneas base de proyectos de inversión. *Gayana. Botánica*, 71(2), 227-245.

Reyes-Díaz, M., Alberdi, M., Piper, F., Bravo, L. A., & Corcuera, L. J. (2005). Low temperature responses of *Nothofagus dombeyi* and *Nothofagus nitida*, two evergreen species from south central Chile. *Tree physiology*, 25(11), 1389-1398.

Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant physiology*, 141(2), 357-366.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.

Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Garcia, P. C., Lopez-Lefebvre, L. R., Sánchez, E., & Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160(2), 315-321.

Rodríguez, R., Marticorena, C., Alarcón, D., Baeza, C., Cavieres, L., Finot, V. L., ... & Marticorena, A. (2018). Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana. Botánica*, 75(1), 1-430.

Rousseaux, M. C., Flint, S. D., Searles, P. S., & Caldwell, M. M. (2004). Plant Responses to Current Solar Ultraviolet-B Radiation and to Supplemented Solar Ultraviolet-B Radiation Simulating Ozone Depletion: An Experimental Comparison. *Photochemistry and photobiology*, 80(2), 224-230.

Rozema, J., Björn, L. O., Bornman, J. F., Gaberščik, A., Häder, D. P., Trošt, T., ... & Meijkamp, B. B. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems— an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(1), 2-12.

Sala de lluvias. (2020). Recuperado 10 de junio de 2020, de Visualizador climático de lluvias en Chile website: <https://saladelluvias.herokuapp.com>

Seckmeyer, G., Mayer, B., Bernhard, G., McKenzie, R. L., Johnston, P. V., Kotkamp, M., ... & Tomlinson, D. (1995). Geographical differences in the UV measured by intercompared spectroradiometers. *Geophysical Research Letters*, 22(14), 1889-1892.

Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*; 24(13):2452.

Shirley, B. W. (1996). Flavonoid biosynthesis: ‘new’ functions for an ‘old’ pathway. *Trends in plant science*, 1(11), 377-382.

Shokoohinia, Y., Rashidi, M., Hosseinzadeh, L., & Jelodarian, Z. (2015). Quercetin-3-O- β -d-glucopyranoside, a dietary flavonoid, protects PC12 cells from H₂O₂-induced cytotoxicity through inhibition of reactive oxygen species. *Food chemistry*, 167, 162-167.

Sierla, M., Rahikainen, M., Salojärvi, J., Kangasjärvi, J., & Kangasjärvi, S. (2013). Apoplastic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses. *Antioxidants & redox signaling*, 18(16), 2220-2239.

Stafford, H. A. (1991). Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology*, 96(3), 680-685.

Striker, G. G., & Colmer, T. D. (2017). Flooding tolerance of forage legumes. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1851-1872.

Suarez, M. L., Ghermandi, L., & Kitzberger, T. (2004). Factors predisposing episodic drought-induced tree mortality in *Nothofagus*–site, climatic sensitivity and growth trends. *Journal of Ecology*, 92(6), 954-966.

Sung, D. Y., Kaplan, F., Lee, K. J., & Guy, C. L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in plant science*, 8(4), 179-187.

Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology*, 14(6), 691-699.

Szeicz, J. M. (1997). Growth trends and climatic sensitivity of trees in the North Patagonian rain forest of Chile. *Canadian journal of forest research*, 27(7), 1003-1014.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Plant physiology fifth edition. *Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates inc., publishers.*

Tercero-Bucardo, N., Kitzberger, T., Veblen, T.T., Raffaele, E. (2007). A field experiment on climatic and herbivore impacts on post-fire tree regeneration in north-western Patagonia. *Journal of Ecology*, 95(4), 771-779.

Tewari, S., & Mishra, A. (2018). Flooding stress in plants and approaches to overcome. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 355-366). Academic Press.

Ulm, R., & Nagy, F. (2005). Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current opinion in plant biology*, 8(5), 477-482.

Vacca, R. A., Valenti, D., Bobba, A., Merafina, R. S., Passarella, S., & Marra, E. (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiology*, 141(1), 208-219.

Vega Belmar, K. A. (2018). Actividad antioxidante y antibacteriana determinadas en extractos metanólicos obtenidos desde partes aéreas de *Rhaphithamnus spinosus* (Juss) Moldenke.

Veblen, T. T., & Schlegel, F. M. (1982). Reseña ecológica de los bosques del sur de Chile. *Bosque*, 4(2), 73-115.

Veblen, T. T., Ashton, D. H., Schlegel, F. M., & Veblen, A. T. (1977). Plant succession in a timberline depressed by vulcanism in south-central Chile. *Journal of Biogeography*, 275-294.

Veblen, T. T., Donoso, C., Kitzberger, T., & Rebertus, A. J. (1996). Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. *The ecology and biogeography of Nothofagus forests*, 10, 93-353.

Villalba, R., & Veblen, T. T. (1998). Influences of large-scale climatic variability on episodic tree mortality in northern patagonia. *Ecology*, 79(8), 2624-2640.

Wang, Y., Gao, S., He, X., Li, Y., Li, P., Zhang, Y., & Chen, W. (2019). Growth, secondary metabolites and enzyme activity responses of two edible fern species to drought stress and rehydration in Northeast China. *Agronomy*, 9(3), 137.

Weinberger, P. (1977). The regeneration of the Araucano-patagonic *Nothofagus* species in relation to microclimatic conditions.

Wink, M. (2008). Evolution of secondary plant metabolism. *eLS*.

Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology*, 126(2), 485-493.

- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 218-223.
- Wrzaczek, M., Brosché, M., & Kangasjärvi, J. (2013). ROS signaling loops—production, perception, regulation. *Current opinion in plant biology*, 16(5), 575-582.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., & Cui, L. (2006). Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany*, 56(3), 274-285.
- Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development*, 30(3), 515-527.
- Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1060-1066.
- Yordanova, R. Y., Christov, K. N., & Popova, L. P. (2004). Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 51(2), 93-101.
- Yordanova, R. Y., Uzunova, A. N., & Popova, L. P. (2005). Effects of short-term soil flooding on stomata behaviour and leaf gas exchange in barley plants. *Biologia Plantarum*, 49(2), 317-319.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., & Tang, T. (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3(2), 90-97.
- Zinta, G., Abdelgawad, H., Domagalska, M. A., Vergauwen, L., Knapen, D., Nijs, I., ... & Asard, H. (2014). Physiological, biochemical, and genome-wide transcriptional analysis reveals that elevated CO₂ mitigates the impact of combined heat wave and drought stress in *Arabidopsis thaliana* at multiple organizational levels. *Global Change Biology*, 20(12), 3670-3685.

ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA- FACULTAD DE CIENCIAS-
UNIVERSIDAD DE CHILE



ANEXO SEMINARIO DE TÍTULO

**VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA RESPUESTA
ANTIOXIDANTE QUÍMICA DE CUATRO ESPECIES DEL
BOSQUE SIEMPREVERDE DE AYSÉN**

Francisco Nicolás Quinán Cárdenas

Director de Seminario de Título: Dr. Oney Oscar Ramírez Rodríguez

Co-director de Seminario de Título: Dra. Merly de Armas Ricard

Profesor Patrocinante: Dra. Julieta Laura Orlando

2021
Santiago de Chile

1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

1.1. Contenido de fenoles totales (TPC)

Curva de calibración con ácido gálico

Se siguió el procedimiento descrito en Materiales y Métodos para la determinación del contenido fenólico total (TPC) utilizando disoluciones etanólicas de ácido gálico de concentración conocida (15; 25; 35; 45; 55; 65 y 75 $\mu\text{g/mL}$). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se reporta el promedio y la desviación estándar (Tabla A1).

Tabla A1. Datos de la curva patrón de ácido gálico para TPC.

Ácido gálico [$\mu\text{g/mL}$]	Absorbancia promedio a 765nm \pm DS
15,06	0,126 \pm 0,022
25,10	0,184 \pm 0,006
35,14	0,263 \pm 0,019
45,18	0,315 \pm 0,008
55,22	0,371 \pm 0,006
65,26	0,467 \pm 0,023
75,30	0,528 \pm 0,016

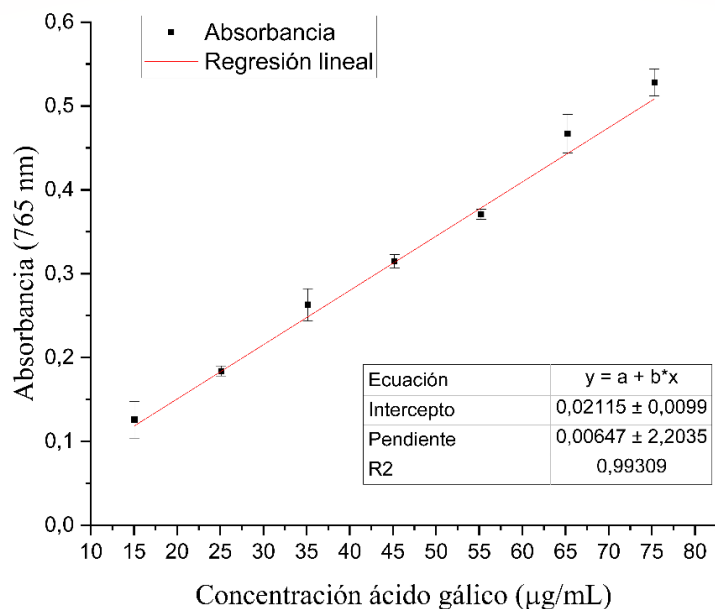


Figura A1. Curva de calibración de ácido gálico para el análisis de TPC.

Tabla A2. Contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de las especies. Para cada muestra se reporta el promedio de tres réplicas realizadas por triplicado, y su desviación estándar.

Especie/sitio	Masa equivalente de ácido gálico [mg/g dm] ± DS							
	Año 2018				Año 2019			
	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
<i>R. spinosus/R.s1</i>	194,0±10,0	175,0±9,0	175,0± 8,0	238,0± 6,0	144,0±4,0	187,0±5,0	153,0±10,0	183,0±7,0
<i>R. spinosus/R.s2</i>	215,0±6,0	233,0±8,0	184,0±10,0	297,0±23,0	228,0±6,0	234,0±6,0	208,0±14,0	204,0±11,0
<i>R. spinosus/R.s3</i>	145,0±6,0	-	156,0±5,0	182,0± 8,0	126,0±4,0	-	139,0±5,0	147,0±14,0
<i>N. nitida/N.n1</i>	218,0±10,0	247,0±7,0	225,0±9,0	327,0± 7,0	142,0±17,0	-	205,0±3,0	224,0±10,0
<i>N. nitida/N.n2</i>	237,0±7,0	269,0±10,0	197,0±6,0	241,0±18,0	157,0±17,0	-	191,0±5,0	218,0±16,0
<i>N. nitida/N.n3</i>	-	-	218,0±4,0	270,0±6,0	171,0±11,0	-	181,0±15,0	222,0±5,0
<i>N. betuloides/N.b1</i>	197,0±5,0	254,0±13,0	274,0±2,0	271,0±22,0	185,0±24,0	-	250,0±9,0	236,0±9,0
<i>N. betuloides/N.b2</i>	-	292,0±9,0	246,0±8,0	218,0±6,0	167,0±11,0	-	206,0±5,0	-
<i>N. betuloides/N.b3</i>	-	0,230±13,0	273,0±41,0	289,0±7,0	100,0±2,0	-	190,0±25,0	227,0±8,0
<i>W.trichosperma/W.t</i>	-	515,0±10,0	388,0±12,0	540,0±5,0	481,0±20,0	-	416,0±17,0	429,0±25,0

1.2. Contenido Total de Flavonoides (TFC)

Curva de calibración con (+)-Catequina

Se siguió el procedimiento descrito en Materiales y Métodos para la determinación del contenido total de flavonoides utilizando disoluciones etanólicas de (+)-catequina de concentración conocida (25; 35; 45; 55; 65; 75; 85; 100 150 y 200 µg/mL). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y reportamos el promedio y la desviación estándar (Tabla 3).

Tabla A3. Datos de la curva patrón de (+)-catequina para TFC.

(+)-Catequina [µg/mL]	Absorbancia promedio a 510 nm ± DS
24,87	0,1310 ± 0,004
35,02	0,1870 ± 0,002
45,17	0,2270 ± 0,005
54,81	0,2750 ± 0,008
64,96	0,3310 ± 0,003
75,11	0,3790 ± 0,007
85,18	0,4250 ± 0,007
99,98	0,4980 ± 0,018
152,25	0,7610 ± 0,025
199,76	0,9680 ± 0,026

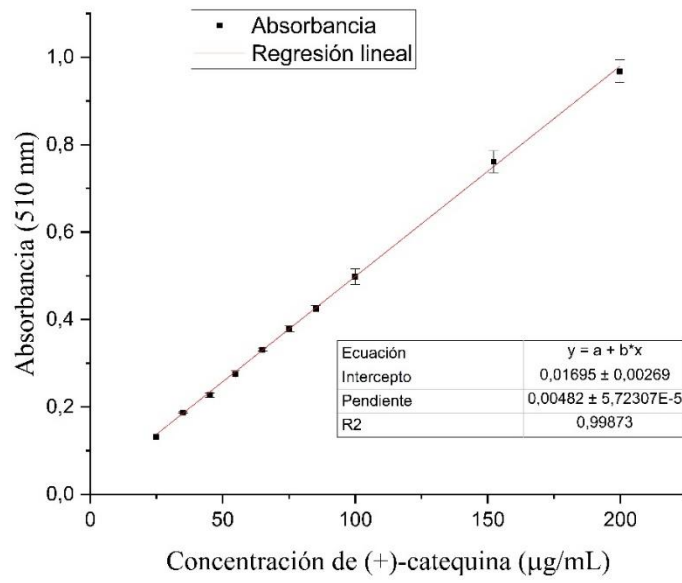


Figura A2. Curva de calibración de catequina para TFC.

Tabla A4. Contenido total de flavonoides de los extractos etanólicos medidos como masa equivalente de catequina. Para cada muestra se reporta el promedio de dos réplicas realizadas por triplicado, y su desviación estándar.

Especies/sitios	Masa equivalente de Catequina [mg/g dm] ± DS							
	Año 2018				Año 2019			
	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
<i>R. spinosus/R.s1</i>	180,5±3,4	212,2±1,5	190,6±9,0	253,5±3,1	169,7±3,2	213,0±5,9	206,3±5,7	174,1 ±4,6
<i>R. spinosus/R.s2</i>	196,6±8,0	303,3±5,4	224,1±5,2	293,6±16,1	258,9±1,5	278,4±4,0	218,5±8,0	213,9 ±6,1
<i>R. spinosus/R.s3</i>	132,4±3,2	-	172,4±7,8	199,0±4,8	102,1±5,8	-	121,8±5,5	-
<i>N. nitida/N.n1</i>	100,5±5,8	115,7±1,6	115,2±2,1	-	97,8±4,9	-	86,7±4,1	94,9±4,6
<i>N. nitida/N.n2</i>	111,4±3,6	123,7±5,8	91,9±5,6	100,0±1,6	84,2±4,9	-	95,6±3,4	99,5±5,4
<i>N. nitida/N.n3</i>	-	-	106,4±5,4	120,6±7,0	96,7±2,7	-	83,6±7,7	104,7±4,5
<i>N. betuloides/N.b1</i>	27,6 ±4,2	46,2±5,3	44,8±1,1	30,2±4,5	36,9±3,2	-	40,9±2,4	28,5±3,2
<i>N. betuloides/N.b2</i>	-	53,1±3,9	43,8±2,0	40,3±2,3	22,1±2,9	-	40,3±5,2	-
<i>N. betuloides/N.b3</i>	-	36,5±1,4	48,5±2,2	39,0±1,8	32,4±1,8	-	27,7±2,6	25,9±5,1
<i>W.trichosperma/W.t</i>	-	233,8±3,3	171,5±3,5	238,4±4,9	168,3±6,7	-	199,5±6,1	209,8±6,3

1.3. Capacidad antioxidante por apagamiento del radical DPPH

Curva de calibración con DPPH

Se prepararon disoluciones etanólicas de concentración 10; 20; 40; 60; 80 y 130 µM de DPPH a partir de la disolución inicial (120–140 µM). Se midió la absorbancia por triplicado de cada una de las disoluciones anteriores a 517 nm utilizando etanol como blanco (Tabla 5).

Tabla A5. Absorbancia de las disoluciones de DPPH de concentración conocida.

Conc. DPPH (µM)	Absorbancia promedio a 517nm ± DS
10,08	0,053 ± 0,005
20,16	0,106 ± 0,003
40,32	0,223 ± 0,003
60,48	0,335 ± 0,006
80,64	0,448 ± 0,002
100,00	0,560 ± 0,003
134,41	0,776 ± 0,010

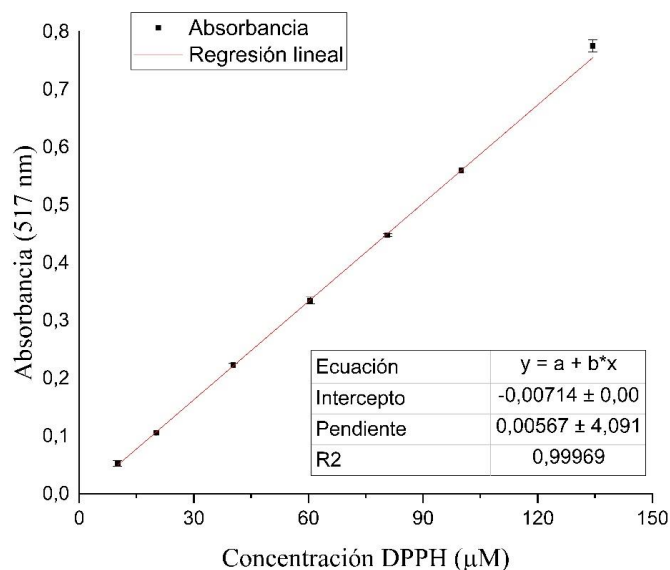


Figura A3. Curva de calibración de DPPH.

Preparación del control positivo (Trolox) para determinar el IC50.

A partir de la disolución 10 mM de Trolox, se prepararon disoluciones de 2 mL de concentración 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 y 110 μM . Se siguió el protocolo descrito para el ensayo, reemplazando los 50 μL de muestra por 50 μL de cada una de las disoluciones de Trolox. Se usó etanol como blanco. Cada medición se realizó por triplicado y se reporta la concentración de Trolox y el porcentaje de inhibición del DPPH asociado (Tabla 6).

IC50 (Trolox) = 14,91 $\mu\text{g/mL}$ = 59,58 μM

Tabla A6. Curva de control positivo (trolox).

Conc. Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de inhibición (%)
2,90098	29
5,80195	34
8,70293	39
11,60391	44
14,50489	50
17,40586	53
20,30684	61
23,20782	65
26,10879	69
29,00977	73

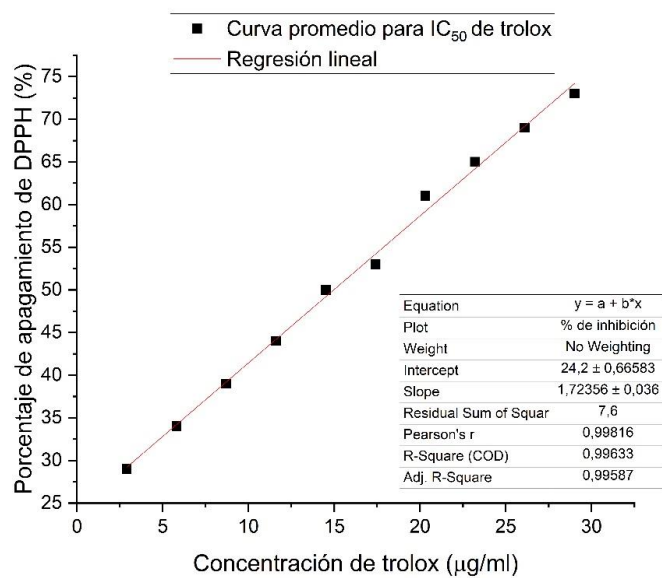


Figura A4. Curva de apagamiento del DPPH con trolox.

Tabla A7. Capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de las especies en estudio reportado como IC50. Cada muestra fue analizada por triplicado y se reporta el promedio y la desviación estándar.

Especie/sitio	IC ₅₀ [µg/ml] ± DS							
	Año 2018				Año 2019			
	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
<i>R. spinosus/R.s1</i>	95,08±0,67	113,96±1,63	96,33±1,46	88,00±1,41	131,86±1,04	76,25±1,44	106,54±1,69	78,06±1,62
<i>R. spinosus/R.s2</i>	78,78±0,19	77,42±0,30	82,64±1,25	77,51±0,93	68,25±0,44	53,28±0,90	78,13±1,08	61,68±1,00
<i>R. spinosus/R.s3</i>	133,15±0,23	-	114,44±2,25	95,34±0,90	133,88±2,35	-	141,83±0,19	84,28±1,43
<i>N. nitida/N.n1</i>	63,95±0,23	52,49±0,68	53,15±0,30	48,20±0,98	82,41±0,54	-	49,89±0,53	52,91±0,97
<i>N. nitida/N.n2</i>	55,44±0,14	50,71±1,17	67,21±0,99	76,86±1,25	91,59±2,34	-	54,84±0,29	53,31±1,31
<i>N. nitida/N.n3</i>	-	-	68,44±0,34	68,55±0,81	84,34±2,87	-	47,38±3,84	48,18±0,70
<i>N.betuloides/N.b1</i>	49,80±0,62	41,33±0,63	36,80±0,33	45,95±0,73	37,49±2,63	-	33,98±0,22	32,60±0,36
<i>N.betuloides/N.b2</i>	-	34,14±0,64	39,27±0,28	56,32±0,75	42,05±1,66	-	43,03±0,99	-
<i>N.betuloides/N.b3</i>	-	43,59±1,94	26,92±0,45	45,31±0,93	46,15±0,90	-	37,54±0,94	30,95±0,335
<i>W.trichosperma/W.t</i>	-	31,69±0,39	35,21±0,39	32,84±0,18	31,98±0,41	-	31,39±0,83	30,31± 0,17

1.4. Capacidad antioxidante por reducción de cobre (II) (CUPRAC)

Curva de calibración

Se siguió el procedimiento descrito en Materiales y Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante reductora del ión cúprico (CUPRAC), utilizando disoluciones etanólicas de ácido gálico de concentración entre 1 y 100 µg/mL. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se reporta el promedio y la desviación estándar (Tabla 8).

Tabla A8. Datos de la curva patrón de ácido gálico para CUPRAC.

Concentración de ácido gálico (µg/mL)	Absorbancia promedio a 450 nm ± DS
1,008	0,028 ± 0,004
2,015	0,053 ± 0,001
3,023	0,084 ± 0,006
4,030	0,123 ± 0,012
5,038	0,137 ± 0,011

6,045	0,157 ± 0,014
7,053	0,190 ± 0,010
10,075	0,277 ± 0,011
13,098	0,366 ± 0,025
17,128	0,493 ± 0,023
20,15	0,592 ± 0,025
22,165	0,676 ± 0,035
25,188	0,751 ± 0,041
50,375	1,535 ± 0,066

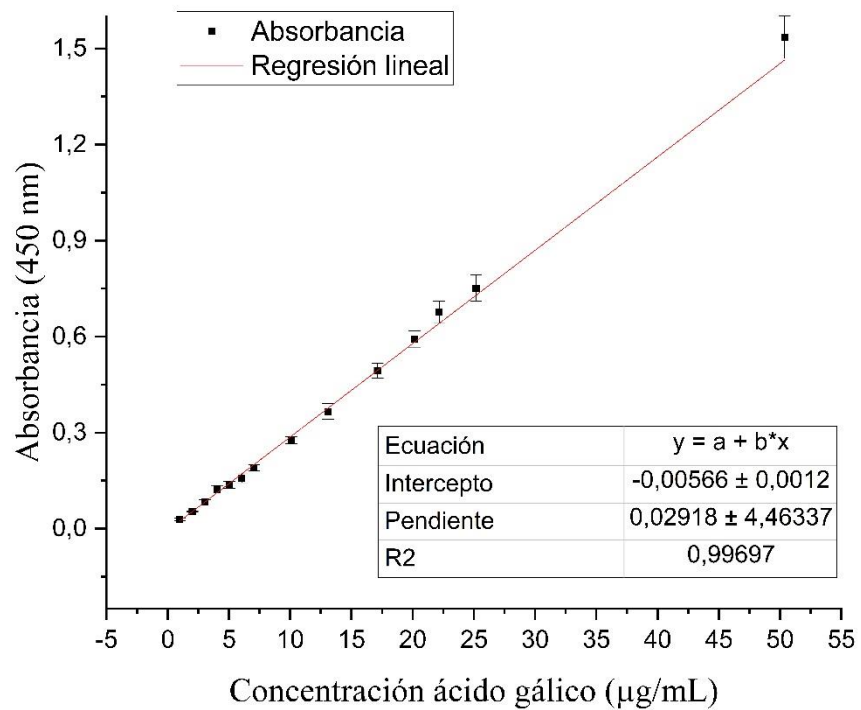


Figura A5. Curva de calibración de ácido gálico.

Tabla A9. Capacidad antioxidante por reducción del ión cúprico de extractos etanólicos de las cuatro especies estudiadas. Cada muestra fue analizada por triplicado y se reporta el promedio y la desviación estándar.

Especie/sitio	Masa equivalente de ácido gálico [mg/g dm] \pm DS							
	Año 2018				Año 2019			
	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
<i>R. spinosus/R.s1</i>	139,8 \pm 7,0	120,9 \pm 3,6	128,0 \pm 2,5	160,9 \pm 2,0	104,0 \pm 4,1	138,4 \pm 2,5	124,5 \pm 2,0	123,8 \pm 2,0
<i>R. spinosus/R.s2</i>	150,7 \pm 6,7	158,7 \pm 1,5	144,0 \pm 4,0	167,3 \pm 2,3	155,1 \pm 3,1	166,7 \pm 3,6	152,4 \pm 1,2	168,4 \pm 1,6
<i>R. spinosus/R.s3</i>	103,6 \pm 1,8	-	118,3 \pm 1,3	100,5 \pm 4,0	101,3 \pm 2,3	-	102,4 \pm 3,9	119,1 \pm 1,4
<i>N. nitida/N.n1</i>	135,8 \pm 4,1	168,5 \pm 4,2	156,8 \pm 7,6	217,1 \pm 5,1	121,9 \pm 1,3	-	134,0 \pm 1,9	156,9 \pm 3,9
<i>N. nitida/N.n2</i>	162,4 \pm 7,6	169,3 \pm 7,8	138,3 \pm 4,9	152,9 \pm 1,5	104,1 \pm 1,2	-	100,7 \pm 4,6	127,7 \pm 4,2
<i>N. nitida/N.n3</i>	-	-	-	181,3 \pm 7,0	115,1 \pm 1,7	-	136,7 \pm 1,7	149,2 \pm 5,3
<i>N. betuloides/N.b1</i>	157,8 \pm 2,4	187,7 \pm 7,4	218,2 \pm 3,1	219,3 \pm 4,7	173,6 \pm 4,9	-	204,7 \pm 3,7	193,5 \pm 3,8
<i>N. betuloides/N.b2</i>	-	235,0 \pm 8,8	202,5 \pm 7,1	178,8 \pm 2,2	79,1 \pm 2,2	-	152,0 \pm 1,3	-
<i>N. betuloides/N.b3</i>	-	170,4 \pm 2,6	206,0 \pm 7,9	235,3 \pm 9,6	164,2 \pm 2,3	-	175,7 \pm 7,0	196,3 \pm 6,2
<i>W. trichosperma/W.t</i>	-	367,0 \pm 8,1	269,8 \pm 4,5	391,6 \pm 11,4	314,0 \pm 7,7	-	302,9 \pm 5,0	316,2 \pm 4,0

2. ANÁLISIS DE VARIABLES AMBIENTALES

2.1. Temperatura

Temperatura estación Puerto Aysén Ad. Dirección meteorológica de Chile.

Tabla A10. Temperaturas mínima, máxima y media de los 30 días anteriores al día de muestreo.

Verano 2018			Otoño 2018			Invierno 2018			Primavera 2018		
T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]	T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]	T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]	T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]
11,4	13,9	14,5	1,7	11,6	5,9	3,8	6,8	5,1	4,2	10,6	7,2
12,7	17,6	13,5	7,0	11,6	11,0	3,9	6,6	4,7	4,1	11,3	6,7
8,3	16,4	11,5	10,6	18	12,9	4,4	6,3	6,4	4,0	11,4	7,2
8,6	16,0	12,0	9,4	15,8	10,2	0,9	8,4	3,5	6,5	12,7	8,1
9,1	16,1	11,2	7,2	13,1	9,5	3,2	6,6	6,1	5,8	11,1	8,7
10,3	13,7	13,1	10,1	12,3	12,4	3,5	9,9	5,7	8,5	11,6	9,8
10,9	17,0	13,6	12,7	14,3	14,2	1,9	8,2	4	8,3	11,8	9,0
8,2	18,3	10,3	8,3	16,5	10,8	2,5	7,3	4,6	6,9	10,3	8,4
7,9	13,2	11,9	8,2	14,6	9,8	4,0	6,5	6,5	7,3	11,3	9,1
9,1	17,1	11,8	4,9	14,2	7,2	5,4	8,0	6,1	7,2	13	8,4
13,2	14,2	16,1	5,4	10,7	8,3	1,1	8,3	2,6	4,1	10,7	7,2
12,1	20,9	16,3	5,4	12,7	8,5	-1,1	6,7	1,6	3,3	12,7	7,0
13,0	25,0	16,9	5,9	12,7	7,0	-1,8	6,2	1,4	5,3	11,4	5,6
6,5	21,7	15,7	7,6	8,3	8,8	-1,4	6,5	1,7	3,0	6,9	7,3
11,4	23,1	17,6	5,9	12,1	8,3	-1,7	5,9	1,9	4,8	12,7	6,8
11,6	24,1	13,1	6,0	10,6	7,0	-1,7	6,0	2,6	5,6	9,9	6,8
9,3	15,6	13,1	1,6	10,6	5,7	0,9	7,8	3,9	2,5	8,8	5,4
9,6	17,3	14,2	2,8	10	6,5	-2,2	10,0	1,2	3,8	9,4	6,8
10,4	18,8	14,6	5,6	13,1	7,2	-2,8	7,4	0,7	1,5	11,4	7,1
13,4	19,5	14,4	5,5	9,1	6,8	-2,5	6,9	1,2	6,1	14,2	8,7
11,2	15,6	14,0	6,2	9,3	7,7	0,0	8,5	4,3	7,2	13,1	9,2
14,4	16,7	15,3	5,6	10,3	8,0	0,7	8,0	4,5	5,2	12,2	5,1
13,2	17,1	16,0	0,7	12,1	4,3	3,6	8,4	6,3	-0,2	6,1	2,7
14,9	19,3	18,5	2,3	9,8	6,7	4,6	9,9	6,2	1,7	7,8	5,4
11,2	23,7	16,1	1,7	12,4	6,3	3,5	8,3	5,0	3,3	10,7	7,3
11,0	21,7	13,5	2,6	14,7	7,2	2,4	7,7	4,5	5,7	12,6	8,5
8,7	17,6	12,7	9	11,1	10,6	-0,6	8,4	2,3	6,7	12,7	9,2
3,9	17,3	12,6	9,8	12,7	11,2	-3,0	7,6	1,4	-1,4	14	6,2
4,8	20,2	14,6	8,2	12,9	9,0	2,1	7,1	3,8	2,3	15,5	7,9
11,9	22,0	14,1	0,9	11,6	4,2	-1,0	7,0	1,6	6,2	11,9	8,2

Verano 2019			Otoño 2019			Invierno 2019			Primavera 2019		
T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]	T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]	T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]	T _{mín} [°C]	T _{máx} [°C]	T _{med} [°C]
9,9	17,4	14,0	7,3	15,4	11,3	1,7	8,6	3,6	0,6	8,2	4,7
7,3	19,2	14,6	11,3	16,3	12,0	3,4	7,1	4,8	3,9	9,2	6,8
12,5	21,6	16,2	10,3	13,7	11,8	3,9	6,2	5,4	0,9	11,5	6,6
12,0	20,3	14,2	9,4	13,9	12,4	0,9	7,1	1,7	6,0	12,9	8,4
12,5	18,3	14,6	6,0	18,1	11,3	-3,9	5,1	-1,0	5,5	12,3	8,2
13,9	17,6	14,7	4,4	18,8	10,7	-0,2	3,5	1,9	5,9	11,1	7,9
8,7	16,3	13,4	4,2	20,0	10,4	-1,7	5,7	2,1	5,8	12,2	7,6
6,0	18,4	13,9	8,0	18,0	12,4	4,0	5,7	6,8	6,9	10,0	8,9
11,3	21,1	13,3	10,9	18,4	11,9	3,5	10,7	4,8	7,2	12,0	9,9
9,7	16,4	12,2	10,9	13,5	13,7	2,5	7,6	4,0	8,3	14,5	10,5
8,7	6,3	9,9	5,8	17,9	11,4	1,4	7,2	3,6	0,1	15,2	6,9
8,3	1,7	11,5	11,2	16,9	12,7	3,1	6,3	5,7	6,4	14	8,9
8,8	3,3	11,3	12,8	14,1	13,5	3,4	8,3	5,4	3,8	12,9	8,5
6,5	4,2	8,7	10,8	15,0	11,9	2,0	9,5	4,9	5,2	14,7	13,1
5,9	1,4	9,8	8,4	13,4	10,2	5,1	8,4	6,7	8,1	20,5	12,9
7,6	4,1	12,9	10,4	12,4	12,5	6,2	8,9	7,6	8,3	18,6	10,8
12,3	9,2	15,5	10,8	15	12,6	5,7	9,4	6,9	7,9	14,8	10,7
10,5	0,2	13,8	10,8	15,3	12,4	3,0	8,9	5,2	9,8	16,1	11,6
9,3	9,0	11,0	10,2	14,5	12,9	4,5	8,1	6,1	2,9	15,2	11,1
7,6	4,5	8,8	2,0	7,2	13,3	5,0	8,3	5,5	9,2	19,4	10,7
4,9	0,8	7,0	0,1	5,6	12,0	3,1	7,1	5,4	5,8	14,8	9,3
1,5	0,0	9,6	8,9	5,4	10,5	5,3	8,2	7,3	6,7	13,3	10,2
6,9	6,5	12,6	8,8	12,6	9,9	4,1	9,8	4,9	1,1	15,2	9,5
9,1	7,2	11,3	6,6	13,5	7,6	-0,1	8,9	3,9	9,0	19,0	10,5
8,5	3,6	12,5	4,9	10,3	7,8	3,2	7,9	5,5	7,9	12,4	11,2
8,7	6,5	12,1	8,2	11,0	10,5	3,7	8,3	4,5	7,9	16,6	8,5
9,2	6,4	15,1	9,5	13,9	10,6	0,6	6,5	2,1	3,8	11,5	6,0
11,0	2,3	12,8	8,5	12,8	10,2	1,4	4,2	2,7	0,3	11,4	4,8
9,3	6,2	13,2	9,3	12,5	10,5	2,1	5,1	4,3	6,4	10,5	8,8
7,0	8,6	14,0	6,8	12,4	9,7	4,1	7,4	6,1	6,0	13,0	9,1

2.2. Precipitaciones

Tabla A11. Precipitación promedio diario (mm) de los treinta días anteriores a cada muestreo.

Precipitación promedio diario (mm). Estación Aysén Ad.							
V18	O18	I18	P18	V19	O19	I19	P19
17,3	0,8	13,8	0,1	1,5	0,0	3,3	0,5
9,2	3,7	34,0	0,4	0,0	1,5	19,0	0,0
0,8	34,6	0,8	11,0	0,0	12,0	21,4	0,0
0,7	21,6	1,1	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,2	2,6	7,7	2,2	5,7	0,0	0,1	0,0
24,7	14,7	10,5	0,1	8,4	0,1	1,1	13,3
13,5	63,0	16,5	0,2	0,0	0,0	27,8	4,1
31,1	5,5	30,6	3,5	0,0	1,1	1,6	1,5
2,0	33,4	48,9	34,0	1,3	8,8	6,8	16,6
6,8	5,8	6,2	27,6	24,0	0,1	0,0	0,1
1,3	0,9	0,0	1,5	19,7	0,0	0,0	0,0
3,5	0,3	0,0	2,6	7,4	10,1	3,4	0,0
0,0	56,0	0,0	33,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0	10,1	0,0	0,1	7,4	0,4	1,6	0,0
9,7	22,1	0,0	17,3	4,7	0,0	11,8	2,5
1,5	1,1	0,0	11,7	0,1	0,0	6,8	2,6
0,0	0,0	0,0	2,9	0,0	20,4	3,0	1,9
0,0	0,0	0,0	0,4	4,0	11,5	2,4	0,0
0,0	0,0	0,0	N.E.	14,1	2,9	9,1	0,0
2,3	12,7	1,0	N.E.	28,8	0,5	12,3	10,7
1,3	0,9	3,2	N.E.	19,5	0,0	0,6	0,0
0,9	0,0	21,4	N.E.	0,0	3,7	14,8	0,0
0,1	0,0	3,9	8,8	2,4	43,8	5,1	0,0
0,0	0,0	0,5	5,4	0,7	26,0	23,5	0,0
0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	0,4	44,7	8,6
3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	24,7	22,5	24,3
0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	21,6	0,1	9,2
0,0	11,1	0,0	0,1	6,5	0,0	0,0	6,6
0,0	0,0	0,0	10,2	0,2	0,0	1,4	6,8
0,0	15,9	0,0	4,1	0,0	N.E.	0,5	9,7

N.E.: No encontrado

Los valores en verde fueron obtenidos desde la plataforma virtual “sala de lluvias” del Instituto de Ciencias de la Ingeniería de la universidad de O’Higgins en conjunto con el CR2.

2.3. Índice de Radiación Ultravioleta

Tabla A12. Índice de radiación ultravioleta (UV-B) promedio diario de los treinta días anteriores a cada muestreo.

Promedio diario del índice de radiación ultravioleta							
V18	O18	I18	P18	V19	O19	I19	P19
11	4	1	4	12	6	1	4
11	4	1	4	11	3	1	5
11	4	1	4	11	6	1	5
12	3	1	3	10	6	1	5
8	3	1	4	9	5	1	5
10	2	1	4	12	5	1	5
11	2	1	3	11	5	1	5
11	3	1	4	11	5	1	5
11	3	1	4	12	5	1	6
8	2	1	4	7	5	1	6
9	3	1	4	10	5	1	6
12	3	1	4	7	3	1	6
11	1	1	2	11	5	2	6
11	3	2	4	12	4	1	6
12	3	1	4	11	5	1	6
11	3	1	4	11	5	1	7
11	3	1	4	11	4	1	8
11	3	1	6	11	3	1	4
11	3	1	5	10	5	1	7
7	2	2	6	7	5	1	7
12	2	1	3	11	4	2	7
5	2	1	4	10	4	2	7
12	1	1	6	11	4	1	7
10	2	1	5	6	2	1	8
11	2	1	6	11	4	1	7
8	3	1	6	11	2	1	8
11	2	1	6	13	3	2	8
10	2	1	5	11	4	2	7
10	2	1	6	11	3	2	10
11	2	2	6	10	4	2	4

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla A13. Variación estacional de la respuesta antioxidante de las especies. Diferencias estadísticamente significativas entre estaciones consecutivas, e iguales en distinto año ($p < 0,01$).

Variación estacional por especie. ANOVA de una vía, test Bonferroni ajustado a un 99 % de confianza				
Ensayo	Especie	Diferencia estacional	valor P	
TPC	R.s	I18 vs. P18	<0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001	
	N.b	V18 vs. O18	0,0008	
		I18 vs. I19	0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001	
	N.n	V18 vs. V19	<0,0001	
		O18 vs. I18	<0,0001	
		I18 vs. P18	<0,0001	
		I18 vs. P18	<0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001	
TFC	R.s	V18 vs. O18	0,0005	
		P18 vs. V19	0,0023	
	N.b	V18 vs. O18	0,0002	
		N.n	O18 vs. I18	0,0067
	I18 vs. I19		0,0007	
	P18 vs. V19		0,0009	
	DPPH	R.s	V19 vs. O19	0,0004
		N.b	I18 vs. P18	<0,0001
			P18 vs. P19	<0,0001
N.n		V18 vs. V19	<0,0001	
		I18 vs. I19	0,0079	
		P18 vs. P19	0,0032	
CUPRAC	R.s	N.s.	-	
	N.b	P18 vs. V19	<0,0001	
	N.n	V18 vs. V19	<0,0001	
		I18 vs. P18	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001	

Tabla A14. Variación estacional intraespecie de la respuesta antioxidante. Diferencias estadísticamente significativas entre estaciones consecutivas, e iguales en distinto año ($p < 0,01$).

Variación estacional intraespecie (por sitio). ANOVA de una vía, test Bonferroni ajustado a un 99% de confianza							
Ensayo	Especie	Diferencia estacional	valor P	Especie	Diferencia estacional	valor P	
TPC	R.s1	V18 vs. V19	<0,0001	N.b3	I18 vs. I19	<0,0001	
		I18 vs. P18	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	
		I18 vs. I19	0,022		P18 vs. P19	0,0007	
		P18 vs. V19	<0,0001	N.n1	V18 vs. O18	0,0008	
		P18 vs. P19	<0,0001		V18 vs. V19	<0,0001	
		V19 vs. O19	<0,0001		I18 vs. P18	<0,0001	
		O19 vs. I19	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	
		I19 vs. P19	<0,0001		P18 vs. P19	<0,0001	
	R.s2	O18 vs. I18	<0,0001		N.n2	V18 vs. V19	<0,0001
		I18 vs. P18	<0,0001			O18 vs. I18	<0,0001
		P18 vs. V19	<0,0001	I18 vs. P18		<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001	P18 vs. V19		<0,0001	
	R.s3	V18 vs. V19	0,0078	N.n3	I18 vs. P18	<0,0001	
		I18 vs. P18	0,0001		I18 vs. I19	<0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001		P18 vs. P19	<0,0001	
	N.b1	V18 vs. O18	<0,0001	W.t	I19 vs. P19	<0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001		O18 vs. I18	<0,0001	
		P18 vs. P19	0,0078		I18 vs. P18	<0,0001	
	N.b2	O18 vs. I18	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	
I18 vs. P18		<0,0001	P18 vs. P19		<0,0001		
I18 vs. I19		<0,0001					
P18 vs. V19		<0,0001					
TFC	R.s1	V18 vs. O18	<0,0001	N.b1	V18 vs. O18	<0,0001	
		O18 vs. I18	0,0006		I18 vs. P18	0,0016	
		I18 vs. P18	<0,0001		I19 vs. P19	0,0092	
		I18 vs. I19	<0,0001	N.b2	P18 vs. V19	0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001		N.b3	O18 vs. I18	0,0007
		P18 vs. P19	<0,0001	I18 vs. P18		0,0078	
		V19 vs. O19	<0,0001	I18 vs. I19		<0,0001	
		I19 vs. P19	<0,0001	P18 vs. P19		0,0002	
	R.s2	V18 vs. O18	<0,0001	N.n1		V18 vs. O18	0,0042
		V18 vs. V19	<0,0001		I18 vs. I19	<0,0001	
		O18 vs. I18	<0,0001	N.n2	V18 vs. V19	<0,0001	
		O18 vs. O19	0,0075		O18 vs. I18	<0,0001	
		I18 vs. P18	<0,0001		P18 vs. V19	0,0075	
		P18 vs. V19	0,0002	N.n3	I18 vs. I19	0,0021	
		P18 vs. P19	<0,0001		P18 vs. V19	0,0013	
	O19 vs. I19	<0,0001	I19 vs. P19		0,0043		
	R.s3	V18 vs. V19	<0,0001	W.t	O18 vs. I18	<0,0001	
		I18 vs. P18	0,0004		I18 vs. P18	<0,0001	
		I18 vs. I19	<0,0001		I18 vs. I19	<0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	

		P18 vs. P19	<0,0001				
CUPRAC	R.s1	V18 vs. O18	<0,0001	N.b3	O18 vs. I18	<0,0001	
		V18 vs. V19	<0,0001		I18 vs. P18	0,0005	
		O18 vs. O19	<0,0001		I18 vs. I19	0,0003	
		I18 vs. P18	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001		P18 vs. P19	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001		N.n1	V18 vs. O18	<0,0001
	V19 vs. O19	<0,0001	I18 vs. P18	<0,0001			
	O19 vs. I19	0,0021	I18 vs. I19	<0,0001			
	R.s2	O18 vs. I18	0,0006	P18 vs. V19		<0,0001	
		I18 vs. P18	<0,0001	P18 vs. P19		<0,0001	
		P18 vs. V19	0,0065	I19 vs. P19		<0,0001	
		O19 vs. I19	0,0009	N.n2	V18 vs. V19	<0,0001	
	I19 vs. P19	0,0002	O18 vs. I18		<0,0001		
	R.s3	I18 vs. P18	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	
		I18 vs. I19	<0,0001		P18 vs. P19	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001	N.n3	P18 vs. V19	<0,0001	
		I19 vs. P19	<0,0001		P18 vs. P19	<0,0001	
	N.b1	V18 vs. O18	<0,0001		W.t	O18 vs. I18	<0,0001
		V18 vs. V19	0,0072			I18 vs. P18	<0,0001
		O18 vs. I18	<0,0001	I18 vs. I19		0,0004	
P18 vs. V19		<0,0001	P18 vs. V19	<0,0001			
P18 vs. P19		<0,0001	P18 vs. P19	<0,0001			
N.b2	O18 vs. I18	<0,0001					
	I18 vs. P18	0,0006					
	I18 vs. I19	<0,0001					
	P18 vs. V19	<0,0001					
DPPH	R.s1	V18 vs. O18	<0,0001	N.b2	O18 vs. I18	0,0022	
		V18 vs. V19	<0,0001		I18 vs. P18	<0,0001	
		O18 vs. I18	<0,0001		P18 vs. V19	<0,0001	
		O18 vs. O19	<0,0001	N.b3	O18 vs. I18	<0,0001	
		I18 vs. P18	<0,0001		I18 vs. P18	<0,0001	
		I18 vs. I19	<0,0001		I18 vs. I19	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001		P18 vs. P19	<0,0001	
		P18 vs. V19	<0,0001		I19 vs. P19	0,0005	
		V19 vs. O19	<0,0001				
		O19 vs. I19	<0,0001		N.n1	V18 vs. O18	<0,0001
	I19 vs. P19	<0,0001	V18 vs. V19	<0,0001			
	R.s2	V18 vs. V19	<0,0001	I18 vs. P18		<0,0001	
		O18 vs. I18	0,0004	I18 vs. I19	0,0046		
		O18 vs. O19	<0,0001	P18 vs. V19	<0,0001		
		I18 vs. P18	0,0005	P18 vs. P19	0,0001		
		I18 vs. I19	0,0019	I19 vs. P19	0,0091		
		P18 vs. V19	<0,0001	N.n2	V18 vs. V19	<0,0001	
		P18 vs. P19	<0,0001		O18 vs. I18	<0,0001	
		V19 vs. O19	<0,0001		I18 vs. P18	<0,0001	
	O19 vs. I19	<0,0001	I18 vs. I19		<0,0001		
I19 vs. P19	<0,0001	P18 vs. V19	<0,0001				
R.s3	I18 vs. P18	<0,0001	N.n3	P18 vs. P19	<0,0001		
	I18 vs. I19	<0,0001		I18 vs. I19	<0,0001		
	P18 vs. V19	<0,0001		P18 vs. V19	0,0009		

	N.b1	P18 vs. P19	0,0001	W.t	P18 vs. P19	<0,0001
		I19 vs. P19	<0,0001		O18 vs. I18	<0,0001
		V18 vs. O18	<0,0001		I18 vs. P18	0,0029
		V18 vs. V19	<0,0001		I18 vs. I19	<0,0001
		I18 vs. P18	<0,0001		P18 vs. P19	0,0016
		P18 vs. V19	<0,0001			
		P18 vs. P19	<0,0001			

Tabla A15. Comparación interespecie de la respuesta antioxidante estacional. Diferencias estadísticamente significativas entre especies en una misma estación del año ($p < 0,01$).

Comparación interespecies. ANOVA de una vía, test de Bonferroni ajustado a un 99% de confianza .									
Ensayo	Estación	Diferencia interespecie	valor P	Ensayo	Estación	Diferencia interespecie	valor P		
TPC	V18	R.s vs. N.n	<0,0001	CUPRAC	V18	N.D.S	-		
		O18	R.s vs. N.b		<0,0001	O18	R.s vs. N.b	<0,0001	
	I18	R.s vs. N.n	<0,0001		I18	R.s vs. N.b	<0,0001		
		R.s vs. N.n	<0,0001			R.s vs. N.n	0,0047		
		N.b vs. N.n	<0,0001			N.b vs. N.n	<0,0001		
	P18	N.D.S	-		P18	R.s vs. N.b	<0,0001		
	V19	N.D.S	-			R.s vs. N.n	0,0040		
	I19	R.s vs. N.b	<0,0001		V19	N.D.S			
		P19	R.s vs. N.b		<0,0001	I19	R.s vs. N.b	<0,0001	
	R.s vs. N.n		<0,0001		N.b vs. N.n		<0,0001		
	TFC	V18	R.s vs. N.b		<0,0001	DPPH	P19	R.s vs. N.b	<0,0001
			R.s vs. N.n		<0,0001			N.b vs. N.n	<0,0001
			N.b vs. N.n		<0,0001			V18	R.s vs. N.b
		O18	R.s vs. N.b		<0,0001		O18	R.s vs. N.n	0,0007
R.s vs. N.n			<0,0001	R.s vs. N.b	<0,0001				
N.b vs. N.n			<0,0001	R.s vs. N.n	<0,0001				
I18		R.s vs. N.b	<0,0001	I18	R.s vs. N.b		<0,0001		
		R.s vs. N.n	<0,0001		R.s vs. N.n		<0,0001		
		N.b vs. N.n	<0,0001		N.b vs. N.n		<0,0001		
P18		R.s vs. N.b	<0,0001	P18	R.s vs. N.b		<0,0001		
		R.s vs. N.n	<0,0001		R.s vs. N.n		<0,0001		
		N.b vs. N.n	<0,0001		N.b vs. N.n		0,0051		
V19		R.s vs. N.b	<0,0001	V19	R.s vs. N.b		<0,0001		
		R.s vs. N.n	<0,0001		N.b vs. N.n		0,0002		
	N.b vs. N.n	0,0014	I19	R.s vs. N.b	<0,0001				
				R.s vs. N.n	<0,0001				

	I19	R.s vs. N.b	<0,0001		P19	R.s vs. N.b	<0,0001
		R.s vs. N.n	<0,0001			R.s vs. N.n	<0,0001
		N.b vs. N.n	0,0001			N.b vs. N.n	<0,0001
	P19	R.s vs. N.b	<0,0001			R.s vs. N.b	<0,0001
		R.s vs. N.n	<0,0001			R.s vs. N.n	<0,0001
		N.b vs. N.n	<0,0001			N.b vs. N.n	<0,0001

Tabla A16. Comparación interespecie de la respuesta antioxidante de *Weinmannia trichosperma*. Diferencias estadísticamente significativas entre sitios en una misma estación del año ($p < 0,01$).

Comparación interespecie. ANOVA de una vía, test de Bonferroni ajustado a un 99% de confianza.			
Ensayo	Estación	Especies	valor P
TPC	O18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	P18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	V19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	P19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
TFC	O18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	P18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	0,0001
	V19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	0,0078

	P19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	>0,9999
DPPH	O18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I18	W.t vs. N.b1	0,3039
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	P18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	V19	W.t vs. N.b1	0,0234
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I19	W.t vs. N.b1	0,0147
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	P19	W.t vs. N.b1	0,0785
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
CUPRAC	O18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	P18	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	V19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	I19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001
	P19	W.t vs. N.b1	<0,0001
		W.t vs. N.n1	<0,0001
		W.t vs. R.s2	<0,0001

Tabla A17. Comparación estacional intraespecie de la respuesta antioxidante. Diferencias estadísticamente significativas entre sitios, de una misma especie y en una misma estación del año ($p < 0,01$).

Comparación intraespecie. ANOVA de una vía, test de Bonferroni ajustado a un 99 % de confianza.							
Ensayo	Estación	Diferencia por sitio	valor P	Estación	Diferencia por sitio	valor P	
TPC	V18	R.s1 vs. R.s2	0,0024	V19	N.b1 vs. N.b2	0,2652	
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.b1 vs. N.b3	<0,0001	
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	<0,0001	
	I18	R.s1 vs. R.s2	0,2551	I19	N.b1 vs. N.b2	0,0015	
		R.s1 vs. R.s3	0,0072		N.b1 vs. N.b3	<0,0001	
		R.s2 vs. R.s3	0,0002		N.b2 vs. N.b3	0,4505	
	P18	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	I18	N.n1 vs. N.n2	<0,0001	
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.n1 vs. N.n3	0,3047	
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0005	
	V19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	P18	N.n1 vs. N.n2	<0,0001	
		R.s1 vs. R.s3	0,0001		N.n1 vs. N.n3	<0,0001	
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0049	
	I19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	I18	N.n1 vs. N.n2	<0,0001	
		R.s1 vs. R.s3	0,1550		N.n1 vs. N.n3	0,3047	
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0005	
	P19	R.s1 vs. R.s2	0,0208	V19	N.n1 vs. N.n2	0,4057	
		R.s1 vs. R.s3	0,0002		N.n1 vs. N.n3	0,0233	
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,4694	
	O18	N.b1 vs. N.b2	0,0004	I19	N.n1 vs. N.n2	0,1130	
		N.b1 vs. N.b3	0,0133		N.n1 vs. N.n3	0,0026	
		N.b2 vs. N.b3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,2447	
	I18	N.b1 vs. N.b2	0,2502	P19	N.n1 vs. N.n2	>0,9999	
		N.b1 vs. N.b3	>0,9999		N.n1 vs. N.n3	>0,9999	
		N.b2 vs. N.b3	0,2950		N.n2 vs. N.n3	>0,9999	
	P18	N.b1 vs. N.b2	<0,0001				
		N.b1 vs. N.b3	0,1758				
		N.b2 vs. N.b3	<0,0001				
	TFC	V18	R.s1 vs. R.s2	0,0146	P18	N.b1 vs. N.b2	0,0093
			R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.b1 vs. N.b3	0,0206
			R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	>0,9999
I18		R.s1 vs. R.s2	0,0012	V19	N.b1 vs. N.b2	0,0003	
		R.s1 vs. R.s3	0,0464		N.b1 vs. N.b3	0,2125	
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	0,0036	
P18		R.s1 vs. R.s2	0,0009	I19	N.b1 vs. N.b2	>0,9999	
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.b1 vs. N.b3	0,0047	
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	0,0062	

	V19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	I18	N.n1 vs. N.n2	0,0005
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.n1 vs. N.n3	0,1399
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0128
	I19	R.s1 vs. R.s2	0,1441	V19	N.n1 vs. N.n2	0,0111
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.n1 vs. N.n3	>0,9999
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0177
	O18	N.b1 vs. N.b2	0,1630	I19	N.n1 vs. N.n2	0,2180
		N.b1 vs. N.b3	0,0408		N.n1 vs. N.n3	>0,9999
		N.b2 vs. N.b3	0,0015		N.n2 vs. N.n3	0,0701
	I18	N.b1 vs. N.b2	>0,9999	P19	N.n1 vs. N.n2	0,8083
		N.b1 vs. N.b3	0,1122		N.n1 vs. N.n3	0,1022
		N.b2 vs. N.b3	0,0386		N.n2 vs. N.n3	0,6585
DPPH	V18	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	P18	N.b1 vs. N.b2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.b1 vs. N.b3	>0,9999
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	<0,0001
	I18	R.s1 vs. R.s2	0,0005	V19	N.b1 vs. N.b2	0,1511
		R.s1 vs. R.s3	0,0001		N.b1 vs. N.b3	0,0076
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	0,1338
	P18	R.s1 vs. R.s2	0,0002	I19	N.b1 vs. N.b2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	0,0017		N.b1 vs. N.b3	0,0140
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	0,0014
	V19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	I18	N.n1 vs. N.n2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	0,6793		N.n1 vs. N.n3	<0,0001
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,1857
	I19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	P18	N.n1 vs. N.n2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.n1 vs. N.n3	<0,0001
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0006
	P18	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	V19	N.n1 vs. N.n2	0,0161
		R.s1 vs. R.s3	0,0119		N.n1 vs. N.n3	>0,9999
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0162
	O18	N.b1 vs. N.b2	0,0026	I19	N.n1 vs. N.n2	0,2082
		N.b1 vs. N.b3	>0,9999		N.n1 vs. N.n3	0,9224
		N.b2 vs. N.b3	0,0013		N.n2 vs. N.n3	0,0479
	I18	N.b1 vs. N.b2	0,0014	P19	N.n1 vs. N.n2	>0,9999
		N.b1 vs. N.b3	<0,0001		N.n1 vs. N.n3	0,0109
		N.b2 vs. N.b3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0060
CUPRAC	V18	R.s1 vs. R.s2	0,1312	P18	N.b1 vs. N.b2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.b1 vs. N.b3	0,0369
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	<0,0001
	I18	R.s1 vs. R.s2	0,0002	V19	N.b1 vs. N.b2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	0,0072		N.b1 vs. N.b3	0,0236
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	<0,0001

	P18	R.s1 vs. R.s2	0,0725	I19	N.b1 vs. N.b2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.b1 vs. N.b3	<0,0001
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.b2 vs. N.b3	0,0004
	V19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	P18	N.n1 vs. N.n2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	0,9891		N.n1 vs. N.n3	<0,0001
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0002
	I19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	V19	N.n1 vs. N.n2	<0,0001
		R.s1 vs. R.s3	<0,0001		N.n1 vs. N.n3	0,0006
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	<0,0001
	P19	R.s1 vs. R.s2	<0,0001	I19	N.n1 vs. N.n2	0,0286
		R.s1 vs. R.s3	0,0206		N.n1 vs. N.n3	0,9180
		R.s2 vs. R.s3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0054
	O18	N.b1 vs. N.b2	<0,0001	P19	N.n1 vs. N.n2	<0,0001
		N.b1 vs. N.b3	0,0370		N.n1 vs. N.n3	0,1928
		N.b2 vs. N.b3	<0,0001		N.n2 vs. N.n3	0,0008
	I18	N.b1 vs. N.b2	0,0437			
		N.b1 vs. N.b3	0,1317			
		N.b2 vs. N.b3	>0,9999			

4. ANÁLISIS DE CORRELACIONES.

4.1. Correlación entre ensayos

Tabla A18. Correlación de Pearson entre ensayos.

Correlación de Pearson ajustado a un 95% de confianza						
	TPC (R²)	TPC (p)	TFC (R²)	TFC (p)	DPPH (R²)	DPPH (p)
TPC R.s	-	-	-	-	-	-
TFC R.s	0,8403	0,0014	-	-	-	-
DPPH R.s	0,2855	0,1725	0,3693	0,1100	-	-
CUPRAC R.s	0,4455	0,0705	0,6306	0,0186	0,6109	0,0220
TPC N.b	-	-	-	-	-	-
TFC N.b	0,4565	0,0957	-	-	-	-
DPPH N.b	0,0549	0,6131	0,0606	0,5947	-	-
CUPRAC N.b	0,9523	0,0002	0,3580	0,1558	0,0896	0,5143
TPC N.n	-	-	-	-	-	-
TFC N.n	0,6887	0,0209	-	-	-	-
DPPH N.n	0,2337	0,2717	0,0672	0,5745	-	-
CUPRAC N.n	0,9825	<0,0001	0,6876	0,0211	0,1806	0,3420
TPC W.t	-	-	-	-	-	-
TFC W.t	0,4509	0,1442	-	-	-	-
DPPH W.t	0,0276	0,7531	0,1251	0,4915	-	-
CUPRAC W.t	0,8938	0,0044	0,7577	0,0241	0,0667	0,6211

4.2. Correlaciones entre los ensayos y las variables ambientales.

Todas las correlaciones de Pearson entre ensayos y variables ambientales se ajustaron a un 95% de confianza.

Tabla A19. Correlación de Pearson entre los ensayos de las especies y las temperaturas.

	T _{media} 5 días (R ²)	T _{media} 5 días (p)	T _{media} 10 días (R ²)	T _{media} 10 días (p)	T _{media} 30 días (R ²)	T _{media} 30 días (p)	T Bajas (R ²)	T Bajas (p)	T Altas (R ²)	T Altas (p)
TPC R.s	0,0162	0,7641	0,0002	0,9712	0,0052	0,8659	0,0096	0,8179	0,0069	0,8446
TFC R.s	0,0095	0,8184	0,0789	0,5003	0,0202	0,7373	0,0040	0,8819	0,0674	0,5347
DPPH R.s	0,0338	0,6631	0,0223	0,7244	0,0024	0,9074	0,0011	0,9376	0,0015	0,9272
CUPRAC R.s	1,178e-5	0,9936	0,0019	0,9189	0,0054	0,8624	0,0219	0,7263	0,0001	0,9792
TPC N.b	0,4740	0,0872	0,4702	0,0890	0,4564	0,0958	0,4692	0,0895	0,5545	0,0548
TFC N.b	0,3801	0,1403	0,5234	0,0661	0,4860	0,0817	0,4567	0,0956	0,5204	0,0673
DPPH N.b	0,3770	0,1424	0,2921	0,2104	0,2734	0,2286	0,2184	0,2903	0,1600	0,3739
CUPRAC N.b	0,5288	0,0640	0,5371	0,0610	0,5154	0,0692	0,5127	0,0703	0,6092	0,0384
TPC N.n	0,0152	0,7923	0,0247	0,7364	0,0177	0,7764	0,0280	0,7200	0,0864	0,5223
TFC N.n	0,0059	0,8696	8,368e-5	0,9845	0,0031	0,9060	0,0030	0,9066	0,0049	0,8814
DPPH N.n	0,2708	0,2312	0,1507	0,3896	0,1620	0,3706	0,2086	0,3029	0,1923	0,3251
CUPRAC N.n	0,0326	0,6986	0,0570	0,6060	0,0446	0,6496	0,0570	0,6062	0,1387	0,4106
TPC W.t	0,4049	0,1743	0,2031	0,3698	0,2707	0,2900	0,2452	0,3179	0,0732	0,6041
TFC W.t	5,039e-5	0,9894	0,0107	0,8457	0,0003	0,9740	0,0030	0,9176	0,0738	0,6025
DPPH W.t	0,1124	0,5160	0,1721	0,4135	0,1917	0,3852	0,1558	0,4387	0,1402	0,4646
CUPRAC W.t	0,1746	0,4097	0,0628	0,6319	0,1084	0,5240	0,0219	0,5706	0,0030	0,9183

Tabla A20. Correlación entre los ensayos intraespecie y las temperaturas.

	Sitio	T _{media} 5 días (R ²)	T _{media} 5 días (p)	T _{media} 10 días (R ²)	T _{media} 10 días (p)	T _{media} 30 días (R ²)	T _{media} 30 días (p)	Bajas T (R ²)	Bajas T (p)	Altas T (R ²)	Altas T (p)
TPC	R.s1	0,0008	0,9456	0,0002	0,9749	0,0004	0,9622	1,608e-5	0,9925	0,0112	0,8027
	R.s2	0,0909	0,4681	0,0096	0,8178	0,0290	0,6869	0,0305	0,6769	4,179e-5	0,9879
	R.s3	0,1050	0,5310	0,1386	0,4673	0,1359	0,4720	0,1536	0,4422	0,2471	0,3158
	N.b1	0,7243	0,0152	0,7846	0,0080	0,7681	0,0096	0,7724	0,0092	0,8670	0,0023
	N.b2	0,1552	0,5116	0,2112	0,4362	0,1419	0,5320	0,1308	0,5497	0,2211	0,4242
	N.b3	0,4055	0,1739	0,4641	0,1362	0,4188	0,1648	0,4145	0,1677	0,5548	0,0893
	N.n1	0,0861	0,5231	0,1182	0,4503	0,1076	0,4726	0,1297	0,4274	0,2327	0,2729
	N.n2	0,0029	0,9081	0,0038	0,8961	0,0073	0,8551	0,0017	0,9295	0,0036	0,8988
	N.n3	0,0382	0,7529	0,0685	0,6706	0,0519	0,7125	0,0548	0,7048	0,1537	0,5139
	W.t	0,4049	0,1743	0,2031	0,3698	0,2707	0,2900	0,2452	0,3179	0,0732	0,6041
TFC	R.s1	0,0689	0,5299	0,1774	0,2987	0,1251	0,3901	0,1138	0,4139	0,2463	0,2109
	R.s2	0,0147	0,7752	0,0220	0,7257	1,520e-5	0,9927	0,0063	0,8522	0,0165	0,7615
	R.s3	0,1949	0,4568	0,2188	0,4269	0,2196	0,4260	0,2302	0,4134	0,3172	0,3229
	N.b1	0,2598	0,2426	0,3728	0,1453	0,3352	0,1732	0,2934	0,2091	0,2939	0,2087

	N.b2	0,3518	0,2918	0,4470	0,2173	0,3472	0,2958	0,3475	0,2955	0,4956	0,1845
	N.b3	0,1029	0,5353	0,1896	0,3881	0,1855	0,3938	0,1517	0,4453	0,1757	0,4081
	N.n1	0,0120	0,8367	0,0286	0,7487	0,0203	0,7877	0,0120	0,8365	0,0276	0,7531
	N.n2	0,01996	0,7626	0,0228	0,7464	0,0332	0,6958	0,0201	0,7619	0,0039	0,8939
	N.n3	0,01010	0,8722	0,0014	0,9519	0,0039	0,9203	0,0057	0,9039	0,0044	0,9152
	W.t	5,039e-5	0,9894	0,0107	0,8457	0,0003	0,9740	0,0030	0,9176	0,0738	0,6025
DPPH	R.s1	0,0435	0,6201	0,0060	0,8551	0,0032	0,8939	0,0009	0,9453	0,0017	0,9226
	R.s2	0,1267	0,3868	0,1109	0,4202	0,2061	0,2585	0,3186	0,1450	0,2568	0,1999
	R.s3	0,02849	0,7492	0,0229	0,7750	0,0127	0,8315	0,0069	0,8755	0,0288	0,7478
	N.b1	0,3016	0,2017	0,2798	0,2221	0,2549	0,2479	0,1992	0,3154	0,1516	0,3879
	N.b2	0,0050	0,9104	0,0001	0,9856	0,0001	0,9868	0,0019	0,9450	0,0194	0,8234
	N.b3	0,5706	0,0824	0,3265	0,2362	0,3737	0,1972	0,3360	0,2279	0,1809	0,4005
	N.n1	0,5567	0,0541	0,4843	0,0825	0,4959	0,0773	0,5549	0,0547	0,6030	0,0400
	N.n2	0,1077	0,4723	0,0256	0,7319	0,0339	0,6926	0,0583	0,6019	0,0369	0,6797
	N.n3	0,3510	0,2925	0,2172	0,4289	0,2101	0,4375	0,2383	0,4041	0,2030	0,4463
	W.t	0,1124	0,5160	0,1721	0,4135	0,1917	0,3852	0,1558	0,4387	0,1402	0,4646
CUPRAC	R.s1	0,0060	0,8549	0,0044	0,8754	0,0054	0,8621	0,0107	0,8077	0,0304	0,6799
	R.s2	0,0509	0,5911	0,0167	0,7602	0,0622	0,5514	0,0962	0,4547	0,0235	0,7170
	R.s3	0,2437	0,3197	0,1123	0,5162	0,1238	0,4940	0,1010	0,5392	0,0550	0,6546
	N.b1	0,7199	0,0158	0,8305	0,0043	0,8176	0,0052	0,7863	0,0078	0,8588	0,0027
	N.b2	0,3205	0,3198	0,4112	0,2436	0,3205	0,3198	0,3096	0,3300	0,4540	0,2124
	N.b3	0,1171	0,5068	0,1420	0,4616	0,1456	0,4554	0,1479	0,4515	0,2246	0,3424
	N.n1	0,0686	0,5705	0,1380	0,4120	0,1081	0,4715	0,1081	0,4714	0,2330	0,2726
	N.n2	0,0006	0,9575	0,0020	0,9245	0,0018	0,9278	0,0002	0,9778	0,0065	0,8632
	N.n3	0,1634	0,5958	0,2426	0,5074	0,2089	0,5429	0,2114	0,5402	0,3753	0,3874
	W.t	0,1746	0,4097	0,0628	0,6319	0,1084	0,5240	0,0869	0,5706	0,0030	0,9183

Tabla A21. Correlación de Pearson entre los ensayos de las especies y las precipitaciones.

	Agua ac. 5 días (R ²)	Agua ac. 5 días (p)	Agua prom. 5 días (R ²)	Agua prom. 5 días (p)	Agua ac. 10 días (R ²)	Agua ac. 10 días (p)	Agua ac. 30 días (R ²)	Agua ac. 30 días (p)	Agua prom. 30 días (R ²)	Agua prom. 30 días (p)
TPC R.s	0,0300	0,6817	0,0475	0,6042	0,0023	0,9110	0,0260	0,7032	0,0771	0,5056
TFC R.s	0,1340	0,3725	0,1668	0,3151	0,0213	0,7300	0,2850	0,1729	0,3703	0,1094
DPPH R.s	0,6854	0,0112	0,7670	0,0044	0,4566	0,0659	0,0123	0,7938	0,0053	0,8634
CUPRAC R.s	0,3385	0,1303	0,4267	0,0790	0,1154	0,4104	0,0156	0,7680	0,0356	0,6544
TPC N.b	0,0413	0,6622	0,0430	0,6555	7,678e-5	0,9851	0,1877	0,3315	0,2399	0,2645
TFC N.b	0,0560	0,6094	0,0546	0,6141	0,0006	0,9593	0,6486	0,0288	0,6654	0,0253
DPPH N.b	0,3002	0,2029	0,2996	0,2035	0,2586	0,2438	0,0192	0,7668	0,0046	0,8857
CUPRAC N.b	0,0768	0,5474	0,0791	0,5412	0,0071	0,8577	0,1007	0,4880	0,1488	0,3927
TPC N.n	0,0239	0,7406	0,0251	0,7345	0,0952	0,5008	0,0617	0,5911	0,1135	0,4600
TFC N.n	0,0001	0,9820	6,951e-5	0,9858	0,3829	0,1385	0,1558	0,3808	0,1869	0,3327
DPPH N.n	0,3362	0,1724	0,3390	0,1702	0,2029	0,3104	0,1339	0,4196	0,1247	0,4371
CUPRAC N.n	0,0087	0,8427	0,0094	0,8360	0,0960	0,4989	0,0868	0,5212	0,1524	0,3865
TPC W.t	0,0003	0,9728	0,0003	0,9746	0,2289	0,3371	0,0478	0,6774	0,0966	0,5488
TFC W.t	0,2204	0,3475	0,2238	0,3433	0,0002	0,9774	0,1286	0,4852	0,2018	0,3715
DPPH W.t	0,6406	0,0558	0,6387	0,0564	0,3356	0,2283	0,0005	0,9673	0,0029	0,9193
CUPRAC W.t	0,0344	0,7248	0,0353	0,7214	0,0944	0,5536	0,0609	0,6374	0,1246	0,4926

Tabla A22. Correlación entre los ensayos intraespecie y las precipitaciones.

Ensayo	Sitio	Agua caída ac. 5 días (R ²)	Agua caída ac. 5 días (p)	Agua caída ac. 10 días (R ²)	Agua caída ac. 10 días (p)	Agua caída ac. 30 días (R ²)	Agua caída ac. 30 días (p)	Agua caída prom. 5 días (R ²)	Agua caída prom. 5 días (p)	Agua caída prom. 30 días (R ²)	Agua caída prom. 30 días (p)
TPC	R.s1	0,0013	0,9319	0,0574	0,5676	0,0359	0,6532	0,0026	0,9044	0,0052	0,8658
	R.s2	5,43e-5	0,9862	0,0128	0,7898	0,0041	0,8804	0,0008	0,9470	0,0352	0,6563
	R.s3	0,0019	0,9349	0,0570	0,6488	0,0073	0,8726	0,0015	0,9413	0,07347	0,6034
	N.b1	0,0228	0,7467	0,0634	0,5860	0,2303	0,2758	0,0241	0,7395	0,2992	0,2039
	N.b2	0,1805	0,4758	0,0530	0,7096	0,6637	0,0931	0,1836	0,4716	0,6983	0,0780
	N.b3	0,0032	0,9149	0,0303	0,7416	0,0181	0,7995	0,0037	0,9083	0,04818	0,6760
	N.n1	0,0131	0,8068	0,0220	0,7512	0,0311	0,7053	0,0141	0,7997	0,08529	0,5251
	N.n2	0,0505	0,6282	0,1086	0,4704	0,1162	0,4544	0,0516	0,6241	0,1433	0,4023
	N.n3	0,0074	0,8904	0,1636	0,4994	0,0409	0,7444	0,0081	0,8856	1,17e-5	0,9956
W.t	0,0003	0,9728	0,2289	0,3371	0,0478	0,6774	0,0003	0,9746	0,0966	0,5488	
TFC	R.s1	0,0016	0,9250	0,0232	0,7186	0,1803	0,2944	0,0055	0,8609	0,2980	0,1616
	R.s2	0,0228	0,7209	0,0005	0,9573	0,2853	0,1727	0,0370	0,6479	0,3639	0,1134
	R.s3	0,0086	0,8823	0,0676	0,6727	0,0096	0,8751	0,0068	0,8953	0,0899	0,6241
	N.b1	0,0329	0,6973	0,0353	0,6866	0,6783	0,0228	0,0325	0,6990	0,6019	0,0403
	N.b2	0,2693	0,3703	0,0008	0,9640	0,6682	0,0910	0,2746	0,3647	0,7485	0,0582
	N.b3	0,5325	0,0997	0,4347	0,1544	0,0466	0,6812	0,5299	0,1010	0,0648	0,6265
	N.n1	0,0949	0,5525	0,4417	0,1499	0,1691	0,4180	0,0941	0,5544	0,1649	0,4243
	N.n2	0,0579	0,6033	0,0658	0,5788	0,2395	0,2649	0,0586	0,6009	0,2313	0,2745
	N.n3	0,0079	0,8870	0,5567	0,1476	0,1950	0,4566	0,0075	0,8898	0,0630	0,6837
W.t	0,2204	0,3475	0,0002	0,9774	0,1286	0,4852	0,2238	0,3433	0,2018	0,3715	
DPPH	R.s1	0,2824	0,1753	0,1204	0,3997	0,1307	0,3789	0,3223	0,1422	0,0974	0,4518
	R.s2	0,5622	0,0322	0,3327	0,1344	0,1184	0,4040	0,6589	0,0144	0,1261	0,3881
	R.s3	0,3153	0,2462	0,0253	0,7636	0,2457	0,3174	0,3172	0,2445	0,1359	0,4721
	N.b1	0,2687	0,2333	0,5198	0,0675	0,0045	0,8868	0,2676	0,2344	0,0002	0,9789
	N.b2	0,0366	0,7578	3,39e-6	0,9977	0,3734	0,2736	0,0350	0,7631	0,2169	0,4293
	N.b3	0,0412	0,6997	0,0548	0,6552	0,0369	0,7155	0,0414	0,6991	0,0638	0,6291
	N.n1	0,1486	0,3931	0,1415	0,4056	0,1410	0,4065	0,1519	0,3874	0,1867	0,3330
	N.n2	0,2523	0,2507	0,0933	0,5054	0,1031	0,4826	0,2536	0,2493	0,0743	0,5544
	N.n3	0,5749	0,1374	0,6876	0,0825	0,0258	0,7963	0,5779	0,1358	0,0139	0,8504
W.t	0,6406	0,0558	0,3356	0,2283	0,0005	0,9673	0,6387	0,0564	0,0029	0,9193	
CUPRAC	R.s1	0,0008	0,9485	0,0012	0,9339	0,0183	0,7493	0,0002	0,9719	0,0004	0,9620
	R.s2	0,5798	0,0282	0,1112	0,4196	0,0281	0,6914	0,5783	0,0285	0,0095	0,8181
	R.s3	0,1654	0,4236	0,0021	0,9306	0,0621	0,6340	0,1653	0,4238	0,1002	0,5409
	N.b1	0,0071	0,8575	0,1329	0,4214	0,0690	0,5694	0,0077	0,8512	0,1172	0,4523
	N.b2	0,1287	0,5533	0,0251	0,7993	0,5081	0,1766	0,1327	0,5466	0,5887	0,1300
	N.b3	0,0098	0,8524	0,0649	0,6263	0,1191	0,5029	0,0091	0,8574	0,0497	0,6710
	N.n1	0,0173	0,7788	0,0387	0,6726	0,0242	0,7389	0,0183	0,7722	0,0775	0,5454
	N.n2	0,0041	0,8921	0,1910	0,3268	0,1505	0,3898	0,0037	0,8967	0,1765	0,3481
	N.n3	0,0266	0,8369	0,0359	0,8106	0,0002	0,9877	0,0283	0,8317	0,0376	0,8060
W.t	0,0344	0,7248	0,0944	0,5536	0,0609	0,6374	0,0353	0,7214	0,1246	0,4926	

Tabla A23. Correlación de Pearson entre los ensayos de las especies y la radiación UV-B.

	IUV ac. 5 días (R ²)	IUV ac. 5 días (p)	IUV ac. 10 días (R ²)	IUV ac. 10 días (p)	IUV ac. 30 días (R ²)	IUV ac. 30 días (p)
TPC R.s	0,0205	0,7352	0,0211	0,7318	0,0185	0,7483
TFC R.s	0,2300	0,2291	0,2352	0,2232	0,1998	0,2668
DPPH R.s	0,1166	0,4078	0,0927	0,4636	0,0967	0,4534
CUPRAC R.s	0,1265	0,3873	0,1054	0,4326	0,0788	0,5006
TPC N.b	0,5809	0,0464	0,5657	0,0512	0,5926	0,0429
TFC N.b	0,7112	0,0171	0,7334	0,0139	0,6380	0,0312
DPPH N.b	0,2060	0,3063	0,1988	0,3160	0,2312	0,2747
CUPRAC N.b	0,5111	0,0710	0,5047	0,0736	0,5741	0,0485
TPC N.n	0,0855	0,5246	0,0796	0,5399	0,0843	0,5277
TFC N.n	0,0498	0,6306	0,0461	0,6439	0,0251	0,7342
DPPH N.n	0,3549	0,1581	0,3128	0,1918	0,3254	0,1811
CUPRAC N.n	0,1218	0,4430	0,1187	0,4492	0,1248	0,4370
TPC W.t	0,1047	0,5316	0,0898	0,5639	0,1085	0,5237
TFC W.t	0,0457	0,6843	0,0465	0,6817	0,0637	0,6294
DPPH W.t	0,0963	0,5494	0,1059	0,5292	0,0871	0,5703
CUPRAC W.t	0,0212	0,7831	0,0166	0,8078	0,0153	0,8156

IUV ac.10 días: Índice de radiación UV-B acumulado durante los diez días anteriores a cada muestreo.

IUV ac.30 días: Índice de radiación UV-B acumulado durante los diez días anteriores a cada muestreo.

Tabla A24. Correlación entre los ensayos intraespecie y la radiación UV-B.

Ensayo	Sitio	IUV ac. 5 días (R ²)	IUV ac. 5 días (p)	IUV ac. 10 días (R ²)	IUV ac. 10 días (p)	IUV ac. 30 días (R ²)	IUV ac. 30 días (p)
TPC	R.s1	7,105e-7	0,9984	5,275e-5	0,9864	0,0010	0,9397
	R.s2	0,0245	0,7111	0,0169	0,7591	0,0114	0,8014
	R.s3	0,1200	0,5012	0,1229	0,4957	0,1536	0,4422
	N.b1	0,7403	0,0129	0,7471	0,0121	0,8146	0,0054
	N.b2	0,5253	0,1660	0,5246	0,1664	0,4367	0,2247
	N.b3	0,3654	0,2037	0,3578	0,2098	0,4399	0,1510

	N.n1	0,1276	0,4315	0,1275	0,4318	0,1605	0,3731
	N.n2	0,0487	0,6343	0,0387	0,6723	0,0263	0,7284
	N.n3	0,0264	0,7942	0,0265	0,7937	0,0555	0,7027
	W.t	0,1047	0,5316	0,0898	0,5639	0,1085	0,5237
TFC	R.s1	0,2180	0,2434	0,2351	0,2233	0,2498	0,2073
	R.s2	0,0566	0,5704	0,0711	0,5234	0,0500	0,5944
	R.s3	0,1951	0,4565	0,1978	0,4530	0,2277	0,4164
	N.b1	0,5296	0,0637	0,5528	0,0554	0,4464	0,1009
	N.b2	0,7489	0,0581	0,7526	0,0567	0,7003	0,0771
	N.b3	0,1705	0,4158	0,1838	0,3963	0,1465	0,4538
	N.n1	0,1214	0,4985	0,1199	0,5013	0,0708	0,6104
	N.n2	0,0461	0,6439	0,0354	0,6863	0,0137	0,8023
	N.n3	0,0174	0,8324	0,0167	0,8361	0,0069	0,8939
	W.t	0,04568	0,6843	0,0465	0,6817	0,0637	0,6294
DPPH	R.s1	0,0478	0,6029	0,0301	0,6810	0,0405	0,6329
	R.s2	0,0353	0,6558	0,0464	0,6085	0,0603	0,5579
	R.s3	1,445e-5	0,9943	1,209e-5	0,9948	0,0084	0,8631
	N.b1	0,1040	0,4804	0,1099	0,4677	0,1543	0,3834
	N.b2	0,1013	0,6018	0,0947	0,6144	0,0352	0,7626
	N.b3	0,2222	0,3453	0,1926	0,3840	0,2390	0,3251
	N.n1	0,5734	0,0487	0,5492	0,0567	0,6198	0,0356
	N.n2	0,2053	0,3072	0,1660	0,3643	0,1478	0,3945
	N.n3	0,2301	0,4135	0,2030	0,4464	0,2742	0,3651
	W.t	0,0963	0,5494	0,1059	0,5292	0,0871	0,5703
CUPRAC	R.s1	0,0219	0,7266	0,0178	0,7527	0,0245	0,7115
	R.s2	0,0167	0,7605	0,0181	0,7511	0,0082	0,8309
	R.s3	0,1144	0,5120	0,0947	0,5530	0,1079	0,5249
	N.b1	0,5050	0,0735	0,5330	0,0625	0,6478	0,0290
	N.b2	0,6653	0,0923	0,6680	0,0911	0,6192	0,1142
	N.b3	0,0167	0,8070	0,0171	0,8049	0,0542	0,6572
	N.n1	0,0883	0,5176	0,0963	0,4982	0,1335	0,4203
	N.n2	0,0814	0,5351	0,0676	0,5734	0,0386	0,6728
	N.n3	0,1454	0,6187	0,1464	0,6174	0,2110	0,5406
	W.t	0,0212	0,7831	0,0166	0,8078	0,0153	0,8156

Tabla A25. Correlación entre variables ambientales.

	T media 30 días (R²)	T media 30 días (p)	Agua ac. 30 días (R²)	Agua ac. 30 días (p)	IUV ac. 30 días (R²)	IUV ac. 30 días (p)
T media 5 días	0,9511	<0,0001	0,1457	0,3508	0,8027	0,0026
T media 10 días	0,9676	<0,0001	0,2725	0,1845	0,8634	0,0008
T media 30 días	-	-			-	-
Bajas T	0,9740	<0,0001	0,1890	0,2818	0,7088	0,0087
Altas T	0,9552	<0,0001	0,2715	0,1854	0,7709	0,0041

Agua ac. 5 días	0,0022	0,9117	9,019e-6	0,9944	0,03248	0,6693
Agua ac. 10 días	0,0529	0,5838	0,0226	0,7226	0,1889	0,2818
Agua ac. 30 días	0,2080	0,2561	-	-	0,4532	0,0672
IUV ac. 5 días	0,6164	0,0210	0,5100	0,0466	0,9529	<0,0001
IUV ac. 10 días	0,6560	0,0148	0,5381	0,0383	0,9678	<0,0001
IUV ac. 30 días	0,7890	0,0032	0,4532	0,0672	0,7890	0,0032

Tabla A26. Promedios del contenido de metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante de las especies.

Especie	TPC [mg GAE/g dm] ± DS	TFC [mg EC/g dm] ± DS	DPPH-IC₅₀ [µg/ml] ± DS	CUPRAC [mg GAE/g dm] ± DS
R.s	188,5 ± 40,4	205,5 ± 51,6	93,8 ± 24,0	134,0 ± 23,2
N.b	228,0 ± 47,4	36,9 ± 8,5	40,1 ± 7,1	186,1 ± 35,4
N.n	219,3 ± 42,1	101,6 ± 11,6	61,5 ± 13,2	147,4 ± 26,1
W.t	461,5 ± 56,9	203,5 ± 27,8	32,1 ± 1,7	326,9 ± 41,3

Tabla A27. Rangos de respuesta de las especies.

Especie	Rango de concentración			
	TPC [mg GAE/g dm]	TFC [mg EC/g dm]	DPPH IC₅₀[µg/ml]	CUPRAC [mg GAE/g dm]
R.s	126,2 - 296,8	102,1-303,3	133,9-53,3	100,5-168,4
N.b	99,6-292,3	22,1-53,1	56,3-26,9	79,1-235,3
N.n	141,8-326,9	83,6-123,7	91,6-47,4	104,1-217,1
W.t	388,1-539,6	168,3-238,4	35,2-30,3	269,8-391,6

Tabla A28. Variación del contenido de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante.

Especie	ΔTPC	ΔTFC	ΔDPPH	ΔCUPRAC
R.s	170,6	201,2	80,6	67,9
N.b	192,7	31,0	29,4	156,2
N.n	185,1	40,1	44,2	113,0
W.t	151,5	70,1	4,9	121,8