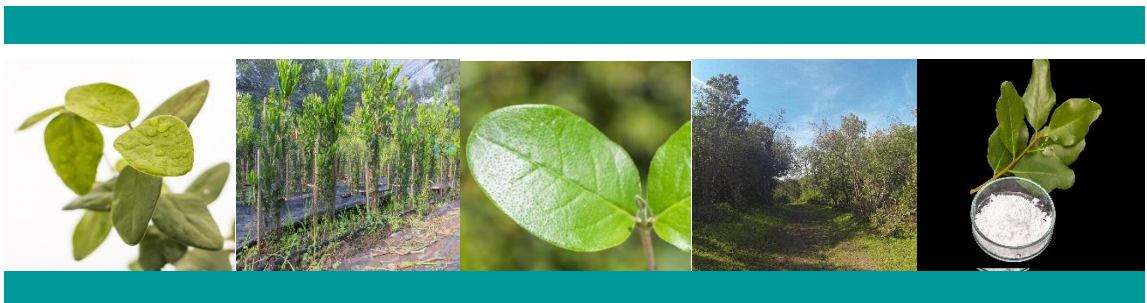




055/2013

Bases para el aprovechamiento sustentable de las hojas medicinales de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba* según parámetros biométricos y químicos.





055/2013

Bases para el aprovechamiento sustentable de las hojas medicinales de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba* según parámetros biométricos y químicos.

financiado por

Fondo de Investigación del Bosque Nativo

Investigador(a) Responsable

[Bruce Kennedy, Cassels N.¹, Doctor en Química]

Co-investigador (es)

[Augusto Carlos, González V.², Master en Ing. Ambiental]

Co-investigador (es)

[Sebastián Esteban, Castro S.³, Ingeniero Forestal]

Institución Patrocinante

[Universidad de Chile]

¹ [Ciencias, Universidad de Chile]

² [Independiente]

³ [Ciencias, Universidad de Chile]

AGRADECIMIENTOS

A todos los estudiantes de pre y post-grado del Laboratorio de Química Biodinámica de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile. En especial a los colaboradores Dr. Cristián Tirapegui Calquín, Dr. (c) Cristián Suárez Rozas y Mg. (c) Williams Acevedo Fuentes. También a la empresa SAPHYCHEM, en especial a Gonzalo Fuentes Barros, Ing. Forestal. Al Centro CEPEDQ de la U. de Chile, en especial a Andrés Barriga y a la Unidad Central de Instrumentación de la P. U. Católica (UCI-PUC), en especial al Dr. Claudio López y a Leonel Liberona. Al personal administrativo de la U. de Chile, en especial a Juan Carlos Hidalgo y Víctor Sade.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	i
Tabla de Contenido	2
Índice de Tablas	4
Índice de Gráficos.....	5
Resumen	9
1. Introducción	10
2. Marco teórico.....	12
3. Hipótesis.....	14
4. Objetivos	15
5. Metodología.....	16
5.1. Selección de individuos en poblaciones naturales de boldo.....	16
5.2 Colecta de muestras	19
5.2. Modelo experimental de la variación trimestral de los principios activos en hojas de individuos de <i>P. boldus</i> y <i>C. alba</i>	21
5.3. Modelo experimental influencia de la edad de las hojas en la concentración total de polifenoles y flavonoides para individuos de <i>Cryptocarya alba</i> y <i>Peumus boldus</i>	21
5.4. Análisis sensorial de infusiones de <i>Peumus boldus</i> y <i>Cryptocarya alba</i>	22
5.5. Cultivo de <i>Peumus boldus</i> y <i>Cryptocarya alba</i>	22
5.6. Modelo experimental de <i>Peumus boldus</i> y <i>Cryptocarya alba</i> bajo cultivo.	25
5.7. Biomasa aérea y arquitectura de los individuos de boldo y peumo bajo cultivo.	26
5.8. Implementación de la reforestación.	26
5.9. Planilla de costos.....	28
5.10. Análisis químicos.	28
5.11. Análisis Cromatográfico.	39
5.12. Análisis estadístico.....	46
6. Resultados	48
6.1. Contenido de principios activos en <i>C. alba</i> y <i>P. boldus</i>	48
6.2. Cuantificación de polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en otra población de <i>Peumus boldus</i> de María Pinto (R.M.) bajo manejo.....	55
6.3. Encuestas y catas de productos de <i>P. boldus</i> y <i>C. alba</i>	58

6.4 Cultivo medicinal de <i>Peumus boldus</i> y <i>Cryptocarya alba</i>	60
6.5. Reforestación.....	67
6.6. Costos de establecimiento de cultivo medicinal de boldo y peumo. .	78
6.7. Análisis del cultivo de boldo.	80
6.8. Difusión de Resultados.....	81
7. Discusión de resultados.....	89
8. Conclusiones	91
8.1. <i>Cryptocarya alba</i> Mol.	91
8.2. <i>Peumus boldus</i> Mol.....	92
9. Recomendaciones.....	95
Bibliografía	96
Anexos.....	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos experimentales de la variación de los principios activos en hojas de <i>C. alba</i> y <i>P. boldus</i> según sexo.	21
Tabla 2. Tratamientos experimentales según edad de la hoja.	21
Tabla 3. Tratamientos experimentales de plantas juveniles para principios activos, polifenoles totales y flavonoides totales.	25
Tabla 4. Método de separación isocrática.	39
Tabla 5. Método de separación en gradiente.	39
Tabla 6. Caracterización de los alcaloides de <i>Peumus boldus</i> por espectrometria de masas.	43
Tabla 7. Contenido total de polifenoles y flavonoides en las hojas de <i>C. alba</i>	48
Tabla 8. Contenido de polifenoles y flavonoides en <i>C. alba</i> según la edad.	49
Tabla 9. Polifenoles encontrados en las hojas de <i>C. alba</i> (ug/g DS).....	49
Tabla 10. Contenido de polifenoles totales por sector.	49
Tabla 11. Contenido de flavonoides totales por sexo y sector.	50
Tabla 12. Compuestos fenólicos encontrados en las hojas de <i>P. boldus</i> según el tipo de extracto (ug/g DS).	51
Tabla 13. Contenido de polifenoles y flavonoides en <i>P. boldus</i> según la edad.	52
Tabla 14. Concentración de alcaloides en hojas de <i>P. boldus</i> , según el sexo y la edad (ug/g DS).	52
Tabla 15. Contenido de polifenoles y flavonoides totales en hojas de <i>P. boldus</i> de distinto vástago.	53
Tabla 16. Compuestos fenólicos encontrados en las hojas de hembras de <i>P. boldus</i> según el tipo de vástago (ug/g DS).....	54
Tabla 17. Compuestos fenólicos encontrados en las hojas de machos de <i>P. boldus</i> (ug/g DS).....	54
Tabla 18. Contenido de alcaloides en hojas de <i>P. boldus</i> de distinto vástago.	55
Tabla 19. Evaluación del sabor de las infusiones.....	59
Tabla 20. Evaluación de olores.	59
Tabla 21. Parámetros de las hojas de <i>P. boldus</i> en individuos de 3,5 años.	61
Tabla 22. Parámetros de las hojas de <i>C. alba</i> en individuos de 3,5 años..	61
Tabla 23. Contenido de polifenoles y flavonoides en individuos de 2 años.	61

Tabla 24. Contenido de polifenoles y flavonoides en individuos de 3,5 años.	62
Tabla 25. Concentración de polifenoles en hojas de <i>P. boldus</i> (ug/g DS). 62	62
Tabla 26. Concentración de alcaloides en hojas de <i>P. boldus</i> (ug/g DS)... 63	63
Tabla 27. Concentración de alcaloides en hojas de <i>P. boldus</i> de diferentes poblaciones (ug/g DS)..... 64	64
Tabla 28. Concentración de alcaloides en hojas de <i>C. alba</i> cultivadas..... 65	65
Tabla 29. Parámetros biométricos en las hojas de cultivo de <i>C. alba</i> 66	66
Tabla 30. Parámetros biométricos en las hojas de cultivo de <i>P. boldus</i> 66	66
Tabla 31. Producción de hojas en individuos de 3,5 años..... 67	67
Tabla 32. Costo de instalación y mantención por tres años en la V Región. 69	69
Tabla 33. Costo de instalación y mantención por tres años. 70	70
Tabla 34. Concentración de alcaloides en la biomasa de <i>C. alba</i> (ug/g DS). 71	71
Tabla 35. Concentración de alcaloides en las cortezas de <i>C. alba</i> (ug/g DS) 72	72
Tabla 36. Concentración de alcaloides en las maderas de <i>C. alba</i> (ug/g DS). 73	73
Tabla 37. Polifenoles encontrados en las cortezas de <i>C. alba</i> (ug/g DS)... 74	74
Tabla 38. Distribución de alcaloides en la biomasa de <i>P. boldus</i> (%) 75	75
Tabla 39. Concentración de alcaloides en hojas de <i>P. boldus</i> según temporada..... 76	76
Tabla 40. Concentración de alcaloides en las maderas y cortezas de <i>P. boldus</i> (ug/g DS)..... 76	76
Tabla 41. Compuestos fenólicos encontrados en las maderas y cortezas de <i>P. boldus</i> (ug/g DS). 78	78
Tabla 42. Planilla de costos de establecimiento de cultivo de <i>P. boldus</i> y <i>C. alba</i> 78	78
Tabla 43. Análisis de sensibilidad del valor de la hoja de boldo..... 80	80
Tabla 44. Análisis de sensibilidad del rendimiento de boldo a los 15 años. 80	80
Tabla 45. Análisis de sensibilidad del horizonte del proyecto. 80	80

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Vista general de la cuesta Ibacache, comuna María Pinto.	17
Figura 2. Sitios de colecta de <i>P. boldus</i> y <i>C. alba</i>	17
Figura 3. Sitios de colecta de <i>P. boldus</i>	18
Figura 4. Sitios de colecta de peumo: Cuesta la Dormida (V Región), predio María Pinto (R.M.) y Curanipe (VII Región).	19
Figura 5. Imagen de la colecta de hojas de <i>C. alba</i> en el sitio Cuesta La Dormida.	20
Figura 6. Vástagos remanentes de una cepa de boldo ubicada en el Sector 1 de María Pinto.	20
Figura 7. Detalle de las hojas nuevas y viejas de <i>P. boldus</i>	22
Figura 8. Localización del cultivo, sector Lo Infante, comuna de San Bernardo (RM).	23
Figura 9. Preparación del terreno.	24
Figura 10. Diseño del ensayo de cultivo.	24
Figura 11. Implementación del cultivo.	25
Figura 12. Medición de parámetros morfométricos de las hojas de boldo y peumo.	26
Figura 13. Sitios de reforestación.	27
Figura 14. Reforestación ubicada en Leyda, V Región.	27
Figura 15. Reforestación ubicada en La Aurora de Curacaví, RM.	28
Figura 16. Cromatografía por columna de los alcaloides presentes en la corteza de <i>C. Alba</i> para la purificación de reticulina. A. Inicio de la cromatografía por columna. B. Cromatografía por columna en desarrollo. D. Cromatografía en capa fina de la subfracciones. E. Imagen de reticulina pura.	29
Figura 17. Espectro RMN 1H de reticulina aislada a partir de la corteza de <i>C. Alba</i> (CDCl ₃ , 400 MHz).	30
Figura 18. Espectro RMN 1H de laurotetanina obtenida a partir de la corteza de <i>C. Alba</i> (CDCl ₃ , 400 MHz).	31
Figura 19. Espectro RMN 13C de laurotetanina obtenida a partir de la corteza de <i>C. Alba</i> (CDCl ₃ , 400 MHz).	32
Figura 20. Espectro RMN DEPT 135 13C de laurotetanina (CDCl ₃ , 400 MHz).	33
Figura 21. Espectro RMN 2D 1H-13C NOESY de laurotetanina (CDCl ₃ , 400 MHz).	34

Figura 22. A. Cromatografía de placas de los alcaloides de hoja de peumo (izquierda) con un patrón de alcaloide interno de boldina (derecha). B. Análisis de los alcaloides de la hoja de peumo por HPLC-UV-ESI-MS.	35
Figura 23. Evaluación de la extracción para la cuantificación de polifenoles y flavonoides.	36
Figura 24. Diagrama general de los análisis de polifenoles y flavonoides totales.	37
Figura 25. Esquema de la cuantificación de alcaloides.....	38
Figura 26. Cromatograma de hoja UV y EIC m/z 328 (separación isocrática).	40
Figura 27. Peak 3, espectro de masas y fragmentación (separación isocrática).	40
Figura 28. Cromatograma de hoja UV y EIC m/z 328 (separación por gradiente).	41
Figura 29. Peak 4, espectro de masas y fragmentación (separación por gradiente).	42
Figura 30. Cromatograma de alcaloides de hoja de <i>Peumus boldus</i> por UHPLC.....	43
Figura 31. Cromatograma de los polifenoles presentes en <i>Cryptocarya alba</i> por UHPLC.	45
Figura 32. Contenido de polifenoles y flavonoides de diferentes infusiones con hoja de <i>P. boldus</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).	56
Figura 33. Capacidad antioxidante ABTS de diferentes infusiones con hoja de <i>P. boldus</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).	57
Figura 34. Capacidad antioxidante DPPH de diferentes infusiones con hoja de <i>P. boldus</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).	57
Figura 35. Capacidad antioxidante FRAP de diferentes infusiones con hoja de <i>P. boldus</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).	58
Figura 36. Preparación del sitio e inicio del ensayo.	60
Figura 37. Cultivo de <i>C. alba</i> y <i>P. boldus</i> a los 4 años.	60
Figura 38. Situación sin riego y con riego, marzo 2016.	67
Figura 39. Ensayo de restauración Quinta Región.....	68
Figura 40. Detalles de las plantas.....	69
Figura 41. Sector de reforestación, Región Metropolitana.	70

Figura 42. Concentración de polifenoles y flavonoides en 3 poblaciones de <i>C. alba</i>	74
Figura 43. Presentación del 14to Congreso Internacional de Etnofarmacología.....	81
Figura 44. Imagen del póster presentado en 14to Congreso Internacional de Etnofarmacología.	82
Figura 45. Presentación del IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia.	83
Figura 46. Imagen del resumen de la presentación en IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia.	84
Figura 47. Presentación V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales.....	85
Figura 48. Imagen del poster 1 presentado en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales.....	86
Figura 49. Imagen del poster 2 presentado en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales.....	87
Figura 50. Imagen del artículo "Phytochemical analysis of alkaloids from the chilean endemic tree <i>Cryptocarya alba</i> ".	88

RESUMEN

Boldo (*Peumus boldus*) y Peumo (*Cryptocarya alba*), son especies endémicas de Chile cuyo conocimiento medicinal de las hojas fue heredado de nuestros pueblos ancestrales. Ambas especies comparten territorio, tienen la capacidad de rebrotar y podrían cosecharse en la misma época. Los frutos de peumo tienen un potencial para producir harinas, aceites y aislar un compuesto llamado cryptofoliona, característico del género. Las hojas son una fuente importante de polifenoles, aceites esenciales e hidrolato. La corteza de taninos, material que alguna vez se utilizó. Todos estos factores transforman a peumo en un recurso muy atractivo y una gran alternativa productiva para la zona central.

Pocas especies nativas se comercializan en una escala importante, pero un interés reciente del público por los productos naturales y saludables sustenta la demanda de ciertas especies, como las hojas de boldo, biomasa de quillay, los frutos de maqui y calafate, hojas y frutos de murtila, en menor escala las partes aéreas de matico y bailahuén. Este proyecto buscó revertir este fenómeno, estudiando las bases que nos permitieran conocer las características de las hojas de boldo y peumo, establecer sus atributos, su variabilidad natural, el potencial de las poblaciones y el cultivo con fines medicinales de estas dos especies.

Fuera de nuestras fronteras, boldo se utiliza en más de un centenar de productos con mayor valor agregado, una proporción importante de estos son tinturas madres, cápsulas y comprimidos, para la digestión, favorecer la pérdida de peso, como fuente de antioxidantes, desintoxicar el organismo y principalmente su prestigio es como una especie medicinal capaz de proteger el hígado, donde compete con el cardo mariano y la alcachofa.

Actualmente el interés medicinal por boldo se focaliza en la concentración de catequina y boldina. En este proyecto se buscó implementar en el modelo de aprovechamiento de la biomasa de boldo estos objetivos productivos. Se estudió la composición de los diferentes órganos, también según la edad de la hoja, el sexo de los individuos, época colecta y la procedencia de las hojas.

1. Introducción

Chile tiene una industria forestal potente pero con pocas empresas que participan, la materia prima proviene principalmente de las plantaciones de pino y eucaliptus que representan 2,5 MM de hectáreas, y focalizan las industrias en la zona centro sur del país (Valdebenito, 2009). Durante el 2015 la exportación de productos forestales alcanzó los USD 6.000.000.000 donde los principales productos son la pulpa, madera aserrada, tableros y molduras (INFOR, 2015). En todo este gran escenario productivo la participación del bosque nativo es marginal, a pesar que posee una cobertura nacional de 13,6 millones de hectáreas (Valdebenito, 2009; INFOR, 2015). Se estima que alrededor de un 2% de los productos exportados provienen del bosque nativo, y en el mercado interno el principal uso de este recurso es la leña, su propiedad en un porcentaje importante está en manos de privados (CIFAG, 2013). En cuanto a los productos tradicionales del bosque nativo, los maderables han tenido una caída dramática desde el año 2000 en adelante, pasando de exportar USD 50 MM a 5 MM en el 2014, donde la lenga (*Nothofagus pumilio*) acapara la oferta representando el 80% (INFOR, 2015).

Los productos forestales no madereros (PFNM) son ejemplos del potencial que tiene nuestra flora y significaron una exportación de USD 83 MM en el 2014 (INFOR, 2015). Para el año 2020 se espera que la exportación de los principales productos llegue a los USD 100 MM y cuenten con modelos de aprovechamiento sustentable (Política forestal 2015-2035). En muchos casos, estos recursos naturales están cargados de historia, de conocimiento etnofarmacológico y reflejan la cultura de cada zona (INFOR, 2011). Otro aspecto interesante, es que se pueden aprovechar de manera sustentable pudiendo beneficiar a miles de medianos y pequeños propietarios (Tacón, 2004; INFOR, 2009). El PFNM más destacado es el fruto de rosa mosqueta, una especie asilvestrada con gran adaptación a nuestro país. La exportación de fruto de rosa mosqueta desde el 2010 en adelante supera los USD 19 MM (INFOR, 2015). Se utiliza para elaborar productos antiinflamatorios, cuenta con estudios clínicos que respaldan su uso para combatir estas dolencias (Chrubasik-Hausmann *et al.*, 2014).

Desde el bosque nativo el sustento económico se focaliza principalmente en el aprovechamiento de la biomasa de quillay y boldo, cada cual últimamente con exportaciones más importantes que todos los productos maderables nativos (INFOR, 2015). Del quillay además de los tradicionales usos en la industria de surfactantes, cosméticos y bebidas existen desarrollos de mayor nivel, extractos ricos en saponinas totales (ULTRA QDP Desert KING S.A.), extractos de saponinas ricos en QS21 usadas en veterinaria como coadyudantes (QUIL A® Brenntag) y complejos llamados ISCOM que se forman con colesterol, fosfolípidos y saponinas, estas estructuras permiten utilizar los beneficios de las saponinas pero disminuir su toxicidad que deriva principalmente de la actividad hemolítica (Rönnberg *et al.*, 1995). Todo esto evidencia el potencial que tiene el aprovechamiento químico de la biomasa de quillay y permiten proyectar una mayor demanda, es tal lo atractivo de

sus propiedades químicas que se ha estudiado la variabilidad del perfil de saponinas de diferentes extractos de corteza (Thalhamer y Himmelsbach, 2014), en poblaciones naturales según costa, valle y montaña (Grandón *et al.*, 2013), y en los individuos de cultivo, donde se encontró gran variabilidad y un 2,58% de saponinas promedio (Schlotterbeck *et al.*, 2015). También conlleva preguntarnos como Ingenieros forestales cómo mejorar el manejo e implementar estas variables de aprovechamiento químico.

2. Marco teórico

Chile es un territorio extenso con variadas alturas y relieves, una isla ecológica como resultado de estar rodeado por la Cordillera de Los Andes, el Océano Pacífico y el desierto. A todo esto se suma un clima que va del tropical desértico a la tundra austral y altoandina conformando una biodiversidad moderada en número, pero con especies únicas y exclusivas. Estas se han utilizado con fines medicinales desde tiempos remotos por los pueblos indígenas, quienes les descubrieron propiedades curativas a sus extractos (Avello y Cisternas, 2010). Como país somos propietarios de un recurso genético importante, de una riqueza de 5.215 especies de plantas catastradas, caracterizada por un alto porcentaje de endemismo en especies y géneros (Massardo y Rozzi, 1996).

La utilización de nuestro bosque nativo ha generado empleos e ingresos para comunidades rurales, familias campesinas y pequeños propietarios forestales, ligando históricamente este recurso al desarrollo del país (Délano *et al.*, 2000; INFOR, 2009). El bosque, en toda su riqueza y variedad biológica, es fuente de innumerables productos no necesariamente madereros. Dentro de estos, existe una amplia gama de productos medicinales provenientes de hojas, cortezas, frutos y raíces (Campos, 1998). Los PFNM (Productos Forestales no madereros) son una fuente importante de ingresos para un gran número de familias. Ellas recolectan un volumen importante de lo transado en el mercado y de allí que en términos sociales el desarrollo de este rubro adquiere gran importancia (INDAP, 2007; Campos, 1998). Todavía queda bastante por mejorar, muchos de estos productos provienen de una comercialización y recolección marginal que no asegura ni la protección del recurso ni la calidad (Tacón, 2004). En la política forestal de nuestro país, se proyecta que los PFNM de exportación generen ingresos por US\$ 100 millones y estos cuenten con modelos de aprovechamiento sustentable (Política Forestal 2015-2035, 2015)

Un pequeño porcentaje de las plantas chilenas han logrado insertarse en este mercado gracias a la relevancia y utilidad de sus principios activos (Campos, 1998). Según Fernández (1994) Chile lleva muchos años exportando material vegetal nativo con fines medicinales, entre los que destacan las hojas de boldo y la corteza de quillay. Boldo dispone de dos productos de interés comercial, las hojas ricas en aceites esenciales y alcaloides y la corteza, estructura que contiene grandes cantidades de alcaloides, siendo boldina su componente más característico (Tacón, 2004; INFOR, 2009). Los extractos de boldo, como el alcaloide boldina, forman parte de la composición de diversas especialidades farmacéuticas asociadas a la alcachofa (*Cynara scolymus*) (Bravo, 2003). Las hojas de boldo además son una fuente importante de catequina (Simirgiotis *et al.*, 2010) y procianidinas (Pastene *et al.*, 2014), también de aceites esenciales donde predomina ascaridol y p-cimeno (Vogel *et al.*, 2008).

En la zona central de nuestro país, la irregularidad y la estacionalidad de las precipitaciones forman ecosistemas frágiles que son alterados con facilidad a

niveles de difícil y lenta recuperación, afectando a todo el ecosistema y la calidad de vida de los habitantes (Valdebenito *et al.*, 1998). En esta zona se puede apreciar un bosque nativo con poco manejo y graves signos de degradación, donde los principales productos son el carbón, leña, extracción de corteza de quillay y hojas de boldo (Palma, 2004). En el área se concentra la mayor superficie nacional cubierta con boldo, existiendo también una intensa actividad extractiva de sus hojas. La especie es uno de los recursos forestales endémicos de mayor importancia económica y ambiental de la zona central del país (INFOR, 2009).

En torno al boldo gira una actividad económica con marcada informalidad, centrada en la recolección y exportación de las hojas. Salvo pequeñas excepciones son tímidos y escasos los productos con valor agregado (Rodríguez *et al.*, 1983; Tacón, 2004). Desde el año 1981 al 2007 las hojas se han exportado a más de 26 países y han participado del negocio un total de 78 empresas. Estas son abastecidas por intermediarios que compran el boldo a los propietarios rurales (INFOR, 2009).

En la actualidad se ha perdido el uso de peumo, si bien se comercializa su aceite esencial, hidrolato y existen cervezas elaboradas con el fruto, son pocos los productos desarrollados. Todo esto a pesar del gran potencial de desarrollo que tiene la especie (Benedetti, 2012). De peumo, se han identificado compuestos fenólicos de las hojas (Simirgiotis, 2013) y de la madera (Pacheco, 2011). Con respecto a los alcaloides, se aisló desde la corteza y las hojas un alcaloide del tipo bencilisoquinolinico, la (+) Reticulina (Urzúa *et al.*, 1975).

3. Hipótesis

La producción de metabolitos secundarios puede verse afectados por factores genéticos, ontogenéticos y ambientales, como la edad de los individuos, la estacionalidad, el nivel de nutrientes, estrés osmótico y fotoperiodo (Gobbo-Netto y Lopes, 2007). Estudios realizados en *Peumus boldus* así lo demuestran, es posible encontrar árboles que en sus hojas tienen pequeñas cantidades de boldina (Vogel *et al.*, 1999). Por lo tanto, la evidencia científica permite formular las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: Identificando la variabilidad fenotípica de la concentración de principios activos en poblaciones naturales, es posible obtener hojas de mayor calidad y (así, permite) priorizar esos estándares por sobre el volumen cosechado.

Hipótesis 2: A través del cultivo de peumo y boldo en alta densidad, se puede obtener un material de mayor homogeneidad, sin afectar los parámetros morfométricos de las hojas.

Hipótesis 3: La edad y ubicación de las hojas son algunos factores que podrían afectar el contenido de principios activos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Establecer las bases para el aprovechamiento sustentable de las hojas medicinales de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba* según parámetros biométricos y químicos.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Estudiar la variación trimestral del contenido de principios activos en hojas de *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus*.

4.2.2. Cuantificar el contenido y composición de principios activos en las hojas de individuos masculinos y femeninos de *Peumus boldus*.

4.2.3. Evaluar la influencia de la edad de las hojas en el contenido de principios activos y en el sabor de la infusión para individuos de *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus*.

4.2.4. Evaluar la evolución de principios activos y parámetros morfométricos de las hojas de individuos de *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus* bajo cultivo.

4.2.5. Determinar el incremento de la biomasa aérea y la arquitectura de individuos *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus* bajo cultivo.

4.2.6. Evaluar la factibilidad técnica y económica de la reforestación con *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus* en la zona central del país.

5. Metodología

5.1. Selección de individuos en poblaciones naturales de boldo.

5.1.1. Selección de individuos.

En octubre y noviembre del 2013 se hizo una evaluación de los dos predios preseleccionados disponibles para la realización del estudio ubicados en la R.M. (cuesta Ibacache, comuna María Pinto) y V Región (Hijuelas), esto consistió en la revisión de imágenes satelitales donde se analizó la cobertura arbórea y se identificaron zonas potenciales que fueron recorridas en terreno para evidenciar la presencia de peumos y boldos. Producto de esta evaluación se escogió el predio ubicado en la comuna de María Pinto ($33^{\circ}31' S$ $71^{\circ}07' O$, 200 m.s.n.m) por presentar zonas donde predominaba boldo y peumo (Figura 1). En el caso de boldo a partir de noviembre del 2013, cuando se realizaron la primeras visitas al predio, se mantuvo un monitoreo de las estructuras reproductivas de los individuos ya que solo se podía observar la presencia de frutos, signo para identificar individuos hembras. Tomando en cuenta este antecedente en marzo del 2014 se eligieron dos sectores para colectar boldo, en cada uno se hizo una tabla de rodal que incluyó las especies del estrato arbóreo, registrándoles el diámetro de copa, la altura de la copa y el sexo de los boldos hembras (Prodan *et al.*, 1997). El sector 1 es plano, los boldos de este sector fueron cosechados a finales del 2012 e inicios del 2013 presenta baja densidad arbórea, predomina en el estrato superior quillay acompañado de boldo, litre, molle y huingán. En marzo del 2014 se marcaron 15 individuos hembras y en agosto 15 individuos machos (Figura 2 y 3). El sector 2 está en la ladera de un cerro, presenta una pendiente moderada y algunas rocas, allí los boldos no han sido intervenidos recientemente, boldo es acompañado por peumo, colliguay, quillay, trevo y quila (Figura 2 y 3). En marzo del 2014 se marcaron 10 individuos hembras de boldo y en agosto del mismo año 10 individuos machos de boldo.

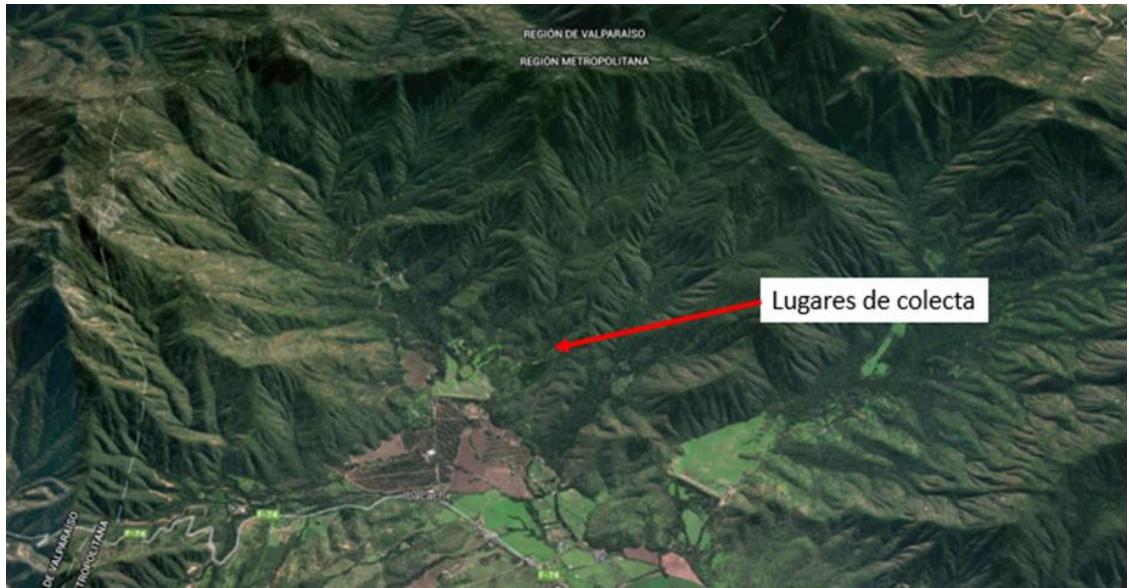


Figura 1. Vista general de la cuesta Ibacache, comuna María Pinto.



Figura 2. Sitios de colecta de *P. boldus* y *C. alba*.



Figura 3. Sitios de colecta de *P. boldus*.

En el caso de peumo se decidió utilizar el mismo predio de María Pinto. En enero del 2014 a partir de un punto dentro del predio se realizó un transecto donde cada 60 m se realizaron 3 parcelas circulares de 1.000 m², se confeccionó una tabla de rodal donde se identificaron las especies y se les midieron variables descriptivas, a partir de esto se seleccionaron al azar 25 individuos de peumo (Prodan *et al.*, 1997). Debido a la poca cantidad de alcaloides que contienen las hojas se decidió tomar muestras de madera y corteza a los mismos individuos. Además se colectaron muestras de peumo (hoja, madera y corteza) en la Cuesta La Dormida (límite de la R.M. y V Región) y en Curanipe (VII Región) a 25 individuos por población (Figura 4) para analizar posibles diferencias latitudinales.



Figura 4. Sitios de colecta de peumo: Cuesta la Dormida (V Región), predio María Pinto (R.M.) y Curanipe (VII Región).

5.2 Colecta de muestras

5.2.1. Muestras de *Cryptocarya Alba*.

En abril del 2014 se realizó la primera colecta de peumo en María Pinto, a cada individuo se le tomó una muestra de 20 g de hojas frescas de la zona media alrededor del árbol, descartando las hojas nuevas y las que presentaban daño, se cortó también una rama por individuo (Figura 5). Las colectas de hojas se mantuvieron de manera trimestral. En mayo de 2014 se colectaron muestras de peumo (hoja y rama) en la Cuesta La Dormida (V Región) y Curanipe (VII Región). De las ramas se separaron cuidadosamente la corteza y la madera.



Figura 5. Imagen de la colecta de hojas de *C. alba* en el sitio Cuesta La Dormida.

5.2.2. Muestras de *Peumus boldus*.

A inicios de septiembre del 2014 se realizó la primera colecta de los individuos de *Peumus boldus* de María Pinto, a los individuos del sector 2 (árboles sin manejo) la muestra se tomó de la zona media del árbol, mientras que en el sector 1 (árboles con muchos vástagos rebrotados) la muestra se tomó a los vástagos remanentes de la corta anterior (Figura 6), en ambos casos se tomaron 20 g de hojas frescas descartando las hojas dañadas. Se mantuvieron las colectas de hojas de manera trimestral.



Figura 6. Vástagos remanentes de una cepa de boldo ubicada en el Sector 1 de María Pinto.

5.2. Modelo experimental de la variación trimestral de los principios activos en hojas de individuos de *P. boldus* y *C. alba*.

Tabla 1. Tratamientos experimentales de la variación de los principios activos en hojas de *C. alba* y *P. boldus* según sexo.

Fecha de Colecta	Boldo		Peumo
	Hembras	Machos	
Trimestre 1	T ₁ B _H	T ₁ B _M	T ₁ P
Trimestre 2	T ₂ B _H	T ₂ B _M	T ₂ P
Trimestre 3	T ₃ B _H	T ₃ B _M	T ₃ P
Trimestre 4	T ₄ B _H	T ₄ B _M	T ₄ P
Trimestre 5	T ₅ B _H	T ₅ B _M	T ₅ P
Trimestre 6	T ₆ B _H	T ₆ B _M	T ₆ P
Trimestre 7	T ₇ B _H	T ₇ B _M	T ₇ P
Trimestre 8	T ₈ B _H	T ₈ B _M	T ₈ P

(T_i = N° de trimestre; B_i = Sexo boldo; H = Femenino, M = Masculino y P = peumo)

Para dar cumplimiento al Objetivo 1 y 2 se tomaron muestras trimestrales, en el caso de boldo identificando el sexo del individuo como indica la Tabla 1. Las muestras al ser cosechadas se introdujeron en bolsas de papel, se etiquetaron y se transportaron al laboratorio para los análisis químicos.

5.3. Modelo experimental influencia de la edad de las hojas en la concentración total de polifenoles y flavonoides para individuos de *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus*.

Tabla 2. Tratamientos experimentales según edad de la hoja.

Hojas nuevas	<i>Peumus boldus</i>				<i>Cryptocarya alba</i>	
	Hembras		Machos		Hojas nuevas	Hojas antiguas
	Hojas nuevas	Hojas antiguas	Hojas nuevas	Hojas antiguas		
H ₁ B ₁	H ₂ B ₁	H ₁ B ₂	H ₂ B ₂	H ₁ P	H ₂ P	

(H_i = Tipo de hoja; 1 = nueva 2 = antigua; B_i = Sexo boldo; 1 = Femenino, 2 = Masculino, P = peumo).

Para dar cumplimiento al Objetivo 3 se utilizaron las hojas viejas (normales) del trimestre 5 y se colectaron 10 g de hojas nuevas separadas por sexo en el caso de boldo, como se aprecia en la tabla 2. Las hojas nuevas corresponden al primer par de hojas debajo de la yema apical, tiene una coloración verde claro como se observa en la Figura 7.



Figura 7. Detalle de las hojas nuevas y viejas de *P. boldus*.

5.3.1 Determinación de la actividad antioxidante de las infusiones elaboradas con hojas de rebrote de tocón, vástagos remanentes, nuevas y viejas de *Peumus boldus*.

De otra población de María Pinto colindante a la de estudio se seleccionó una muestra de 15 individuos de *P. boldus* para analizar la capacidad antioxidante de las infusiones elaboradas con hojas nuevas y viejas, del rebrote de tocón y de los vástagos remanentes mediante los ensayos ABTS, DPPH y poder reductor férrico FRAP.

5.4. Análisis sensorial de infusiones de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba*.

Se realizaron dos encuestas, la primera constó de 13 preguntas referentes al conocimiento y consumo de la infusión de boldo, formatos y productos de preferencias, disposición a pagar por un producto de mayor seguridad y principales canales de adquisición, la primera encuesta se realizó a 81 personas y la segunda a 400 personas. Se realizaron dos análisis sensoriales (cata), la primera se realizó a 80 panelistas no expertos para evaluar la calidad de las infusiones preparadas con hojas de *P. boldus* y la segunda fue realizada a 100 panelistas no expertos donde se evaluaron las infusiones de hojas de *P. boldus* y *C. alba*.

5.5. Cultivo de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba*.

5.5.1 Adquisición de individuos juveniles de *P. boldus* y *C. alba*.

En diciembre del 2013 se compraron a un vivero ubicado en Los Ángeles (VII Región) 1.400 boldos y 1.200 peumos, recibidas las plántulas se procedió a trasplantarlas en bolsas de polipropileno de 1.000 cm³ y se les

incorporó un sustrato compuesto por tierra de hojas (Anasac), turba y perlita (1:1:1).

5.5.2. Mantención de las plantas.

Las plantas se mantuvieron bajo una cubierta de malla raschel (80%), con un riego diario por 6 meses. La malla se retiró a finales del mes de julio del 2014 para aprovechar las precipitaciones. También ese mes se redujo el riego a una aplicación dos veces por semana, para favorecer el desarrollo radicular y acondicionarlas para la plantación.

5.5.3. Preparación del terreno.

Dentro del predio ubicado en el sector Lo Infante, comuna de San Bernardo (R.M.) ($33^{\circ}39' S$ $70^{\circ}43' O$, 550 m.s.n.m.), se delimitó un área de 12 x 50 m para la realización del ensayo (Figura 8). A finales de septiembre de 2014 en el terreno se hizo un roce con desbrozadora manual para cortar las malezas que presentaban alrededor de 50 cm de alto, luego fue arado con tractor para eliminar los restos de malezas y mullir el suelo. Una vez listo el suelo, se procedió al cierre del ensayo con polines de pino radiata impregnado de 3" y 2,60 cm de largo. Estos fueron puestos cada 3 m a lo largo, a lo ancho una hilera en el centro cada 6 m y se instaló una línea de alambre que unió los polines a lo largo en el extremo superior. Además se colocó una malla de alambre hexagonal de 60 cm de alto para impedir la entrada de lagomorfos. Junto a esto, se colocaron 3 hileras de alambre de púas por seguridad. En la tierra se hicieron surcos con arado tirado por caballo cuya distancia entre hileras es de 70 cm (Figura 9).



Figura 8. Localización del cultivo, sector Lo Infante, comuna de San Bernardo (RM).



Figura 9. Preparación del terreno.

5.5.4. Implementación del ensayo.

Para establecer los tratamientos se dividió el área en dos sectores grandes uno con riego dos veces por semana y otro sin riego. La cubierta con malla raschel de 80% de sombra se colocó en los extremos y malla raschel de 40% en el centro (Figura 10). Los boldos y peumos se plantaron en hileras alternadas cada 70 cm y dentro de la hilera a una distancia de 50 cm. Las plantas se protegieron con una malla anticonejos individual de 60 cm de alto, la que fue apoyada con dos tutores de 1" y 50 cm de largo. Además, se instaló un sistema de riego por goteo para suministrarles agua dos veces por semana al tratamiento con riego (Figura 11).

Con riego	Malla 80%	Malla 40%	Malla 80%
Sin riego	Malla 80%	Malla 40%	Malla 80%

Figura 10. Diseño del ensayo de cultivo.

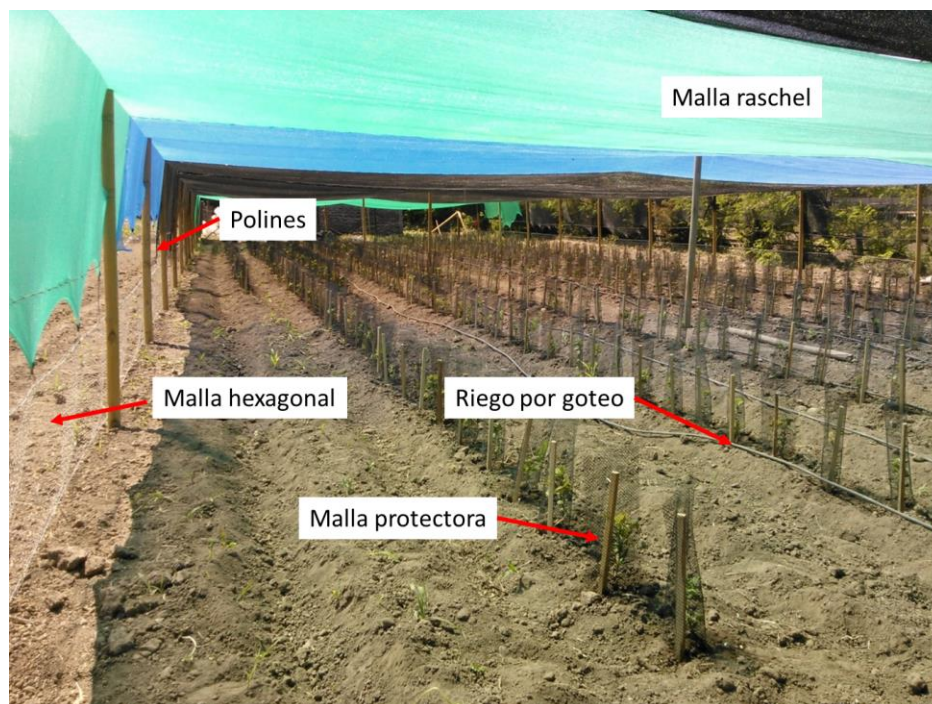


Figura 11. Implementación del cultivo.

5.6. Modelo experimental de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba* bajo cultivo.

5.6.1. Evolución de principios activos de individuos de *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus* bajo cultivo.

Tabla 3. Tratamientos experimentales de plantas juveniles para principios activos, polifenoles totales y flavonoides totales.

Especie			
Boldo		Peumo	
Bajo sombra 40%	Bajo sombra 80%	Bajo sombra 40%	Bajo sombra 80%
C ₁ E ₁ T ₁	C ₁ E ₁ T ₂	C ₁ E ₂ T ₁	C ₁ E ₂ T ₂

(Ti = Tipo de tratamiento; 1 = plena exposición, 2 = bajo sombra; Ei = Especie; 1 = boldo, 2 = peumo; Ai = N° de año).

Para dar cumplimiento al Objetivo 4, se colectaron las hojas frescas cada planta seleccionada, siguiendo las medidas de colecta antes señaladas. En total se realizaron 100 muestras para alcaloides, polifenoles y flavonoides totales (Tabla 3).

5.6.2. Parámetros morfométricos de las hojas de individuos de *Cryptocarya alba* y *Peumus boldus* bajo cultivo.

Se separaron 10 hojas sanas de los individuos seleccionados, 50 individuos de boldo y 50 peumos separados según tipo de sombra (40 y 80%). Las hojas se secaron por 72 h a 65 °C en una estufa de secado hasta peso constante. Luego se montaron en una hoja de papel milimetrado como en

un herbario. Se escanearon a 300 dpi y la imagen se procesó con la aplicación Leaver del Software ImageJ 1.45 (Borianne, 2012). Los valores fueron corroborados midiendo las hojas en el papel milimetrados. Los caracteres que se midieron fueron: largo de la hoja (l) en cm, ancho medio de la lámina (a) en cm, área foliar (af) en cm² y perímetro de la lámina (pl) en cm (Figura 12).

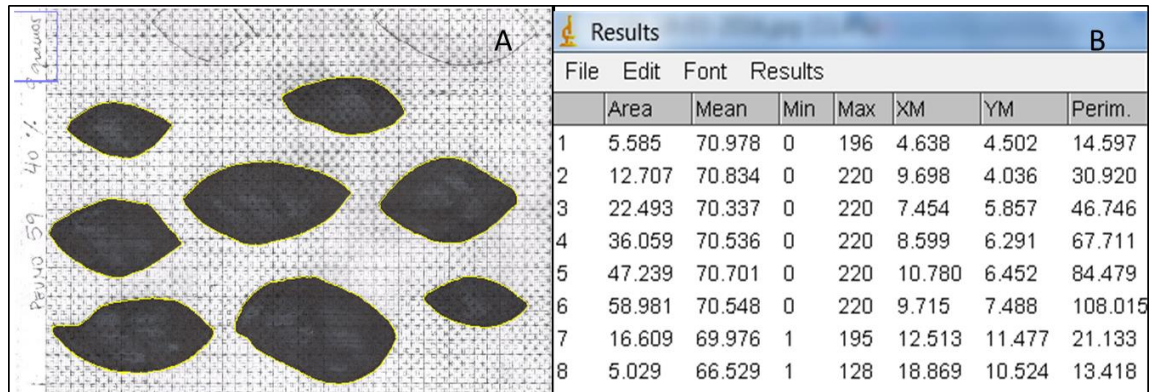


Figura 12. Medición de parámetros morfométricos de las hojas de boldo y peumo.

5.7. Biomasa aérea y arquitectura de los individuos de boldo y peumo bajo cultivo.

A cada individuo de peumo y boldo bajo cultivo cada se les midió el diámetro a la altura del cuello (DAC), altura total (HT) y se estimó la biomasa con la fórmula $DAC^2 \times HT$. Se hizo una separación de acuerdo a los tratamientos con y sin riego.

5.8. Implementación de la reforestación.

Se contactó a 5 propietarios de la R.M. y V Región, quienes presentaron buena disposición a reforestar un sector de su predio. Se visitaron dichos terrenos donde se pudo observar un difícil acceso a las fuentes de agua, recurso que se considera indispensable para la sobrevivencia de las plantas ya que se ha constatado en otras experiencias una baja sobrevivencia al reforestar. De los cuales se eligieron dos terrenos, el primero se ubica en la localidad de Leyda, comuna de San Antonio (V Región). Posee una forestación con *Eucaliptus globulus* y algunos ejemplares de *Pinus radiata*, boldo y trevo, el terreno es plano y presenta influencia costera. El segundo terreno se ubica en la Aurora de Curacaví (RM), posee un bosque nativo esclerófilo muy diverso donde predominan en el estrato superior boldo, peumo, quillay y molle. Presenta una quebrada seca y una ladera de exposición sur, con poca luminosidad (Figura 13, 14 y 15).



Figura 13. Sitios de reforestación.

Las actividades de reforestación se desarrollaron de acuerdo a las buenas prácticas forestales (MINAGRI, 2006). En el primer sitio se plantaron 75 individuos de boldo de 5 años y 50 individuos de peumo de 2 años. En el segundo sitio 150 individuos de boldo y 50 de peumo.

En ambos lugares los individuos fueron plantados únicamente bajo dosel. Además fueron protegidas con una malla anti-conejos de 50 cm afirmada con 2 tutores de 50 cm de largo. Además, se estableció un sistema de riego por goteo para el periodo estival, regándose 2 veces por mes.



Figura 14. Reforestación ubicada en Leyda, V Región.



Figura 15. Reforestación ubicada en La Aurora de Curacaví, RM.

5.8.1. Mantenición de la reforestación.

Se monitorio la sobrevida de las plantas, con visitas mensuales. Con los propietarios se estableció un acuerdo para que se encarguen del cuidado de la reforestación por al menos 5 años.

5.9. Planilla de costos.

Con los costos de la reforestación, que incluye el valor de las plantas, herramientas, materiales y mano de obra utilizados se elaboró una planilla para evaluar la factibilidad técnico-económica de la reforestación.

5.10. Análisis químicos.

5.10.1 Reactivos químicos.

Los reactivos Folin-Ciocalteu, 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), persulfato potásico, cloruro de aluminio hexahidratado, carbonato de sodio (Na_2CO_3), cloruro férrico, acetato de sodio, buffer de acetato de sodio, 2, 4, 6 tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), DPPH, Trolox® fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y Merck. Los reactivos utilizados durante los análisis fueron grado HPLC o PA. Los alcaloides glaucina, predicentrina, secoboldina, N-metilsecoboldina, norreticulina, coclaurina, N-metilcoclaurina, higenamina fueron sintetizados en el laboratorio. Reticulina, laurotetanina, boldina, N-metillaurotetanina, norglaucina y laurolitsina fueron aislados de fuentes naturales. Norisoboldina fue adquirido AK Scientific Inc., isocoridina HCl en PhytoLab GmbH & Co y coridina en ALB Technology Limited. Los polifenoles ácido cafeico, ácido gálico, apigenina, ácido clorogénico, ácido cumarico, quercetina, miricetina fueron adquiridos Sigma-Aldrich, ácido cryptoclorogénico, epicatequina, isoramnetina, kaempferol, pinocembrina, procianidina-B1, procianidina-B2, procianidina-C1, quercitrina, rutina, catequina fueron adquiridos en Phytolab.

5.10.2. Aislación de patrones de reticulina y laurotetanina.

La reticulina se aisló a partir de 3,5 kg de corteza de peumos adultos. La extracción de los alcaloides totales se hizo de acuerdo a la metodología descrita, se obtuvieron 1,5 g de alcaloides crudos. Luego, se purificaron por cromatografía por columna y preparativa. Toda la aislación fue guiada por cromatografía en capa fina (Figura 16).

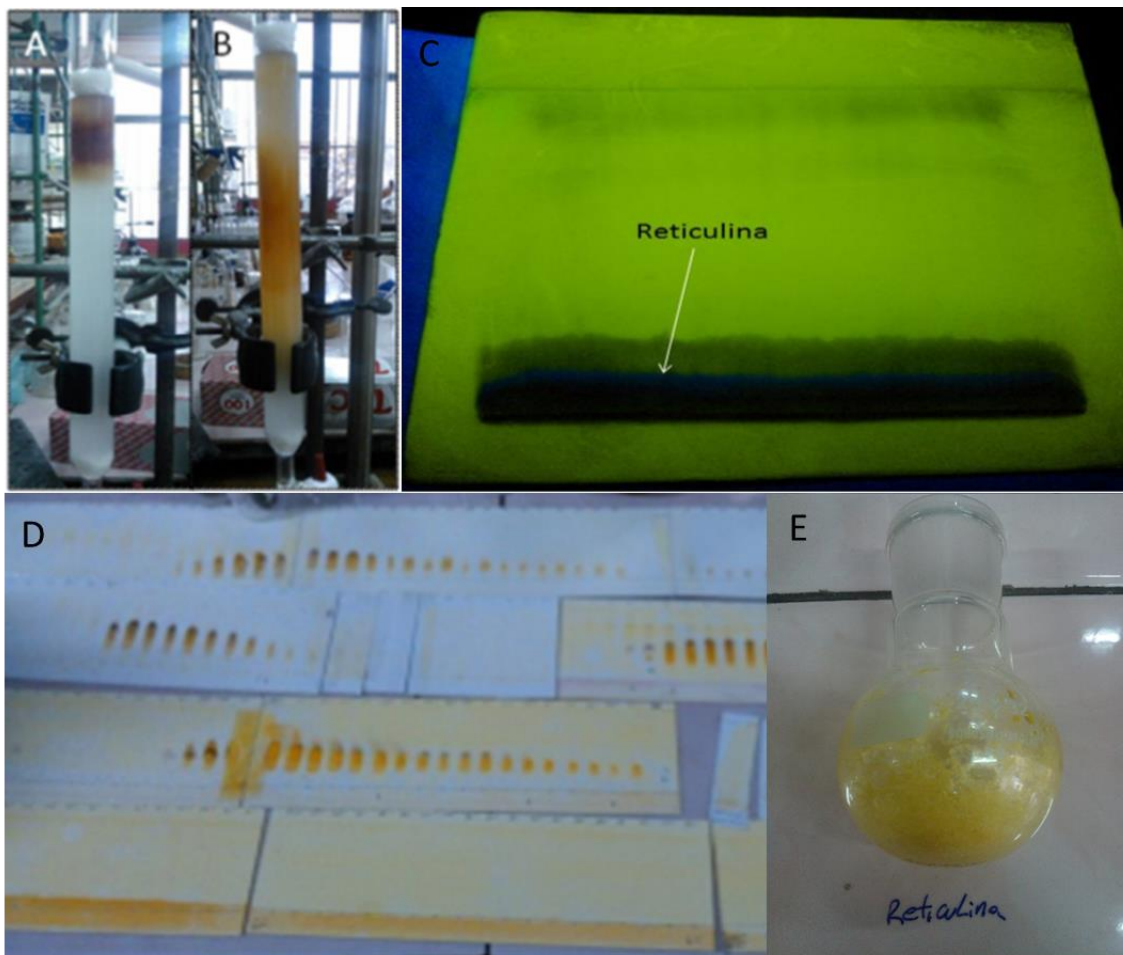


Figura 16. Cromatografía por columna de los alcaloides presentes en la corteza de *C. Alba* para la purificación de reticulina. A. Inicio de la cromatografía por columna. B. Cromatografía por columna en desarrollo. D. Cromatografía en capa fina de la subfracciones. E. Imagen de reticulina pura.

Se obtuvieron 50 mg de reticulina pura (>95%, HPLC), una parte se envió a la Unidad Central de Instrumentación de la P.U. Católica para el análisis de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ^1H) (Figura 17). Producto de la interpretación de los espectros de RMN se encontró que su espectro de RMN ^1H poseía los mismos desplazamientos descritos en la reticulina obtenida de *Cryptocarya alba* (Urzúa *et al.*, 1975) y *Cryptocarya rugulosa* (Saidi *et al.*, 2011) (Figura 4). Reticulina. ^1H NMR (200 MHz, Bruker ACP 200) δ 6.77 (1H, d, $J = 2.0$, H-2'), 6.74 (1H, d, $J = 8.2$, H-5'), 6.59 (1H, dd, $J = 8.2$, $J' = 2.0$, H-6'), 6.53 (1H, s, H-5), 6.41 (1H, s, H-8), 3.85 3H, s,

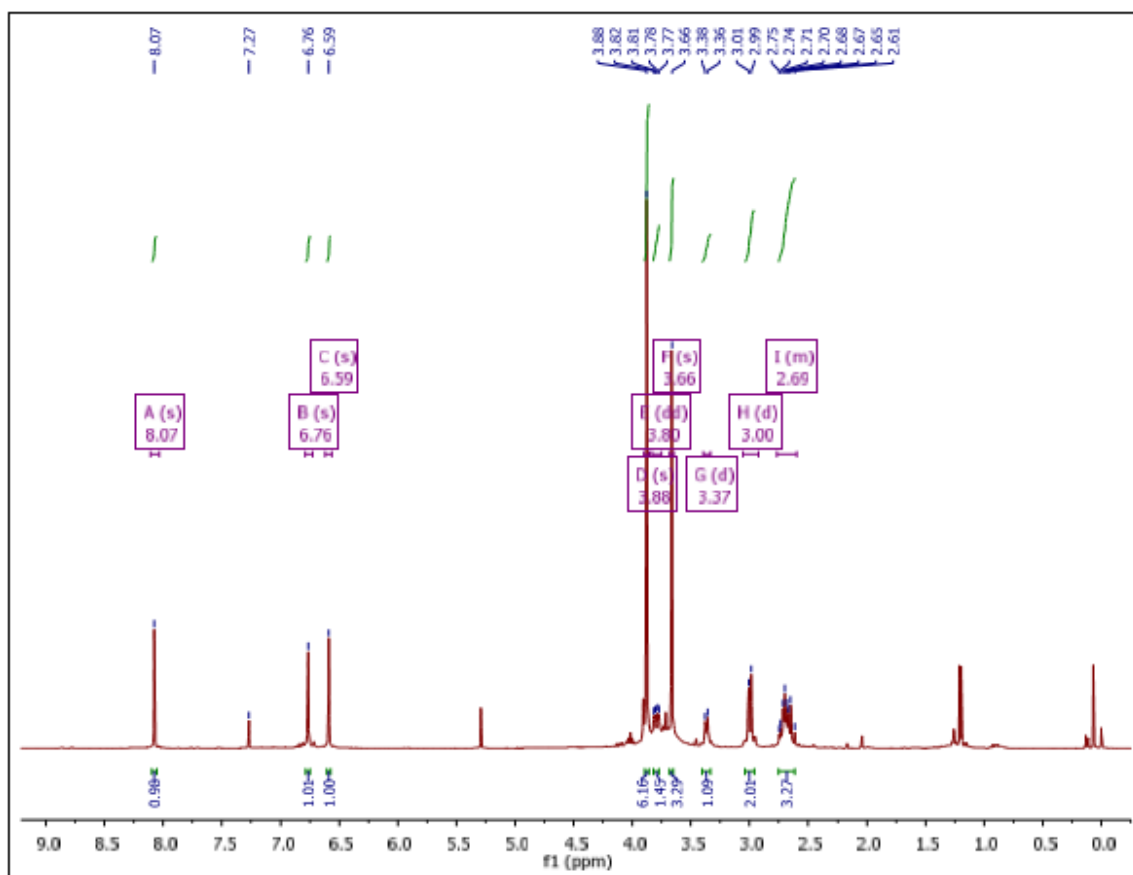


Figura 18. Espectro RMN ^1H de laurotetanina obtenida a partir de la corteza de *C. Alba* (CDCl_3 , 400 MHz).

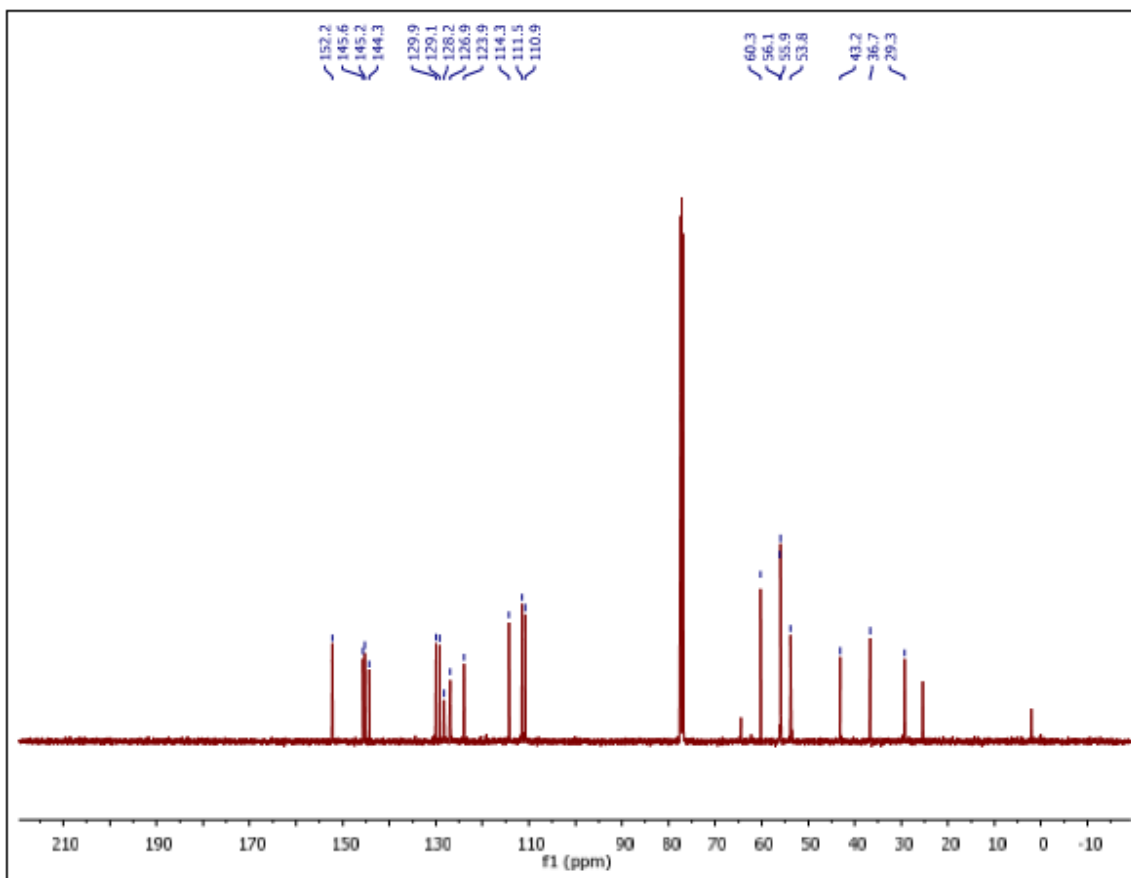


Figura 19. Espectro RMN ¹³C de laurotetanina obtenida a partir de la corteza de *C. Alba* (CDCl₃, 400 MHz).

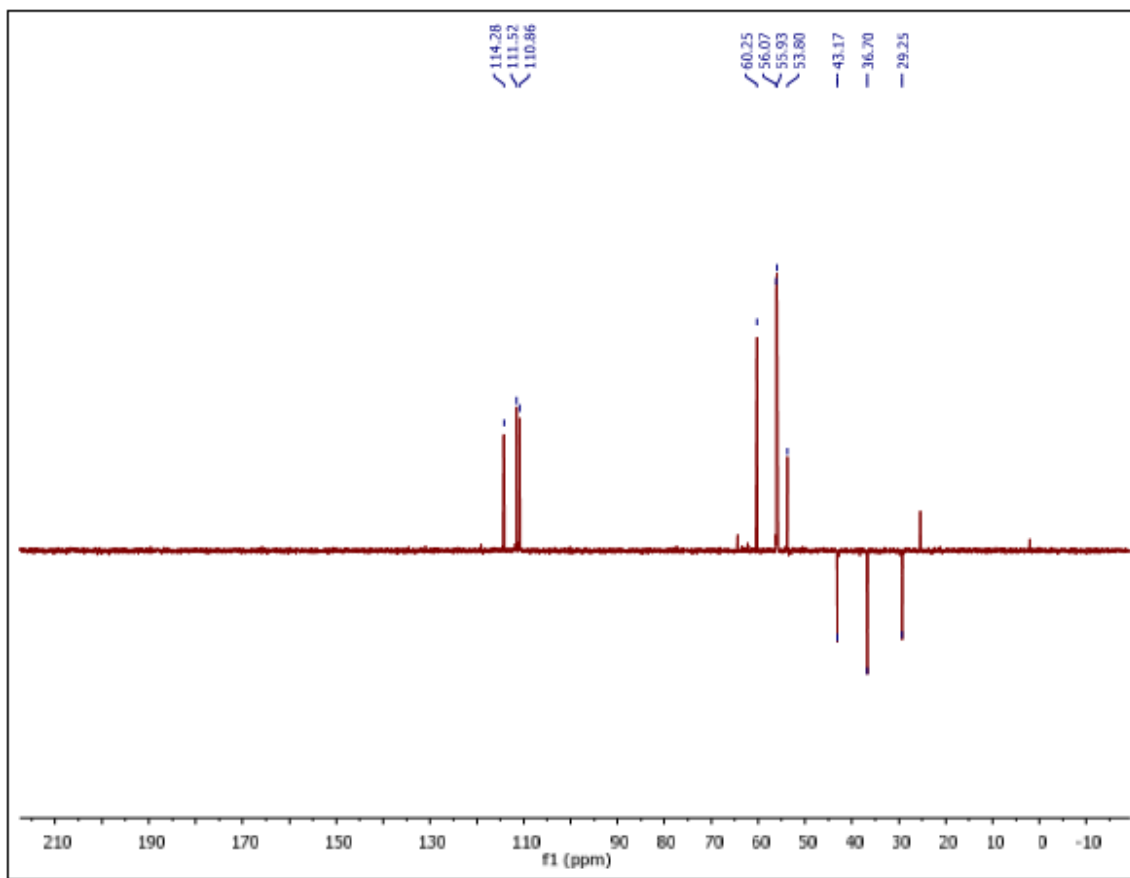


Figura 20. Espectro RMN DEPT 135 13C de laurotetanina (CDCl₃, 400 MHz).

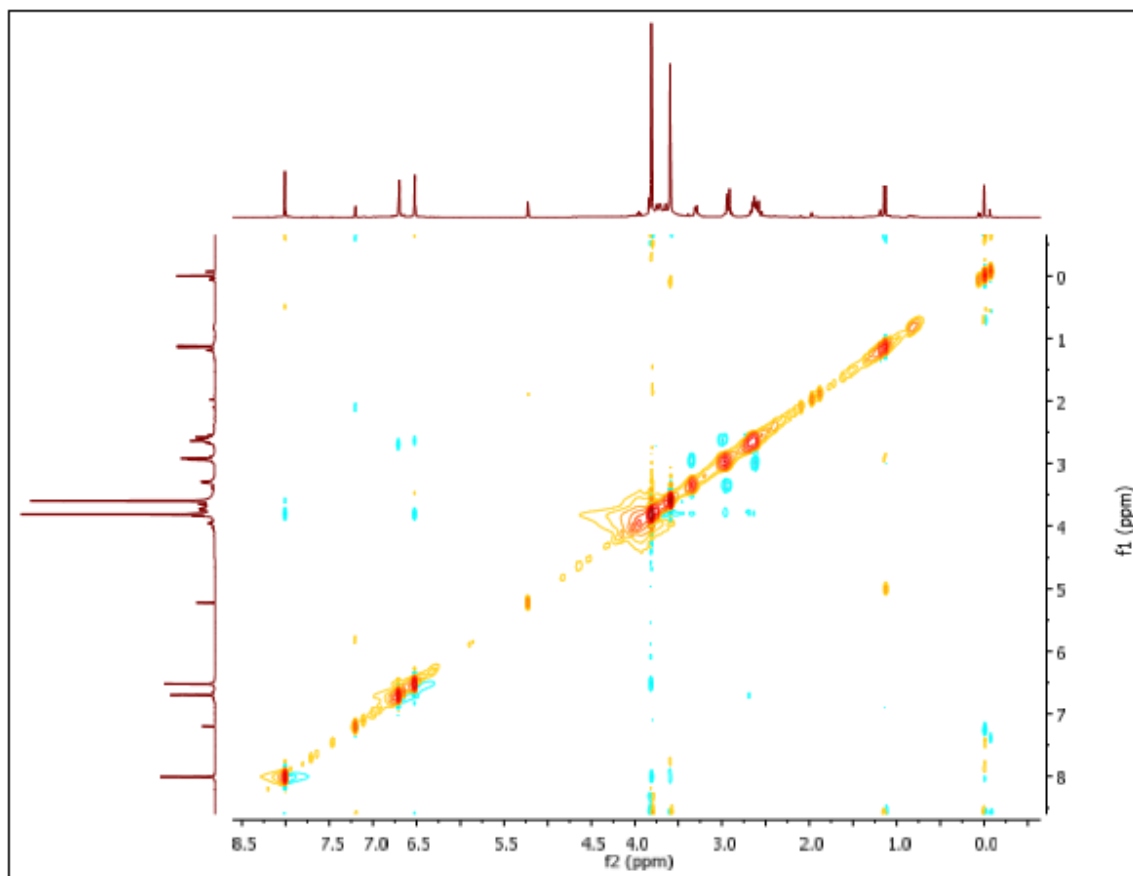


Figura 21. Espectro RMN 2D 1H-13C NOESY de laurotetanina (CDCl₃, 400 MHz).

En mayo de 2014 a plantas de peumo muertas compradas para la reforestación se les extrajeron los alcaloides de acuerdo a la metodología descrita, se separaron sus hojas, raíz y tallo. Se utilizó el método cromatográfico de separación por gradiente de Tseng *et al.* (2000). Por coinyección se encontró que estaba presente reticulina en el tallo, raíz y hojas. La concentración de alcaloides quedaron en el siguiente orden decreciente corteza>raíz>madera>hoja, encontrándose trazas difíciles de detectar, se amplió la búsqueda de alcaloides con hojas de individuos adultos y nuevamente se encontraron trazas de alcaloides.

5.10.3. Aislación e identificación de los alcaloides presentes en las hojas, madera y raíz de *C. alba*

Se extrajeron los alcaloides a partir de 4 kg de hojas secas de peumo y se aislaron por cromatografía por columna, siendo monitoreados por cromatografía en capa fina, de acuerdo al procedimiento descrito. Posteriormente se analizaron los alcaloides por HPLC-UV-ESI-MS (Figura 22)

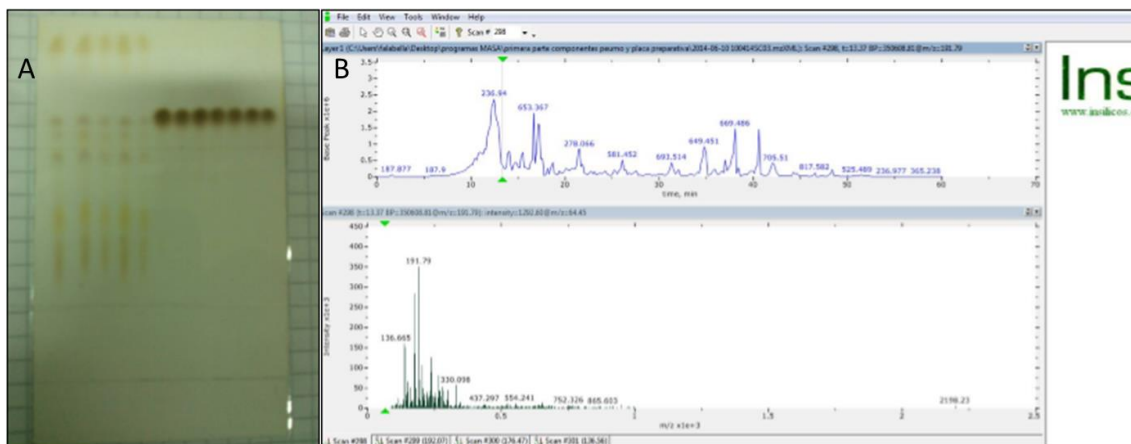


Figura 22. A. Cromatografía de placas de los alcaloides de hoja de peumo (izquierda) con un patrón de alcaloide interno de boldina (derecha). B. Análisis de los alcaloides de la hoja de peumo por HPLC-UV-ESI-MS.

A partir de análisis cromatográfico de los alcaloides de peumo presentes en la raíz, hoja y tallo de individuos juveniles y la aislación lograda por Urzúa *et al.* (1975) se tenía la impresión que al menos reticulina sería un alcaloide importante, lo cual no ocurrió ya que al ser analizados los alcaloides de las hojas de peumo por HPLC con el método de Tseng *et al.* (2000) se encontró que las concentraciones eran muy bajas, pese a que se redujo el volumen de las muestras al mínimo. Se llegó a la conclusión que la presencia de alcaloides en las hojas de peumo es a nivel de trazas. Y al analizar las otras partes se tuvo el antecedente de la presencia de otros posibles alcaloides no descritos para la especie por lo cual se decidió aislar e identificar los alcaloides de la hoja, corteza, madera y raíz.

La extracción de los alcaloides de la madera se hizo a partir de 10 kg y de la raíz a partir de 5 Kg. Con los alcaloides obtenidos de cada parte se hicieron cromatografías en capa fina y muestras que se enviaron para su análisis por HPLC-UV-ESI-MS al centro CEPDEQ para determinar la masa molecular y fragmentación de los alcaloides y así lograr una identificación tentativa de los compuestos.

A partir de la extracción de alcaloides realizada a las partes de peumo se pudo identificar 9 alcaloides además de reticulina, laurotetanina, isocoridina, n-metillaurotetanina, boldina entre otros. Se encontraron otros alcaloides como norisocoridina y norcoridina, pero no se logró purificarlos para trabajar.

5.10.4. Preparación de extractos a partir de hoja de boldo y peumo.

Después de colectar las hojas estas se mantuvieron una semana en una sala a 20°C, luego fueron secadas por 72 h en una estufa de aire forzado a 40°C, hasta alcanzar peso constante. Posteriormente se molieron en una procesadora de alimentos y se pasaron por un tamiz de 2 mm. La muestra (1 g ±0,001) se depositó en un matraz erlenmeyer y se le agregaron 100 ml

de metanol destilado. Los matraces fueron puestos en un baño termorregulado a 60°C por 6 h, luego el contenido se filtró con un papel filtro tipo Whatman N°1, este procedimiento se repitió hasta completar cinco extracciones. La secuencia de extracción se diseñó calculando en base a los sólidos extraíbles (mg) y su agotamiento (Figura 23). Se reunieron los cinco extractos filtrados y se concentraron en un evaporador rotatorio a 38 °C y a presión reducida, siendo resuspendidos en metanol y aforados a 20 ml para ser guardados en viales de vidrio ámbar hasta su análisis. Además, luego de ser extraídas con metanol se verificó el agotamiento del material realizando otro extracto, uno con agua hirviendo, por lo que las hojas se secaron, se les agregó 50 ml de agua destilada y sometieron a una cocción por 30 minutos a 95 °C, luego fueron filtradas a través de un papel tipo Whatman No. 1. El extracto metanólicos total y el acuoso de cada individuo se evaluaron por separado.



Figura 23. Evaluación de la extracción para la cuantificación de polifenoles y flavonoides.

5.10.5. Preparación de extractos a partir de madera y corteza de boldo y peumo.

Las ramas colectadas fueron peladas manualmente con mucho cuidado para separar la corteza de la madera, luego debido a su dureza cada parte fue pasada por un molino de martillos, de allí se tomó una muestra y se pasó por un tamiz de 2 mm. Luego se pesaron 0,5 g ($\pm 0,001$) de corteza y madera, siendo extraídas con metanol al igual que las hojas, la corteza luego de ser sometida a extracción con metanol tubo una cocción final, de acuerdo a lo descrito para las hojas.

5.10.6. Preparación de extractos acuosos.

En un matraz de vidrio se colocaron 2 g de hoja seca pulverizada y se agregaron 100 ml de agua desionizada (Milli-Q), se colocaron en un baño termostático a 95°C por 5 minutos con agitación cada 45 segundos. Los extractos se filtraron por gravedad con papel filtro Whatman N° 1. Las muestras filtradas se colocaron en botellas ámbar cerradas, etiquetadas y se mantuvieron refrigerados <5 °C hasta su utilización.

5.10.7. Determinación del contenido de polifenoles totales.

El contenido de polifenoles totales se determinó de acuerdo al método de Singleton y Rossi (1965). A cada tubo de ensayo se le agregaron 50 µL de muestra, se adicionaron 250 µL del reactivo Folin Ciocalteu y 3 mL de agua destilada, se dejó reposar 5 min. Luego, se le añadieron 750 µL de una solución de Na₂CO₃ al 20% (p/p) y 950 µL de agua destilada, luego se agitaron en un vortex por 15 seg y se esperó 40 min para la reacción. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 3 mL de la muestra, se vertió a una cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Figura 24). La curva de calibración fue realizada con ácido gálico ($y = 0,1158x + 0,0239$; $R^2 = 0,9976$) y la concentración de polifenoles totales fue expresada como mg equivalentes ácido gálico por g de droga seca (mg AGE/g).



Figura 24. Diagrama general de los análisis de polifenoles y flavonoides totales.

5.10.8. Determinación del contenido de flavonoides totales.

El contenido de flavonoides totales se determinó de acuerdo al método de Chang *et al.* (2002). A cada tubo de ensayo se le agregó 2,5 ml de agua destilada, 300 µL de muestra, 100 µL de acetato de sodio y 100 µL de AlCl₃·6H₂O, se agitó 15 segundos en un vortex y se esperó 30 min para la reacción. Transcurrido el tiempo, se vertió el contenido del tubo en una cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia a 435 nm en un espectrofotómetro (Figura 24). La curva de calibración fue realizada con

quercetina ($y = 0,0824x - 0,0385$; $R^2 = 0,9927$) y la concentración de flavonoides totales fue expresada como mg equivalentes de quercetina por g de droga seca (mg QE/g).

5.10.9. Extracción de alcaloides.

Los crudos de la biomasa de cada especie y una proporción menor de las muestras fueron realizadas con extracto alcaloidal.

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la 5ta edición de la Farmacopea Europea, en un embudo de decantación de 500 ml se vertió una solución de 100 ml de acetato de etilo/n-hexano (1:1) y se agregó el extracto ácido, se formaron dos fases, la fase orgánica se separó con el fin de arrastrar aceites, grasas y otras moléculas afines. El extracto se alcalinizó con hidróxido de amonio a pH 8,5-9,0 y los alcaloides se extrajeron en tres etapas, con 100, 50 y 50 ml de diclorometano. Luego las fases orgánicas de cada muestra fueron reunidas y concentradas en un evaporador rotatorio. Los alcaloides disueltos en un pequeño volumen de diclorometano se pasaron a viales y se concentraron con un adaptador para ser guardados protegidos de la luz hasta su análisis (Figura 25).



Figura 25. Esquema de la cuantificación de alcaloides.

5.11. Análisis Cromatográfico.

5.11.1. Selección de los protocolos para cuantificar alcaloides en *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba* por cromatografía líquida.

A partir del mes de diciembre del 2013 y durante el año 2014 se enviaron muestras de hojas de boldo laboratorio CEPEDEQ de la U. de Chile para el análisis de sus alcaloides por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de tipo electrospray-trampa iónica (HPLC-UV-ESI-MS) y para el estudio de protocolos cromatograficos.

Condiciones cromatográficas

Para la separación se utilizó una columna C18 de 150 x 4.6 mm, 5 μ m y 100 Å (Luna, Phenomenex Inc., EE.UU.), a la salida de la cual se conectó un split que dividió el flujo hacia el detector UV y al espectrómetro de masas. La separación de 20 μ L de blanco (acetonitrilo) y de cada solución de trabajo se realizó a temperatura ambiente utilizando un protocolo de separación isocrática (Schwanz, 2006) (Tabla 4) y otro de separación en gradiente descrito por Tseng *et al.* (2000), donde la fase A corresponde a ácido trifluoroacético 0.01% v/v (agua), mientras que la fase B ácido trifluoroacético 0.01% v/v (acetonitrilo). Un flujo de 1.0 ml/min y una longitud de onda de 305 nm (Tabla 5). El proceso de ionización mediante electrospray se realizó a 4000 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una temperatura de 325°C, presión de 30 psi y flujo de 7 L/min. Los cromatogramas y espectros de masas se adquirieron en polaridad positiva.

Tabla 4. Método de separación isocrática.

t (min)	B (%)
0	15.0
40	15.0

Fuente: Schwanz, 2006

Tabla 5. Método de separación en gradiente.

t (min)	B (%)
0	3.0
3	3.0
50	60.0
55	3.0
60	3.0

Fuente: Tseng *et al.*, 2000.

En la Figura 26 se presenta el cromatograma EIC (extracted ion Chromatogram) de la separación isocrática para visualizar la elución de compuestos con una señal m/z 328, esperada para boldina (masa nominal, 327 g/mol). Con esa masa se observan los peaks 3, 5 y 7 del cromatograma UV. En la Figura 27 se muestra el espectro de masas obtenido para el peak 3 (superior) y el espectro de fragmentación para m/z 328 (inferior), que coincide con lo descrito en literatura para boldina (Stévigny *et al.*, 2004). Con respecto al peak 5, no se obtuvo la fragmentación para m/z 328. En el

espectro de masas para el peak 7 se observó una molécula protonada m/z 328, pero su fragmentación ($M_2(m/z)$: 311.1; 295.5; 280.4) no corresponde a la descrita en la literatura para boldina.

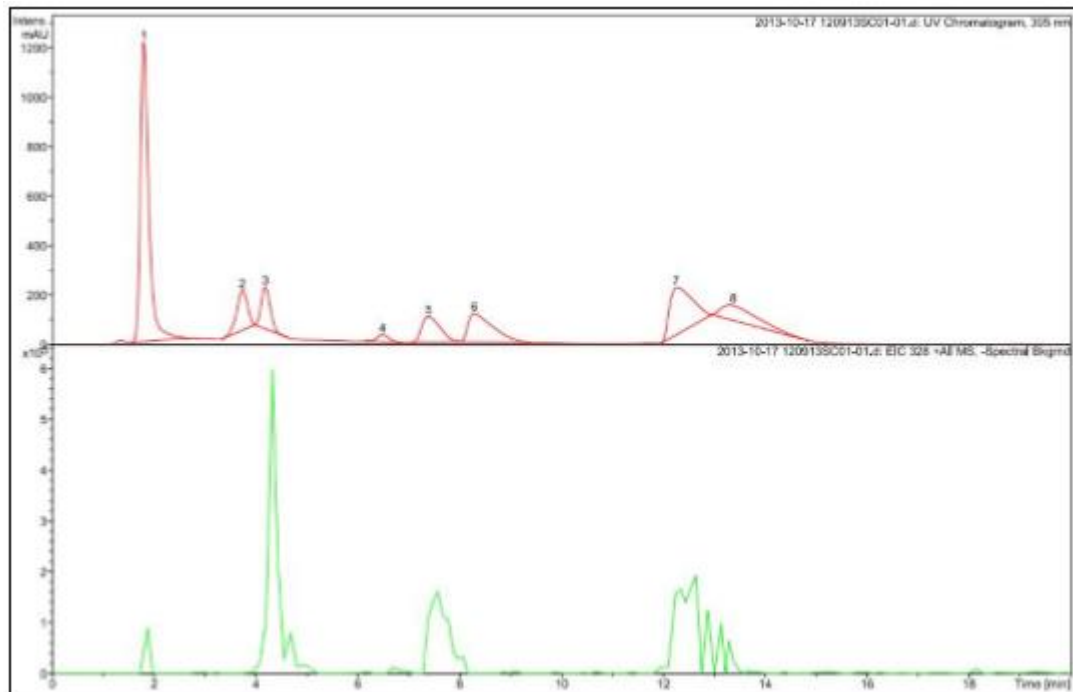


Figura 26. Cromatograma de hoja UV y EIC m/z 328 (separación isocrática).

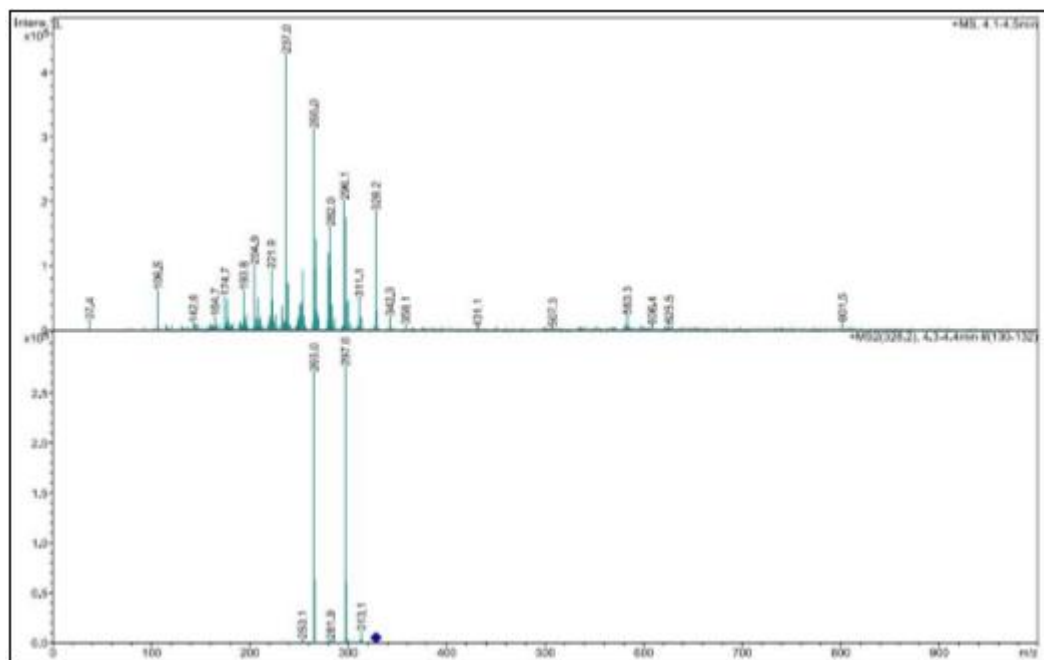


Figura 27. Peak 3, espectro de masas y fragmentación (separación isocrática).

En la Figura 28 se presenta el cromatograma EIC de los alcaloides de hoja para la separación por gradiente, se observan 10 peaks, al examinar los que corresponden con la masa molar de boldina se ve una señal de gran intensidad en el peak 4. El espectro de masas correspondiente a ese peak y sus fragmentos ($M_2(m/z)$: 313.1; 297.0; 265.0; 253.2) coincide a los señalados para boldina (Figura 29). De acuerdo a los resultados obtenidos el método cromatográfico elegido correspondió al descrito por Tseng *et al.* (2000) para analizar diferentes fracciones y subfracciones. Los extractos fueron diluidos en acetonitrilo grado HPLC filtrados por una membrana hidrofóbica (PTFE de 25 mm x 0,45 μm). La solución filtrada fue contenida en un matraz aforado de 5 ml. Para la separación se utilizó una columna RP18 de 250 x 4,6 mm, 5 μm (Hibar®, Merck, Alemania) con una precolumna de 5 μm (LiChroCART®, Merck, Alemania). El volumen de inyección fue de 20 μl , con un flujo de 1.0 ml/min y 282 nm de longitud de onda. El tiempo asignado para cada muestra fue de 40 minutos, cada análisis se realizó por triplicado.

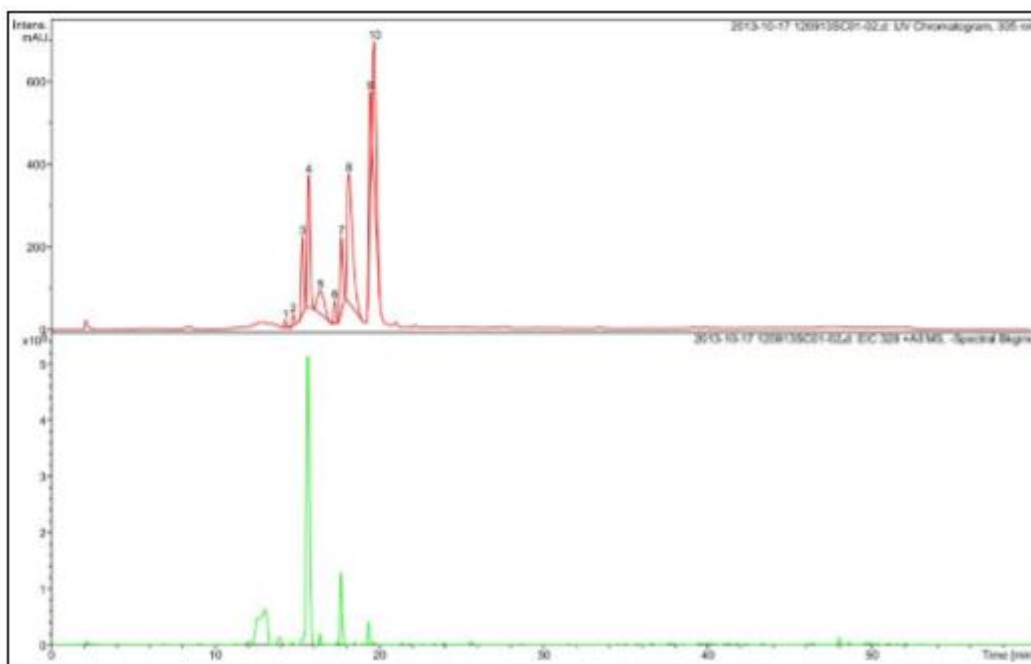


Figura 28. Cromatograma de hoja UV y EIC m/z 328 (separación por gradiente).

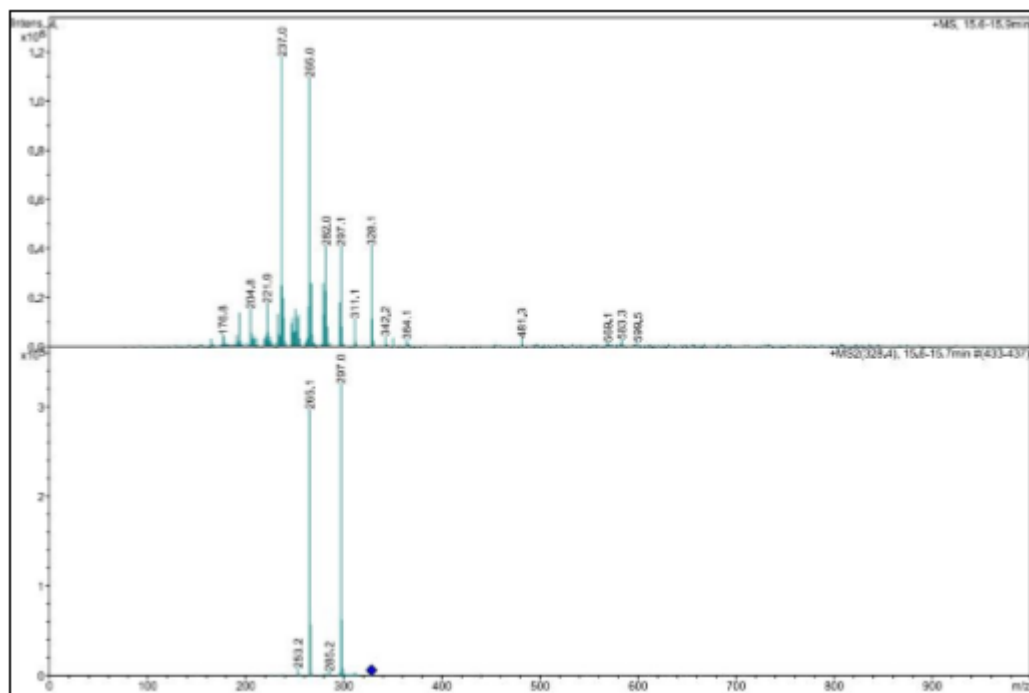


Figura 29. Peak 4, espectro de masas y fragmentación (separación por gradiente).

5.11.2. Cuantificación de metabolitos por UHPLC.

Cuantificación de Alcaloides por UHPLC.

Todas las muestras fueron analizadas por UHPLC-MS/MS en un equipo EkspertUltraLC 100-XL de cromatografía líquida de alta presión acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo ABSciex Triple Quad 4500 con ionización por electrospray (ESI). Se utilizó una columna PhenomenexSynergi™ Fusion-RP 80 Å (50 mm x 2.0 mm, 4 µm) la fase móvil consistió en ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) en gradiente de acuerdo a lo reportado por Zeng *et al.* (2015) con algunas modificaciones: (tiempo, min/%B) 3/3%, 13/15%, 16/20%, 17/3%, 20/3%, el volumen de inyección fueron 10 µl. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron: gas 1 N₂ (40 psi); gas 2 N₂ (50 psi); voltaje de ionización, 3500 V, temperatura de ionización, 650 °C; curtain gas N₂ (25 psi), flujo 0.3 mL/min, escaneado en modo MRM con polaridad positiva. El sistema UHPLC-MS/MS fue controlado por el programa Analyst 1.6.2 y los datos fueron analizados con el programa Multiquant 3.0. Las curvas de calibración estuvieron en el rango de 0.01-1 µg/mL. Los resultados se presentan como µg/g. En la Figura 30 se presenta un cromatograma UHPLC-MS/MS de una muestra de hoja de *P. boldus* y en la Tabla 6 la fragmentación de 17 alcaloides cuantificados con el método cromatográfico.

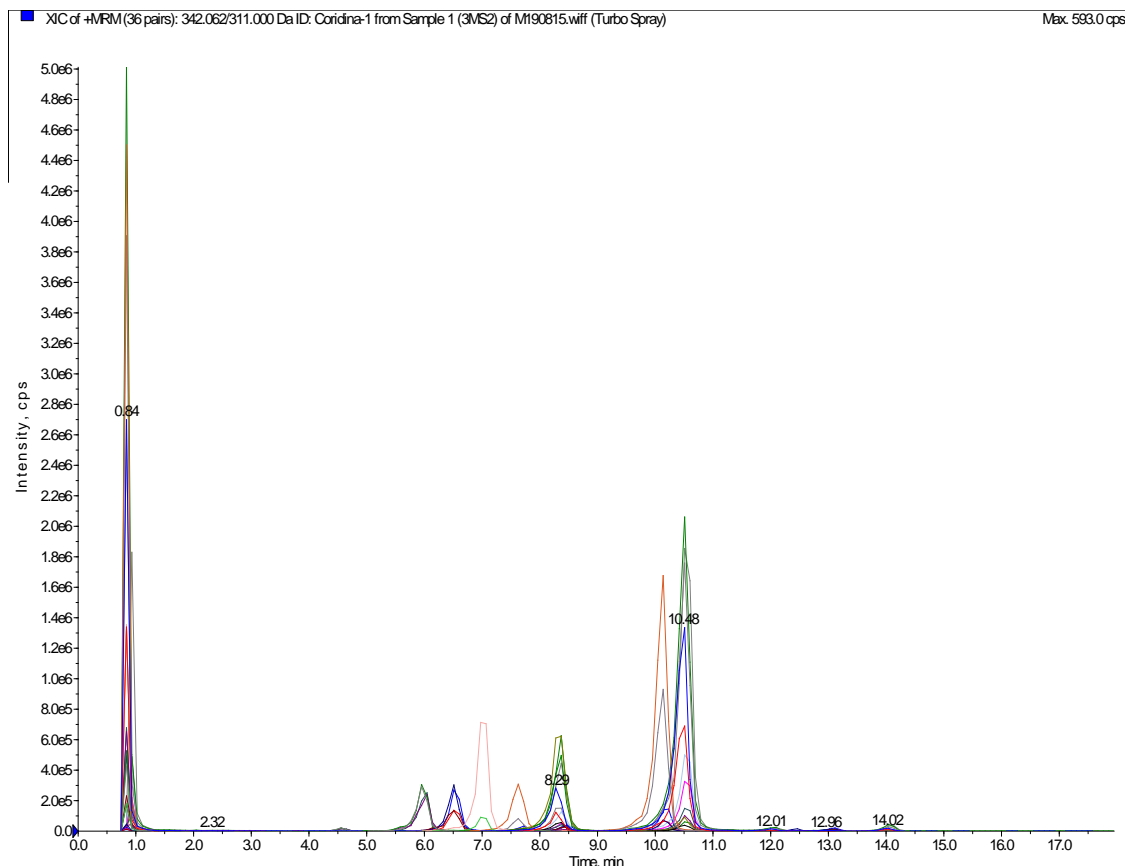


Figura 30. Cromatograma de alcaloides de hoja de *Peumus boldus* por UHPLC.

Tabla 6. Caracterización de los alcaloides de *Peumus boldus* por espectrometría de masas.

Alcaloides	[M+H] ⁺	Fragmentos
Higenamine	271.9	255.0 (66.5), 165.2 (14.9), 161.0 (36.3), 107.0 (100)
Coclaurine	285.9	193.9 (18.0), 209.1 (34.8), 237.0 (28.6), 269.1 (100)
<i>N</i> -Me-coclaurine	299.9	192.0 (27.4), 209.1 (20.7), 237.1 (20.0), 269.0 (100)
Norreticuline	316.0	163.1 (25.7), 175.1 (16.3), 178.0 (100), 299.0 (37.3)
Reticuline	330.0	175.1 (29.5), 177.1 (30.0), 178.1 (7.1), 192.1 (100)
Norisoboldine	314.0	164.9 (43.6), 237.0 (57.0), 265.0 (99.4), 297.0 (100)
Laurolitsine	314.0	165.1 (51.1), 237.1 (54.3), 264.9 (100), 297.1 (90.2)
Boldine	327.9	237.1 (57.1), 264.9 (100), 282.0 (49.8), 297.0 (82.9)
Secoboldine	328.0	193.9 (36.3), 237.0 (35.9), 265.1 (100), 296.9 (66.3)
<i>N</i> -Me-secoboldine	342.0	194.0 (38.7), 205.0 (27.1), 237.0 (64.3), 265.0 (100)

Laurotetanine	328.0	205.1 (79.7), 264.9 (44.6), 280.0 (55.7), 310.9 (100)
<i>N</i> -Me-laurotetanine	342.0	237.1 (45.2), 265.0 (45.0), 280.0 (75.5), 311.1 (100)
Predicentrine	342.0	207.2 (23.9), 251.1 (55.1), 265.0 (28.5), 279.0 (100)
Norglaucine	341.8	194.2 (86.0), 222.1 (57.6), 236.9 (97.8), 265.0 (100)
Glaucine	356.0	279.0 (50.9), 294.0 (100), 310.0 (55.3), 325.2 (86.9)
Corydine	342.0	165.0 (32.9), 253.0 (33.1), 296.0 (64.6), 311.1 (100)
Isocorydine	342.0	165.0 (45.7), 189.1 (29.0), 278.9 (100), 311.0 (71.1)

Cuantificación de Polifenoles por UHPLC

Todas las muestras fueron analizadas por UHPLC-MS/MS en un equipo EkspertUltraLC 100-XL de cromatografía líquida de alta presión acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo ABSciex Triple Quad 4500 con ionización por electrospray (ESI). Se utilizó una columna PhenomenexSynergi™ Fusion-RP 80 Å (50 mm x 2.0 mm, 4 µm) la fase móvil consistió en ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) en gradiente de acuerdo a lo reportado por Zeng et al. (2015) con algunas modificaciones: (tiempo, min/%B) 1/5%, 10/40%, 11/100%, 13/5%, 14/5%, el volumen de inyección fueron 10 µl. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron: gas 1 N2 (500 psi); gas 2 N2 (50 psi); voltaje de ionización, 4500 V, temperatura de ionización, 650 °C; curtain gas N2 (30 psi), flujo 0.5 mL/min, escaneado en modo MRM con polaridad positiva. El sistema UHPLC-MS/MS fue controlado por el programa Analyst 1.6.2 y los datos fueron analizados con el programa Multiquant 3.0. Las curvas de calibración estuvieron en el rango de 0.01-1 ug/mL. Los resultados se presentan como ug/g. En la Figura 31 se presenta el cromatograma UHPLC-MS/MS de una muestra de *C. alba*.

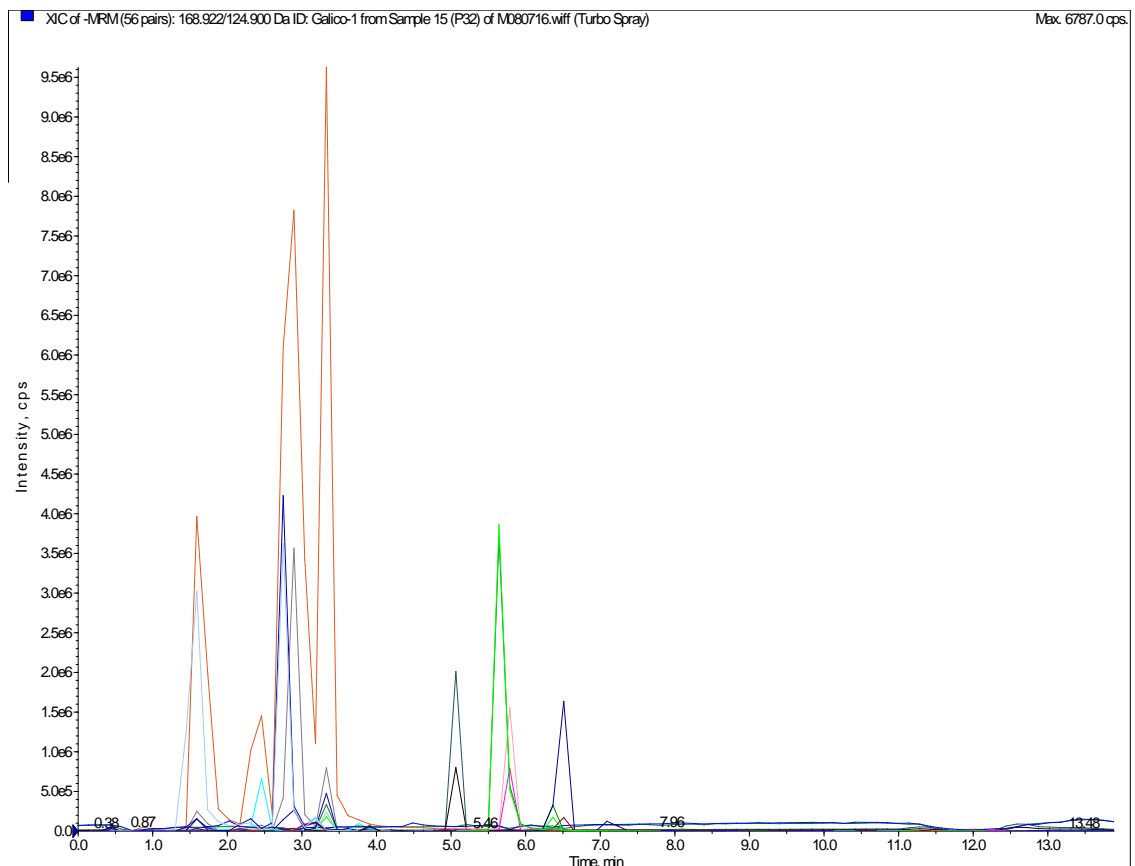


Figura 31. Cromatograma de los polifenoles presentes en *Cryptocarya alba* por UHPLC.

Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS.

Se usó el procedimiento descrito por Re *et al.* (1999), donde el radical ABTS+ se obtuvo mediante la reacción de 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) en forma de sal diamónica (ABTS) (7 mM) y persulfato potásico (2,45 mM) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm. La reducción de dicho radical se midió a través de la disminución de la absorbancia transcurridos 7 minutos. Se determinó el porcentaje de inhibición de acuerdo a $[(A_0 - A_e)/A_0] \times 100$, donde A_0 es la absorbancia sin extracto y A_e es la absorbancia con extracto. Y se expresarán los resultados en mMoles equivalentes de Trolox®.

Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH.

Se utilizó el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Se preparó una solución de 150 μM de DPPH en metanol y se incubaron en oscuridad por dos horas. Luego se añadió el extracto de cada individuo y después de transcurridos 30 minutos se leyó la absorbancia a 520 nm. Se determinó el

porcentaje de inhibición de acuerdo a $[(A_0 - A_e)/A_0] \times 100$, donde A_0 es la absorbancia sin extracto y A_e es la absorbancia con extracto. Y se expresaron los resultados en mMoles equivalentes de Trolox®.

Determinación del poder reductor férrico (FRAP).

Se realizó según el método de Benzie y Strain (1996). El complejo férrico se formó mezclando los siguientes reactivos: 25 ml de buffer de acetato de sodio 300 mM (pH: 3,6), 2,5 ml de solución de 2, 4, 6 tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (10 mmol/L) y 2,5 ml de cloruro férrico (20 mmol/L) en una relación de 10:1:1. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 593 nm y se expresaron como mMoles equivalentes de Trolox®.

5.12. Análisis estadístico.

Se utilizó Excel 2013 y los software estadísticos Minitab® versión 16.0 para Windows (Minitab Inc., State College, PA, EE.UU.), InfoStat® versión 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), STATA 10.1 (Stata Corporation, College Station, EE.UU.) y SPSS 17. (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU). Una vez obtenidos los resultados para los distintos parámetros de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba*, se determinaron las estadísticas descriptivas para cada uno de los parámetros de interés y se realizaron pruebas de normalidad de Anderson-Darling o Shapiro-Wilk, determinando el análisis paramétrico o no-paramétrico de los resultados. En el caso de un comportamiento significativamente normal, se verificó igualdad de varianzas para las pruebas t de Student de muestras independientes y se aplicaron métodos de comparaciones múltiples como Tukey o se aplicó la prueba para muestras dependientes, según el caso. En el caso de ausencia de normalidad, se realizó un análisis de transformación de Box-Cox y de Johnson, no obteniendo una transformación adecuada para la normalidad, de tal forma que se utilizó la prueba de Mann-Whitney o Kruskal Wallis para la comparación de muestras independientes. Para evaluar la correlación entre las variables se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) basado en las correlaciones lineales, para determinar la proyección de las especies en los nueve ejes. Para evaluar la similitud de las especies respecto al conjunto de variables analizadas, se utilizó un Análisis de conglomerados calculado sobre la base de las distancias Euclidianas y el método de Ward para la aglomeración jerárquica.

6. Resultados

6.1. Contenido de principios activos en *C. alba* y *P. boldus*.

Tabla 7. Contenido total de polifenoles y flavonoides en las hojas de *C. alba*.

	TPC (mg AGE/g DS)	TFC (mg QE/g DS)
	n=25	n=25
Invierno	90.5±13.6	26.6±4.6
Primavera	75.1±11.8	22.8±4.2
Verano	84.3±13.0	23.5±6.2
Otoño	86.3±13.3	22.0±4.7
Invierno	68.1±18.3	22.8±5.0
Primavera	61.9±9.0	19.8±3.9
Verano	66.2±12.9	19.8±5.4
Otoño	40.5±14.9	24.1±4.0

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

En las hojas de *C. alba* existen grandes diferencias en el contenido de polifenoles entre cada temporada. Entre las variaciones, la única alza registrada fue entre primavera y verano del 2014, por el contrario tres fuertes bajas se determinaron (Tabla 7 y Tabla 36 Anexo). También una tendencia en la disminución de los valores con el paso del tiempo.

Con respecto a los flavonoides también hay variaciones, se destacan dos importantes disminuciones en los valores entre el invierno y la primavera de cada año (Tabla 37 anexo). Estos resultados no permiten establecer relaciones del contenido de polifenoles con las diferentes estaciones.

En las hojas de *C. alba* hay diferencias entre el contenido de polifenoles y flavonoides según la edad de la hoja, los mayores valores se encontraron en las hojas adultas (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido de polifenoles y flavonoides en *C. alba* según la edad.

	TPC (mg AGE/g)	TFC (mg QE/g)
Hojas nuevas (n=25)	51,16±16,57	20,61±5,84
Hojas adultas (n=25)	84,37±13,01a	22,82±4,17a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$)

Tabla 9. Polifenoles encontrados en las hojas de *C. alba* (ug/g DS)

Hojas	
n=20	
Ác. Cafeico	3.2±1.6
Catequina	23.6±20.2
Ác. Clorogénico	2824.7±960.3
Ác. Cryptoclorogenico	64.5±35.1
Ác. Cumárico	3.1±1.1
Epicatequina	16.8±30.1
Procianidina b1	11.9±16.6
Procianidina b2	11.3±15.2
Procianidina c1	7.4±17.5
Quercitrina	771.5±286.3
Rutina	104.1±67.0

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

Entre los polifenoles cuantificados, el ácido clorogénico fue el encontrado en mayor concentración, luego en importancia viene quercitrina (Tabla 9).

Tabla 10. Contenido de polifenoles totales por sector.

	Sector 1 n=30	Sector 2 n=20
Primavera	69.6±20.9a	66.6±16.1a
Verano	71.9±17.7a	51.6±12.6b
Otoño	81.3±17.6a	61.8±14.8b
Invierno	61.7±22.9a	42.6±12.2b
Primavera	70.9±10.8a	50.2±9.8b
Verano	66.8±17.1a	55.6±14.8b
Otoño	34.9±12.3a	43.0±16.2a
Invierno	88.9±18.2a	58.6±13.4b

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).

Entre las hojas de individuos masculinos y femeninos de *Peumus boldus* no hay diferencias en ninguno de los trimestres donde se evaluó el contenido total de polifenoles (Tabla anexo 22). En los individuos femeninos, los valores encontrados para polifenoles totales fueron más estables en las temporadas de primavera y verano. En otoño e invierno existen diferencias significativas, con alzas y bajas importantes (Tabla anexo 24). En los individuos machos también hay cambios en el contenido de polifenoles, las principales variaciones se concentran en otoño e invierno (Tabla anexo 23). Considerando todos los individuos, no existe una tendencia que permita establecer un patrón u asociación con los mayores valores, en ambos sexos las alzas y bajas se concentraron en los mismos periodos (Tabla anexo 25).

Entre los dos sectores, la zona en que existe aprovechamiento de hojas tiene valores más altos en comparación con las hojas de árboles con libre crecimiento. Estas diferencias significativas se expresan en 6 de las 8 temporadas evaluadas (Tabla anexo 26).

Tabla 11. Contenido de flavonoides totales por sexo y sector.

	Femeninos		Masculinos	
	Sector 1 n=15	Sector 2 n=10	Sector 1 n=15	Sector 2 n=10
Primavera	9.4±1.6	8.9±1.4	10.8±2.0	11.2±2.2

Verano	17.9±2.4	21.9±5.6	17.9±3.8	20.6±3.9
Otoño	20.8±3.6	19.6±3.7	18.8±2.5	20.4±2.6
Invierno	23.1±3.6	22.0±3.8	21.6±3.3	23.8±2.1
Primavera	21.6±3.8	21.4±3.9	20.1±3.0	21.9±2.5
Verano	17.9±4.7	18.5±3.3	16.9±4.0	16.6±4.3
Otoño	18.4±4.7	21.5±3.5	16.9±3.1	21.4±5.5
Invierno	22.9±4.4	18.1±3.9	19.3±3.7	22.7±3.1

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

El contenido de flavonoides varía con el paso de las diferentes temporadas, hay incrementos que comienzan en la temporada de verano y se mantiene el alza hasta el invierno. Esto se observó en los individuos masculinos, femeninos, en los dos sectores y a nivel poblacional (Tabla 11). No hubo diferencias entre los sectores (Tabla anexo 31), ni por el sexo del árbol (Tabla anexo 26). La variación en la cantidad de compuestos fenólicos afectará considerablemente los productos que se elaboren con esas hojas (Tabla 12).

Tabla 12. Compuestos fenólicos encontrados en las hojas de *P. boldus* según el tipo de extracto (ug/g DS).

	Infusiones n=6	Extractos metanólicos n=6
Catequina	452.6±224.1	238.1±165.4
Epicatequina	338.8±194.5	263.8±238.1
Procianidina b1	962.7±499.7	294.8±210.1
Procianidina b2	819.3±434.3	259.6±184.3
Procianidina c1	ND	ND
Quercetina	ND	4.9±5.3
Quercitrina	124.9±85.4	258.9±90.4
Rutina	159.3±55.0	164.8±61.4

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

En los vástagos remanentes, las hojas adultas tienen un mayor contenido de polifenoles totales en comparación con las hojas nuevas y en los individuos

masculinos esta diferencia es significativa. En el contenido de flavonoides no hay diferencias por la edad de la hoja, ni por el sexo de la planta (Tabla 13).

Tabla 13. Contenido de polifenoles y flavonoides en *P. boldus* según la edad.

	TPC (mg AGE/g DS)		TFC (mg QE/g DS)	
	Femeninos	Masculinos	Femeninos	Masculinos
Hojas viejas (n=25)	63.2±19.5	63.4±24.3a	19.6±4.3	18.9±3.9
Hojas nuevas (n=25)	56.5±18.0	52.5±19.2b	18.5±3.5	18.8±4.4

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$)

En las hojas viejas de individuos machos y hembras los alcaloides encontrados en mayor concentración fueron laurotetanina, norglaucina, N-metillaurotetanina, coclaurina, predicentrina e isocoridina. En cambio, en las hojas nuevas los alcaloides más importantes son la predicentrina y la isocoridina, este último alcaloide es el único compuesto encontrado en mayor concentración en las hojas nuevas, por el contrario, en 7 de los 11 alcaloides cuantificados el material de mayor edad tiene valores más altos (Tabla 14).

Entre las hojas viejas, las de individuos hembras tienen los valores más altos, pero sólo son diferencias significativas para la laurotetanina. En las hojas nuevas hay diferencias según el sexo para boldina, laurotetanina, N-metillaurotetanina y norglaucina, encontrándose esta vez los mayores valores en los machos (Tabla 14).

Tabla 14. Concentración de alcaloides en hojas de *P. boldus*, según el sexo y la edad (ug/g DS).

	Hojas viejas		Hojas nuevas	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
	n= 30	n= 30	n= 30	n= 30

Reticulina**	195.5±108.4b	168.3±152.6b	100.6±299.8a	81.3±97.6a
Norisoboldina*	201.3±156.1a	127.4±111.8b	68.7±70.1c	107.4±148.7bc
Laurolitsina*	192.5±146.2a	125.4±108.0ab	70.9±77.9c	110.9±137.5bc
Boldina*	151.3±90.7c	130.1±101.7c	51.3±48.2a	82.3±74.9b
N-Me-secoboldina**	47.2±32.9b	39.3±33.2b	16.9±32.9a	21.8±23.5a
Laurotetanina (LT)*	531.0±269.6a	454.1±245.6a	144.3±157.9c	192.8±127.4b
N-Me-LT*	442.9±233.0a	364.5±248.2a	134.1±234.8c	176.4±177.6b
Predicentrina*	415.8±276.2a	355.9±272.2ab	315.8±347.7b	424.2±388.9ab
Norglaucina**	553.1±314.9c	544.6±329.6c	244.3±299.6a	392.8±334.9b
Coridina*	120.5±71.2a	121.8±78.5a	135.6±96.7a	190.0±152.3a
Isocoridina*	120.5±262.9b	377.7±232.5b	464.8±299.6a	605.5±363.9a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes * Test Tukey ($p < 0.05$) ** Test Kruskal Wallis ($p < 0.05$).

Al estudiar el perfil fenólico de los individuos se encontró en cantidades importantes, epicatequina, procianidina b1, catequina, procianidina, b2 (Tabla 16 y 17). Al comparar las hojas del vástago remanente con las hojas de los vástagos de rebrote de tocón, se puede apreciar que las hojas del remanente tienen valores de polifenoles totales significativamente más altos. Con respecto a los flavonoides, son las hojas del rebrote de tocón las que tienen los valores más altos y en los individuos masculinos las diferencias son significativas (Tabla 15).

Tabla 15. Contenido de polifenoles y flavonoides totales en hojas de *P. boldus* de distinto vástago.

	TPC (mg AGE/g DS)		TFC (mg QE/g DS)	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Hojas de rebrote (n=15)	55.1±10.6	50.2±7.2	22.5±2.3	28.9±2.9a
Hojas de	70.7±10.8a	71.2±16.1a	21.6±3.8	20.1±3.0

vástagos
remanentes
(n=15)

Los resultados son presentados como promedio \pm desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$)

Tabla 16. Compuestos fenólicos encontrados en las hojas de hembras de *P. boldus* según el tipo de vástago (ug/g DS).

	Vástagos remanentes n=15	Vástagos de rebrote n=15
Catequina	308.6 \pm 104.8	275.7 \pm 129.3
Epicatequina	350.5 \pm 126.9	248.2 \pm 114.7
Procianidina b1	318.6 \pm 188.5	308.4 \pm 243.3
Procianidina b2	280.6 \pm 187.3	310.4 \pm 240.9
Procianidina c1	75.2 \pm 111.2	80.5 \pm 62.8
Quercetina	14.5 \pm 8.5	22.5 \pm 8.7
Quercitrina	43.0 \pm 30.3	61.9 \pm 47.5
Rutina	52.9 \pm 23.0	111.4 \pm 42.3

Los resultados son presentados como promedio \pm desviación estándar.

Tabla 17. Compuestos fenólicos encontrados en las hojas de machos de *P. boldus* (ug/g DS).

	Vástagos remanentes n=15	Vástagos de rebrote n=15
Catequina	262.1 \pm 159.1	227.3 \pm 139.4
Epicatequina	298.7 \pm 133.2	214.3 \pm 127.8
Procianidina b1	252.3 \pm 172.4	211.2 \pm 215.7
Procianidina b2	212.6 \pm 177.9	201.4 \pm 202.9
Procianidina c1	58.7 \pm 106.6	50.1 \pm 52.9
Quercetina	12.2 \pm 6.7	21.5 \pm 8.9
Quercitrina	45.7 \pm 34.4	80.6 \pm 47.3

Rutina	46.2±19.1	126.1±54.2
--------	-----------	------------

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

En cuanto al contenido de alcaloides, un número importante (9) se encuentran en cantidades mayores en las hojas producidas en los vástagos del rebrote (Tabla 18).

Tabla 18. Contenido de alcaloides en hojas de *P. boldus* de distinto vástago.

	Remanente n= 30	Rebrote de tocón n= 30
Higenamina*	243.6±184.3a	128.1±110.9b
Coclaurina*	993.5±714.1b	1787.0±632.9a
N-Me-coclaurina*	278.7±217.8b	406.4±271.5a
Reticulina*	466.3±348.4b	516.2±327.7a
Norisoboldina*	155.4±100.7a	168.8±127.7a
Laurolitsina*	152.9±99.1a	168.8±121.1a
Boldina*	177.6±72.2a	216.6±105.5a
Laurotetanina (LT)*	515.6±265.5b	580.1±275.4a
N-Me-LT**	960.9±374.9b	1640.1±568.2a
Predicentrina*	459.3±260.3b	877.3±251.1a
Norglaucina*	1020.5±391.2b	1741.6±594.0a
Coridina*	276.4±164.5b	568.6±170.4a
Isocoridina*	447.1±251.7b	944.1±267.9a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes * Test Tukey ($p < 0.01$) ** Test Kruskal Wallis ($p > 0.05$).

6.2. Cuantificación de polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en otra población de *Peumus boldus* de María Pinto (R.M.) bajo manejo.

Se utilizó una población cercana a la de estudio, se evaluaron las infusiones de hojas nuevas y viejas de los vástagos remanentes y las de rebrote de tocón. El contenido de polifenoles es mayor en las hojas adultas y en las de remanente. El contenido de flavonoides sólo tiene diferencias en las hojas adultas (Figura 32).

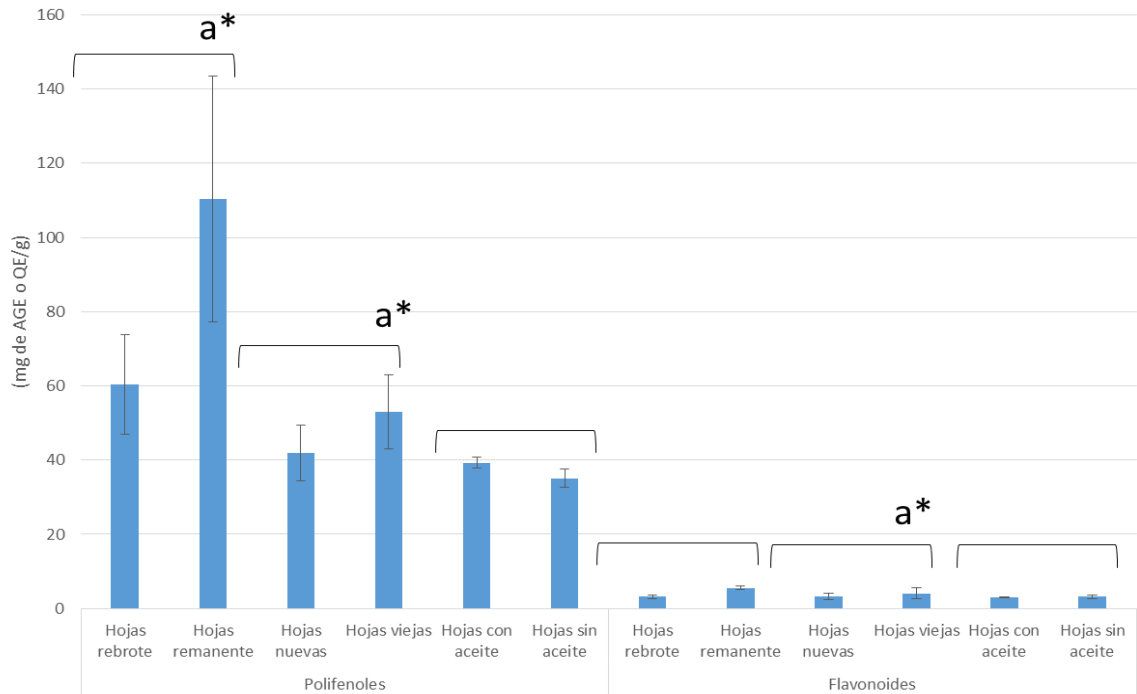


Figura 32. Contenido de polifenoles y flavonoides de diferentes infusiones con hoja de *P. boldus*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).

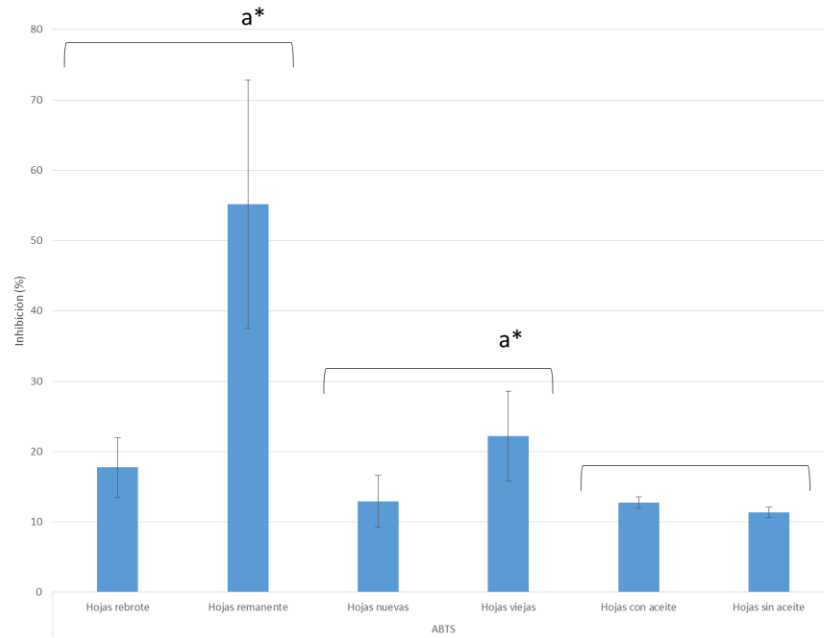


Figura 33. Capacidad antioxidante ABTS de diferentes infusiones con hoja de *P. boldus*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).

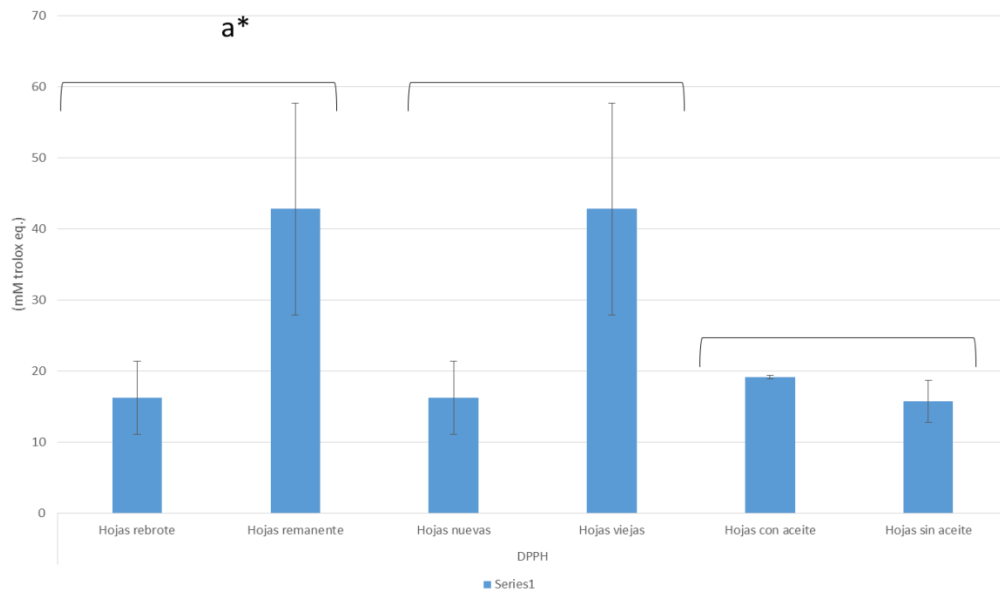


Figura 34. Capacidad antioxidante DPPH de diferentes infusiones con hoja de *P. boldus*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).

Con respecto a la capacidad antioxidante y la procedencia de las hojas, el material que proviene de los vástagos remanentes obtiene mejores resultados en los ensayos ABTS, DPPH y FRAP. En cuanto a la edad las

hojas, las viejas tienen una capacidad antioxidante significativamente mayor en los ensayos, ABTS y FRAP (Figura 33, 34 y 35).

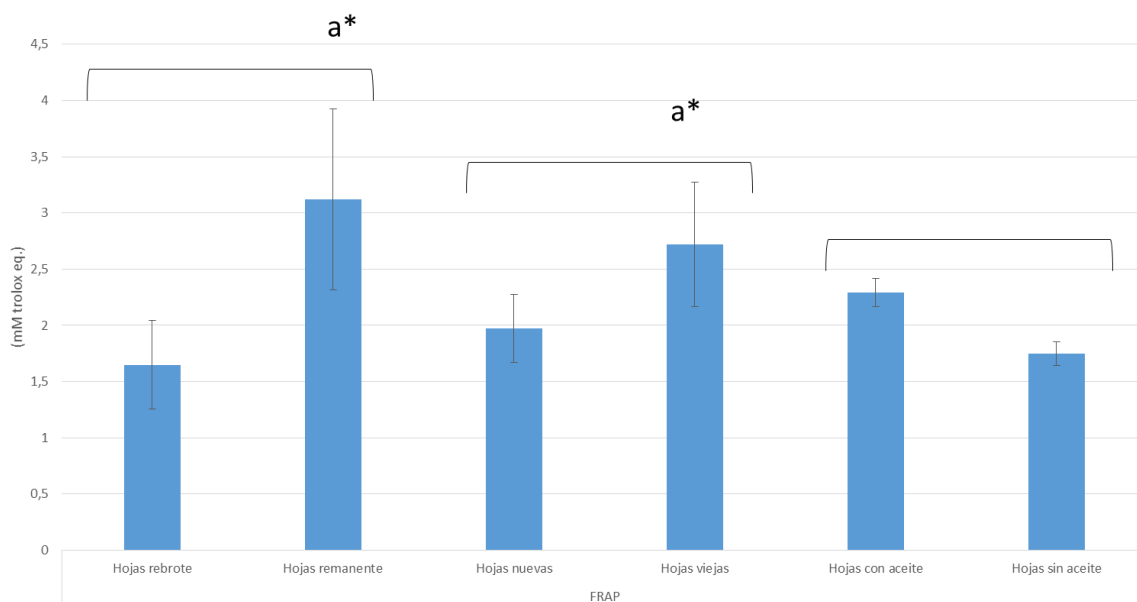


Figura 35. Capacidad antioxidante FRAP de diferentes infusiones con hoja de *P. boldus*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student ($p < 0.05$).

La extracción del aceite esencial no alteró las cantidades de polifenoles y flavonoides totales, tampoco la capacidad antioxidante medidas en los ensayos ABTS, FRAP y DPPH.

6.3. Encuestas y catas de productos de *P. boldus* y *C. alba*.

Del total de encuestados, el 85% ha consumido infusiones de plantas medicinales, un 39% lo hace al menos 3 veces por semana, un 77% al menos 1 vez por semana. Un 72% está dispuesto a probar nuevas infusiones, un 73% consume estos productos durante todo el año, adquiriéndolos principalmente en supermercados, autocultivo y ferias libres. Una proporción importante de los encuestados también utiliza otras bebidas calientes, el 85% consume té, el 64% café y 45% mate.

Según los propios encuestados entre las principales causas que sustentan el consumo están las propiedades medicinales, la tradición y lo refrescante de la bebida. Entre los beneficios medicinales, los más buscados son las propiedades digestivas y para combatir dolores, coincidentemente usos ancestrales descrito para boldo y peumo. Más atrás, se mencionaron para disminuir el estrés, insomnio y como fuente de antioxidantes naturales.

Un 81% de los encuestados conoce y consume infusiones de plantas medicinales nativas, liderando la lista se encuentran boldo (72.3%) y matico (69%). Con respecto a peumo, sólo un 16.5% sabe o ha consumido infusiones de la especie.

Entre los sabores, las hojas con aceite obtienen mejores evaluaciones que las hojas sin el aceite. Los sabores de *P. boldus* y *C. alba* fueron evaluados con una nota del promedio, donde *P. boldus* es un poco más agradable. La mejor evaluación fue para la infusión elaborada con hojas *P. boldus* de cultivo bajo sombra (Tabla 19).

Tabla 19. Evaluación del sabor de las infusiones.

	Evaluación promedio	Disposición a consumir la infusión nuevamente
<i>P. boldus</i> normal	4.3	61%
<i>P. boldus</i> sin aceite esencial	4.2	44%
<i>C. alba</i> normal	3.7	33%
<i>C. alba</i> sin aceite esencial	3.6	31%
<i>P. boldus</i> hojas de cultivo	5.4	86%

Entre los productos de *P. boldus* y *C. alba* que se pueden obtener por arrastre de vapor, el olor del aceite de boldo fue el producto con mejor evaluación. Los productos de *C. alba* no fueron bien evaluados (Tabla 20), definiéndolos principalmente como fuertes, grasosos y pesados.

Tabla 20. Evaluación de olores.

	Evaluación promedio
Aceite esencial de <i>P. boldus</i>	5.0
Aceite esencial de <i>C. alba</i>	4.2
Hidrolato de <i>P. boldus</i>	4.1
Hidrolato de <i>C. alba</i>	4.2

6.4 Cultivo medicinal de *Peumus boldus* y *Cryptocarya alba*.



Figura 36. Preparación del sitio e inicio del ensayo.

Los resultados del cultivo medicinal para la producción de hojas de peumo y boldo son muy interesantes, una experiencia en donde se lograron buenos crecimientos, posibilitando incluso un modelo de huerto familiar autogestionable (Figura 36 y 37).

En los primeros años las plantas son muy susceptibles a las heladas y a la radiación solar por lo que la malla brindó grandes beneficios protegiendo los individuos débiles y los brotes. A pesar de contar con una presencia importante de caracoles e insectos en el ensayo, las hojas del 98% de los arboles no presentan daños, lo que representa su resistencia y una ventaja en el control de agentes patógenos.



Figura 37. Cultivo de *C. alba* y *P. boldus* a los 4 años.

Tabla 21. Parámetros de las hojas de *P. boldus* en individuos de 3,5 años.

	Área (cm ²)	Perímetro (cm ²)	Largo (cm)	Ancho (cm)
Sombra 40% (n=25)	16,5±2,4	17,0±1,1	6,0±0,3	3,58±0,3
Sombra 80% (n=25)	20,0±3,9a	18,8±1,7a	6,4±0,6a	4,0±0,5a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student (p<0.01)

El porcentaje de sombra empleado en el cultivo puede influenciar los parámetros métricos de las hojas, en boldo se encontraron hojas más grandes en un porcentaje de sombra mayor (Tabla 21). En el caso de peumo también se observaron diferencias en las características de las hojas, con un 80% de sombra las hojas son significativamente más grandes (Tabla 22).

Tabla 22. Parámetros de las hojas de *C. alba* en individuos de 3,5 años.

	Área (cm ²)	Perímetro (cm ²)	Largo (cm)	Ancho (cm)
Sombra 40% (n=25)	11,9±2,2	15,1±1,6	5,7±0,5	2,8±0,3
Sombra 80% (n=25)	15,1±2,3 ^a	17,3±1,4 ^a	6,4±0,5 ^a	3,3±0,3 ^a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student (p<0.001)

A los dos años de edad, se puede apreciar que las hojas y tallos de las dos especies ya cuentan con polifenoles. Las hojas son un material más atractivo que los tallos y entre las hojas *C. alba* tiene un gran potencial (Tabla 23).

Tabla 23. Contenido de polifenoles y flavonoides en individuos de 2 años.

	Hojas		Tallos	
	TPC (mg AGE/g)	TFC (mg QE/g)	TPC (mg AGE/g)	TFC (mg QE/g)
<i>P. boldus</i> (n=15)	43,72±14,98	16,37±2,1	6,11±3,26	3,95±1,24

<i>C. alba</i> (n=15)	72,49±19,89	21,86±6,7	7,50±2,92	2,75±0,5
-----------------------	-------------	-----------	-----------	----------

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

A los 3,5 años de cultivos, en las dos especies, un porcentaje menor sombra produce mayores contenidos de polifenoles totales, pero sólo en *C. alba* esta diferencia es significativa. El contenido de flavonoides no se ve afectado por la sombra (Tabla 24).

Tabla 24. Contenido de polifenoles y flavonoides en individuos de 3,5 años.

	<i>Peumus boldus</i>		<i>Cryptocarya alba</i>	
	TPC (mg AGE/g)	TFC (mg QE/g)	TPC (mg AGE/g)	TFC (mg QE/g)
Cultivo 40% (n=25)	29,44±9,00	22,40±3,66	55,9±11,6a	25,4±5,1
Cultivo 80% (n=25)	25,43±6,79	22,83±4,54	42,1±9,6b	27,5±2,7

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test t de student (p<0.001).

Al analizar los compuestos fenólicos encontrados en mayor importancia en *P. boldus*, catequina, epicatequina, procianidina b2, quercitrina y rutina alcanzan un mayor contenido en las hojas otorgándoles un menor porcentaje de sombra en su cultivo (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración de polifenoles en hojas de *P. boldus* (ug/g DS).

	Hojas de cultivo	
	40% sombra n= 25	80% sombra n= 25
Catequina	762.4±553.2a	359.4±398.2b
Epicatequina	498.8±328.7a	236.2±237.5b
Procianidina B1	290.3±306.6a	106.2±131.5a
Procianidina B2	272.2±283.2a	99.4±121.9b
Procianidina C1	78.9±78.6a	31.1±38.2a

Quercitrina	75.8±45.2a	39.2±30.9b
Rutina	205.2±98.1a	157.1±66.4b

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test de Tukey (p<0.05).

En ambos tratamientos, los alcaloides encontrados en mayor concentración son laurotetanina, norglaucina, N-metillaurotetanina, coclaurina, predicentrina e isocoridina. Con la excepción de laurotetanina, laurolitsina y norisoboldina, nueve alcaloides se encontraron en mayor concentración en el sector con mayor porcentaje de sombra (Tabla 26).

Tabla 26. Concentración de alcaloides en hojas de *P. boldus* (ug/g DS).

	Hojas de cultivo	
	40% sombra n= 25	80% sombra n= 25
Higenamina**	70.7± 61.8b	146.7±97.3a
Coclaurina*	1401.5±351.7a	1390.2±367.2a
N-Me-coclaurina*	506.2±232.4b	801.2±403.8a
Norreticulina	-	0.14±0.72
Reticulina*	446.4±234.4b	668.0±279.7a
Norisoboldina*	246.2±92.3a	184.7±102.5a
Laurolitsina*	223.4±85.1a	171.0 ±88.6b
Boldina*	142.7±68.3b	236.3±90.0a
Secoboldina**	30.5±19.8a	17.0±19.8a
N-Me-secoboldina*	63.1±20.0b	92.8±39.0a
Laurotetanina (LT)*	2444.7±920.6a	1986.1±685.9a
N-Me-LT*	2012.7± 616.5b	2721.3±1172.8a
Predicentrina*	985.6±347.4b	1439.9±586.9a
Norglaucina*	2072.3±653.1b	2904.2±1090.7a
Glaucina	0.07±0.22	0.46±0.84

Coridina*	580.1±216.8b	849.9±370.4a
Isocoridina*	963.7±335.8b	1423.7±573.5a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes * Test Tukey (p<0.01) ** Test Kruskal Wallis (p<0.05).

La concentración de alcaloides encontrada en las hojas de cultivo fueron valores altos, sobre un 1%. En comparación con las hojas de boldos de dos poblaciones naturales bajo manejo y una población con árboles sobremaduros, las hojas de cultivo tienen concentraciones significativamente mayores (Tabla 27).

Las hojas de las 4 procedencias tienen un patrón similar con respecto a los alcaloides más importantes, laurotetanina, norglaucina, N-metillaurotetanina, coclaurina, predicentrina e isocoridina. En comparación, las hojas de cultivo tienen los valores significativamente más altos en 13 de los alcaloides analizados (Tabla 27). Entre las hojas de poblaciones manejadas silviculturalmente (1 y 2) y la de mayor longevidad no existen grandes diferencias, si bien en las hojas longevas hay valores más altos para alcaloides como la N-metillaurotetanina y norglaucina, estas concentraciones no logran diferenciarse de ambas poblaciones manejadas, sólo de una (Tabla 27).

Tabla 27. Concentración de alcaloides en hojas de *P. boldus* de diferentes poblaciones (ug/g DS).

	Cultivo n= 50	Población 1 n= 15	Población 2 n =30	Árboles longevas n=15
Higenamina*	108.7±89.3b	42.8±30.2b	nd	42.7±53.0b
Coclaurina*	1395.9±356.1a	1076.7±472.2b	nd	758.1±453.4b
N-Me-coclaurina*	529.2±311.5a	323.1±245.4b	nd	236.5±197.2b
Reticulina**	557.3±278.8b	244.7±177.2a	181.9±131.7a	296.4±244.6a
Norisoboldina**	215.4±101.4b	131.1±59.3a	164.3±139.4a	182.1±188.0a
Lauroitsina*	197.2±90.0a	125.0±59.2bc	158.9±131.6ab	177.4±183.4c
Boldina*	189.5±92.1a	109.8±53.9b	140.7±95.9b	107.2±81.4b
Secoboldina**	23.8±20.7b	14.6±7.1a	nd	21.7±10.9a
N-Me-secoboldina**	78.0±34.2b	39.5±15.5a	43.3±32.9a	42.8±26.9a
Laurotetanina (LT)*	2215.4±836.2a	464.3±237.8c	492.6±258.2b	633.5±298.2b

<i>N</i> -Me-LT**	2367.0±993.9c	480.2±198.6ab	403.7±241.6a	1044.5±636.5b
Predicentrina*	1212.7±529.6a	762.7±314.4b	385.9±273.1c	632.7±372.6b
Norglaucina**	2488.3±983.9c	1040.7±432.7b	548.9±319.1a	1026.6±636.7b
Coridina*	714.9±329.8a	428.7±182.2b	121.2±74.2c	342.6±211.4b
Isocoridina*	1193.7±518.9a	756.2±312.2b	386.9±245.8c	617.0±357.8b

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, * Test Tukey ($p < 0.01$) ** Test Kruskal Wallis ($p < 0.05$); nd: no determinado.

Tabla 28. Concentración de alcaloides en hojas de *C. alba* cultivadas.

	Hojas de cultivo	
	40% sombra	80% sombra
	n= 25	n= 25
Higenamina*	6.96±7.33b	15.01± 14.45a
Coclorina*	43.48±39.09a	25.29±24.99a
<i>N</i> -Me-coclorina*	4.34±4.81b	5.28±5.51a
Norreticulina	-	-
Reticulina*	32.60±29.76a	31.49±36.05a
Norisoboldina**	30.1±36.4a	10.5±15.7b
Lauroitsina**	22.83±30.79a	8.34±11.34b
Boldina*	57.5±60.2a	30.0±36.2b
Laurotetanina (LT)**	29.93±30.39a	28.51±31.74a
<i>N</i> -Me-LT*	0.84±0.40b	0.99±1.35a
Predicentrina*	0.72±0.66b	1.25±2.3a
Norglaucina*	7.80±7.70a	6.90±7.14a
Glaucina	0.003±0.007	0.01±0.02
Isocoridina*	0.67±0.43b	1.13±2.07a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, *Test Tukey ($p < 0.01$) ** Test Kruskal Wallis ($p < 0.05$).

Con respecto a las hojas cultivadas de *C. alba*, las cantidades encontradas son inferiores en comparación con las hojas de boldo. En las hojas de cultivo de peumo los alcaloides reticulina, boldina, laurólitsina, laurotetanina y coclaurina son los más importantes, encontrando diferencias significativas para boldina, norisoboldina y laurólitsina en el sector con menor porcentaje de sombra (Tabla 28).

Los resultados del ensayo de cultivo de peumo y boldo evidenciaron la importancia del riego (Figura 38), ya que este factor provoca diferencias significativas en crecimiento de las plantas de *Cryptocarya alba* (Tabla 29) y *Peumus boldus* (Tabla 30).

Tabla 29. Parámetros biométricos en las hojas de cultivo de *C. alba*.

	Altura (cm)	DAC (cm)	DAC2*HT (cm ³)
Con riego	99,0±25,9 a	1,34±0,37 a	202,2±136,0 a
Sin riego	74,8±27,4	1,19±0,32	123,0±101,0

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test Mann Whitney (p<0.01)

Tabla 30. Parámetros biométricos en las hojas de cultivo de *P. boldus*.

	Altura (cm)	DAC (cm)	DAC2*HT (cm ³)
Con riego	98,7±22,7 a	1,77±0,5 a	363,6±275,8 a
Sin riego	58,2±20,8	1,23±0,39	108,8±107,7

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test Mann Whitney (p<0.01).



Figura 38. Situación sin riego y con riego, marzo 2016.

Un indicador importante del rendimiento es la producción de hojas, a los 3,5 años los individuos de *P. boldus* sin fertilizante producen en promedio 18 gramos, con un máximo de 34 g. En ambas especies, los tratamientos de sombra no producen diferencias en la producción de hojas (Tabla 31).

Tabla 31. Producción de hojas en individuos de 3,5 años.

	<i>Peumus boldus</i>	<i>Cryptocarya alba</i>
Cultivo 40 % sombra (n=25)	18,32±4,95 a	13,64±4,97 a
Cultivo 80 % sombra (n=25)	17,92±6,29 a	15,16±6,27 a

Los resultados son presentados como promedio \pm desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, test t de student ($p < 0.05$).

6.5. Reforestación

6.5.1. Ensayo Quinta Región Leyda

El ensayo se instaló en el invierno del 2015 con riego suplementario (2 veces al mes), una malla plástica como protector individual y se utilizó la cobertura del dosel a favor para disminuir la radiación. Para *Cryptocarya alba* se utilizaron plantas de 2,5 años, con una sobrevivencia muy baja del 5% (Figura 39).



Figura 39. Ensayo de restauración Quinta Región.

Para *Peumus boldus* se utilizaron individuos de 5 años, ejemplares de tamaño pequeño. La sobrevivencia obtenida fue del 90%, pero no se observan crecimientos importantes en las plantas (Figura 40).



Figura 40. Detalles de las plantas.

Considerando una plantación de 150 plantas de 5 años, el principal costo de reforestar con boldo son las plantas. En este caso, una gran limitante son las pobres condiciones del sitio que repercutieron en la necesidad de utilizar plantas de mayor edad. En este escenario son muy altos los costos de reforestar y lo transforman en una alternativa poco viable (Tabla 32).

Tabla 32. Costo de instalación y mantenimiento por tres años en la V Región.

Item	Insumos	Cantidad	Unidad	Unitario (\$)	Total
Plantación	Pala	1	u	7.000	7.000
	Chuzo	1	u	15.000	30.000
Protección	Malla anticonejos	150	u	150	22.500
	Tutores (70 cm)	300	u	15	4.500
Insumos	Plantas	150	u	4.500	675.000
Sistema de Riego	Plansas 1/2 pulgada	150	m	260	39.000
	Tee plana	25	u	390	9.750
	Codo plana	10	u	120	1.200
	Unión	4	u	250	1.000
	Llave	3	u	2.000	6.000

Mano de obra	Plantación	1	jornada	15.000	15.000
	Mantenimiento	9	jornadas	15.000	135.000
Riego		3	años	120.000	360.000
Total					1.305.950

6.5.2. Ensayo Región Metropolitana.

El ensayo se instaló en el otoño del 2016 con riego por goteo, bajo dosel y con una malla plástica como protector individual. La sobrevivencia fue del 99% para ambas especies (Figura 41).



Figura 41. Sector de reforestación, Región Metropolitana.

Tabla 33. Costo de instalación y mantenimiento por tres años.

Item	Insumos	Cantidad	Unidad	Unitario (\$)	Total
Plantación	Pala	1	u	7.000	7.000
	Chuzo	1	u	15.000	15.000
Protección	Malla anticonejos	150	u	150	22.500
	Tutores (70 cm)	300	u	15	4.500
Insumos	Plantas	150	u	450	67.500
Sistema de	Plansas 1/2	400	m	260	104.000

Riego	pulgada				
	Tee plana	25	u	390	9.750
	Codo plana	4	u	120	480
	Unión	4	u	250	1.000
	Llave	3	u	2.000	6.000
Mano de obra	Plantación	1	jornada	15.000	15.000
	Mantención	9	jornada	15.000	135.000
Riego		3	años	120.000	360.000
Total					747.730

En este escenario se redujeron los costos en 43% en comparación con el primer ensayo y se debe a que las condiciones del sitio eran más favorables y fue posible utilizar plantas de 1 año (Tabla 33).

6.5.3. Otros resultados obtenidos

***Cryptocarya alba* Mol.**

El análisis de *Cryptocarya alba* condujo a la aislación de 12 alcaloides: las benciltetrahydroisoquinolinas reticulina, norreticulina, coclaurina, *N*-metilcoclaurina y 8 aporfina, algunos de estos ya documentados para el género *Cryptocarya*. Se trabajó con la biomasa de un ejemplar adulto y los rendimientos en alcaloides totales fueron muy bajos: la mayor concentración se encontró en la corteza (0,057%), seguida por la raíz (0,025%), madera (0,009%) y con una cantidad exigua las hojas (0,003%). Posteriormente, se consideraron individuos de diferentes edades, evidenciando que la composición alcaloidal se ve influenciada por el estado de desarrollo de los individuos. Los mayores valores se encontraron en las cortezas y particularmente en la de individuos adultos con un DAP > 30cm, en estos árboles se encontró glaucina y en cantidades mayores que en las otras muestras predicentrina, norglaucina e isocoridina (Tabla 34).

Tabla 34. Concentración de alcaloides en la biomasa de *C. alba* (ug/g DS).

Plantas < 3 años		Arboles DAP < 10cm			Arboles DAP > 30 cm	
n=7	n=7	n=7	n=12	n=12	n=7	n=7
Hojas	Tallos	Hojas	Madera	Cortezas	Hojas	Cortezas

Lauroitsina	4.7-111.2	14.3-35.1	7.5-24.6	21.8-153.6	0.6-11.6	nd-57.3	nd-39.2
Boldina	1.38-42.2	47.1-97.2	6.1-19.1	3.7-62.7	1.0-6.4	4.6-88.6	8.7-123.7
Reticulina	2.81-43.9	10.6-37.0	7.3-36.2	12.2-135.0	17.3-287.0	20.1-48.5	3.6-542.6
Laurotetanina	0.7-165.7	0.9-12.6	1.2-19.7	4.22-35.9	6.6-180.6	1.46-13.5	14.6-323.4
Predicentrina	nd-3.1	nd-4.22	nd-2.0	0.5-3.58	0.27-5.1	nd-4.2	1.4-44.3
Isocoridina	nd-1.86	nd-2.0	nd	nd-1.7	nd-2.9	nd-2.1	0.71-21.3
Norglaucina	0.6-19.8	1.2-6.27	0.38-6.4	0.24-3.55	0.6-75.9	nd-5.2	2.7-60.0
N-Me-Laurotetanina	0.6-18.1	nd-6.8	0.36-6.6	0.29-3.7	1.2-170.3	nd-9.5	3.6-74.7

Resultados expresados como máximo y mínimo; nd: no detectado.

En las cortezas de las tres poblaciones, la reticulina es el compuesto más importante, seguido por laurotetanina. A nivel latitudinal se encontraron diferencias significativas en la concentración de laurotetanina. También, en algunos alcaloides la concentración responde en alguna medida a variables ambientales a nivel de sitio y en este aspecto la población de la Región Metropolitana presenta los valores más altos en reticulina duplicando a las otras dos (Tabla 35).

Tabla 35. Concentración de alcaloides en las cortezas de *C. alba* (ug/g DS)

	C. Dormida n=25	M. Pinto n=25	Curanipe n=25
Lauroitsina	2.21 ±2.34b	4.34±3.20a	3.62±3.84ab
Boldina	2.10±1.8b	2.98±1.6a	3.21±2.5a
Reticulina	68.70±54.41	121.56±76.89a	68.95±51.0
Laurotetanina	23.57±21.78b	63.81±54.89a	60.59±55.48a
Norglaucina	4.57±4.68b	11.40±15.98ab	17.82±14.97a
N-Me laurotetanina	8.63±8.67b	24.59±35.3ab	37.19±53a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Test Kruskal Wallis (p<0.01)

En la madera de las tres poblaciones la reticulina es un componente importante del total de alcaloides. En igual o mayor importancia se encontró

laurolitsina, un alcaloide muy característico de los componentes leñosos de algunas especies del orden Laurales y que se encuentra en cantidades importantes en *Peumus boldus*, *Litsea cubeba* (Han *et al.*, 2009) y *Lindera aggregata* (Zhang *et al.*, 2014). En las poblaciones naturales se evidencian diferencias significativas en la concentración de los dos alcaloides más importantes, reticulina y laurolitsina, pero no en un eje latitudinal, ya que es la de la Región Metropolitana la que duplica a las otras en la cantidad de laurolitsina (Tabla 36).

Tabla 36. Concentración de alcaloides en las maderas de *C. alba* (ug/g DS).

	C. Dormida n=25	M. Pinto n=25	Curanipe n=25
Laurolitsina	31.83 ±27.7b	66.95±33.42a	26.0±41.4b
Boldina	14.92±19.4	13.72±7.59	12.71±12.39
Reticulina	34.32±18.75a	44.73±22.5a	23.09±30.36b
Laurotetanina	8.28±7.35b	14.42±8.08a	11.77±17.17b
Norglaucina	1.09±1.26	0.91±0.68	1.48±1.15
N-Me laurotetanina	2.26±2.68	1.01±0.72	1.74±1.34

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, test Kruskal Wallis (p<0.01)

En las poblaciones de más al norte (VR y RM), las hojas cuentan con la mayor concentración de polifenoles y flavonoides, luego se encuentra la corteza y con cantidades bastantes menores la madera. Sin embargo, en la población del sur (VIIR) ocurre algo distinto, en esta área de estudio se expresan las mayores diferencias, encontrando que las hojas contienen la menor cantidad de polifenoles y flavonoides pero, por el contrario, las más altas concentraciones en las cortezas. La latitud afecta el contenido de estos compuestos en las hojas y cortezas, no así en la madera (Figura 42). En todos los componentes, la relación entre el contenido de polifenoles y flavonoides es positiva, pero débil. En la corteza se encontraron procianidina b1, procianidina b2, catequina, epicatequina y ácido clorogénico en concentraciones importantes (Tabla 37).

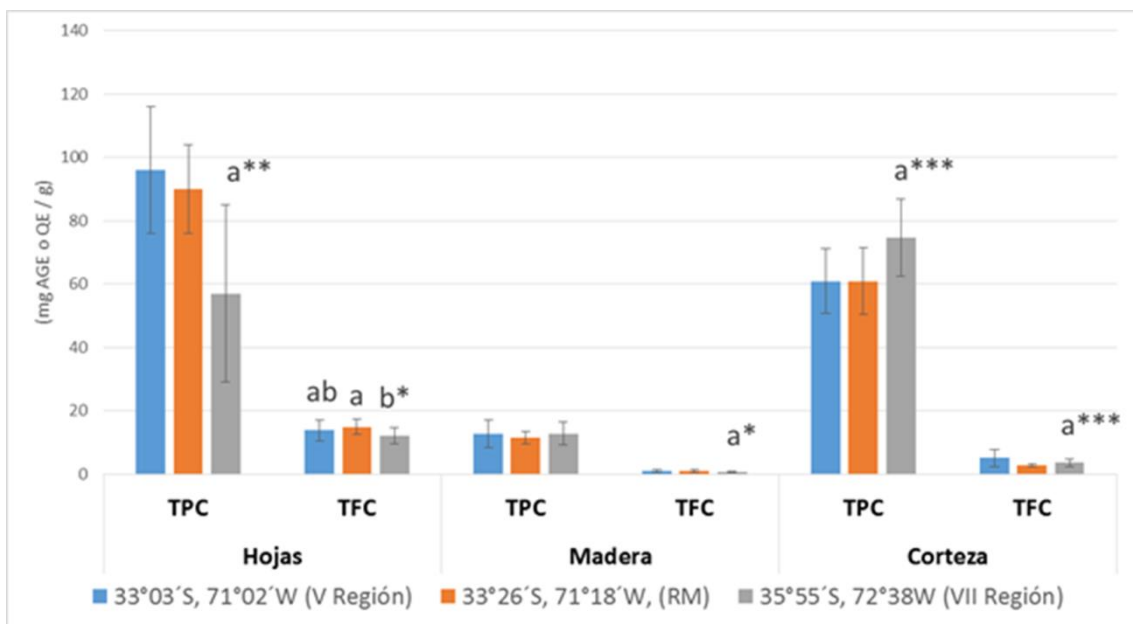


Figura 42. Concentración de polifenoles y flavonoides en 3 poblaciones de *C. alba*.

Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar. TPC: mg AGE/g droga seca. TFC: como mg QE/g droga seca. Letras distintas indican diferencias significativas (*) Tukey $p < 0,05$; (**) Tamhane $p < 0,05$; (***) Kruskal-Wallis $p < 0,001$.

Tabla 37. Polifenoles encontrados en las cortezas de *C. alba* ($\mu\text{g/g DS}$).

Cortezas	
n=20	
Catequina	214.0 \pm 68.0
Ác. Clorogénico	174.9 \pm 129.6
Ác. Cryptoclorogenico	8.4 \pm 6.4
Epicatequina	207.5 \pm 64.1
Miricetina	9.9 \pm 1.7
Procianidina b1	219.5 \pm 98.9
Procianidina b2	238.2 \pm 107.3
Procianidina c1	65.2 \pm 34.5
Quercetina	15.0 \pm 6.4
Quercitrina	74.2 \pm 44.6

Rutina	4.1±2.7
--------	---------

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

***Peumus boldus* Mol.**

Tabla 38. Distribución de alcaloides en la biomasa de *P. boldus* (%)

	Corteza	Madera	Raíz	Hojas
Coclaurina	8.8	0	6.1	17.5
N-Me-coclaurina	0.64	1.9	0	9.0
Reticulina	10.7	7.9	20.0	8.6
Norisoboldina	10.7	35.5	30.9	5.4
Laurokitsina	10.2	33.6	29.0	5.0
Boldina	57.7	16.8	12.7	8.5
N-Me-secoboldina	0.24	0.1	0	0.56
Laurotetanina (LT)	0.03	2.4	1.2	31.7
N-Me-LT	0.32	0.61	0	5.4
Predicentrina	0.004	0	0	0
Norglaucina	0.43	0.73	0	7.5
Isocoridina	0.03	0.01	0	0.48

Con la biomasa de un árbol se realizó un trabajo habitual de aislamiento e identificación de alcaloides. Se pueden apreciar las diferencias en la composición y contenido según el órgano de la planta (Tabla 38).

El contenido de alcaloides en un mismo árbol puede variar de una temporada a otra. En el verano de 2014 la concentración de alcaloides en las hojas adultas de los vástagos remanentes fue significativamente inferior en reticulina, boldina, predicentrina, coridina, isocoridina, norglaucina y N-metillaurotetanina en comparación con el mismo material pero colectado en la primavera del 2015 (Tabla 39).

Tabla 39. Concentración de alcaloides en hojas de *P. boldus* según temporada.

	Verano 2014	Primavera 2015
	n= 30	n= 30
Reticulina*	184.4±112.0b	466.3±348.4a
Norisoboldina*	141.5±105.3 ^a	155.4±100.7a
Laurolicina*	136.4±99.1 ^a	152.9±99.1a
Boldina*	120.5±71.8b	177.6±72.2a
N-Me-secoboldina	40.5±30.8	ND
Laurotetanina (LT)*	550.3±236.3 ^a	515.6±265.5b
N-Me-LT*	382.3±224.9b	960.9±374.9a
Predicentrina*	333.2±224.3b	459.3±260.3a
Norglaucina*	487.7±283.4b	1020.5±391.2a
Coridina*	103.7±65.7b	276.4±164.5a
Isocoridina*	325.3±211.4b	447.1±251.7a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes * Test Tukey (p<0.01).

Tabla 40. Concentración de alcaloides en las maderas y cortezas de *P. boldus* (ug/g DS).

Población 1		Individuos longevos	
Cortezas	Maderas	Cortezas	Maderas

	n= 25	n= 25	n =15	n=15
Higenamina**	52.8±100.5b	25.4±35.6b	3.5±7.0a	1.7±1.6a
Coclaurina**	10094.1±3099.3c	835.9±803.7ab	316.5±341.9b	1341.8±838.3a
N-Me-coclaurina**	529.2±311.5c	57.4±48.0b	16.5±12.1b	104.3±45.6a
Reticulina **	3880.2±2190.3c	316.7±203.9ab	255.6±303.9a	577.6±298.7b
Norisoboldina**	1499.3±1057.3b	1473.2±659.9b	699.8±935.4a	2191.2±785.7c
Laurolitsina*	1392.6±972.6b	1370.7±645.9b	643.9± 831.3a	2058.9±728.5c
Boldina**	10059.4±1898.6b	752.3±579.9a	1114.3±1110.1a	1231.4±832.4a
Secoboldina**	452.7±201.6b	28.0±16.3 ^a	34.8±36.5a	44.2±47.4a
N-Me-secoboldina*	284.5±124.1a	7.5±7.8c	35.8±28.5b	13.5±10.9c
Laurotetanina (LT)**	51.7±64.4a	481.7±359.8b	47.9±98.0a	464.4±370.2b
N-Me-LT**	256.2±159.8b	8.9±12.2a	12.7±23.6a	10.5±14.9a
Predicentrina*	463.8±287.1a	15.5±20.9b	11.9±10.1b	23.2±28.1b
Norglaucina*	1499.7±.1770.9a	127.1±121.4c	73.1±82.3c	263.5±233.5b
Coridina**	222.0±139.3b	7.9±10.8a	11.9±22.6a	10.7±13.1a
Isocoridina**	452.9± 277.5b	16.1±21.4a	11.8±9.8a	21.7± 26.3a

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes * Test Tukey (p<0.01) ** Test Kruskal Wallis (p<0.05).

Se analizaron los componentes leñosos de dos poblaciones naturales de la zona central con diferentes edades, una es un bosque longevo y sobremaduro. El segundo, una población tipo con árboles cosechados al menos en 3 ocasiones siguiendo las pautas comunes para aprovechar las hojas de la especie.

Entre los alcaloides presentes en la corteza y la madera, se pueden evidenciar diferencias según el material y el estado del individuo donde se obtuvo la muestra. En las cortezas los alcaloides principales fueron boldina y coclaurina, laurolitsina, norisoboldina y reticulina. En las maderas, laurolitsina, norisoboldina, coclaurina, boldina, laurotetanina y reticulina.

Entre los 4 materiales vegetales, la mayor concentración de alcaloides se encontró en las cortezas de las ramas remanentes de la población bajo manejo, con diferencias significativas en la cantidad de boldina, isocoridina, N-metil laurotetanina, norglaucina, predicentrina, reticulina, coridina, coclaurina, N-metil coclaurina y secoboldina. Por el contrario, en las cortezas de los arboles sobremaduros la concentraciones encontradas son significativamente más bajas para la reticulina, norisoboldina, coclaurina y N-metil coclaurina. En las maderas de la población longeva se encontró la mayor concentración de laurólitsina y en las maderas de la población bajo manejo silvícola laurotetanina (Tabla 40).

Entre los compuestos fenólicos, los encontrados en mayor concentración fueron procianidinas b1 y b2, catequina y epicatequina. Los perfiles de la madera y corteza son bastante similares en su composición pero difieren en las cantidades encontradas donde la corteza tiene los valores más altos (Tabla 41).

Tabla 41. Compuestos fenólicos encontrados en las maderas y cortezas de *P. boldus* (ug/g DS).

	Maderas n=7	Cortezas n=20
Catequina	273.8±176.7	862.2±285.9
Epicatequina	267.9±162.9	857.1±281.6
Procianidina b1	428.6±257.3	1826.4±570.3
Procianidina b2	397.9±252.7	1685.1±529.3
Procianidina c1	91.3±47.6	400.1±238.5
Quercetina	0.33±0.35	4.9±6.9
Quercitrina	0.47±0.26	10.8±31.9
Rutina	1.8±1.3	20.1±21.3

Los resultados son presentados como promedio ± desviación estándar.

6.6. Costos de establecimiento de cultivo medicinal de boldo y peumo.

Tabla 42. Planilla de costos de establecimiento de cultivo de *P. boldus* y *C. alba*.

					300 m2	0,5 há	1 há
Item	Insumos	Cantidad	Unidad	Unitario (\$)	Total (\$/unidad)	Total (\$/0,5 há)	Total (\$/1 há)
Preparación del terreno y plantación	Roce con tractor	1	jornada	25.000	6.000	12.000	25.000
	Arado tirado por caballo	1	jornada		6.000	15.000	30.000
	Pala	2	u	7.000	14.000	14.000	14.000
	Rastrillo	2	u	8.500	17.000	17.000	17.000
	Azadón	2	u	11.000	22.000	22.000	22.000
	Chuzo	2	u	15.000	30.000	30.000	30.000
Subtotal					95.000	110.000	138.000
Cercado y enmallado	Malla hexagonal (0,6 m altura)	100	m	400	40.000	120.000	160.000
	Polines impregnados 3"-4" x 2,44 m	30	u	2.000	60.000	500.000	1.000.000
	Alambre púas (3 hebras)	230	m	100	23.000	90.000	120.000
	Alicate	2	u	3.500	7.000	7.000	7.000
	Martillo	2	u	3.500	7.000	7.000	7.000
	Grampas	0,5	kg	3.500	1.750	35.000	70.000
	Clavos	1	kg	1.600	1.600	16.000	32.000
	Malla Raschel 35%	100	m	500	50.000	650.000	1.250.000
Broches	10	bolsas	900	9.000	153.000	297.000	
Subtotal					199.350	1.578.000	2.943.000
Protección	Malla anticonejos	600	u	150	90.000	1.530.000	2.970.000
	Tutores (70 cm)	1200	u	15	18.000	306.000	594.000
Subtotal					108.000	1.836.000	3.564.000
Insumos	Plantas	600	u	450	270.000	4.590.000	8.910.000
Subtotal					270.000	4.590.000	8.910.000
Sistema de riego	Plansas 1/2 pulgada	150	m	260	39.000	464.100	900.900
	Tee plansa	10	u	390	3.900	46.410	90.090
	Codo plansa	4	u	120	480	5.712	11.088
	Unión	4	u	250	1.000	11.900	23.100
	Llave	3	u	2.000	6.000	71.400	138.600
Subtotal					50.380	599.522	1.163.778
Mano de obra	Cercado y enmallado	4	jornadas	15.000	60.000	714.000	1.428.000
	Plantación	2	jornadas	15.000	30.000	357.000	714.000
	Desmalezado	2	jornadas	15.000	30.000	357.000	714.000
Subtotal					120.000	1.428.000	2.856.000

Total					842.730	10.141.522	19.574.778
-------	--	--	--	--	---------	------------	------------

6.7. Análisis del cultivo de boldo.

6.7.1. Análisis de sensibilidad del cultivo de boldo

Al realizar el análisis de sensibilidad del valor de la hoja a partir de \$1.500 por kilogramo a variar -20%, 10%, +10% y +20%, se puede observar que al bajar el precio de la hoja un 20% la VAN desciende un 73,5% (Tabla 43).

Tabla 43. Análisis de sensibilidad del valor de la hoja de boldo.

PRECIO BOLDO/kg	VAN	TIR
1.200	\$ 1.119.900	37,9%
1.350	\$ 2.672.626	41,1%
1.500	\$ 4.225.353	44,3%
1.650	\$ 5.778.080	47,5%
1.800	\$ 7.330.806	50,7%

6.7.2. Análisis de sensibilidad del rendimiento de los individuos de boldo 1 kg a los 15 años.

Al analizar la variación del rendimiento de boldo de 1 kg de hoja seca por individuo a los 15 años un -20%, -10%, +10% y +20%, se puede observar que al bajar el rendimiento de la hoja un 20% la VAN desciende un 77,22% (Tabla 44).

Tabla 44. Análisis de sensibilidad del rendimiento de boldo a los 15 años.

FINALES	VAN	TIR
0,8	\$ 902.555	37,3%
0,9	\$ 2.428.113	40,4%
1	\$ 4.225.353	44,3%
1,1	\$ 5.479.230	46,7%
1,2	\$ 7.004.788	49,8%

6.7.3. Análisis de sensibilidad del horizonte del proyecto

Tabla 45. Análisis de sensibilidad del horizonte del proyecto.

Años	VAN	TIR
------	-----	-----

25	\$ 3.953.672	43,5%
50	\$ 21.023.600	50,7%
100	\$ 25.232.817	50,7%

Con el escenario supuesto de un valor de hojas de \$1.500/kg y un rendimiento sostenido por planta de 1 kg cada 3 años en un horizonte de 25 años las proyecciones son promisorias (VAN (6%) = \$ 4.225.353; TIR=44,3%). Los resultados esperados mejoran al aumentar el horizonte del proyecto a 50 años (VAN (6%)=\$ 21.023.600; TIR 50,7%). Para aumentar la rentabilidad es clave el desarrollo de un modelo sostenido en el tiempo (Tabla 45).

6.8. Difusión de Resultados.

6.8.1. Congresos.

1. 14to Congreso Internacional de Etnofarmacología. Realizado del 23 al 26 de septiembre del 2014 (Figura 43).



Figura 43. Presentación del 14to Congreso Internacional de Etnofarmacología.

Poster 1: Variation in the alkaloid content of *Peumus boldus* Mol. ("boldo"). Autores: Fuentes-Barros, G., Castro-Saavedra, S., Cassels, BK. Referencia: Book of abstract, p 171 (Figura 44).

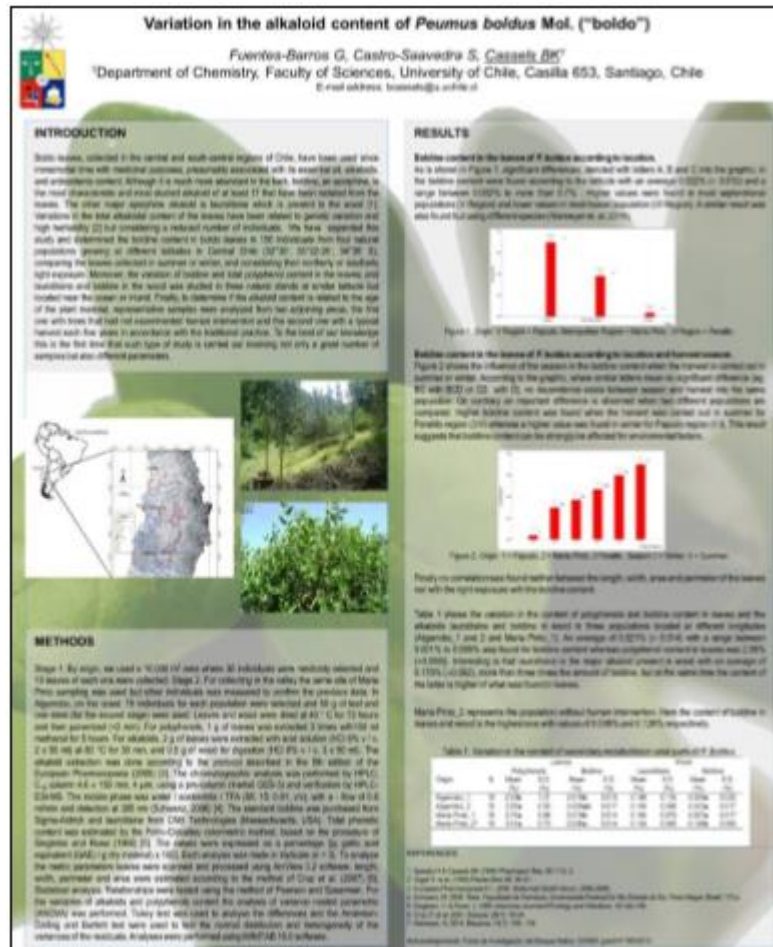


Figura 44. Imagen del póster presentado en 14to Congreso Internacional de Etnofarmacología.

2. IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia: La diversidad química y biológica. Realizado del 28 al 30 de septiembre del 2014 (Figura 45).

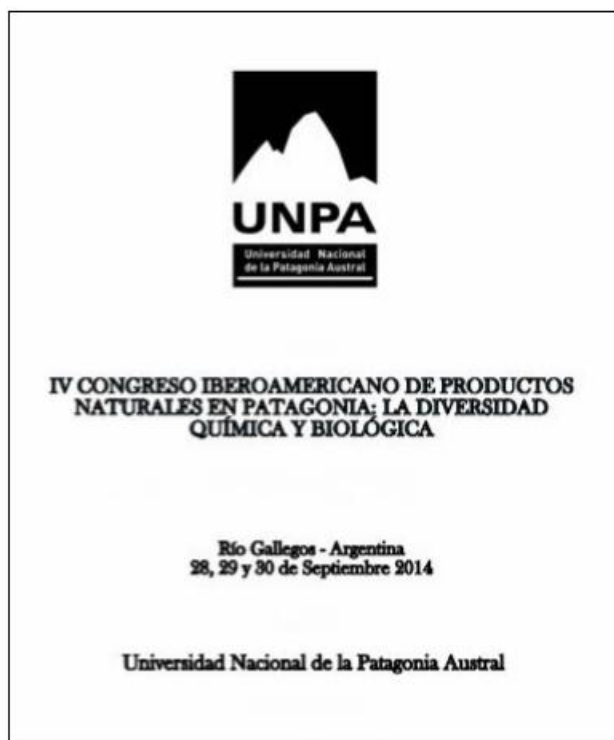


Figura 45. Presentación del IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia.

Presentación oral 1: Estudios metabólicos en Laurales del bosque esclerófilo chileno. Autor: Cassels, BK. Referencia: Libro de resúmenes, p 9-11 (Figura 46).

ESTUDIOS METABOLÓMICOS EN LAURALES DEL BOSQUE

ESCLERÓFILO CHILENO

Isaac K. Canals¹, Gonzalo Fuentes-Barros,² Sebastián Castro-Saavedra,²

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

²South American Phytochemistry (SAPHTCHEM)

bcansel@u.achd.cl

Chile central, entre las latitudes aproximadas de 33° y 38° S y donde la altura no supera los 1.500 m.s.n.m., es una de las pocas regiones del mundo que posee un clima de tipo mediterráneo, templado, semiárido, con lluvias casi exclusivamente invernales donde los árboles han debido adaptarse a una intensa radiación solar, baja humedad y largos períodos de sequía desarrollando hojas duras y sintetizando metabolitos secundarios. Esta zona climática se caracteriza por la presencia del matorral y el bosque esclerófilo, este último constituido principalmente por *Quillaja saponaria*, *Lithraea caustica*, *Cryptocarya alba* (peumo), *Acacia caven*, *Maytenus boaria*, *Protopis chilensis*, *Beilschmiedia miersii*, *Peumus boldus* (boldo), *Kugeneckia oblonga* y *Schinus molle*, representando una superficie de unas 345.000 ha. El orden Laurales está representado aquí por la monimiácea *P. boldus*, las lauráceas *C. alba*, y *R. miersii* a las que se podría agregar unos 3.000 ejemplares adultos sobrevivientes de, *B. berterouana*, *Persea lingue* y, en áreas muy reducidas, la gomortegácea monotípica – muy amenazada - *Gomortega leufei*. La sobreexplotación de especies nativas desde la colonización, el avance de la agricultura, la forestación con especies exóticas y el crecimiento urbano han transformado el paisaje boscoso a una condición con escasa cobertura arbórea y pérdida de biodiversidad. En el bosque esclerófilo domina el boldo junto al peumo, preferentemente en zonas con mayor humedad. Ambos se han utilizado desde tiempos inmemoriales para fines medicinales, pero solo el boldo es conocido internacionalmente, lo que quizá explique la existencia de numerosos estudios químicos de los cuales el más antiguo data de 1872.

Los metabolitos secundarios más conocidos de las hojas de boldo, que constituyen el principal producto comercial del árbol, son alcaloides y un aceite

Figura 46. Imagen del resumen de la presentación en IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia.

3. V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales. Realizado del 25 al 29 de abril del 2016 (Figura 47).



Figura 47. Presentación V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales.

Poster 1. Variabilidad de la concentración de metabolitos secundarios en poblaciones naturales de *Cryptocarya alba* (Mol). Autores: SE Castro-Saavedra, GJ Fuentes-Barros, CI Suarez Rozas, CA Tirapegui C, WA Acevedo-Fuentes, BK Cassels N. Referencia: Libro de resúmenes, p 352 (Figura 48).

Verifiabilidad de la Concentración de Metabolitos Secundarios en Poblaciones Naturales de *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser

EP Casado B. Escobar*, GJ Fuentes, RA Acevedo, CI Suarez, CA Tirapegui, WA Acevedo, BK Cassels, N. Escobar

Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Chile, Santiago, Chile
*Departamento Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile
E-mail: epcas@ingem.uchile.cl

RESUMEN:

El presente estudio tiene como objetivo determinar la variabilidad de la concentración de metabolitos secundarios en poblaciones naturales de *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser, especie nativa de Chile, en función de factores como la altitud, la latitud y la longitud. Se analizaron 10 poblaciones naturales de esta especie, distribuidas en la zona central de Chile, entre los 33° y 38° S de latitud y 71° y 73° W de longitud. Se determinó la concentración de los metabolitos secundarios: flavonoides, terpenoides y alcaloides, mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS). Los resultados indican que la concentración de los metabolitos secundarios varía significativamente entre las poblaciones estudiadas, lo que puede estar relacionado con factores como la altitud, la latitud y la longitud. Se concluye que la concentración de metabolitos secundarios en *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser es altamente variable y depende de factores geográficos y ambientales.

Figura 48. Imagen del poster 1 presentado en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales.

Figura 49. Potencial medicinal de 19 especies de la flora chilena de la zona central. Autores: SE Castro S, GJ Fuentes B, CI Suarez R, CA Tirapegui C, WA Acevedo F, BK Cassels N. Referencia: Libro de resúmenes, p 310 (Figura 49).

Figura 48. Imagen del poster 1 presentado en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales.

Poster 2. Potencial medicinal de 19 especies de la flora chilena de la zona central. Autores: SE Castro S, GJ Fuentes B, CI Suarez R, CA Tirapegui C, WA Acevedo F, BK Cassels N. Referencia: Libro de resúmenes, p 310 (Figura 49).

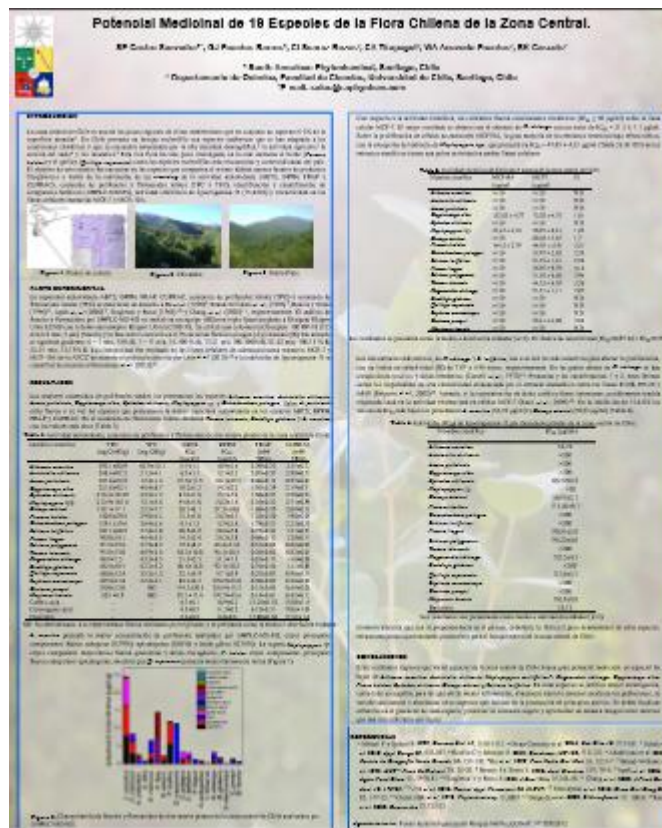


Figura 49. Imagen del poster 2 presentado en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales.

6.8.2. Publicaciones científicas.

Está publicado un artículo en la revista de la Sociedad Química Chilena. Título: Phytochemical analysis of alkaloids from the chilean endemic tree *Cryptocarya alba*. Autores: SEBASTIÁN CASTRO-SAAVEDRA, GONZALO FUENTES-BARROS, CRISTIAN TIRAPEGUI, WILLIAMS ACEVEDO-FUENTES, BRUCE K. CASSELS, ANDRÉS BARRIGA, MARCELO VILCHES-HERRERA. Número 61, capítulo 3, páginas 3076-3080 (Figura 50).

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF ALKALOIDS FROM THE CHILEAN ENDEMIC TREE *CRYPTOCARYA ALBA*

SEBASTIÁN CASTRO-SAAVEDRA ^{1,2}, GONZALO FUENTES-BARRROS ^{1,2}, CRISTIAN TIRAPEGÚ ¹, WILLIAMS ACEVEDO-FUENTES ¹, BRUCE K. CASSELS ³, ANDRÉS BARRIGA ⁴, MARCELO VILCHES-HERRERA ^{1,2,*}.

¹School of Forestry Engineering, Universidad Mayor, Santiago, Chile

²Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

³CEPEZOL, Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

⁴Corresponding author, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Chile,

Las Palmeras 4425, Estación, Santiago 7800024, Chile, (M. Vilches-Herrera).

ABSTRACT

A phytochemical study of the stem and aerial parts of *Cryptocarya alba* (Mal.) Looser (Lauraceae), an endemic Chilean tree and the southernmost *Cryptocarya* species, led for the first time to the isolation and unambiguous characterization of four known alkaloids by NMR techniques: boldine, laurobolina, laurentosine and norglucine, in addition to the previously identified reticuline, and the identification via UHPLC-MS of seven more alkaloids, including, 5-methylscoulerine, norreticuline, isocorydine, 5-methylharmanine, prediuronine and glaucine. In spite of the fairly broad variety of biarylbenzylisoquinoline and sparteine, the concentrations of these alkaloids in the different organs of *C. alba* are quite low, which is in contrast with the sometimes generous yields of alkaloids in this genus.

1. INTRODUCTION

Cryptocarya alba (Mal.) Looser (vascular name *Peumus*, *pepu*, *pepu* or *pepu* in the Mapuche language), one of the four or five endemic Chilean Lauraceae, is an evergreen shade- and fire-tolerant tree that grows up to 1500 m above sea level, distributed from about 30 to 40 °S, spanning the Mediterranean climate zone of Chile and the north of the warmer temperate zone. It is therefore the southernmost representative of its pantropical genus which consists of about 350 species, and it has been isolated from its South American congeners since the mid-Pliocene (about 3.5 million years ago) by the "ard diagonal" established at that time due to the final raising of the Andean range.¹ It is amongst the most abundant native trees in Central Chile, and one of the dominant species of the sclerophyllous forest along with *Peumus boldus* Mal. (Simonseniaceae), *Lithoum cuneatum* Mol. (Asteraceae) and *Quilaja agnoscata* Mol. (Quillajaaceae). Due to its exceptional concentration of endemic species, this region has been identified as one of the world's 25 biodiversity hotspots.² *C. alba* is a threatened species due to overexploitation and habitat destruction, and is considered vulnerable in some areas of central Chile and exceptional in the southern part of its range.³ It is well known for its oblong, pink to red, intensely aromatic edible fruits (peasas), the thin pericarp of which has been consumed by the local people since before the arrival of European. Peasas are also food for birds, louse and rodents.⁴ The oleaginous seeds may have been chewed and made into an alcoholic beverage, or cooked and eaten "in times of scarcity".⁵ However the ethnopharmacology of *C. alba* is somewhat ambiguous and its chemical composition is almost unknown. Its reported uses in folk medicine include the infusion of its bark for the treatment of liver diseases, the infusion of leaves and bark against rheumatism and to heal wounds, and an ointment made from the ground seeds to treat vaginal infections.⁶ Regarding its phytochemistry, the presence of tannin and santonin in the leaves, bark and fruits was reported by Gantner half a century ago.⁷ The composition and antimicrobial effect of the essential oil distilled from the very aromatic leaves has also been investigated by at least three independent groups, and is composed mainly of monoterpeneoids such as terpin-1-ol-4-ol, limonene, 1,8-cineole (eucalyptol), piperonyl, or and linalool.⁸⁻¹⁰ Ten flavonoids and chlorogenic acid were isolated and identified from the leaves and stem in 1995,¹¹ and much more recently 19 phenolic compounds, mainly flavonoids and phenolic acids, were identified in the fruits and aerial parts, and the antioxidant activity of their methanol extracts was assayed.¹² The ripe fruits contain the α -pyrone cryptofoline and 6-(4,6-dimethoxy-8-phenyloct-1,7-dienyl)-4-hydroxyethylidene-2-one. Cryptofoline and its acetate were shown to be moderately cytotoxic and active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species.¹³

Considering that Lauraceae are often rich sources of alkaloids and that a fair number of *Cryptocarya* species have been shown to contain structurally diverse isoquinoline alkaloids,¹⁴ it is somewhat surprising that the

benzyltetrahydroisoquinoline (+)-reticuline is the only alkaloid reported from the stem bark and leaves of this species.¹⁵ In the framework of a chemical investigation of sclerophyllous forest trees of Central Chile, we therefore undertook a meticulous study of the alkaloids present in *C. alba* including the root, leaves, bark and wood in order to characterize the composition at different growth stages, and to obtain data that might contribute to explain, in an evolutionary context, the events associated with the isolation of this species from its geographically closer Southern Brazilian and Northern Peruvian relatives. We also expected to find some support for the various uses of this species in traditional medicines. This work led for the first time to the isolation and characterization by NMR techniques of four alkaloids aside from reticuline, and the identification via UHPLC-MS of seven additional alkaloids.

2. EXPERIMENTAL

Plant material (leaves, wood, bark and root) of a single *Cryptocarya alba* tree growing near Itascache (33°26' S, 71°38' W, 230 m above sea level), Chile, in May 2016 (southern autumn). This was used for isolation of the major alkaloids. In addition, samples were collected from 12 young adult individuals belonging to the same population, with diameter at breast height (DBH) less than 10 cm; seven larger trees with DBH > 30 cm were sampled in La Aurora (33°22' S, 70°58' W, 950 m above sea level), Chile, and seven saplings less than 3 years old from a commercial tree farm near Los Angeles, Chile, grown under controlled conditions, were analyzed for comparison.

2.1 Reference Standards

(5)-Glucosine and (5)-prediuronine were prepared from boldine by methylation with diazomethane.¹⁶ (4S)-Norreticuline was synthesized by the Buchler-Napierkowski route.¹⁷ Isocorydine HCl was purchased from PhytoLab GmbH & Co. (Vestenbergsgreuth, Bavaria, Germany).

2.2 Extraction

Leaves were dried at 40 °C during 72 h (5.5 kg), then were milled directly, while bark (5.5 kg), wood (5.0 kg) and roots (4.0 kg) were dried similarly and ground using first a chipper and then a mill. Each kg of material was macerated and extracted three times with 10 L of methanol (MeOH) at 50 °C for 12 hours. The extracts were filtered off, concentrated, the residues taken up in dichloromethane (DCM) and extracted three times with an equal volume of dilute hydrochloric acid (approximately 1 mol/L). The aqueous solution was extracted successively with hexane and ethyl acetate, and then made basic (pH 10) using concentrated aqueous ammonia solution (25%) and extracted with DCM. The organic extract was dried over sodium sulfate, filtered and evaporated of the solvent under reduced pressure. For the chromatographic quantification the same procedure was followed, starting from 1 g dried and ground plant material.

Figura 50. Imagen del artículo "Phytochemical analysis of alkaloids from the Chilean endemic tree *Cryptocarya alba*".

Existen dos manuscritos en preparación que saldrán el primer semestre del 2017.

1. Variación en el contenido de alcaloides de *Peumus boldus*.
2. Variación en el contenido de alcaloides, polifenoles y flavonoides de *Cryptocarya alba*.

6.8.3. Presentaciones.

Se realizó una presentación en la Universidad Mayor a 25 estudiantes de Ingeniería Forestal. Título: Aprovechamiento químico de especies nativas de la zona central. En el verano se harán dos presentaciones con los resultados del proyecto, una en Santiago (RM) y otra en Lolol (VI Región).

7. Discusión de resultados

La estructura original del bosque se ha modificado, las condiciones en la que se establecieron estos árboles se han distorsionado considerablemente afectando formaciones naturales de boldo que hoy en día con gran dificultad puede generar descendencia (INFOR, 2009). Las hojas y cortezas de *Peumus boldus* que se comercializan provienen en un 100% de selección silvestre, las exportadoras son suministradas por intermediarios que compran a pequeños productores y propietarios rurales, pero no existen una buena distribución de las ganancias (INFOR, 2009; INFOR, 2011). Las actividades de cosecha se realizan generalmente en renovales jóvenes, de entre 4 y 5 años. En promedio se extraen 6 a 7 vástagos por cepa, los que se cortan a una altura de 10 a 15 cm del suelo (Roach, 2001). A pesar de la presión que hay sobre las poblaciones naturales de boldo y el juicio transversal sobre la sustentabilidad en su manejo y aprovechamiento, hasta antes de este proyecto sólo existían dos experiencias de plantación (INFOR, 2009; INFOR, 2011), por cual es difícil discutir nuestros resultados y levantar dicha información es vital para ejecutar cualquier plan reforestación, mejoramiento o cultivar la especie. En este escenario, nuestros resultados de cultivo son muy alentadores en cuanto al crecimiento de los individuos, rendimiento en hojas, tamaño y forma de estas y sus parámetros químicos. En cuanto al incremento en biomasa, proyectamos que incorporando nutrientes y manejando otras variables se puedan obtener resultados mejores e implementarlos.

Con ese trabajó se buscó innovar en una infusión de boldo con diferentes atributos medicinales y sabor. También en una infusión libre de aceite esencial, una alternativa de mayor seguridad y que no pierde su capacidad antioxidante.

En cuanto a los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Peumus boldus* de poblaciones naturales y de cultivo, se encontró en cantidades importantes catequina, epicatequina, procianidina b1, procianidina b2, procianidina c1, quercitrina y rutina, acorde en gran medida a las identificaciones previas de los componentes de este material (Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, 2010; Falé *et al.*, 2012; Pastene *et al.*, 2014; Zielinski *et al.*, 2014), pero disimiles al trabajo de Bianchini *et al.* (2014) realizado con la infusión.

Durante años el conocimiento de los alcaloides de boldo se ha focalizado en las hojas y en menor medida en la corteza. En estos productos y los elaborados a partir de ellos se han identificado más de una decena de alcaloides y resultados recientes indican que es aún mayor (Falé *et al.*, 2012; Hošťálková *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2014). En la naturaleza, se pueden encontrar hojas con una concentración de boldina muy baja (Vogel *et al.*, 1999) e incluso individuos cuyas hojas tengan como alcaloide mayoritario por ejemplo la N-metillaurotetanina (Soto *et al.*, 2014). Nuestros resultados concuerdan con estas investigaciones, indicando que boldina está presente en todas las hojas de los boldos analizados, pero no es el alcaloide con mayor concentración en las hojas, estos serían

isocoridina, N-metillaurotetanina, laurotetanina, predicentrina, norglaucina, reticulina y coclaurina y todo indica que los sintetizan durante toda la vida del árbol. Todas las hojas analizadas en el proyecto cumplen con la concentración mínima de alcaloides totales (0,1%), un estándar común para las hojas medicinales de boldo (European Pharmacopoeia 5.1). Con diferencias significativas por sobre todas las otras hojas, las de árboles de cultivo tienen la mayor concentración.

En los individuos de *Cryptocarya alba* encontramos gran variabilidad en el contenido de polifenoles totales y para alcaloides, influenciado por la latitud y según el componente de la biomasa. La concentración de polifenoles y flavonoides encontrada en las hojas y corteza de poblaciones naturales concuerdan con lo determinado por Simirgiotis (2013), también en los compuestos fenólicos encontrados. En la corteza se encontraron procianidinas (b1, b2 y c1), catequina, epicatequina y ácido clorogénico, similar a los datos obtenidos (Pacheco, 2011).

En la biomasa la mayor concentración de alcaloides se encontró en la corteza, seguida por la raíz, madera y hojas. Nuestros resultados respaldan que la reticulina es el alcaloide más importante en peumo (Úrzua *et al.*, 1975). En cuanto a la producción de alcaloides, en *Cryptocarya alba* se encontraron estructuras del tipo aporfínicos, como ocurre con *Cryptocarya odorata* y *Cryptocarya chinensis* (Custódio y Da Veiga, 2014). En la corteza el alcaloide mayoritario es reticulina, seguido por laurotetanina, ambos con interés científico, el primero como insumo biotecnológico para producir otros alcaloides y el segundo por su capacidad hipotensora y baja toxicidad (Schmeda-Hirshmann *et al.*, 1994).

En poblaciones naturales no fue posible determinar un patrón para la variación de la concentración de polifenoles en las hojas. Sin embargo, recientemente se determinó la variación en la concentración de fenoles en las hojas de peumo y boldo, identificando que en verano se obtienen valores más altos (Pacheco, 2011).

8. Conclusiones

8.1. *Cryptocarya alba* Mol.

En las hojas hay una variación en el contenido de polifenoles totales, con una tendencia hacia la disminución de los valores conforme pasa el tiempo. El contenido de flavonoides es más estable, pero también tiene bajas significativas registradas en la primavera. Las hojas nuevas contienen cantidades de polifenoles y flavonoides significativamente más bajas que las hojas adultas.

Para la producción de hojas medicinales en un huerto o cultivo el riego es trascendental, generando diferencias significativas en el crecimiento de los individuos.

El porcentaje de sombra del 80% genera diferencias significativas en el área, perímetro, largo y ancho de las hojas. Sin embargo, no incide en la producción de biomasa de hojas que a los 3,5 años de cultivo es de $14,4 \pm 5,6$ g.

Las hojas de cultivo contienen un porcentaje importante de polifenoles y flavonoides. La cantidad de sombra provoca diferencias significativas sólo en el contenido de polifenoles, encontrándose los mayores valores en el 40% de sombra.

En las hojas de cultivo la concentración de alcaloides totales fue de 0,02% en promedio, encontrándose gran variabilidad. En estas hojas los alcaloides mayoritarios fueron boldina, reticulina, coclaurina, lauroitsina y laurotetanina. El cultivo bajo sombra influyó en la concentración de alcaloides, encontrándose en el sector con un 40% de sombra boldina, lauroitsina y norisoboldina en cantidades significativamente superiores, mientras que en el 80% de sombra, higenamina y N-metilcoclaurina son más abundantes.

De la biomasa de un árbol adulto se logró aislar diferentes alcaloides en pequeñas cantidades. En orden decreciente se encuentran en la corteza (0,057%), raíces (0,025%), madera (0,009%) y hojas (0,003%). El contenido y la composición alcaloidal son muy variables, dependiendo del material analizado y de la edad de este. Parece probable que los alcaloides estén presentes durante toda la vida del árbol. En la corteza, reticulina y laurotetanina predominan y otros como predicentrina e isocoridina se encuentran en mayor concentración a medida que el árbol envejece. En la madera los más importantes son lauroitsina y reticulina.

En la madera y corteza de tres poblaciones de *C. alba* se encontraron 4 benciltetrahydroisoquinolinas y 8 aporfinas que varían mucho en su abundancia y distribución, pero sólo unos pocos predominan, donde reticulina es el más importante y está presente siempre en todas las muestras analizadas. La concentración de alcaloides depende de la etapa de desarrollo, del componente analizado y en el caso de laurotetanina en la corteza, de un factor latitudinal. Sin embargo, todo indica que existen otras

variables ambientales a nivel de sitio que pueden pesar también. La variabilidad encontrada en las poblaciones naturales y según las diferentes de edades evaluadas demuestran las dificultades para establecer un perfil fitoquímico y las grandes oportunidades que ofrecería la selección de individuos sobresalientes.

En las poblaciones del norte (VR y RM), las hojas cuentan con la mayor concentración de polifenoles y flavonoides, luego se encuentra la corteza y con cantidades bastantes menores la madera. En la población del sur (VIIR) es la corteza la que cuenta con las mayores concentraciones, luego la hoja y la madera. La latitud pareciera afectar el contenido de compuesto fenólicos en las hojas y cortezas, no así en la madera, mientras en el norte están los valores más altos para las hojas ocurre en el sur para los compuestos alojados en las cortezas.

Los compuestos fenólicos encontrados en cantidades importantes en la hoja de *C. alba* fueron ácido clorogénico, quercitrina y rutina. En la corteza se encontraron procianidinas (b1, b2 y c1), catequina, epicatequina y ácido clorogénico.

Los sabores y olores de los productos derivados de *C. alba* no tuvieron una buena aceptación. Para aprovechar los beneficios medicinales es necesario explorar otras alternativas como desarrollar fórmulas poliherbales, extractos estandarizados y evaluar la posibilidad de usar hojas sin aceite esencial, principal responsable del olor y sabor, que en sí es otro producto de la especie que se podría utilizar.

Reforestar con *C. alba* es una buena alternativa. Las plantas son fáciles de producir y se obtienen buenos resultados bajo dosel, con riego y medidas de protección.

8.2. *Peumus boldus* Mol.

No existen diferencias en el contenido de polifenoles totales entre las hojas de individuos masculinos y femeninos. En ambos sexos, las disminuciones y alzas en las cantidades los afectan de igual forma. En cuanto al sector, los individuos bajo manejo (Sector 1) tienen mayores cantidades de polifenoles que los con libre crecimiento (Sector 2). En cuanto al contenido de flavonoides, no hay diferencias con respecto al sector ni al sexo.

Tras dos años de seguimiento se evidenciaron variaciones en el contenido de polifenoles y flavonoides totales, pero no existe un patrón claro que permita establecer una relación con la época de cosecha.

En las hojas adultas del vástago remanente la producción de ocho alcaloides puede verse afectada por temporada.

En el vástago remanente, las hojas nuevas tienen menos alcaloides totales que las hojas antiguas. Esto pasa con un número importante de los compuestos cuantificados, salvo isocoridina, que se encuentra con mayor concentración en el material más nuevo. Con respecto al contenido total de polifenoles, el material con mayor edad tiene un contenido significativamente superior. Esto se confirma en otra de las poblaciones

evaluadas, donde también se obtuvieron mejores resultados en los ensayos de ABTS, DPPH y FRAP.

Las hojas adultas que provienen de los vástagos de rebrote tienen concentraciones de alcaloides superiores a las hojas adultas del vástago remanente, pero inferiores cantidades de polifenoles totales, tanto en los individuos masculinos como femeninos. Las hojas del vástago remanente también dan mejores resultados en los ensayos de capacidad antioxidante FRAP, ABTS y DPPH.

Para la producción de hojas en un huerto o cultivo medicinal el riego es trascendental, generando diferencias significativas en el crecimiento de los individuos.

El porcentaje de sombra del 80% genera diferencias significativas en el área, perímetro, largo y ancho de las hojas. Sin embargo, no incide en la producción de biomasa de hojas que a los 3,5 años de cultivo es $18,2 \pm 5,6$ g.

En las hojas de cultivo los alcaloides encontrados en cantidades importantes son laurotetanina, norglaucina, N-metillaurotetanina, coclaurina, predicentrina e isocoridina. El contenido promedio de alcaloides totales en estas hojas es de 1,3% y es significativamente más alto que en las hojas de dos poblaciones naturales bajo manejo y en las de una población de árboles sobremaduros.

En las hojas de cultivo, la cantidad de sombra provoca diferencias significativas en el contenido de polifenoles, encontrándose los mayores valores con 40% de sombra, con diferencias significativas para catequina, epicatequina, procianidina b2, quercitrina y rutina. Con respecto a los alcaloides el porcentaje de sombra afecta distintos compuestos, un 40% de sombra genera diferencias significativas para laurotetanina, lauroitsina y norisoboldina, mientras que el 80% afecta higenamina, coclaurina, n-metilcoclaurina, reticulina, boldina, n-metilsecoboldina, n-metillaurotetanina, predicentrina, norglaucina, coridina e isocoridina.

En la biomasa de boldo se encontraron alcaloides en cantidades importantes, 5 benciltetrahidroisoquinolinas y 10 aporfinas. En orden decreciente la mayor concentración de alcaloides totales se encontró en la corteza (1,01%), raíces (0,088%), madera (0,040%) y hojas (0,025%).

El contenido y la composición alcaloidal son muy variables. En la corteza predominan boldina y coclaurina. En la madera los más importantes son lauroitsina, norisoboldina y coclaurina. El estado y desarrollo de la planta pueden influenciar el contenido de estos compuestos, expresándose las principales diferencias en la corteza.

La evaluación sensorial de las infusiones preparadas con hojas sin aceite esencial fue un decimal más bajo que la preparada con hojas normales, considerando que no hay pérdidas en la capacidad antioxidante ni en el contenido de compuestos fenólicos al extraer el aceite. Esta alternativa permite preparar una infusión más segura, con otro sabor, y además aprovechar el aceite esencial.

La infusión preparada con hojas de cultivo es un producto con mejor evaluación y aceptación que la elaborada con hojas normales, transformándose en un producto diferenciado de boldo, en cuanto al sabor y sus principios activos

En las hojas los compuestos fenólicos encontrados en mayor concentración son epicatequina, catequina, procianidina b1 y procianidina b2. En la madera y corteza predominan procianidina b1, procianidina b2, catequina, epicatequina y procianidina c1. No obstante la concentración en la corteza duplica la de la madera.

Reforestar con *Peumus boldus* es una labor de bastante dificultad. Si la planta logra sobrevivir no se observan crecimientos en el plazo del presente estudio. Considerando la oferta reducida de plantas y el costo de estas se deben seleccionar sitios que cuenten con condiciones favorables.

Utilizando ciertos criterios el cultivo de *Peumus boldus* puede ser una alternativa conveniente para la producción de hojas con fines medicinales.

9. Recomendaciones

Con la experiencia de este proyecto, se recomienda:

Estudiar con mayor precisión la incorporación de especies en la zona central, en las condiciones que hoy se encuentra el bosque es muy difícil rehabilitar, mejorar o incluso sólo incorporar algunos árboles.

En la urgencia por mejorar el escenario actual de la especie, se requieren un programa especial para enfrentar las condiciones fragilidad en que se encuentra . El aprovechamiento de hojas se sustenta en individuos que posiblemente tienen cientos de años, no conocemos con certeza si su rendimiento se incrementa o decrece con las faena y no existe actualmente la incorporación de nuevos individuos al ciclo.

Con la importancia que tiene la comercialización de la biomasa de boldo se debería mejorar la información del mercado interno, oferta, demanda y otros antecedentes importantes del negocio como el valor pagado por los compradores por el material puesto en planta o en pie.

Estudiar el secado de las hojas y evaluar cómo disminuir las pérdidas y qué posibilidades productivas tiene ese material descartado.

Estudiar alternativas para mejorar el aprovechamiento de hojas, controlando lo invasivo de las labores es urgente estudiar podas en las cepas.

Prospectar los diferentes perfiles químicos de nuestras especies nativas, dada la gran variabilidad encontrada en boldo y peumo y en otras hay grandes probabilidades de encontrar individuos sobresalientes.

Trabajar en el conocimiento, aplicaciones y valor agregado de las ramillas de boldo (laurolicina) y corteza de peumo (reticulina), principalmente por su contenido de alcaloides. También, especial énfasis en los aceites esenciales de estas dos especies.

Establecer una norma de calidad para los productos de boldo considerando los principios activos más importantes.

Trabajar en el potencial de nuestras especies de la zona central, por ejemplo en un modelo que se sustente de quillay, boldo y peumo.

BIBLIOGRAFÍA

- Avello, M. y Cisternas, I. 2010. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev. Med. Chile. 138: 1288-1293.
- Benedetti, S. 2012. Monografía de peumo *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser. Información tecnológica de productos forestales no madereros del bosque nativo en Chile. Instituto Forestal, Santiago de Chile. 75 p.
- Benzie, I. y Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239(1): 70-76.
- Bianchini, M.C., Gularte, C.O., Escoto, D.F., Pereira, G., Gayer, M.C. Roehrs, R., Soares, F.A., Puntel, R.L. 2016. *Peumus boldus* (Boldo) Aqueous extract present better protective effect than boldine against manganese-induced toxicity in *D. melanogaster*. Neurochem. Res. 41(10)2699-2707.
- Bravo, L. 2003. Farmacognosia especial. Editorial Gea consultoría. Madrid, España. 349 p.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 28(1): 25-30.
- Campos, J. 1998. Productos Forestales No Madereros en Chile. Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Santiago, Chile. Serie forestal N° 10. 65 p.
- CIFAG. 2013. Propuestas para un desarrollo sustentable del sector forestal chileno (2014-2018). Colegio de Ingenieros forestales, Santiago de Chile. 18 p.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 176-182.
- Chrubasik-Hausmann, S., Chrubasik, C., Neumann, E., Müller-Ladner. 2014. A pilot study on the effectiveness of a Rose Hip shell powder in patients suffering from chronic musculoskeletal pain. Phytotherapy Research. 28:1720-1726.
- Custódio, D.L., da Veiga, V. F. 2014. Lauraceae alkaloids. RSC Advances. 4:21864-21890.
- Délano, G., Zamorano, M., Ormeño, J., Sepúlveda, P., Hewstone, N., Estay, P., Hinrichsen, P., Reckmann, O., Silva, L. 2000. Cultivo de plantas medicinales como alternativas para el secano de la Sexta Región. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Santiago, Chile. Financiamiento PRODECOP secano. Boletín INIA N° 31. 94 p.
- European Pharmacopoeia. 2005. 5ta edición. Boldo leaf (*Boldi folium*). 2888-2889.

Falé, P. L., Amaral, F., Amorin Madeira, P. J., Sousa Silva, M., Florêncio, M. H., Frazão, F. N., Serralheiro, M. L. M. 2012. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. 50(8): 2656-2662.

Fernández, M. P. 1994. Las plantas medicinales y aromáticas. Aporte a la transformación productiva de la agricultura. Santiago, La voz del Campo. 71 p.

Grandón, A., Espinosa, M., Ríos, D., Sánchez, M., Sáez, K., Hernández, V., Becerra, J. 2013. Variation of saponin contents and physiological status in *Quillaja saponaria* under different environmental conditions. *Natural Product Communications*. 8(12):1697-1700.

Gobbo-Netto, L y Lopes, NP. 2007. Medicinal plant. Factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quim Nova*. 30: 374-381.

Han, Z., Su, H., Chen, N., Luan, L., Wu, Y. 2009. Simultaneous determination of four alkaloids in *Lindera aggregata* by high performance liquid chromatography. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 34(5):583-586.

Hošťálková, A., Opletal, L., Kuneš, J., Novák, Z., Hrabínová, M., Chlebek, J., Čegan, L., Cahlíková, L. 2015. Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. *Nat. Prod. Commun*. 10(4):577-580.

INDAP. 2007. Productos forestales no maderables: Hongos, Rosa mosqueta, Hierbas medicinales, VIII Región. Estrategia regional de competitividad por el rubro.

INFOR. 2009. Sistematización silvícola, tecnológica y comercial de boldo (*Peumus boldus* Mol.) en Chile. Santiago de Chile, Instituto Forestal. 220 p.

INFOR. 2011. Boldo: rescate de un patrimonio forestal chileno. Manejo sustentable y valoración de sus productos. Santiago de Chile, Instituto Forestal. 235 p.

INFOR. 2015. Anuario Forestal 2015. Santiago de Chile, Instituto Forestal. 161 p.

Massardo, F. Rozzi, R. 1996. Plantas medicinales chilenas: un recurso subvalorado. En: *Ambiente y Desarrollo*. 12 (3): 76-81.

MINAGRI. 2006. Especificaciones técnicas de buenas prácticas para plantaciones forestales. Ministerio de Agricultura, Santiago de Chile. 47 p.

Pacheco, N. 2011. Estudio de la composición fenólica de las especies nativas: *Peumus boldus*, *Cryptocarya alba* y *Schinus latifolius*. Memoria para optar al título de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 82 p.

Palma, J. 2004. Objetivos estratégicos del sector forestal de la sexta región. Memoria para optar al título de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Talca. Talca. Chile. 65 p.

Pastene, E., Parada, V., Avello, M., Ruiz, A., García, A. 2014. Catechin-based Procyanidins from *Peumus boldus* Mol. Aqueous Extract Inhibit *Helicobacter pylori* Urease and Adherence to Adenocarcinoma Gastric Cells. *Phytotherapy Research*. 28(11):1637-1645.

Política Forestal 2015-2035. 2015. Ministerio de Agricultura, Santiago de Chile. 75 p.

Prodan, M., Peters, R., Cox, F., Real, P. 1997. *Mensura Forestal*. Serie de investigación y evaluación en desarrollo sostenible. San José, Costa Rica. IICA/GTZ. 561 p.

Tacón, A. 2004. Programa de fomento para la conservación de tierras privadas de la X región. Manual de productos forestales no madereros. Valdivia, Chile. 22 p.

Thalhamer, B., Himmelsbach, M. 2014. Characterization of quillaja bark extracts and evaluation of their purity using chromatography-high resolution mass spectrometry. *Phytochemistry Letters*. 8:97-100.

Tseng, L-H., Braumann, U., Godejohann, M., Lee, S-S., Albert, K. 2000. Structure identification of aporphine alkaloids by on-line coupling of HPLC-NMR with loop storage. *J. Chin. Chem. Soc.* 47(6):1231-1236.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10):1231-1237.

Roach, F. 2001. Análisis prospectivo del mercado de hojas de boldo (*Peumus boldus* Mol.) y sus posibilidades de desarrollo. Memoria para optar al título de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 106 p.

Rodríguez, R., Matthei, O., Quezada, M. 1983. *Flora arbórea de Chile*. Editorial Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 408 pp.

Rönnerberg, B., Fekadu, M., Morein, B. 1995. Adjuvant activity of non-toxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine*. 13(14):1375-1382.

Schlotterbeck, T., Castillo-Ruiz, M., Cañon-Jones, H., San Martín, R. 2015. The use of leaves from young trees of *Quillaja saponaria* (Molina) plantations as a new source of saponins. *Economic Botany*. 69(3):262-272.

Schmeda-Hirschmann, G., Loyola, J.I., Rodríguez, J., Dutra-Behrens. 1994. Hypotensive effect of *Laurelia sempervirens* (Monimiaceae) on normotensive rats. *Phytotherapy Research*. 8(1):49-51.

Schwanz, M. 2006. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação da Boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e Avaliação Preliminar de sua Estabilidade. Tesis. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 113 p.

- Simirgiotis, M.J. y Schmeda-Hirschmann, G. 2010. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1217(4):443-449.
- Simirgiotis, M. 2013. Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules.* 18(2):2061-2080.
- Singleton, V., Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 16:144-158.
- Soto, C., Caballero, E., Pérez, E., Zuñiga, M. E. 2014. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food and Bioproducts Processing.* 92(3):328-333.
- Stévigny, C., Jiwan, J. L., Rozenberg, R., De Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J. 2004. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18(5): 523-528.
- Urzúa, A., Torres, R., Cassels, B. 1975. (+)-Reticulina en *Cryptocarya alba*. *Revista Latinoamericana de Química.* 6:102-103.
- Valdebenito, G., Benedetti, S., Andrade, V., Wrann, H., Perret, D., Kahler, G., Salinas, A., Hormazabal, D., Cohen, I., Delard, C., Blanco, P. 1998. La contribución del Instituto Forestal a la investigación en zonas áridas y semiáridas.
- Valdebenito, G. 2009. Productos forestales no madereros en Chile. Instituto Forestal, Santiago de Chile. 22 p.
- Vogel, H., Razmilic, I., Muñoz, M., Doll, U., San Martín, J. 1999. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in boldo (*Peumus boldus*) *Planta Med.* 65(1): 90-91.
- Vogel, H., Razmilic, I., San Martín, J., Doll, U., González, B. 2008. Plantas medicinales chilenas. Experiencias de domesticación y cultivo de boldo, matico, bailahuén, canelo, peumo y maqui. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. (2) 194 p.
- Zeng, R-J., Li, Y., Chen, J-Z., Chou, G-X., Gao, Y., Shao, J-W., Jia, L., Wu, S-D., Wu, S-S. 2015. A novel UPLC-MS/MS method for sensitive quantitation of boldine in plasma, a potential anti-inflammatory agent: application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography.* 29(3):459-464.
- Zhang, S.Y., Guo, Q., Cao, Y., Zhang, Y., Gao, X.L., Tu, P.F., Chai, X.Y. 2014. Alkaloids from roots and stems of *Litsea cubeba*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 39(20):3964-3968.

Zielinski, A. A. F., Haminiuk, C. W. I., Alberti, A., Nogueira, A., Demiate, I.M., Granato, D. 2014. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*. 60: 246-254.

ANEXOS

Análisis de parámetros métricos, de rendimiento y contenido de Polifenoles (TPC) y Flavonoides (TFC) en cultivo.

1. Estadística Descriptiva

Tabla 1: Parámetros métricos de las hojas de Peumo y Boldo

		40% sombra				80% sombra			
		Área	Perímetro	Largo	Ancho	Área	Perímetro	Largo	Ancho
Peumo	Media	11,96	15,15	5,75	2,85	15,14	17,33	6,36	3,30
	Desviación Estándar	2,43	1,65	0,55	0,32	2,36	1,42	0,51	0,36
	Mínimo	7,77	12,72	4,77	2,09	11,33	15,16	5,64	2,63
	Percentil 25	10,41	14,13	5,36	2,72	12,98	16,17	5,89	3,07
	Percentil 50	11,66	14,93	5,62	2,89	15,52	17,66	6,31	3,26
	Percentil 75	12,90	15,70	6,14	3,04	16,46	18,22	6,61	3,49
	Máximo	18,13	19,51	7,04	3,55	20,37	21,06	7,58	4,17
	Coefficiente de Variación	20,33%	10,86%	9,53%	11,36%	15,57%	8,17%	8,02%	10,76%
Boldo	Media	16,53	17,00	6,07	3,58	20,04	18,82	6,48	4,08
	Desviación Estándar	2,44	1,18	0,34	0,38	3,94	1,79	0,64	0,53
	Mínimo	12,67	14,63	5,32	2,94	12,91	15,55	5,22	2,98
	Percentil 25	14,31	16,41	5,90	3,22	17,94	18,01	6,03	3,74
	Percentil 50	16,59	16,99	6,06	3,64	21,29	19,24	6,66	4,21
	Percentil 75	18,58	17,79	6,27	3,92	23,03	19,97	6,94	4,53
	Máximo	20,20	20,05	6,86	4,28	26,22	22,12	7,71	4,84
	Coefficiente de Variación	14,77%	6,95%	5,54%	10,70%	19,67%	9,51%	9,82%	12,99%

En la tabla 1, todos los parámetros métricos presentan un comportamiento bastante homogéneo y baja variabilidad, asimismo los valores de las medianas (percentil 50) son similares a las medias, lo que indica presencia de simetría en los resultados tanto para un ambiente de 40% y 80% de sombra, para Peumo como Boldo.

Tabla 2: Producción de hojas en Peumo y Boldo

Peso (g)	Peumos		Boldos	
	40% sombra	80% sombra	40% sombra	80% sombra
Media	13,64	15,16	18,32	17,92
Desviación Estándar	4,97	6,28	4,96	6,29
Mínimo	5,00	5,00	5,00	10,00
Percentil 25	11,00	10,00	15,00	13,00
Percentil 50	12,00	15,00	19,00	17,00
Percentil 75	16,00	19,00	21,00	21,00
Máximo	25,00	28,00	26,00	34,00
Coficiente de Variación	36,47%	41,40%	27,05%	35,11%

En la tabla 2, la producción de hojas presentan un comportamiento homogéneo y baja variabilidad, además los valores de las medianas (percentil 50) son similares a las medias, lo que indica presencia de simetría en los resultados tanto para un ambiente de 40% y 80% de sombra, para Peumo como Boldo.

Tabla 3: Polifenoles y Flavonoides en Peumo y Boldo

		40% sombra		80% sombra	
		TFC	TFC	TPC	TPC
Peumo	Media	29,01	27,57	42,16	54,96
	Desviación Estándar	5,15	2,76	9,73	11,60
	Mínimo	15,56	22,02	20,59	34,50
	Percentil 25	26,54	25,92	38,10	48,98
	Percentil 50	28,52	27,52	40,43	55,96
	Percentil 75	31,90	29,23	46,77	59,45
	Máximo	37,33	35,14	70,10	77,49
	Coficiente de Variación	17,77%	10,03%	23,07%	21,11%
Boldo	Media	22,41	22,84	25,43	29,45
	Desviación Estándar	3,67	4,54	6,80	9,00
	Mínimo	12,38	15,77	15,47	15,47
	Percentil 25	20,61	18,81	20,42	22,28
	Percentil 50	21,34	23,78	25,01	28,80
	Percentil 75	25,01	25,95	28,80	35,95
	Máximo	29,71	32,23	41,65	45,08
	Coficiente de Variación	16,37%	19,88%	26,72%	30,58%

En la tabla 3, la presencia de polifenoles y flavonoides presentan un comportamiento bastante homogéneo y una variabilidad algo más dispersa según el ambiente de exposición. Por otro lado, los valores de las medianas (percentil 50) son menos similares a las medias, lo que indica una leve presencia

de asimetría en los resultados tanto para un ambiente de 40% y 80% de sombra, para Peumo como Boldo.

2. Análisis de comparación Parámetros de las hojas.

a. Parámetros métricos de las hojas en Peumo.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para los parámetros métricos de área, perímetro, largo y ancho de las hojas, determinando que los parámetros se comportan aceptablemente como una normal para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra). Los resultados se resumen en la siguiente tabla de valores p:

Tabla 4: Valores p prueba de normalidad parámetros métricos de las hojas en Peumo.

		Valor-p	
		40% sombra	80% sombra
Peumo	Área	0,147	0,583
	Perímetro	0,187	0,427
	Largo	0,263	0,391
	Ancho	0,534	0,898

Dados los resultados anteriores se procedió a realizar pruebas de comparación de medias para los parámetros métricos mediante la prueba t de Student, previa verificación de igualdad de varianzas para cada parámetro, respectivamente. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5: Valores p prueba t de Student comparación parámetros métricos de las hojas en Peumo.

		Diferencia estimada	IC de 95%	Valor t	Valor-p
Peumo	Área	3,177	(1,815 ; 4,539)	4,69	<0,001
	Perímetro	2,178	(1,305 ; 3,051)	5,01	<0,001
	Largo	0,605	(0,304 ; 0,906)	4,04	<0,001
	Ancho	0,454	(0,261 ; 0,647)	4,72	<0,001

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra) para todos los parámetros métricos evaluados en Peumo, siendo significativamente mayor en los expuesto a un ambiente de 80% de sombra.

b. Parámetros métricos de las hojas en Boldo.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para los parámetros métricos de área, perímetro, largo y ancho de las hojas, determinando que los parámetros se comportan aceptablemente como una normal para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra), los resultados se resumen en la siguiente tablas de valores p:

Tabla 6: Valores p prueba de normalidad parámetros métricos de las hojas en Boldo.

		Valor-p	
		40% sombra	80% sombra
Boldo	Área	0,270	0,106
	Perímetro	0,471	0,161
	Largo	0,926	0,508
	Ancho	0,519	0,088

Dados los resultados anteriores se procedió a realizar pruebas de comparación de medias para los parámetros métricos mediante la prueba t de Student, previa verificación de igualdad de varianzas para cada parámetro, respectivamente. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7: Valores p prueba t de Student comparación parámetros métricos de las hojas en Boldo.

		Diferencia estimada	IC de 95%	Valor t	Valor-p
Boldo	Área	3,517	(1,643 ; 5,392)	3,79	<0,001
	Perímetro	1,815	(0,949 ; 2,681)	4,23	<0,001
	Largo	0,411	(0,119 ; 0,703)	2,85	0,007
	Ancho	0,492	(0,229 ; 0,755)	3,76	<0,001

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra) para todos los parámetros métricos evaluados en Boldo, siendo significativamente mayor en los expuesto a un ambiente de 80% de sombra.

3. Producción de hojas

a. Rendimiento de hojas por árbol en Peumo

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para la producción de hojas, determinando que la producción se comporta aceptablemente como una normal para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra), los resultados se resumen en la siguiente tablas de valores p:

Tabla 8: Valores p prueba de normalidad producción de hojas en Peumo.

Valor-p	
40% sombra	80% sombra
0,240	0,415

Dados los resultados anteriores se procedió a realizar pruebas de comparación de medias para la producción de hojas mediante la prueba t de Student, previa verificación de igualdad de varianzas. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 9: Valores p prueba t de Student comparación producción de hojas Peumo.

Diferencia estimada	IC de 95%	Valor t	Valor-p
1,520	(-1,700 ; 4,740)	0,95	0,347

Se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra) para la producción de hojas en Peumo.

b. Rendimiento de hojas por árbol en Boldo

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para la producción de hojas, determinando que la producción se comporta aceptablemente como una normal para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra), los resultados se resumen en la siguiente tablas de valores p:

Tabla 10: Valores p prueba de normalidad producción de hojas en Boldo.

Valor-p	
40% sombra	80% sombra
0,081	0,125

Dados los resultados anteriores se procedió a realizar pruebas de comparación de medias para la producción de hojas mediante la prueba t de Student, previa verificación de igualdad de varianzas. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 11: Valores p prueba t de Student comparación producción de hojas Boldo.

Diferencia estimada	IC de 95%	Valor t	Valor-p
-0,400	(-3,620 ; 2,820)	-0,25	0,804

Se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra) para la producción de hojas en Boldo.

4. Contenido de polifenoles TPC y flavonoides TFC

a. Polifenoles TPC y Flavonoides TFC en Peumo

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para la presencia de polifenoles y flavonoides, determinando que ambas variables se comportan aceptablemente como una normal para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra), los resultados se resumen en la siguiente tablas de valores p:

Tabla 12: Valores p prueba de normalidad contenido de TPC y TFC en Peumo.

	Valor-p	
	40% sombra	80% sombra
TPC	0,394	0,097
TFC	0,274	0,645

Dados los resultados anteriores se procedió a realizar pruebas de comparación de medias para TPC y TFC mediante la prueba t de Student, previa verificación de igualdad de varianzas. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 13: Valores p prueba t de Student comparación contenido de TPC y TFC en Peumo.

	Diferencia estimada	IC de 95%	Valor t	Valor-p
TPC	-12,790	(-18,880 ; -6,710)	-4,23	<0,001
TFC	-1,44	(-3,810 ; 0,930)	-1,23	0,226

Se determinó que para TPC existen diferencias significativas, siendo mayor en los árboles expuestos a un ambiente de 40% de sombra, en cambio para TFC, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra).

b. Rendimiento de hojas por árbol en Boldo

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para la presencia de polifenoles y flavonoides, determinando que ambos se comportan aceptablemente como una normal para ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra), los resultados se resumen en la siguiente tablas de valores p:

Tabla 14: Valores p prueba de normalidad contenido de TPC y TFC en Boldo.

	Valor-p	
	40% sombra	80% sombra
TPC	0,466	0,529
TFC	0,105	0,679

Dados los resultados anteriores se procedió a realizar pruebas de comparación de medias para TPC y TFC mediante la prueba t de Student, previa verificación de igualdad de varianzas. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 15: Valores p prueba t de Student comparación contenido de TPC y TFC en Boldo.

	Diferencia estimada	IC de 95%	Valor t	Valor-p
TPC	-4,010	(-8,550 ; 0,520)	-1,78	0,082
TFC	0,430	(-1,920 ; 2,780)	0,37	0,714

Se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos entre ambos ambientes de exposición (40% y 80% de sombra) para el contenido de TPC y TFC en Boldo.

Análisis de contenido de Polifenoles (TPC) y Flavonoides (TFC) en poblaciones naturales

1. Estadística Descriptiva

Tabla 16: TPC en Boldo por sector, trimestre según sexo

Sector		1							
Sexo	Trimestre	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Hembra	Media	77,29	71,94	85,01	64,04	70,72	65,99	37,57	78,15
	Desv. Est.	20,98	17,74	17,58	22,99	10,79	17,10	12,28	18,22
	Mínimo	25,29	46,99	56,78	30,01	57,01	34,16	15,62	46,36
	Q1	65,23	53,04	71,58	45,56	64,96	54,36	25,35	61,85
	Mediana	78,95	67,37	87,01	65,99	66,91	64,90	39,63	79,41
	Q3	89,08	88,62	93,17	82,92	75,32	83,78	42,85	93,63
	Máximo	111,70	99,50	125,58	107,44	94,66	94,49	60,41	108,54
	Coef. Var.	27,14%	24,66%	20,68%	35,90%	15,26%	25,92%	32,69%	23,31%
	N	14	15	15	15	15	15	15	15
Macho	Media	62,42	70,29	77,64	59,30	71,17	67,69	32,13	99,60
	Desv. Est.	20,54	28,36	20,94	22,79	16,02	18,18	13,72	39,40
	Mínimo	45,04	27,25	56,78	21,61	50,28	34,27	19,99	42,70
	Q1	50,16	50,56	66,63	35,83	55,28	60,70	22,12	63,80
	Mediana	51,60	69,97	73,71	59,72	68,76	63,92	25,23	102,80
	Q3	73,59	82,57	80,10	79,69	85,80	79,12	40,09	131,30
	Máximo	124,48	150,62	141,81	95,87	100,94	105,43	64,96	174,10
	Coef. Var.	32,91%	40,35%	26,97%	38,44%	22,51%	26,86%	42,69%	39,53%
	N	15	15	15	15	15	15	15	15
Sector		2							
Sexo	Trimestre	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8

Hembra	Media	59,17	50,02	65,45	40,52	50,26	55,62	46,90	56,32
	Desv. Est.	16,55	14,12	15,13	8,90	9,08	13,72	19,72	11,79
	Mínimo	37,90	25,58	42,04	29,09	31,74	42,04	22,30	31,51
	Q1	43,09	36,72	48,87	35,18	43,31	46,40	32,29	52,03
	Mediana	58,91	58,25	73,22	39,14	52,95	51,43	42,39	55,66
	Q3	72,74	60,12	76,69	44,58	55,26	60,16	66,05	64,60
	Máximo	87,35	66,51	84,88	57,01	62,37	89,83	82,63	73,65
	Coef. Var.	27,97%	28,23%	23,12%	21,97%	18,07%	24,67%	42,05%	20,94%
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Macho	Media	74,01	53,12	58,24	44,67	50,20	55,48	39,15	60,91
	Desv. Est.	12,34	11,36	14,40	15,01	10,94	16,49	11,42	15,11
	Mínimo	57,59	32,43	33,24	27,36	32,66	39,17	24,54	34,50
	Q1	67,30	45,48	46,04	33,74	43,08	40,76	31,84	53,04
	Mediana	71,87	54,94	59,86	38,53	46,97	50,94	36,60	59,60
	Q3	77,92	59,17	69,53	62,88	62,61	74,40	43,28	71,87
	Máximo	103,59	71,00	78,31	69,62	64,44	81,82	65,94	86,43
	Coef. Var.	16,67%	21,38%	24,73%	33,59%	21,79%	29,73%	29,16%	24,81%
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 17: Flavonoides en Boldo por sector, trimestre según sexo

Sector		1							
Sexo	Trimestre	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Hembra	Media	9,44	17,97	20,82	23,13	21,56	17,97	18,41	22,99
	Desv. Est.	1,62	2,39	3,64	3,59	3,84	4,71	4,71	4,45
	Mínimo	6,91	14,03	14,95	15,61	15,41	11,69	12,08	19,05
	Q1	8,04	15,88	18,09	20,28	19,18	13,78	15,55	20,41
	Mediana	9,27	18,45	20,71	23,16	22,50	19,20	17,21	21,46
	Q3	10,36	19,56	24,42	25,56	23,39	20,49	20,97	23,60
	Máximo	12,97	22,14	27,40	28,48	27,67	28,58	31,40	37,71
	Coef. Var.	17,19%	13,29%	17,48%	15,51%	17,83%	26,21%	25,58%	19,36%
	N	14	15	15	15	15	15	15	15
Macho	Media	10,80	17,87	18,83	21,58	20,08	16,84	16,84	19,27
	Desv. Est.	2,01	3,81	2,46	3,28	3,02	4,03	3,11	3,69
	Mínimo	8,16	12,77	15,47	16,55	13,52	11,13	10,53	12,04
	Q1	8,99	15,74	16,46	18,82	18,93	12,14	14,92	17,55
	Mediana	10,59	17,32	19,77	21,94	20,28	16,75	17,10	18,30
	Q3	11,62	20,56	20,88	23,10	21,43	20,07	18,54	21,36
	Máximo	14,90	26,36	22,47	28,22	25,23	23,91	21,58	26,00
	Coef. Var.	18,60%	21,34%	13,09%	15,20%	15,03%	23,93%	18,46%	19,17%
	N	15	15	15	15	15	15	15	15

Sector		2							
Sexo	Trimestre	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Hembra	Media	8,98	21,90	19,60	22,06	21,48	18,52	21,51	19,11
	Desv. Est.	1,44	5,56	3,70	3,79	3,89	3,29	3,46	3,93
	Mínimo	7,47	14,66	14,45	17,06	14,54	14,06	15,52	13,19
	Q1	7,99	18,16	16,04	18,31	18,67	16,20	19,02	17,03
	Mediana	8,31	20,20	19,50	22,39	21,07	17,50	22,09	18,52
	Q3	10,30	25,37	22,97	25,88	24,58	21,20	24,75	20,63
	Máximo	11,96	32,70	25,83	26,84	27,27	24,26	26,25	26,34
	Coef. Var.	15,99%	25,39%	18,88%	17,18%	18,11%	17,76%	16,09%	20,57%
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Macho	Media	11,17	20,58	20,43	23,78	21,90	16,57	21,41	22,73
	Desv. Est.	2,25	3,87	2,57	2,11	2,45	4,25	5,48	3,15
	Mínimo	8,09	14,26	17,04	20,68	17,77	11,34	13,06	18,43
	Q1	10,00	17,88	18,29	22,31	19,85	13,84	18,51	19,95
	Mediana	10,48	19,59	20,35	23,73	21,97	15,17	21,44	22,07
	Q3	12,53	24,89	22,29	24,97	23,99	20,15	22,97	25,95
	Máximo	15,68	25,25	25,02	28,27	25,25	24,11	33,72	27,40
	Coef. Var.	20,11%	18,80%	12,56%	8,88%	11,20%	25,65%	25,60%	13,84%
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 18: TPC y Flavonoides en Boldo según Rebrote y Remanente según sexo

Sexo	TPC				Flavonoides			
	REBROTE		REMANENTE		REBROTE		REMANENTE	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
Media	55,12	50,24	70,72	71,17	22,51	22,85	21,56	20,08
Desv. Est.	10,66	7,18	10,79	16,02	2,27	2,95	3,84	3,02
Mínimo	43,25	39,68	57,01	50,28	19,89	18,81	15,41	13,52
Q1	46,88	44,52	64,96	55,28	20,07	20,94	19,18	18,93
Mediana	52,75	50,68	66,91	68,76	21,75	21,61	22,50	20,28
Q3	61,45	54,13	75,32	85,80	24,41	25,91	23,39	21,43
Máximo	74,97	65,47	94,66	100,94	26,34	26,93	27,67	25,23
Coef. Var.	19,34%	14,29%	15,26%	22,51%	10,08%	12,90%	17,83%	15,03%
N	15	15	15	15	15	15	15	15

Tabla 19: TPC y Flavonoides en Boldo hojas nuevas y viejas según sexo

Nuevas	Sexo	TPC				Flavonoides			
		Hembra		Macho		Hembra		Macho	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Media	Sector	1	2	1	2	1	2	1	2
Desv.Est.	Media	59,54	51,91	57,65	44,76	18,71	18,85	16,48	22,35
Mínimo	Desv.Est.	19,17	15,99	21,43	12,77	3,28	4,07	2,68	4,10
	Mínimo	32,08	37,90	18,27	28,23	12,49	13,13	12,52	16,73

	Q1	46,07	39,86	36,63	36,45	16,69	15,43	13,97	17,88
	Mediana	57,53	47,40	56,44	42,94	18,48	18,70	16,51	23,42
	Q3	67,09	60,65	78,54	50,75	20,91	21,91	19,17	25,78
	Máximo	105,43	89,14	89,02	73,36	24,89	25,77	20,44	28,01
	CoefVar	32,20%	30,80%	37,17%	28,53%	17,55%	21,59%	16,26%	18,34%
	N	15	10	15	10	15	10	15	10
Viejas	Media	71,94	50,02	70,29	53,12	17,97	21,90	17,87	20,58
	Desv. Est.	17,74	14,12	28,36	11,36	2,39	5,56	3,81	3,87
	Mínimo	46,99	25,58	27,25	32,43	14,03	14,66	12,77	14,26
	Q1	53,04	36,72	50,56	45,48	15,88	18,16	15,74	17,88
	Mediana	67,37	58,25	69,97	54,94	18,45	20,20	17,32	19,59
	Q3	88,62	60,12	82,57	59,17	19,56	25,37	20,56	24,89
	Máximo	99,50	66,51	150,62	71,00	22,14	32,70	26,36	25,25
	Coef. Var.	24,66%	28,23%	40,35%	21,39%	13,29%	25,39%	21,34%	18,80%
	N	15	10	15	10	15	10	15	10

Tabla 20: TPC y Flavonoides en Peumo según trimestre

TPC	Trimestre	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
	Media	90,49	75,13	84,38	86,28	68,04	61,87	66,21	40,53
	Desv. Est.	13,65	11,83	13,01	13,24	18,28	9,04	12,89	14,89
	Mínimo	66,12	53,04	61,33	62,48	36,46	36,17	39,74	17,52
	Q1	78,53	68,24	73,68	76,13	54,67	55,86	56,95	29,19
	Mediana	92,67	76,01	84,47	84,24	68,30	63,09	69,42	40,43
	Q3	100,55	80,07	94,40	97,97	85,28	69,55	73,58	50,62
	Máximo	113,74	110,90	106,75	111,07	96,22	74,23	87,58	74,46
	Coef. Var.	15,08%	15,75%	15,42%	15,35%	26,87%	14,61%	19,47%	36,74%
	N	25	25	25	25	24	24	24	24
Flavonoides	Trimestre	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
	Media	26,65	22,82	23,50	22,06	22,87	19,80	19,79	24,07
	Desv. Est.	4,61	4,18	6,23	4,74	5,02	3,98	5,41	4,03
	Mínimo	18,16	16,53	15,34	11,10	15,88	13,18	10,70	16,75
	Q1	24,04	19,55	19,17	18,78	18,82	17,04	14,72	21,29
	Mediana	26,06	22,52	23,49	20,88	21,94	18,93	19,28	24,69
	Q3	29,92	25,70	26,76	26,35	25,84	21,67	24,94	26,85
	Máximo	39,44	30,41	39,75	31,43	35,01	30,91	31,57	31,28
	Coef. Var.	17,31%	18,31%	26,51%	21,50%	21,93%	20,09%	27,32%	16,76%
	N	25	25	25	25	24	24	24	24

Tabla 21: TPC y Flavonoides en Peumo según hoja nueva y vieja

Tipo	TPC		Flavonoides	
	Nueva	Vieja	Nueva	Vieja
Media	51,17	84,38	20,62	26,65
Desv. Est.	16,57	13,01	5,84	4,61
Mínimo	24,95	61,33	11,82	18,16
Q1	36,23	73,68	16,53	24,04
Mediana	50,68	84,47	19,66	26,06
Q3	64,93	94,40	24,92	29,92

Máximo	86,89	106,75	34,93	39,44
Coef. Var.	32,39%	15,42%	28,34%	17,31%
N	25	25	25	25

2. Análisis de comparación TPC y Flavonoides trimestre Boldo.

a. Comparación TPC según sexo por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres según sexo, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias mediante la prueba t de Student, previa verificación de igualdad de varianzas, respectivamente. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 22: Comparación TPC según sexo por trimestre.

Valores-p	Trimestre (Hembras)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,6351	0,4717	0,0613	0,0344	0,3362	0,2945	0,0000	0,6576
2		0,9680	0,0306	0,1849	0,8757	0,7882	0,0004	0,3375
3			0,1998	0,0146	0,1505	0,1341	0,0000	0,9348
Trimestre (Machos)	4			0,8459	0,0798	0,1218	0,0258	0,0071
	5				0,9566	0,8444	0,0000	0,2061
	6					0,8447	0,0001	0,2166
	7						0,1298	0,0000
	8							0,0836

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que el trimestre 1 en Machos tiene diferencias significativas con el trimestre 4 en hembras.

b. Comparación TPC Machos por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación para muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 23: Comparación TPC Machos por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,4173	0,4841	0,0067	0,3548	0,3703	0,0000	0,0454
2		0,0376	0,0545	0,8649	0,9123	0,0000	0,0149
3			0,0001	0,0319	0,1466	0,0000	0,0571
Trimestre 4				0,0097	0,0400	0,0003	0,0000
5					0,9954	0,0000	0,0021
6						0,0000	0,0016
7							0,0000

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que en Machos el trimestre 1 tiene diferencias significativas con el trimestre 4.

c. Comparación TPC Hembras por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación para muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 24: Comparación TPC Hembras por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,1553	0,1031	0,0051	0,0445	0,0495	0,0000	0,7300
2		0,0008	0,0439	0,7122	0,5243	0,0006	0,2229
3			0,0000	0,0003	0,0012	0,0000	0,1079
Trimestre 4				0,0567	0,1578	0,0348	0,0027
5					0,6612	0,0003	0,1085
6						0,0005	0,0628
7							0,0000

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que en Hembras el trimestre 1 tiene diferencias significativas con el trimestre 4.

d. Comparación TPC Total por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación para muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 25: Comparación TPC Total por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0838	0,0826	0,0000	0,0400	0,0448	0,0000	0,0852
2		0,0000	0,0050	0,7816	0,7810	0,0000	0,0048
3			0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,4678
Trimestre 4				0,0011	0,0075	0,0000	0,0000
5					0,8960	0,0000	0,0004
6						0,0000	0,0003
7							0,0000

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que en Total el trimestre 1 tiene diferencias significativas con el trimestre 4.

e. Comparación TPC por Sector por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres según sector, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 26: Comparación TPC Sector por trimestre.

Valores-p	Trimestre (Sector 2)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Trimestre (Sector 1)	1	0,6014	0,0017	0,1724	0,0000	0,0005	0,0154	0,0000	0,0504
	2		0,0012	0,1210	0,0000	0,0004	0,0108	0,0000	0,0349
	3			0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	4				0,0012	0,0386	0,2916	0,0026	0,5894
	5					0,0000	0,0004	0,0000	0,0025
	6						0,0210	0,0000	0,0798
	7							0,0549	0,0000
	8								0,0002

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que el sector 1 el trimestre 1 tiene diferencias significativas con el sector 2 en el trimestre 2.

f. Comparación Flavonoides según sexo por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres según sexo, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 27: Comparación Flavonoides según sexo por trimestre.

Valores-p	Trimestre (Hembras)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,6210	0,2075	0,0011	0,0237	0,5076	0,5637	0,0472
3			0,3376	0,0007	0,0296	0,1938	0,8627	0,0685
4				0,7990	0,3385	0,0001	0,0120	0,3558
5					0,4534	0,0125	0,2827	0,5643
6						0,2132	0,0189	0,0004
7							0,4528	0,0408
8								0,5171

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que los Machos en el trimestre 1 tienen diferencias significativas con las Hembras en el trimestre 1.

g. Comparación Flavonoides Machos por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 28: Comparación Flavonoides Machos por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,4847	0,0000	0,0267	0,0602	0,7513	0,0372
3			0,0001	0,0111	0,0069	0,3108	0,0875
Trimestre 4				0,0101	0,0000	0,0001	0,0139
5					0,0002	0,0119	0,8515
6						0,1324	0,0001
7							0,0100

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que los Machos en el trimestre 1 tienen diferencias significativas con el trimestre 2.

h. Comparación Flavonoides Hembras por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 29: Comparación Flavonoides Hembras por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,4728	0,0057	0,0575	0,2013	0,9224	0,1696
3			0,0000	0,0857	0,0360	0,4724	0,2540
Trimestre 4				0,1389	0,0000	0,0038	0,1882
5					0,0020	0,0316	0,9211
6						0,1868	0,0054
7							0,0604

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que los Hembras en el trimestre 1 tienen diferencias significativas con el trimestre 2.

i. Comparación Flavonoides Total por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 30: Comparación Flavonoides Total por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,3171	0,0000	0,0036	0,0224	0,9005	0,0227
3			0,0000	0,0032	0,0006	0,2228	0,0508
Trimestre 4				0,0050	0,0000	0,0000	0,0101
5					0,0000	0,0008	0,8403
6						0,0421	0,0000
7							0,0018

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que en Total en el trimestre 1 tienen diferencias significativas con el trimestre 2.

j. Comparación Flavonoides por Sector por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 31: Comparación Flavonoides Sector por trimestre.

Valores-p	Trimestre (Sector 2)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Trimestre (Sector 1)	1	0,9058	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	2		0,0043	0,0244	0,0000	0,0001	0,7062	0,0018	0,0043
	3			0,8361	0,0015	0,0498	0,0273	0,1386	0,2867
	4				0,5630	0,4913	0,0000	0,4291	0,1803
	5					0,3746	0,0030	0,5692	0,9218
	6						0,9065	0,0024	0,0054
	7							0,0026	0,0060
	8								0,8673

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que en Sector 1 en el trimestre 1 tienen diferencias significativas con el Sector 2 en el trimestre 2.

3. Análisis de comparación TPC y Flavonoides Remanente y Rebrote Boldo.

a. Comparación TPC según sexo por temporada.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias en muestras independientes y muestras dependientes mediante la prueba t de Student, según el caso. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 32: Comparación TPC Remanente y Rebrote Boldo según sexo.

Valor-p			Total	Sexo		
				Hembra	Macho	Hembra
Sexo	Temporada	Temporada	Remanente	Remanente	Rebrote	Rebrote
				Macho	Remanente	
Hembra	Remanente			0,0000	0,0009	
Macho	Rebrote				0,1526	
Total		Rebrote		0,0000		

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que remanente en Machos tiene diferencias significativas con rebrote en Macho.

b. Comparación Flavonoides según sexo por temporada.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias en muestras independientes y muestras dependientes mediante la prueba t de Student, según el caso. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 33: Comparación Flavonoides Remanente y Rebrote Boldo según sexo.

Valor-p			Total	Sexo		
				Hembra	Macho	Hembra
Sexo	Temporada	Temporada	Remanente	Remanente	Rebrote	Rebrote
				Macho	Remanente	
Hembra	Remanente			0,3103	0,1927	
Macho	Rebrote				0,7296	
Total		Rebrote		0,0025		

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que remanente en Machos tiene diferencias significativas con rebrote en Macho.

4. Análisis de comparación TPC y Flavonoides Tipo de hoja Boldo.

a. Comparación TPC según sexo por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias en muestras independientes y muestras dependientes mediante la prueba t de Student, según el caso. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 34: Comparación TPC Tipo de hoja Boldo según sexo.

Valor-p			Total	Sexo		
				Hembra	Macho	Hembra
Sexo	Tipo de hoja		Vieja	Vieja	Nueva	Nueva
	Macho	Vieja			0,9680	0,0059
Hembra	Vieja			0,0569	0,0963	
Macho	Nueva				0,4529	
Total				0,0016		

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que las hojas Viejas en Machos tienen diferencias significativas con las hojas nuevas en Macho.

b. Comparación Flavonoides Tipo de hoja Boldo según sexo.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias en muestras independientes y muestras dependientes mediante la prueba t de Student, según el caso. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 35: Comparación Flavonoides Remanente y Rebrote Boldo según sexo.

Valor-p			Total	Sexo		
				Hembra	Macho	Hembra
Sexo	Tipo de hoja		Vieja	Vieja	Nueva	Nueva
	Macho	Vieja			0,6210	0,8941
Hembra	Vieja			0,5660	0,4116	
Macho	Nueva				0,9559	
Total				0,4929		

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que las hojas Nuevas y Viejas en Machos no tienen diferencias significativas con las hojas Nuevas y Viejas en Hembras.

5. Análisis de comparación TPC y Flavonoides trimestre Peumo.

a. Comparación TPC por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres según sexo, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dados los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 36: Comparación TPC por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0000	0,1141	0,1813	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,0011	0,0002	0,0277	0,0000	0,0046	0,0000
3			0,3851	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
Trimestre 4				0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5					0,0844	0,6625	0,0000
6						0,1057	0,0000
7							0,0000

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que el trimestre 1 tiene diferencias significativas con el trimestre 2.

b. Comparación Flavonoides por trimestre.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres según sexo, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de muestras dependientes mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 37: Comparación Flavonoides por trimestre.

Valores-p	Trimestre						
	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0002	0,0204	0,0005	0,0058	0,0000	0,0000	0,0046
2		0,6029	0,5010	0,9570	0,0107	0,0373	0,2817
3			0,1184	0,2735	0,0007	0,0005	0,8025
Trimestre 4				0,6872	0,0037	0,0022	0,0611
5					0,0058	0,0036	0,2091
6						0,9866	0,0001
7							0,0004

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que el trimestre 1 tiene diferencias significativas con el trimestre 2.

6. Análisis de comparación TPC y Flavonoides Hojas Nuevas y Viejas Peumo.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para todos los trimestres según sexo, determinando que los datos tienen un comportamiento normal. Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar pruebas de comparación de medias mediante la prueba t de Student. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 38: Comparación TPC por trimestre.

	Valor-p	Prueba-t
TPC	0,0000	7,5851
Flavonoides	0,0001	4,8148

En color rojo se destacan todos los valores p que detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre los resultados obtenidos, se puede apreciar que las hojas nuevas tienen diferencias significativas con las hojas viejas, tanto para TPC como Flavonoides.

Análisis de Biomasa: Altura, DAC, DAC2xHT.

1. Estadística Descriptiva

Tabla 39: Biomasa con y sin riego de Peumo y Boldo

		Con Riego			Sin Riego		
		Altura (cm)	DAC (cm)	DAC2 x HT (cm ³)	Altura (cm)	DAC (cm)	DAC2 x HT (cm ³)
Peumo	Media	99,02	1,34	202,21	74,87	1,19	123,03
	Desviación Estándar	25,95	0,37	136,00	27,41	0,32	101,05
	Mínimo	15,00	0,50	5,40	25,00	0,50	7,50
	Percentil 25	82,50	1,10	101,83	50,00	1,00	56,70
	Percentil 50	102,00	1,30	179,20	75,00	1,10	95,00
	Percentil 75	115,00	1,55	257,38	95,00	1,40	166,60
	Máximo	160,00	2,40	720,00	140,00	2,60	845,00
	Coefficiente de Variación	26,20%	27,32%	67,26%	36,61%	26,85%	82,14%
Boldo	Media	98,70	1,77	363,60	58,21	1,23	108,85
	Desviación Estándar	22,71	0,57	275,80	20,82	0,39	107,73
	Mínimo	30,00	0,40	4,80	20,00	0,50	5,00
	Percentil 25	85,00	1,35	167,90	45,00	1,00	42,56
	Percentil 50	102,00	1,70	281,60	55,00	1,20	78,65
	Percentil 75	115,00	2,10	496,10	70,00	1,40	126,49
	Máximo	145,00	3,60	1531,30	120,00	2,80	627,20
	Coefficiente de Variación	23,01%	32,17%	75,87%	35,77%	31,52%	98,97%

En la tabla 39, los parámetros altura y DAC presentan un comportamiento bastante homogéneo y baja variabilidad, a diferencia de DAC2xHT que presenta mucha heterogeneidad en sus resultados una elevada variabilidad. Por otro lado, la mayoría de los valores de las medianas (percentil 50) son menores que las medias (salvo en la variable altura), lo que indica presencia de asimetría con sesgo positivo en los resultados obtenidos en los tratamientos con y sin riego, para Peumo como Boldo.

2. Análisis de comparación Biomasa.

a. Biomasa en Peumo.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para las variables de biomasa: Altura, DAC y DAC2xHT, determinando que todas las variables no presentan un comportamiento normal para ambos tratamiento (con y sin riego). Los resultados se resumen en la siguiente tabla de valores p:

Tabla 40: Valores p prueba de normalidad para variables de biomasa en Peumo.

		Valor-p	
		Con Riego	Sin Riego
Peumo	Altura	<0,005	<0,005
	DAC	<0,005	<0,005
	DAC2xHT	<0,005	<0,005

Dada la falta de normalidad en los datos, se realizó un análisis mediante la transformación de Box-Cox y de Johnson para determinar la transformación óptima que permitiera normalizar las observaciones. Los resultados de las pruebas, no lograron determinar un único valor óptimo para la misma variable, y en algunos casos no se obtuvo convergencia para la estimación. En consideración a lo anterior, se procedió a realizar un análisis no-paramétrico de las variables mediante la prueba de Mann-Whitney para cada una de las variables. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 41: Valores p prueba de Mann-Whitney para la comparación de variables de biomasa en Peumo.

		Diferencia estimada	IC de 95%	W	Valor-p
Peumo	Altura	25,00	(20,00 ; 30,00)	57605,5	<0,001
	DAC	0,20	(0,10 ; 0,20)	52349,0	<0,001
	DAC2xHT	67,50	(49,63 ; .87,00)	55712,0	<0,001

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los resultados obtenidos para ambos tratamientos (con y sin riego) para todas las variables evaluadas en Peumo, siendo significativamente mayor en los expuestos a un tratamiento con riego.

b. Biomasa en Boldo.

Se realizó un análisis de ajuste a la normal mediante la prueba de Anderson-Darling para las variables de biomasa: Altura, DAC y DAC2xHT, determinando que todas las variables no presentan un comportamiento normal para ambos tratamiento (con y sin riego). Los resultados se resumen en la siguiente tabla de valores p:

Tabla 42: Valores p prueba de normalidad para variables de biomasa en Boldo.

		Valor-p	
		Con Riego	Sin Riego
Peumo	Altura	<0,005	<0,005
	DAC	<0,005	<0,005
	DAC2xHT	<0,005	<0,005

Dada la falta de normalidad en los datos, se realizó un análisis mediante la transformación de Box-Cox y de Johnson para determinar la transformación óptima que permitiera normalizar las observaciones. Los resultados de las pruebas, no lograron determinar un único valor óptimo para la misma variable, y en algunos casos no se obtuvo convergencia para la estimación. En consideración a lo anterior, se procedió a realizar un análisis no-paramétrico de las variables mediante la prueba de Mann-Whitney para cada una de las variables. Los resultados de las pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 43: Valores p prueba de Mann-Whitney para la comparación de variables de biomasa en Boldo.

		Diferencia estimada	IC de 95%	W	Valor-p
Peumo	Altura	45,00	(40,00 ; 47,00)	65335,5	<0,001
	DAC	0,50	(0,40 ; 0,60)	60274,5	<0,001
	DAC2xHT	192,75	(163,29 ; .225,31)	63602,0	<0,001

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los resultados obtenidos para ambos tratamientos (con y sin riego) para todas las variables evaluadas en boldo, siendo significativamente mayor en los expuestos a un tratamiento con riego.

Diferencias entre hojas rebrote y remanente

1. Polifenoles

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): Polif_HRebrot, Polif_HRemte

Paired T for Polif_HRebrot - Polif_HRemte

	N	Mean	StDev	SE Mean
Polif_HRebrot	10	60.4	13.4	4.3
Polif_HRemte	10	110.5	33.1	10.5
Difference	10	-50.1	38.9	12.3

95% CI for mean difference: (-77.9, -22.3)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4.08 P-Value = 0.003

2. Flavonoides

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): Flavo_HRebrot, Flavo_HRemte

Paired T for Flavo_HRebrot - Flavo_HRemte

	N	Mean	StDev	SE Mean
Flavo_HRebrot	10	3.170	0.549	0.173
Flavo_HRemte	10	5.479	0.493	0.156
Difference	10	-2.309	0.786	0.248

95% CI for mean difference: (-2.871, -1.747)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -9.29 P-Value = 0.000

3. ABTS

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): ABTS_HRebrot, ABTS_HRemte

Paired T for ABTS_HRebrot - ABTS_HRemte

	N	Mean	StDev	SE Mean
ABTS_HRebrot	10	17.74	4.22	1.33
ABTS_HRemte	10	55.17	17.65	5.58
Difference	10	-37.43	19.20	6.07

95% CI for mean difference: (-51.16, -23.70)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -6.17 P-Value = 0.000

4. DPPH

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): DPPH_HRebrot, DPPH_HRemte

Paired T for DPPH_HRebrot - DPPH_HRemte

	N	Mean	StDev	SE Mean
DPPH_HRebrot	10	16.22	5.12	1.62
DPPH_HRemte	10	42.84	14.91	4.71
Difference	10	-26.62	13.25	4.19

95% CI for mean difference: (-36.10, -17.14)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -6.35 P-Value = 0.000

5. FRAP

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): FRAP_HRebrot, FRAP_HRemte

Paired T for FRAP_HRebrot - FRAP_HRemte

	N	Mean	StDev	SE Mean
FRAP_HRebrot	10	1.650	0.394	0.124
FRAP_HRemte	10	3.121	0.805	0.255
Difference	10	-1.471	1.062	0.336

95% CI for mean difference: (-2.230, -0.712)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4.38 P-Value = 0.002

Diferencias entre hojas nuevas y viejas

1. Polifenoles

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): Polif_HN, Polif_HV

Paired T for Polif_HN - Polif_HV

	N	Mean	StDev	SE Mean
Polif_HN	10	41.93	7.43	2.35
Polif_HV	10	53.00	9.97	3.15
Difference	10	-11.07	8.65	2.73

95% CI for mean difference: (-17.26, -4.89)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4.05 P-Value = 0.003

2. Flavonoides

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): Flavo_HN, Flavo_HV

Paired T for Flavo_HN - Flavo_HV

	N	Mean	StDev	SE Mean
Flavo_HN	10	3.260	0.880	0.278
Flavo_HV	10	4.019	1.462	0.462
Difference	10	-0.759	0.963	0.304

95% CI for mean difference: (-1.448, -0.070)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -2.49 P-Value = 0.034

3. ABTS

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): ABTS_HN, ABTS_HV

Paired T for ABTS_HN - ABTS_HV

	N	Mean	StDev	SE Mean
ABTS_HN	10	12.92	3.71	1.17
ABTS_HV	10	22.21	6.38	2.02
Difference	10	-9.29	6.22	1.97

95% CI for mean difference: (-13.74, -4.84)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4.73 P-Value = 0.001

4. DPPH

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): DPPH_HN, DPPH_HV

Paired T for DPPH_HN - DPPH_HV

	N	Mean	StDev	SE Mean
DPPH_HN	10	21.46	7.33	2.32
DPPH_HV	10	24.96	7.34	2.32
Difference	10	-3.51	11.34	3.59

95% CI for mean difference: (-11.62, 4.60)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -0.98 P-Value = 0.354

5. FRAP

Test t' Student pareado e intervalo de confianza (CI): FRAP_HN, FRAP_HV

Paired T for FRAP_HN - FRAP_HV

	N	Mean	StDev	SE Mean
FRAP_HN	10	1.973	0.302	0.095
FRAP_HV	10	2.719	0.554	0.175
Difference	10	-0.746	0.585	0.185

95% CI for mean difference: (-1.165, -0.327)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4.03 P-Value = 0.003

Diferencias entre hojas con aceite (A) y sin aceite (sA)

1. Polifenoles

Mann-Whitney Test and CI: Polif_A, Polif_sA

	N	Median
Polif_A	3	39.180
Polif_sA	3	36.240

Point estimate for ETA1-ETA2 is 3.930

91.9 Percent CI for ETA1-ETA2 is (1.172,8.460)

W = 15.0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0.0809

2. Flavonoides

Mann-Whitney Test and CI: Flavo_A, Flavo_sA

	N	Median
Flavo_A	3	3.0200
Flavo_sA	3	3.0300

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0.0100

91.9 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0.6998,0.2701)

W = 10.0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 1.0000

3. ABTS

Mann-Whitney Test and CI: ABTS_A, ABTS_sA

	N	Median
ABTS_A	3	12.600
ABTS_sA	3	11.240

Point estimate for ETA1-ETA2 is 1.360

91.9 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0.139,3.010)

W = 14.0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0.1904

4. DPPH

Mann-Whitney Test and CI: DPPH_A, DPPH_sA

	N	Median
DPPH_A	3	19.190
DPPH_sA	3	14.520

Point estimate for ETA1-ETA2 is 4.670
91.9 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0.301,5.651)
W = 14.0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0.1904

5. FRAP

Mann-Whitney Test and CI: FRAP_A, FRAP_sA

	N	Median
FRAP_A	3	2.3300
FRAP_sA	3	1.7800

Point estimate for ETA1-ETA2 is 0.5500
91.9 Percent CI for ETA1-ETA2 is (0.3200,0.7601)
W = 15.0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0.0809

Alcaloides en hojas de boldo de cultivo.

Estadística descriptiva general

Variable	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
boldine	50	189.5	13.0	92.1	76.5	117.7	181.7	233.4	465.7
isocorydine	50	1193.7	73.5	519.9	259.0	835.7	1083.5	1572.2	2907.5
N-Me-LTT	50	2367.0	141.0	994.0	0.0	1687.0	2334.0	2738.0	6192.0
N-ME-SecoB	50	78.1	4.8	34.2	21.6	53.9	75.0	88.3	230.0
Predicentrine	50	1212.7	74.9	529.6	269.7	845.6	1097.0	1569.3	2949.7
norglaucine	50	2488.0	139.0	984.0	702.0	1745.0	2468.0	2876.0	6488.0
LTS	50	197.2	12.7	90.0	70.9	126.7	165.9	261.7	443.3
LTT	50	2215.0	118.0	836.0	834.0	1659.0	2021.0	2638.0	4459.0
reticulina	50	557.3	39.4	278.9	168.2	386.4	450.5	694.1	1338.7
CORIDINA	50	715.0	46.6	329.8	148.4	487.4	631.6	954.8	1859.5
NORISOBOLDINA	50	215.4	14.3	101.4	74.5	138.6	180.2	297.7	475.9
Higenamina	50	108.7	12.6	89.3	21.6	46.4	70.4	147.2	410.7
coclaurina	50	1395.9	50.4	356.1	683.8	1195.9	1383.6	1678.8	2160.5
N-me-coclaurina	50	653.7	50.7	358.5	162.1	390.3	590.2	835.1	2022.3
Glaucina	50	0.3	0.1	0.6	0.0	0.0	0.0	0.4	3.9
Norreticulina	50	0.1	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6
Secoboldina	50	23.8	2.9	20.8	0.0	0.0	27.3	37.8	63.3

Boldina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,5$ ($y^{-0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: boldina_BCx versus Factor

```
Factor  Type  Levels  Values
Factor  fixed      2  40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for boldine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0084586	0.0084586	0.0084586	64.93	0.000
Error	44	0.0057316	0.0057316	0.0001303		
Total	45	0.0141902				

S = 0.0114133 R-Sq = 59.61% R-Sq(adj) = 58.69%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
40%sombra	21	0.09502	A
80%sombra	25	0.06779	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Isocoridina

La variable presentó distribución normal, por tanto, sólo se eliminaron del análisis aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: isocoridina versus Factor

```
Factor  Type  Levels  Values
Factor  fixed      2  40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for isocorydine, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	2643554	2643554	2643554	17.69	0.000
Error	45	6726486	6726486	149477		
Total	46	9370040				

S = 386.623 R-Sq = 28.21% R-Sq(adj) = 26.62%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	22	1439.1	A
40%sombra	25	963.8	B

Means that do not share a letter are significantly different.

N-Me-LTT

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: N-Me-LTT_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for N-Me-LTT_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	635.08	635.08	635.08	24.22	0.000
Error	38	996.59	996.59	26.23		
Total	39	1631.67				

S = 5.12114 R-Sq = 38.92% R-Sq(adj) = 37.31%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	18	54.40	A
40%sombra	22	46.39	B

Means that do not share a letter are significantly different.

N-ME-SecoB

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,50 ($y^{0.50}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: N-ME-SecoB_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for N-ME-SecoB_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	22.299	22.299	22.299	21.53	0.000
Error	40	41.426	41.426	1.036		
Total	41	63.725				

S = 1.01767 R-Sq = 34.99% R-Sq(adj) = 33.37%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	20	9.686	A
40%sombra	22	8.227	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Predicentrina

La variable presentó distribución normal, por tanto, sólo se eliminaron del análisis aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: Predicentrina versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for Predicentrine, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	2570906	2570906	2570906	16.06	0.000
Error	45	7202036	7202036	160045		
Total	46	9772942				

S = 400.057 R-Sq = 26.31% R-Sq(adj) = 24.67%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	22	1454.3	A

40%sombra 25 985.6 B

Means that do not share a letter are significantly different.

Norglaucina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: norglaucine_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for norglaucine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	640.86	640.86	640.86	23.34	0.000
Error	39	1070.73	1070.73	27.45		
Total	40	1711.59				

S = 5.23971 R-Sq = 37.44% R-Sq(adj) = 35.84%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	19	55.05	A
40%sombra	22	47.12	B

Means that do not share a letter are significantly different.

LTS

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a -0,17 ($y^{-0.17}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: LTS_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for LTS_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0090901	0.0090901	0.0090901	12.21	0.001
Error	46	0.0342521	0.0342521	0.0007446		

Total 47 0.0433422

S = 0.0272875 R-Sq = 20.97% R-Sq(adj) = 19.25%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	23	0.4319	A
40%sombra	25	0.4043	B

Means that do not share a letter are significantly different.

LTT

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0.06 ($y^{0.06}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: LTT_BCX versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for LTT_BCX, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0015400	0.0015400	0.0015400	2.56	0.118
Error	40	0.0240987	0.0240987	0.0006025		
Total	41	0.0256386				

S = 0.0245452 R-Sq = 6.01% R-Sq(adj) = 3.66%

Reticulina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a -0,02 ($y^{-0.02}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: reticulina_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for reticulina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0009481	0.0009481	0.0009481	28.57	0.000
Error	44	0.0014603	0.0014603	0.0000332		

Total 45 0.0024084

S = 0.00576088 R-Sq = 39.37% R-Sq(adj) = 37.99%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
40%sombra	23	0.8883	A
80%sombra	23	0.8792	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Coridina

La variable presentó distribución normal, por tanto, sólo se eliminaron del análisis aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: CORIDINA versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for CORIDINA, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	885881	885881	885881	14.43	0.000
Error	45	2762947	2762947	61399		
Total	46	3648828				

S = 247.788 R-Sq = 24.28% R-Sq(adj) = 22.60%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	22	855.2	A
40%sombra	25	580.1	B

Means that do not share a letter are significantly different.

NORISOBOLDINA

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a -0,15 ($y^{-0.15}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: NORISOBOLDINA_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for NORISOBOLDINA_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.013702	0.013702	0.013702	21.97	0.000
Error	44	0.027438	0.027438	0.000624		
Total	45	0.041140				

S = 0.0249717 R-Sq = 33.31% R-Sq(adj) = 31.79%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	21	0.4777	A
40%sombra	25	0.4431	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Higenamina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,50$ ($y^{-0.50}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos. La normalidad en el resultado se logró, pero eliminando varios valores producto del alto residuo estandarizado, por tano, también se realizó una prueba no paramétrica para confirmar el resultado.

General Linear Model: Higenamina_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for Higenamina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.033569	0.033569	0.033569	77.35	0.000
Error	37	0.016057	0.016057	0.000434		
Total	38	0.049626				

S = 0.0208317 R-Sq = 67.64% R-Sq(adj) = 66.77%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
40%sombra	19	0.14318	A
80%sombra	20	0.08449	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Factor-Boldo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Higenamina-Boldo	40%sombra	25	70.79	61.84	50.00	11.60	0.0007
Higenamina-Boldo	80%sombra	25	146.66	97.25	113.60		

Trat.	Ranks
40%sombra	18.48 A
80%sombra	32.52 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Coclaurina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,50$ ($y^{-0.50}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: coclaurina versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for coclaurina, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	60528	60528	60528	0.70	0.407
Error	43	3705420	3705420	86173		
Total	44	3765948				

S = 293.552 R-Sq = 1.61% R-Sq(adj) = 0.00%

N-me-coclaurina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $0,20$ ($y^{0.20}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: N-me-coclaurina_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for N-me-coclaurina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	1.1542	1.1542	1.1542	16.49	0.000
Error	42	2.9391	2.9391	0.0700		
Total	43	4.0934				

S = 0.264536 R-Sq = 28.20% R-Sq(adj) = 26.49%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	21	3.742	A
40%sombra	23	3.418	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Secoboldina

Se eliminaron todos los valores "0", y se realizó una estadística descriptiva.

Variable	Factor	N tot	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
			Ausentes								
Secoboldina	sin factor	50	18	37.20	2.28	12.91	12.86	27.68	35.60	47.28	63.34
Secoboldina	40%sombra	25	5	38.2	3.09	13.8	12.86	29.02	36.61	50.59	63.34
Secoboldina	80%sombra	25	13	35.6	3.37	11.67	20.09	27.06	31.88	47.28	58.42

Kruskal-Wallis Test: Secoboldina versus Factor

32 cases were used
18 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on Secoboldina

Factor	N	Median	Ave Rank	Z
40%sombra	20	36.61	17.4	0.66
80%sombra	12	31.88	15.1	-0.66
Overall	32		16.5	

H = 0.44 DF = 1 P = 0.508

Alcaloides en hojas de peumo de cultivo

Estadística descriptiva general

Variable	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
boldine	49	43.520	7.270	50.870	6.100	14.200	21.800	57.830	275.190
isocorydine	49	0.911	0.216	1.515	0.148	0.310	0.424	0.919	10.038
N-Me-LTT	49	0.924	0.143	0.998	0.138	0.452	0.694	0.976	6.539
Predicentrine	49	0.995	0.240	1.679	0.175	0.345	0.482	0.981	11.133
norglaucine	49	7.340	1.050	7.360	0.740	2.690	5.020	9.380	36.030
LTS	49	15.440	3.420	23.920	0.000	0.650	8.940	16.330	144.320
LTT	49	30.860	4.680	32.750	2.360	10.810	17.010	32.690	125.170
reticulina	49	32.040	4.680	32.780	6.880	13.590	20.100	36.930	185.920
NORISOBOLDINA	49	20.090	4.180	29.280	0.000	0.000	11.030	23.290	162.110
Higenamina	49	11.070	1.730	12.120	0.480	3.740	7.110	15.250	78.090
coclaurina	49	32.050	5.090	35.600	7.390	13.710	18.060	40.020	212.800
N-me-coclaurina	49	4.826	0.736	5.149	1.082	2.116	2.894	5.024	29.170
glaucina	49	0.011	0.003	0.021	0.000	0.000	0.000	0.017	0.115

Boldina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,5$ ($y^{-0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: boldine_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for boldine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.091420	0.091420	0.091420	29.78	0.000
Error	39	0.119718	0.119718	0.003070		
Total	40	0.211138				

S = 0.0554048 R-Sq = 43.30% R-Sq(adj) = 41.84%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	19	0.2565	A

40%sombra 22 0.1618 B

Means that do not share a letter are significantly different.

Isocoridina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,5$ ($y^{-0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: isocorydine_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for isocorydine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.8100	0.8100	0.8100	5.22	0.028
Error	40	6.2055	6.2055	0.1551		
Total	41	7.0155				

S = 0.393875 R-Sq = 11.55% R-Sq(adj) = 9.33%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	19	1.627	A
40%sombra	23	1.348	B

Means that do not share a letter are significantly different.

N-Me-LTT

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,14$ ($y^{-0.14}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: N-Me-LTT_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for N-Me-LTT_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.036307	0.036307	0.036307	8.38	0.006
Error	39	0.169064	0.169064	0.004335		
Total	40	0.205371				

S = 0.0658406 R-Sq = 17.68% R-Sq(adj) = 15.57%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	18	1.093	A
40%sombra	23	1.033	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Predicentrina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,50$ ($y^{-0.50}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: Predicentrina_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	40%sombra, 80%sombra

Analysis of Variance for Predicentrine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	1.2777	1.2777	1.2777	7.84	0.008
Error	42	6.8409	6.8409	0.1629		
Total	43	8.1186				

S = 0.403581 R-Sq = 15.74% R-Sq(adj) = 13.73%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	21	1.636	A
40%sombra	23	1.295	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Norglaucina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox,

donde la variable y fue elevada a $-0,02$ ($y^{-0.02}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: norglaucine_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for norglaucine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0005840	0.0005840	0.0005840	2.82	0.100
Error	42	0.0086909	0.0086909	0.0002069		
Total	43	0.0092750				

S = 0.0143850 R-Sq = 6.30% R-Sq(adj) = 4.07%

LTS

La variable no presentó distribución normal y no se encontró una transformación que permitiera una distribución normal de la variable mediante el test de Johnson. Es por ello se realizará una prueba no paramétricas para el análisis de esta variable.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Factor	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
LTS	40%sombra	24	22.83	30.79	13.05	5.76	0.0156
LTS	80%sombra	25	8.35	11.35	5.75		

Trat.	Ranks
80%sombra	20.20 A
40%sombra	30.00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

LTT

La variable no presentó distribución normal y la transformación no cumple lo supuestos de normalidad del ANOVA. Es por ello se realizará una prueba no paramétricas para el análisis de esta variable.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Factor	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
LTT	40%sombra	24	29.94	37.25	12.90	2.96	0.0854
LTT	80%sombra	25	31.74	28.52	19.85		

Reticulina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox,

donde la variable y fue elevada a $-0,50$ ($y^{-0.50}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: reticulina_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for reticulina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.000064	0.000064	0.000064	0.01	0.905
Error	45	0.200405	0.200405	0.004453		
Total	46	0.200469				

S = 0.0667342 R-Sq = 0.03% R-Sq(adj) = 0.00%

NORISOBOLDINA

La variable no presentó distribución normal y no se encontró una transformación que permitiera una distribución normal de la variable mediante el test de Johnson. Es por ello se realizará una prueba no paramétrica para el análisis de esta variable.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Factor	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NORISOBOLDINA	40%sombra	24	30.10	36.44	16.44	7.40	0.0060
NORISOBOLDINA	80%sombra	25	10.48	15.67	6.32		

Trat.	Ranks
80%sombra	19.56 A
40%sombra	30.67 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Higenamina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $0,06$ ($y^{0.06}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos. La normalidad en el resultado se logró, pero eliminando varios valores producto del alto residuo estandarizado, por tano, también se realizó una prueba no paramétrica para confirmar el resultado.

General Linear Model: Higenamina_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for Higenamina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.059327	0.059327	0.059327	71.96	0.000
Error	36	0.029679	0.029679	0.000824		
Total	37	0.089006				

S = 0.0287127 R-Sq = 66.66% R-Sq(adj) = 65.73%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
80%sombra	21	1.164	A
40%sombra	17	1.085	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Factor	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Higenamina	40%sombra	24	6.97	7.33	4.19	11.97	0.0005
Higenamina	80%sombra	25	15.01	14.46	12.47		

Trat.	Ranks
40%sombra	17.79 A
80%sombra	31.92 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Coclorina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,50$ ($y^{-0.50}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Test for Equal Variances: RESI8 versus Factor

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Factor	N	Lower	StDev	Upper
40%sombra	23	0.0493527	0.0660945	0.0987097
80%sombra	22	0.0364138	0.0490563	0.0740924

F-Test (Normal Distribution)
Test statistic = 1.82, p-value = 0.177

Levene's Test (Any Continuous Distribution)
Test statistic = 3.14, p-value = 0.084

N-me-coclorina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,50$ ($y^{-0.50}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: N-me-coclaurina_BCX versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 40%sombra, 80%sombra
```

Analysis of Variance for N-me-coclaurina_BCX, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.25290	0.25290	0.25290	18.13	0.000
Error	40	0.55808	0.55808	0.01395		
Total	41	0.81098				

S = 0.118118 R-Sq = 31.18% R-Sq(adj) = 29.46%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
40%sombra	19	0.6740	A
80%sombra	23	0.5181	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Concentración de alcaloides, vástago de rebrote vs remanente.

Estadística descriptiva general

Variable	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
boldine	60	197.10	11.80	91.80	64.20	131.60	181.30	251.50	555.00
isocorydine	60	695.60	46.40	359.50	155.90	376.50	663.90	958.60	1687.30
N-Me-LTT	60	1300.60	75.80	587.40	380.20	836.00	1127.50	1734.20	2973.10
Predicentrine	60	668.30	42.60	329.70	158.80	379.80	664.90	900.20	1559.30
norglaucine	60	1381.10	79.70	617.10	390.30	868.40	1228.80	1838.30	3025.20
LTS	60	160.90	14.20	110.10	24.00	89.20	124.80	222.30	535.80
LTT	60	547.90	34.90	270.10	159.80	377.90	510.40	641.00	1606.80
reticulina	60	491.30	43.40	336.30	134.00	252.20	395.00	557.60	1784.20
CORIDINA	60	422.50	28.70	222.00	92.60	226.80	405.50	593.20	1037.00
NORISOBOLDINA	60	162.10	14.80	114.30	27.10	86.20	119.70	236.70	598.10
Higenamina	60	185.90	20.90	161.70	25.80	69.40	139.20	256.20	952.50

coclaurina	60	1390.00	101.00	780.00	343.00	753.00	1240.00	1942.00	3937.00
N-me-coclaurina	60	342.50	32.60	252.40	45.30	173.80	259.30	444.30	1055.30
Glaucina	60	0.22	0.06	0.44	0.00	0.00	0.00	0.26	2.92

Estadística descriptiva considerando el factor de origen

Variable	Factor	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
boldine	Rebrote	30	216.60	19.30	105.50	73.90	143.30	184.70	282.30	555.00
	Vástago	30	177.70	13.20	72.20	64.20	128.80	159.00	235.50	342.20
isocorydine	Rebrote	30	944.10	48.90	267.90	458.90	806.00	937.40	1104.00	1687.30
	Vástago	30	447.10	46.00	251.70	155.90	271.40	378.50	639.00	1173.30
N-Me-LTT	Rebrote	30	1640.00	104.00	568.00	656.00	1225.00	1674.00	2029.00	2973.00
	Vástago	30	961.00	68.50	374.90	380.20	730.10	939.40	1078.10	2048.60
Predicentrine	Rebrote	30	877.30	45.80	251.10	420.70	725.60	880.50	1013.50	1559.30
	Vástago	30	459.30	47.50	260.30	158.80	274.40	382.30	651.40	1215.80
norglaucine	Rebrote	30	1742.00	108.00	594.00	702.00	1313.00	1777.00	2172.00	3025.00
	Vástago	30	1020.50	71.40	391.20	390.30	743.20	1000.80	1173.30	2095.80
LTS	Rebrote	30	168.80	22.10	121.20	28.80	86.50	129.20	237.20	535.80
	Vástago	30	153.00	18.10	99.10	24.00	88.60	118.20	221.40	426.90
LTT	Rebrote	30	580.10	50.30	275.40	210.80	401.50	516.00	694.10	1606.80
	Vástago	30	515.60	48.50	265.50	159.80	321.00	491.10	619.70	1377.50
reticulina	Rebrote	30	516.20	59.80	327.70	161.50	248.60	474.90	673.40	1493.10
	Vástago	30	466.30	63.60	348.40	134.00	250.30	374.90	514.50	1784.20
CORIDINA	Rebrote	30	568.60	31.10	170.40	272.90	457.10	567.00	664.20	1037.00
	Vástago	30	276.40	30.00	164.50	92.60	159.90	227.40	397.30	771.20
NORISOBOLDIN A	Rebrote	30	168.80	23.30	127.70	28.90	85.90	119.70	237.90	598.10
	Vástago	30	155.40	18.40	100.80	27.10	83.80	122.60	235.80	477.60
Higenamina	Rebrote	30	128.10	20.30	111.00	34.00	65.80	87.60	159.70	583.80
	Vástago	30	243.60	33.70	184.30	25.80	119.60	221.80	349.30	952.50
coclaurina	Rebrote	30	1787.00	116.00	633.00	595.00	1263.00	1843.00	2314.00	2939.00
	Vástago	30	993.00	130.00	714.00	343.00	546.00	773.00	1230.00	3937.00
N-me-coclaurina	Rebrote	30	406.40	49.60	271.50	73.40	197.70	316.40	609.20	1055.30

	e	0			0					0
	Vástago	3	278.70	39.80	217.8	45.30	152.90	192.90	366.60	869.10
	o	0			0					
Glaucina	Rebrote	3	0.34	0.10	0.53	0.00	0.18	0.23	0.28	2.92
	e	0								
	Vástago	3	0.10	0.05	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29
	o	0								

Boldina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,04$ ($y^{-0.04}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: boldine_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for boldine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0002976	0.0002976	0.0002976	1.88	0.175
Error	55	0.0086890	0.0086890	0.0001580		
Total	56	0.0089866				

S = 0.0125691 R-Sq = 3.31% R-Sq(adj) = 1.55%

Isocoridina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $0,5$ ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: isocoridina_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for isocorydine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	1780.0	1780.0	1780.0	116.15	0.000
Error	52	796.9	796.9	15.3		
Total	53	2576.9				

S = 3.91478 R-Sq = 69.07% R-Sq(adj) = 68.48%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	27	30.66	A
Vástago	27	19.17	B

Means that do not share a letter are significantly different.

N-ME-LTT

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,23 ($y^{0.23}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: N-Me-LTT_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	Rebrote, Vástago

Analysis of Variance for N-Me-LTT_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	6.4084	6.4084	6.4084	174.94	0.000
Error	39	1.4287	1.4287	0.0366		
Total	40	7.8371				

S = 0.191397 R-Sq = 81.77% R-Sq(adj) = 81.30%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	20	5.596	A
Vástago	21	4.805	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Factor	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
N-Me-LTT	Rebrote	30	1640.13	568.15	1674.16	19.41	<0.0001
N-Me-LTT	Vástago	30	960.97	374.95	939.41		

Trat.	Ranks
Vástago	20.57 A
Rebrote	40.43 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Predicentrina

La variable presentó distribución normal, por tanto, sólo se eliminaron del análisis aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: Predicentrine versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for Predicentrine, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	3352618	3352618	3352618	103.61	0.000
Error	51	1650199	1650199	32357		
Total	52	5002817				

S = 179.880 R-Sq = 67.01% R-Sq(adj) = 66.37%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	26	899.1	A
Vástago	27	395.9	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Norglaucina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: norglaucina_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for norglaucine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	1853.8	1853.8	1853.8	114.17	0.000
Error	46	746.9	746.9	16.2		
Total	47	2600.6				

S = 4.02944 R-Sq = 71.28% R-Sq(adj) = 70.66%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	22	42.93	A
Vástago	26	30.46	B

Means that do not share a letter are significantly different.

LTS

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,12 ($y^{0.12}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: LTS_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	Rebrote, Vástago

Analysis of Variance for LTS_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.00008	0.00008	0.00008	0.01	0.935
Error	49	0.57708	0.57708	0.01178		
Total	50	0.57715				

S = 0.108522 R-Sq = 0.01% R-Sq(adj) = 0.00%

LTT

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a -0,07 ($y^{-0.07}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: LTT_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for LTT_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0007219	0.0007219	0.0007219	4.05	0.050
Error	47	0.0083704	0.0083704	0.0001781		
Total	48	0.0090923				

S = 0.0133452 R-Sq = 7.94% R-Sq(adj) = 5.98%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Vástago	23	0.6527	A
Rebrote	26	0.6450	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Reticulina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,21$ ($y^{-0.21}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: reticulina_BCx versus Factor

```
Factor Type Levels Values
Factor fixed 2 Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for reticulina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0001221	0.0001221	0.0001221	0.17	0.683
Error	50	0.0362127	0.0362127	0.0007243		
Total	51	0.0363348				

S = 0.0269120 R-Sq = 0.34% R-Sq(adj) = 0.00%

Coridina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: CORIDINA_BCx versus Factor

```
Factor  Type  Levels  Values
Factor  fixed      2  Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for CORIDINA_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	1088.2	1088.2	1088.2	113.26	0.000
Error	50	480.4	480.4	9.6		
Total	51	1568.6				

S = 3.09963 R-Sq = 69.37% R-Sq(adj) = 68.76%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	26	23.86	A
Vástago	26	14.71	B

Means that do not share a letter are significantly different.

NORISOBOLDINA

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,09 ($y^{0.09}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: NORISOBOLDINA_BCx versus Factor

```
Factor  Type  Levels  Values
Factor  fixed      2  Rebrote, Vástago
```

Analysis of Variance for NORISOBOLDINA_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.000831	0.000831	0.000831	0.16	0.694
Error	50	0.264578	0.264578	0.005292		

Total 51 0.265409

S = 0.0727431 R-Sq = 0.31% R-Sq(adj) = 0.00%

Higenamina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,02 (y^{-0.02})$. A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: Higenamina_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	Rebrote, Vástago

Analysis of Variance for Higenamina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.0037761	0.0037761	0.0037761	59.78	0.000
Error	47	0.0029687	0.0029687	0.0000632		
Total	48	0.0067448				

S = 0.00794761 R-Sq = 55.99% R-Sq(adj) = 55.05%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	26	0.9137	A
Vástago	23	0.8961	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Coclorina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $0,17 (y^{0.17})$. A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos. Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: coclorina_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	Rebrote, Vástago

Analysis of Variance for coclaurina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	2.7601	2.7601	2.7601	45.18	0.000
Error	56	3.4214	3.4214	0.0611		
Total	57	6.1815				

S = 0.247176 R-Sq = 44.65% R-Sq(adj) = 43.66%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	29	3.555	A
Vástago	29	3.119	B

Means that do not share a letter are significantly different.

N-me-coclaurina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,12 ($y^{0.12}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos. Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: N-me-coclaurina_BCx versus Factor

Factor	Type	Levels	Values
Factor	fixed	2	Rebrote, Vástago

Analysis of Variance for N-me-coclaurina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Factor	1	0.34278	0.34278	0.34278	15.21	0.000
Error	53	1.19468	1.19468	0.02254		
Total	54	1.53747				

S = 0.150137 R-Sq = 22.30% R-Sq(adj) = 20.83%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Rebrote	28	2.031	A
Vástago	27	1.873	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Concentración de alcaloides en hojas de boldo según temporada.

Estadística descriptiva general

Variable	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
boldine	60	149.07	9.94	77.01	31.53	88.04	132.39	196.52	342.18
isocorydine	60	386.20	30.80	238.50	95.60	203.50	319.50	470.70	1173.30
N-Me-LTT	60	671.60	54.60	423.20	18.60	372.70	548.10	955.80	2048.60
Predicentrine	60	396.30	32.20	249.20	20.90	207.70	332.20	489.20	1215.80
norglaucine	60	754.10	55.80	432.30	195.70	415.00	587.20	1059.10	2095.80
LTS	60	144.70	12.70	98.60	24.00	75.30	110.60	212.70	426.90
LTT	60	533.00	32.20	249.80	159.80	352.30	506.30	642.20	1377.50
reticulina	60	325.40	37.90	293.30	30.70	142.60	255.60	396.90	1784.20
CORIDINA	60	190.00	19.60	151.60	20.70	77.60	159.90	250.50	771.20
NORISOBOLDINA	60	148.50	13.20	102.40	25.20	72.80	112.00	223.70	477.60

Estadística descriptiva considerando el factor de origen

Variable	Temporada	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Media	Q3	Max
boldine	2	30	120.50	13.10	71.80	31.50	70.80	98.70	150.90	315.10
	5	30	177.70	13.20	72.20	64.20	128.80	159.00	235.50	342.20
isocorydine	2	30	325.30	38.60	211.40	95.60	185.60	267.60	370.50	1037.50
	5	30	447.10	46.00	251.70	155.90	271.40	378.50	639.00	1173.30
N-Me-LTT	2	30	382.30	41.10	225.00	18.60	217.70	373.00	457.70	1197.30
	5	30	961.00	68.50	374.90	380.20	730.10	939.40	1078.10	2048.60
Predicentrine	2	30	333.20	40.90	224.30	20.90	199.90	279.20	396.30	1053.40
	5	30	459.30	47.50	260.30	158.80	274.40	382.30	651.40	1215.80
norglaucine	2	30	487.70	51.70	283.40	195.70	293.80	434.30	549.50	1572.60
	5	30	1020.50	71.40	391.20	390.30	743.20	1000.80	1173.30	2095.80
LTS	2	30	136.40	18.10	99.10	24.60	43.40	110.10	190.80	364.60
	5	30	153.00	18.10	99.10	24.00	88.60	118.20	221.40	426.90
LTT	2	30	550.30	43.10	236.30	168.40	400.30	506.30	750.60	997.90
	5	30	515.60	48.50	265.50	159.80	321.00	491.10	619.70	1377.50
reticulina	2	30	184.40	20.40	112.00	30.70	84.80	166.30	260.10	506.00
	5	30	466.30	63.60	348.40	134.00	250.30	374.90	514.50	1784.20

				0	0	0	0			0
CORIDINA	2	30	103.70	12.0	65.70	20.70	51.80	79.80	153.20	268.00
	5	30	276.40	30.0	164.5	92.60	159.9	227.40	397.30	771.20
				0	0		0			
NORISOBOLDIN	2	30	141.60	19.2	105.3	25.20	43.80	111.60	204.90	381.80
A	5	30	155.40	18.4	100.8	27.10	83.80	122.60	235.80	477.60
				0	0					

Boldina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,18 ($y^{0.18}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: boldina_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for boldine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	0.70246	0.70246	0.70246	28.09	0.000
Error	50	1.25059	1.25059	0.02501		
Total	51	1.95305				

S = 0.158151 R-Sq = 35.97% R-Sq(adj) = 34.69%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
5	28	2.512	A
2	24	2.279	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Isocoridina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a -0,09 ($y^{-0.09}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: isocoridina_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for isocorydine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	0.0030782	0.0030782	0.0030782	4.45	0.040
Error	54	0.0373924	0.0373924	0.0006925		
Total	55	0.0404705				

S = 0.0263145 R-Sq = 7.61% R-Sq(adj) = 5.89%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
2	27	0.6023	A
5	29	0.5875	B

Means that do not share a letter are significantly different.

N-Me-LTT

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: N-Me-LTT_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for N-Me-LTT_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	1885.7	1885.7	1885.7	207.79	0.000
Error	46	417.5	417.5	9.1		
Total	47	2303.1				

S = 3.01248 R-Sq = 81.87% R-Sq(adj) = 81.48%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
5	22	30.67	A
2	26	18.09	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Predicentrina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: Predicentrina_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for Predicentrine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	113.79	113.79	113.79	7.58	0.008
Error	49	735.69	735.69	15.01		
Total	50	849.48				

S = 3.87481 R-Sq = 13.40% R-Sq(adj) = 11.63%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
5	26	19.11	A
2	25	16.12	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Norglaucina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a -0,02 ($y^{-0.02}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: norglaucina_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for norglaucine_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	0.0023968	0.0023968	0.0023968	112.17	0.000
Error	47	0.0010043	0.0010043	0.0000214		
Total	48	0.0034011				

S = 0.00462253 R-Sq = 70.47% R-Sq(adj) = 69.84%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
2	24	0.8862	A
5	25	0.8722	B

Means that do not share a letter are significantly different.

LTS

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,18 ($y^{0.18}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: LTS_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for LTS_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	0.13193	0.13193	0.13193	1.46	0.233
Error	57	5.16578	5.16578	0.09063		
Total	58	5.29771				

S = 0.301044 R-Sq = 2.49% R-Sq(adj) = 0.78%

LTT

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,07$ ($y^{-0.07}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: LTT_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for LTT_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	1.1096	1.1096	1.1096	10.56	0.002
Error	49	5.1466	5.1466	0.1050		
Total	50	6.2562				

S = 0.324088 R-Sq = 17.74% R-Sq(adj) = 16.06%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
2	26	4.321	A
5	25	4.026	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Reticulina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $0,01$ ($y^{0.01}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos. Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: reticulina_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for reticulina_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
--------	----	--------	--------	--------	---	---

Temporada	1	0.0009753	0.0009753	0.0009753	36.17	0.000
Error	52	0.0014021	0.0014021	0.0000270		
Total	53	0.0023774				

S = 0.00519271 R-Sq = 41.02% R-Sq(adj) = 39.89%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
5	27	1.060	A
2	27	1.051	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Coridina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,11 ($y^{0.11}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: CORIDINA_BCx versus Temporada

Factor	Type	Levels	Values
Temporada	fixed	2	2, 5

Analysis of Variance for CORIDINA_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	0.40735	0.40735	0.40735	36.54	0.000
Error	55	0.61316	0.61316	0.01115		
Total	56	1.02050				

S = 0.105586 R-Sq = 39.92% R-Sq(adj) = 38.82%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Temporada	N	Mean	Grouping
5	29	1.819	A
2	28	1.650	B

Means that do not share a letter are significantly different.

NORISOBOLDINA

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,15 ($y^{0.15}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se

probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

Finalmente se utilizó un modelo lineal general anidado para evaluar los diferentes factores y el test a posteriori de Tukey para comparar entre grupos.

General Linear Model: NORISOBOLDINA_BCx versus Temporada

```
Factor      Type  Levels  Values
Temporada  fixed    2      2, 5
```

Analysis of Variance for NORISOBOLDINA_BCx, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temporada	1	0.01862	0.01862	0.01862	0.38	0.538
Error	57	2.76681	2.76681	0.04854		
Total	58	2.78544				

S = 0.220319 R-Sq = 0.67% R-Sq(adj) = 0.00%

Polifenoles en las hojas de boldo de cultivo

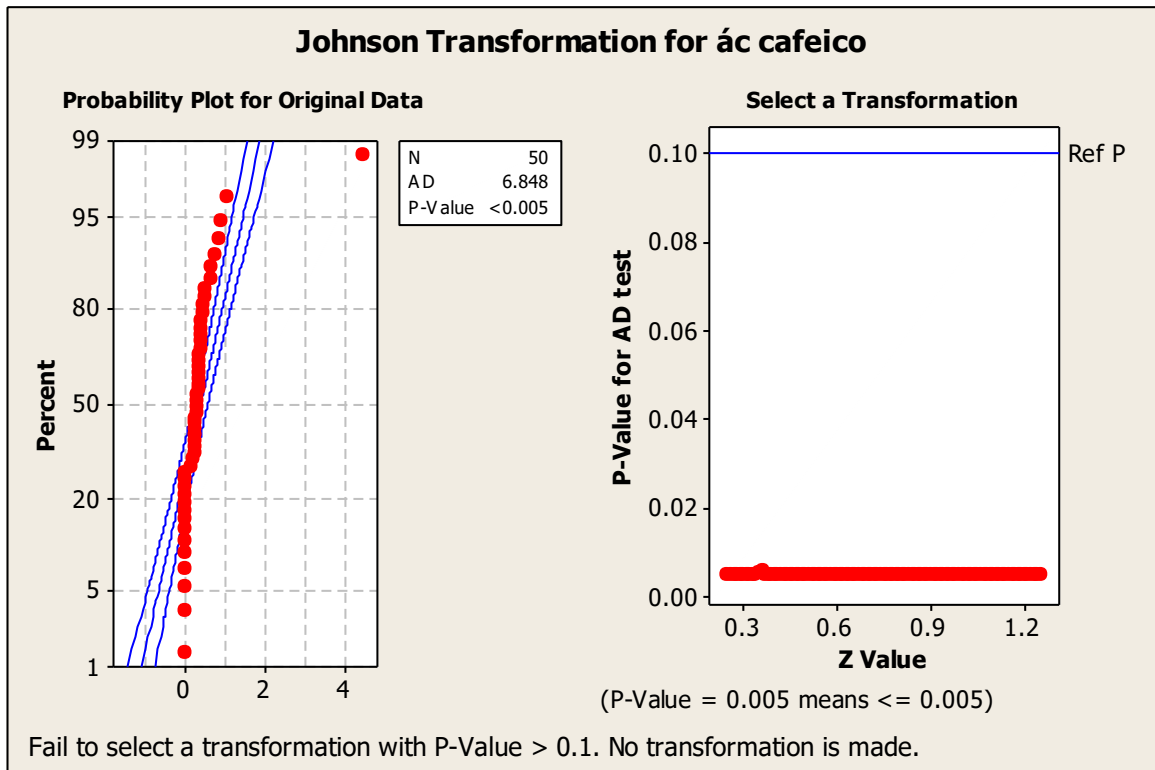
Variable	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
Ác cafeico	50	0.381	0.091	0.645	0.000	0.000	0.290	0.419	4.485
apigenina	50	0.581	0.082	0.580	0.000	0.000	0.612	0.835	2.871
catequina	50	560.900	73.300	518.600	0.000	161.300	367.900	948.800	2181.900
Ac cumarico	50	10.466	0.712	5.038	0.000	7.531	9.953	13.727	24.706
epicatequina	50	367.500	44.300	313.300	0.000	118.300	267.800	581.800	1327.300
isoramnetina	50	7.910	2.090	14.770	0.000	1.880	4.720	9.970	104.430
kaempferol	50	9.340	3.780	26.750	0.000	2.180	4.020	5.480	175.190
Pinocembrina	50	0.352	0.026	0.181	0.000	0.230	0.335	0.447	1.020
Prob1	50	198.300	35.500	251.300	0.000	22.000	80.500	325.400	1305.600
Prob2	50	185.800	32.900	232.800	0.000	21.400	78.900	302.100	1204.400
Proc1	50	55.050	9.300	65.780	0.000	6.820	28.590	85.690	343.330
quercetina	50	5.032	0.526	3.716	0.152	2.192	4.579	7.656	15.498
quercitrina	50	57.470	6.020	42.580	0.150	23.170	46.360	75.210	184.070
rutina	50	181.100	12.200	86.400	0.000	128.700	167.200	216.700	501.000
clorogenico	50	0.113	0.085	0.601	0.000	0.000	0.000	0.000	4.245

Variable	%Sombra	N	Mean	SE	StDev	Min	Q1	Median	Q3	Max
Ác. cafeico	40%	25	0.49	0.17	0.86	0.00	0.25	0.35	0.40	4.49
	80%	25	0.27	0.06	0.30	0.00	0.00	0.24	0.43	1.03
apigenina	40%	25	0.48	0.14	0.69	0.00	0.00	0.00	0.86	2.87
	80%	25	0.68	0.09	0.44	0.00	0.51	0.70	0.84	1.66
catequina	40%	25	762.0	111.0	553.0	39.0	310.0	650.0	1173.0	2182.0
	80%	25	359.4	79.6	398.2	0.0	21.8	257.8	546.1	1453.3

Ac cumarico	40%	25	10.6	0.9	4.3	3.7	7.7	9.7	14.6	21.5
	80%	25	10.4	1.2	5.8	0.0	7.0	10.5	13.0	24.7
epicatequina	40%	25	498.8	65.7	328.7	42.6	205.2	472.8	748.7	1327.3
	80%	25	236.2	47.5	237.6	0.0	30.3	189.7	379.7	852.2
isoramnetina	40%	25	11.0	4.0	20.1	0.0	2.6	7.8	11.5	104.4
	80%	25	4.8	0.9	4.5	0.0	1.8	3.3	6.7	18.0
kaempferol	40%	25	8.2	3.3	16.4	0.0	2.5	4.4	5.7	85.0
	80%	25	10.5	6.9	34.5	0.0	1.7	3.6	5.1	175.2
Pinocembrina	40%	25	0.348	0.031	0.157	0.126	0.225	0.335	0.458	0.772
	80%	25	0.355	0.041	0.205	0.000	0.229	0.335	0.444	1.020
Prob1	40%	25	290.3	61.3	306.7	2.6	57.6	214.7	447.9	1305.6
	80%	25	106.2	26.3	131.5	0.0	0.8	45.3	221.7	396.8
Prob2	40%	25	272.2	56.6	283.2	2.3	57.4	200.7	406.8	1204.4
	80%	25	99.4	24.4	122.0	0.0	0.8	44.9	210.9	376.0
Proc1	40%	25	79.0	15.7	78.7	0.0	20.7	55.8	112.0	343.3
	80%	25	31.1	7.6	38.2	0.0	0.0	12.4	63.2	120.4
quercetina	40%	25	6.4	0.7	3.3	2.0	4.6	5.9	8.1	15.5
	80%	25	3.6	0.7	3.6	0.2	1.0	2.5	4.5	13.4
quercitrina	40%	25	75.8	9.1	45.3	12.3	42.9	61.5	111.6	184.1
	80%	25	39.2	6.2	30.9	0.2	20.7	28.0	53.7	141.1
rutina	40%	25	205.2	19.6	98.1	63.4	131.1	190.2	243.2	501.0
	80%	25	157.1	13.3	66.4	0.0	121.4	154.7	188.0	346.3
clorogenico	40%	25	0.215	0.169	0.845	0.000	0.000	0.000	0.098	4.245
	80%	25	0.012	0.007	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.128

Ác. cafeico

La variable no presentó distribución normal y no se encontró una transformación que permitiera una distribución normal de la variable mediante el test de Johnson. Es por ello se realizará una prueba no paramétricas para el análisis de esta variable.

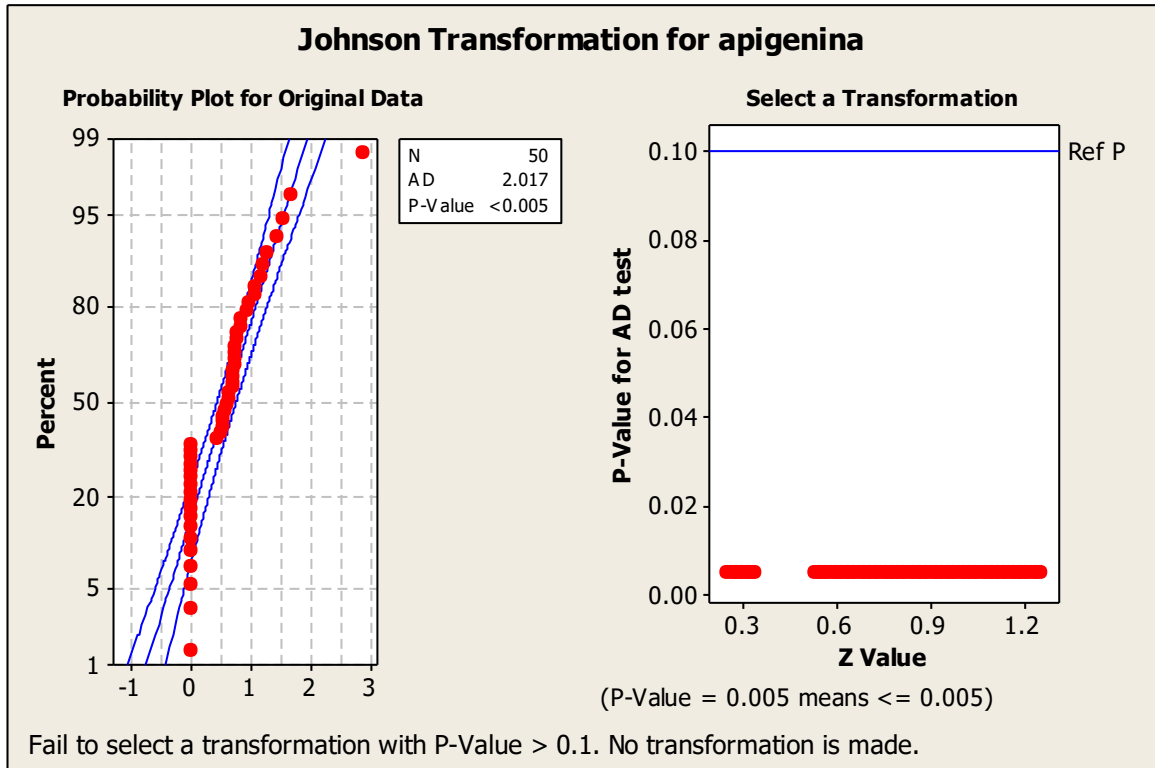


Prueba de Kruskal Wallis

Variable	%Sombra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
ác cafeico	40%	25	0.49	0.86	0.35	1.49	0.2165
ác cafeico	80%	25	0.27	0.30	0.24		

Apigenina

La variable no presentó distribución normal y no se encontró una transformación que permitiera una distribución normal de la variable mediante el test de Johnson. Es por ello se realizará una prueba no paramétricas para el análisis de esta variable.



Prueba de Kruskal Wallis

Variable	%Sombra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Apigenina	40%	25	0.48	0.69	0.00	1.92	0.1554
Apigenina	80%	25	0.68	0.44	0.70		

Catequina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: catequina_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for catequina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	1406.9	1406.9	1406.9	17.11	0.000
Error	43	3535.5	3535.5	82.2		
Total	44	4942.4				

S = 9.06763 R-Sq = 28.47% R-Sq(adj) = 26.80%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
0.4	23	25.60	A
0.8	22	14.41	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Ac. cumarico

La variable presentó distribución normal y se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2.

General Linear Model: Ac cumarico versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for Ac cumarico, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	1.76	1.76	1.76	0.15	0.703
Error	42	501.03	501.03	11.93		
Total	43	502.79				

S = 3.45387 R-Sq = 0.35% R-Sq(adj) = 0.00%

Epicatequina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: epicatequina_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for epicatequina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	661.75	661.75	661.75	12.53	0.001
Error	45	2377.24	2377.24	52.83		
Total	46	3039.00				

S = 7.26826 R-Sq = 21.78% R-Sq(adj) = 20.04%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
---------	---	------	----------

0.4	24	20.40	A
0.8	23	12.90	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Isoramnetina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,01$ ($y^{-0.01}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: isoramnetina_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for isoramnetina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	0.0005656	0.0005656	0.0005656	21.59	0.000
Error	34	0.0008909	0.0008909	0.0000262		
Total	35	0.0014565				

S = 0.00511885 R-Sq = 38.83% R-Sq(adj) = 37.04%

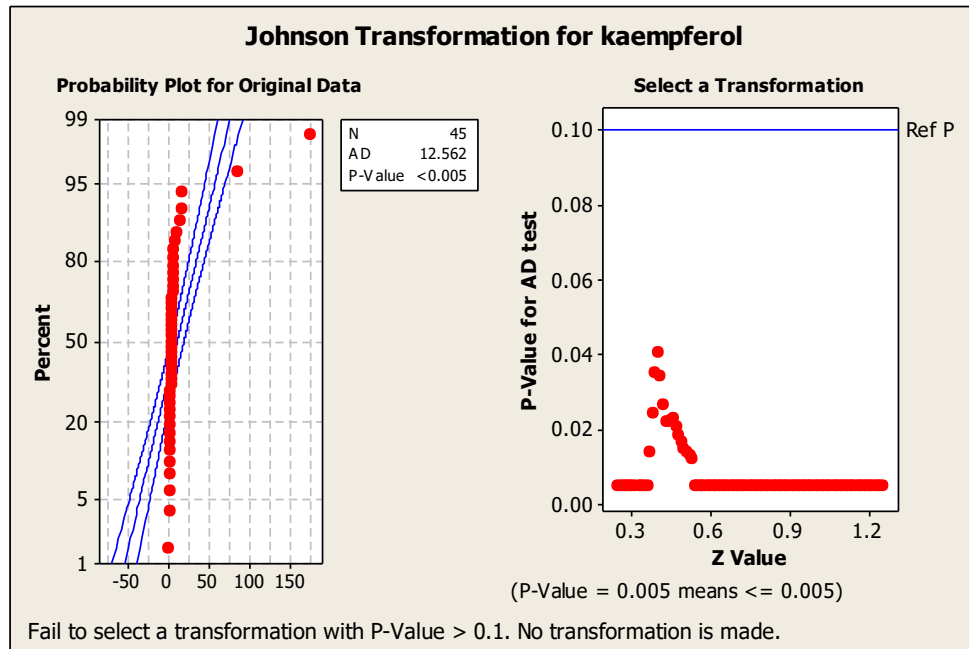
Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
0.8	18	0.9870	A
0.4	18	0.9791	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Kaempferol

La variable no presentó distribución normal y no se encontró una transformación que permitiera una distribución normal de la variable mediante el test de Johnson. Es por ello se realizará una prueba no paramétricas para el análisis de esta variable.



Prueba de Kruskal Wallis

Variable	%Sombra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
kaempferol	40%	24	8.50	16.70	4.38	0.63	0.4259
kaempferol	80%	21	12.52	37.41	3.97		

Pinocembrina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,19$ ($y^{-0.19}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: Pinocembrina_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for Pinocembrina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	0.005631	0.005631	0.005631	0.85	0.363
Error	41	0.272689	0.272689	0.006651		
Total	42	0.278319				

S = 0.0815533 R-Sq = 2.02% R-Sq(adj) = 0.00%

Prob1

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,25 ($y^{0.25}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: Prob1_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for Prob1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	4.153	4.153	4.153	4.08	0.050
Error	40	40.727	40.727	1.018		
Total	41	44.879				

S = 1.00904 R-Sq = 9.25% R-Sq(adj) = 6.98%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
0.4	23	3.581	A
0.8	19	2.949	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Prob2

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,26 ($y^{0.26}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: Prob2_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for Prob2_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	4.967	4.967	4.967	4.35	0.044
Error	40	45.708	45.708	1.143		
Total	41	50.675				

S = 1.06897 R-Sq = 9.80% R-Sq(adj) = 7.55%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
0.4	23	3.727	A
0.8	19	3.036	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Proc1

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,17 ($y^{0.17}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: Proc1_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for Proc1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	0.1197	0.1197	0.1197	1.14	0.292
Error	37	3.8790	3.8790	0.1048		
Total	38	3.9987				

S = 0.323786 R-Sq = 2.99% R-Sq(adj) = 0.37%

Quercetina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: quercetina_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for quercetina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	9.1624	9.1624	9.1624	41.07	0.000
Error	40	8.9229	8.9229	0.2231		
Total	41	18.0853				

S = 0.472305 R-Sq = 50.66% R-Sq(adj) = 49.43%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
0.4	23	2.339	A
0.8	19	1.400	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Quercitrina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: quercitrina_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for quercitrina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	60.155	60.155	60.155	15.68	0.000
Error	43	164.956	164.956	3.836		
Total	44	225.111				

S = 1.95862 R-Sq = 26.72% R-Sq(adj) = 25.02%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
0.4	22	8.109	A
0.8	23	5.796	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Rutina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a -0,05 ($y^{-0.05}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: rutina_1 versus %Sombra

Factor	Type	Levels	Values
%Sombra	fixed	2	0.4, 0.8

Analysis of Variance for rutina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
%Sombra	1	0.0005727	0.0005727	0.0005727	4.55	0.039
Error	41	0.0051585	0.0051585	0.0001258		
Total	42	0.0057312				

S = 0.0112168 R-Sq = 9.99% R-Sq(adj) = 7.80%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

%Sombra	N	Mean	Grouping
0.8	22	0.7774	A
0.4	21	0.7701	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Diferencias entre las hojas de cultivo y poblaciones naturales.

Variable	Zona	n	Mean	SE	Min	Q1	Median	Q3	Max
cafeico	Cultivo	50	0.381	0.0913	0	0	0.2897	0.4191	4.4848
	Natura	20	0.3432	0.0263	0	0.2834	0.3358	0.4209	0.5886
apigenina	Cultivo	50	0.5807	0.082	0	0	0.6117	0.8351	2.8713
	Natura	20	0	0	0	0	0	0	0
catequina	Cultivo	50	560.9	73.3	0	161.3	367.9	948.8	2181.9
	Natura	20	3467	573	0	228	4069	5709	8274
Ac cumarico	Cultivo	50	10.466	0.712	0	7.531	9.953	13.727	24.706
	Natura	20	5.383	0.451	2.226	3.935	5.226	7.006	9.005
epicatequina	Cultivo	50	367.5	44.3	0	118.3	267.8	581.8	1327.3
	Natura	20	2961	223	549	2266	3148	3627	5105
isoramnetina	Cultivo	50	7.91	2.09	0	1.88	4.72	9.97	104.43
	Natura	20	0.771	0.315	0	0	0	1.286	5.858
kaempferol	Cultivo	50	9.34	3.78	0	2.18	4.02	5.48	175.19
	Natura	20	0.716	0.185	0	0	0.499	1.304	2.942
Pinocembrina	Cultivo	50	0.3516	0.0255	0	0.2295	0.3353	0.4467	1.0197
	Natura	20	0.0546	0.0146	0	0	0	0.1233	0.161
Prob1	Cultivo	50	198.3	35.5	0	22	80.5	325.4	1305.6
	Natura	20	2732	225	72	2069	2795	3478	4151
Prob2	Cultivo	50	185.8	32.9	0	21.4	78.9	302.1	1204.4
	Natura	20	2463	199	67	1845	2475	3043	3656
Proc1	Cultivo	50	55.05	9.3	0	6.82	28.59	85.69	343.33
	Natura	20	645.1	47.2	26.3	548.6	640.9	808.6	1029.4
quercetina	Cultivo	50	5.032	0.526	0.152	2.192	4.579	7.656	15.498
	Natura	20	4.455	0.617	0	2.956	4.17	6.177	11.752
quercitrina	Cultivo	50	57.47	6.02	0.15	23.17	46.36	75.21	184.07
	Natura	20	202.2	27.1	21.8	125.9	178.1	243.4	542.1

rutina	Cultivo	50	181.1	12.2	0	128.7	167.2	216.7	501
	Natura	20	204.4	27.6	56.3	117.1	163.8	266.7	544.8
clorogenico	Cultivo	50	0.1134	0.0849	0	0	0	0	4.2448
	Natura	20	0.461	0.313	0	0	0	0.045	5.902

Ác. cafeico

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a $-0,5$ ($y^{-0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: ác cafeico_1 versus Zona

```
Factor Type Levels Values
Zona fixed 2 Cultivo, Natura
```

Analysis of Variance for ác cafeico_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Zona	1	0.01227	0.01227	0.01227	0.37	0.544
Error	42	1.37869	1.37869	0.03283		
Total	43	1.39096				

S = 0.181179 R-Sq = 0.88% R-Sq(adj) = 0.00%

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Zona	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
catequina	Cultivo	50	560.87	518.62	367.92	9.69	0.0018
catequina	Natura	20	3466.84	2561.97	4068.57		

Trat.	Ranks
Cultivo	30.71 A
Natura	47.48 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Ac cumarico

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación del LN de la variable. A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2 . Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: Ac cumarico_1 versus Zona

```
Factor Type Levels Values
Zona fixed 2 Cultivo, Natura
```

Analysis of Variance for Ac cumarico_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Zona	1	4.3854	4.3854	4.3854	40.42	0.000
Error	59	6.4018	6.4018	0.1085		
Total	60	10.7873				

S = 0.329402 R-Sq = 40.65% R-Sq(adj) = 39.65%

Unusual Observations for Ac cumarico_1

Obs	cumarico_1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
48	1.61181	2.28576	0.05023	-0.67396	-2.07 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Zona	N	Mean	Grouping
Cultivo	43	2.286	A
Natura	18	1.698	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Epicatequina

La variable no presentó distribución normal por lo que se probaron diferentes transformaciones, utilizándose la transformación propuesta por el test de Box Cox, donde la variable y fue elevada a 0,5 ($y^{0.5}$). A su vez, se eliminaron del análisis todas aquellas variables que poseían un residuo estandarizado menor a -2 y mayor a 2. Se probaron los supuestos de normalidad con los residuos, mediante los test de Anderson Darling, prueba de Barlett y de independencia de los datos.

General Linear Model: epicatequina_1 versus Zona

Factor	Type	Levels	Values
Zona	fixed	2	Cultivo, Natural

Analysis of Variance for epicatequina_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Zona	1	17954	17954	17954	340.91	0.000
Error	61	3213	3213	53		
Total	62	21167				

S = 7.25705 R-Sq = 84.82% R-Sq(adj) = 84.57%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Zona	N	Mean	Grouping
Natura	17	55.01	A
Cultivo	46	16.98	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Isoramnetina

La variable no presentó distribución normal y no se logró encontrar una transformación que permitiera realizar un test paramétrico.

Kruskal-Wallis Test: isoramnetina versus Zona

54 cases were used
16 cases contained missing values

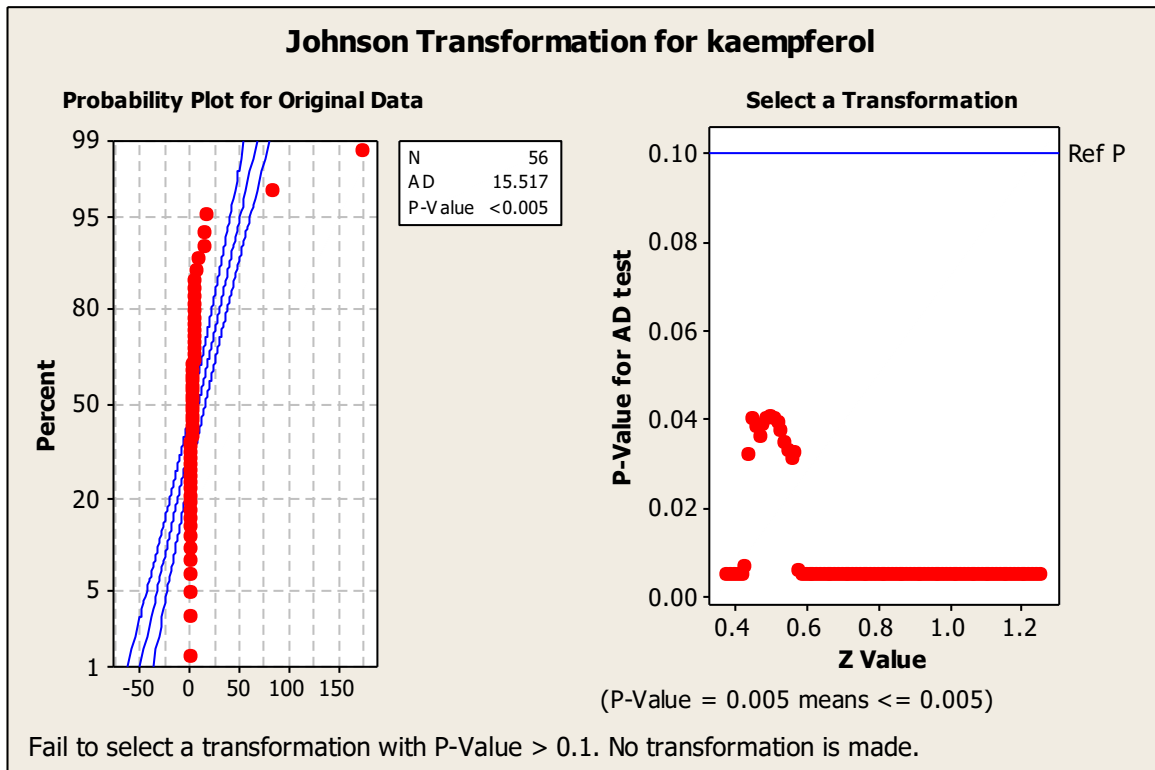
Kruskal-Wallis Test on isoramnetina

Zona	N	Median	Ave Rank	Z
Cultivo	45	5.437	30.7	3.38
Natura	9	1.359	11.3	-3.38
Overall	54		27.5	

H = 11.40 DF = 1 P = 0.001

kaempferol

La variable no presentó distribución normal y no se logró encontrar una transformación a través del test de Johnson que permitiera realizar un test paramétrico.



Kruskal-Wallis Test: kaempferol versus Zona

56 cases were used
 14 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on kaempferol

Zona	N	Median	Ave Rank	Z
Cultivo	45	4.168	33.5	4.65
Natura	11	1.277	8.0	-4.65
Overall	56		28.5	

H = 21.63 DF = 1 P = 0.000

Pinocembrina

La variable no presentó distribución normal y no se logró encontrar una transformación que permitiera realizar un test paramétrico.

Kruskal-Wallis Test: Pinocembrina_1 versus Zona

58 cases were used
 12 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on Pinocembrina_1

Zona	N	Median	Ave Rank	Z
Cultivo	49	1.727	25.1	-4.59
Natura	9	2.775	53.2	4.59
Overall	58		29.5	

H = 21.02 DF = 1 P = 0.000