



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAMBIOS MORFOANATÓMICOS
FOLIARES EN *Polylepis sericea* Wedd. (ROSACEAE: SANGUISORBEAE) EN UN
GRADIENTE ALTITUDINAL DE LA SIERRA NEVADA DE MÉRIDA.**

Trabajo Especial de Grado para optar por el título de licenciado en Biología

Br. Diego José García Mora

Tutora: Dra. Francisca Ely Bali

Cotutor: Dr. Carmelo Rosquete Porcar

Enero, 2019. Mérida, Venezuela

JARDÍN BOTÁNICO DE MÉRIDA



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Anatomía y Embriología de Espermatofitas del Instituto Jardín Botánico de Mérida y el Laboratorio de Productos Naturales, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, con la colaboración del sistema teleférico Mukumbarí del estado Mérida.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A la vida, porque aunque azarosa e impredecible, agradezco cada uno de los pasos dados para llegar a este momento. A la Biología, ciencia tan apasionante y pura, no hay mejor manera de expresar el amor por la vida que dedicar tu existencia a estudiarla.

A mis padres por su inmenso amor, a veces fuerte, a veces suave, pero siempre puro, no me puedo imaginar una vida sin ellos a mi lado. A mis hermanos, a Manuelita por su paciencia, a Liliana por su sabiduría, a Daniel por su alegría y a Claudia por su empatía, nunca desearía unos hermanos distintos a ustedes. A toda mi familia (incluida Bella) por estar siempre a mi lado apoyándome y amándome ¡Qué hermosa es mi familia!

A Víctor, Oriana, José Gabriel, Mary Selva y Juan Carlos mis mejores amigos por compartir sus risas, llantos, preocupaciones, celebraciones y muchas cervezas ¡Qué nunca se acaben las cervezas!

A la Facultad de Ciencias y a todos sus profesores, por sus enseñanzas, cada uno de ellos me inculcaron la increíble pasión que hoy siento por la Ciencia. A la Coral de Ciencias y a todos sus coralistas, por iniciarme en un mundo tan maravilloso y apasionante, con especial énfasis a Eliana, su directora, que siempre tuvo todo la paciencia y cariño para enseñar.

A mis tutores, por abrirme las puertas de sus laboratorios, acompañarme en cada momento, aconsejarme en cada duda, especialmente por su inmensa paciencia y apoyo durante todo el desarrollo de este proyecto. A los jurados, por sus recomendaciones, y críticas siempre acertadas y objetivas que me permitieron desarrollar al máximo este proyecto.

A la Universidad de Los Andes, ilustre Alma Mater donde me siento inmensamente orgulloso de ser estudiante, solo existen los mejores recuerdos en mí para tan bella Universidad.

¡Simplemente Gracias!

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

El género *Polylepis* está representado por árboles pequeños y arbustos adaptados a ambientes de alta montaña tropical, como páramos y punas, caracterizados por una elevada radiación todo el año, así como déficit hídricos estacionales. Para el caso de *P. sericea* Wedd., única especie reportada para Venezuela y con la mayor distribución latitudinal del género, se han propuesto distintos mecanismos y adaptaciones para explicar su distribución altitudinal a ecosistemas de alta montaña (3.200-4.500 m.s.n.m.). Hasta la fecha, los estudios relacionados con la fitoquímica, en especial los compuestos con capacidad fotoprotectora, en este género son notablemente escasos, pese a que los mismos podrían aportar información relevante para comprender mejor sus mecanismos adaptativos a ambientes expuesto a radiaciones elevadas. Se planteó la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, así como los cambios morfoanatómicos en individuos de *P. sericea* distribuidos a lo largo de un gradiente altitudinal (3.549, 3.836, 4.087 y 4.223 m.s.n.m.) en la Sierra Nevada de Mérida, basado en estudios morfoanatómicos foliares del área foliar específica (AFE) y secciones transversales foliares teñidas con Azul de Alcian/Safranina, FeSO_4 , FeCl_3 ; como la cuantificación de polifenoles en extractos metanólicos foliares con Folin-Ciocalteu y llevando el extracto a sequedad, por último se acopló la cuantificación a barridos espectrofotométricos y cromatografía en capa fina con vainillina sulfúrica para discernir la composición de los extractos. Desde un punto de vista ecológico, los bosques de *P. sericea* se distribuyen en un gradiente hídrico que disminuye en sentido ascendente a lo largo del gradiente altitudinal muestreado, afectando el tamaño y desarrollo de los individuos que crecen a mayor altitud, 4.223 m.s.n.m, quienes presentan una forma de vida arbustiva, a diferencia de las formas de vida arbóreas presentes en altitudes inferiores. A diferencia del desarrollo de los individuos, la estructura morfoanatómica de *P. sericea* es muy conservada a lo largo de su intervalo de distribución altitudinal. Se corrobora que *P. sericea* presenta una hoja típicamente heliófita, con una cutícula y paredes de la células adaxiales engrosadas, epidermis uniestratificada y un parénquima en empalizada de tres estratos de células muy compactados. Las tinciones con reactivos ferrosos revelaron que la acumulación de agentes quelantes se produce en todo el clorénquima, en la envoltura de los cloroplastos; en una mayor proporción en los dos primeros estratos del parénquima en empalizada. Se postula que en *P. sericea* los compuestos quelantes interactúan con las especies reactivas de oxígeno (ROS), productos de la excitación excesiva del aparato fotosintético, evitando el estrés oxidativo, actuando como antioxidantes intracelulares. Al cuantificar el contenido de polifenoles hidroxí sustituidos, se determinó que el mayor contenido correspondió a los individuos creciendo a menor altitud, a 3.549 m.s.n.m., aunado a que la mayor intensidad en las tinciones con hierro correspondió a los individuos creciendo en el límite superior del gradiente, a 4.223 m.s.n.m, se rechaza que el aumento en el contenido de polifenoles en hojas de *P. sericea*, esté asociado con un gradiente altitudinal, aunque si se demuestran diferencias en la composición de los compuestos fenólicos sintetizados a distintas altitudes. Los análisis UV, revelaron un patrón de espectro muy similar de los extractos, con un pico de absorbancia a 212 nm, el cual se presume corresponder a glucósidos de flavonoles y flavonas hidroxí sustituidos. A través de los barridos espectrofotométricos, se determinó que el extracto proveniente de individuos creciendo a 4.223 m.s.n.m. está compuesto mayoritariamente por flavonas fuertemente oxidadas en su anillo A, mientras que las cromatografías en capa fina en sílica gel reveladas con vainillina, muestran que el extracto proveniente de individuos creciendo a 3.549 m.s.n.m. está compuesto por glicósidos de flavanoles. En ambos casos, los principales componentes de los extractos pertenecen a fenilpropanoides hidroxí sustituidos.

Palabras Claves: Rosaceae, heliofitismo, fenilpropanoides, quelantes, páramo.

CONTENIDO

RESUMEN	4
CONTENIDO	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ANEXOS	9
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	12
Descripción de <i>Polylepis sericea</i> Wedd.	13
Ecofisiología de <i>Polylepis sericea</i>	15
Metabolitos Secundarios	17
Flavonoides en el género <i>Polylepis</i>	18
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Zona de estudio	24
Recolección de muestras de estudio	25
Análisis morfoanatómicos	26
Análisis estadísticos	28
Extracción de los compuestos fenólicos	29
Ensayo de Folin-Ciocalteu	30
RESULTADOS	33
Caracteres morfoanatómicos	33
Compuestos fenólicos	43
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista esquemática de la biosíntesis de los fenilpropanoides.	11
Figura 2. Secciones transversales del mesófilo de <i>Polylepis sericea</i> .	14
Figura 3. Individuos de <i>Polylepis sericea</i> provenientes de La Sierra Nevada de Mérida.	16
Figura 4. Metabolitos secundarios reportados en el género <i>Polylepis</i> .	19
Figura 5. Mapa de los Bosques de <i>Polylepis sericea</i> ubicados en las cercanías del Sistema Teleférico Mukumbarí	25
Figura 6. Escaneo de hojas frescas de <i>P. sericea</i> conservadas en F.A.A. utilizadas para medir el área foliar específica.	26
Figura 7. Mecanismo de acción de dímeros de epicatequina (B2) como agentes quelantes de iones de Fe (III).	27
Figura 8. Proporción [Fe(III)/Fe(total)] como una función de pH para una solución Fe- polifenoles.	28
Figura 9. Efecto del solvente de extracción en el total de fenoles.	29
Figura 10. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.	31
Figura 11. Bosques de <i>Polylepis sericea</i> ubicados en las cercanías del Sistema Teleférico Mukumbarí	33
Figura 12. Corte transversal de la lámina foliar de <i>P. sericea</i> teñido con Azul de Alcian/Safranina. Objetivo 10x	34
Figura 13. Corte transversal de la lámina foliar de <i>P. sericea</i> teñido con Azul de Alcian/Safranina. Objetivo 40x	35
Figura 14. Corte transversal de la vena principal de la lamina foliar teñido con Azul de Alcian/Safranina. Objetivo 40x	36
Figura 15. Corte transversal de la vena principal de la lamina foliar teñido con FeCl ₃ . Objetivo 40x	37
Figura 16. Diagramas de cajas de los caracteres anatómicos de las hojas de <i>P. sericea</i>	38
Figura 17. Análisis de componentes principales (PCO) de los parámetros anatómicos de cuatro poblaciones de <i>P. sericea</i>	40
Figura 18. Secciones transversales de la lámina foliar de <i>P. sericea</i> teñido con FeCl ₃ y FeSO ₄ . Objetivo 10x.	41
Figura 19. Comparación entre los paquetes de células en empalizada en secciones transversales de la lámina foliar de <i>P. sericea</i> teñido con FeSO ₄ .	42
Figura 20. Estructura química de flavonas y flavonoles.	43
Figura 21. Espectro de absorción de los filtrados metanólicos.	43
Figura 22. Cromatografía de capa fina en sílica gel revelada con vainillina sulfúrica.	46
Figura 23. Microimagen de fluorescencia de hojas de <i>Phillyrea latifolia</i> .	48
Figura 24. Sección transversal de célula del parénquima en empalizada de <i>P. sericea</i> teñido con FeCl ₃ . Objetivo 100x.	49

Figura 25. Estructura química, espectro de absorción (entre 250-400 nm) y actividad eliminadora in vitro (IC50) contra los radicales superóxido (O ₂ ⁻) de los hidroxycinamatos solubles y flavonoides detectados en hojas de <i>Ligustrum vulgare</i> .	50
Figura 26. Máximos de absorbancia y capacidad de extinción de ROS de los flavonoides glucósidos con di-hidroxi sustituciones en el anillo B.	51
Figura 27. Distribución intercelular de flavonoides e hidroxycinamatos en hojas de <i>Phyllirea latifolia</i> expuestas a contrastantes condiciones lumínicas.	52
Figura 28. Esquema de la biosíntesis de fenilpropanoides a partir de fenilalanina.	53

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Temperaturas mínima de aire, temperaturas de congelamiento extracelular, temperaturas de daño y mecanismos de resistencia a bajas temperaturas en especies del género <i>Polylepis</i> .	15
Tabla 2 Estudios realizados en metabolitos secundarios reportados en el género <i>Polylepis</i> .	20
Tabla 3 Bosques de <i>Polylepis sericea</i> seleccionados para la recolección de muestras vegetales.	24
Tabla 4 Curva de calibración con concentraciones crecientes de ácido gálico.	32
Tabla 5 Área foliar específica de hojas de <i>P. sericea</i> provenientes de cuatro localidades distribuidas a través de un gradiente altitudinal.	34
Tabla 6 Grosor de la lámina foliar y porcentaje del parénquima en empalizada y esponjoso en hojas de <i>P. sericea</i> provenientes de cuatro localidades distribuidas a través de un gradiente altitudinal.	34
Tabla 7 Caracteres anatómicos de hojas de <i>P. sericea</i> a través de un gradiente altitudinal.	37
Tabla 8. Caracteres anatómicos de hojas de <i>P. sericea</i> para la localidades Loma Redonda y Mucubají en dos estaciones hídricas.	39
Tabla 9. Absorbancia de la curva de calibración con concentraciones crecientes de ácido gálico y muestras de tres localidades a través de un gradiente altitudinal.	44
Tabla 10. Porcentajes de polifenoles en hojas de <i>P. sericea</i> determinados por medio de extracciones metanólicas para tres localidades distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal.	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. PERMANOVA de dos vías tomando como factor fijo la altitud y factor aleatorio la hoja anidada a la altitud.	60
Anexo 2. Prueba a pares del largo de las células de la epidermis adaxial tomando como factor fijo la altitud y factor aleatorio la hoja anidada a la altitud.	61
Anexo 3. Picos de absorbancias de algunos flavonoides representativos de las principales subclases.	62
Anexo 4. Curva de calibración de contenido de fenoles.	63

www.bdigital.ula.ve

Introducción

El páramo andino se considera como un ecosistema relativamente reciente (desde el Mioceno) que posee una alta riqueza de especies (Madriñán *et al.*, 2013), definido altitudinalmente por el límite superior continuo de los bosques andinos y por debajo de líneas perpetuas de nieves (Monasterio, 1980a). Este ecosistema se asemeja a una serie de islas elevadas ya que se distribuye con una alta discontinuidad en toda la región andina; cuya vegetación está dominada por gramíneas en macollas, arbustos, rosetas acaulescentes y caulescentes. En Venezuela, la temperatura media anual en el páramo andino fluctúa entre 10-7 °C (Monasterio, 1980a), pero puede llegar a -0,4 °C en zonas de páramo desértico; son ambientes generalmente húmedos con precipitaciones de 800 mm en vertientes secas y hasta 1800 mm en vertientes húmedas (Ataroff y Sarmiento, 2004).

Según Monasterio (1980b), el ecosistema páramo abarca las formaciones vegetales del Páramo Desértico, Desierto Periglacial, Bosque Altiandino de Coloradito (*Polylepis sericea*), Páramo Andino, Pajonal Paramero, Pastizal Paramero, Bosque Paramero, entre las cuales destaca el Bosque Altiandino de *Polylepis sericea* Wedd, ubicado generalmente entre los límites de los pisos andino y altiandino, y definido como una región de páramo única debido a que no entra en contacto con ningún otro bosque andino, lo cual es característico de su distribución insular (netamente heterogénea) formando pequeños enclaves forestales.

Las especies de *Polylepis* típicamente forman bosques densos sobre la línea continua de bosques (*treeline*). Algunas especies de este género, como *Polylepis tarapacana* (Kessler, 2006), llegan incluso cerca de los 5000 m.s.n.m. En los Andes venezolanos, las condiciones ambientales adversas que caracterizan el páramo altiandino (fluctuaciones abruptas en los ciclos diarios de temperatura, heladas nocturnas, niveles de radiación elevados) influyen en el establecimiento de especies como *Polylepis sericea*, llevándolas a desarrollar mecanismos fisiológicos altamente especializados en *P. sericea*, como la resistencia a temperaturas congelantes (Goldstein *et al.*, 1994; Rada *et al.*, 2011).

Goldstein *et al.* (1994) y Rada *et al.*, (2011) sugieren que los altos niveles de radiación juegan un papel importante en el establecimiento y supervivencia de esta especie, debido a que se observa una mayor densidad de individuos de un origen sexual (semilla) en la periferia del bosque que en su interior, donde se benefician por el efecto del nodricismo, sin estar limitados por la sombra que origina el dosel formado por los individuos adultos. Simpson (1979), describe una serie de características morfológicas y anatómicas en los árboles de *Polylepis* (Figura 2), que les permiten amortiguar el efecto adverso de las condiciones ambientales como la elevada radiación y las bajas temperaturas nocturnas. Entre las adaptaciones morfológicas destacan el acortamiento de los entrenudos, área foliar reducida, hojas compuestas recubiertas de un indumento de tricomas grisáceos, tricomas glandulosos y resinas (Simpson, 1979).

Dentro de los procesos metabólicos afectados por la radiación UV-B se pueden destacar aquellos relacionados con el aumento de la síntesis de metabolitos secundarios tales como los fenoles (Carrasco-Ríos, 2009). Dentro de los fenoles, los flavonoides son un gran grupo de compuestos pertenecientes a los fenilpropanoides (Figura 1). Los fenilpropanoides están estructuralmente relacionados por un esqueleto de tipo benzopirano, con un sustituyente fenilo en la posición C2 o C3 (Rijke *et al.*, 2006). Esta estructura les confiere la capacidad de absorber radiación UV-B. Además, éste tipo de estructuras proveen protección contra el estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son producto de las altas radiaciones UV-B, actuando como antioxidantes intracelulares (Mouradov y Spangenberg, 2014; Williams *et al.*, 2004).

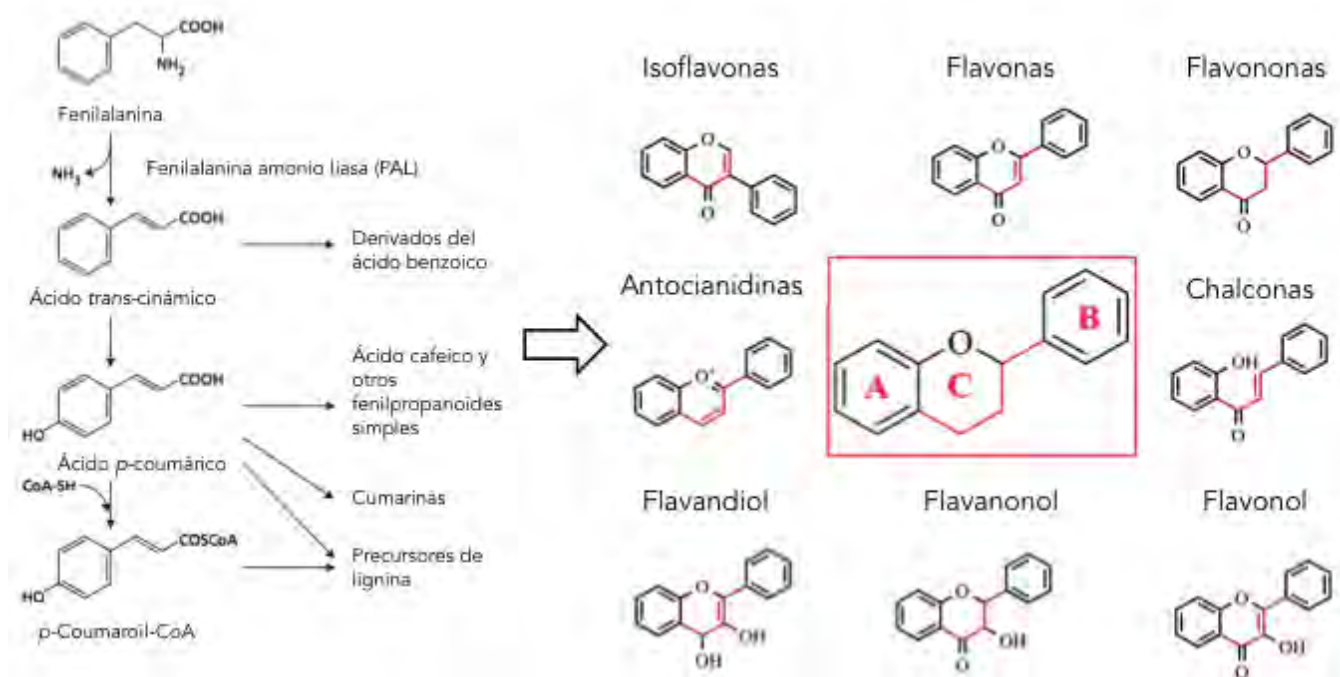


Figura 1. Vista esquemática de la biosíntesis de los fenilpropanoides. La vía general de los fenilpropanoides comienza con sucesivas reacciones de transformación de la fenilalanina a 4-coumaroil-CoA (*p*-coumaroylCoA), el cual es el precursor común de los flavonoides, entre otros. Modificado de Taiz y Zeiger (2006) y Amawi *et al.* (2017).

La síntesis de compuestos flavonoides es inducida por la presencia de luz UV-B en una amplia gama de especies vegetales y se han evidenciado altos niveles constitutivos de estos compuestos en especies vegetales que crecen en regiones con elevados niveles de radiación UV-B (Falcone-Ferreira *et al.*, 2012). Ya que, tanto los flavonoles y flavonas se han descrito para diferentes especies del género *Polylepis*, se sugiere que pudiera existir una mayor concentración de flavonoides en individuos de *P. sericea* que crecen a mayor elevación en Los Andes Venezolanos.

Los estudios orientados a la caracterización fitoquímica del género son escasos; en trabajos de Catalano *et al.* (1995), Vélez *et al.* (1998), Lampasona *et al.* (1998), Neto *et al.* (2000) y Caceda (2012), solo se han reportado fenilpropanoides y terpenoides para *P. australis*, *P. quadrijuga*, *P. incana*, *P. racemosa* y *P. rugulosa* (Tabla 2). Hasta los momentos no existe ningún estudio fitoquímico en *P. sericea* única especie del género reportada para Venezuela (Simpson, 1979). En el presente estudio se cuantificó los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *P. sericea*, de cuatro poblaciones ubicadas a lo largo de un gradiente altitudinal en el Norte de la Sierra Nevada de la Cordillera de Mérida.

Marco Teórico

La región Neotropical es la región de mayor riqueza de especies en el planeta. Muchas causas han sido propuestas para explicar su extraordinaria diversidad, algunas se aproximan a un origen biótico (conservación de nicho, interacciones con polinizadores, dispersores y herbívoros), o abiótico (precipitaciones, temperatura, levantamientos montañosos, cambios hidrológicos, etc.). La evidencia obtenida hasta ahora a partir de filogenias moleculares y el registro fósil, han confirmado el papel crucial de los procesos geotectónicos en la reconstrucción del norte de América del Sur, lo cual ha permitido la amplia diversidad de especies establecidas en este continente. Sin embargo se ha señalado que la biodiversidad neotropical es el producto de muchas formas evolutivas distintas, y a menudo interactuantes procesos que no son comprendidos en la actualidad (Antonelli y Sanmartín, 2011).

En la región neotropical, Los Andes tropicales constituyen uno de los sitios de mayor diversidad y con mayor incidencia de especies endémicas del planeta (30% de especies endémicas por 62.000 km²) (Barthlott *et al.*, 2007). Los Andes tropicales se caracterizan por la formación de una serie de mesetas extremadamente elevadas coronadas por picos, se considera que Los Andes es una formación de cordilleras y depresiones intermedias con una extensión de 8.900 km desde el extremo Sur de América hasta la costa más septentrional del continente en el Caribe (Velásquez y Stewart, 2016).

En Venezuela, la región que pertenece a Los Andes está conformada por la Sierra de Perijá, la Cordillera de Mérida y el Macizo de Tamá. Entre las anteriores mencionadas, la Cordillera de Mérida es la porción de los Andes septentrionales que se extiende casi 450 km entre las latitudes 7°30' y 10°10' Norte y las longitudes 69°10' y 72°20' Oeste (Ataroff y Sarmiento, 2004).

La Cordillera de Mérida posee un amplio rango altitudinal, de 200 a 5.000 m.s.n.m., que ha condicionado un destacado gradiente de temperaturas (desde -2°C a 27°C) con una marcada variación en el régimen de precipitaciones. Ambos factores ambientales influyen en la diversidad de unidades ecológicas evidenciados a lo largo de esta cordillera. Tomando en cuenta la vegetación como el carácter más visible, Ataroff y Sarmiento (2004), describen una serie de unidades ecológicas para vertientes húmedas: Selva Húmeda Submontana, Selva Semicaducifolia Montana, Selva Nublada Montana Baja y Alta, Páramo Andino y Páramo Altiandino. En el presente estudio se tomará en cuenta la unidad ecológica ubicada a partir de los 3.000 m.s.n.m., es decir, el piso andino superior, conformado por el páramo andino propiamente dicho (3.000 a 4.100 m.s.n.m.) y el páramo Altiandino (4.100 hasta 4.800 m.s.n.m.).

El páramo andino es considerado como un ecosistema relativamente reciente (desde el Mioceno) que posee una alta riqueza de especies (Madriñán *et al.*, 2013), definido altitudinalmente por el límite superior continuo de los bosques andinos y por debajo de líneas perpetuas de nieves (Monasterio, 1980a), es considerado como una serie de islas elevadas ya que se distribuye con una alta discontinuidad en toda la región andina, representado generalmente por gramíneas en macollas, rosetas acaulescentes y caulescentes, arbustos esclerófilos y árboles de bajo porte. En Venezuela, la temperatura media anual en el páramo andino fluctúa entre 10-7 °C, pero puede llegar a -0,4 °C en zonas de páramo desértico, mientras que en el páramo Altiandino fluctúa entre 2,5 a -2 °C, aunque se han medido temperaturas de -14 °C (Monasterio, 1980a). El páramo andino se considera un ecosistema relativamente húmedo, con precipitaciones anuales de 800 mm en vertientes secas y 1800 mm en vertientes húmedas (Ataroff y Sarmiento, 2004).

Según Monasterio (1980b) dentro de dicho ecosistema se pueden encontrar siete principales formaciones vegetales, destacando entre ellas el Bosque Altiandino de *Polylepis sericea* (ubicado generalmente entre los límites de los pisos andino y Altiandino), como una región de páramo única

debido a que no entra en contacto con ningún otro bosque andino, lo cual es característico de su distribución insular (netamente heterogénea) que forma pequeños enclaves forestales.

La mayoría de las especies del género *Polylepis* forman bosques de buen crecimiento sobre la línea continúa de bosques ("treeline"), algunas especies incluso cerca de los 5.000 m.s.n.m. Aunque el género está restringido solamente a Los Andes, la presencia de árboles verdaderos que crecen en tales altitudes es rara en cualquier parte del mundo, por lo que, *Polylepis* parece ser la angiosperma arborescente que crece a mayor altitud a nivel mundial, calificando junto con las coníferas de Los Himalayas como los árboles endémicos que crecen a mayor altitud (Simpson, 1979).

Descripción de *Polylepis sericea*

El género *Polylepis* presenta hojas estipuladas (formando una vaina que rodea al pecíolo), imparipinnadas y flores con un hipanto bien desarrollado, como la mayoría de las Rosáceas (Simpson, 2006). Pertenecen a la tribu Sanguisorbeae por su polinización y dispersión tipo anemófila, ya que posee flores dispuestas en racimos colgantes, de perianto simple, calicino, carente de olor o néctar, sépalos verdes, anteras numerosas con filamentos largos, polen abundante y seco, un estigma grande y fimbriado, frutos secos tipo aquenios compuestos fusionados por el hipanto (Kessler, 2006; Simpson 1979). Todos los representantes del género se caracterizan por presentar corteza papirácea, exfoliante, compuesta de numerosas capas de color rojo oscuro, razón por la cual se los conoce típicamente como "coloraditos".

Polylepis sericea se caracteriza por presentar árboles deciduos de 5-15 m de altura, hojas con pubescencia plateada o blanquecina, folíolos con base desigualmente cordada, inflorescencias 3-18 cm de largo, flores con una bráctea conspicua de color verde o anaranjado, escariosa. Frutos indehiscentes, irregulares, más o menos turbinados, pilosos, con protuberancias en forma de perillas o espinas gruesas (Simpson, 1979). Cabe destacar que se recomienda utilizar sincronizadamente caracteres del folíolo junto a atributos sexuales y de los frutos para la identificación del taxón.

Los estudios anatómicos foliares realizados por Simpson (1979) reportan una gran plasticidad anatómica en los tejidos del mesófilo, en función de las características microambientales de los hábitat que ocupa. Según Colmenares-Arteaga (2002), los individuos de *P. sericea* procedentes de dos poblaciones (3.500 y 4.087 m.s.n.m.) del páramo de Sierra Nevada se caracterizaban por presentar hojas bifaciales de cutícula engrosada, células epidérmicas e hipodérmicas con paredes engrosadas, epidermis uniestratificada en ambas caras, siendo la epidermis abaxial densamente papilosa, hipodermis con células cuadradas a rectangulares. Mesófilo bifacial e hipoestomático, bien diferenciado, con un parénquima en empalizada dispuesto en tres estratos de células (Figura 2).

En Venezuela los bosques de *P. sericea* se distribuyen entre 3.000 a 4.500 m.s.n.m., con un óptimo en el intervalo de los 3.500-4.200 m.s.n.m. Los bosques de *Polylepis* se establecen generalmente sobre estratos pedregosos, rodeados de derrubios rocosos o con la presencia de grandes bloques pétreos, en montañas con pendientes altas ubicados en sus laderas bajas o medias. Estos bosques proporcionan un microambiente que amortigua los efectos adversos del ecosistema altiandino con clima periglacial, siendo el gradiente de precipitaciones uno de los factores más influyentes de la fisonomía de estos bosques, aparentemente los rangos de precipitación más apropiados para modelar la distribución de los bosques están entre 1.100-1.700 mm (entre los 3.800 a los 4.300 m.s.n.m.) (Arnal, 1983).

Los bosques de *P. sericea* se caracterizan por ser siempreverdes de cobertura cerrada a semi-abierta con condiciones fisonómicas y florísticas muy homogéneas. Aunque suelen considerarse bosques monoespecíficos, el estrato arbóreo está conformado por otras especies arbóreas, principalmente especies del género *Hesperomeles* y *Gynoxis* (Gaviria, 2004). León (1991), reporta para tres bosques en las cercanías de la estación Loma Redonda del Sistema Teleférico Mukumbarí

(4.050 m.s.n.m.), un estrato arbóreo de 3-5 m de altura constituido principalmente por *Gynoxis moritziana* y *P. sericea*. Por su parte, Delgado (2015) indica que los elementos arbóreos de un bosque de *P. sericea* a 3.618 m.s.n.m. en el Páramo El Escorial (Sierra La Culata) están representados por *Libanothammus lucidus* y *P. sericea*. En ambos casos los autores indican una fuerte asociación entre las especies que componen el estrato arbóreo.

La composición florística de los bosques de *Polylepis* se considera baja al compararla con la Selva Nublada Montana, pero al compararla con la vegetación de páramo andino estos bosques representan un oasis florístico en un mar de vegetación paramera, confluyendo en su composición elementos florísticos propios de la Selva Nublada, de bosques parameros inferiores, como vegetación xeromórfica circundante (Delgado, 2015).

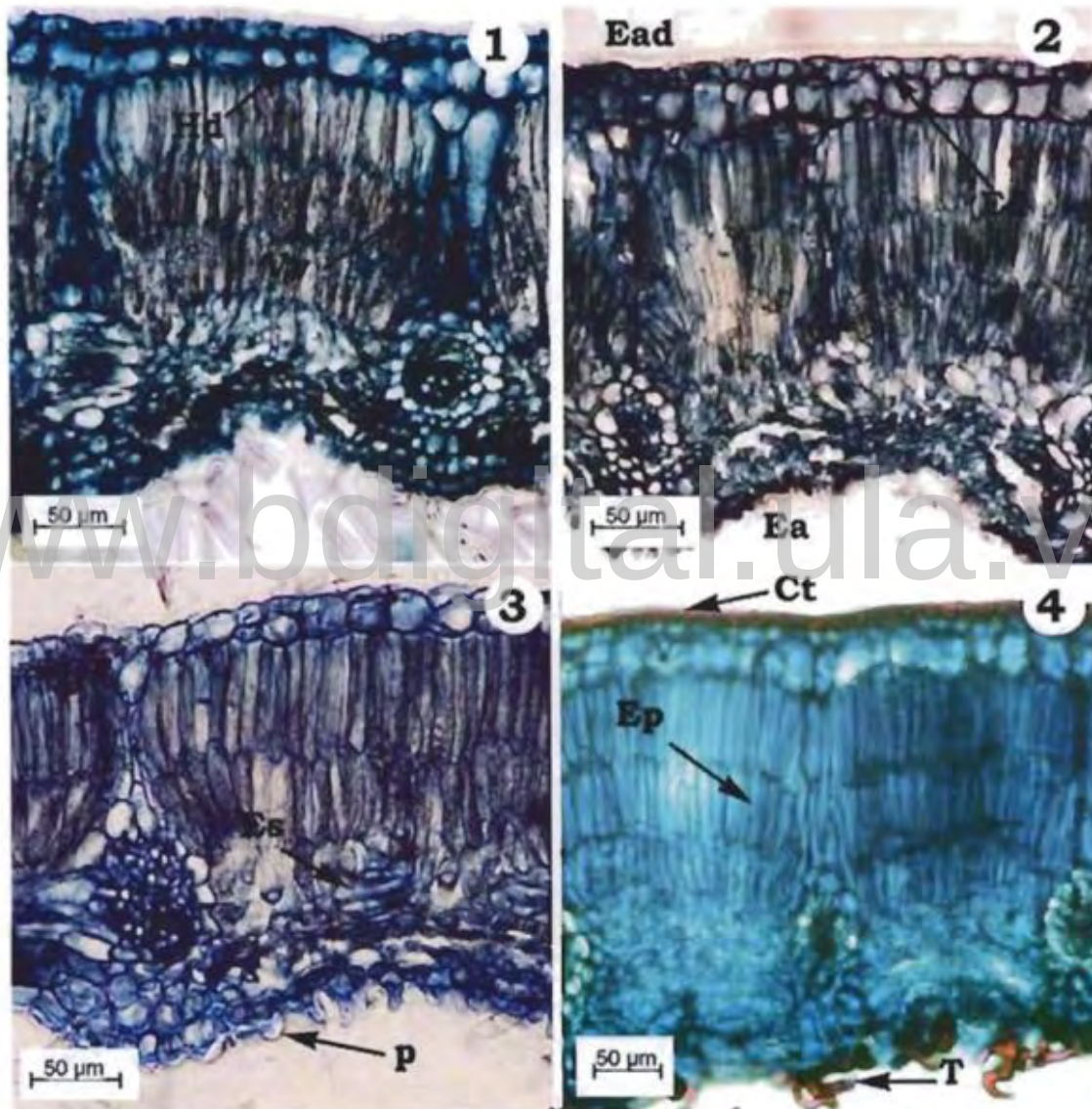


Figura 2. Secciones transversales del mesófilo de *Polylepis sericea* (1) Loma Redonda época húmeda. (2) Loma Redonda época seca. (3) Mucubají época húmeda. (4) Mucubají época seca. Abreviaturas: **Ct**: cutícula, **Ead**: epidermis adaxial, **Ea**: epidermis abaxial, **Ep**: parénquima en empalizada, **Es**: parénquima esponjoso, **Hd**: hipodermis, **p**: papila, **T**: tricoma. Tomado de Colmenares-Arteaga *et al.* (2005).

P. sericea destaca de las otras especies del género por ocupar el gradiente latitudinal más amplio en la Cordillera de Los Andes; distribuyéndose desde el estado Lara hasta los Andes

Bolivianos de manera muy discontinua. El lectotipo de *P. sericea* sobre el cual se basó la descripción de especímenes colectados en Venezuela, se caracteriza por presentar folíolos elípticos que son glabros arriba, densamente cubiertos por debajo con tricomas finos y plateados (Figura 3). Sin embargo, en Venezuela también hay individuos con hojas prácticamente glabras, cuya pubescencia en la superficie inferior de las láminas varía enormemente. También existe cierta variación en la forma de la parte superior de las vainas estipulares, la mayoría de las poblaciones tienen espuelas a ambos lados del pecíolo de la hoja (Simpson, 1979).

Según los mapas de distribución de cada una de las especies del género reportadas por Simpson (1979), en Venezuela hasta la fecha no se han reportado otras especies del género aparte de *P. sericea*, aunque se han reportado poblaciones en regiones del territorio colombiano cercanos a Venezuela de *P. quadrijuga*, no se hace ninguna afirmación verídica si *P. sericea* es la única especie del género presente en Venezuela.

Ecofisiología *Polylepis sericea*

Las especies del género *Polylepis* han desarrollado tanto mecanismos de evasión como de tolerancia a las bajas temperaturas que le han permitido adaptarse a temperaturas congelantes a lo largo de la cordillera de Los Andes (Tabla 1; Azócar y Rada, 2006). En el caso de *P. sericea*, la adaptación a temperaturas congelantes es lograda mediante el sobreenfriamiento histológico; las hojas y ramas sobreenfrian a -9 °C y las yemas a -12°C (Rada *et al.*, 1985). En experimentos en los cuales se exponían las plantas a temperaturas cada vez más bajas, se encontró que la capacidad de sobreenfriamiento estaba vinculada a una disminución del potencial osmótico inducido por un incremento en la concentración de azúcares solubles y de prolina (Azocar y Rada, 2006).

Tabla 1. Temperaturas mínima de aire (Tmin), temperaturas de congelamiento extracelular, temperaturas de daño y mecanismos de resistencia a bajas temperaturas (MR, E: evasión mediante la capacidad de sobreenfriamiento y T: tolerancia al congelamiento) en especies del género *Polylepis*.

Especie	Temperatura en época seca (° C)			Temperatura en época húmeda (° C)			MR
	Tmin	Daño	Congelamiento	Tmin	Daño	Congelamiento	
<i>P. sericea</i>	-4,5	-9,0 ± 0,5 a	-8,5 ± 0,5 a	-2,0	-8,0 ± 0,9 a	-8,0 ± 0,3 a	E
<i>P. tarapacana</i>	-13,0	-20,0 ± 0,5 a	-3,5 ± 0,5 b	-6,0	-21,0 ± 1,2 a	-9,2 ± 0,6 b	T
<i>P. australis</i>	-13,5	-24,0 ± 1,0 a	-7,0 ± 0,2 b	-2,0	-18,0 ± 2,0 a	-6,0 ± 0,2 b	T

Diferentes letras representan diferencias significativas (P<0,05) entre temperaturas de daño y congelamiento para cada una de las especies. Los datos en rojos indican que no existe diferencias de temperaturas de daño y congelamiento en *P. sericea*. Modificado de Azócar y Rada (2006).

Los estudios realizados por Rada *et al.* (1985) y Azócar y Rada (2006), podemos observar que los individuos de *P. sericea* presentan un ajuste fisiológico para adaptarse a las condiciones extremas que condiciona el páramo, por lo que no sería de extrañar que dicha especie presente también adaptaciones fisiológicas y anatómicas para protegerse de la elevada radiación que caracteriza el ecosistema páramo, particularmente el altiandino.

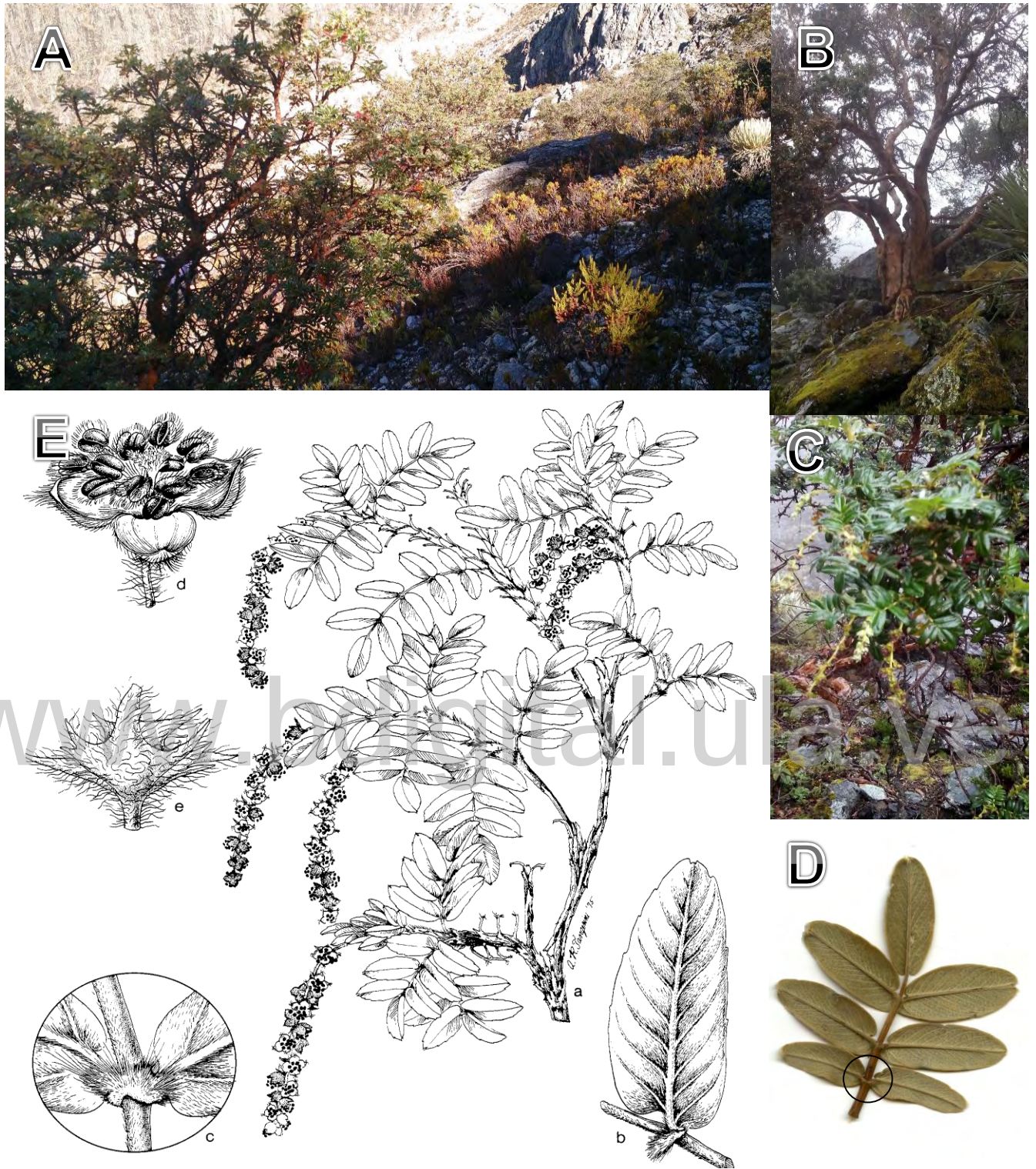


Figura 3. Individuos de *Polylepsis sericea* provenientes de La Sierra Nevada de Mérida (A) Bosque de *P. sericea* a 4.223 m.s.n.m. en La Sierra Nevada de Mérida. (B) Individuo de *P. sericea* de Loma Redonda (4.087 m.s.n.m.), se observa el ritidoma rojizo formado por finas capas exfoliantes característico del género *Polylepsis*. (C) Hojas completamente extendidas de *P. sericea* con inflorescencias *in situ*. (D) Hojas de *P. sericea* conservadas en F.A.A, observe el punto de inserción de los folíolos donde se destaca su característico anillo de tricomas glandulares. (E) Ilustración botánica de *P. sericea* donde se observa algunas de las características taxonómicas anteriormente mencionadas. Modificado de Simpson (1979).

Rada *et al.* (2011) sugieren que la exposición a niveles elevados de radiación puede condicionar el establecimiento y sobrevivencia de *P. sericea* en áreas abiertas, ya que individuos sembrados en el borde del bosque se desarrollan más rápidamente en comparación con los sembrados (origen sexual) en su interior, donde no se ven afectados por el efecto de sombra proyectado por el dosel pero aún se ven beneficiados por el microclima generado por el enclave forestal. En contraposición estos autores demostraron que la mayor proporción de individuos de origen vegetativo (rebotes) se desarrollaban al interior del bosque. La importancia funcional del establecimiento a partir de las semillas y el crecimiento clonal no debe considerarse como una antítesis sino como una compensación. El éxito en el establecimiento de siembra aumentará la aptitud del genotipo, mientras que el crecimiento clonal reduce el riesgo de extinción en condiciones ambientales extremas desfavorables (Rada *et al.*, 2011).

Los árboles de *Polylepis* poseen muchas características morfológicas y anatómicas que les permiten amortiguar los efectos adversos que se les impone vivir en un ambiente con altas radiaciones; entre ellos: acortamiento de entrenudos en las ramas, reducción en el área foliar, denso indumento de tricomas blancos a grisáceos en la superficie abaxial de la lámina foliar, que pueden tener función secretora (Simpson 1979). Colmenares-Arteaga al comparar hojas de *P. sericea* de individuos creciendo en la estación Loma Redonda (4.050 m.s.n.m.) y la laguna Mucubají (3.549 m.s.n.m.) reporta una reducción del área foliar, y un incremento de la cutícula, epidermis adaxial y parénquima en empalizada en la época seca de la localidad Mucubají con respecto a la húmeda y por ende con la localidad a mayor altitud, lo cual parece indicar una plasticidad anatómica asociada a la estacionalidad hídrica.

Son pocos los trabajos reportados sobre la fitoquímica del género, y hasta la fecha, no se han realizado estudios fitoquímicos en *P. sericea*. Dentro de los procesos metabólicos afectados por la radiación UV-B se puede destacar aquellos relacionados con el aumento de la síntesis de metabolitos secundarios tales como flavonoides y otros fenoles (Carrasco-Ríos, 2009), por lo que no sería de extrañar que los individuos de *P. sericea* expuestos a altos niveles de radiación presente dichos compuestos al igual que algunas especies pertenecientes al género *Polylepis* mencionadas a continuación. Para fines de esta investigación solo se tomarán en cuenta aquellos trabajos que reporten la presencia de metabolitos secundarios.

Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos que parecen no tener una función directa en el crecimiento y el desarrollo. Estas sustancias se conocen como metabolitos secundarios o productos naturales. Los metabolitos secundarios también difieren de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares y ácidos lipídicos) en tener una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, existen metabolitos secundarios particulares restringidos solamente a un grupo relacionado de especies, mientras que los metabolitos primarios se encuentran a lo largo de todo el reino vegetal (Taíz y Zeiger, 2006)

Los metabolitos pueden intervenir en la respuesta de las plantas hacia el ataque de patógenos, el exceso de O₃ y de radiación UV, el daño físico, la falta de nutrientes o climas extremos (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Los metabolitos secundarios de las plantas se pueden dividir en tres grupos químicamente distintos: terpenos, fenilpropanoides y alcaloides.

La mayoría de los fenilpropanoides son producto de la fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés), la cual cataliza la desaminación de la fenilalanina para dar ácido cinámico, un importante precursor de los compuestos fenólicos como los flavonoides (Bidwell, 1993). La actividad de PAL se ve incrementada por factores ambientales, como niveles bajos de nutrientes, luz (a través de su efecto sobre el fitocromo) e infección fúngica, siendo una enzima crucial en la transición entre metabolitos primarios y secundarios.

Los flavonoides son un gran grupo de compuestos que están estructuralmente relacionados por un esqueleto de tipo benzopirano, con un sustituyente fenilo en la posición C2 o C3 (Figura 1; Rijke *et al.*, 2006), esta estructura les confiere la capacidad de absorber radiación UV-B. Los flavonoides también les proporcionan protección contra el estrés oxidativo causados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) producto de una exposición excesiva a altos niveles de UV-B, actuando como antioxidantes intracelulares (Mouradov y Spangenberg, 2014; Williams *et al.*, 2004).

Estos metabolitos secundarios, están ampliamente distribuidos en las plantas y se clasifican en seis subgrupos principales: chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas y proantocianidinas o taninos condensados (Falcone-Ferreira *et al.*, 2012). Estudios previos (Mouradov y Spangenberg, 2014) sobre la función de los flavonoides en eventos de señalización y regulación intracelular inducidos por el estrés oxidativo, posicionan a los flavonoides como constituyentes principales en las primeras plantas que fueron capaces de colonizar ambientes terrestres. Otras funciones, como la protección directa de las plantas frente a tensiones ambientales, como la radiación UV, a través de la formación de pigmentos capaces de absorber longitudes de ondas por debajo del espectro de luz visible (donde se ubica la luz fotosintéticamente activa), se desarrollaron gradualmente en etapas posteriores de la evolución de las plantas terrestres, cuando las concentraciones y el espectro de flavonoides incrementaron, alcanzando los niveles observados en las plantas terrestres modernas (Mouradov y Spangenberg, 2014).

Flavonoides en el género *Polylepis*

La existencia de flavonoides ha sido ampliamente documentada en Rosidae y ha contribuido a los estudios filogenéticos de este clado. La transición gradual desde los flavonoles primitivos (especialmente la miricetina) con varias sustituciones (O-metilación, acilación) hacia la síntesis de flavonoides con C-glicosilación y de flavonas permitió ubicar taxonómicamente al clado Rosidae como un grupo bien delimitado, posicionado entre dicotiledóneas basales y herbáceas más avanzadas (Harbone, 1980).

Para niveles taxonómicos más bajos, se observa en Rosaceae la ausencia general tanto del ácido elágico (excepto de la subfamilia Rosoideae) como de la miricetina, a pesar de su aparición común en la mayoría de las otras familias de Rosidae, por lo cual, se considera a la familia Rosaceae como un grupo basal dentro de Rosidae. Por otro lado, la presencia de caracteres especializados en la familia tipo C-glicosilflavonas y un número representativo de flavonoles sugieren que varias de las subfamilias son más avanzadas, ya que las C-glicosidaciones de las flavonas no es común para todos los representantes de esta familia. Dentro de la familia Rosaceae, Rosoideae es probablemente más primitiva en su retención tanto de miricetina como del ácido elágico.

En el caso del género *Polylepis*, Catalano *et al.* (1995) estudiaron los compuestos químicos de órganos aéreos de *P. incana*, en la que hallaron un nuevo compuesto, el 3-O- β -D-6"-feruloilglucósido de kaempferol, adicionalmente propusieron una serie de marcadores taxonómicos químicos que incluye tanto flavonoides como triterpenoides, confirmando la posición de la especie en la tribu Sanguisorbeae (Figura 4B; Tabla 2). También en *P. australis* se han reportado la presencia de triterpenoides en la corteza (Figura 4C; Tabla 2) (Lampasona *et al.*, 1998).

Por otro lado, Vélez *et al.* (1998), reportan en hojas de *Polylepis quadrijuga* altas concentraciones de flavonoides, quinonas, taninos y esteroides, a la vez que señalan las pequeñas cantidades de triterpenos y esteroides (Tabla 2). Estos autores identificaron una flavona y una catequina (flavonol), compuestos que contribuyen tanto a la protección frente a la elevada radiación UV-B, como a una reducción de la palatabilidad de las hojas, actuando como deterrentes de herbívoros. Por tales motivos, estos autores, atribuyen las elevadas concentraciones de flavonoides a la exposición permanente a altos niveles de radiación UV-B de los páramos.

También se ha comprobado las propiedades medicinales en terpenoides de *P. racemosa* (Figura 4A y Tabla 2; Neto *et al.*, 2000) y fenilpropanoides de *P. rugulosa* (Tabla 2; Caceda, 2012). Los compuestos de *P. racemosa* demostraron ser citotóxicos para células epidérmicas de carcinoma alojado en tejido uterino y antiinflamatorias aludidas a la presencia del ácido ursólico. Para el caso de *P. rugulosa*, las hojas producen sustancias bioactivas en su mayoría flavonoides, taninos, quinonas y fenoles con efectos antibacterianos *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y cepas uropatógenas de *Escherichia coli*.

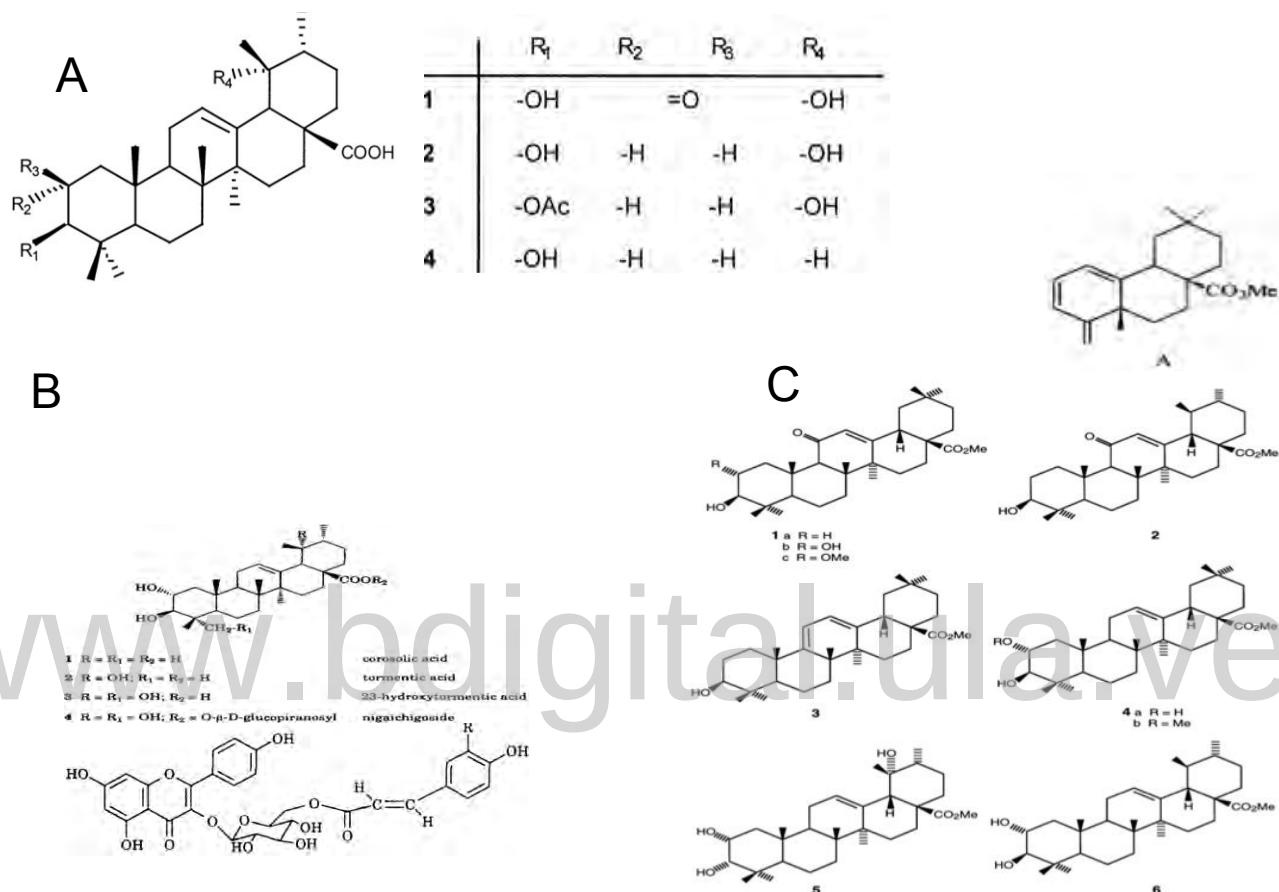


Figura 4. Metabolitos secundarios reportados en el género *Polylepis* (A) Ácidos triterpenos en *P. racemosa*. Neto *et al.* (2000). (B) Marcadores taxonómicos químicos en *P. incana*. Catalano *et al.* (1995) (C) Derivados del Ácidos terpenoicos 7 oleanos y 5 ursanos de *P. australis*. Lampasona *et al.* (1998).

Tabla 2. Estudios realizados en metabolitos secundarios reportados en el género *Polylepis*.

Año	Autores	Estudio	Muestra	Compuesto	Aportes
1979	Simpson	A Revision of the Genus <i>Polylepis</i> (Rosaceae: Sanguisorbeae)	-	Desconocido	Reporte de propiedades medicinales en <i>P. sericea</i>
1995	Catalano <i>et al.</i>	Chemical Investigation of <i>Polylepis incana</i> (Rosaceae). Lugar: Ecuador	Partes áreas de distintos individuos	Terpenoides 3-O-β-D-6"-feruloilglucósido de kaempferol (flavonoide)	Marcadores taxonómicos químicos
1998	Vélez <i>et al.</i>	Ecological traits of the tropical treeline species <i>Polylepis quadrijuga</i> (Rosaceae) in the Andes of Colombia.	Hojas	Flavona Catequina	La mayor concentración de flavonoides corresponden al mes más húmedo, el cual corresponde también al mes más frío.
1998	Lampasona <i>et al.</i>	Oleanolic and Ursolic Acid Derivatives From <i>Polylepis australis</i> . Lugar: Argentina	Corteza	Ácidos terpenoicos 7 oleanos y 5 ursanos	Identificación de nuevos compuestos
2000	Neto <i>et al.</i>	Cytotoxic Triterpene Acids from the Peruvian Medicinal Plant <i>Polylepis racemosa</i>	Tallo y Corteza	Ácido ursólico Ácido pomólico Ácido 2-oxopomólico	Citotoxicidad del ácido pomólico contra células ME-180 (carcinoma cervical del epitelio uterino humano)
2012	Caceda, C.	Evaluación de la Actividad Antibacteriana "in Vitro" del Extracto Alcohólico de las Hojas de <i>Polylepis rugulosa</i> ("queilua") Frente a Cultivos Bacterianos Uropatógenos. Lugar: Perú	Hojas	Mayor concentración flavonoides, taninos, quinonas, fenoles, en pequeñas cantidades de triterpenos y esteroide	Flavonoides, taninos, quinonas y fenoles con efectos antibacterianos "in vitro" frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y cepas uropatógenas de <i>Escherichia coli</i>

Justificación del trabajo

Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio fitoquímico en *Polylepis sericea*, por lo no se ha corroborado la existencia de flavonoides en la única especie del género en Venezuela. Se ha comprobado ampliamente la capacidad de estos metabolitos secundarios como fotoprotectores a la radiación UV-B en especies adaptadas a climas con altas radiaciones como el ecosistema páramo (Falcone-Ferreira *et al.*, 2012; Zidorn, 2009), además de la inducción de dichos compuestos al exponer plantas a altos niveles de radiación, como la presencia de los mismos en otras especies del género *Polylepis*. Tomando ello en consideración, es factible que los individuos de *P. sericea* que están permanentemente expuestos a dichas condiciones ambientales presenten altas concentraciones de compuestos fenólicos los cuales pueden desempeñar un papel importante en la adaptación de esta especie a las condiciones de elevada radiación UV que caracterizan su hábitat.

www.bdigital.ula.ve

Hipótesis

Si la síntesis de compuestos fenólicos en las plantas está influenciada por la exposición a la radiación UV, y se ha demostrado su acumulación en especies asociadas a ecosistemas de alta montaña, esperaríamos un incremento progresivo en la concentración de dichos compuestos, así como cambios morfoanatómicos foliares en poblaciones de *Polylepis sericea* a lo largo de su gradiente de distribución altitudinal (3.500-4.230 m.s.n.m.) situadas al Norte del Parque Nacional Sierra Nevada.

www.bdigital.ula.ve

Objetivo General

Evidenciar los cambios morfoanatómicos y determinar la proporción de compuestos fenólicos foliares en *Polylepis sericea* a lo largo de su gradiente de distribución altitudinal en el Parque Nacional Sierra Nevada.

Objetivos específicos

- Identificar los cambios morfoanatómicos foliares en poblaciones de *P. sericea* en cuatro altitudes (3.549, 3.836, 4.087 y 4.223 m.s.n.m.).
- Confirmar la presencia de compuestos fenólicos y determinar su ubicación en tejidos foliares de individuos procedentes de diferentes altitudes.
- Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en cada una de las poblaciones de *P. sericea* de la Cordillera de Mérida.
- Caracterizar a través de técnicas de cromatografía en capa fina y análisis espectrofotométricos los diferentes tipos de compuestos fenólicos.
- Asociar las variaciones cuantitativas de compuestos fenólicos con modificaciones morfoanatómicas foliares en individuos distribuidos a lo largo del gradiente altitudinal.

www.bdigital.ula.ve

Materiales y métodos

Zona de estudio

El área de estudio se encuentra al Sureste de la ciudad de Mérida, en la Sierra Nevada de la Cordillera de los Andes, a las cercanías de las estaciones Loma Redonda y La Aguada del Sistema Teleférico Mukumbarí del Estado Mérida, en dos pisos altitudinales: páramo propiamente dicho (de 3.000-4.100 m.s.n.m.) y el páramo Altiandino (a partir de 4.100 m.s.n.m.). Las coordenadas de dichas poblaciones fueron registradas con un GPS Garmin modelo GPSmap 60CSx (Tabla 3) y la selección previa de los bosques se realizó a partir de los mapas de Arnal *et al.* (2014). La distribución parcial de los bosques de *P. sericea* son ilustrados en la Figura 5.

Tabla 3. Bosques de *Polylepis sericea* seleccionados para la recolección de muestras vegetales ubicados en las cercanías del Sistema Teleférico Mukumbarí del estado Mérida, Venezuela, Zona UTM: 19 N. (*) Datos obtenidos de Arnal *et al.* (2014).

	Denominación	Coordenadas		Altitud	Perímetro*
		O	N	(m.s.n.m.)	
VEN_Sie_083	Laguna La Fría	269867	945520	3.549	5.110
VEN_Sie_081	Laguna Los Anteos	271832	944834	3.836	8.046
VEN_Sie_077	Loma Redonda	271180	944275	4.087	565
VEN_Sie_076	Alto de La Cruz	271293	943627	4.223	1.012

En las cercanías de las estaciones Loma Redonda y la Aguada la zona de estudio está influenciada por un clima relativamente húmedo, la humedad relativa para la Aguada en época seca es de 68%, mientras que en época húmeda alcanza un 80% (Ely *et al.*, 2011); para la estación Loma Redonda, el total anual de precipitaciones es de 1500 mm, que se distribuye en una época seca con precipitaciones menores a 50 mm mensuales durante Enero-Mayo y una época lluviosa con precipitaciones mayores a 100 mm mensuales durante Abril-Noviembre (León, 1991). Cabe destacar, que en los últimos tres años no se ha presentado una época seca propiamente dicha, ya que no ha ocurrido un prolongado periodo de bajas precipitaciones. Por otro parte, el páramo Altiandino presenta precipitaciones anuales de 200 mm en páramos más seco y 1.200 mm en páramos más húmedos (Ataroff y Sarmiento, 2004).

Las temperaturas medias anuales en la estación Loma Redonda fluctúan entre 5,8 a 1,4 °C manteniéndose constante durante todo el año (León, 1991). Para el caso del páramo Altiandino, la temperatura media anual fluctúa entre 2 a -2,5 °C (Ataroff Y Sarmiento, 2004). Para la estación La Aguada, la temperatura promedio durante la época seca es de 7,8 °C, y en la época húmeda es de 7,4 °C, el máximo de temperatura es 20 °C y el mínimo es de -0,68 °C, ambos registrados en época seca (Ely *et al.*, 2011). Como en toda zona tropical, los Andes venezolanos se caracterizan por una isoterminia anual con fuertes variaciones diarias de temperaturas. La variación anual de temperatura para la estación fue de 1,1 °C por dos años consecutivos. En el caso de la variación diaria de temperatura, se presenta el mismo patrón para un grupo de estaciones en la cuenca del río Chama. En general, el mínimo de temperaturas ocurre a las 6 de la mañana, mientras que el máximo se registra a las 2 de la tarde (León, 1991).



Figura 5. Mapa de los Bosques de *Polylepis sericea* ubicados en las cercanías del Sistema Teleférico Mukumbarí ubicados en el Parque Nacional Sierra Nevada del estado Mérida, Venezuela, Zona UTM: 19 N. Los polígonos azules representan el perímetro de los bosques. Datos obtenidos de Arnal *et al.* (2014).

Delgado (2015) indica en su inventario 127 especies de plantas entre Bryophyta, Lycophyta, Pteridophyta y Spermatophyta, distribuidas en 53 familias y 97 géneros. Leon (1991) encuentra para los bosques de la Sierra Nevada que Asteraceae es la familia dominante con 22 especies, seguida de Rosaceae con 12 especies, y las Scrophulariaceae y Poaceae con 6 especies cada una.

Los bosques de Coloradito ubicados en la cercanía de la estación Loma Redonda, están representados por tres estratos: un estrato arbóreo, de 3-5 m de altura constituido por *P. sericea* y *Gynoxis moritziana*. Un estrato arbustivo, pobre florísticamente, representado por las especies *Ribes canescens*, *Senecio greenmanianus*, y arbustos postrados como *Hesperomeles pernettoides*. El estrato herbáceo lo constituyen *Senecio formosus*, *Castilleja fissifolia*, *Senecio longepenicillatus* y *Polypodium rigescens*, algunas de estas hierbas tienen hábitos tanto terrestres como epífitos.

La vegetación circundante corresponde al páramo desértico, y es la encontrada comúnmente a partir de los 4.200 m.s.n.m. en el área de estudio. Está dominada por rosetas gigantes del género *Espeletia*, que son capaces de alcanzar 2 m de altura, rosetas acaulescentes como *Hypochoeris*, *Calandrinia* y *Acaulemalva*, y pequeños arbustos como *Hypericum*, *Senecio* y *Draba*. Además posee un estrato inferior de 0-0,5 m compuesto por cojines del género *Arenaria*, *Acaena*, *Azorella* y *Aciachne* (Ataroff y Sarmiento, 2004).

Recolección de muestras de estudio

El estudio tuvo dos enfoques, un enfoque fitoquímico y otro enfoque morfoanatómico, para la extracción de compuestos fenólicos se seleccionaron solo tres poblaciones en las cuatro poblaciones muestreadas, ubicadas a 3.549, 3.836 y 4.223 m.s.n.m., se recolectaron muestras compuestas (formada por varios individuos de una población) que consistieron en hojas vigorosas, completamente expandidas, con el fin de alcanzar un peso mayor a 500 g. Se seleccionaron hojas sanas, ubicadas a más de 1,5 m de altura, preferiblemente en la zona superior del dosel donde se encuentran las hojas más expuestas de las copas de los árboles. Según Simpson (1979), las hojas y vainas estipulares más jóvenes suelen ser mucho más pubescentes que las maduras, debido a que la pubescencia aísla

a los tejidos más vulnerables al aire frío, por lo cual se tomó en cuenta la pubescencia como factor de selección entre hojas inmaduras, jóvenes y senescentes, tratando de seleccionar las jóvenes completamente expandidas.

Para el análisis morfológico se seleccionaron cuatro individuos de las cuatro localidades en estudios, mientras para el análisis anatómico se seleccionaron cinco individuos; en ambos casos las muestras se recolectaron aleatoriamente siguiendo el criterio aplicado para la extracción de compuestos fenólicos.

Análisis morfoanatómicos

Para los análisis morfoanatómicos las muestras fueron previamente fijadas en F.A.A. (Etanol al 70%/Ácido acético/Formalina) para conservarlas lo mejor posible. El atributo morfológico tomado en consideración en el presente estudio fue el área foliar específica (AFE = Área de la hoja fresca/peso seco de la hoja). De cada población se tomaron cuatro muestras foliares procedentes de diferentes individuos, se lavaron repetidas veces sumergiéndolas en agua destilada durante períodos de 48 h.

Posteriormente se secaron con papel absorbente y se escanearon con un escáner Epson expression 10000 XL, con una resolución de 300 bmp (Figura 6) con el objeto de determinar el área en hojas completamente hidratadas (cm²). El área se determinó utilizando el programa ImageJ versión 1,52a, se adjuntó en el escaneo un recorte de papel milimetrado como referencia de la distancia entre los pixeles que corresponderá a la distancia en centímetros. Una vez medida el área de las hojas frescas, se guardaron en la estufa a 40 °C por cuatro días, transcurrido ese tiempo, se pesó varias veces hasta que el peso seco no variara.



Figura 6. Escaneo de hojas frescas de *P. sericea* conservadas en F.A.A. utilizadas para medir el área foliar específica Imagen de 300 bmp. Se adjuntó en el escaneo un recorte de papel milimetrado como referencia de la distancia entre los pixeles. Hojas provenientes del Bosque ubicado en Loma Redonda.

Para los estudios anatómicos, se tomaron cinco muestras de hojas de *P. sericea* provenientes de diferentes individuos de cada localidad, se lavaron, y de dichas muestras se obtuvieron secciones transversales del tejidos a través de cortes a mano alzada, con el fin de hacer una detención preliminar del contenido de taninos y medición de los estratos celulares. El conjunto de secciones se

dividió en tres grupos con el fin de aplicar los siguientes tratamientos de tinción para la detección de compuestos fenólicos, entre ellos taninos, lignina, suberina y cutícula (Johansen, 1940):

- Cloruro férrico al 10 % durante 10 min.
- Reactivo de Schreder (sulfato ferroso 2%/ácido acético 0,25%/formaldehído 10%) durante 2 horas.
- Doble tinción de azul de Alcian al 5%/Safranina al 5% en proporción 7:3. Para aplicar este tratamiento las secciones fueron previamente tratadas con hipoclorito de sodio al 5% por 15 min, ácido acético glacial al 10% por 2 min y etanol al 50% por 15 min, entre cada tratamiento las secciones fueron lavadas 3 veces en agua destilada.

A las secciones foliares teñidas con hierro, se les sumergió previamente en etanol al 50% durante 5 min, con la finalidad de mejorar la visibilidad y nitidez de las tinciones. Una vez teñidos con los reactivos de hierro, se procedió en ambos casos a sumergir los cortes en ácido clorhídrico al 5% por 5 min para así eliminar el exceso de hierro. La mayoría de los taninos contienen o-dihidroxifenil sustituciones, que actúan como grupos quelantes con muchos metales iónicos (McDonald *et al.*, 1996), como lo son el hierro y el aluminio, esto gracias al arreglo conformacional de un mínimo de dos grupos donadores de electrones (tipo catecol) (Figura 7), que forman un complejo similar SCN-Fe(III) o tris-bipiridil-Fe(II). Esta interacción depende del pH del medio, debilitándose a pH menor a 6 (Figura 8) (Kennedy y Powell, 1985).

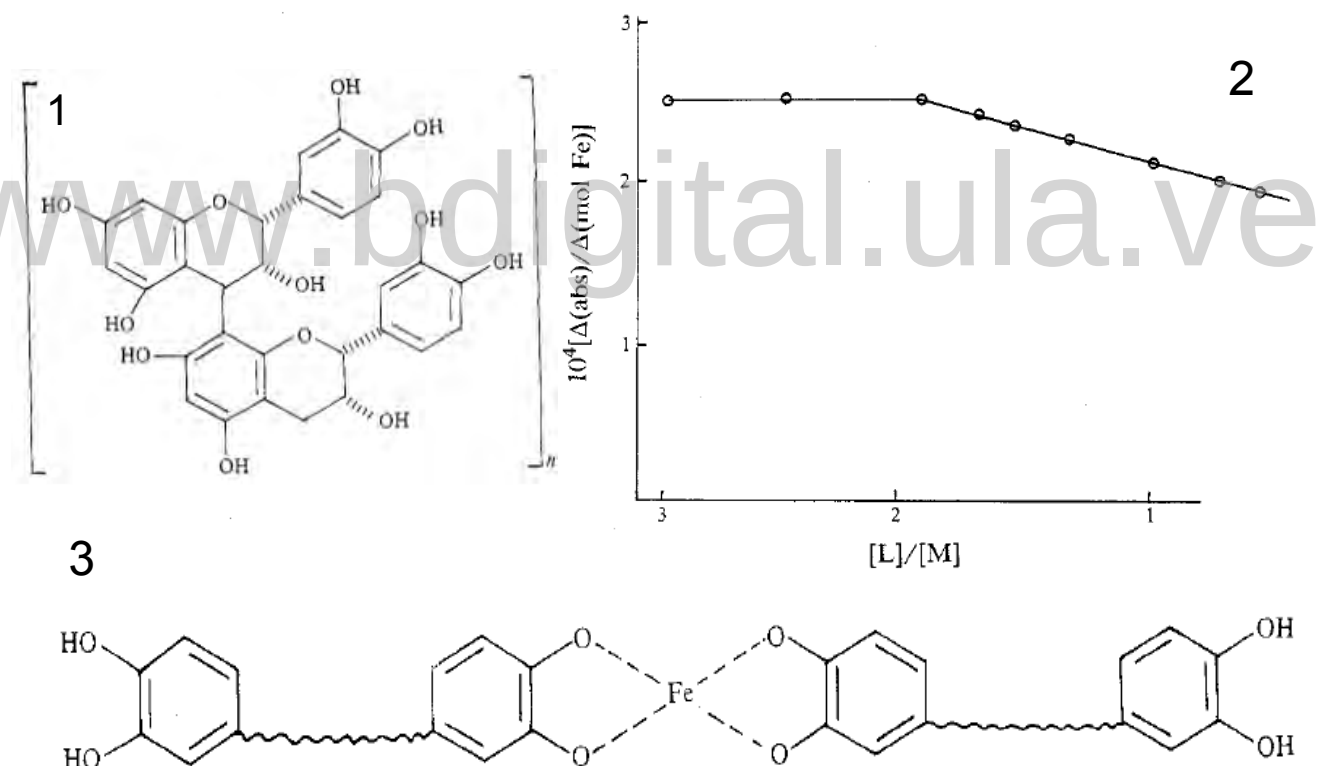


Figura 7. Mecanismo de acción de dímeros de epicatequina (B2) como agentes quelantes de iones de Fe (III) (1) Diagrama de epicatequina-(4β-8)-epicatequina (L) (B2) (2) Tasa de concentraciones de L: B2 y M: Fe (III) contra el cambio en la absorbancia $[\Delta(\text{abs})/\Delta(\text{mol Fe})]$, para una solución de B2 ($1,03 \times 10^{-4}$ M) y Fe (III) a pH 6,9. (3) Esquema de la característica bidentada de B2. Modificado de Kennedy y Powell (1985).

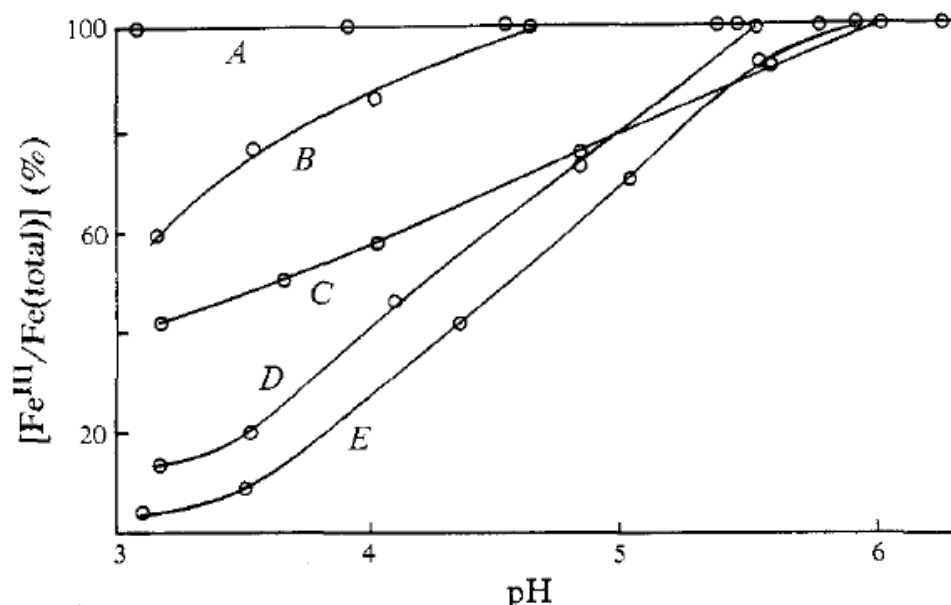


Figura 8. Proporción [Fe(III)/Fe(total)] como una función de pH para una solución Fe-polifenoles. (A) Tiron (1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfonato) **(B)** Acido protocatecuico **(C)** catecol **(D)** epicatequina **(E)** dimero de epicatequina (B2). Modificado de Kennedy.y Powell (1985).

Las mejores secciones (n=5) fueron seleccionados para su montaje en un portaobjeto y se recubrieron en glicerina acuosa al 50% con su respectivo cubreobjetos para su posterior análisis anatómico. Para realizar dicho análisis se tomó en consideración los siguientes parámetros:

- Grosor de la cutícula.
- Alto y ancho de las células epidérmicas adaxiales, hipodérmicas y de las células del parénquima en empalizada.
- Número de estratos celulares de cada tejido y presencia de compuestos fenólicos en cada estrato, haciendo énfasis en la proporción del parénquima en empalizada/esponjoso.
- Porcentaje del área del parénquima en empalizada/esponjoso con respecto al área total de la lámina foliar.
- Intensidad de coloración de la tinciones con hierro, abarcando rangos de coloración desde un verde pardo (bajo contenido de compuestos fenólicos) hasta negro (alto contenido de compuestos fenólicos).

Los parámetros anatómicos correspondientes al grosor, alto y ancho de las células de los tejidos antes mencionados se midieron 30 veces en cada individuo (n=5), obteniendo así 150 mediciones por cada tipo celular para cada población. Para el caso del número de estratos celulares y el porcentaje del área el n se mantuvo en cinco. Al igual que el AFE, las fotomicrografías se tomaron con una cámara adosada al ocular del microscopio óptico (Ken-A-Vision modelo PupilCam), utilizando el software de la cámara (Applied Vision 4.5.1). Las imágenes digitales se analizaron en Image J versión 1.52a, tomando como referencia fotografías al microscopio de una escala de $1 \pm 0,01$ cm vista en cada uno de los aumentos (4x, 10x, 40x, 100x). El resto de la muestra se guardó en la estufa a 50 °C durante 4 días o hasta que su peso seco no varió, se molieron y pesaron para determinar el peso seco de la muestra utilizada en la extracción de los compuestos fenólicos.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Primer 6.1.15 más su complemento PERMANOVA+ 1.0.5, junto al programa R a través de la plataforma RStudio versión 1.1.423. Con los

datos obtenidos se construyó una matriz en Excel con el debido formato para importar los datos, se determinaron los valores mínimos, máximos, la media y el error estándar de cada parámetro anatómico (Tabla 7). En el caso de los parámetros anatómicos, se tomaron 30 pseudo-réplicas de cada cinco individuos obteniendo un total de 150 medidas por altitud, por lo cual se pudo aplicar un análisis de varianza a partir de permutaciones múltiples (PERMANOVA), no es el caso de los parámetros morfológicos donde no se obtuvieron pseudo-replicaciones y el n evaluado es de 3.

Se les aplicó a los parámetros anatómicos un PERMANOVA de dos vías con el factor hoja anidado a la altitud, para evaluar si existían diferencias significativas para el factor altitud a pesar de las diferencias existentes entre cada una de las hojas. Los datos se ordenaron utilizando distancias euclidianas, se seleccionó un alfa de 0,05, y un total de 9999 permutaciones. Como el largo de las células de la epidermis adaxial fue el único parámetro que presentó diferencias significativas entre altitudes (Anexo 1), se aplicó una prueba a pares con un número de 9999 permutaciones y un ajuste del p con el método de Montecarlo (Anexo 2). Las diferencias estadísticamente significativas para cada uno de los parámetros anatómicos incluidos en el presente estudio se representaron en diagramas de cajas donde grupos iguales se denotaron con las mismas letras (Figura 16).

Por último, se evaluó si las hojas formaban grupos definidos a lo largo del gradiente altitudinal a través de un análisis de coordenadas principales (PCO), utilizando la variación de todos los parámetros anatómicos en cuenta (Figura 17). Para evitar las diferencias entre las medidas debido al tipo de parámetro, los datos se normalizaron y arreglaron con distancias euclidianas. Por último se adicionó al PCO una correlación de Pearson (coeficiente $> 0,02$) del largo de las células de la epidermis adaxial sin normalizar, debido a que fue el único parámetro que presentó diferencias significativas entre altitudes.

Extracción de los compuestos fenólicos

Muchos compuestos fenólicos son solubles en solventes polares, la elección del solvente depende del número de grupos hidroxilos y azúcares asociadas a la molécula. Para extractos puros de fenoles, los alcoholes y la acetona son utilizados a menudo, siendo el metanol una de las mejores elecciones (Figura 9), ya que es bastante efectivo; sin embargo, es un solvente agresivo para ciertos tipos de compuestos fenólicos, como por ejemplo, los glucósidos (Julkenen-Tiitto, 1985).

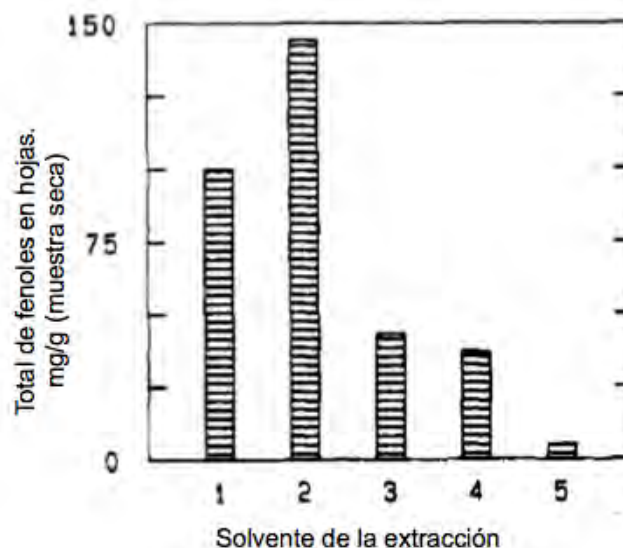


Figura 9. Efecto del solvente de extracción en el total de fenoles obtenidos en hojas de *Salix cv. aquatica* (1= 80% acetona; 2 = 95% metanol; 3 = agua destilada; 4 = 0,2 M NaCl; 5 = éter dietil). La cantidad de fenoles fue determinada por el método del Folin-Ciocalteu. Tomado de Julkenen-Tiitto (1985).

A partir de una extracción sólido-líquido haciendo uso del extractor Soxhlet, con metanol grado técnico como solvente, se extrajeron los metabolitos presentes en las hojas secas molidas de *P. sericea* durante 48 horas por carga de muestra en el extractor. Debido a que dichos extractos estaban altamente concentrados, se observó la precipitación de compuestos (presumiblemente polifenoles debido al solvente empleado), por lo que se procedió a realizar una filtración al vacío del extracto, haciendo uso de un embudo Büchner y un Kitasato. El precipitado recuperado, fue guardado en una estufa a 40 °C para eliminar la humedad restante a través de la evaporación del metanol, hasta que el peso seco del precipitado no variara.

A su vez, el filtrado obtenido en el paso anterior fue concentrado por medio de rotavaporación hasta un volumen mínimo de solvente, y se llevó a sequedad en la estufa a 60 °C por siete días continuos. Una vez obtenidos los extractos metanólicos secos, se pesaron y se determinó el porcentaje del extracto metanólico a partir de las hojas secas molidas de *P. sericea* para cada localidad de estudio. Cabe destacar que previo a la concentración de los filtrados metanólicos, se tomó una alícuota de 10 mL de cada localidad con el fin de determinar la concentración de compuestos fenólicos, como la diferenciación cualitativa de los extractos metanólicos entre localidades a través de la presencia de componentes distintivos entre los extractos.

Se determinó la concentración de los compuestos polifenólicos disueltos en el filtrado metanólico, a través del método Folin-Ciocalteu, utilizando como compuesto de inferencia el ácido gálico para identificar el coeficiente de correlación lineal entre la absorbancia de los grupos hidroxilos de los fenoles y su concentración en la muestra. Acoplado al ensayo se realizó un barrido desde los 190-800 nm, de los compuestos polifenólicos disueltos en el filtrado metanólico de cada localidad, para lo cual se diluyó la muestra 1/50 en metanol y se procedió a hacer la medición en el espectrofotómetro, entre 0-3 de absorbancia.

Para el caso de la distinción de componentes en los extractos entre las localidades se realizó una cromatografía de capa fina en gel de Sílice con placas Z234214 - Sigma-Aldrich® TLC Plates, utilizando como fase móvil una mezcla 2:1 de Acetato de Etilo/Metanol grado técnico. Las placas fueron observadas en lámparas de luz UV a 254 y 366 nm, con el fin de observar compuestos de interés o en algunos casos irrelevantes para el estudio (como es el caso de la clorofila). Posteriormente, las placas se revelaron con vainillina sulfúrica (100 mL de vainillina al 1% en etanol + 2 mL de ácido sulfúrico al 98%), aplicando la vainillina en forma de spray y calentando las placas por unos segundos.

Cuando la vainillina está protonada en solución ácida, posee un radical electrofílico débil que puede reaccionar con el anillo de muchos compuestos flavonoides en la posición 6 u 8. Este compuesto intermediario, se deshidrata para dar un compuesto de color rojo claro a rojo cereza intenso, indicando la prueba como positiva. En el caso de los flavonoides, los grupos hidroxis en los C-5 y C-7 no reaccionan efectivamente con la vainillina cuando el C-4 posee un carbonilo, o cuando el C-7 posee O-glicosilaciones. Por lo tanto, la reacción se ha aplicado como una prueba específica para los flavanoles agliconados, porque carecen del grupo carbonilo en la posición C-4 y no poseen azúcares en C-7, pero se debe considerar la posibilidad de interferencia por dihidrochalconas y antocianinas (Sarkar y Howarth, 1976).

Ensayo de Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu, se fundamenta en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, como otros reactivos, es inespecífico para cualquier compuesto fenólico y el color producido depende de los grupos hidroxilo y su lugar en las moléculas (Julkenen-Tiitto, 1985). La reacción se lleva a cabo a pH básico, promoviendo la transferencia de electrones que reducen los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico que contiene el reactivo Folin-Ciocalteu en óxidos (Figura

10A), formando así cromógenos de color azul intenso de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) (Gutiérrez *et al*, 2008), apreciables espectrofotométricamente a 765 nm (García *et al*, 2013).

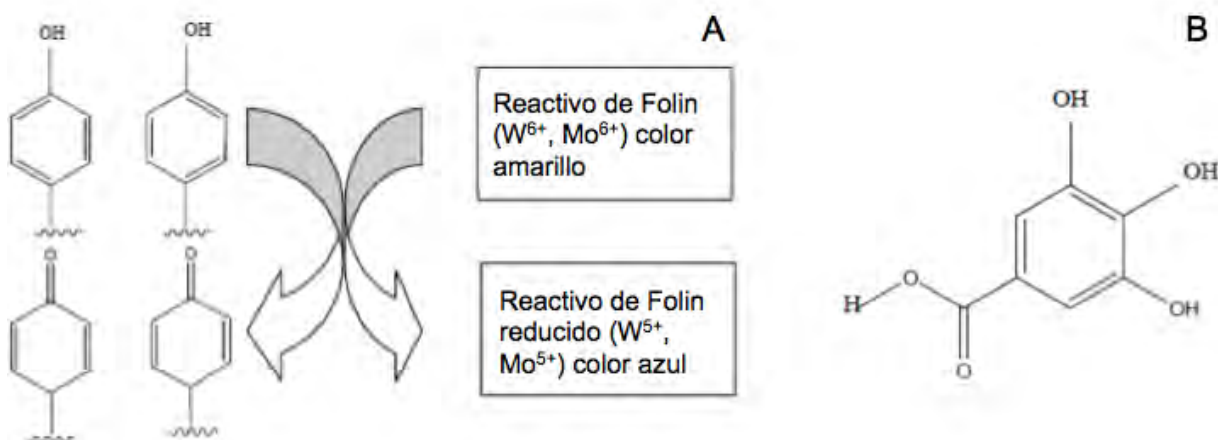


Figura 10. (A) Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu. (B) Ácido gálico.

La elección del compuesto de inferencia adecuado para muestras vegetales es una decisión fundamental, debido a la heterogeneidad química de los productos naturales y la poca especificidad de los reactivos fenólicos. A pesar de este hecho, en ciertas circunstancias (p. e., ausencia de sustancias interferentes) se puede obtener resultados relativos para fenoles (Julkenen-Tiitto, 1985), por lo que, en los ensayos de Folin-Ciocalteu solo es posible obtener concentraciones relativas a los compuestos utilizados como inferencia. El ácido gálico y el ácido 3,4-di-hidroxilbenzoico suelen generar la mayor intensidad en la reacción, debido a la sustitución de un grupo hidroxilo en la posición 2 o 3 en adición a la posición 4 incrementando considerablemente la sensibilidad de la reacción (Figura 10B).

La reacción de Folin-Ciocalteu es un método espectrofotométrico, por lo cual el mismo se rige por la ecuación de Beer-Bouguer-Lambert ($Abs = C * l * \epsilon$; donde C es concentración, l es longitud de la cubeta (generalmente 1 cm) y ϵ es coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$)), la cual considera todos los elementos participantes en el proceso de transmitancia entre la luz incidente sobre la cubeta de la reacción con respecto a la luz transmitida a través de la cubeta (Absorbancia), al observar la ecuación podemos notar su tendencia lineal:

$$Abs = C * l * \epsilon \rightarrow Y = mX + b; \text{ donde } Y: Abs, m: l * \epsilon, X: C \text{ y } b: 0$$

El ensayo se realizó a partir de una curva de calibración con diluciones crecientes de ácido gálico como se expresa en la Tabla 4, para lo cual se depositaron cada uno de los reactivos en frascos recubiertos de papel aluminio de 5 mL con el fin de siempre mantener tanto la solución madre como las diluciones protegidas de la luz. En primera instancia, se disolvió el ácido gálico en agua antes de agregar Folin-Ciocalteu, se agitó la mezcla, se dejó en reposo a temperatura ambiente por 5 min, y se adicionó el Na_2CO_3 , se esperó a que reaccionara por 30 min (Gutiérrez *et al*, 2008) y se llevó a un volumen final de 4 mL con agua destilada. Una vez terminada la reacción se midió a 754 nm (pico de mayor absorbancia para la muestra en estudio) en un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1240, entre 0-1 de absorbancia (Abs). Se identificó el coeficiente de correlación lineal a través de la ecuación de la recta ilustrada en la Anexo 4.

En el caso de los extractos metanólicos, previamente disueltos en metanol en una proporción 1/50 los provenientes de los bosques Alto de La Cruz (C) y Los Antojos (A), y 1/250 para el extracto obtenido de la Laguna La Fría (F) con el fin de obtener un valor de absorbancia apreciable entre 0-1, se tomaron 0,05 mL de cada uno y se disolvieron en 0,45 mL de agua, se mezclaron con 0,75 mL de

reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó la mezcla, y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 5 min, para consiguientemente agregar 0,75 mL de Na_2CO_3 al 20%, se agito rápidamente y se puso en reposo por 30 min a temperatura ambiente. Transcurridos los 30 minutos, se llevó a un volumen final de 4mL con agua destilada.

Igualmente la reacción para los extractos se midió a 754 nm, y se obtuvieron los valores de absorbancia que se indican en la Tabla 4. El contenido de fenoles en cada extracto es expresado en gramos equivalentes a ácido gálico/g de peso seco del material vegetal, basándose en la curva de calibración del material de referencia del ácido gálico (Anexo 4), tomando en cuenta estos gramos como la parte soluble del total de polifenoles. El contenido total de polifenoles se obtiene al adicionar los valores del peso seco del precipitado de la extracción más los gramos inferidos a partir del ácido gálico. Se calculó parte del porcentaje de compuestos del proceso tomando como referencia el peso inicial previo a la extracción.

Tabla 4. Curva de calibración con concentraciones crecientes de ácido gálico a partir de una solución madre de ácido gálico a (3×10^{-4} M), Na_2CO_3 al 20% (p/v), y Folin-Ciocalteu a 1N. (*) Blanco de la reacción.

Punto	Volumen (mL)			
	Ácido gálico	Agua	Folin	Na_2CO_3
0*	0	0	0,25	0,25
1	0,1	1,4	0,25	0,25
2	0,2	1,3	0,25	0,25
3	0,3	1,2	0,25	0,25
4	0,4	1,1	0,25	0,25
5	0,5	1	0,25	0,25
6	0,6	0,9	0,25	0,25
7	0,7	0,8	0,25	0,25

Resultados

En este estudio, se determinó que las poblaciones muestreadas a lo largo del gradiente altitudinal están influenciadas por el gradiente hídrico que decrece en sentido ascendente. En este sentido, observamos que las poblaciones asociadas al límite inferior del gradiente, ubicadas a 3.549 y 3.836 m.s.n.m. están adyacentes a lagunas (La Fría y Los Antejos, respectivamente) que favorecen suelos húmedos y fangosos; mientras que la población ubicada en el límite superior de este gradiente (El Alto de La Cruz, a 4.230 m.s.n.m.) crece en laderas empinadas, que originan suelos más drenados y pedregosos (Figura 11).

Se presume que este gradiente hídrico, aunado a otros factores ambientales (radiación, temperatura del aire y del suelo), influyen en el desarrollo y tamaño de los individuos, puesto que se aprecia una disminución en el tamaño de los árboles de *P. sericea* a lo largo del gradiente muestreado, con árboles que pueden alcanzar 2-6 m en las poblaciones ubicadas en el límite inferior (3.549 m.s.n.m.) y medio del gradiente (3.836 y 4.087 m.s.n.m.), cuya estatura disminuye a 1,5-2,5 m en el límite superior (4.223 m.s.n.m.).



Figura 11. Bosques de *Polylepis sericea* ubicados en las cercanías del Sistema Teleférico Mukumbarí en el Parque Nacional Sierra Nevada del estado Mérida, Venezuela. (A) Laguna La Fría (3.549 m.s.n.m.), (B) Laguna Los Antejos (3.836 m.s.n.m.), (C) Loma Redonda (4.087m.s.n.m.) y (D) Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.).

Caracteres morfoanatómicos

A pesar de que las características microambientales de cada localidad afectan el tamaño de los individuos, no afectan el desarrollo y tamaño de las hojas. No se demostró diferencias significativas, se detalla que los mayores valores de área foliar específica (AFE, Tabla 5) correspondieron a las hojas procedentes de las poblaciones ubicadas en la región media del gradiente (3.836 y 4.087 m.s.n.m.) y los menores valores, a las poblaciones situadas en los extremos (3.549 y 4.223 m.s.n.m., respectivamente). Estos resultados contrastan con lo reportado por Colmenares-Arteaga (2002), ella reporta mayor AFE para la población ubicada en la Laguna Mucubají (3.500 m.s.n.m.) indicando hojas de mayor tamaño más gruesas y escleromórficas, con respecto a las hojas provenientes de la localidad de Loma Redonda (4.087 m.s.n.m.).

Tabla 5. Área foliar específica (AFE) de hojas de *P. sericea* provenientes de cuatro localidades distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal (m.s.n.m.).

Parámetro morfológico	La Fría (3.549)	Los Anteosojos (3.836)	Loma Redonda (4.087)	Alto de La Cruz (4.223)
AFE (cm ² /g)	64,15	85,74	87,19	71,68

En ambos estudios no se encontraron diferencias significativas, es evidente que la morfología de *P. sericea* es muy conservada a lo largo de su gradiente de distribución altitudinal. Cabe destacar que las muestras obtenidas por Colmenares-Arteaga (2002), consistieron en 18 muestras de hojas totalmente expandidas durante la época húmeda y seca en la localidad de Loma Redonda y la laguna de Mucubají, mientras que en este estudio solo se tomó las muestras de hojas (n=4) durante la época húmeda.

A nivel anatómico se detalla que las secciones transversales de los folíolos, evidencian una anatomía típicamente bifacial, con una cutícula densa, y epidermis e hipodermis uniestratificadas de paredes engrosadas (Figura 12 y 13). Las características del mesófilo, en términos de la disposición y número de estratos del parénquima en empalizada coinciden con las observaciones de Colmenares-Arteaga (2002) y Simpson (1979), quienes describen células en empalizada compacta de tres estratos de células que ocupa poco más de dos tercios del mesófilo. Los resultados del presente estudio corroboran dichos estudios, puesto que el parénquima en empalizada ocupa un 60 % (Figura 12, 13 y Tabla 6) de la superficie del mesófilo y el esponjoso escasamente el 18 %. Estos resultados confirman que se trata de una planta heliófita, adaptada a los elevados niveles de radiación que caracterizan el ecosistema altiandino.

Tabla 6. Grosor de la lámina foliar y porcentaje (%) del parénquima en empalizada y esponjoso en hojas de *P. sericea* provenientes de cuatro localidades distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal (m.s.n.m.). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Característica anatómica	La Fría (3.549)	Los Anteosojos (3.836)	Loma Redonda (4.087)	Alto de La Cruz (4.223)
Grosor de lámina foliar (µm)	278,989	282,817	302,751	295,132
% Parénquima en empalizada	60,76	63,15	62,36	63,77
% Parénquima Esponjoso	18,03	14,58	15,41	16,85

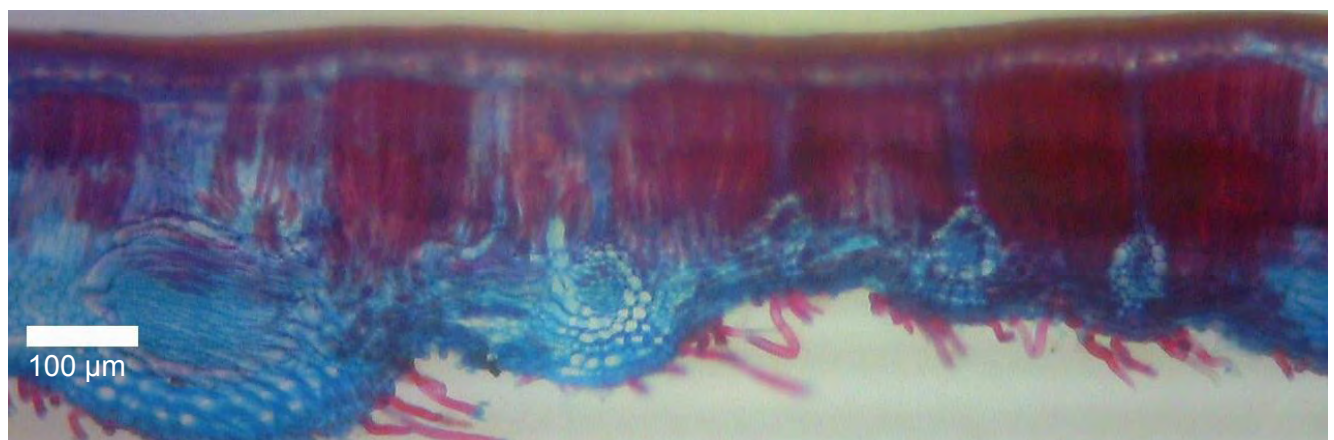


Figura 12. Corte transversal de la lámina foliar de *P. sericea* teñido con Azul de Alcian/Safranina. Objetivo de 10x Muestra proveniente de La Fría (3.549 m.s.n.m.).

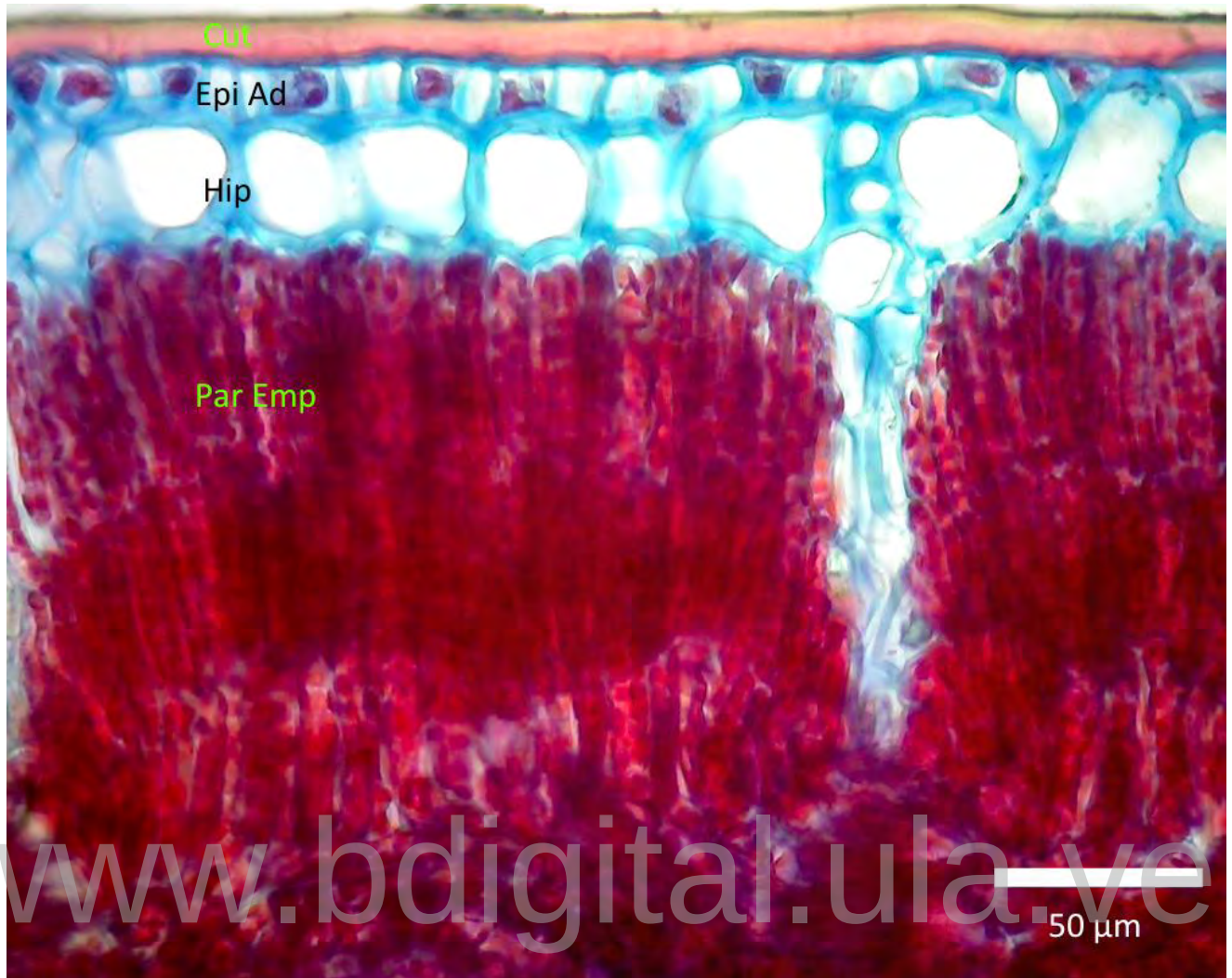


Figura 13. Corte transversal de la lámina foliar de *P. sericea* teñido con Azul de Alcian/Safranina Objetivo de 40x. Muestra proveniente de la laguna Los Anteos (3.836 m.s.n.m.), Parque Nacional Sierra Nevada del estado Mérida, Venezuela. Cut: Cutícula; Epi Ad: Epidermis Adaxial; Hip: Hipodermis; Par Emp: Parénquima en empalizada.

Además de una anatomía adaptada a captar la luz más eficientemente, *P. sericea* presenta adaptaciones frente al estrés hídrico, Colmenares-Arteaga (2002) y Simpson (1979) enfatizan la existencia de rasgos xeromórficos foliares cuya existencia corroboramos en este estudio morfoanatómico comparado. Los caracteres xeromórficos también son evidentes en la estructura del nervio medio, el cual se caracteriza por un anillo de esclerénquima rodeando el xilema y la presencia de varias capas de colénquima en el tejido fundamental del nervio medio (Figura 14).

El nervio medio presenta un crecimiento secundario breve, propio de hojas de árboles siempreverdes. Los estudios anatómicos del nervio medio revelaron que los tejidos conductores (xilema y floema) se encuentran delimitados por una vaina esclerenquimática discontinua que se prolonga hacia la superficie adaxial de la lamina, a su vez rodeada por una banda parenquimática formada por células de paredes suberizadas, a modo de endodermis, muy semejante a la Banda de Caspary (Figura 14), en la tinción con hierro podemos observar una acumulación de metabolitos secundarios, correspondientes a taninos y otros polifenoles, además de la presencia de granulos de almidón. visibles en el microscopio óptico (Figura 15).

Simpson (1979), reporta que en casi todas las especies existe una vaina del haz con extensiones que se prolongan a ambas epidermis de la hoja, ésta vaina transporta agua activamente

hacia ambas epidermis. Por su parte, Ancibor (1975) reporta cristales de oxalato de Calcio dispuestos en la vaina que rodea los nervios principales de las hojas, como en las extensiones de la vaina, siendo la disposición de estos cristales muy variables entre hojas y dentro de las misma hoja (Simpson, 1979).

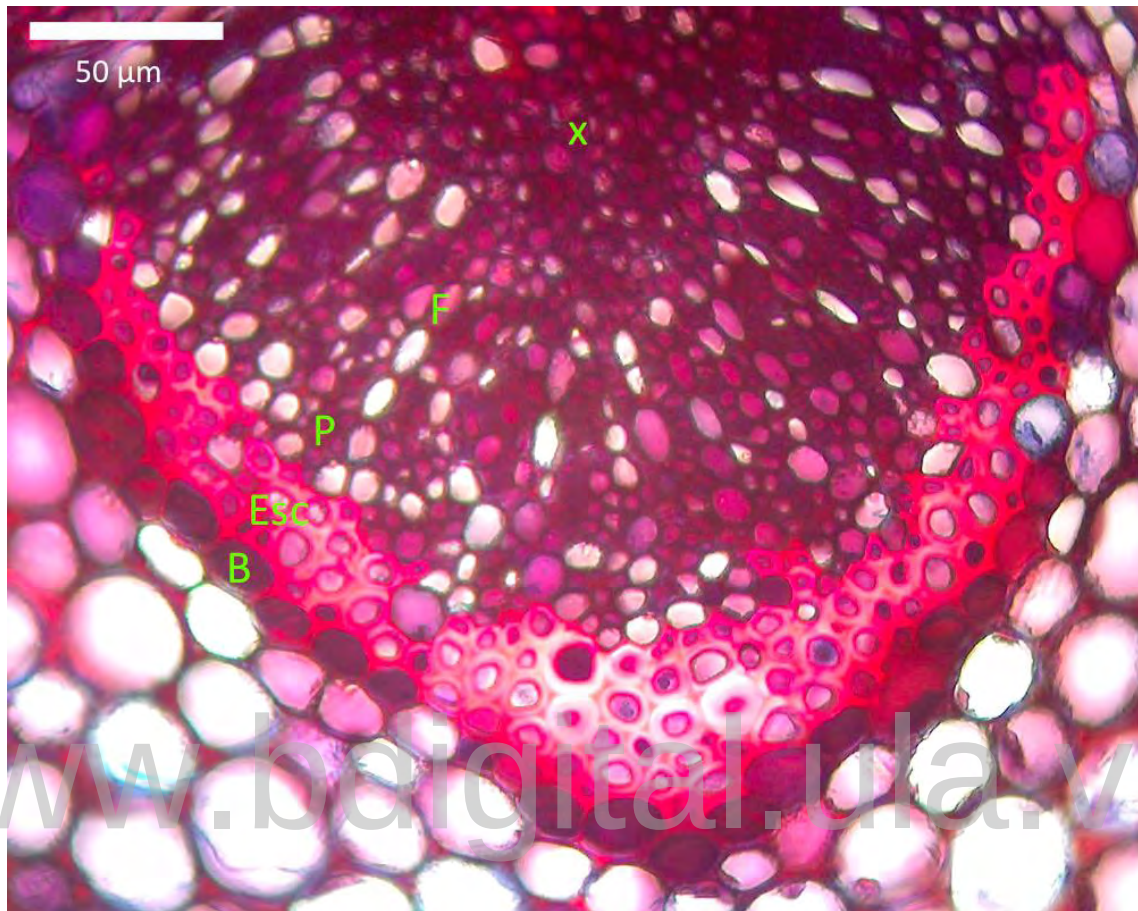


Figura 14. Corte transversal de la vena principal de la lámina foliar teñido con Azul de Alcian/Safranina. Objetivo de 40x. Muestra proveniente de la estación Loma Redonda (4.087 m.s.n.m.). Sistema Teleférico Mukumbarí. X: xilema; F: Floema; P: Parénquima; Esc: vaina esclerenquimática; B: bandas de parénquima que rodea el tejido conductor.

Rada *et al.* (1985) habían mencionado previamente que *P. sericea* presenta un ajuste osmótico dependiente de las concentraciones de azúcares solubles y prolina, la presencia de almidón en el parénquima que rodea el tejido conductor (Figura 15), podría estar relacionado con la acumulación de carbohidratos en los ciclos diarios, cuya presencia contribuye a disminuir el potencial osmótico de las células y por ende a disminuir la temperatura de congelamiento, lo cual constituye un mecanismo de evasión a las temperaturas nocturnas congelantes del Altiandino (Rada *et al.* 1985, Azócar y Rada 2006).

En el análisis anatómico comparativo se evaluó si existían variación entre las características morfoanatómicas a lo largo de gradiente de distribución altitudinal, que estuvieran asociadas con la acumulación de compuestos polifenólicos quelantes. Entre las localidades en estudios las características anatómicas correspondientes al grosor, altura y amplitud de la cutícula, células de la epidermis adaxial, hipodermis y parénquima en empalizada no variaron significativamente entre localidades (Anexo 1), con excepción al largo de la epidermis adaxial. El mayor tamaño de las células epidérmicas correspondió a individuos ubicados a 4.087 m.s.n.m. (Tabla 7; Figura 16).

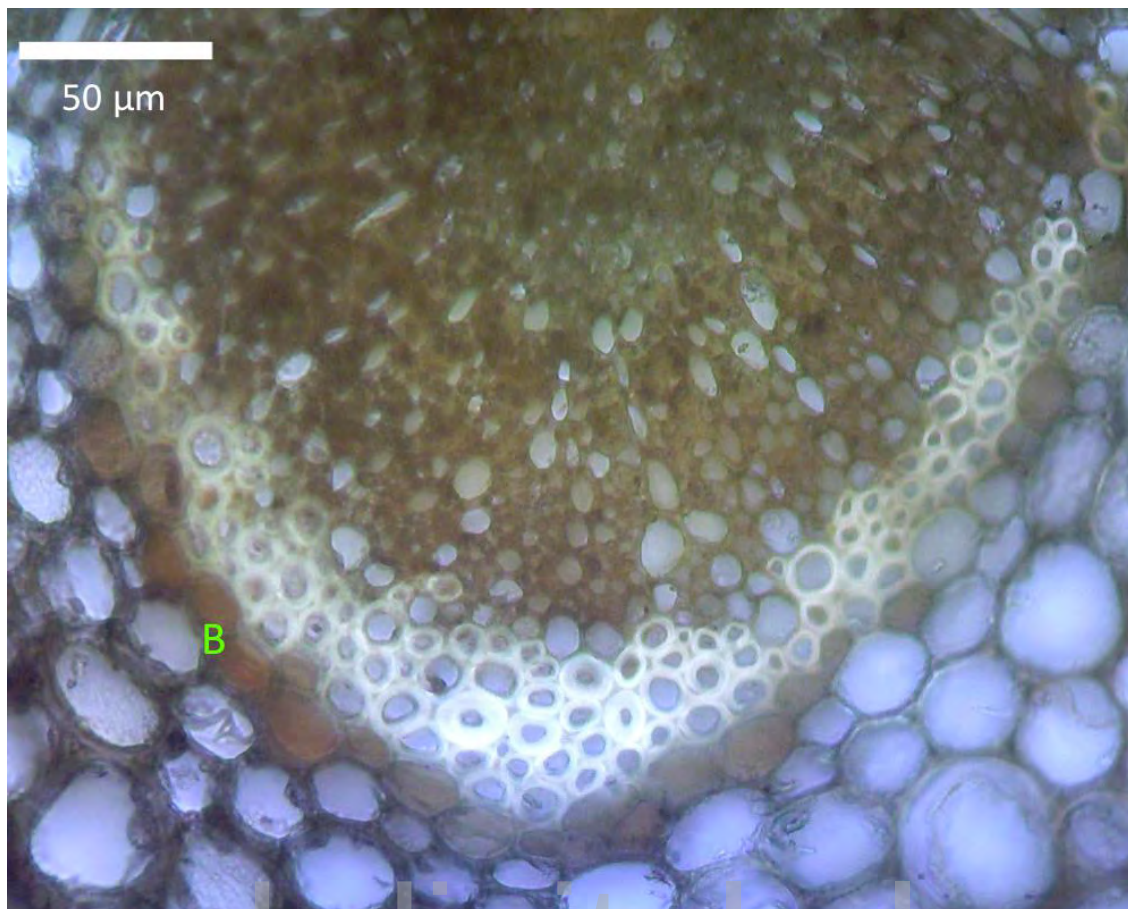


Figura 15. Corte transversal de la vena principal de la lámina foliar teñido con FeCl_3 . Objetivo de 40x. Muestra proveniente de la estación Loma Redonda (4.087 m.s.n.m.). Sistema Teleférico Mukumbarí. B: bandas de parénquima que rodea el tejido conductor.

Tabla 7. Caracteres anatómicos foliares estudiados a lo largo de un gradiente altitudinal. La media con su error estándar entre paréntesis. Los grupos con diferencias significativas se les asigno letras distintas, mientras los parámetros sin letras no presentaron diferencias significativas.

Localidad (m.s.n.m.)	Grosor de la Cutícula (μm)	Células de la epidermis adaxial (μm)		Células de la hipodermis (μm)		Células del parénquima en empalizada (μm)	
		Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
La Fría (3.549)	8,07 (0,66)	13,96 (1,14) a	15,69 (1,28)	23,30 (1,91)	27,02 (2,21)	56,26 (4,61)	10,10 (0,83)
Los Antejos (3.836)	6,76 (0,55)	14,53 (1,19) a	15,19 (0,59)	24,70 (2,02)	29,16 (2,39)	56,51 (4,63)	9,43 (0,77)
Loma Redonda (4.027)	7,13 (0,58)	16,60 (1,36) b	16,86 (1,38)	24,35 (2,00)	29,74 (2,43)	62,58 (5,13)	11,22 (0,92)
Alto de La Cruz (4.223)	8,91 (0,73)	13,93 (1,41) a	17,62 (1,44)	24,35 (2,00)	27,80 (2,28)	62,26 (5,10)	10,38 (0,85)

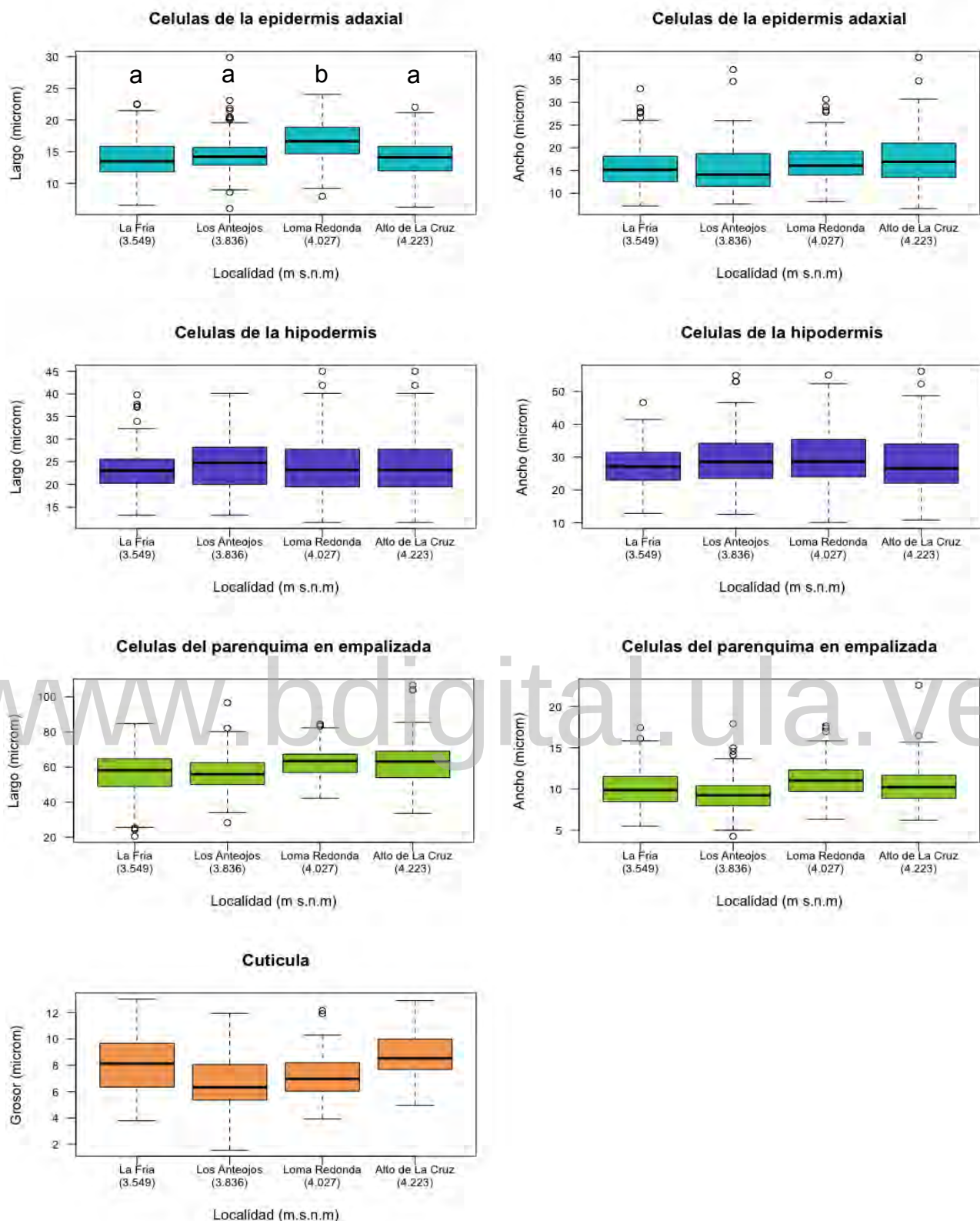


Figura 16. Diagramas de cajas de los caracteres anatómicos de las hojas de *P. sericea* de cuatro localidades distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal. Los grupos que son asignados con la misma letra no se les encontraron diferencias significativas.

Colmenares-Arteaga (2002) también reporta que no se encontraron diferencias significativas entre las características anatómicas correspondientes al grosor, altura y amplitud (Tabla 8). Como en este estudio, se analizaron más de dos poblaciones, se pudo verificar que no solo las poblaciones por debajo de los 4.027 m.s.n.m. muestran menores valores del largo de las células de la epidermis adaxial, sino también la población por encima de los 4.200 m.s.n.m. presenta menores valores. Las diferencias entre los tamaños de las células de la epidermis adaxial reportados por Colmenares-Arteaga *et al.* (2002) y los medidos en este estudio, se deben a los métodos de medición, como se puede observar en la escala de la figura 2, el tamaño de las células epidérmicas no parecen corresponder con la amplitud de la escala.

Tabla 8. Caracteres anatómicos de hojas de *P. sericea* para la localidades Loma Redonda y Mucubají en dos estaciones hídricas. Datos modificados de Colmenares-Arteaga (2002). Estudio del crecimiento de *Polylepis sericea* Wedd. en el páramo venezolano.

Localidad (estación hídrica)	Células epidérmicas (µm)				Estomas (µm)		Densidad estomática	Empalizada (µm)	
	Superficie adaxial		Superficie abaxial						
	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	De (e/mm²)	Largo	Ancho
Loma Redonda (húmedo)	41,4 (0,08)	32,3 (0,08)	22,0 (0,04)	12,1 (0,02)	24,8 (0,03)	21,6 (0,02)	220,2 (19,9)	54,9 (0,08)	8,8 (0,01)
Loma Redonda (seco)	45,8 (0,05)	34,5 (0,06)	25,4 (0,05)	10,5 (0,02)	24,9 (0,03)	20,7 (0,02)	205,4 (19,8)	51,9 (0,09)	8,3 (0,01)
Mucubají (húmedo)	35,1 (0,06)	28,1 (0,06)	21,2 (0,05)	13,4 (0,03)	20,4 (0,03)	19,2 (0,02)	234,8 (21,7)	51,9 (0,06)	9,3 (0,01)
Mucubají (seco)	39,3 (0,09)	31,2 (0,05)	26,6 (0,06)	12,3 (0,02)	23,2 (0,02)	18,6 (0,02)	171,1 (10,9)	54,5 (0,08)	8,5 (0,01)

Adicionalmente, se evaluó si las hojas formaban grupos definidos a lo largo del gradiente altitudinal a través de un análisis de coordenadas principales (PCO), utilizando la variación de todos los parámetros anatómicos tomados en consideración, pero solo detallando en el PCO la epidermis adaxial que presentó diferencias significativas entre altitudes (Figura 17). En función de los caracteres anatómicos estudiados no hay una segregación de grupos a lo largo del gradiente altitudinal muestreado, solo se corroboró un ligero aumento del tamaño de las células de la epidermis adaxial a los 4.087 m.s.n.m. Este resultado confirma que la estructura morfoanatómica de *P. sericea* es muy estable, es decir poco plástica a lo largo de su intervalo de distribución altitudinal.

Al aplicar las tinciones con hierro podemos observar, como el contenido de los compuestos fenólicos se distribuye uniformemente en todo el clorénquima, asociado principalmente con los cloroplastos, con una mayor proporción en los dos primeros estratos de células del parénquima en empalizada (Figura 18). No se aprecia un incremento progresivo en la acumulación de compuestos fenólicos en las poblaciones muestreadas a diferentes altitudes a lo largo del gradiente altitudinal. No obstante, si se aprecia un marcado oscurecimiento de los tejidos parenquimáticos en la población ubicada a la mayor altitud (4.223 m.s.n.m.), dicho oscurecimiento está particularmente asociado con las células del parénquima en empalizada.

Esta tendencia se aprecia aún mejor cuando se detallan solamente las tinciones obtenidas de las muestras foliares procedentes de las poblaciones ubicadas en los extremos de este gradiente altitudinal (3.549 y 4.223 m.s.n.m., respectivamente; Figura 19). Cuando se compara la coloración verde mate de los tejidos parenquimáticos de la población ubicada en el límite inferior del gradiente con la coloración pardo oscuro hasta negro que se observó en la población ubicada a 4.223 m.s.n.m. (Figura 19), se evidencia un aumento del contenido de compuestos fenólicos con capacidades antioxidantes (mayor capacidad de secuestrar el metal hierro) en la población expuesta a mayores niveles de radiación, es decir, las hojas provenientes del Alto de La Cruz poseen mayor cantidad de compuestos con capacidades antioxidantes que las hojas provenientes de la Laguna La Fría. Es de

especial interés que la localidad Loma Redonda presenta la menor intensidad de coloración con ambas tinciones de hierro (Figura 19).

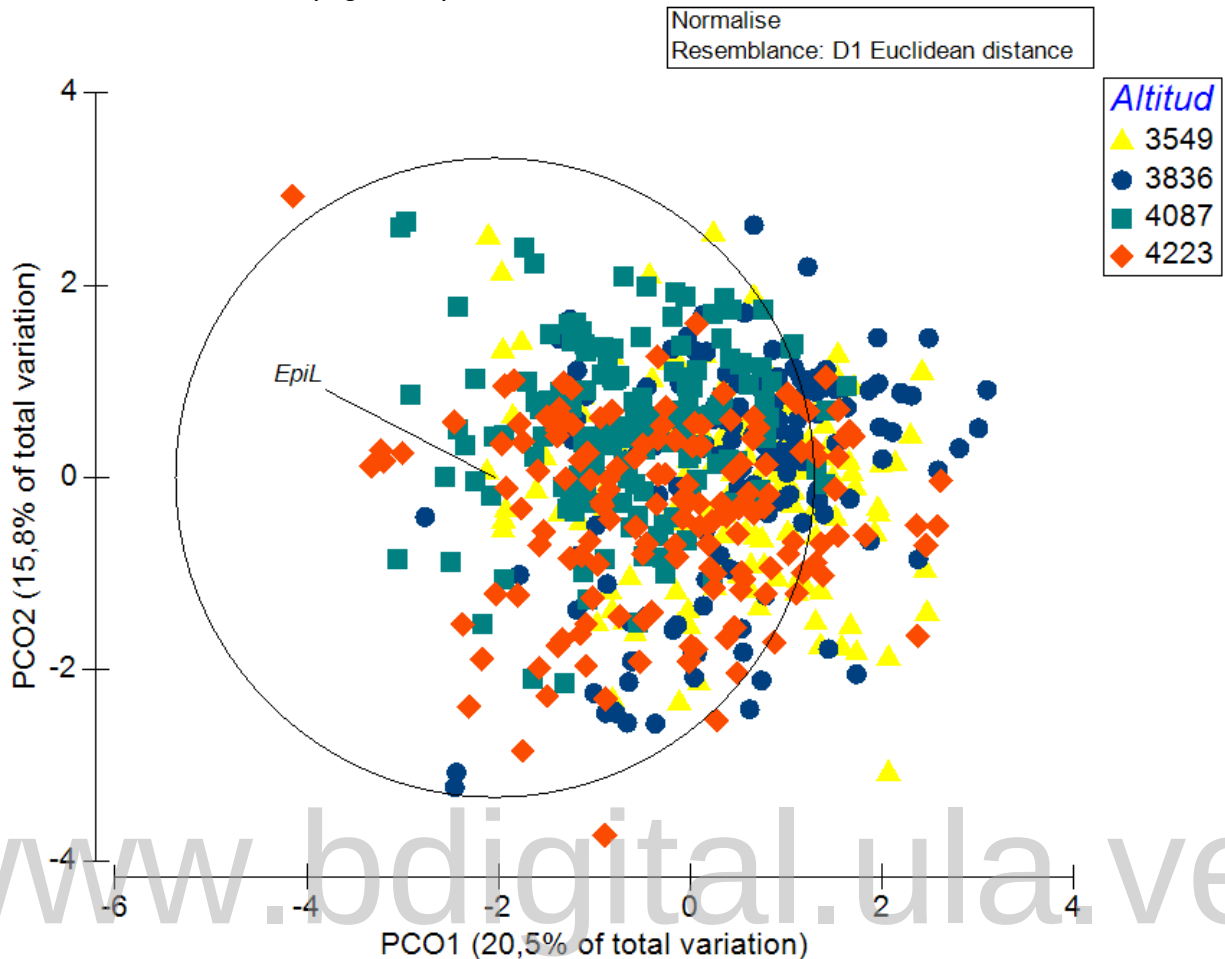


Figura 17. Análisis de componentes principales (PCO) de los parámetros anatómicos de cuatro poblaciones de *P. sericea* distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal. Se tomaron 30 pseudo-replicas de cinco individuos, obteniendo un total de 150 medidas por altitud.

En una escala cualitativa de acuerdo a la intensidad de coloración, podríamos ordenar en sentido ascendente las localidades en: Loma Redonda, Laguna La Fría, Laguna Los Anteos y Alto de La Cruz. Por lo cual, el contenido de polifenoles evidenciado a través de las tinciones con hierro no parecen seguir un patrón lineal que corresponda al aumento que existe entre las poblaciones muestreadas en las localidades en estudio.

Todo lo anterior mencionado corrobora que *P. sericea* presenta una anatomía típica de dicotiledónea, adaptada a condiciones de elevada radiación, bajas temperaturas y presumiblemente un déficit hídrico, en el caso de la población ubicada a 4220 m.s.n.m., factores ambientales característicos del clima periglacial del páramo.



Figura 18. Secciones transversales de la lámina foliar de *P. sericea* teñido con FeCl_3 (izquierda) y FeSO_4 (derecha) en cuatros localidades distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal. Objetivo de 10x. Escala 100 μm . (A) Laguna La Fría (3.549 m.s.n.m.), (B) Laguna Los Antejos (3.836 m.s.n.m.), (C) Loma Redonda (4.087 m.s.n.m.) y (D) Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.).

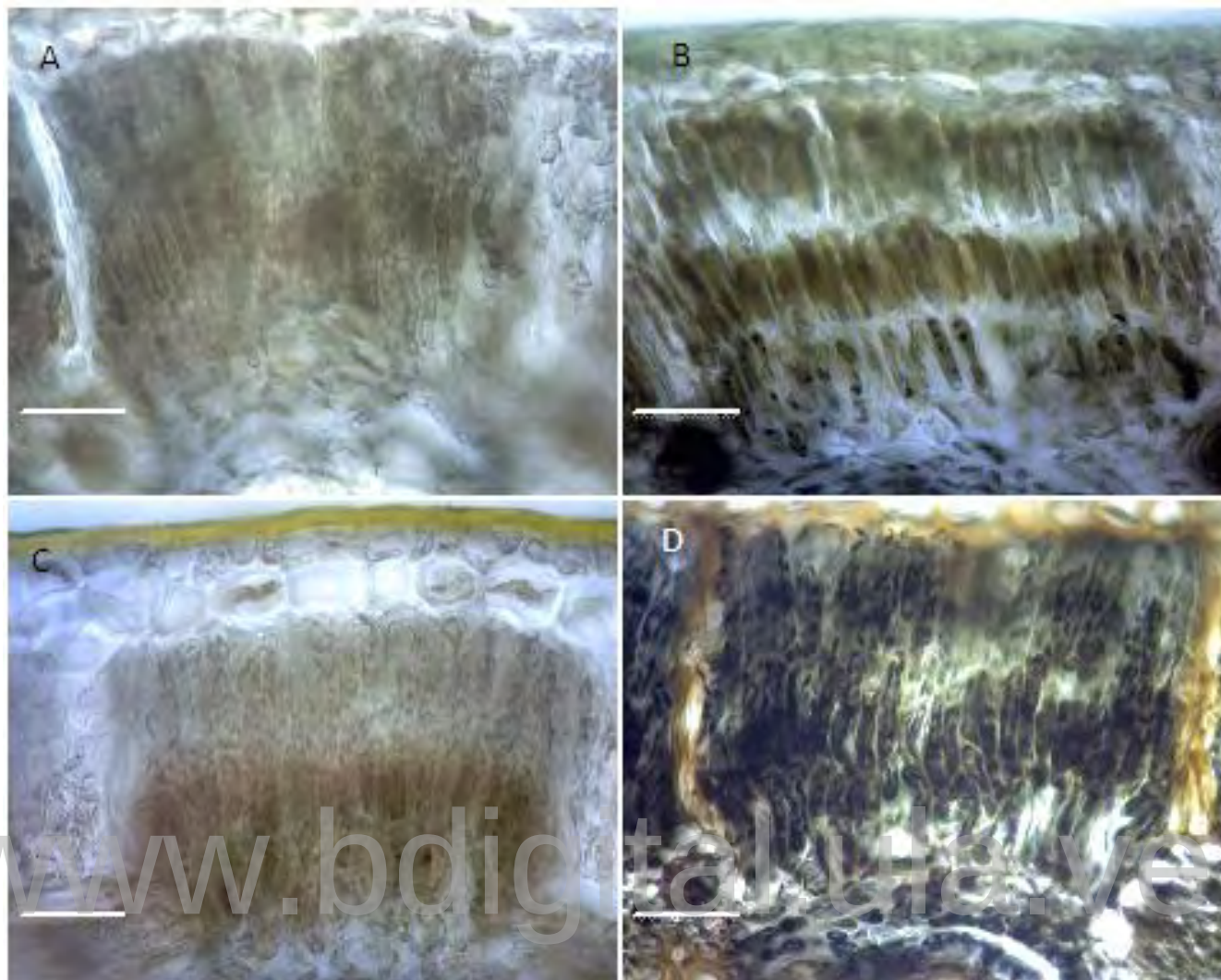


Figura 19. Comparación entre los paquetes de células en empalizada en secciones transversales de la lámina foliar de *P. sericea* teñido con FeSO_4 en especímenes colectados a diferentes altitudes a lo largo del gradiente estudiado. Objetivo de 40x. Escala 50 μm . (A) Laguna La Fría (3.549 m.s.n.m.), (B) Laguna Los Anteos (3.836 m.s.n.m.), (C) Loma Redonda (4.087 m.s.n.m.) y (D) Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.).

Compuestos fenólicos

A partir de las extracciones sólido-líquido se obtuvo un volumen de 2,5 L de extracto metanólico de las hojas provenientes de individuos de la laguna La Fría, y 2 L para la laguna Los Anteos y el Alto de La Cruz, no se tomó en cuenta la localidad Loma Redonda ya que la muestra fue utilizada en estudios preliminares y el tiempo de recolección entre las demás localidades fue de un año. Debido a que todos los extractos presentaron precipitado se procedió a filtrar; el precipitado fue secado y pesado (Tabla 10) y el filtrado, el cual poseía el resto de compuestos polifenólicos en solución se le procedió a realizar análisis espectrofotométricos. Se demostró en análisis preliminares, por medio de cromatografía en capa fina en Silica gel que el precipitado formado durante las extracciones posee el mismo patrón de bandas que el extracto, por lo cual, el precipitado formado es producto de la solubilidad de los polifenoles en metanol.

El espectro UV de muchos compuestos flavonoides perteneciente a seis principales sub-clases, poseen dos máximo de absorbancia entre los 250-400 nm (Anexo 3) (Mabry *et al.*, 1970). Estos picos son comúnmente denotados como banda I, ubicada entre los 300-380 nm y banda II entre los 240-280 nm. Se considera que la banda I está asociada con el anillo B de los flavonoides, mientras que la banda II está asociada con el anillo A (Figura 20).

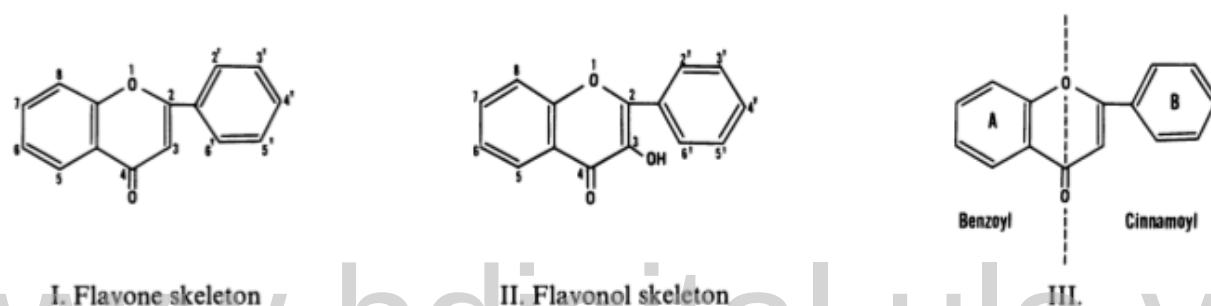


Figura 20. Estructura química de flavonas y flavonoles con numeración en sus carbonos, como detalles del tipo de anillo aromático que lo conforman. Los picos de absorbancias en el rango de la banda I está asociada con el anillo B, mientras que los picos en el rango de la banda II se asocian con el anillo A. Tomado de Mabry *et al.* (1970).

Los espectros de los filtrados metanólicos foliares de cada localidad, demostraron que los compuestos polifenólicos entre cada localidad son muy similares entre sí (Figura 21), dichos espectros muestran un alto pico de absorbancia en el rango de luz UV, específicamente a los 212 nm. Cabe destacar, que este patrón de un solo pico, y no el esperado de 2 picos para flavonoides, puede deberse a la gran complejidad de polifenoles obtenidos del extracto metanólico foliar, los cuales se enmascaran entre sí al superponerse sus moléculas.

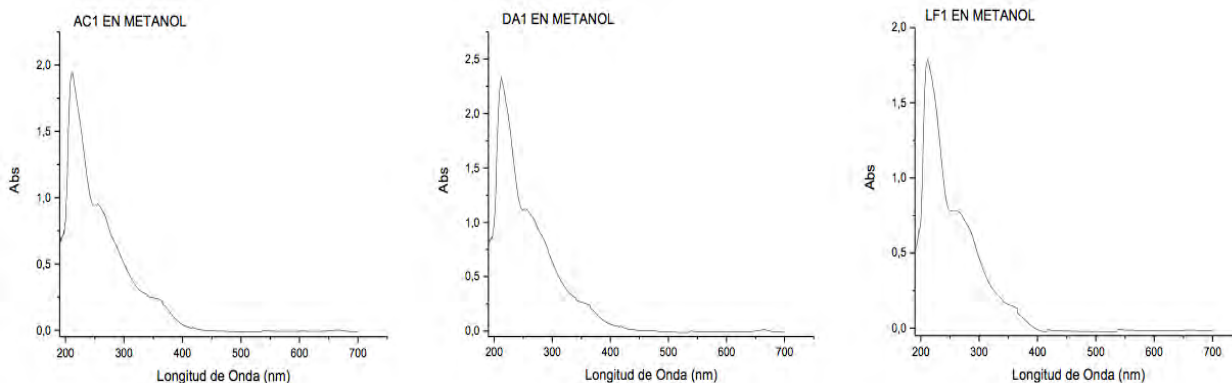


Figura 21. Espectro de absorción de los filtrados metanólicos obtenidos de tres localidades a lo largo de un gradiente altitudinal AC1: Alto de La Cruz, DA1: Laguna Los Anteos y LF1: Laguna La Fría.

Si los flavonoles o las flavonas están metilados o glicosilados en sus hidroxilos 3, 5 o 4' se observan cambios hipsocromicos (pico de absorbancia a menores longitudes de ondas) en sus espectros UV. En las plantas, los flavonoides a menudo presentan sustituciones O-glucosilicas más comúnmente que las C-glucosilicas (Rijke *et al.* 2006), por lo cual, no es extraño encontrar espectros UV con picos de absorbancias menores a 250 nm para la banda II, este tipo de sustituciones parecen corresponder a los compuestos flavonoles y flavonas glicosilados en los extractos metanólicos de *P. sericea* (Mabry *et al.*, 1970).

Cabe destacar que el Alto de la Cruz (4.223 m.s.n.m.) presentó un pico extra a los 255 nm, este pico de absorbancia correspondería a dichos compuestos si no presentan O-glicosilaciones, para discernir la identidad de los compuestos, se recomienda la separación de los componentes del extracto a partir de una cromatografía de alta resolución (HPLC) y una identificación a partir de técnicas espectroscópicas.

Por lo expuesto anteriormente, se presume que los filtrados metanólicos presentan un comportamiento similar a los flavonoides, ya que presentan un anillo aromático fuertemente oxidado, el cual presenta picos de absorbancia cerca de los 212 nm, se proponen a dichos compuestos como una porción mayoritaria de los compuestos polifenólicos.

A través de una curva de calibración de ácido gálico (Anexo 4), se determinó la concentración de compuestos polifenólicos hidroxil sustituidos en los filtrados metanólicos foliares; como los valores de absorbancia expuestos en la Tabla 9 indican la cantidad de polifenoles capaces de reducir los iones metálicos presentes en el reactivo Folin-Ciocalteu, se calculó la cantidad de polifenoles en los extractos al interpolar los valores de absorbancia de cada extracto. Cabe destacar que cada filtrado metanólico tuvo que ser diluido (como se detalla en la metodología), por lo cual, se multiplicó dichos valores de absorbancia por el respectivo factor de dilución de cada muestra y se procedió a determinar los gramos de polifenoles en solución (Tabla 10).

Tabla 9. Absorbancia de la curva de calibración con concentraciones crecientes de ácido gálico y muestras de tres localidades a través de un gradiente altitudinal (m.s.n.m.). (*) La concentración se obtuvo a partir de un volumen final de 4 mL, capacidad volumétrica de la cubeta de medición del espectrofotómetro.

Punto	[Fenoles] (mg/L) en la cubeta*	Abs (754 nm)
0	0	0
1	1,276	0,1514
2	3,828	0,4187
3	5,104	0,577
4	6,38	0,7108
5	7,655	0,8452
6	8,931	0,9601
La Fría	3,178	0,4195
Los Anteosojos	0,97	0,128
Alto de La Cruz	1,721	0,2272

Como se puede observar en la tabla 10, los porcentajes de polifenoles de los extractos metanólicos en las hojas de *P. sericea*, presentan su menor porcentaje en la localidad Los Anteosojos ubicada a los 3.836 m.s.n.m., mientras que los mayores porcentajes lo presentan las localidades ubicadas al extremo del gradiente.

Tomando en cuenta, que el patrón de porcentaje fenoles determinado a través de sequedad (Tabla 10; verde) presentó el mismo patrón que las tinciones con hierro (Figura 18 y 19), mientras que el porcentaje de polifenoles hidroxil sustituidos determinado a partir de ácido gálico (Tabla 10;

amarillo) solo presenta el mayor porcentaje en la laguna La Fría (3.549 m.s.n.m.), se concluye que las hojas que crecen en las localidades a ambos extremos del gradiente presentan compuestos con capacidades antioxidante. El extracto proveniente de La Fría acumula preferiblemente compuestos con estructuras aromáticas sin impedimentos estéricos que le permitan reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo cual no es el caso del Alto de La Cruz. En ambos casos, el patrón de acumulación de compuestos polifenólicos no se acopla con el aumento en la altitud entre las localidades.

Tabla 10. Porcentajes de polifenoles en hojas de *P. sericea* determinados por medio de extracciones metanólicas para tres localidades distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal. (Verde) La cantidad de gramos de fenoles fue determinada a partir de peso seco del extracto llevado a sequedad por rotaevaporación **(Amarillo)** fenoles equivalentes al ácido gálico que reaccionaron con el Folin-Ciocalteu.

Localidad (m.s.n.m.)	Recolectado en campo (g)	Extracto metanólico (g)	Total de extracto seco(g)	% de extracto en hojas	Polifenoles (g) equiv. al Ácido gálico	% de polifenoles en hojas
La Fría (3.549)	1165	166,102	202,978	17,423	1,986	0,17
Los Anteosojos (3.836)	220	30,43	30,785	13,993	0,096	0,044
Alto de La Cruz (4.223)	220	38,876	39,741	18,064	0,172	0,078

Aunque el metanol es el solvente más efectivo a la hora de extraer compuestos polifenólicos, ya sea taninos o flavonoides (Figura 9), como todo solvente es natural que interactúe con muchos compuestos y permitan su disolución durante el proceso de extracción, es ciertamente inespecífico; al poseer una mezcla compleja de compuestos en cada una de las localidades, no hay manera directa de saber la composición de los extractos, antes de un debido método de separación, purificación (en algunos casos cristalización) e identificación. Como el objetivo del proyecto se centralizó en la cuantificación de compuestos polifenólicos, las diferencias entre la composición de polifenoles se enfocaron en una estimación con vainillina sulfúrica (Figura 22).

Para observar las diferencias entre la composición de polifenoles entre los extractos de cada una de las localidades en estudio, se reaccionó el patrón de bandas de una TLC en sílica gel con vainillina sulfúrica. Al analizar el patrón de bandas obtenidos en la TLC con cada una de las poblaciones, se observó que solo la muestra proveniente de la laguna La Fría dio positivo, lo cual se indica por la aparición de una coloración rosa claro (Figura 22).

Este resultado positivo indica la presencia de un compuesto fenólico similar a los flavanoles (flavan-3-ol; véase metodología), como la catequina. Ahora bien, si acoplamos los resultados obtenidos en la prueba de vainillina, con la cuantificación de compuestos fenólicos tomando como referencia al ácido gálico (Tabla 10 amarillo), se corrobora que la mayor cantidad de compuestos que reaccionaron al reactivo Folin-Ciocalteu no se encuentran en las poblaciones ubicadas a mayor altitud. Al parecer las características microambientales de este ecosistema condicionan la acumulación de compuestos fenólicos hidroxilados sin impedimentos estéricos, lo cual no ocurre en las poblaciones ubicadas en altitudes más elevadas.

Como se observó en la figura 21, el espectro UV del Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.) mostró un pico de absorbancia adicional a los 255 nm, este pico indicaría una mayor diversidad de compuestos aromáticos en el filtrado, el cual no se evidenció en las pruebas con vainillina sulfúrica. Sarkar y Howarth (1976) indican que la prueba con vainillina no es capaz de detectar compuestos con doble enlaces en sus C3, como es el caso de las flavonas. Por otra parte, Mabry *et al* (1979), señala que el pico de absorbancia de la banda II de muchas flavonas con sus anillos A oxidados, como es el

caso de la 7-hidroxiflavona, presentan su pico de absorbancia entre los 250-280 nm, lo cual parece indicar que en el Alto de La Cruz compuestos similares a las flavonas son los que están en una mayor proporción en el extracto.

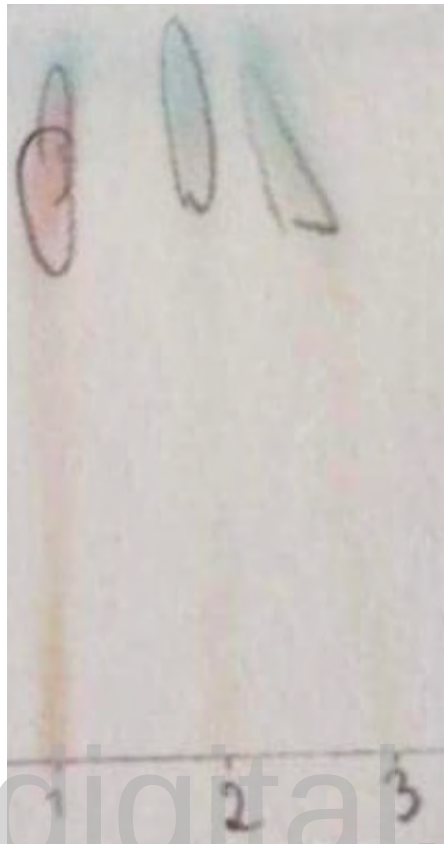


Figura 22. Cromatografía de capa fina en sílica gel revelada con vainillina sulfúrica al 1 %. (1) Laguna La Fría (3.549 m.s.n.m.) (2) Laguna Los Anteos (3.836 m.s.n.m.) (3) Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.). Los compuestos de color azul corresponden a la clorofila, la prueba dio positiva solamente para un compuesto adicional en la banda 1, es decir en la laguna La Fría (3.549 m.s.n.m.)

Tomando en cuenta, los espectros UV (Figura 21), las tinciones anatómicas con hierro (Figura 18 y 19), la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (Tabla 10; amarillo), y la deshidratación con vainillina en medio ácido (Figura 22), dependen principalmente de la presencia de un grupo fenol con dihidroxi sustituciones en disposición orto (1, 2) sin impedimento estérico; es factible proponer que la porción mayoritaria de los compuestos polifenólicos que componen los extractos de *P. sericea* poseen una estructura similar a los flavonoides hidroxil sustituidos. Dicha propuesta debe ser puesta a prueba mediante técnicas de identificación, como la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), como proponen Rijke *et al.* (2006).

Discusión

La mayoría de los bosques de *P. sericea* suelen ser bosques semi-cerrados (cobertura del estrato arbóreo entre 25-65%), con un sotobosque abundante, que generalmente está entre 0,1-1,5 m de altura (sotobosque) conformado por gramíneas en macollas, plantas herbáceas y arbustos de bajo porte. Aunque el 57% de los bosques estudiados por Arnal (1983) presentan esta cobertura, existe un pequeño grupo de bosques con coberturas del estrato arbóreo menor al 4% (Arnal, 1983), este parece ser el caso del bosque del Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.), dicho bosque presenta individuos de *P. sericea* de bajo porte, con formas de vida más arbustivas (Figura 11).

Arnal (1983), indica que los bosques de *Polylepis* no poseen una flórmula exclusiva; por el contrario, su composición está fuertemente influenciada por la vegetación circundante del páramo abierto. En el caso del Alto de la Cruz (4.223 m.s.n.m.) la flórmula circundante era de tipo arbustiva, asociada a individuos de *P. sericea* de bajo porte y aspecto arbustivo, y las especies arbóreas y arbustivas habituales del estrato superior de bosques de *P. sericea* que se observaron en las localidades de altitudes inferiores (3.549, 3.836 y 4.027 m.s.n.m.), como es el caso de *Gynoxys* y *Libanothamnus* (Delgado y León-Vargas, 2017) no estaban presentes. La ausencia de las especies arbóreas que típicamente acompañan a *P. sericea* a altitudes inferiores se ha atribuido a las características microambientales propias del sitio (bajas temperaturas, fuertes vientos y elevada radiación, exposición, pendiente de la ladera, textura y contenido de agua del suelo).

Desde un punto de vista morfológico, la AFE difiere de los valores reportados por Colmenares-Arteaga (2002), la autora reporta mayores AFE en poblaciones de la Laguna de Mucubají (3.500 m s.n.m.) con respecto a la estación Loma Redonda (4.087 m s.n.m.). A pesar de este hecho, la misma autora señala que en la población ubicada a 4.087 m.s.n.m., el número de estratos del parénquima en empalizada es superior al hallado en los individuos creciendo a 3.500 m.s.n.m., lo cual incrementa el grosor de las hojas, reduciendo la difusión de solutos en espacios intercelulares, generando hojas con mayor eficiencia fotosintética. En ambos casos el AFE no presenta diferencias significativas.

Los resultados del presente estudio confirman las observaciones de Colmenares-Arteaga (2002), en el sentido que se trata de una especie con anatomía foliar heliófila, en la cual una densa cutícula protege a las hojas de la radiación excesiva, más del 60% de la lámina foliar está compuesto por parénquima en empalizada. Cabe destacar, que a pesar de existir diferencias significativas en el largo de las células de la epidermis adaxial (Figura 16), el PCO indica que la variabilidad de los parámetros anatómicos no se ve únicamente afectado por las variaciones térmicas y lumínicas a lo largo del gradiente altitudinal, probablemente también por variaciones en el patrón de precipitaciones a lo largo del mismo (Figura 17). Colmenares-Arteaga (2002) afirma que el estrés hídrico es un factor modulador del crecimiento de ramas de *P. sericea*, esto concuerda con Arnal (1983), quien indica que el establecimiento de la especie depende de los niveles de precipitación propios de cada localidad.

Colmenares-Arteaga (2002) y Simpson (1979), reportan que las hojas de *P. sericea* presentan muchas características xeromórficas, en esta investigación se corroboró la presencia de una vaina esclerenquimática asociada al nervio medio (Figura 14), así como la banda de parenquimática amilífera rodeando la anterior (Figura 15). En los trabajos expuestos por Goldstein *et al.* (1994) y Azócar y Rada (2006) se detalla la disminución del potencial osmótico, así como un aumento del contenido de azúcares solubles y prolina en las primeras horas de la mañana como estrategia evasora del congelamiento de los tejidos; por lo que es factible que este almidón acumulado contribuya a dicha estrategia de resistencia a bajas temperaturas.

Los resultados del presente estudio confirman que *P. sericea* es una especie bien adaptada a las condiciones adversas del páramo propiamente dicho y al páramo Altiandino que caracterizan los Andes venezolanos, y nos permiten afirmar que su desarrollo foliar no está fuertemente influenciado por las condiciones de su microhábitat o condiciones de sitio. Los estudios ecofisiológicos realizados en esta especie confirman su adaptación al estrés hídrico (Arnal, 1983; Colmenares-Arteaga, 2002),

térmico (Rada *et al.*, 1985; Goldstein *et al.*, 1984; Azocar y Rada 2006) y lumínico (Azócar y Rada, 2006; Rada *et al.*, 2011).

En ecosistemas donde la elevada radiación puede generar un estrés oxidativo elevado (generación de $^1\text{O}_2$, como de H_2O_2 por la excesiva excitación del fotosistema II), la síntesis de metabolitos secundarios, como los flavonoides, puede amortiguar el daño producido por las ROS. Los flavonoides son antioxidantes intracelulares que disminuyen el daño generado por las ROS en el metabolismo celular, protegiendo al aparato fotosintético o complejo fotosintético de la fotoinhibición.

Las hojas de *P. sericea* demostraron ser morfoanatómicamente heliófilas que acumulan agentes quelantes, como se pudo observar en las tinciones con hierro (Figura 18 y 19), donde muchos compuestos con capacidades antioxidantes están fuertemente asociados con células fotosintéticamente activas, es decir, a todas las células del mesófilo, tanto del parénquima en empalizada como el esponjoso, lo cual concuerda con lo reportado por Agati *et al.* (2012) en su revisión.

Agati *et al.* (2012), destacan la capacidad antioxidante de los glicósidos de flavonoides dihidroxi sustituidos en el anillo B, como su ubicación casi exclusiva en el núcleo, la envoltura de cloroplasto y la vacuola de las células de los tricomas glandulosos. Los autores dan especial interés a la vacuola donde se presenta un pico de absorbancia extra a 525 nm correspondiente a derivados de ácido caféico o hidroxycinamatos (Figura 23).

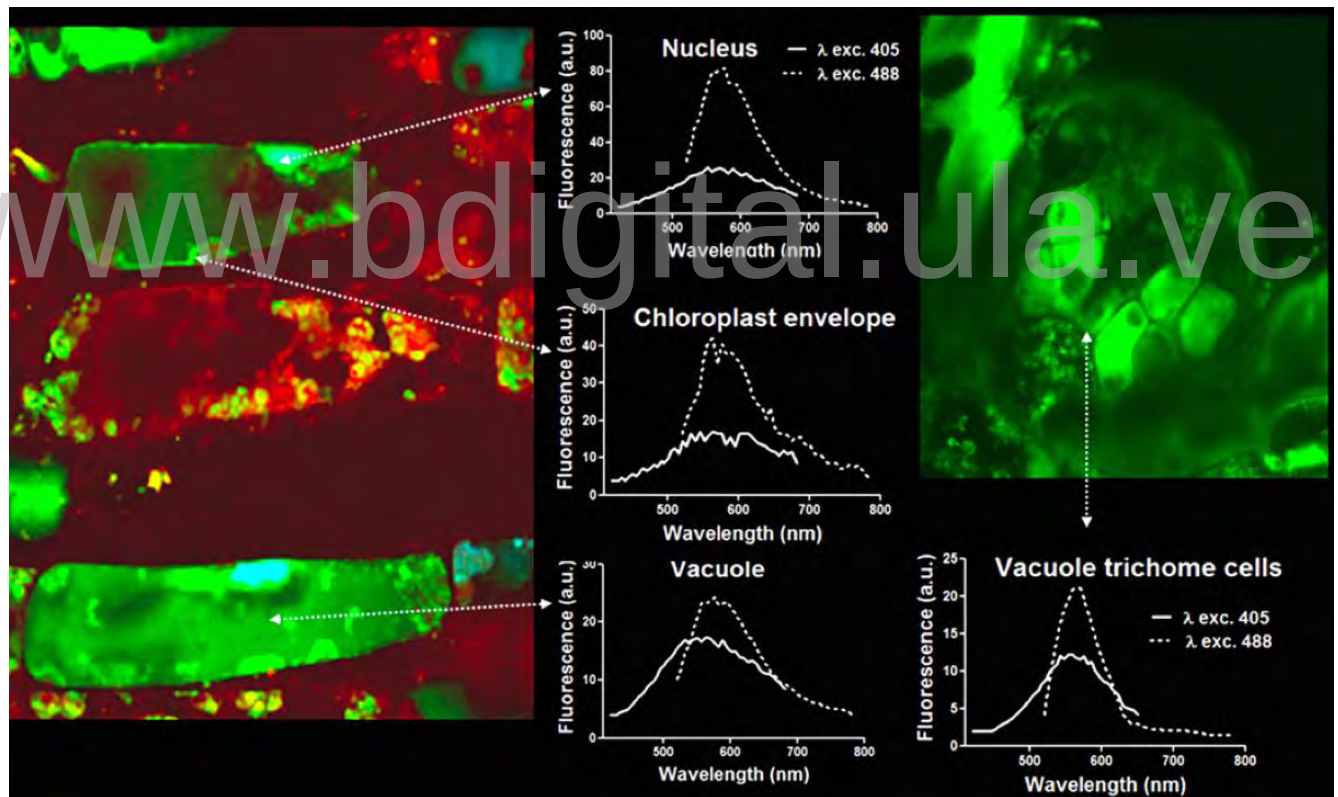


Figura 23. Microimagen de fluorescencia de hojas de *Phillyrea latifolia* que muestra la distribución subcelular de fenilpropanoides dihidroxi-sustituidos. La sección transversal, de 100 μm de espesor, se refiere a la segunda capa de parénquima en empalizada (a 100 μm de profundidad desde la epidermis adaxial) y las células del tricoma glandular. Modificado de Agati *et al.* (2012).

Se pudo apreciar que en el caso de *P. sericea*, las tinciones con hierro están estrechamente relacionadas con la presencia de compuestos quelantes que se acumulan en los cloroplastos, como se observa en la figura 24, esto concuerda con lo detallado previamente en la figura 23. Aunque no se pudo detallar en este estudio, se ha demostrado previamente la ubicación de los flavonoides

alrededor de la membrana que envuelve a los cloroplastos y núcleos, siendo estos compartimientos relativamente pequeños a comparación de la vacuola, se deduce que la concentración molar de los flavonoides antioxidantes esté lo suficientemente elevada para desintoxicar la célula de ROS (Agati *et al.*, 2013; Brunetti *et al.*, 2013). Además, la ubicación de los flavonoides di-hidroxi sustituidos alrededor de los cloroplastos se relaciona con su capacidad de captar $^1\text{O}_2$, producto de la actividad del aparato fotosintético expuestos a altas radiaciones fotosintéticamente activas (PAR, por sus siglas en inglés) (Tattini *et al.*, 2004).

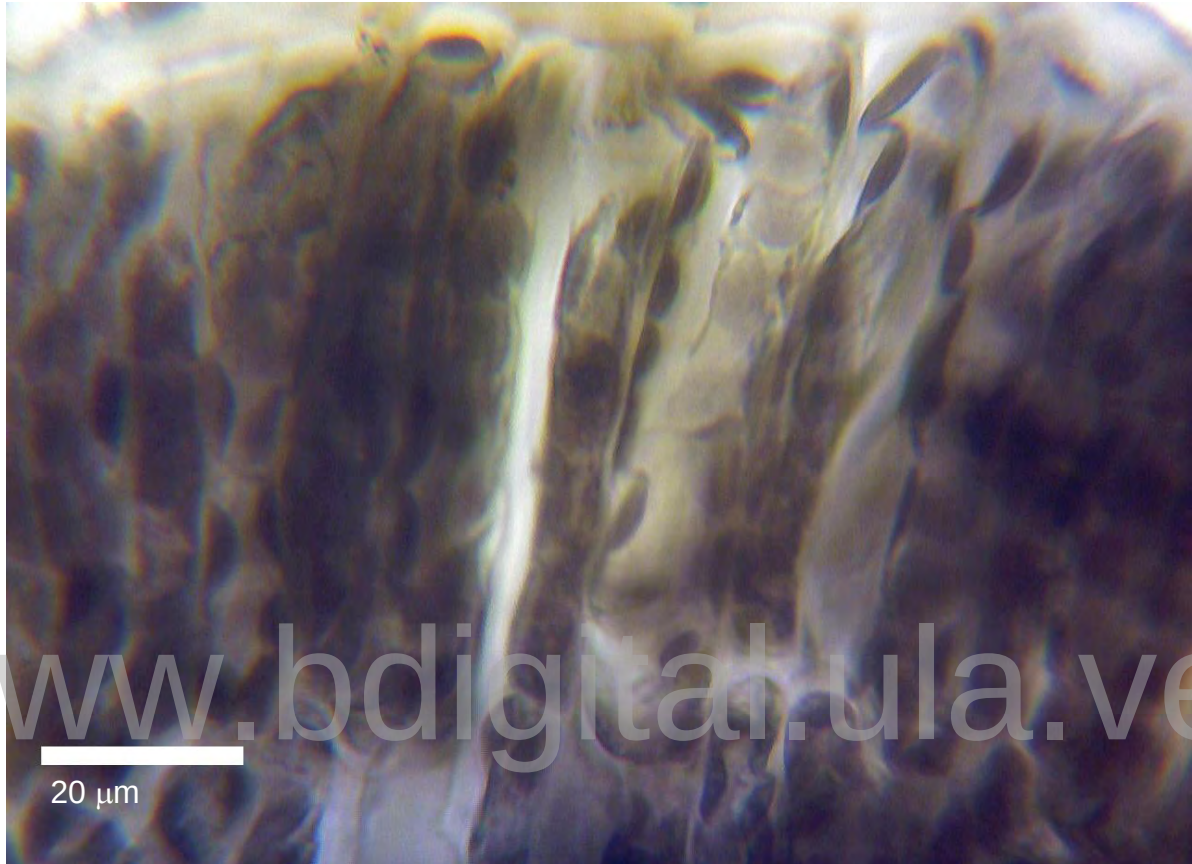


Figura 24. Sección transversal de célula del parénquima en empalizada de *P. sericea* teñido con FeCl_3 . Objetivo de 100x. Muestra proveniente del Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.).

Tattini *et al.* (2004) reportan en hojas heliófilas de *Ligustrum vulgare* (Figura 25), la mayor acumulación de fenilpropanoides di-hidroxi sustituidos que sus contrapartes mono-hidroxi sustituidos, ya sean hidroxicinamatos, como el equinacósido o flavonoles y flavonas, como la quercetina 7-O-glc y la luteolina 3-O-rut, respectivamente, por lo cual se consideran antioxidantes intracelulares más eficientes (Figura 25).

Estudios realizados por Tattini *et al.* (2004), concuerdan con los análisis obtenidos para los extractos metanólicos de *P. sericea*; aunque parece existir una diferencia en la composición de los extractos, presumiéndose que el extracto del Alto de La Cruz (4.223 m.s.n.m.) está compuesto mayoritariamente por flavonas fuertemente oxidadas en su anillo A (Mabry *et al.*, 1970; Figura 20), mientras que en La Fría (3.836 m.s.n.m.) la porción mayoritaria parece estar compuesta por glicósidos de flavonoles di-hidroxi sustituidos. Los componentes de los extractos pertenecen a los fenilpropanoides di-hidroxi sustituidos, lo cual apoya a que los fenilpropanoides di-hidroxi sustituidos sean compuestos candidatos a formar la proporción mayoritaria de los extractos polifenólicos.

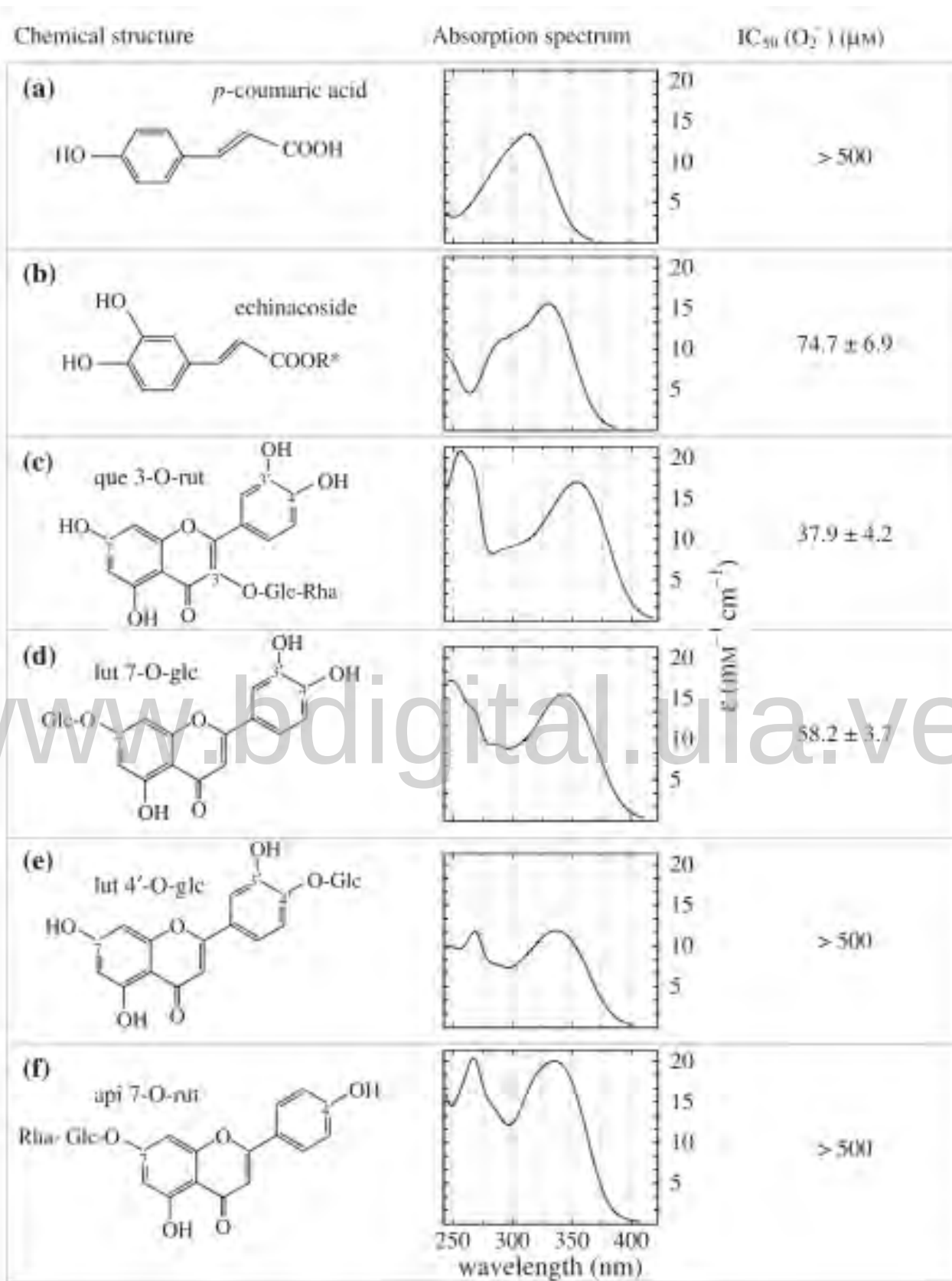


Figura 25. Estructura química, espectro de absorción (entre 250-400 nm) y actividad eliminadora *in vitro* (IC₅₀) contra los radicales superóxido (O₂⁻) de los hidroxicinamatos solubles y flavonoides detectados en hojas de *Ligustrum vulgare*. Tomado de Tattini *et al.* (2004).

Aunque el pico de absorbancia de 255 nm detectado en las muestras de individuos procedentes de la población situada a 4.230 m.s.n.m. (Alto de La Cruz), parece indicar que una porción de lo que se presume que son flavonas poseen sus hidroxilos libres, la glicosilación en flavonoides suele estar asociada mayormente con los hidroxilos 3 y 7 (Figura 26), este enlace incrementa la solubilidad de los flavonoides en el medio acuoso intracelular, además de preservar sus grupos OH evitando su auto-oxidación, permitiendo así el transporte de los flavonoides desde el retículo endoplasmático a varios compartimientos celulares o su secreción a la membrana plasmática y la pared celular. Como consecuencia, la capacidad antioxidante de los flavonoides reside usualmente en el grupo catecol del anillo B del esqueleto flavonoide (Brunetti *et al.*, 2013).

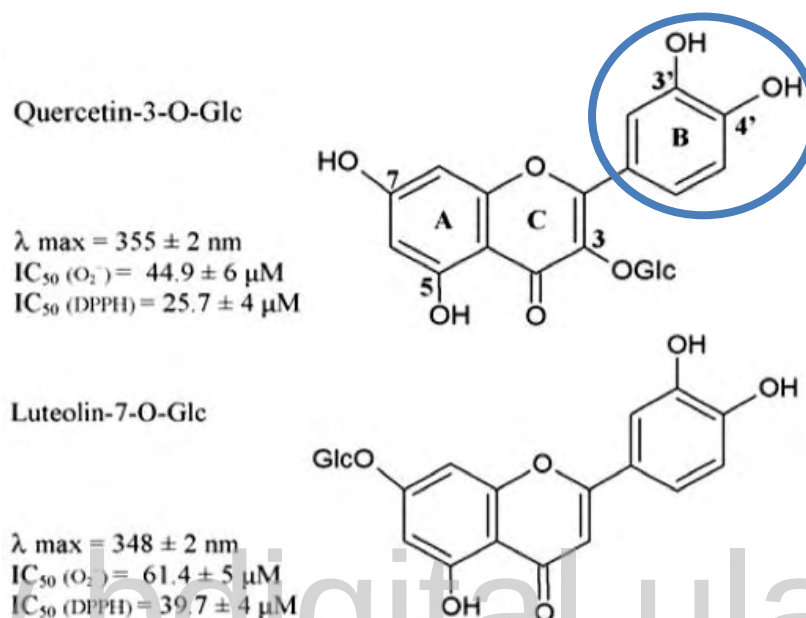


Figura 26. Máximos de absorbancia y capacidad de extinción de ROS de los flavonoides glucósidos (glc) con di-hidroxi sustituciones en el anillo B (quercetina y luteolina). Los espectros de absorbancia se registraron en buffer fosfato a una concentración de metabolismo de 50 μM . La IC_{50} denota la concentración molar requerida para reducir en un 50% las concentraciones de anión superóxido (O_2^-) y el radical libre sintético DPPH (2,2-difenil-1-picrililhidracilo). Tomado de Brunetti *et al.* (2013).

Como se ha expuesto previamente, otros compuestos capaces de actuar como agentes antioxidantes, son los hidroxycinamatos, al igual que los flavonoides suelen estar sesgados a la línea celular y en algunos casos a cada célula en particular. Agati *et al.* (2013) afirman que en hojas de sol, existe una evidente sustitución de los hidroxycinamatos por flavonoides di-hidroxi sustituidos, conformando así los flavonoides el mayor compuesto de acumulación en células epidérmicas, como del aparato estomático (Figura 27 F, G).

En la figura 27A, los flavonoides di-hidroxi sustituidos se presentan gradualmente desde los estratos adaxiales hasta los abaxiales en las células del mesófilo de hojas de sol, acumulándose en su mayoría en vacuolas, cloroplastos y núcleos, no es el caso en hojas de sombra donde los flavonoides suelen disponerse solamente en vacuolas de epidermis adaxial y cutícula (Figura 27C) (Agati *et al.*, 2013).

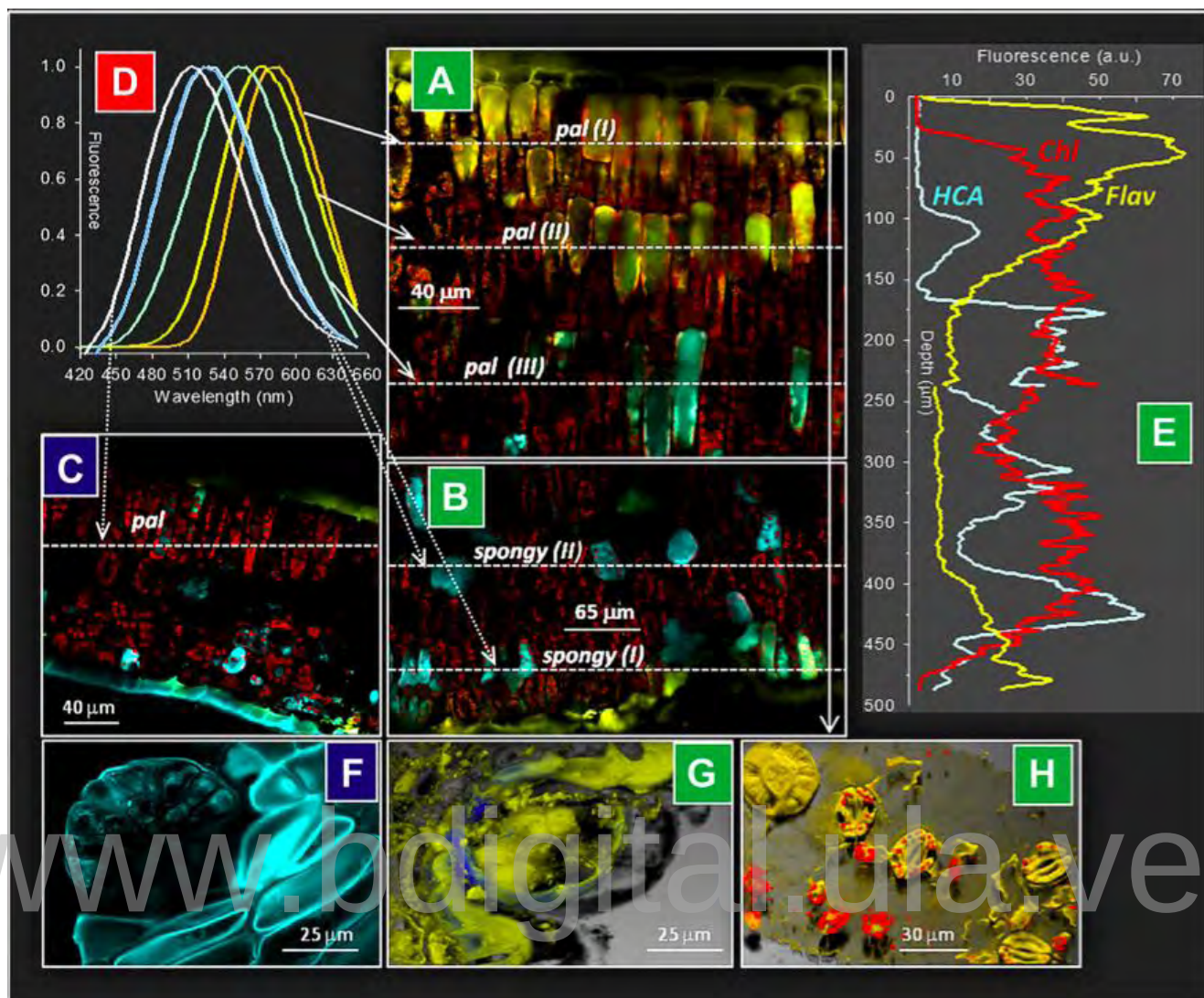


Figura 27. Distribución intercelular de flavonoides e hidroxycinamatos en hojas de *Phyllirea latifolia* expuestas a contrastantes condiciones lumínicas. Secciones transversales de 100 μm de espesor, ácido hidroxicinámico (HCA, azul claro), flavonoides (Flav, amarillo) y clorofila (Chl, rojo). Las figuras son imágenes de fluorescencias superpuestas de HCA, Flav y Chl, para los tejidos adaxiales (A) y abaxiales (B) de la hoja de sol y la hoja de sombra (C). En (E) se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia de HCA, Flav y Chl en toda la profundidad de una hoja de sol. Las imágenes en (F-H) son combinaciones de las imágenes de fluorescencias superpuestas de las células guardianas y los tricomas glandulares en hojas de sol (G, H) y en hojas de sombra (F). Tomado de Agati *et al.* (2013).

En las tinciones con hierro de *P. sericea*, se pudo observar como el contenido de los compuestos fenólicos se distribuye uniformemente en todo el clorénquima, asociado directamente con la envoltura de los cloroplastos (Figura 24), con una mayor proporción en las dos primeras capas de células del parénquima en empalizada (Figura 18). Esto parece concordar con lo reportado con Agati *et al.* (2013), por lo que la distribución de los compuestos fenólicos en las hojas de *P. sericea* parece estar principalmente asociada con el hecho de que las mismas son hojas heliófitas, y que dichos compuestos poseen capacidades antioxidantes, capaces de contrarrestar el estrés oxidativo generado por la formación de ROS, durante la excitación excesiva del aparato fotosintético.

Este hecho sugiere que la síntesis de flavonoides está regulada positivamente por los altos niveles de luz, es decir, desde un punto de vista metabólico la vía de los fenilpropanoides, es modulada positivamente hacia la producción de flavonoides por encima de los hidroxycinamatos (Figura 28) cuando las hojas son expuestas a altos niveles de luz. En consecuencia, los cambios en

la vía de los fenilpropanoides inducidos por la radiación fotosintéticamente activa (PAR), modulan a las hojas para que muestren un mayor potencial de eliminación de ROS, pero no una mayor capacidad para atenuar las longitudes de ondas más energéticas (radiaciones UV-A,B o C) al alcanzar objetivos sensibles en la hoja (como los son los aparatos fotosintéticos) (Agati *et al.*, 2013).

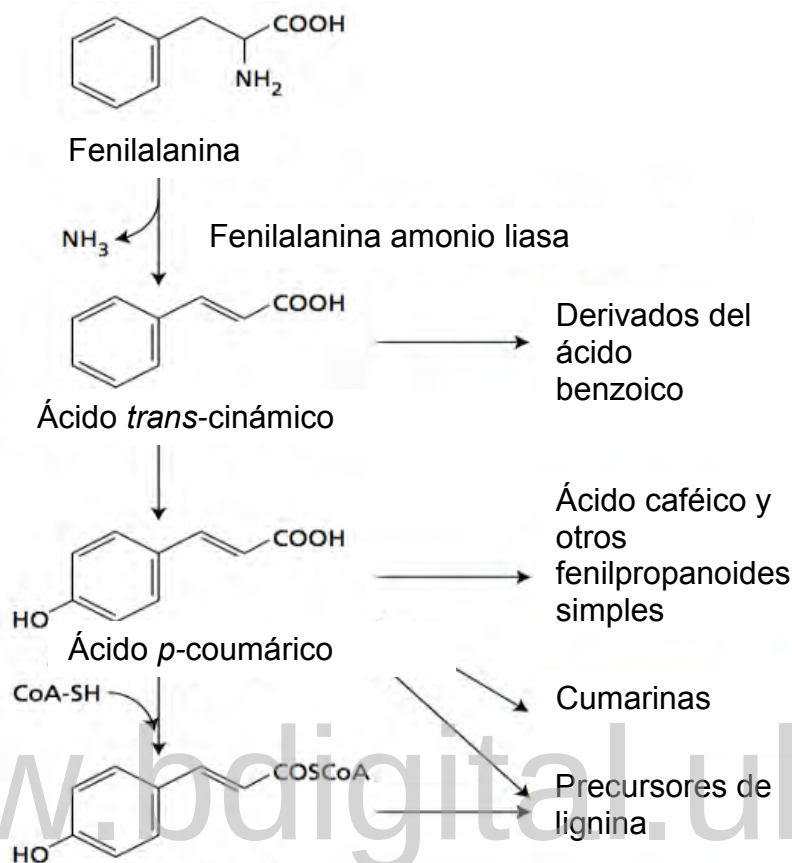


Figura 28. Esquema de la biosíntesis de fenilpropanoides a partir de fenilalanina. La formación de muchos fenoles vegetales, incluyendo fenilpropanoides simples, cumarinas, derivados del ácido benzoico, lignina, antocianinas, isoflavonas, taninos condensados y otros flavonoides, comienza con fenilalanina. Modificado del Taiz y Zeiger (2006).

En el caso de *P. sericea*, el patrón de acumulación de compuestos polifenólicos antioxidantes no se acopla al incremento en la altitud entre las localidades (Tabla 10; Figura 18), en este sentido, es factible presumir que la acción de los compuestos flavonoides di-hidroxi sustituidos es interactuar con las ROS, como los $^1\text{O}_2$, más que ser moléculas capaces de captar las radiaciones de alta energía. Siendo así, la acumulación dependerá del tipo de célula y de las características microambientales de cada sitio más que de un aumento en la altitud.

Conclusiones

- Los individuos de *P. sericea* a los 4.223 m.s.n.m. presentan una forma de vida arbustiva, a diferencia a las formas de vida arbóreas presentes en altitudes inferiores.
- La estructura morfoanatómica foliar de *P. sericea* es muy conservada a lo largo de su intervalo de distribución altitudinal.
- La acumulación de agentes quelantes se produce en todo el clorénquima de las hojas y en una mayor proporción en los dos primeros estratos del parénquima en empalizada.
- El contenido de polifenoles hidroxí sustituidos correspondió a las hojas proveniente de los individuos creciendo a 3.549 m.s.n.m., mientras que la mayor intensidad en las tinciones con hierro correspondió a las hojas proveniente de individuos creciendo en el límite superior del gradiente, a 4.223 m.s.n.m, lo cual sugiere diferencias en la composición de los compuestos fenólicos sintetizados.
- El extracto metanólico foliar proveniente de individuos creciendo a 4.223 m.s.n.m. está compuesto mayoritariamente por flavonas fuertemente oxidadas en su anillo A, mientras que el extracto proveniente de individuos creciendo a 3.549 m.s.n.m. está compuesto por glicósidos de flavanoles. En ambos casos, los principales componentes de los extractos pertenecen a fenilpropanoides hidroxí sustituidos.

www.bdigital.ula.ve

Bibliografía

Agati, G.; Brunetti, C.; Di Ferdinando, M.; Ferrini, F.; Pollastri, S.; Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. **Elsevier. Plant Physiology and Biochemistry XXX**: 1-11. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.03.014.

Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Elsevier. Plant Science 196**: 67–76. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.

Ancibor, E. (1975). Estudio anatómico de la vegetación de la Puna de Jujuy. I. Anatomía de *Polylepis tomentella* Wedd. (Rosaceae) **Darwiniana, T. 19, No. 2/4**: pp. 373-385. <http://www.jstor.org/stable/23215548>.

Antonelli, A.; Sanmartín, I. (2011). Why are there so many plant species in the Neotropics? **Taxon, 60**: 403-414.

Arnal, H. (1983). **Estudio ecológico del bosque Alti-andino de *Polylepis sericea* Wedd. en la Cordillera de Mérida**. Trabajo especial de grado para optar por el título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Arnal, H.; Sampson, A.; Navarro, G.; Palomino, W.; Ferreira, W.; Romoleroux, K.; Caro, D.; Teich, I.; Cuyckens, E.; Antezana, C.; Arrazola, S.; Aucca, C.; Balderrama, J.; Beck, S.; Burneo, S.; De la Barra, N.; Bustamante, A.; Fandino, Y.; Ferro, G.; Gómez, I.; Guzmán, G.; Iglesias, J.; Irazabal, J.; Lozano, P.; Mercado, M.; Monsalve, A.; Renison, D.; Salgado, S.; Samochuallpa, E. (2014). **Mapa Pan Andino de Bosques de *Polylepis* prioritarios para Conservación**. American Bird Conservancy, The Plains, USA.

Ataroff, M.; Sarmiento, L. (2004). Las unidades ecológicas de los Andes de Venezuela. *En*: La Marca, E.; Soriano, P. (Eds.): **Reptiles de Los Andes de Venezuela**. Fundación Polar, Codepre-ULA, Fundacite-Mérida, Biogeos, Mérida, pp. 9-26.

Azcón-Bieto, J.; Talón, M. (2013). **Fundamentos de Fisiología Vegetal**. 2da Ed. p McGraw-Hill - Interamericana de España, S.L. p. 594

Azocar, A.; Rada, F. (2006). **Ecofisiología de plantas de páramo**. ICAE. ULA. Centro Editorial Litorama, C.A. Mérida, Venezuela. ISBN: 980-11-0990-4

Barthlott, W.; Hostert, A.; Kier, G.; Küper, W.; Kreft, H.; Mutke, J.; Rafiqpoor, M.D; Sommer J.H. (2007). Geographic patterns of vascular plant diversity at continental to global scale. **Erdkunde, 61**: 305–315.

Bidwell, R.G.S. (1993). **Fisiología vegetal**. AGT Editor, S.A. ISBN: 968-463-015-8. p. 256.

Brunetti, C.; Di Ferdinando, M.; Fini, A.; Pollastri, S.; Tattini, M. (2013). Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. **Int. J. Mol. Sci., 14**, 3540-3555. DOI:10.3390/ijms14023540.

Caceda, C. (2012). Evaluación de la Actividad Antibacteriana "in Vitro" del Extracto Alcohólico de las Hojas de *Polylepis rugulosa* ("queilua") Frente a Cultivos Bacterianos Uropatógenos Aislados en el Hospital Hipólito Unanue – Tacna. **Revista Ciencia & Desarrolla, 14**: 51-58.

Catalano, S.; Cioni, P. L.; Martinozzi, M.; De Feo, V.; Morelli, I. (1995). Chemical Investigation of *Polylepis incana* (Rosaceae). **Biochemical Systematics and Ecology, 23 (1)**: 105-107. DOI: 10.1016/0305-1978(95)93663-N.

- Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. **IDESIA (Chile)**, 27, N° 3:59-76.
- Colmenares-Arteaga, M. (2002). **Estudio del crecimiento de *Polylepis sericea* Wedd. en el páramo venezolano**. Trabajo especial de grado para optar por el título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Colmenares-Arteaga, M.; Rada, f.; Luque, R. (2005). Anatomía foliar de *Polylepis sericea* Wedd.(Rosaceae) a dos altitudes en los Altos Andes venezolanos. **Plantula**, 3(3): 141-148.
- Delgado, J. (2015). **Flórlula Vascular y Bryophyta sensu stricto de un Bosque de *Polylepis sericea* WEDD., Ubicado en la Sierra de la Culata, Estado Mérida**. Trabajo especial de grado para optar por el título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Delgado, J.; Leon-Vargas, Y. (2017). Musgos (Bryophyta) de bosques de *Polylepis sericea* (Rosaceae) del estado Mérida (Venezuela). **Bol. Soc. Argent. Bot.** 52 (2). Córdoba. ISSN 1851-2372.
- Ely, F.; Rada, F.; Gutierrez, N. (2011). "Análisis Morfofuncional de tres bambúes leñosos del Ecotono Selva Nublada-Páramo en los Andes Venezolanos." **Ecotrópicos**, 24 (1): 92-112. ISSN 1012-1692.
- Falcone-Ferreira, M.; Rius, S.; Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. **Front. Plant Science**, 3 (222): 1-15. DOI: 10.3389/fpls.2012.00222.
- Fernández, J. (2017). **Derivados del α -Pineno (componente mayoritario del aceite esencial del pino extraído de la resina de *Pinus caribaea*) obtenido de los desechos de la explotación maderera de Uverito, (estado Monagas). Ensayos biológicos**. Trabajo especial para optar por el título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- García, E.; Fernández, I.; Fuentes, A. (2013). **Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu**. Centro ETSIAMN, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Gaviria, J. (2004). **Las Rosáceas de la Flora del Páramo venezolano**. Trabajo especial para ascender a la categoría de Profesor Titular. Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Centro Jardín Botánico. pp. 105-107.
- Goldstein, G., Meinzer, F. C.; Rada, F. (1994). Ecophysiology of *Polylepis sericea*: a tropical treeline species. En: Rundel, P.W., Meinzer, F.C.; Smith, A.P. (eds): **Tropical Alpine Environments: Plant Form and Function**. Cambridge, University Press, pp.129-149.
- Gutiérrez, D.; Ortiz, C.; Cisneros, A. (2008). **Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal**. Centro Nacional de Metrología. Simposio de Metrología 2008. Santiago de Querétaro, México. SM2008-M220-1108-1.
- Johansen, D. (1940). **Plant microtechnique**. Macgraw Hill Book I.N.C. p. 107, 193.
- Julkenen-Tiitto, R. (1985). Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, 33 (2):213-217. DOI: 10.1021/jf00062a013.
- Kessler, M. (2006). Bosques de *Polylepis*. En: Moraes, M.; Øllgaard, B.; Kvist, L.; Borchsenius, F.; Balslev, H. (Eds): **Botánica Económica de los Andes Centrales**. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. pp. 110-120.

- Kennedy, J. y Powell, H. (1985). Polyphenol Interactions with Aluminium(III) and Iron(III) : their Possible Involvement in the Podzolization Process. **Aust. J. Chem.**, **38**: 879-88
- Lampasona, M.; Catalan, C.; Gedris, T.; Herz, W. (1998). Oleanolic and Ursolic Acid Derivatives From *Polylepis Australis*. **Phytochemistry**, **49** (7): 2061-2064.
- León, Y. (1991). **Estudio de la Vegetacion de Tres Bosques de *Polylepis sericea* WEED Ubicados en la Sierra Nevada de Mérida**. Trabajo especial de grado para optar por el título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Mabry, T.; Markham, K.; Thomas, M. (1970). **The Systematic Identificacion of Flavonoids**. Springer-Verlag New York Inc. DOI: 10.1007/978-3-642-88458-0.
- Madriñán, S.; Cortés, A.; Richardson, J. (2013). Paramo is the world's fastest evolving and coolest biodiversity hotspot. **Front. Genet.** DOI: 10.3389/fgene.2013.00192.
- McDonald, M.; Mila, I. y Scalbert, A. (1996). Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation **J. Agric. Food Chem.**, **44**: 599-606.
- Monasterio, M. (1980a). Los páramos andinos como región natural. Características biogeográficas generales y afinidad con otras regiones andinas. En: Monasterio, M. (Ed): **Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos**. Editorial de la Universidad de Los Andes. Mérida, pp. 15-27
- Monasterio, M. (1980b). Las formaciones vegetales de los páramos de Venezuela. En: Monasterio, M. (Ed). **Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos**. Editorial de la Universidad de Los Andes, Mérida, pp. 93-158.
- Mouradov, A.; Spangenberg, G. (2014). Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. **Front. Plant Science**, **5** (620): 3. DOI: 10.3389/fpls.2014.00620.
- Neto, C.; Vaisberg, A.; Zhou, B.; Kingston, D.; Hammond, G. (2000). Cytotoxic Triterpene Acids from the Peruvian Medicinal Plant *Polylepis racemosa*. **Planta Medica** **66**: 483 – 484. ISSN: 0032-0943.
- Rada, F.; Goldstein, G.; Azocar, A. y Meinzer, F. (1985). "Daily and seasonal osmotic changes in a tropical treeline species". **J. Exp. Botany** **36**(167): 989-1000.
- Rada, F.; García-Núñez, C.; Rangel, S. (2011). "Microclimate and regeneration patterns of *Polylepis sericea* in a treeline forest of the Venezuelan Andes". **Ecotrópicos**, **24** (1):113-122. ISSN 1012-1692.
- Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, **1112**: 31–63. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.019
- Sarkar, S. K., & Howarth, R. E. (1976). Specificity of the vanillin test for flavanols. **J. Agric. Food C**, **24**(2): 317–320. doi:10.1021/jf60204a041
- Simpson, B. (1979). A Revision of the Genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). **Smithsonian Contributions to Botany**, **43**: 1-62. Smithsonian Institutions Press, Washington D.C.
- Simpson, M. (2006). **Plant Systematics**. Elsevier Academic Press, Canada. ISBN:0-12-644460-9.pp. 275, 278.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2006). **Plant Physiology**. 4^a ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. ISBN 0-87893-856-7.

Tattini, M.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Massai, R.; Remorini, D.; Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, **163**: 547-561. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x.

Vélez, V.; Cavelier, J.; Devia, B. (1998). Ecological traits of the tropical treeline species *Polylepis quadrijuga* (Rosaceae) in the Andes of Colombia. **Journal of Tropical Ecology**, **14 (06)**: 771-787. DOI: 10.1017/S026646749800056X.

Williams, R.; Spencer, J.; Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules?. En Rice-Evans, C. (Ed). Serial Reviews: Flavonoids and Isoflavonoids (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism and Bioactivity. Elsevier Inc. **Free Radical Biology & Medicine**, **36(7)**: 838-849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.

Enlaces electrónicos

Velázquez, M.; Stewart, N. (2016). **Andes Mountains: mountain system, South America**. Encyclopædia Britannica, Inc. Publicado el 09/12/2016. Visitado el 08/05/2017. Tomado del sitio web: <https://www.britannica.com/place/Andes-Mountains>

www.bdigital.ula.ve

Anexos

www.bdigital.ula.ve

Anexo 1. PERMANOVA de dos vías tomando como factor fijo la altitud y factor aleatorio la hoja anidada a la altitud. Alfa: 0,05. Los valores en rojo indican los parámetros anatómicos donde las medias entre localidades presentaron diferencias significativas. Se aplicó un número de 9999 permutaciones.

Medida anatómica	Pseudo-F	P(perm)	Permutaciones Únicas
Grosor de la cutícula	2,0437	0,1547	9955
Largo de las células de la epidermis adaxial	5,607	0,0094	9955
Ancho de las células de la epidermis adaxial	1,3346	0,2998	9950
Largo de las células de la hipodermis	0,24968	0,8718	9960
Ancho de las células de la hipodermis	1,0636	0,3953	9954
Largo de las células del parénquima en empalizada	0,97745	0,4521	9952
Ancho de las células del parénquima en empalizada	2,5444	0,0978	9942

www.bdigital.ula.ve

Anexo 2. Prueba a pares del largo de las células de la epidermis adaxial tomando como factor fijo la altitud y factor aleatorio la hoja anidada a la altitud Alfa: 0,05. Los valores en rojo indican los parámetros anatómicos donde las medias entre localidades presentaron diferencias significativas. Se aplicó un número de 9999 permutaciones y un ajuste del p con Montecarlo (P(MC)).

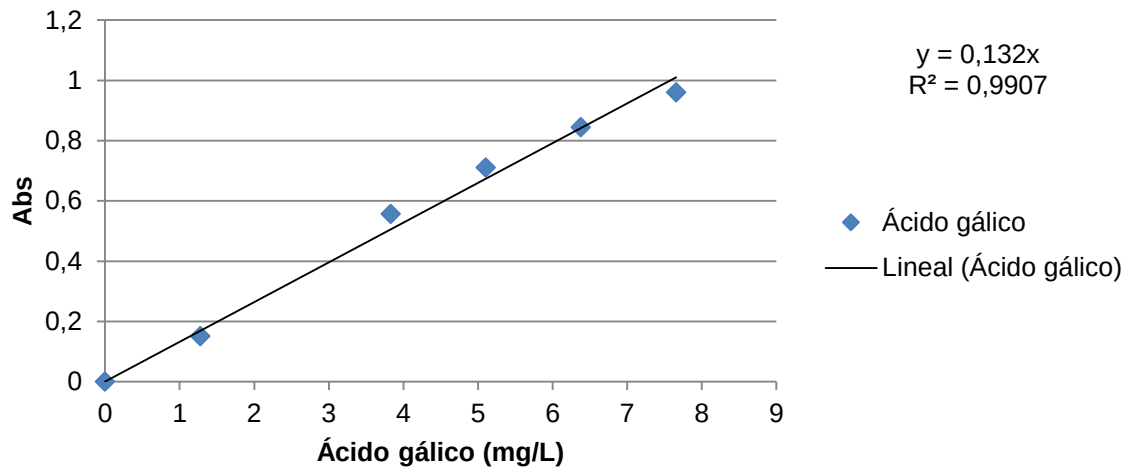
Localidad	t	P(perm)	Permutaciones Únicas	P(MC)
La Fría: Los Antejos	0,66921	0,5414	126	0,5325
La Fría: Loma Redonda	3,1152	0,0317	126	0,016
La Fría: Alto de La Cruz	2,95E-02	0,9592	126	0,977
Los Antejos: Loma Redonda	3,7643	0,0064	126	0,0053
Los Antejos: Alto de La Cruz	0,93741	0,3873	126	0,3808
Loma Redonda: Alto de La Cruz	4,2646	0,009	126	0,003

www.bdigital.ula.ve

Anexo 3. Picos de absorancias (λ_{MAX}) de algunos flavonoides representativos de las principales subclases. Los (sh) indican cambios en el pico de absorancia. Datos tomado de Rijke *et al.* (2006).

Flavonoid	λ_{max}
Flavones	
5-Hydroxyflavone	272, 337
Apigenin	268, 337
Luteolin	253, 347
3-Methylquercetin	255, 355
Flavonols	
Fisetin	253, 370
Morin	263, 380
Quercetin	250, 370
Isoquercitrin	258, 360
Myricetin	255, 378
Isoflavones	
Genistein	260, 328 (sh)
Biochanin A	261, 326 (sh)
Daidzein	250, 302 (sh)
Formononetin	249, 302
Flavanones	
Naringin	284, 330 (sh)
Naringenin	288, 325 (sh)
Hesperetin	289, 330 (sh)
Flavan-3-ols	
3'-Hydroxy-5,7,4'-trimethoxy-flavan-3-ol	225, 290
Flavan-3-ol	279
Epicatechin Catechin	280
Flavanonols	
Taxifolin	218, 230, 290 (sh)
Taxifolin pentoside	293, 342
Taxifolin deoxyhexose	295, 340

Anexo 4. Curva de calibración de contenido de fenoles



www.bdigital.ula.ve