



**Efecto de la radiación UV-B en la composición
química y actividad antioxidante de extractos de
orégano (*Origanum vulgare* L.)**

Danilo Manrique Altamar

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería

Pregrado en Química
Bogotá D.C., Colombia

2017

**Efecto de la radiación UV-B en la composición
química y actividad antioxidante de extractos de
orégano (*Origanum vulgare* L.)**

Danilo Manrique Altamar

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Químico

Director:

Ingeniero Agrónomo, Msc. Ingeniería Agrícola Rafael Andrés Ramírez

Codirectora

Ingeniero Agrícola, Msc. Ingeniería Civil, Doc.rer.hort - Claudia Patricia Pérez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería
Pregrado en Química
Bogotá D.C., Colombia
2017

Dedicatoria

*A Dios, por darme la fortaleza, el conocimiento,
la dedicación y la sabiduría necesaria para
afrontar cada etapa en la culminación de esta
investigación y cada paso que doy en la vida.*

*A mis padres y hermanita, no habría sido esto
posible sin ellos, porque han sido un
apoyo incondicional, constante y con
enseñanzas que a diario me ayudan a ser
mejor persona y profesional.*

A, Camila, por su absoluta paciencia, apoyo y amor.

*“El éxito no es un accidente, es trabajo duro, perseverancia,
aprendizaje, estudio, sacrificio y lo más importante de todo,
amor por lo que estás haciendo o aprendiendo a hacer”.*

Pelé

Agradecimientos

Esta investigación contó con la dirección y apoyo del profesor Rafael Andrés Ramírez asociado a la Universidad Nacional abierta y a Distancia UNAD, quien durante el desarrollo de la tesis aportó información relevante y referente para la estructuración académica del documento.

De igual forma, a la profesora Claudia Patricia Pérez Rodríguez asociada a la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, quien aportó y apoyo los espacios de laboratorios de la facultad de ingeniería, para de esta forma llevar a cabo la fase experimental.

Al profesor Camilo Mahecha asociado a la universidad de ciencias aplicadas y ambientales UDCA, por facilitar la realización de los análisis cromatográficos.

A la profesora Martha Nancy Ozuna asociada a la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, por su acompañamiento, paciencia y orientación de crecimiento académico y personal.

Al profesor Yamid Ortiz, por sus invaluable aportes al desarrollo y construcción del trabajo, de igual forma por su enseñanza y paciencia.

A mi colega y amiga Cindy Olarte por su apoyo y colaboración en cada una de las etapas vividas en la construcción de esta investigación.

A todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron y participaron en la construcción y desarrollo de esta investigación.

Resumen

Los aceites esenciales (AOE) de *Origanum vulgare* L. presentan alta actividad antioxidante producto de concentración en ácidos fenólicos, flavonoides y mayor concentración de terpenos. Los metabolitos secundarios son fundamentales en el estudio de los productos naturales, pues a estos compuestos se asocian diversas capacidades como antioxidante, antimicrobiana, antimicótica, entre otras características con gran aplicación a nivel industrial, experimental y terapéutico.

La radiación emitida por el sol es conocida como ultravioleta, la cual está dividida en tres tipos, UV-A, UV-B, UV-C, la longitud de onda de cada una de ellas es 320nm a 400 nm, 280 a 320nm, 200 a 280nm, respectivamente. Entre más corta es su longitud de onda más intensa es la energía que emite. La radiación tiene incidencia en distintos procesos bioquímicos, metabólicos y morfológicos. Uno de los procesos con mayor interés, es el del metabolismo secundario, en cual se encuentran los precursores para la síntesis de metabolitos secundarios.

Para estudiar el comportamiento de dichos metabolitos secundarios frente a la radiación UV-B, aplicamos una dosis de $0,075 \text{ W.h.m}^{-2}$, a tallos y hojas jóvenes de orégano, provenientes de la sabana de Bogotá. Las muestras se dividieron en un diseño factorial 2^2 , con dos tratamientos, dos tiempos de adaptación de 24 y 48 horas y, dos métodos conocidos como el radical DPPH y ABTS para la evaluación de capacidad antioxidante.

Para la extracción del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. se empleó el método de hidrodestilación modificado conocido como cohobación. Este método nos permitió obtener ácidos grasos saturados e insaturados. Para llevar a cabo el estudio de la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles de los AEO de *Origanum vulgare* L. Se evaluó la actividad antioxidante por medio del método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ensayo (ácido 2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)(ABTS), adicionalmente se determina la cantidad de fenoles totales por medio del método Folin-Ciocalteu.

Los mejores resultados reportados para fenoles totales y actividad antioxidante se lograron con las muestras control con 48 horas de adaptación y en las muestras tratadas con radiación UV-B en tiempos de adaptación de 48 horas 0,404% en método DPPH y ABTS 0,0085%.

Palabras claves: Elicitores, aromáticas, metabolitos secundarios, fenoles,

flavonoides, extractos.

Abstract

The essential oils of *Origanum vulgare* L. present high antioxidant activity due to the concentration of the phenolic acids, flavonoids and major concentration of terpenes. The secondary metabolism are fundamental in the study of the natural products, as these compounds are associated with diverse capacities such as antioxidant, antimicrobial, antimitotic, among other characteristics with great application at the industrial, experimental or therapeutic levels.

The solar radiation is known as ultraviolet, which is split into three types, UV-A, UV-B, UV-C, the length of the wave of each of these is 320nm to 400nm, 280nm to 320nm, and 200nm to 280nm, respectively. The shorter the length of the wave, the energy emitted is more intense. The radiation has an incident in different biochemical, metabolically and morphological processes. One of the processes with high interest is the secondary metabolism, in which we find the precursors for the synthesis of the secondary metabolic.

To study the behavior of these secondary metabolic against the UV-B radiation, we apply a dosage of 0.075 W.h.m^{-2} , to young oregano stems and leaves, coming from Bogota's savanna. The samples were divided in a factorial design 2^2 , with two treatments, two adaptation times of 24 and 48 hours and, two methods for the evaluation of the antioxidant capacity.

For the extraction of the essential oil of *Origanum vulgare* L. a method of hydro-distillation method was used and modified as cohobating. This method lets us obtain fatty acids saturated and unsaturated, in which the tests of the total phenols and antioxidant activity were performed. To perform the study of the antioxidant capacity and the phenol content of the essential oils of *Origanum vulgare* L. The antioxidant activity was evaluated by the method of discoloration of the 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), test (acid2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazolina)-6-sulfonic) (ABTS), additionally it is determined the total phenol quantity through the Folin-Ciocalteu method.

The best results reported for total phenols and antioxidant activity were achieved with control samples with 48 hours of adaptation and sample treated with UV-B radiation at 48 hours adaptation times 0,404% in method DPPH y ABTS 0,0085%).

Key words: Elicitors, Aromatic, secondary metabolic, phenols, flavonoids, extracts.

Contenido

Resumen.....	8
Índice de tablas	15
Índice de figuras.....	17
Lista de abreviaturas.....	20
Justificación.....	21
1. Estado del arte.....	26
1.1. Origen y botánica del orégano	26
1.2. Actividad biológica de los componentes de orégano	28
1.3. Características de la especie <i>Origanum vulgare</i> L.....	29
1.4. Extractos de orégano y su composición química	29
1.4.1. Timol.....	31
1.4.2. Carvacrol	33
1.5. Extracción de aceites esenciales	35
1.5.1. Hidrodestilación – cohobación.....	35
1.6. Evaluación y análisis de la actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los aceites esenciales.....	38
1.6.1. DPPH (Ensayo actividad antiradicalaria).....	39
1.6.2. Cation-radical ABTS+-.....	40
1.6.3. Contenido total de fenoles (Folin Ciocalteu).....	41
1.7. Radiación ultravioleta.....	42
1.7.1. Radiación UV-B.....	43
1.8. Efecto de la radiación UV-B en procesos bioquímicos.....	44
1.9. Efectos de la radiación UV-B sobre la morfología y anatomía de las plantas	46
1.10. Radiación UV-B sobre procesos fotoquímicos y metabólicos.....	47
1.11. Metabolismo secundario	47
1.11.1. Biosíntesis del ácido shikímico	50

1.11.2. Biosíntesis de fenilalanina y tirosina (Aminoácidos aromáticos).....	51
1.12. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa en el análisis de la composición química del <i>Origanum vulgare</i> L.....	54
1.12.1. Descripción de la técnica.....	55
1.12.2. Técnica cromatográfica en aceites esenciales.....	55
1.12.3. Tiempos de retención en cromatografía de gases.....	57
1.12.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	58
1.12.5. Espectrometría de masas.....	59
2. Objetivos.....	61
2.1. Objetivos Generales.....	61
2.2. Objetivos Específicos.....	61
3. Metodología.....	62
3.1. Material Vegetal.....	62
3.1.2. Extracción por hidrodestilación.....	63
3.2. Análisis de la composición química de los extractos.....	64
3.2.1. Preparación de las muestras para la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	64
3.3. Evaluación de la actividad antioxidante en los extractos de <i>Origanum vulgare</i> L.	64
3.3.1. Ensayo actividad antiradicalaria DPPH.....	65
3.3.2. Ensayo producción de radicales libres ABTS+.....	65
3.3.3. Contenido total de fenoles.....	66
3.4. Tratamiento del material vegetal con radiación UV-B.....	66
3.5. Análisis estadístico.....	69
4. Resultados y discusión.....	71
4.1. Rendimiento de los extractos obtenidos por hidrodestilación.....	71
4.2. Evaluación de actividad antioxidante y contenido total de fenoles.....	74
4.2.1. Ensayo actividad antiradicalaria DPPH.....	74
4.2.2. Ensayo actividad antiradicalaria ABTS+.....	78
4.2.3. Contenido total de fenoles.....	81

4.3. Análisis de extractos de <i>Origanum vulgare</i> L. utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	86
5. Conclusiones y recomendaciones	93
6. Referencias bibliográficas.....	96
Anexos	107

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de las especies <i>Origanum vulgare</i> L.Fuente, (Tropicos.org, y Vásquez, 2012).....	27
Tabla 2 Actividades Biologicas del Orégano.Fuente, (Arcila-Lozano, 2004).	28
Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas del Timol.Fuente, (Dozal, 2012)	32
Tabla 4 Propiedades fisicoquimicas del carvacrolFuente, (Dozal, 2012).....	33
Tabla 5 Proceso fotosintetico en precencia y ausencia de luz. Fuente: (Piña,2013).....	47
Tabla 6 Ruta de biosíntesis para algunos compuestos fenólicos presentes en plantas. Fuente, (Ramírez, 2016).....	49
Tabla 7 Ventajas de la espectrometrica de masa.	59
Tabla 8 Deseño experimental y tratamientos empleados al material vegetal fresco.	69
Tabla 9 Deseño experimental y tratamientos empleados al material vegetal para evaluar el contenido total de fenoles.	70
Tabla 10 Deseño experimental y tratamientos empleados al material vegetal para la evaluación de actividad antioxidante.	70
Tabla 11 Rendimientos de los extractos obtenidos con relación al tiempo de adaptación y tratamientos realizados.	72
Tabla 12 Resultados [ara determinación de rendimiento de extracción de los extractos, medida en él % de capacidad antioxidante.....	72
Tabla 13 Actividad antioxidante controles y tratamientos ensayo ABTS	79
Tabla 14 Contenido total de fenoles en extractos control y tratamientos.	82
Tabla 15 Correlación entre contenido total de fenoles y actividad antioxidante en los extractos obtenidos de <i>Origanum vulgare</i> L. por hidrodestilación y con relación a controles y tratamiento con radiación UV-B.....	84
Tabla 16 Resultados de medición de actividad antioxidante de los extractos, medida en él % de capacidad antioxidante.....	81
Tabla 17 Correlación entre contenido total de fenoles y actividad antioxidante en los extractos obtenidos de <i>Origanum Vulgare</i> L. por hidrodestilación y tratado con radiación UV-B	85
Tabla 18 Resultados de medición contenido total de polifenoles de los extractos, medida en él % de capacidad antioxidante.....	83
Tabla 19 Cantidad relativa (%) de los principales quimiotipos (>0,1%) de extractos de <i>Origanum vulgare</i> L. obtenidos por hidrodestilación – cohobación...	87

Tabla 20 Cantidad relativa (%) de los principales quimiotipos (>0,1%) de extractos de <i>Origanum vulgare</i> L. obtenidos por hidrodestilación – cohobación y tratados con radiación UV-B.....	89
Tabla 21 Comparación de porcentaje de principales compuestos identificados control vs tratamiento.....	86
Tabla 22 Comparación entre el valor de la cantidad relativa presente en la muestra control vs la cantidad relativa presente en la muestra tratada con UV-B.....	86

Índice de figuras

Figura 1: Compuestos presentes en los aceites esenciales de orégano (AEO). Adaptado de: Arcila – Lozano, 2004.....	31
Figura 2: Estructura química del timol. Fuente Adaptado de: Dozal, 2010.....	32
Figura 3: Reacción química de síntesis de Timol. Adaptado de: Van der Merwe, 2014.....	32
Figura 4: Estructura química del Carvacrol. Adaptado de: Garcia <i>et al</i> 2008.....	33
Figura 5: Componentes no volátiles (flavonoides) del orégano. Adaptado de: Arcila <i>et al.</i> , 2004.....	35
Figura 6: Equipo de extracción por hidrodestilación – destilación simple. Adaptado de: Zitlalpopoca, 2008.....	37
Figura 7: Equipo de hidrodestilación modificado a cohobación para el proceso de extracción. Adaptado de: Linares, 2008.....	37
Figura 8: Mecanismo de reacción transferencia de electrones del compuesto polifenólico (A) sobre el radical DPPH. Adaptado: Teixeira <i>et al.</i> , 2013.....	40
Figura 9: Mecanismo de reacción del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante. Fuente: Zuleta <i>et al.</i> , 2009.....	41
Figura 10: Reacción del método Folin – Ciocalteu. Fuente: Muñoz <i>et al.</i> , 2007.....	42
Figura 11: Espectro electromagnético emitido por el sol, se observa la longitud de onda de la radiación ultravioleta. Fuente: García, 2016.....	43
Figura 12: Estructura química del Fenol. Adaptado :García <i>et al.</i> , 2015.....	50
Figura 13: Ruta biosintética de la obtención del ácido Shikímico a partir de fosfoenolpiruvico (PEP) y la Eritrosa 4-fosfato (E4P). Fuente, (Arango, 2010).....	51
Figura 14: Biosíntesis de fenilalanina y tirosina. Fuente, Arango (2010).....	52
Figura 15: Ruta biosintética para la obtención de fenoles simple y complejos a partir de la fenilalanina (Ruta del ácido Shikímico). Fuente, (Arango, 2010).....	52
Figura 16: Estructura química del isopreno unidad mínima de los terpenos. Adaptado de: Elena Ceaușescu 1984.....	53
Figura 17: Síntesis de terpenos y clasificación de acuerdo a las unidades de isopreno que contenga. Fuente, (García <i>et al.</i> , 2009).....	53
Figura 18: Muestra vegetal de material fresco <i>Origanum vulgare</i> L. Fuente: Autor.....	60
Figura 19: Equipo de hidrodestilación del Laboratorio de Poscosecha, Universidad Nacional de Colombia. (a) Equipo de hidrodestilación (b) Clevenger modificado. Fuente: Autor.....	64
Figura 20: Registro de la radiación UV-B aplicada mediante sonda adaptada a radiómetro DELTHA OHM HD 2102.2. Fuente Autor.....	65
Figura 21: Material vegetal Orégano A) antes de iniciar el tratamiento y B) finalizado el tratamiento con radiación. Fuente: Autor.....	66

- Figura 22:** Curva de emisión de radiación UV-B registrada por el software DeltaLog9, mediante una sonda LP 471 UV-B y radiómetro DELTHA OHM HD 2102.2. Fuente: Autor.....67
- Figura 23:** Rendimiento de extracción en los extractos obtenidos por hidrodestilación – cohobación modificada, tratados y control por medio del ensayo DPP. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).....69
- Figura 24:** (A) Montaje de hidrodestilación – cohobación modificada. (B) Extracto obtenido sistema clevenger.....70
- Figura 25:** Diferencia significativa en los rendimiento de extracción por Hidrodestilación-Cohobación entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey.....71
- Figura 26:** Actividad antioxidante medida en los extractos obtenidos por hidrodestilación – cohobación modificada, tratados y control por medio del ensayo DPPLas letras diferentes indican significancias estadísticas ($P < 0,05$).....72
- Figura 27:** Diferencia significativa en la actividad antioxidante medida por la técnica DPPH entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey.....74
- Figura 28:** Actividad antioxidante registrada por ensayo ABTS⁺ en extractos de *Origanum vulgare* L. en tratamientos y controles. Las letras diferentes indican significancias estadísticas ($P < 0,05$).....75
- Figura 29:** No existe diferencia significativa en la actividad antioxidante medida por la técnica ABTS entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey.....77
- Figura 30:** Contenido total de fenoles de los extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L. tratados y controles.....78
- Figura 31:** Diferencia significativa de contenido total de fenoles entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey.....80
- Figura 32:** Perfil cromatográfico para controles con adaptación a 48 horas de extracto de *Origanum vulgare* L.....81
- Figura 33:** Perfil cromatográfico para tratamientos UV - B con adaptación a 48 horas de extracto de *Origanum vulgare* L.....82

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Rendimiento de la extracción.	62
Ecuación 2. Porcentaje de inhibición DPPH.....	65
Ecuación 3. Porcentaje de inhibición ABTS.....	64
Ecuación 4. Contenido total de fenoles	66

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Termino
ABTS	ácido 2, 2' - azino-bis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AEO	Aceite esencial de Orégano
AO	Aceite de Orégano
ATP	Adenosin trifosfato
CFC	Clorofluorocarbonados
CH ₄	Metano
Cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CTF	Contenido total de fenoles
Da	Dalton
EC ₅₀	Mitad de la máxima concentración efectiva
EM	Espectrometría de masas
E4P	Eritrosa 5 – Fosfato
EtOH	Etanol
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazul
eV	Electro voltio
GP	Glutation Peroxidasa
GST	Glutation s-transferasa
IE	Ionización electrónica
IR	Infrarrojo
K _D	Constante de distribución
LC 50	Concentración letal
M.S.N.M	Metros sobre el nivel del mar
mM	Mili moles
Mg	Miligramos
Mm	Miligramos

Justificación

Debido al auge que ha tenido el orégano en el mercado y por la carencia de investigaciones en radiación UV-B como tecnología poscosecha en esta planta, se decidió incursionar en el tema con el fin de vislumbrar la importancia de la capacidad antioxidante y en el efecto benéfico que tiene consumir estas sustancias, además de incursionar en la posibilidad de mejorar las características nutricionales y medicinales por medio de procesos nuevos, sostenibles, sustentables y no perjudiciales a la salud. Cuando se habla capacidad antioxidante hace referencia al proceso donde una molécula es capaz de retardar, intervenir o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor). Todos los organismos vivos donde su proceso para obtener energía es mediante oxígeno, liberan radicales libres, los cuales son nocivos para la vida celular, a menos que existan mecanismos celulares y agentes de defensa que intervengan en el proceso degenerativo, a estas defensas se las denomina antioxidantes. Los bajos niveles de estos agentes o inhibición de enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo nocivo y generan daños y muerte celular, siendo el causal de la adquisición y propagación de diferentes enfermedades.

Estos compuestos los cuales se derivan del metabolismo secundario, están valorados tanto en el sector alimenticio, farmacéutico e industrial gracias a su capacidad antioxidante, la cual es utilizada para el enriquecimiento y mejoramiento de alimentos, suplementos alimenticios y productos cosméticos, buscando una mejoría en la salud humana, de esta manera evitando que el organismo sea perjudicado por especies conocidas como reactivas de oxígeno y derivadas del proceso de oxidación, que debido a su aumento nocivo es causa del deterioro de la salud humana y así mismo su expectativa de vida debido a la vulnerabilidad de las células a distintas enfermedades. Para la planta de orégano se evaluó la tecnología de radiación UV-B poscosecha como procesos de elicitación y activación. El proceso fundamental de la tecnología es el principio de elicitación, dicho proceso promueve la activación inducida, mejorando la biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas, a las cuales les permitirá su adecuación, supervivencia y competitividad. (Namdeo, 2007, citado por Ramírez, 2016).

Cuando se habla de un elicitador, hace referencia a un tipo de sustancias o estímulos desencadenantes los cuales se emplean en concentraciones pequeñas en células vivas para mejorar los procesos de biosíntesis de

compuestos específicos, acorde a la características de cada uno de estos se clasifican como; elicitores abióticos (estos son conocidos como aquellos tratamientos o estímulos donde se implementan materiales o sustancias no biológicas, como metales y sales inorgánicas) y elicitores bióticos (para este caso se hace uso o implementación de aquellas sustancias de origen biológico, como microorganismos y biomoléculas), estos son ordenados siguiendo su origen, como exógenos (los cuales se originan al exterior de la célula) y endógenos (sustancias que se producen al interior de la celular) (Namdeo, 2007).

En poscosecha se considera la utilización de elicitores con el fin de mejorar el contenido fitoquímico el cual brinda características nutraceuticas en frutas y verduras frescas. Algunos ejemplos de elicitación son los siguientes; daño mecánico, variación en la temperatura, luz ultravioleta entre otros. El metabolismo secundario de frutas y hortalizas se ha visto intervenido por estos procesos de tal manera que han logrado aumentar la biosíntesis de productos naturales o fitoquímicos, erigiéndose como una alternativa para la industria de productos frescos buscando mejorar las propiedades benéficas productos vegetales, consiguiendo de esta manera mejores rendimientos de extracción y productos procesados saludables (Cisneros, 2003).

Las plantas han logrado adaptarse a diferentes ambientes ya que poseen la capacidad de sintetizar cantidades considerables de compuestos fenólicos (fenilpropanoides). Estos compuestos principalmente son los constituyentes de la pared celular, y existe gran variedad de compuestos fenólicos que tiene la capacidad de proteger la planta, también definir el color de la flor o contribuir en la determinación de los sabores y olores. Además de las funciones anteriormente nombradas existen otras asociadas a la supervivencia de las plantas vasculares. Se estima que el 40% del carbono orgánico presente en la biosfera se encuentra en forma de compuestos fenólicos vegetales, siendo el shikimato y Malato las rutas biosintéticas de obtención.

Introducción

En la actualidad, el comercio de las plantas aromáticas ha ido en aumento gracias al descubrimiento de sus propiedades curativas, anti-microbianas, anti-oxidantes, anti-protozoaria, anti-fúngica. Una de las empresas con mayor experiencia en la venta de plantas y extractos a nivel internacional es Ralco Nutrition, Inc. Quienes son los encargados del cultivo, destilado y distribución de aceites esenciales de plantas aromáticas. Estos aceites esenciales han abarcado un amplio mercado gracias a sus propiedades anteriormente nombradas, su utilización no es estrictamente farmacéutica o curativa, con el pasar de los días los aceites esenciales han sido utilizados en distintas terapias cosméticas y relajantes.

El incremento del cultivo y venta de plantas aromáticas ha llamado la atención de pequeños y medianos productores, interés que ha sido motivado por factores agronómicos, ecológicos, sociales y económicos, de esta manera lo expresa (Argüello *et al*, 2012) así permite ingresar a mercados con productos diferenciados (Di Fabio, 2000). Este cultivo ofrece una amplia modalidad de uso, ya sea en hierbas secas, aceites esenciales, drogas crudas o precursores para el desarrollo de esencias. Uno de los valores agregados de las plantas aromáticas, más allá de la amplia modalidad de usos, es su composición química, ya que son precursores de sustancias benéficas que son de gran interés, algunos de los compuestos de mayor estudio y demanda en estas plantas son los fenoles y terpenoides, conocidos por sus actividades antioxidantes y microbianas, cada una de ellas supeditada a las distintas clases que podemos encontrar de estos quimiotipos.

Los fenilpropanoides son una familia química numerosa y sus principales representantes son las ligninas, lignanos, suberinas, flavonoides, coumarinas, furano coumarinas y estilbenos (Anzora *et al*, 2008). Las ligninas se encuentran en ramas, troncos, semillas, etc, las cuales tienen la función de reforzar la pared celular especializadas, de esta manera permite soportar el peso en tierra y realizar el transporte de agua y minerales desde la raíz a las hojas.

Los lignanos brindan la posibilidad de defenderse de posibles patógenos así mismo poseen capacidad antioxidante en flores, semillas, frutos, tallos, cortezas, hojas y raíces. Los tejidos suberizados poseen capas de naturaleza hidrofóbicas

(alifáticas) e hidrofílicas (fenólicas) las cuales cumplen una función estructural. En la corteza, raíces y algunos tejidos peridérmicos, esas sustancias estructurales, conocidas como suberinas, cumplen la función de degenerar una barrera la cual cumplirá la función de proteger a la planta de los efectos atmosféricos y presencia de patógenos. Más de 4500 compuestos constituyen un grupo conocido como flavonoides, y entre sus subclases podemos encontrar las antocianinas y proantocianidinas lo cuales sirven como repelente de herbívoros, e isoflavonoides como molecular de señalización y sistema de defensa. Por último, las coumarinas, furanocoumarinas y estilbenos tienen la función de proteger a la célula de ataque bacteriano y patógeno, también repeler herbívoros e inhibición de germinación de semillas. (Puma, 2010)

Los antioxidantes alimentarios son compuestos que logran impedir, retrasar o inhibir las oxidaciones catalíticas y auto oxidaciones, de igual forma todos aquellos procesos que conllevan a la formación y propagación de radicales libres en alimentos y bebidas. En este momento ha el interés por aquellos aditivos naturales que cuentan con propiedades antioxidantes, y de unos años para acá han sido objeto de estudio diversas especies vegetales, consideradas como precursoras de compuestos antioxidantes, entre ellas toman relevancia las plantas aromáticas y especias (Torrenegra, 2014).

Las plantas no cuentan con un mecanismo que les permita protegerse de los rayos del sol y los tiempos de exposición a la radiación UV-B, por lo tanto, ha desarrollado mecanismos que les permite defenderse de la radiación lo cual ha suscitado un gran interés. Lo estudios científicos en los últimos iniciando el milenio se han centrado en el análisis y estudio de este fenómeno en diversas plantas silvestres, ya que brindan un valor medicinal y potencial al igual que las plantas aromáticas.

Investigaciones como las de (Pinto *et al*, 2000; Carrasco, 2009; Fina, 2017) han permitido ponernos en contexto y conocer la incidencia de la radiación en la cantidad y calidad de los productos derivados del metabolismo secundario como alcaloides, glucósidos, flavonoides, taninos y resinas, que gracias a sus características aportan sustancialmente en el perfil químico de compuestos volátiles en diversas plantas (Dolzhenko *et al.*, 2010 citado por Ramírez, 2016).

Hay evidencia que la radiación UV-B es causal de estrés oxidativo nocivo, debido a la acumulación de radicales libres de especies conocidas súper oxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP) e isoformas de la peroxidasa. A

causa del estrés oxidativo generado se evidencia la obtención de flavonoides como mecanismo de defensa, buscando que los rayos UV-B no penetren por completo, por otro lado, gracias a su capacidad para eliminar radicales libres logran disminuir el daño (Rodríguez *et al.*, 2006). El aumento de la radiación UV-B sobre la superficie terrestre genera un riesgo, el cual ha sido relacionado con la disminución de ozono en la estratosfera debido a la contaminación generada por las actividades antropogénicas como explotación minera, perforación petrolera, empresas de producción, entre otros, especies químicas de efecto invernadero como lo son NO_x (Óxidos de nitrógeno), SO_x (Óxidos de azufre), CH₄ (Metano) y clorofluoro carbonados (CFC) este tipo de compuestos degrada las proteínas, el ADN, los lípidos y las membranas celulares (Hollósy, 2002 citado por Ramirez, 2016).

Esta investigación tiene como objetivo llevar a cabo una profundización sobre las aplicaciones del AEO (*Origanum vulgare* L.) teniendo como precursor el conocimiento de su composición, con el fin de generar nuevos conceptos, ampliar y diversificar la aplicación de estos. Además de esto buscar tecnologías alternativas que pueden ser utilizadas en el cultivo de plantas ricas en metabolitos secundarios con potencial uso como productos naturales, con el fin de mejorar su composición nutricional, sin necesidad de llevar a cabo una modificación genética. Por ende, se desea aplicar dosis moderadas de radiación UV-B como tecnología alternativa durante la poscosecha del orégano.

1.Estado del arte

1.1.Origen y botánica del orégano

El orégano, es una planta aromática perteneciente a la familia Verbenaceae, esta familia cuenta con más de 60 especies. Estas plantas son utilizadas como especia y condimento. El género *Origanum* al cual pertenece, se divide en dos grandes grupos: orégano mediterráneo (conocido como europeo) y orégano mexicano. El género proveniente de Europa se deriva de las especies *Origanum vulgare subs. Hirtum* (orégano griego) y *O. vulgare subs. Gracite* (orégano turco). En cuanto al orégano mexicano podemos encontrar dos sub especies principales las cuales son *lippia palmeri* y *Lippia graveolens*. (Vásquez, 2012)

Según (Kintzios, 2002) en Colombia podemos encontrar de manera silvestre el orégano de monte cuyo nombre científico corresponde a *Lippia origanoides*, esta especie es proveniente de la región neotropical, debido a las características que posee estas indican que es especie-específica con *Lippia suaveolens*, la cual crece desde el sur de Estados Unidos hasta Guatemala.

Las especies de orégano también poseen propiedades medicinales, gracias a su compleja composición química, además de ser considerada como condimento y especia con fines culinarios. Tal como lo nombra los autores Vásquez (2012) y Miranda, (2008), de las hojas y los tallos del orégano se puede obtener aceite esencial, las cuales son utilizados con fines tónicos, posee un principio amargo, el aceite esencial tiene como componentes principal, carvacrol y timol, α -pineno, p -cimeno, terpenos principalmente, con un alto contenido de monoterpenos oxigenados aproximadamente (66%), también carvacrol y timol, (38,6%) (18,5%) respectivamente.

Además de sus propiedades anteriormente mencionadas, es importante resaltar otros compuestos de vital importancia como los son los glucósidos, fenilpropanoides, naftoquinonas y flavonoides, metabolitos secundarios no volátiles que han sido también reportados en *Origanum Vulgare L.*, que

aportan propiedades tónicas: amargo-excitante, antisépticas, expectorantes, diuréticas y sudoríficas (Kintzios, 2002).

También hay que resaltar su aplicación en la fabricación de cosméticos, fármacos y licores; por tal motivo es un producto en gran demanda mundial. Adicionalmente, el uso de extractos vegetales y sus compuestos activos, 80% de la población mundial hacen uso de estos, datos reportados por organización mundial de la salud, la utilización de estos extractos principalmente está enfocado con fines terapéuticos y cuidados a la salud (Arcila *et al.*, 2004).

Los criterios morfológicos se pueden observar según (Arcila *et al.*, 2004) reporta que el género *Origanum* ha sido clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos. Para esta clasificación se ha tenido en cuenta los usos para lo que regularmente son empleados. Con fines culinarios encontramos los siguientes cuatro: el griego (*Origanum vulgare* spp. *Hirtum* (Link) *letsvaart*), español (*Coridohymus capitatus*(L.) *Hoffmanns* y *Link*), turco (*Origanum onites* L.) y mexicano (*Lippia graveolens* Kunth). Tanto los factores climáticos como la altitud, estado de crecimiento y época de cosecha, inciden directamente en la cantidad, composición y calidad de los metabolitos secundarios presentes en estas plantas.

Tabla 1 Clasificación taxonómica de las especies *Origanum vulgare* L. Fuente, (Tropicos.org, y Vásquez, 2012).

Dominio	<u>Eukaryota</u> Whittaker & Margulis 1978 – eukaryotes
Reino	<u>Plantae</u> Haeckel, 1866 – plantas
Subreino	<u>Viridaeplantae</u> Cavelier-Smith 1981- plantas verdes
Phylum	<u>Tracheophyta</u> Sinnot, 1935 ex Cavalier – Smith, 1998 – plantas Vasculares
Subphylum	<u>Spermatophytina</u> (auct.) Cavalier – Smith, 1988 – plantas de semilla
Infraphylum	<u>Angiospermae</u> auct
Clase	<u>Equisetum</u> L – Agardh, 1825-Equisetaceae
Subclase	<u>Lamiidae</u> Takhajan ex Reveal, 1992
Superorden	<u>Lamianae</u> Takhajan, 1967
Orden	<u>Lamiales</u> Bromhead, 1838
Familia	<u>Labiata</u> Jaume Saint – Hilaire, 1805, nom. Cons
Tribu	<u>Lantaneae</u> Vásquez, 2012
Genero	<u>Vulgare</u> Linnaeus, 1753.Lippia
Epiteto específico	<u>Origanoides</u> Kunth
Nombre botanico	<u>Origanum vulgare</u> L. H.B. & K

Se ha identificado que el orégano, tiene una composición alta en terpenos, los cuales son también responsables de su capacidad antioxidante, según (Acevedo, Navarro y Monroy, 2013). Una cuantificación por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se identificó que el quimiotipo o compuesto mayoritario es el timol con un 67,51% seguido por el *p*-cimeno y *y*-terpineno con 11,66% y 5.51% respectivamente, además de otros metabolitos secundarios en porcentajes menores (Acevedo, Navarro y Monroy, 2013).

1.2. Actividad biológica de los componentes de orégano

Las utilidades de los componentes del aceite esencial de orégano son diversas, pero una de las que mayor fuerza ha tomado principalmente en el género *Origanum* es la capacidad antioxidante. Diversos alimentos que poseen compuestos con dicha característica han suscitado un gran interés, debido a que su papel en la dieta tiene un efecto benéfico en la prevención de enfermedades. Los compuestos antioxidantes tienen gran importancia ya que tienen la posibilidad de brindar protección a las células contra el daño oxidativo debido a las especies reactivas de oxígeno, el cual es causal de envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, entre las cuales podemos encontrar el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes. Carotenoides, tocoferoles, compuestos fenólicos y vitamina C son conocidos por su capacidad antioxidante y se obtienen de manera exógena a través de la dieta (Arcila-Lozano, 2004).

Tabla 2 Actividades Biologicas del Orégano. Fuente, (Arcila-Lozano, 2004).

Genero	Actividad
<i>Origanum vulgare</i> L	Antioxidante
	Antimicrobiana
	Antiparasitica
	Estrogenica
	Antigenotóxica
	Insecticida

1.3. Características de la especie *Origanum vulgare* L.

En Colombia las especies *Origanum vulgare* L. pueden encontrarse en los departamentos de Guajira, Magdalena, Cauca (Alto Patía), Cundinamarca, Norte de Santander y Santander. (Ruiz *et al.*, 2007). Según estudios realizados el orégano mexicano contiene cantidades aproximadas de carvacrol, timol y algunas cantidades de 1,8-cineol. Se debe tener en cuenta que a pesar que las especies de orégano contienen quimiotipos similares al igual que su composición básica, estos varían de acuerdo a las condiciones del cultivo y a su área geográfica en donde está crece.

Según Vásquez (2012), Miranda (2008) y Bedoya (2014) la especie *Origanum vulgare* L. posee las siguientes características:

1. Es un arbusto aromático, la mayoría de sus quimiotipos son los que le brindan el olor a orégano, en ocasiones puede ser cítrico y de manera excepcional inodoro.
2. Presenta un porte arbustivo con una altura máxima de 3,5m, ramas sub redondeadas, estriadas, pecíolos cortos, 1- 10 mm largo, tamaño de la hoja muy variable según los ambientes sean propicios (6 x 3,5 cm) o más secos y/o pobres (5 x 3 mm), lanceolado u ovado oblongo, crenado denticulado a lo largo del margen
3. Presenta inflorescencias axilares verticiladas, 4-6 por axila, pedúnculos 1-6 mm, generalmente más cortas que las hojas que la subtienden, cabezuelas ovado tetrágonas a prismático alargadas, 4-15 mm de largo, brácteas florales ovadas, en 4 series, imbricadas más cortas que las flores; flores en 4 series, imbricadas 4mm de largo, fragantes de pétalos unidos.
4. Los frutos son pequeñas núculas que contienen las semillas de color café, no mayores de 0,25 mm.

1.4. Extractos de orégano y su composición química

Los factores climáticos a los que se encuentra sometido el orégano determinaran la cantidad, calidad y composición de los metabolitos secundarios, condiciones como la altitud, época de cosecha y el estado de crecimiento. De esta forma el estudio de dichos factores y la influencia de estos determinan el aprovechamiento y explotación del mismo.

La especie *O. Vulgar* cuenta con carvacrol y timol como quimiotipos principales, para su biosíntesis es necesario una serie de enzimas específicas las cuales dirigen su obtención en el metabolismo secundario, tal cual como se presenta en la Figura 1. Por ejemplo, se encontró que los quimiotipos presentes en el aceite esencial del regano de tipo (*Lippia berlanderi* Schauer) son el timol y el carvacrol. Debido a la gran cantidad de especies de orégano se ha encontrado algunas variaciones de porcentajes en sus quimiotipos, como en el orégano griego (*Origanum vulgaresubsp. Hirtumv*), su contenido fenólico es de 78,27% (Carvacrol+Timol), además existe la presencia de otros componentes como lo son monoterpenos hidrocarbonados, representados por γ -terpineno y p-cimeno (5,54 y 7,35% del total del aceite, respectivamente) (Poulose y Croteau, 1978).

Los monoterpenoides, son los componentes encargados de producir las sensaciones de olor, fragancias y sabor de la mayoría de las plantas. Este tipo de componentes tanto a nivel biológico como estructural pueden ser clasificados hasta en 35 grupos. Por otro lado, está el timol y el carvacrol, compuestos fenólicos naturales, a los cuales se les atribuye una actividad antioxidante, por su estructura química y posibilidad de captar radicales libres, también son considerados agentes antifúngicos y antibacteriales, acaricidas, analgésicos, desodorantes, insecticidas entre otras las cuales tiene una presencia significativa en los aceites esenciales del género *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Lippia* (Duke, 2002).

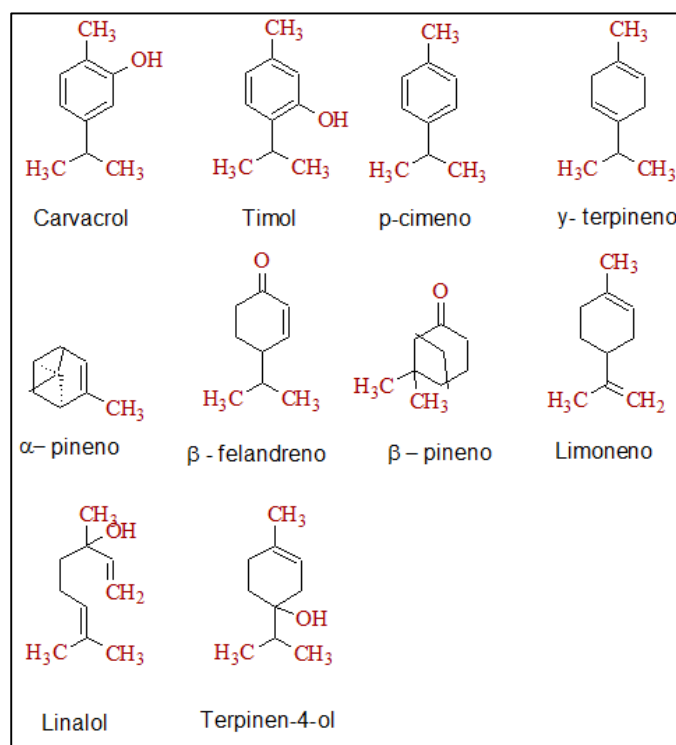


Figura 1: Compuestos presentes en los aceites esenciales de orégano (AEO). Adaptado de: Arcila – Lozano, 2004.

En la Figura 1 podemos encontrar algunos de los compuestos presentes en los AEO, se identifican fenoles y terpenos, en la primera fila encontramos los que poseen mayor concentración en los aceites esenciales de orégano como lo es el carvacrol y timol que podemos observar a continuación

1.3.1. Timol

El timol (2-isopropil-5-metilfenol, Figura 1-1), tradicionalmente es extraído de plantas como el tomillo, menta y orégano (Van der Merwe, 2014). Esta es una sustancia incolora con olor característico, no solo se encuentra en las naturales sino también puede ser sintetizada de manera industrial. Este quimiotipo pertenece al grupo de los terpenos y es un isomero del carvacrol. Así como lo aclara Dozal (2010), se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida, es utilizado en disolución al 5% en etanol (etOH) para labores de desinfección.

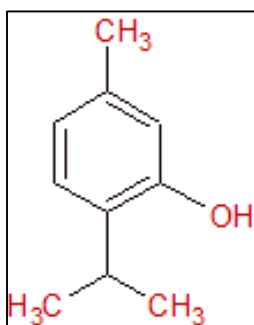


Figura 1: Estructura química del timol. Fuente Adaptado de: Dozal, 2010.

Para obtener timol se puede hacer por medio de la adición de m-Cresol a propeno utilizando isopropanol y así llevando a cabo una isopropilación.

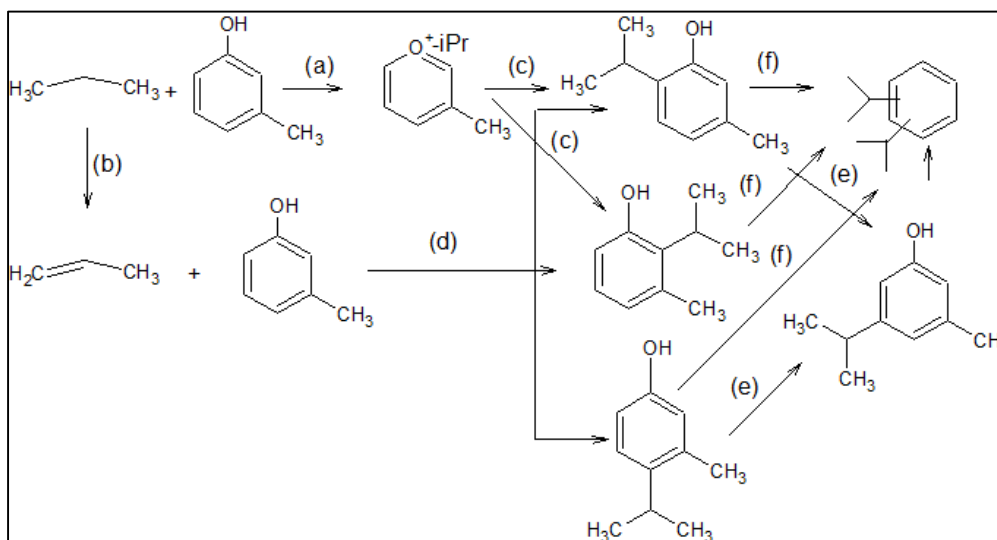


Figura 2: Reacción química de síntesis de Timol. Adaptado de: Van der Merwe, 2014.

Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas del Timol. Fuente, (Dozal, 2012)

Formula	C ₁₀ H ₁₄ O
Masa molecular	150.22 g/mol
Punto de fusión	49 – 51 °C
Punto de ebullición	232 °C
Punto de inflamación	107 °C
Presión de vapor	2.5 Pa a 25°C
Densidad de liquido	0.97 g/cm ³ (20°C) 0.93 g/cm ³ (70°C)

Solubilidad	0.98 g/L en agua a 25°C 1000g/L en tanol 1428g/L en cloroformo
Dosis Letal 50	980 mg/kg

1.3.2. Carvacrol

El carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)fenol), su estructura química se ve representada por un grupo fenológico que posee el cual presenta característica hidrofóbica."Existen agentes antimicrobianos obtenidos naturalmente,el carvacrol es uno de los que más atención ha recibido en su mecanismo de acción; es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias gram negativa." (García, 2008), el rompimiento de la pared celular permite la salida de ATP, inhibición de ATPasas , esto conlleva la disminución de fuerza motriz (Bur *et al.*, 2007). El mecanismo de acción del timol es igual al del carvacrol ya que manejan una estructura similar por ser un estereoisomero.

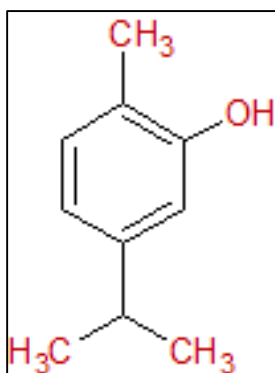


Figura 3: Estructura química del Carvacrol. Adaptado de: García *et al*/2008.

Tabla 4 Propiedades fisicoquímicas del carvacrol Fuente, (Dozal, 2012)

Formula	C ₁₀ H ₁₄ O
Masa molecular	150.22 g/mol
Punto de fusión	1 °C
Punto de ebullición	273.7 °C
Punto de inflamación	107 °C
Presión de vapor	2.5 Pa a 25°C
Densidad de liquido	0.97 g/cm ³ (20°C) 0.93 g/cm ³ (70°C)
Solubilidad	0.98 g/L en agua a 25°C

	1000 g.L ⁻¹ en tanol 1428g/L en cloroformo
Dosis letal 50	980 mg/kg

Los AEO también cuentan con compuesto volátiles llamados flavonoides, los cuales están formados por un grupo de compuestos polifenólicos los cuales se encuentran en cantidades significativas en las frutas y en los vegetales, también hacen parte de otros alimentos como lo es en la cocoa, vino rojo, café entre otros. Sus concentraciones varían, por tal motivo se pueden encontrar de manera polimerizada con pesos moleculares superiores a los 30.000 Da hasta simples moléculas (Pérez, 2003).

Poseen propiedades antioxidantes; antiinflamatorias; antitrombóticas; antimicrobianas; antialérgicas; antitumoral, antiasmáticas (Pérez, 2003).

Por otro lado, (Arcila *et al* 2004), encontramos las siguientes propiedades presentes en los diferentes tipos de orégano y sus aceites esenciales:

- Estrogénica: El orégano (*O. vulgare*) presente alta capacidad para ligar progesterona.
- Insecticida: El aceite esencial de *O. syriacum* contiene un alto nivel de carvacrol (61%), el cual cuenta con un (LC50) de 37.6 mg/L, seguido de timol (21.8) con LC50 de 36 mg/L contra larvas del mosquito *Culex pipiens*.
- Capacidad antígenotóxica: el aumento de la actividad de la enzima detoxificante glutatión S-transferasa (GST) se ve estimulada por el aceite esencial de orégano, cuando se suministra de manera oral, siendo un potencial anticarcinogénico.

El género *Lippia* posee una diferencia sobresaliente, esta radica en la composición del aceite esencial de la misma especie, pero sembrada en lugares geográficos diferentes. A pesar de que su composición química cambia en algunos casos, las condiciones de la eco-región se han mantenido constantes. (Soler *et al.*, 1986; Souto *et al.*, 1996 y 1997; Citado por Vásquez, 2012).

Los conocimientos y los reportes acerca de los quimiotipos no volátiles presentes en la especie *Origanum v* es escasa y fragmentada, las flavonas

son la especie de tipo predominante de flavonoides. A continuación, se presentan los compuestos no volátiles identificados en extractos de orégano.

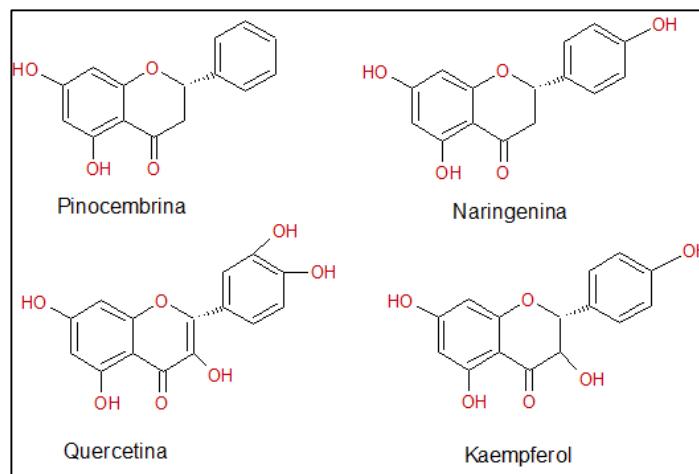


Figura 4:Componentes no volátiles (flavonoides) del orégano. Adaptado de: Arcila *et al.*, 2004.

1.5.Extracción de aceites esenciales

Para la extracción y obtención de los aceites esenciales del material vegetal se puede emplear una serie de métodos y procesos clásicos, tales como la destilación con vapor. Enflourage, maceración, hidrodifusión, extracción con disolventes, también es posible implementar procesos vanguardistas, como lo son la extracción con fluidos supercríticos, disolventes iónicos y líquidos presurizados. La obtención de los aceites esenciales por cualquiera de los métodos anteriormente nombrados en ocasiones es necesario ser refinados o implementar procesos adicionales, ya sea que se emplea una combinación de procesos adecuados, redestilación, fraccionamiento, cromatografía, tratamiento químico, cristalización, entre otros. La determinación de uno de estos procesos está ligado a la naturaleza de la materia prima y los estándares bajo los que se quiere obtener el producto (Sarker *et al.*, 2006).

1.5.1.Hidrodestilación – cohobación

La hidrodestilación es un método de extracción, donde su fundamento está basado en alcanzar el punto de ebullición el agua, la cual atraviesa los tejidos de la planta y disuelve parte del aceite esencial presente en las estructuras que lo contiene; a través de la membrana celular la solución acuosa de

difunde y el aceite es vaporizado desde la superficie. El proceso es continuo hasta lograr obtener la totalidad del aceite contenido en las glándulas de las de la planta. Los compuestos presentes en el aceite son alrededor de 100 veces más solubles en el agua hirviendo que sus hidrocarburos análogos. Debido a esto en las etapas iniciales se obtienen compuestos por su índice de solubilidad antes que por su punto de ebullición (Sarker, 2006).

Posteriormente y en cuanto la destilación avanza, los compuestos liberados se obtendrán en función de su punto de ebullición, permitiendo obtener fracciones muy ricas en compuestos químicos de las familias sesquiterpenos y análogos oxigenados (Clarke, 2008). Por otro lado el contenido de compuestos lipídicos en la planta, juega un papel importante durante la extracción mediante esta técnica, ya que presentan baja solubilidad y se podría decir que almacena una fracción de hidrocarburos volátiles presentes, demostrando su alta afinidad con (Sánchez, 2006). Para la obtención de extractos a escala laboratorio, el equipo que se emplea con mayor frecuencia es el clevenger (Günther, 1948; Cerpa, 2007), la continua utilización de este método se debe a que ha sido considerado confiable y adecuado para determinar el contenido total del aceite esencial en plantas aromáticas, todo esto basándose en estándares internacionales. El equipo clevenger posee un sistema cerrado en el cual el solvente o material extraído retornan al balón de destilación, proceso continuo que se repite hasta que es considerado que se ha obtenido el total de aceite esencial y finaliza la extracción. El retorno constante es lo que se conoce como cohobación. La efectividad de este método está ligado a la posibilidad de obtener partículas solubles en agua o en su defecto cuando su polaridad no es conocida (Félix, 2013).

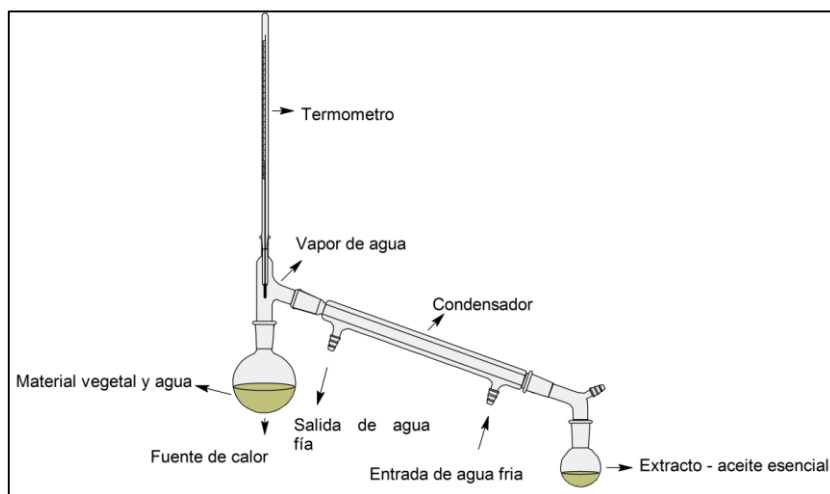


Figura5: Equipo de extracción por hidroddestilación – destilación simple. Adaptado de: Zitalpopoca, 2008.

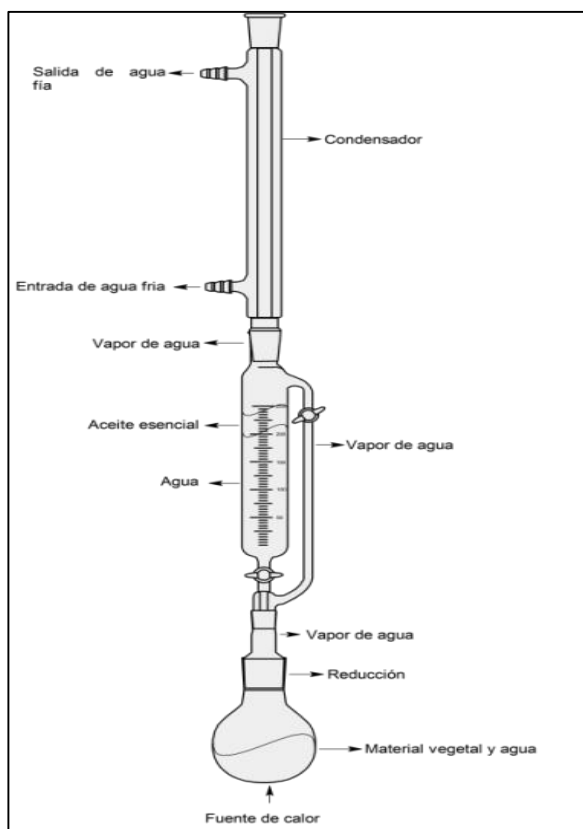


Figura 6: Equipo de hidroddestilación modificado a cohobación para el proceso de extracción. Adaptado de: Linares, 2008

1.6.Evaluación y análisis de la actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los aceites esenciales

Las sustancias antioxidantes son conocidas por la facilidad que presentan para retardar o disminuir las reacciones de oxidación que se llevan a cabo en diferentes sustratos, estos pueden provenir de fuente natural o sintética. (Montoya *et al.*, 2009). Se han reportado efectos secundarios tales como aumento de colesterol y hepatomegalia a causa de antioxidantes secundarios; esto se debe a que el aumento de antioxidantes en el organismo produce un desbalance en el equilibrio de óxido-reducción y genera daños en el funcionamiento metabólico. Cuando el nivel de antioxidantes primarios es rebasado por la concentración de radicales libres, el organismo activa un segundo nivel de protección, con el fin de atrapar los radicales restantes y evitar reacciones en cadena, se obtienen de fuentes exógenas y pueden ser de características lipolíticas e hidrolíticas.

Debido a esto, ha habido un creciente interés por parte de la industria alimenticia y farmacéutica con el fin de encontrar moléculas de origen natural que presenten gran poder antioxidante y no generen daños citotóxicos, ni genotóxicos (López *et al.*, 2008; Rojano *et al.*, 2008a, Rojano *et al.*, 2008).

Para la evaluación de actividad antioxidante se implementan diferentes técnicas ya sea *in vitro* o *in vivo*. Para el medio *in vitro* se busca la manera de medir la capacidad antioxidante total del compuesto, muestra o alimento, donde se emplea sustancias cromógenas de naturaleza radical para verificar su actividad antioxidante, donde el cambio de color será directamente proporcional a la concentración de compuesto antioxidante (Kuskoski *et al.*, 2005).

En el mercado se puede encontrar variedad de compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPO y FRAP), los cuales presentan diferentes características y afinidades, estos son utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos presente en las frutas que se encargan de captar los radicales libres generados, evitando de esta manera los efectos perjudiciales para la célula, producida por los procesos de oxidación por parte de las especies reactivas de oxígeno (EROS) (Arnouset *et al.*, 2002, Guiste *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2002).

Los métodos más empleados son ABTS y DPPH. Estos dos compuestos poseen una excelente estabilidad bajo condiciones específicas, una de las diferencias que posee el radical DPPH, es que este se obtiene de manera directa, mientras

que el ABTS es obtenido luego de una reacción química con (dióxido de magnesio, persulfato de potasio, ABAP). Por medio de la técnica ABTS se puede medir la actividad antioxidante de sustancia con naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras el DPPH solo puede disolverse en compuestos orgánicos (Kuskoski *et al.*, 2005).

En los compuestos fenólicos, se ha evidenciado su capacidad para la captación de radicales libres generados por el estrés oxidativo. Gracias a estas características de los fenoles, se les ha asociado con la prevención de enfermedades de tipo: cardiovascular, circulatorias, oncológicas y neurológicas (Ishige *et al.*, 2001, Katsube *et al.*, 2003). Para determinar la cantidad de polifenoles totales en muestra se emplea una conocida como Folin –Ciocalteu.

1.6.1.DPPH (Ensayo actividad antiradicalaria)

La técnica conocida como DPPH posee un nitrógeno orgánico, de esta forma se encuentra comercialmente disponible (Brand *et al.*, 1995). La capacidad antioxidante o efecto antioxidante se mide con relación a la pérdida del radical DPPH en las muestras que se están midiendo.

El radical DPPH es monitoreado utilizando un espectrómetro UV, lo cual permite que esta técnica sea ampliamente usada, con un máximo de absorción a 515 nm (purpura). El cambio de coloración presenta un viraje de purpura a amarillo, esto evidenciara que el DPPH se forme sobre la absorción de hidrógeno del antioxidante. La reacción efectuada de la muestra antioxidante sobre el radical DPPH es estequiométrica teniendo en cuenta el número de átomos de hidrógeno que serán absorbidos. Las unidades por medio de las cuales se expresa la actividad antioxidante presente en una muestra son μ moles de equivalentes trolox por 100g de muestra (TE/100 g). Otra manera de reportarlos es mostrando la cantidad de agente antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial del radical que para este caso el DPPH al 50%, esto se indica como el EC50 (Moon y Shibamoto, 2009).

La actividad antioxidante puede ser evaluada mediante el uso de resonancia paramagnética electrónica (RPE); esta se encarga de realizar un conteo de los radicales libres que se encuentran presentes en la mezcla de DPPH y la muestra a probar. Al pasar el tiempo de la reacción química la disminución de los radicales DPPH será correlacionada con la capacidad antioxidante de la muestra, los resultados son reportados en equivalentes de trolox (Huang *et al.*, 2005).

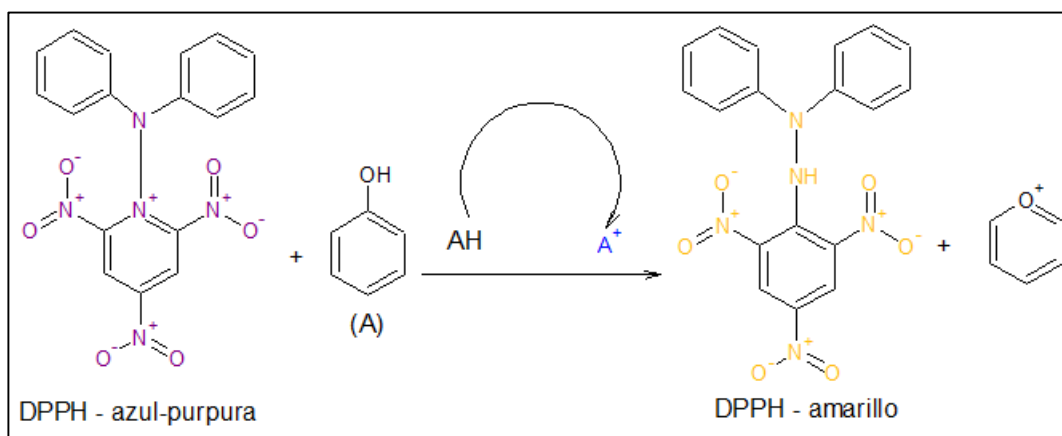


Figura 7: Mecanismo de reacción transferencia de electrones del compuesto polifenólico (A) sobre el radical DPPH. Adaptado: Teixeira *et al.*, 2013.

1.6.2. Cation-radical ABTS⁺

El compuesto ABTS⁺ es un agente oxidante y cromógeno artificial el cual presenta un espectro ultravioleta, posee tres máximos de absorbancia en 414nm, 752nm y 842 nm en medio acuoso y en medio etanólico presenta absorbancias de 414nm, 713nm y 873nm (Nenadis *et al.*, 2004; Branchi *et al.*, 2005). La concentración del agente antioxidante será el factor determinante para la reducción del catión radical y el tiempo en que lleva a cabo la reacción. Debido a que hay un viraje, el grado de decoloración del radical, será el que nos permitirá el grado de inhibición del catión radical ABTS⁺, es calculado con respecto a la concentración de trolox, el cual es usado como estándar en las mismas condiciones (Torrenegra, 2014).

Tanto el radical DPPH y ABTS⁺, cuentan con alta estabilidad con relación a las condiciones específicas de la técnica, lo que difiere entre ellos respecta a las concentraciones utilizadas del antioxidante. El catión radical nitrógeno se obtiene por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Re *et al.*, 1999; Nenadis *et al.*, 2004; Branchi *et al.*, 2005 citado por Torrenegra, 2014).

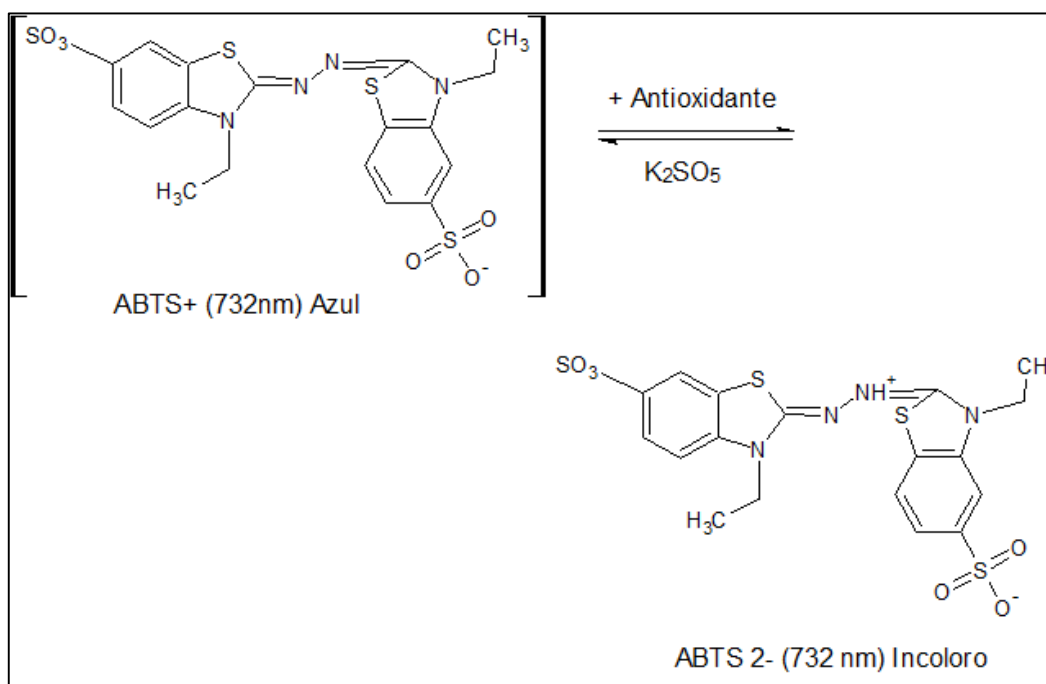


Figura 8: Mecanismo de reacción del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante. Fuente: Zuleta *et al.*, 2009.

1.6.3. Contenido total de polifenoles (Folin Ciocalteu)

Para la determinación del contenido total de fenoles (CTF) se emplea un método conocido como Folin Ciocalteu, esto sucede mediante una reacción oxidación/reducción (Vásquez, 2012). La reducción sucede en los grupos (OH) de los compuestos fenólicos (R-OH) con una mezcla de ácido fosfotungsténico (H₃PW₁₂O₄₀) y ácido fosfomolibdénico (H₃PMo₁₂O₄₀) (Prior *et al.*, 2005)

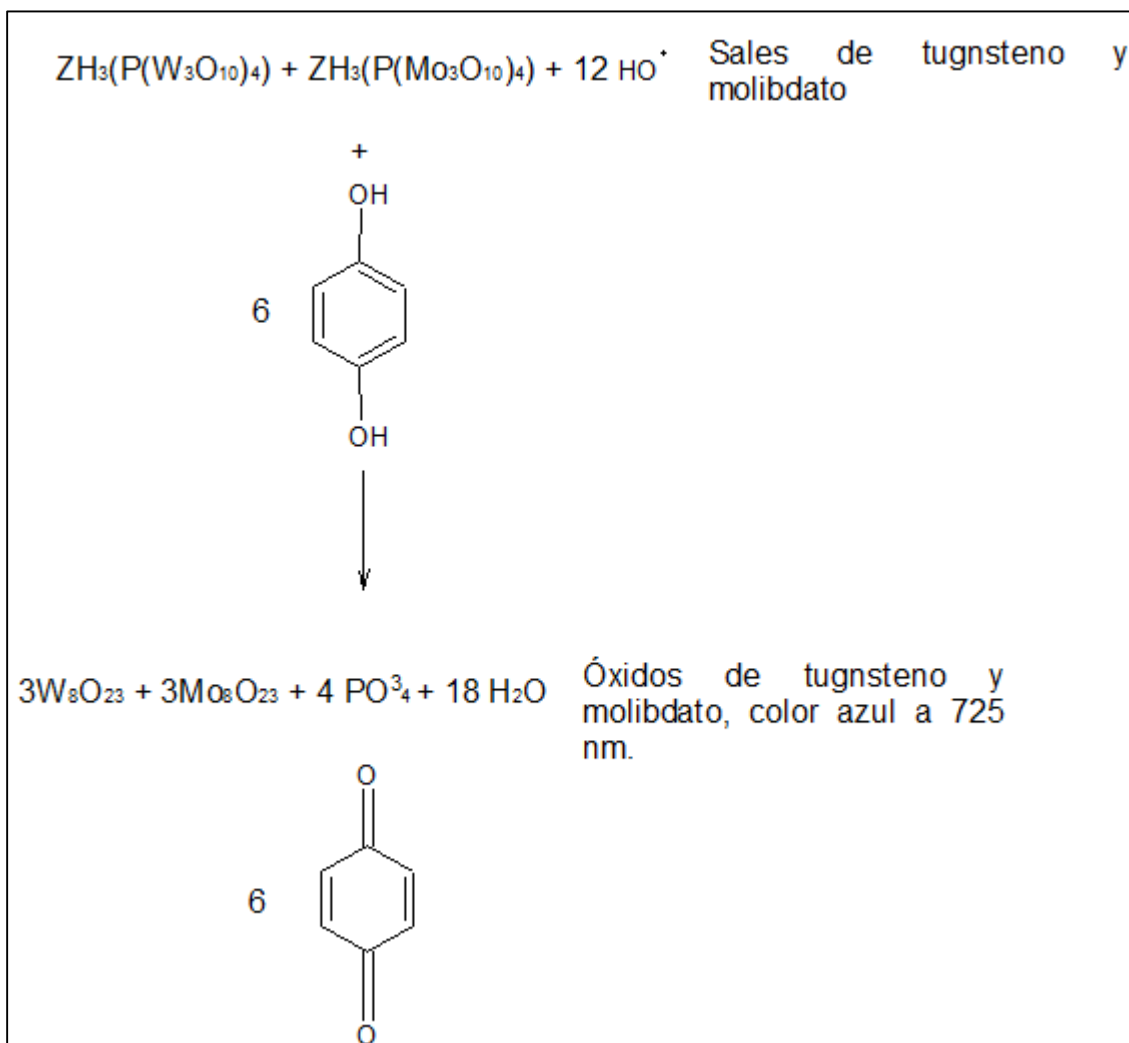


Figura 9:Reacción del método Folin – Ciocalteu.Fuente: Muñoz *et al.*,2007.

1.7.Radiación ultravioleta

Las ondas emitidas por el sol se denominan radiación ultravioleta, la entrada de estas ondas se ve interrumpida por barreras que impiden la acción de concentraciones de radiación dañinas en la biosfera. Es importante mencionar que concentraciones elevadas de radiación pueden ser perjudiciales para los ecosistemas y el desarrollo de la vida en sí. Una de las barreras que limitan el flujo de estas ondas es, el ozono (O₃), este compuesto, absorbe gran cantidad de radiación, consiguiendo que ingrese la menor cantidad de radiación ultravioleta B y C, las cuales son consideradas nocivas, las longitudes de onda de la radiación ultravioleta están

comprendidas entre 100 y 400, esto se puede apreciar en la (figura 11). La radiación y su incidencia sobre las plantas dependen de factores como lo son la nubosidad, fenómeno de reflectancia del suelo, gradiente latitudinal natural de la capa de ozono entre otros (Caldwell, 1981).

Las plantas al estar bajo la incidencia de la radiación ultravioleta presentan diversos efectos, los cuales se medían por la intensidad o dosis a la que están expuestas. Varios autores como (Greenberg *et al.*, 1996) (Hollós, 2002) (Andreasson y Wängberg, 2006)(Klem *et al.*, 2012) han realizado descripciones donde se puede observar de manera detallada el efecto de la radiación desde el punto de vista morfológico y fisiológico, y los diferentes efectos que tienen dependiendo de la edad de las hojas (Reifenrath y Müller, 2007 citado por Ramírez, 2016).

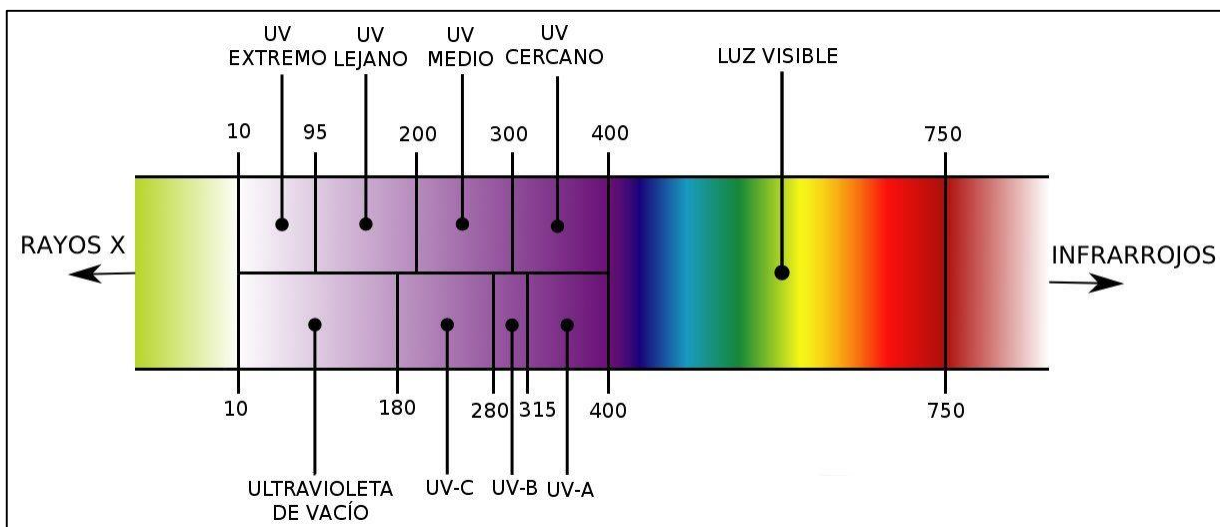


Figura 10:Espectro electromagnético emitido por el sol, se observa la longitud de onda de la radiación ultravioleta. Fuente: García, 2016

1.7.1.Radiación UV-B

Debido a la alta contaminación industrial, ha aumentado la disminución del ozono presente en la estratosfera, lo que ha generado un aumento en la radiación ultravioleta– B (UV-B) a nivel de la troposfera. (Frederick *et al.*,1989). La radiación UV-B es aquella comprendida entra las longitudes de onda 280 – 320 nm. El aumento de este tipo de radiación ha tenido mayor incidencia en la zona austral, cercana a la Antártida, así como lo explica el autor (Kirchoff *et al.*,1997) donde las pérdidas de ozono registrada entre los años 1969 y 1986 superaron el

50%. Estimaciones realizadas por (Roy *et al.*, 1990 citado por Pinto *et al.*, 2000), de ser la disminución del 1% del ozono total, la radiación aumentaría en un promedio de 2% en la radiación UV-B entrante a la superficie terrestre. Este valor puede ser considerado pequeño con relación a otras longitudes de onda, este aumento no podría tener incidencia en organismos que se encuentre en latitudes bajas o altas normalmente están adaptado a altas intensidades de radiación UV-B. Cabe resaltar que para aquellas especies que no están adaptados a intensidades medias o bajas, pueden verse afectadas en aspectos morfológicos, además de que la acción de la radiación se puede ver reflejada en ácidos nucleicos, pigmentos biomoléculas y procesos metabólicos. (Fiscus *et al.* 1995) (Jansen *et al.* 1998). Debido a que en la tierra existen diferentes intensidades de radiación, los vegetales han mostrado cierta adaptación, lo que ha suscitado un interés en el estudio de su evolución y desarrollo de hábitats.

1.8.Efecto de la radiación UV-B en procesos bioquímicos

La radiación solar es uno de los factores ambientales que afecta la vida en nuestro planeta, por medio de la radiación producida por el sol se llevan a cabo muchas de las reacciones bioquímicas y procesos foto-biológicos en los diferentes ecosistemas (fotosíntesis, fotoperiodo, fototropismo, entre otros) además de presentar una influencia en otros factores como lo es la temperatura, humedad, etc. La radiación que llega a la tierra abarca una amplia gama del espectro electromagnético el cual es alrededor del 40%, esta es la que conocemos como luz o radiación visible, se tienen valores aproximados de longitud de onda, los cuales comprenden de 400 a 700 nm. (Carrasco, 2009).

La radiación UV representa entre el 8-9 % del total de la radiación solar y hace parte de la región no ionizante del espectro electromagnético, esta se clasifica en tres rangos acorde a su longitud de onda; UV-C (200-280nm), UV-B (280-320) y UV-A (320-400nm), (Ramírez, 2016).

La radiación UV-C es altamente nociva para la salud humana, aunque el ozono presenta en la estratosfera es el encargado de absorberla por completo por otro lado es la fracción con más bajo porcentaje del total de la radiación solar. La radiación UV-B induce una serie de daños en los seres fotosintéticos y esta representa el 1,5% del total de la radiación solar. El 6,3% está representado por la UV-A presenta en la radiación solar, y es la que

presenta menos nocividad tanto para los humanos como para los cuerpos fotosintéticos. (Hollósy, 2002 citado por Ramírez, 2016).

La radiación que se encuentra entre las longitudes de onda 280 y 320 nm es conocida como UV-B. Lo que conocemos como radiación UV-C 200 y 280 nm y UV-A 320 y 400 nm componen el restante de la radiación UV. La radiación UV-A presenta poca absorción por parte del O₃, por lo que logra llegar en mayor cantidad a la superficie de la tierra y es aquella que constituye la señal fotomorfogénica en las plantas, cabe resaltar que es la menos nociva. Por otro lado, nos encontramos con la UV-V, siendo esta la más energética y nociva para el ADN, su llegada a la superficie terrestre es prácticamente limitada debido a que es absorbida por el O₃ y el O₂ presente en la estratosfera (Carrasco, 2009).

La absorción de la radiación por parte de las plantas depende de las condiciones de alta densidad, donde las más altas poseen una ventaja competitiva, porque pueden capturar más luz. Según estudios realizados se ha encontrado que el alargamiento de los tallos se ve perjudicado por la radiación UV-B. Así como los tallos la superficie foliar también presenta cambios, donde se determinará el tamaño de la superficie fotosintética, que será donde los fotones serán captados para los procesos fotosintéticos. Se conoce que la radiación ultravioleta ejerce un proceso de inhibición en la expansión de la superficie foliar, esto presenta consecuencias en el crecimiento y la acumulación de la biomasa. Al momento de comparar plantas que han tenido influencia de radiación y aquellas que no, existen diferencias notables en la expansión foliar e incremento de peso.

(Carrasco, 2009). “Si bien la radiación ultravioleta-b comprende una pequeña región del espectro electromagnético, su acción sobre plantas y animales es considerable. Esto principalmente debido a que importantes biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, por presentar electrones P los absorben fuertemente. Numerosos son los efectos atribuibles a esta radiación, la cual ha estado desde siempre presente en el ambiente. Así, las plantas desde temprano en su evolución han debido adaptarse a su presencia y desarrollar mecanismos capaces de disminuir sus efectos adversos. Por tal motivo, desde el descubrimiento del denominado “agujero” de ozono en la Antártica, el interés por estudiar los principales efectos de la radiación ultravioleta-B sobre los vegetales ha aumentado considerablemente. Estos efectos se

pueden clasificar en efectos anatómico-morfológicos, metabólicos y moleculares” (p.60)

La radiación ultravioleta UV- B incide en alguno de los procesos metabólicos de las plantas relacionados con la fotosíntesis u otros que se encuentran vinculados directamente con la actividad genética. Desde los años setenta se han llevado a cabo experimentos en los cuales se ha encontrado relacionado un incremento en la radiación como una forma de inhibir la fotosíntesis. La aplicación en pos-cosecha de tratamientos con elicitores busca mejorar tanto la calidad como la cantidad de sustancias fitoquímicas que posean un potencial nutracéutico en frutas y verduras ha sido objeto de diferentes estudios.

1.9.Efectos de la radiación UV-B sobre la morfología y anatomía de las plantas

La radiación UV-B al llegar a la biosfera debe ser absorbida por las plantas, para que estas produzcan alteraciones en la fisiología de la planta, esta radiación es percibida por la hoja cual tiene agentes llamados cromóforos, estos son susceptibles al daño realizado por esta radiación. Los cambios morfológicos de la planta que son inducidos por la radiación UV-B, son determinantes en la respuesta de distintas especies vegetales, además de tener un efecto colateral en su metabolismo secundario.

De acuerdo con Carrasco (2009), se menciona que, “frente a un aumento de la radiación UV-B muchos de los cambios observados, tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, son principalmente atribuidos a la orientación de las hojas que tiene cada uno de estos grupos de plantas, lo que finalmente influirá en la capacidad de interceptar este tipo de radiación. Las especies monocotiledóneas que presentan hojas delgadas con orientación vertical interceptan menos la radiación UV-B que las dicotiledóneas por presentar éstas hojas anchas y de orientación más bien horizontal, y por lo tanto son más susceptibles al daño. Por tal motivo, las plantas monocotiledóneas parecen ser generalmente más tolerantes a niveles elevados de radiación UV-B.” (p.60)

Los cromóforos son el conjunto de átomos asociados al aparato fotosintético y responsables de la absorción de la radiación UV-B, que para el funcionamiento y estructura de esta depende de la respuesta fotomorfogénicas (Carrasco, 2009).

1.10. Radiación UV-B sobre procesos fotoquímicos y metabólicos

La radiación UV-B ejerce sus mayores efectos principalmente en sus procesos energéticos, como lo es la fotosíntesis, al igual que la biosíntesis de metabolitos secundarios y detoxificación de especies reactivas de O₂ (Carrasco, 2009).

1.11. Metabolismo secundario

Los seres vivos poseen una serie de reacciones químicas y bioquímicas, realizadas por las células para la síntesis de sustancias complejas a partir de sustancias más simples o sustancias simples a partir de sustancias más complejas. Las plantas cuentan con un metabolismo secundario el cual les permite sintetizar y acumular productos químicos de naturaleza diversa.

El primero con el fin de obtener energía y alimento, la fotosíntesis es la vía por la cual la planta busca obtener moléculas de glucidos a partir de sustancias inorgánicas, para que este proceso sea posible será necesario luz, cloroplasto con pigmentos (clorofila) y moléculas transportadoras y receptoras de electrones. El proceso de fotosíntesis se puede interpretar de la siguiente manera, la luz incide en la clorofila, donde electrones activados son desprendidos, las moléculas encargadas del transporte, llevan estos electrones al aceptor final, el espacio cerrado del cloroplasto.

La fotosíntesis puede realizarse de manera dependiente o independiente de la luz, los pasos son los siguientes:

Tabla 5 Proceso fotosintético en presencia y ausencia de luz. Fuente: (Piña, 2013)

Fase dependiente de la luz:	Fase independiente de la luz:
El cloroplasto capta la energía luminosa:	No requiere presencia de luz.

Se activa la clorofila para que se desprenda electrones.	Es también llama fase de fijación del carbono porque es el momento donde se capta CO ₂ atmosférico, el cual se incorpora para formar glucosa, proceso que permitirá producir almidón.
Se forman moléculas de ATP que contienen en sus enlaces la energía química procedentes de los electrones activados. (Piña, 2013)	Los glucidos (glucosa, almidón) obtenidos se utilizarán también en la síntesis de otro tipo de biomoléculas como los aminoácidos, los lípidos y los nucleótidos. (Piña, 2013)

En la célula vegetal se producen procesos metabólicos comunes, los cuales se encaminan a la obtención de productos como azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, estos como esenciales tanto para la vida celular como en general para el sostenimiento de la planta, estos productos son conocidos como metabolitos primarios (Ruiz, 2008).

En el metabolismo secundario la planta a través de rutas metabólicas y reacciones tanto químicas como bioquímicas sintetizan metabolitos secundarios, los cuales cuentan con diferentes grupos taxonómicos, también propiedades biológicas y ecológicas, las cuales tienen diferentes usos de acuerdo a la industria, y entre los productos más comunes se encuentran los medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (Avalos y Pérez, 2009).

A diferencia de otros organismos, las plantas utilizan una gran cantidad de carbono y de la energía, para la síntesis de una gran cantidad de moléculas orgánicas, las cuales no están ligadas directamente al proceso fotosintético, respiratorios, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, estos son denominados metabolitos secundarios. La planta al poseer metabolismo primario y secundario, presenta fases específicas en el desarrollo de la planta, donde se obtienen metabolitos secundarios, principalmente en momentos de estrés, depredadores, condiciones adversas, deficiencia de nutrientes (Azcón-Bieto y Talón, 2000)(Taiz y Zeiger, 2002)(Ruiz, 2008.Citados por Ramírez, 2016). Estos productos despiertan el

interés debido a su funcionalidad, como herbicidas, insecticidas, perfumes, entre otros.

La planta frente a dichos estímulos, desarrolla diferentes rutas metabólicas, las cuales 3 en especial presentan interés en la producción de metabolitos secundarios que están ligados a la acetilcoenzima (ácido mevalónico-ruta ruta de la condensación isoprenica), ácido shikimico y acetato-malonato (ruta policetidos) (Castro *et al.*, 2013). Algunos de los productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes de insectos que los ayudan en el proceso de polinización, al igual que atrayendo animales que utilizan sus frutos como fuente de alimento y de esta manera contribuir a la distribución de las semillas.

Existen varios compuestos, lo cuales ofrecen a la planta una acción protectora frente a predadores, también actuando como repelentes por sus sabores amargos o venenos. Por otro lado, emplean mecanismo de defensa frente a patógenos, ofreciendo utilidades pesticidas naturales (Avalos y Pérez, 2009).

Tabla 6 Ruta de biosíntesis para algunos compuestos fenólicos presentes en plantas. Fuente, (Ramírez, 2016)

Tipo de compuesto		Ruta de biosíntesis
Fenólicos	Ácidos Fenólicos	Ácido shikimico
	Cumarinas y lignanos	Ácido shikimico
	Flavonoides	Ácido shikimico y acetato-malonato
	Taninos	Ácido shikimico y acetato-malonato
	Antraquinonas	Acetato-malonato
Isoprenoides	Esteroides	Ácido mevalonico
	Terpenos	Ácido mevalonico
Alcaloides	Alcaloides	Ácido shikimico y ácido mevalonico

Algunos productos del metabolismo secundario presentan características ecológicas, las cuales tienen funciones específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos de estos productos tienen taxonomía similar pero las funciones que desempeñan son totalmente distintas, muchos de estos son los encargados de aportar color a las flores y a los frutos, lo cuales juegan un papel fundamental al momento de atraer insectos polinizadores y animales que ayudaran al repartimiento de las semillas.

Dos de los metabolitos secundarios más abundantes con los que cuenta el AEO es el Carvacrol y el Timol dos quimiotipos pertenecientes a los fenoles monoterpenoides, esto se debe a que cuenta con dos unidades de isopreno; las plantas a nivel metabólico cuentan con gran variedad de aminoácidos aromáticos asociados a al metabolismo primario como secundario. Una gran variedad de compuestos sintetizados por las plantas cuenta con un grupo fenol, este grupo se divide en fenoles simples y fenoles complejos tales como los taninos y la lignina.

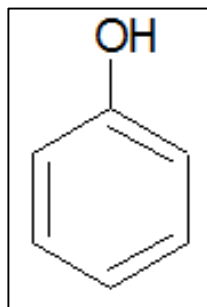


Figura 11: Estructura química del Fenol. Adaptado :García *et al.*, 2015

Para la biosíntesis de compuestos fenólicos existen dos rutas conocidas como la ruta del ácido shikímico y ácido malónico (García *et al* 2009).

La ruta del ácido malónico es una fuente importante para la biosíntesis de fenoles, dicho proceso es empleado por hongos y bacterias, pero rara vez utilizada en plantas superiores a diferencia de la ruta del ácido shikímico.

1.11.1. Biosíntesis del ácido shikímico

Los precursores para la obtención de ácido shikímico son compuestos de 3 y 4 átomos de carbono, donde encontramos al ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y la eritrosa 4-fosfato (E4P) gracias a una condensación de tipo aldólica, así se obtiene un compuesto C₇ siguiendo una serie de etapas observadas en la figura 1-11 (Arango, 2010).

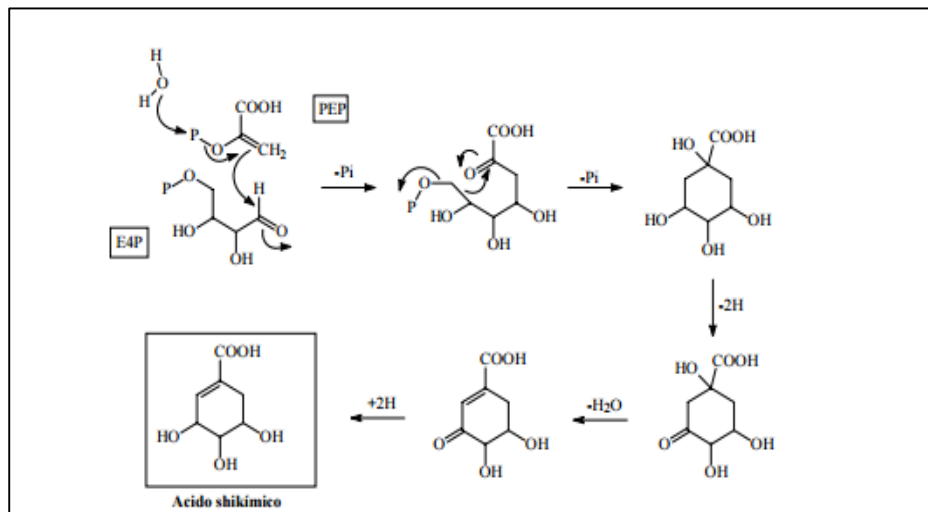


Figura 12: Ruta biosintética de la obtención del ácido Shikímico a partir de fosfoenolpiruvico (PEP) y la Eritrosa 4-fosfato (E4P).Fuente, (Arango, 2010)

1.11.2. Biosíntesis de fenilalanina y tirosina (Aminoácidos aromáticos)

La biosíntesis de estos aminoácidos se obtiene por reacciones entre el ácido shikímico con PEP, siendo el ácido corísmico el intermedio del ácido prefénico donde luego se forma el fenilpiruvico. Para la obtención de la fenilalanina y tirosina, aminoácidos que cumplen un papel indispensable en la formación de proteínas y son los precursores de la ruta biosintética de los compuestos llamados C₆-C₃, reacción que se podrá apreciar en la figura 1-12, se emplea el ácido prefénico, fenilpiruvico y el p-hidroxifenilpiruvico como precursores

Las biosíntesis de estos aminoácidos de obtiene por reacciones posteriores del ácido shikímico con PEP, vía del ácido corísmico como intermediario del ácido prefénico para luego formar el fenilpirúvico. Los ácidos prefénico, fenilpirúvico y el p-hidroxifenilpirúvico son los precursores de fenilalanina y tirosina, estos aminoácidos cumplen un papel indispensable en la formación de proteínas y son los precursores de la ruta biosintética de los compuestos llamados C₆-C₃, reacción que se podrá apreciar en la figura 1-12.

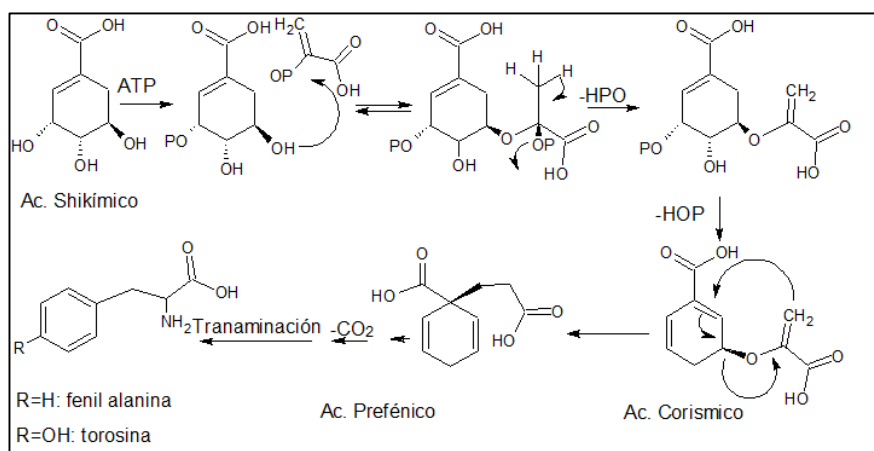


Figura 13: Biosíntesis de fenilalanina y tirosina. Fuente, Arango (2010)

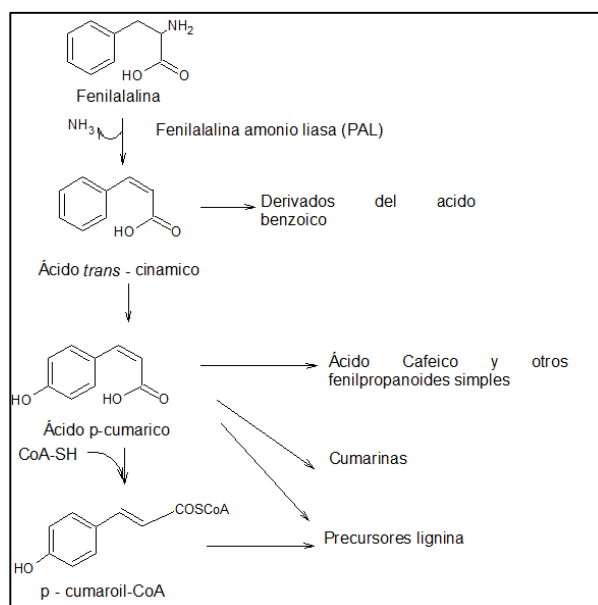


Figura 14: Ruta biosintética para la obtención de fenoles simple y complejos a partir de la fenilalanina (Ruta del ácido Shikímico). Fuente, (Arango, 2010)

En los AEO encontramos en menor proporción los quimiotipos y – terpeno y el p – cimeno, los cuales se derivan de la unión de unidades de isopreno (5 carbonos). Las unidades de isopreno que poseen son las que clasifican a los terpenos, entre ellos se encuentran los monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) y politerpenos cuando tienen más de 8 unidades de isopreno. (García *et al*, 2009)

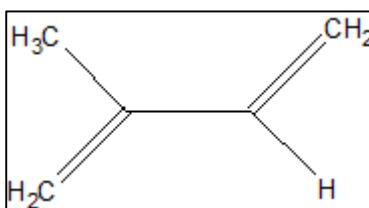


Figura 15: Estructura química del isopreno unidad mínima de los terpenos. Adaptado de: Elena Ceaşescu 1984.

El proceso de biosíntesis de terpenos, presenta una correlación entre el metabolismo primario y el metabolismo secundario, dicho proceso se podrá observar en la figura 1-15.

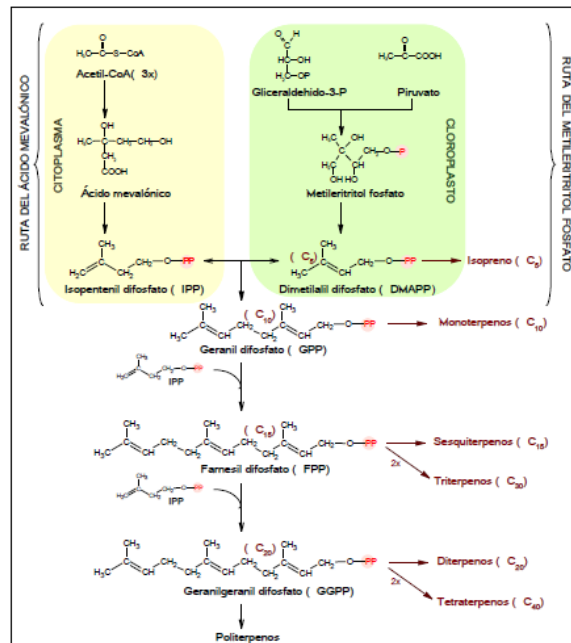


Figura 16: Síntesis de terpenos y clasificación de acuerdo a las unidades de isopreno que contenga. Fuente, (García *et al.*, 2009).

1.12.Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa en el análisis de la composición química del *Origanum vulgare* L.

La cromatografía de gases es una técnica que nos permite la separación de los componentes presentes en una muestra vaporizada, estos compuestos son distribuidos entre una fase estacionaria la cual puede ser líquida o sólida, la cual se encuentra en una columna y una fase móvil de naturaleza gaseosa. La muestra a analizar es inyectada en la cabeza de la columna (Rivera, 2008). La elusión de los componentes que se están analizando se realiza mediante un flujo de una fase gaseosa móvil, la cual es inerte, esto indica que no reaccionara con las moléculas de las especies que contiene la muestra, solo será un medio de transporte a través de la columna. En este método analítico encontramos dos tipos de cromatografía de gases: gas – líquido y gas – solido (Skoog *et al*, 2001). Le velocidad de los componentes dependerá de la velocidad que imprimamos al gas portador y de su naturaleza, de igual forma la naturaleza de la fase estacionaria (Dozal, 2010).

Al final de la columna hay un detector el cual envía una señal que se refleja en forma de picos, cada uno de estos picos corresponde a un componente de la muestra. Se denomina pico del aire al primer pico que aparece, el cual corresponde al aire que se encuentra en la columna. La línea base es conocida como el registro que corresponde al gas portador puro. La identificación puede ser cualitativa o cuantitativa (Dozal, 2010).

- Cualitativa: tiempo que tarda en salir la muestra.
- Cuantitativa: averiguar la cantidad del compuesto en la muestra, para ello se analiza la relación entre el área del pico y la masa del compuesto.

Para el análisis de muestras que exigen alta sensibilidad del orden de miligramos a picogramo, se emplea la cromatografía de gases, la cual ofrece excelentes resultados en tiempos relativamente cortos y de manera cuantitativa. Una de las condiciones es la estabilidad de las muestras a la temperatura de la operación y están deben ser volátiles. (Rivera, 2008).

La que se conoce como fase estacionaria es un líquido que cuenta con poca volatilidad la cual recubre las paredes de la columna. La forma en que los compuestos se separan se produce mediante una partición de moléculas presentes en la muestra entre la fase estacionaria y móvil.

Esta técnica se utiliza más del 95% de las aplicaciones de la cromatografía líquida, esta debe tener una estabilidad térmica, presentar baja volatilidad con relación a la temperatura que se está realizando la corrida de la muestra y químicamente inerte (Sharapin, 2000).

1.12.1.Descripción de la técnica

Fase móvil: esta fase de naturaleza gaseosa nos proporcionara un equilibrio entre las fases, ofreciendo mayor eficiencia al obtener los análisis. Para esta técnica los gases más utilizados son: nitrógeno, helio, hidrogeno y argón. La naturaleza de la fase móvil no debe interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra y debe tener compatibilidad con el detector y poseer alta pureza. Para que el análisis se pueda reproducir, el gas debe tener una saturación constante y esta se controla a través de las válvulas de aguja (Sharapin, 2000).

Sistemas de inyección: se utilizan micro-jeringas para la inyección de la muestra. El volumen a inyectar no puede estar por encima de la capacidad de la columna, es claro que en la medida que se pueda utilizar una menor cantidad de volumen, tanto la reproducibilidad como la eficiencia serán mayores en la técnica. La temperatura empleada debe lograr volatilizar la muestra. (Sharapin, 2000).

Columnas: la columna es el recipiente que contiene la fase estacionaria. Para esto se utiliza en el mayor de los casos el cobre, aluminio, vidrio y teflón. La columna no debe interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra a analizar (Rivera, 2008).

Sistema de detectores: las muestras pasan a través de las columnas, en este lugar serán separadas y al final de la columna llegan al sistema de detección, donde se eligen de acuerdo a la selectividad, estos son universales y específicos. La diferencia entre estos dos tipos se centra principalmente en que los detectores específicos son implementados para determinar una característica específica de una muestra X, y los detectores universales se utilizan para medir la variación de una propiedad del gas de arrastre que sale de la columna como lo define Rivera (2008).

1.12.2.Técnica cromatográfica en aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias complejas, debido a la variedad y elevada cantidad de quimiotipos que poseen en su composición, para la determinación de cada una de estas especies químicas, se requiere de procedimientos dispendiosos y tediosos, lo cuales incluyen métodos de aislamientos y purificación de cada quimiotipo, como era costumbre realizarlo anteriormente, estos procesos incluyen (destilación fracciona, cromatografía de capa fina, cromatografía en columna, métodos de coloración, derivados, precipitados, entre otros métodos).

Con el fin de evitar este tipo de métodos tradicionales, con el avance de la ciencia y tecnología, se han desarrollado técnicas instrumentales de análisis, lo cuales van acoplados a sistemas informáticos y brindan la posibilidad de acoplarse entre sí, de esta manera permite analizar y determinar distintas especies químicas presentes en distintas sustancias químicas, tales como lo son los aceites esenciales.

- Técnicas cromatográficas de alta resolución, cromatografía de gases con columnas capilares.
- Técnicas espectroscópicas, en especial la espectrometría de masas (EM), la infrarroja (IR) y la espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)
- Sistemas cromatográficos acoplados a técnicas espectroscópicas, como lo es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).

La cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectroscopia de masas (CG-EM) es utilizada para la separación e identificación de la composición química de aceites esenciales (AE), esta ha ganado importancia y a alcanzado de manera que es una técnica que se utiliza como rutina en diversos laboratorios (Sharapin, 2000). Como ejemplo de utilización de esta técnica ha sido en el estudio del ciclo vegetativo y su influencia en la producción de aceites esenciales. (Sharapin, 2000).

En la actualidad las columnas usualmente usadas son de tipo capilar, la cuales están constituidas por un tubo de sílice fundido de 0,25 mm de diámetro y 25 a 60 mm de largo; su alta resolución y separación de los componentes presentes de las mezclas que se encuentran en la muestra, su polaridad y peso molecular las hacen predilectas en la técnica. Cuan de aceites esenciales se trata, regularmente se utiliza una fase estacionaria de

polietilenglicol, la cual es la fase polar y poli (dimetilsiloxano) que es la fase no polar (Baharum *et al.*, 2010). El sistema cromatográfico es la columna, el cual es el más importante, y la elección de la misma se rige por la naturaleza de las muestras que se van a analizar. Los factores que se deben tener en cuenta para la elección deben ser El diámetro y la longitud de la columna, esta es la que ejerce y determina la eficiencia de la separación y el tiempo empleado, es importante tener en cuenta la polaridad de la fase estacionaria(Stashenko *et al.*, 2010).

Para analizar los componentes presentes en un AE utilizando la técnica de cromatografía gaseosa, es necesaria la utilización como parámetro de medición el compararlos tiempos de retención de las muestras con los tiempos de retención de los estándares de referencia o muestra patrón. Los tiempos de retención están sujetos a distintos parámetros como lo son las variaciones en la temperatura, la técnica de inyección, como también el flujo de los gases de arrastre y el diseño del equipo (Stashenko *et al.*, 2010).

La función de los tiempos de retención es brindar la información de cada uno de los componentes presentes en la muestra, pero además de esto es necesario tener en cuenta otros parámetros, ya que estos valores pueden ser similares entre componentes. Por tal motivo en la mayoría de los casos se aplica una técnica complementaria que apoye y brinde una información estructural como lo es la cromatografía acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Stashenko *et al.*, 2010).

1.12.3.Tiempos de retención en cromatografía de gases

Para la cromatografía de gases, la separación de las sustancias presentes se basa en un diferencial en las constantes de distribución, (K_D) entre las dos fases, móvil y estacionaria (f.e.). (Stashenko *et al.*, 2010). Para un proceso cromatográfico asertivo se debe seleccionar de manera correcta las condiciones termodinámicas del proceso de separación para diferentes sustancias, donde las cuales se obtiene bajos condiciones únicas operacionales, de esta forma la separación de los analíticos será de manera nítida, cabe resaltar que no siempre se obtiene el resultado esperado. La (K_D) depende de la naturaleza química de la fase móvil y estacionaria y de la del analito, así como de la temperatura de la columna (Stashenko *et al.*, 2010).

La columna que es la encargada de la retención de los analitos está en función de las presiones de vapor y las fuerzas intermoleculares que rigen

sus relaciones con la fase estacionaria. La elución de los analitos y su velocidad se ve influida por la constante (K_D) o lo que coloquialmente se conoce como tiempos de retención, estos son característicos de las columnas cromatograficas. A mayores (K_D), más largos serán los tiempos de retención de analitos, t_R , (Stashenko *et al.*, 2010).

1.12.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La técnica de cromatografía de gases es ampliamente utilizada debido a la capacidad que posee de dividir mezclas muy complejas. Pero luego de que han sido separados, detectados y cuantificados, cada uno de los componentes de una muestra, el dato que se dispone es el del tiempo de retención para cada uno de los componentes con sus picos cromatográficos.

Pero este valor no nos garantiza una identificación inequívoca, ya que en la mayoría de los casos se analiza un compuesto con un elevado número de componentes. La razón por la cual se realiza un acople a espectrometría de masas, que es capaz de identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero presenta dificultad en la identificación de los componentes individuales de una mezcla que en donde sus componentes no han sido separados previamente, esto se debe a la extrema complejidad de espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. (Gutiérrez *et al.*, 2002).

La asociación de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, dan lugar a una técnica combinada GC-MS. Esta permite identificación y separación de mezclas complejas de manera exacta y casi inequívoca. Esta conexión se logra empleando sistemas especiales de enlazado. Esta técnica presenta un obstáculo, el cual es al momento de realizar el enlazado, el efluente que sale de la columna cromatográfica está bajo condiciones de presión atmosférica, y al introducirlo al cromatógrafo deber ser en condiciones vacío. En la actualidad la utilización de cromatografía de gases capilar ha facilitado el enlace de estas técnicas. La separación de los compuestos inyectados en el cromatógrafo se produce en la columna, la cual se encarga de realizar la elución sucesiva de cada compuesto aislado que posteriormente entraran al espectrómetro de masas. El pico cromatográfico es registrado por cada compuesto y luego identificado gracias al espectrómetro de masas. (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Esta herramienta analítica que presenta gran eficiencia para el estudio de AE, y acertada en la identificación de sus componentes. La inyección presenta la posibilidad de inyectarse directamente al cromatógrafo, sin la necesidad de algún tratamiento previo, ya se podría decir que los componentes de los AE poseen un peso molecular bajo y relativamente volátil; esto facilita la disposición de la muestra evitando tratamientos previos y modificaciones. (Torrenegra, 2014). En el cromatógrafo los componentes de la muestra son separados y se pasan al espectrómetro de masas, de esta manera cada sustancia que se encuentra en el AE es registrada. Así se podrán identificar gracias a la fragmentación de los patrones que se pueden visualizar en el espectro de masas (Masada, 1997; Bauer, *et al*, 2001; Lawrence, 2003 citados por Torrenegra, 2014).

1.12.5. Espectrometría de masas

Los componentes de los aceites esenciales se pueden identificar mediante un detector llamado espectrómetro de masas (EM), estos datos se obtienen por medio de un efecto de impacto electrónico o también por ionización química analizadores másicos, los cuales son espectros que se encuentran acoplados a cromatografía de gases. También existen los detectores de trampa iónica, los cuales han tomado fuerza y su utilización es ahora de mayor frecuencia para el estudio de mezclas complejas, en los cuales se encuentran los aceites esenciales, es principalmente donde el experimento necesita de alta sensibilidad. El espectrómetro de masas, muestra la relación existente de masa/carga (m/z) de los iones formados al momento de la fragmentación de la molécula, la abundancia de cada uno de los iones formados. Para estas pruebas generalmente la carga es unitaria, esto quiere decir que los fragmentos iónicos se ven representados por la masa (Albarracín, 2003).

En los aceites esenciales uno de los componentes principales son los terpenos, estos poseen iones formados parecidos, pero para su identificación facilita la diferencia en la abundancia (Albarracín, 2003).

Tabla 7. Ventajas de la espectrométrica de masa.

Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que

proporciona un espectro característico de cada molécula.
Cuantitativa: brinda la posibilidad de conocer las concentraciones de las soluciones.
Gran sensibilidad: logra determinar compuestos en concentraciones ppm y ppb, aunque para casos esenciales ppt y ppq.
Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
Suministra información isotópica
Se puede realizar un espectro en décimas de segundo, permitiendo monitorear para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también existe la formación de iones fragmento, esto debido a la descomposición de los iones moleculares debido a los excesos de energía.

Luego de que las moléculas se ionizan, se aceleran y son conducidas hacia el sistema que se colecta mediante eléctricos o magnéticos. La velocidad que alcanza cada ion directamente proporcional a su masa. Cuando se detecta de manera consecutiva de los iones formados por parte de las moléculas de la muestra, suponiendo que es una sustancia pura, produce un espectro de masa, las cuales son diferentes para cada uno de los compuestos químicos y la cual constituye prácticamente la identificación inequívoca del compuesto analizado. Los espectros pueden almacenarse en una especie de librería, la cual permitirá comparar entre sí, y averiguar la naturaleza y origen de la molécula (Gutiérrez *et al*, 2002).

Para obtener ion-radical, con gran regularidad la técnica de ionización electrónica (IE). Para esta técnica se emplea un haz de electrones, el cual cuenta con una energía de alrededor de 70 eV, los cuales se generan desde un filamento de tungsteno por emisión termoiónica. El haz tiene la función de interaccionar con las moléculas en la cámara de ionización, la energía será la encargada de la fragmentación de las moléculas presentes en la muestra (Grob,1995; Lawrence,2003 citado por Torrenegra, (2014).Para la identificación de los componentes presentes en una muestra de AE, se emplea la comparación de los índices de retención, estos son obtenidos por medio de dos fases, una apolar y otra polar, estos poseen sus respectivos índices de kovats experimentales y obtenidos (Ray, 2002), también los patrones de fragmentación observados en los espectros de masas (Torrenegra, 2014).

2. Objetivos

2.1. Objetivos Generales

- Evaluar el cambio en la composición y actividad antioxidante de algunos fitoquímicos presentes en extractos de plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) ocasionados por la elicitación con radiación UV-B como tecnología alternativa durante poscosecha.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar en qué medida diferentes tratamientos con radiación UV-B y tiempos de adaptación de 24 y 48 horas pueden tener un efecto en la actividad antioxidante en plantas aromáticas.
- Identificar el efecto de la radiación UV-B en la composición de extractos de orégano con el fin de identificar los principales componentes elicitados.
- Caracterizar por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas la composición de los extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L tratados y no tratados con radiación UV-B.

3. Metodología

Este estudio se llevó a cabo en plantas de la especie *Origanum vulgare* L. (Orégano) quimiotipos principales timol y carvacrol.

Se empleó un método de extracción; hidrodestilación (HD), y la determinación de los respectivos rendimientos de extracción, el análisis de la composición de los extractos se realizó mediante de CG-EM. Para evaluar la actividad antioxidante de cada extracto se emplearon las técnicas radicales DPPH y radical ABTS+ junto con la determinación del contenido total de polifenoles CTF. Se realizó una correlación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles, para los extractos empleados como control y los extractos sometidos a tratamientos con radiación UV-B.

3.1. Material Vegetal

Se realizaron pruebas en tallos y hojas jóvenes de orégano, en un estado fenológico de punto de corte. Se empleó aprox. 2 kg de hojas y tallos en estado fresco para cada uno de los tiempos de adaptación Ta (24h) y Tb (48h), y para el tratamiento utilizado con radiación UV-B. La especie *Origanum vulgare* L. se obtuvo de la sabana de Bogotá, suministrada por la empresa Morenos LTDA. Donde fueron cultivadas por esquejes, proceso que permite una mayor probabilidad de obtener plantas con el mismo quimiotipo. (Figura 3-1)



Figura 18: Muestra vegetal de material fresco *Origanum vulgare* L. Fuente: Autor.

3.1.1. Evaluación del método de extracción del aceite esencial de orégano:

El método de extracción empleado fue el de hidrodestilación (HD), donde se utilizó un montaje de cohobación modificado, se determinó el rendimiento de extracción para cada extracto. El cálculo realizado fue la división del peso del extracto obtenido entre el peso del material vegetal empleado multiplicado por 100.

$$\% \frac{p}{p} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso Material vegetal}} * 100$$

Ecuación 1 Rendimiento de la extracción.

3.1.2. Extracción por hidrodestilación

El extracto fue obtenido por medio de un montaje el cual cuenta con un clevenger modificado ubicado en el laboratorio de poscosecha presente en la Universidad Nacional de Colombia (Figura 3-1) se empleó un peso aprox. De 100g de material vegetal fresco y un balón con capacidad de 2 litros y llenado hasta un litro con agua destilada

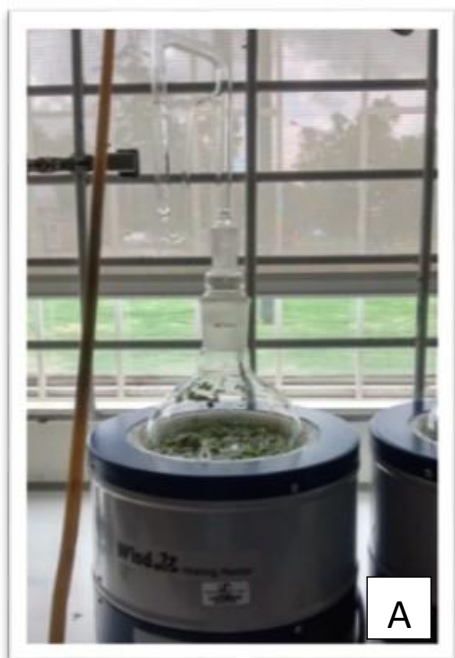


Figura 19:Equipo de hidrodestilación del Laboratorio de Poscosecha, Universidad Nacional de Colombia. (a) Equipo de hidrodestilación (b) Clevenger modificado. Fuente: Autor

La obtención del extracto sucedió durante 2 horas, el extracto fue secado con de sulfato anhidro, posteriormente fue pesado para obtener su rendimiento y almacenado para futuros análisis.

3.2.Análisis de la composición química de los extractos

El análisis de la composición química de los extractos AE de *Origanum vulgare* L fue realizado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

3.2.1.Preparación de las muestras para la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Las muestras fueron separadas de la siguiente manera, se diluyeron en éter grado HPLC (5 ml), posteriormente se pasaron a través de un filtro de celulosa previamente desengrasado. Las muestras se almacenaron hasta su inyección en el equipo sin retirar el solvente. La presencia de éter no interfiere con los análisis pues este es considerado en equipo como solvente base.

Para el análisis cromatográfico se utilizó un equipo Hitachi m-8000 una columna HP-5 de Agilent de 0,32mm, la fase móvil empleada fue Helio al 99% de pureza. La temperatura del inyector se colocó a 200°C y el programa se inició a 40°C con una pendiente de 8°C/min hasta alcanzar 240°C, el volumen de inyección fue de 2µl. El espectrómetro de masas utilizado como detector fue un Hitachi M-80b, con una energía de ionización de 70 ev.

3.3.Evaluación de la actividad antioxidante en los extractos de *Origanum vulgare* L.

Para el estudio de la posible actividad antioxidante que presentan el extracto de *Origanum vulgare* L., se utilizaron dos técnicas de capacidad antiradicalaria (DPPH, ABTS+), además de esto se evaluó el contenido total de fenoles.

3.3.1. Ensayo actividad antiradicalaria DPPH

Para el método de DPPH, se realizó de acuerdo con Vásquez *et al.* (2015). Se preparó una solución de DPPH (2,2 –diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,01mM en etanol. En un tubo de ensayo se agregó 50 µL de extracto con 950 µL de etanol. Se tomó 2 ml de la solución de DPPH y se agregó al tubo donde se encontraba el extracto con el EtOH y se completó a 4 ml con EtOH. Se llevó a oscuridad y dejó que reaccionará durante 30 min. Como blanco se utilizó EtOH, para la lectura del blanco y muestras se utilizó una absorbancia de 517 nm en un espectrofotómetro Rigol Ultra-3660. Las mediciones se realizaron por triplicado.

La curva de calibración fue construida desde 0,004mg/ml hasta 0,028mg/ml.

$$\text{Porcentaje de Inhibición DPPH} = \frac{\text{Abs nm inicial} - \text{Abs nm final}}{\text{Abs nm inicial}} \times 100$$

Ecuación 2 Porcentaje de inhibición.

Para el cálculo de la concentración de DPPH• presente en la reacción se calcula mediante una curva de calibración obtenida por regresión lineal. Para expresar la actividad antioxidante se utilizó el término de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) esta se expresó como mmoles de trolox/mg de extracto. Las muestras se analizaron por triplicado.

3.3.2. Ensayo producción de radicales libres ABTS+

El método ABTS+, fue realizado siguiendo la metodología propuesta por Alvis *et al.* (2012). Se diluyó el reactivo ABTS+ 2,2´-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). Se preparó una solución de persulfato de potasio a una concentración de 2,45 mM, las dos soluciones preparadas se mezclaron en partes hasta lograr una homogeneidad; se dejó incubar por 16 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

Para realizar la prueba se diluyó con EtOH el reactivo hasta obtener una absorbancia de 0,70 a 734nm, lograda dicha absorbancia se mezcló 50 µL de extracto con 1 ml de la solución ABTS+, se dejó incubar durante 10 min en oscuridad, pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 734nm en un espectrofotómetro Rigol Ultra-3660.

Para el cálculo de la concentración de ABTS presente en la reacción se calcula mediante una curva de calibración obtenida por regresión lineal. Para expresar la

actividad antioxidante se utilizó el término de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) esta se expresó como mmoles de trolox/mg de extracto. Las muestras se analizaron por triplicado.

$$\text{Porcentaje de Inhibición ABTS} = \frac{\text{Abs nm inicial} - \text{Abs nm final}}{\text{Abs nm inicial}} \times 100$$

Ecuación 3 Porcentaje de inhibición.

3.3.3. Contenido total de fenoles

El contenido total de fenoles fue determinado acorde a la metodología propuesta por Chuen *et al.*, (2005) la cual fue ligeramente modificada, en donde, 10 µl de extracto se diluyo con 10 ul de etOH 99%, 0,5 ml de agua destilada posteriormente 10 ul folin grado reactivo. Pasados 5 min se adiciono 1 ml de Na₂CO₃, se realizó la mezció y se dejó en reposo por 1 hora. La absorbancia fue leída a 725 en un espectrofotómetro Rigol Ultra-3660. La curva de calibración para el estándar de ácido gálico fue entre 25 – 200 µg en agua destilada.

$$\text{Contenido total de fenoles} = \frac{\text{mg Ácido Gálico}}{\text{ml del extracto}} * 100$$

Ecuación 4 Contenido total de fenoles

3.4. Tratamiento del material vegetal con radiación UV-

B

Para el tratamiento del material vegetal con radiación ultravioleta B, fue necesario la utilización de lámparas Philips TL 40W/12RS, las cuales garantizan una dosis media de 0,045 W.h.m⁻² (Ramírez, 2016). Se realizó un tratamiento con radiación UV-B, acorde a estudios preliminares planteados en estudios preliminares en algunas plantas realizados por (Pérez, 2009;2010; Ramírez, 2016).

T1: 0,075 W.h.m⁻², esto se logra con un tiempo de exposición de 1 hora y 40 minutos.

Para el ajuste de la dosis fue necesaria la utilización de una sonda LP 471 UV-B acoplada a un radiómetro DELTHA OHM HD 2102.2 (Figura 20) para las mediciones.



Figura 20: Registro de la radiación UV-B aplicada mediante sonda daptada a radiómetro DELTA OHM HD 2102.2. Fuente Autor.



Figura 21:Material vegetal Orégano A) antes de iniciar el tratamiento y B) finalizado el tratamiento con radiación. Fuente: Autor.

En la figura 22 se presenta en el eje Y la cantidad de radiación UV-B emitida en $W.m^2$, en el eje X encontraremos la duración del tratamiento con hora de inicio y hora de finalización. Luego del calentamiento de las lámparas y de una irradiación inconstante por alrededor de 4 minutos, pasado este tiempo se observa una irradiación continua y constante por parte de la lámpara por un valor aproximado de $2,3 - 0,5 W.m^2$. La cámara de radiación tiene un temporizador que garantiza y el apagado instantáneo pasado la 1 hora 40 min dispuesta para el tratamiento del material vegetal.

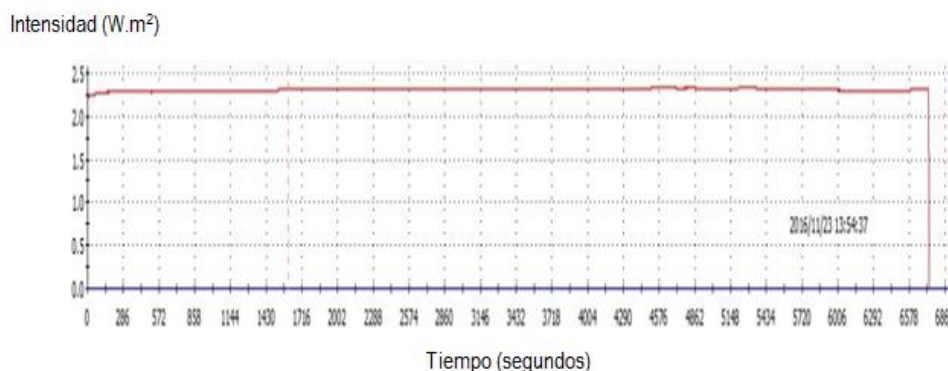


Figura 22 :Curva de emisión de radiación UV-B registrada por el software DeltaLog9, mediante una sonda LP 471 UV-B y radiómetro DELTHA OHM HD 2102.2.Fuente: Autor.

3.5.Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño factorial 2² con controles por separado para cada tratamiento, se realizó un análisis de varianza ANOVA y se realizó comparación entre los tratamientos empleando la prueba de Tukey empleando el software estadístico XLSTAT versión 2014.5. El diseño experimental se puede observar en la tabla 1:8.

Tabla 8 Diseño experimental y tratamientos empleados al material vegetal fresco.

Variable	Estado fenológico	Dosis UV-B	Tiempos de adaptación T1 y T2	Tratamiento
Material vegetal fresco en estado punto de corte o madurez comercial	EF1	D1	T1	A
			T2	B
			T1	Control A
			T2	Control B
			T1	C
			T2	D
			T1	Control C
			T2	Control D
			T1	E
			T2	F
			T1	Control E
			T2	Control F
			T1	G
			T2	H
			T1	Control G
			T2	Control H

En la Tabla 1:6, se encuentran las abreviaturas para el estado fenológico correspondiente a punto de corte(EF1), dosis de radiación UV-B 0,075 Wh.m² (D1), los tiempos de adaptación Ta y Tb corresponden respectivamente a 24 y 48 horas.

Tabla 9 Diseño experimental y tratamientos empleados al material vegetal para evaluar el contenido total de fenoles.

Variable	Estado fenológico	Dosis UV-B	Tiempos de adaptación	Tratamiento
Fenoles Totales	EF1	D1	T1	A
			T2	B
			T1	Control A
			T2	Control B
			T1	C
			T2	D
			T1	Control C
			T2	Control D
			T1	E
			T2	F
			T1	Control E
			T2	Control F

En la tabla 1:7 se encuentran las abreviaturas para el estado fenológico correspondiente a punto de corte(EF1), dosis de radiación UV-B 0,075 Wh.m² (D1), los tiempos de adaptación Ta y Tb corresponden respectivamente a 24 y 48 horas.

Tabla10 Diseño experimental y tratamientos empleados al material vegetal para la evaluación de actividad antioxidante.

Variable	Estado fenológico	Dosis UV-B	Tiempos de adaptación	Tratamiento
Actividad Antioxidante	EF1	D1	T1	A
			T2	B
			T1	Control A
			T2	Control B
			T1	C
			T2	D
			T1	Control C
			T2	Control D
			T1	E
			T2	F
			T1	Control E
			T2	Control F

En la tabla 1:8 se encuentran las abreviaturas para el estado fenológico correspondiente a punto de corte(EF1), dosis de radiación UV-B 0,075 Wh.m² (D1), los tiempos de adaptación Ta y Tb corresponden respectivamente a 24 y 48 horas.

4. Resultados y discusión

4.1. Rendimiento de los extractos obtenidos por hidrodestilación

La técnica utilizada para la obtención de los extractos fue por medio de la técnica de hidrodestilación - cohobación modificada descrita en el numeral 3.2.1. Los rendimientos obtenidos fueron obtenidos a partir de los triplicados y su promedio, valores que se podrán apreciar en la tabla 6.

$$\% \frac{p}{p} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso Material vegetal}} * 100$$

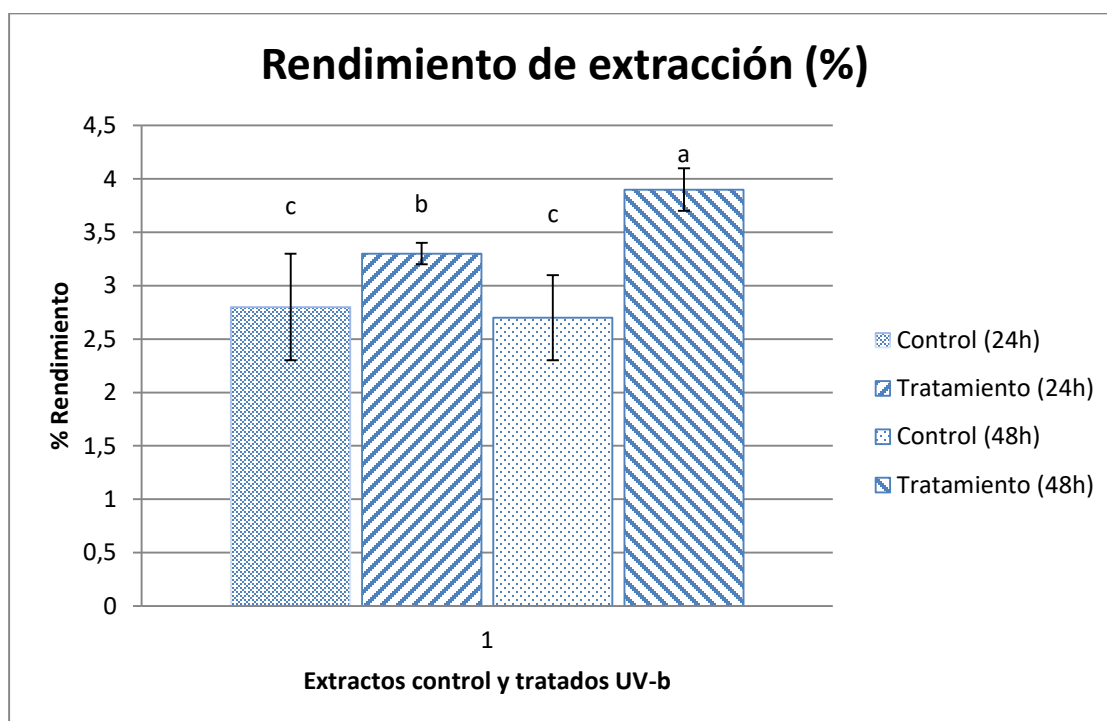


Figura 23 Rendimiento de extracción en los extractos obtenidos por hidrodestilación – cohobación modificada, tratados y control por medio del ensayo DPP. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P > 0,05$).

El método de hidrodestilación – cohobación modificada en control a 48h presentó el más bajo rendimiento (2,7%), y en orden ascendente se presentan los rendimientos de los extractos control 24 h (2,8%), tratamiento 24h (3,3%) y con mayor rendimiento tratamiento 48 h (3,9%).

Tabla 11 Rendimientos de los extractos obtenidos con relación al tiempo de adaptación y tratamientos realizados.

Control	Rendimiento (%)	Tratamiento UV-B	Rendimiento (%)	Δ (%)
24 h	$2,8 \pm 0,8^c$	24 h	$3,3 \pm 0,3^b$	0,5
48 h	$2,7 \pm 0,7^c$	48 h	$3,9 \pm 0,2^a$	1,2

Promedio expresado en base a material vegetal fresco (%).^{abc} letras diferentes significancia estadística

Se evidencia diferencia significativa estadísticamente entre el tratamiento con radiación UV-B adaptado a 48 horas con el tratamiento adaptado a 24 horas y los dos controles. De igual forma hubo diferencia significativa estadísticamente entre el tratamiento con radiación UV-B adaptado a 24 horas con respecto a los dos controles.

Con relación a los rendimientos obtenidos, se encuentran en los rangos presentados acorde en otras investigaciones, como lo expresan algunos autores como Vásquez (2012), en el cual se evaluaron extractos provenientes de hojas de *Origanum vulgare* L. reportado un rendimiento del 3.0%. Por otro lado, en la hidrodestilación asistida por microondas Acevedo *et al.*, y Torrenegra *et al.*, reportaron valores de 2,3% y 0,95% respectivamente (2007,2015). Dos santos *et al* y Rocha *et al.*, en un estudio en la especie *Origanum Vulgare* L. obtuvieron resultado de 4,6% y 4,3% respectivamente (2004,2007). Por último, de los valores más bajos obtenidos por método de hidrodestilación lo reporta de nuevo los autores Torrenegra *et al.*, en 2015 donde los rendimientos obtenidos fueron de 0,09% en la especie *Minthostachys mollis*.

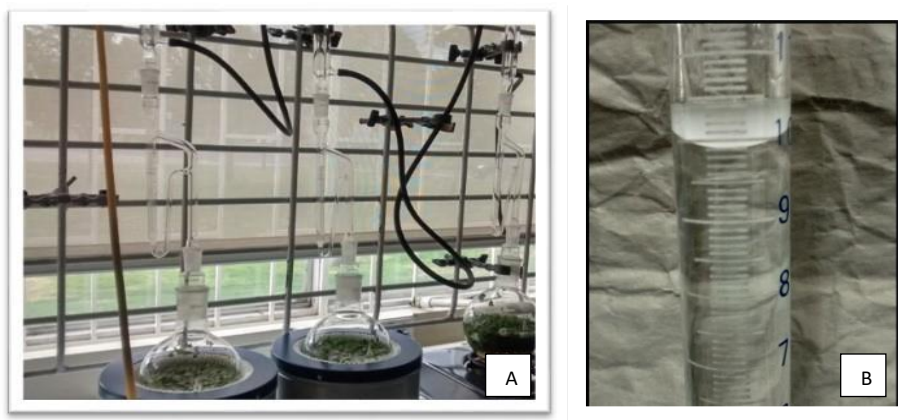


Figura 24:(A) Montaje de hidrodestilación – cohobación modificada. (B) Extracto obtenido sistema clevenger.

Rendimiento extracción

TA / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
24 vs 48	0,0088	4,2599	2,8965	0,0132	Si
Valor crítico del d de Tukey:			3,9265		

Figura 25: Diferencia significativa en los rendimiento de extracción por Hidrodestilación-Cohobación entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey.

Se realizó la comparación entre los extractos control y tratados con el fin de determinar si existe una significancia estadística, para esto se empleó un índice de confianza del 95% respecto al test de Tukey, siendo *P* el valor de significancia más pequeño posible, indico que existe una diferencia significativa para el rendimiento de extracción entre el control y los tratamientos, evidenciando que las muestras tratadas presentar un rendimiento mayor.

Tabla 12 Resultados para determinación de rendimiento de extracción de los extractos, medida en él % de capacidad antioxidante.

Estado Fenológico	UV-B(D1 :0,07 5Wh, m ⁻²)	Tiempo de adaptación (T1> 24h y T2 48h)	Matriz F (fresco)	Tratamiento	Rendimiento de extracción %	Control	ΔRE
Punto de corte	D1	T1	F	A	3.3±0.3 ^c	2.8±0.8 ^b	0.5
		T2	F	B	3.9±0.2 ^c	2.7±0.7 ^a	1.2

^{abc} letras diferentes significancia estadística

ΔRE: Cambio porcentual del tratamiento respecto al control

Prueba de Tukey: letras diferentes, indican diferencias significativas Tukey(HDS).

4.2.Evaluación de la actividad antioxidante y contenido total de fenoles

La Actividad antioxidante de los extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L., fueron medidos por medio de las técnicas DPPH y ABTS (TE). En los métodos DPPH y ABTS, la medida de capacidad antioxidante está basada en una reacción de tipo redox, donde se evalúa la descomposición cinética de un compuesto de tipo cromóforo que demuestra la finalización de la reacción. Los métodos de transferencia de electrones (TE) fueron diseñados para medir la capacidad de radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva de una muestra (Huang *et al.*, 2005).

En los últimos años se han adoptado y desarrollado para técnicas espectrofotométricas para la lectura de capacidad antioxidante en alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Una de los métodos más confiables, sencillos y rápidas empleadas en laboratorio es la técnica DPPH, ya que se puede realizar en un lapso de tiempo corto y no presenta costos tan elevados como otras técnicas. Por otro lado, tenemos la técnica ABTS la cual presenta una naturaleza lipofílica (Alam *et al.*, 2012). Al igual que el DPPH, es un método de decoloración.

4.2.1.Ensayo actividad antiradicalaria DPPH

Este método fue establecido principalmente por Brand – Williams y colaboradores (1995) (Holguin *et al.*, 2010), es un método colímetrico simple, que reacciona directamente con el compuesto, por lo cual la reacción depende de la conformación estructural de los compuestos (Fukumoto *et al.*, 2000 citado por Holguin *et al.*, 2010). El fundamento de esta técnica se basa en que el radical libre presenta un electrón de nitrógeno desapareado, el cual tiene una tonalidad azul-violeta, cuando este radical se reduce a causa del agente antioxidante, se estabiliza su acción oxidativa, esta reacción se puede observar ya que se decolora a un color amarillo pálido (Cheng *et al.*, 2006).

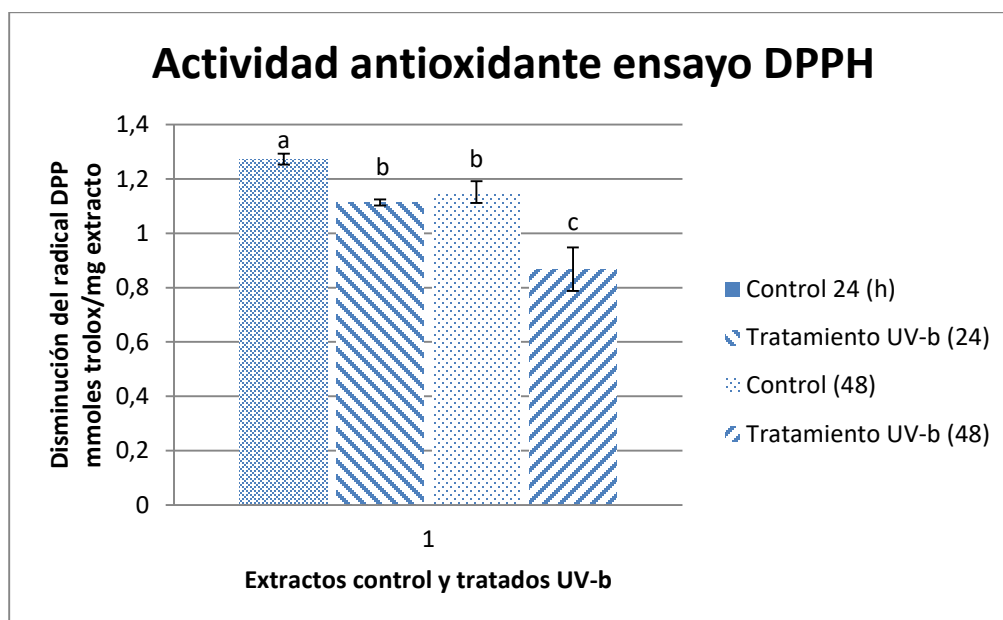


Figura 26: Actividad antioxidante medida en los extractos obtenidos por hidrodestilación – cohobación modificada, tratados y control por medio del ensayo DPPH. Las letras diferentes indican significancias estadísticas ($P > 0,05$).

Para este estudio los extractos obtenidos por hidrodestilación modificada – cohobación con 48 h de adaptación y tratamiento con radiación UV-B presento la mayor disminución del radical DPPH, mostrando una actividad antioxidante de 0,866 mmoles trolox/mg extracto, mientras que para los extractos de 24 h tratado con radiación 1,113 mmoles trolox/mg extracto. Para el control con 48 horas de adaptación presento una actividad de 1,152 mmoles trolox/mg extracto, por ultimo con este ensayo antiradicalario para el control de 24 h se registró una actividad de 1,273 mmoles trolox/ mg extracto.

Tabla 13 Actividad antioxidante controles y tratamientos ensayo DPPH

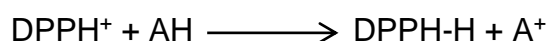
Extractos	Actividad Antioxidante - inhibición del radical DPPH (mmoles trolox/mg extracto)
Control a 24 horas	1,273 ± 0,02 % ^a
Control a 48 horas	1,152 ± 0,04 % ^b
Tratamiento 24 horas	1,113 ± 0,011% ^b
Tratamiento 48 horas	0,868 ± 0,08 % ^c

^{abc}Las letras diferentes indican significancias estadísticas ($P < 0,05$)

A través de la tabla 12 podemos inferir que el extracto que presenta mayor actividad antioxidante fue la muestra tratada con radiación ultravioleta, esto se puede explicar por el aumento en la cantidad de *quimiotipos* polifenoles, principalmente el timol, lo cual le permite enlazar con mayor velocidad los radicales libres del DPPH por medio de las moléculas antioxidantes. De esta manera entre más disminuya la absorbancia mayor será la actividad antioxidante del extracto, debido a que la concentración del radical DPPH disminuye y de igual forma se retrasan las reacciones en cadena.

Cabe resaltar que la actividad antioxidante fue evaluada *In vitro*.

Reacción DPPH



AH en este caso represente el agente antioxidante, el cual donará electrones al radical y así evitara la reacción en cadena.

Según Rao *et al.* (2009) citados por Holguin *et al.* (2010), la estabilidad y funcionamiento del reactivo DPPH es confiable a temperatura ambiente, acepta electrones del antioxidante para ganar estabilidad, y hasta el momento ha sido el mejor método para medir la actividad antioxidante en compuestos polifenólicos.

El tratamiento con radiación UV-B con 48 horas de adaptación presenta una diferencia significativa entre los extractos tratados a 24 horas de adaptación y los dos controles, esto se debe a su alta actividad antioxidante, el control con 24 horas de adaptación presenta diferencia significativa con respecto a los tratamientos con tiempos de adaptación 24 y 48 horas y al control de 48 horas.

Por último, los valores de actividad antioxidante presentan diferencia significativa estadísticamente entre el control adaptado a 48 horas y el tratamiento adaptado a 24 horas.

(Torrenegra, 2014) reporta que el extracto obtenido por HD de la especie orégano (*Origanum vulgare* L.) presentó la mayor actividad antioxidante utilizando la técnica del radical DPPH.

Según Amadio y colaboradores en (2011), el *Origanum x aplii* presenta alto poder secuestrante comparado con el *O. x majoricum*, utilizando menores

concentraciones. (Alma *et al.*, 2003) reporta valores menores comparados con el *Origanum vulgare* L. y las dos especies anteriormente mencionadas.

DPPH

TA / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
24 vs 48	0,0052	4,2479	2,7765	0,0132	Si
Valor crítico del d de Tukey:			3,9265		

Figura 27 Diferencia significativa en la actividad antioxidante medida por la técnica DPPH entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey.

Las técnicas utilizadas para la medición de la actividad antioxidante reportaron una correlación con la cantidad total de fenoles, ya que para las muestras tratadas con radiación UV-B y adaptadas a 48 horas, reportaron mayores cantidades de polifenos, mismas muestras evidenciaron la mayor actividad antioxidante.

(Vásquez, 2012) en su estudio habla de una correlación entre otros métodos tales como el DPPH, ORAC y BET. Es importante mencionar que la actividad antioxidante está supeditada al quimiotipo principal y su mecanismo de acción en la captación de los radicales libres.

Los controles con tiempos de adaptación de 48 horas presentaron un aumento en la actividad antioxidante del 0,12%, mientras que para los tratamientos con radiación UV-B adaptados a 48 fueron quienes presentaron un aumento 0,24% en la actividad antioxidante. Tomando las muestras que mayor actividad antioxidante para controles y tratamientos se encontró que el tratamiento adaptado a 48 horas presentó un aumento del 0,124% en su actividad antioxidante, a causa del uso de radiación UV-B como elicitador físico evidenciando un impacto positivo.

En la figura 27 se puede evidenciar la existencia de una diferencia significativa entre los controles adaptados a 24 horas y los tratamientos adaptados a 48

horas, mientras que para el control de 48 horas y el tratamiento de 24 horas no existió una significancia estadística.

4.2.2. Ensayo actividad antiradicalaria ABTS+

Los aceites esenciales cuentan con un efecto protector, el cual se fundamenta por la capacidad que tienen algunos quimiotipos presentes en los extractos de captar radicales libres tal como lo describe (Re *et al.* 1999). La técnica de ABTS⁺ es altamente utilizada para el análisis de muestras biológicas, alimentos, extractos de planta que presenten naturaleza lipofílica o hidrofílica.

El reactivo ABTS es un compuesto químico de naturaleza cromógena, el cual cuenta con espectro ultravioleta (UV), el cual cuenta con rango máximos de absorbancia a 414, 752 y 842 nm en naturaleza hidrofílica, y a 414, 713, 873 nm en medio etanólico. La reducción del catión-radical depende de la concentración del antioxidante y del tiempo de reacción (Torrenegra, 2014).

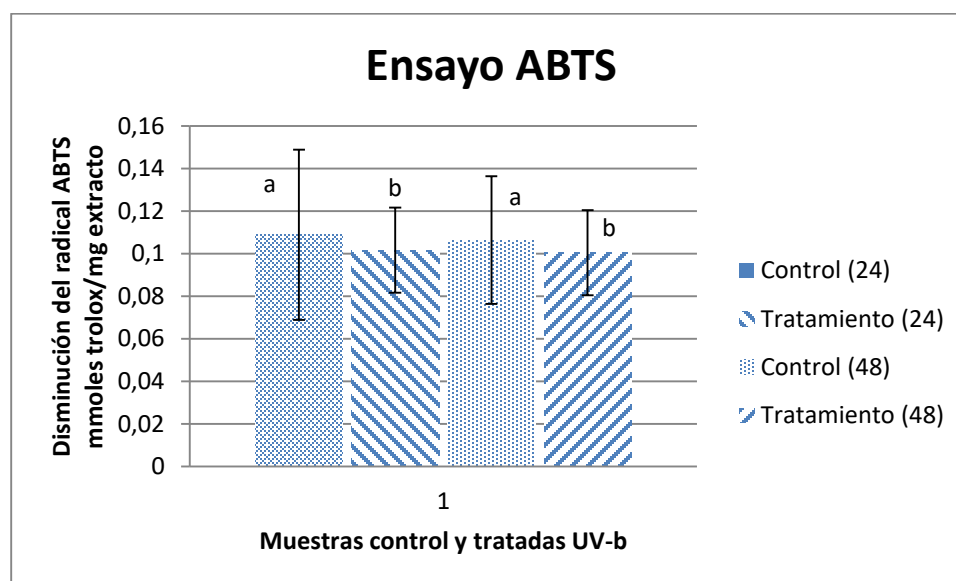


Figura 28: Actividad antioxidante registrada por ensayo ABTS⁺ en extractos de *Origanum vulgare* L. en tratamientos y controles. Las letras diferentes indican significancias estadísticas ($P < 0,05$)

Los extractos de *Origanum vulgare* L. que fueron tratados con radiación UV-B y 48 horas de adaptación presentaron mayor actividad antioxidante con un registro de 0,1004 mmoles trolox/ mg extracto, de esta manera la actividad antioxidante presente un descenso con relación a la muestra tratada con radiación UV-B pero

con 24 horas de adaptación donde se registró un valor de 0,1017 mmoles trolox/mg extracto.

Por último, encontramos los controles de 24 y 48 horas de adaptación con valores para la actividad antioxidante de 0,1063 y 0,1089 respectivamente, presentando una mayor actividad antioxidante para los controles las muestra adaptadas a 48 horas.

Tabla 14 Actividad antioxidante controles y tratamientos ensayo ABTS

Extractos	Actividad Antioxidante inhibición del radical ABTS⁺(mmoles trolox/mg extracto)
Control a 24 horas	0,1089 ± 0,04% ^a
Control a 48 horas	0,1063 ± 0,03% ^a
Tratamiento 24 horas	0,1017 ± 0,02% ^b
Tratamiento 48 horas	0,1004 ± 0,02% ^b

^{a,b,c,d} Las letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05)

En los extractos control de 24 y 48 horas, no existió diferencia significativa entre sí, ya que presentaron valores de actividad antioxidante y reducción del radical ABTS⁺ similares, por otra parte si presentaron significancia estadísticamente frente a los extracto tratados con radiación UV-B, donde evidentemente se observa un aumento en la actividad antioxidante debido al proceso de elicitación y el aumento de la concentración de *quimiotipos* de familia fenólica, principalmente timol, al cual se le asocia su actividad antioxidante y agente que previene las reacciones en cadena.

La actividad antioxidante se registró de manera descendente en el siguiente orden: tratamiento 48 horas, tratamiento 24 horas, control 48 horas y control 24 horas.

El método que registró una mayor actividad antioxidante fue el DPPH el cual predominó sobre el ABTS, a pesar de que las dos técnicas están basadas en transferencia de electrones se había hablado anteriormente que el DPPH es totalmente lipofílico, lo cual presenta mayor afinidad con los extractos obtenidos por su naturaleza apolar.

Las características antioxidantes que presentan los compuestos fenólicos, está principalmente ligada a las características químicas estructurales como la de poder donar protones del hidroxilo fenólico, esto le permite deslocalizar y estabilizar electrones que se encuentren desapareados por resonancia en el

anillo aromático, además de esto tiene la capacidad de quelar metales los cuales son susceptibles a reaccionar con otras moléculas oxidables, cuenta con alto poder de reducción (Rice *et al.*, 1996).

Para la técnica del radical ABTS se registró valores menores comparados con los obtenidos para la técnica DPPH, esto se debe a que el ABTS es un método el cual puede ser aplicado tanto en sistemas acuosos como lipolíticos (Nenadis, 2004), de esta manera le permite interactuar tanto con especies polares como apolares. El radical ABTS presenta alta estabilidad y solubilidad en agua (Kukoski, 2005, Gonzales, 2007), A diferencia del ABTS el radical DPPH es posible solo disolverlo en solventes de naturaleza orgánica, esto permite de medir con mayor afinidad en compuestos poco polares o apolares (Floegel, *et al.*, 2011).

ABTS

TA / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
48 vs 24	0,0019	2,0821	2,7765	0,1058	No
Valor crítico del d de Tukey:			3,9265		

Figura 29: No existe diferencia significativa en la actividad antioxidante medida por la técnica ABTS entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey

El ensayo de actividad antioxidante ABTS evidenció que para el grupo de los controles las muestras adaptadas a 48 horas tuvieron un valor en la actividad antioxidante más alto, indicando un aumento del 0,0026% frente al control adaptado a 24 horas. Para el grupo tratado con radiación UV-B la muestra con mayor actividad antioxidante evidenciada fue con tiempos de adaptación de 48 horas, presento un aumento de 0,0013% en dicha actividad en comparación con el tratamiento adaptado a 24 horas. La comparación de los dos grupos indico, que las muestras elicitados presentaron un aumento de 0,0013% en la actividad antioxidante. Para el caso de la prueba de ABTS presento diferencias significativas entre los grupos control y los tratamientos, a diferencia de lo anterior los valores de 24 y 48 horas de adaptación en los controles no

evidenciaron diferencia significativa, esto mismo sucedió en el grupo de las muestras tratadas.

Tabla 16 Resultados de medición de actividad antioxidante de los extractos, medida en él % de capacidad antioxidante.

Estado Fenológico	UV-B(D 075 Wh, m ⁻²)	Tiempo de adaptación(T1> 24h y T2 48h)	Matr iz F (fresco)	Tratamiento	% actividad antioxidante	Control	ΔAA
Punto de corte	D1	T1	F	A	1,113±0,01 1 ^b	1,273±0,02 % ^a	0.16
		T2	F	B	0.0868±0,0 8 ^c	1,152±0,04 ^b	1.065 2
		T1	F	C	0,1017±0,0 2 ^f	0,1089±0,0 4% ^e	0.007 2
		T2	F	D	0,1004±0,0 2% ^g	0,1063±0,0 3% ^e	0.005 9

^{a,b,c,d} Las letras diferentes indican significancias estadísticas (P<0,05)

ΔAA: Cambio porcentual del tratamiento respecto al control

Prueba de Tukey: letras diferentes, indican diferencias significativas Tukey(HDS).

4.2.3.Contenido total de fenoles

Los compuestos fenólicos naturales poseen uno o más grupo fenol, un anillo aromático con al menos un grupo funcional. Muchos son metabolitos secundarios de las plantas. (Apak *et al.*, 2007). Los compuestos fenólicos se encuentran entre las sustancias bioactivas más potentes y útiles terapéuticamente proporcionando beneficios para la salud asociados con un menos riesgo de enfermedades crónicas y degenerativas. Muchos de estos efectos se atribuyen a la actividad antioxidante y bloqueo de radicales libres. (Bartos *et al.*, 2009)

Los antioxidantes presentes en los alimentos pueden ayudar por acción directa sobre las especies reactivas del oxígeno ROS o por la estimulación endógena de los sistemas de defensa. Los grupos fenol de los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar un radical fenoxil relativamente estable, alterando así la

cadena de reacciones oxidativas (Scalbert *et al* 2005), gracias a estas bioactividades se realiza la cuantificación en la planta.

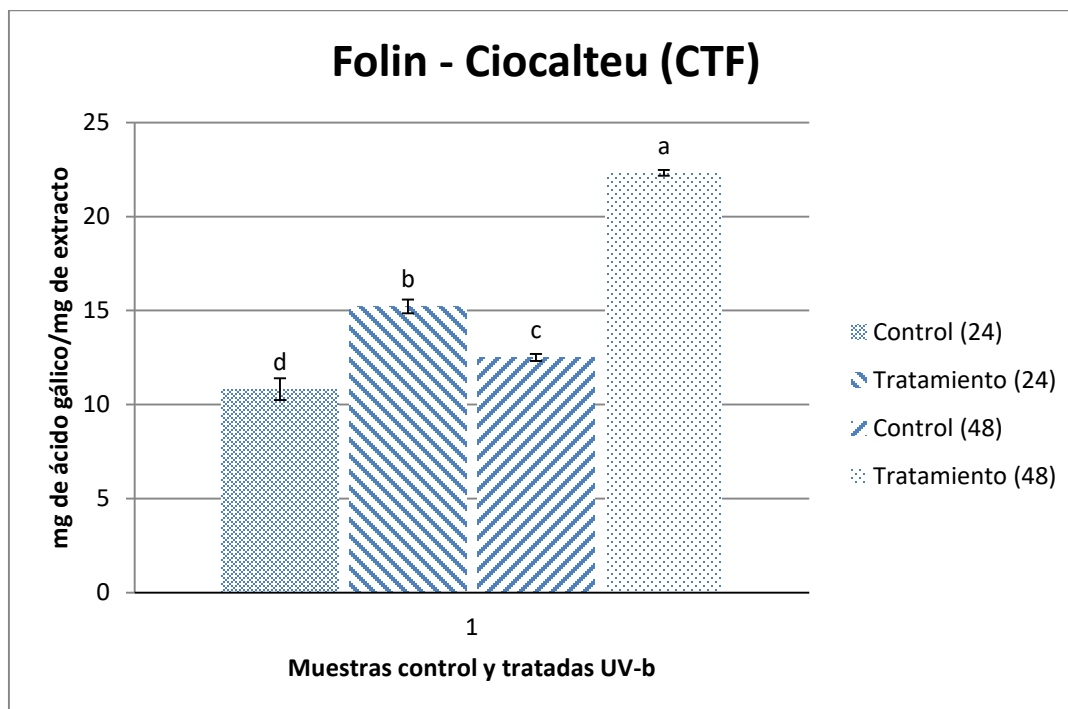


Figura 30: Contenido total de fenoles de los extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L. tratados y controles

El contenido total de fenoles de extracto obtenido por hidrodestilación (HD) con relación a los controles y tratamiento se pueden apreciar en la tabla 7.

Tabla 15 Contenido total de fenoles en extractos control y tratamientos.

Extractos	Contenido total de fenoles (mg ácido gálico / extracto)
Control a 24 horas	11,9 ± 0,06% ^d
Control a 48 horas	13,9 ± 0,01% ^c
Tratamiento 24 horas	17,0 ± 0,03% ^b
Tratamiento 48 horas	24,7 ± 0,06 % ^a

^{a,b,c,d} Las letras diferentes indican significancias estadísticas (P<0,05)

Por el método de extracción Hidrodestilación – cohobación modificada, presentó mayor contenido total de fenoles los extractos tratados con radiación UV – Bis y tiempos de adaptación de 48 horas donde los valores promediados fueron de 24,7 mg ácido gálico/extracto.

Los otros tratamientos se pueden apreciar en la figura 4-7 donde anteriormente se mencionó el tratamiento de 48 h de adaptación presentó un mayor contenido de fenoles totales, de manera descendente se observa una diferencia significativa entre el tratamiento con 24 horas de adaptación el cual reportó un valor de 17 mg ácido gálico/extracto, a continuación, se encontraron valores de 13,9 y 11,9 mg ácido gálico/extracto para controles 48 y 24 horas respectivamente.

Para el grupo de los controles la muestra con tiempos de adaptación de 48 horas evidenció un aumento del 2% en su contenido total de fenoles, mientras que para el grupo de los tratamientos se evidencio un aumento del 7,7% para la muestra adaptada a 48 horas. Comparando las muestras con mejores resultados de cada grupo se observó que la muestra elicitada con radiación UV-B presento un aumento del 5% en su contenido total de fenoles analizado por medio de la técnica Folin-Ciocalteu. De esta manera se puede sugerir que a pesar de los rendimientos pequeños obtenidos por medio de hidrodestilación-cohobación modificada, se obtienen niveles significativos de fenoles los cuales pueden ser utilizados como agentes antioxidantes en la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia. Esta afirmación debe estar soportada por medios experimentales en sistemas que estén expuestos a degradación oxidativa.

Los ensayos anteriormente realizados se llevaron a cabo en modalidad “*in vitro*” evaluando de esta manera la capacidad antioxidante de los extractos, aunque se deben complementar con estudios de manera “*in vivo*”, de igual forma estudios de efectos prooxidantes debido a dosis elevadas (Frankel y Meyer, 2000). Por otro lado, es importante verificar la naturaleza de los compuestos responsables de brindar una capacidad antioxidante, y si estos presentan biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal y la posibilidad de permanecer en los tejidos (Aruoma, 2003)(Wu *et al.*, 2004 citado por Vásquez, 2012).

Contenido total de fenoles

TA / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
48 vs 24	0,4757	13,4455	2,7765	0,0002	Si
Valor crítico del d de			3,9265		

Tukey:

Figura 31: Diferencia significativa de contenido total de fenoles entre tratamiento de 48 horas y control de 24 horas por el método Tukey

Obtenido el anterior conjunto de datos nos permite realizar mediante la utilización del programa estadístico XLSTAT versión 2014.5, métodos estadísticos que nos permitan analizar si existe correlación entre los métodos utilizados para actividad antioxidante (figuras 4-3,4-4) y CTF (figura 4-5), y si la radiación ultravioleta B tiene incidencia en la actividad antioxidante. El estudio de la correlación perteneciente al contenido total de fenoles y la actividad antioxidante presente en los extractos obtenidos de *Origanum Vulgare* L. se presentan en la **Tabla1-15**.

Podemos observar la correlación que presentan de manera significativa DPPH y ABTS (70,24%), DPPH y CTF (66,14%) y ABT y CTF (61,33%). La correlación existente entre los métodos puede estar dada que los dos métodos son utilizados en medio lipolíticos y su mecanismo de reacción está basado en la transferencia de electrones.

Tabla 17 Correlación entre contenido total de fenoles y actividad antioxidante en los extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L. por hidrodestilación y con relación a controles y tratamiento con radiación UV-B.

VARIABLES	DPPH	ABTS	CTF
DPPH	1,000	0,7024	0,6614
		0,0012	0,0063
ABTS		1,000	0,6133
			0,0051
CFT			1,000

Prueba de Tukey: 95% Tukey(HDS).

La correlación existe entre el CTF y su actividad antioxidante en los extractos de *Origanum Vulgare* L. es directa y altamente significativa como se puede apreciar en la tabla 1-16. La correlación existente es altamente significativa entre la técnica DPPH con ABTS (92,64%), de igual forma DPPH con CTF (77,73%) y por últimos ABTS con CTF (72,04%). Se evidencia que el tratamiento con radiación ultravioleta – B tiene alta incidencia en la biosíntesis de compuestos poli fenólicos, los cuales tienen la característica antioxidante anteriormente mencionada. Además, existe una correlación directa entre las técnicas de transferencia de electrones.

Tabla18 Correlación entre contenido total de fenoles y actividad antioxidante en los extractos obtenidos de *Origanum Vulgare* L. por hidrodestilación y tratado con radiación UV-B

VARIABLE	DPPH	ABTS	CTF
DPPH	1,000	0,9264	0,7773
		0,0030	<,0001
ABTS		1,000	0,7204
			0,0018
CTF			1,000

Prueba de Tukey: 95% Tukey(HDS).

Por último, se pueden apreciar la diferencia significativa entre el control de 24 horas y el tratamiento de 48 horas en la actividad antioxidante por técnicas DPPH y ABTS al igual que el contenido total de fenoles (CFT). La tabla 16 nos indica que existe una correlación entre la actividad antioxidante y en contenido total de polifenoles, esto quiere decir que la estructura polifenolica es la responsable de la actividad antioxidante en el extracto obtenido del *Origanum vulgare* L.

Tabla 19 Resultados de medición contenido total de polifenoles de los extractos, medida en él % de capacidad antioxidante.

Estado Fenológico	UV-B(D1 :0,07 5Wh, m ⁻²)	Tiempo de adaptación(T1> 24h y T2 48h)	Matriz F (fresco)	Tratamiento	Contenido total de Polifenoles	Control	ΔCTP
Punto de corte	D1	T1	F	A	17.0±0.03 ^b	11.9±0.06 ^d	5.1
		T2	F	B	24.7±0.06 ^a	13.9±0.01 ^c	10.8

^{a,b,c,d} Las letras diferentes indican significancias estadísticas (P<0,05)

ΔCTP: Cambio porcentual del tratamiento respecto al control

Prueba de Tukey: letras diferentes, indican diferencias significativas Tukey(HDS).

4.3. Análisis de extractos de *Origanum vulgare* L. utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Los extractos obtenidos por medio de hidrodestilación de *Origanum vulgare* L. fueron analizados con ayuda de la técnica instrumental de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría, con el fin de correlacionar la actividad antioxidante con los *quimiotipos* presentes en los extractos obtenidos.

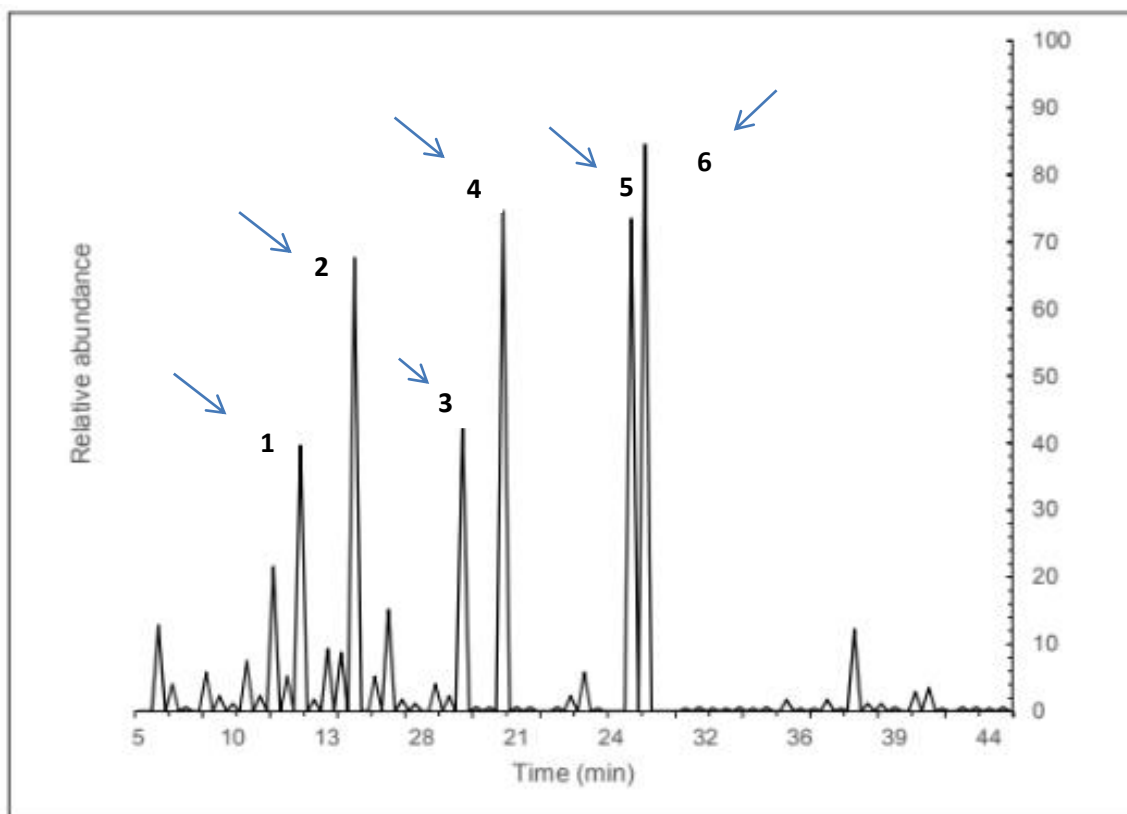


Figura 32: Perfil cromatográfico para controles con adaptación a 48 horas de extracto de *Origanum vulgare* L.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en los extractos que mostraron mayor actividad antioxidante para el caso de los controles, las muestras analizadas fueron las que tuvieron un tiempo de adaptación de 48 horas.

En la tabla 1:17 se presenta los 5 quimiotipos principales encontrados en la muestra analizada, a los que se les atribuye la actividad antioxidante debido a sus altas concentraciones en Timol y Carvacrol, los cuales tiene la posibilidad de

donar un hidrógeno, así estabilizar el radical libre y evitar las reacciones en cadena. La presencia del β -Fenchyl alcohol le brinda una actividad antimicrobiana.

Tabla 20 Cantidad relativa (%) de los principales quimiotipos (>0,1%) de extractos de *Origanum vulgare* L. obtenidos por hidrodestilación – cohobación.

N° Pico	Identificación Cualitativa	Quimiotipo	Cantidad Relativa
1	Carvacrol	Fp	15,81%
2	Thymol	Fp	14,06%
3	β -Fenchyl alcohol	C-OH	13,96%
4	γ Terpinene	M	11,12%
5	δ Terpineol	M	8,18%
6	1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene	MO	7,85%
Abreviaturas	Familias de compuestos aislados		Cantidad Relativa
F-P	Fenil propanoide		22,84%
C-OH	Alcohol		7,53%
M-O	Monoterpenos oxigenados		7,56%
S	Hidrocarburos sesquiterpenicos		1,89%
S-O	Sesquiterpenos oxigenados		0,50%
M	Hidrocarburos Monoterpenicos		24,45%

En la tabla N°17 se observan las cantidades relativas (%) de los quimiotipos organizados por familias presentes en los extractos de orégano control 48 horas, obtenidos por hidrodestilación. Los compuestos principales en esta muestra fueron los hidrocarburos monoterpénicos (24,45%), donde sus mayores exponentes son γ Terpinene (11,12%), δ Terpineol (8,18%), α - terpinene (4,03%), fenilpropanoides con un (22,84%), están representados en mayor proporción de la siguiente manera Carvacrol (65.81%), Thymol(14.06%).

Para los extractos de orégano obtenidos por hidrodestilacion, reportado por Salgar, (2002), Tafurt *et al.*, (2005) y Torrenegra (2011) su perfil cromatografico, indica un composición química en donde su compuesto mayoritario es el carvacrol (65,63%), timol (13,7%), γ -terpineno (9,81%) y cariofileno (7,49%). Los porcentajes de los compuestos pueden variar debido a las condiciones de cultivo en las que se encuentra la planta, como condiciones climáticas, altura y posición geográfica.

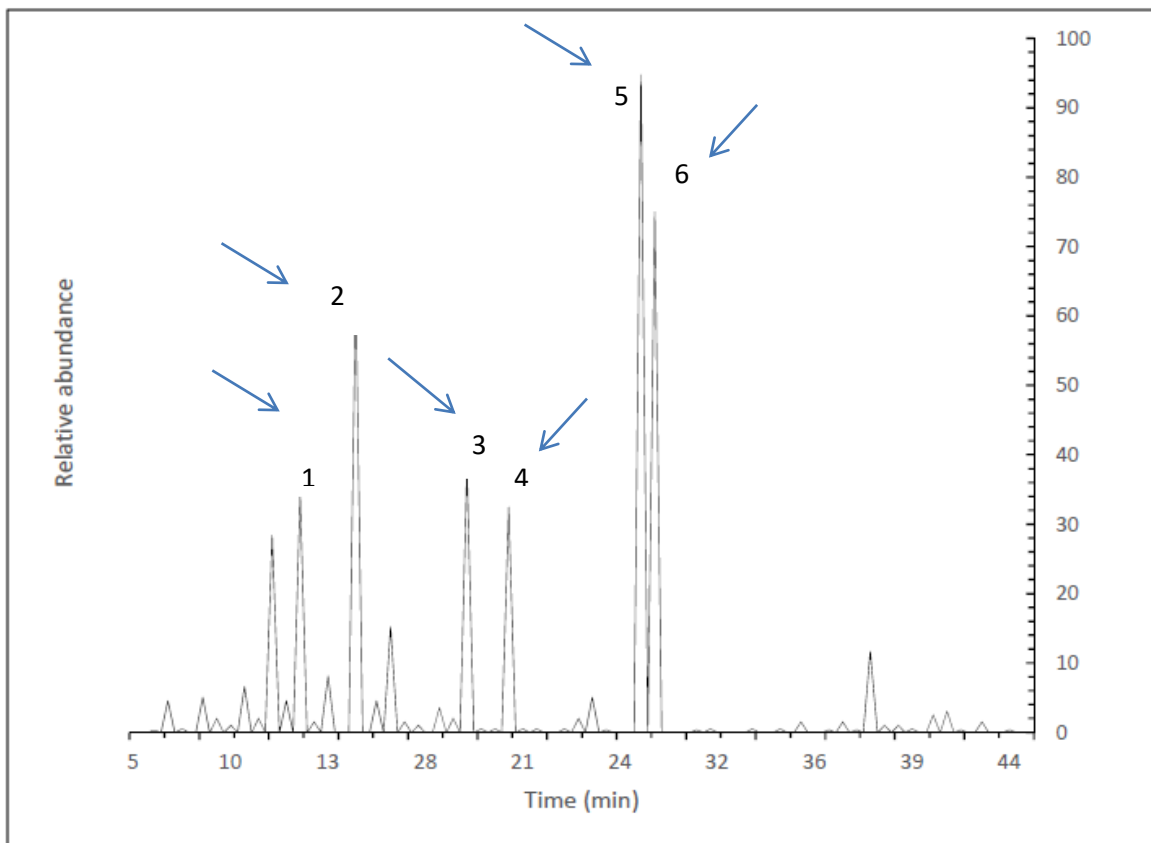


Figura 33: Perfil cromatografico para tratamientos UV - B con adaptación a 48 horas de extracto de *Origanum vulgare* L.

El extracto tratado con radiación UV-B y tiempos de adaptación de 48 horas presento mayor actividad antioxidante.

En la tabla 18 se presenta los 6 quimiotipos principales encontrados en la muestra analizada, a los que se les atribuye la actividad antioxidante debido a sus altas concentraciones en Timol y Carvacrol, los cuales tiene la posibilidad de donar un hidrogeno, así estabilizar el radical libre y evitar las reacciones en cadena. La presencia del β -Fenchyl alcohol le brinda una actividad antimicrobiana.

Tabla 21 Cantidad relativa (%) de los principales quimiotipos (>0,1%) de extractos de *Origanum vulgare* L. obtenidos por hidrodestilación – cohobación y tratados con radiación UV-B.

N° Pico	Identificación Cualitativa	Quimiotipo	Cantidad Relativa
1	Thymol	Fp	20,21%
2	Carvacrol	Fp	15,99%
3	Y Terpinene	M	13,61%
4	δ Terpineol	M	8,10%
5	1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene	MO	7,35%
6	β- Fenchyl Alcohol	C-OH	6,92%

Abreviaturas	Familias de compuestos aislados	Cantidad Relativa
F-P	Fenil propanoide	28,21%
C-OH	Alcohol	3,68%
M-O	Monoterpenos oxigenados	6,43%
S	Hidrocarburos sesquiterpenicos	2,24%
S-O	Sesquiterpenos oxigenados	0,75%
M	Hidrocarburos Monoterpenicos	18,55%

En la tabla N° 18 encontraremos las cantidades relativas (%) pertenecientes a los extractos sometidos a tratamientos con radiación ultravioleta con un tiempo de adaptación de 48 horas, los cuales al igual que el control fueron obtenidos por hidrodestilación. Para esta muestra se obtuvieron valores para los Fenil propanoides (28,21%), donde sus mayores representantes son Thymol (20,21%), Carvacrol (15,99%), continuaron con un orden descendente los hidrocarburos monoterpenicos (18,55%), donde los quimiotipos con mayor presencia fueron los Y Terpinene (13,61%), δ Terpineol (8.10%), α- terpinene (6,05%)

Evidentemente se puede ver como hubo un aumento en la biosíntesis de la familia de fenil propanoides para los extractos que fueron obtenidos del material vegetal sometido a tratamiento con irradiación, uno de los *quimiotipos* que presencio un aumento fue el Timol junto con el Carvacrol, junto con los monoterpenos y-terpinene y δ Terpineol, siendo los compuestos que se encuentran en mayor proporción y son los causales de las beneficios antioxidantes, simulando el mecanismo de acción de la hidroquinona el cual actúa por resonancia y también por enlaces inductivos, agente antioxidante por

excelencia capacidad antioxidante que se le atribuye al aceite esencial de orégano es dependiente de su alta concentración en el quimiotipo Timol y Carvacrol, según (Méndez *et al.* 2015) se ha registrado procesos de oxidación lipídica inhibidos por la presencia de estos compuestos, esto es debido a la mayor estabilidad presentada en radical timoil, la cual se origina por el efecto inductivo del grupo isopropil localizado en la posición *orto* con relación al grupo hidroxilo. El γ -terpinene al igual que el carvacrol y el timol, neutraliza los radicales libres por medio del efecto inductivo, debido a su grupo isopropil en la posición *para*, a diferencia de los compuestos anteriores el δ Terpineol, se oxida, los electrones quedan dentro del anillo aromático ganando insaturaciones y evitando las reacciones en cadena.

Los *quimiotipos* identificados a continuación como el timol (CAS-No. 89-83-8), carvacrol (CAS-No. 499-75-2), γ -terpinene (CAS No.99-85-4), δ Terpineol (CAS No. 8000-41-7), evidenciaron un aumento considerable en el proceso de elicitación lo cual se correlaciona con el aumento de actividad antioxidante en los extractos sometidos a tratamiento con radiación UV-B.

Un detalle importante a resaltar es la presencia del β -Fenchyl alcohol (13,96%) compuesto enantiomero del linalool con propiedades antimicrobianas (Herman *et al.*, 2016), en la muestra control como tercer compuesto más abundante en el extracto, con relación a la muestra irradiada donde se encuentra como el sexto compuesto más abundante (6,92%) y la aparición del compuesto monoterpeno oxigenado 1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene (7,35%), el cual cuenta con un grupo isopropilo en la posición *meta* el cual permite el proceso inductivo.

En los extractos sometidos a tratamiento con radiación UV-B se encontraron valores para γ -terpinene y δ Terpineol de (13,61%) y (8,10%) respectivamente, comparados con los valores de las muestras control γ Terpinene (11,12%) δ Terpineol (8,10), evidentemente la actividad antioxidante se puede asociar al monoterpeno γ -terpinene.

Tabla 22 Comparación entre el valor de la cantidad relativa presente en la muestra control vs la cantidad relativa presente en la muestra tratada con UV-B

N° Pico	Quimitipo control 48 horas	(%)	Quimitipo tratamiento UV-B 48 horas	(%)	Δ (%)
1	Carvacrol	15,81	Carvacrol	15,99	+0,18
2	Thymol	14,06	Thymol	20,21	+6,15
3	β -Fenchyl alcohol	13,96	β - Fenchyl Alcohol	6,92	- 7,04
4	γ Terpinene	11,12	γ Terpinene	13,61	+2,49
5	δ Terpineol	8,18	δ Terpineol	8,10	-0,08
6	1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene	7,85	1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene	7,35	-0,5

La epidermis foliar contiene compuestos que absorben UV, de esta manera se limita la penetración de esta radiación a los tejidos internos. Principalmente estos compuestos son derivados fenólicos, ya que su concentración mayor se encuentra alojada en las vacuolas de las células epidérmicas. La biosíntesis de los compuestos fenólicos está dada por dos rutas conocidas como la del ácido shikímico y la de los fenilpropanoides. (Giordano, 2003).

Estos procesos se ven regulados por enzimas las cuales son activadas en respuesta al ser inducidas a radiación UV-B: la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la chalcona sintasa (CHS) (Sugiura *et al.*, 2000). La enzima PAL da lugar a la biosíntesis de especies tales como fenoles, fitoalexinas y ligninas. (Ryalls *et al.*, 1996). Por otro lado también se ve estimulada la activación de la ruta biosintética de quercetinas (Flavonoles), la cual se ve estimulada por la radiación UV-B en el pericarpio, la síntesis de fenolpropanoides y flavonoles se ve correlacionada positivamente con la radiación UV-B lo que sugiere un proceso metabólico foto-dependiente.

La radiación UV-B como tratamiento elicitor en el aumento de compuestos fotoprotectores en células epidérmicas se ha visto soportada y bien documentada por los autores (Meijkamp *et al.*, 1999; Mazza *et al.*, 2000).

El aumento de fenilpropanoides inducido por radiación UV-B se ve ligado a una disminución de terpenoides y alcoholes, ya que el aumento de quimiotipos fenol, evita la penetración de la radiación UV-B de esta manera se reduce la síntesis de terpenoides y alcoholes, con el fin de proteger la planta de un estrés oxidativo nocivo. Para la ruta biosintética de los fenilpropanoides y terpenos se realiza sobre el sustrato acetyl-CoA.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

- El tratamiento del material vegetal con radiación ultravioleta B tiene una incidencia positiva en la obtención de un mayor rendimiento de *Origanum vulgare* L, evidenciando un aumento el 5% y 1,2% para las muestras adaptadas a 24 y 48 horas respectivamente, pertenecientes al grupo tratado.
- Para la actividad antioxidante analizada por medio de las técnicas ABTS y DPPH en los mejores extractos para los dos grupos, se evidenció que la muestra con 48 horas de adaptación y elicitado presentó un aumento de 0,0013% y 0,124% respectivamente.
- Se reportaron diferencias significativas en la actividad antioxidante mediante la técnica DPPH, probablemente debida a la naturaleza lipolítica del método y su afinidad con los extractos.
- El extracto con tiempos de adaptación de 48 horas presentó el mayor rendimiento en comparación con los demás extractos, 31 % mayor que el control con 24 horas de adaptación.
- La actividad antioxidante de los extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L. se atribuyen a la biosíntesis de quimiotipos fenilpropanoides y terpenoides y mediante el análisis cromatográfico se corroboró dicha información.
- Por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se determinó la composición química del extracto de *Origanum vulgare* L. y los principales componentes elicitados, fueron el Thymol y Carvacrol, de igual forma asociados a la actividad antioxidante del extracto.
- Se reportaron diferencias significativas en la actividad antioxidante mediante la técnica DPPH y ABTS, esto puede ser por la naturaleza bipolar del reactivo ABTS de acuerdo a Reket *al.*, 1999.

- La carencia de investigaciones y reportes de radiación ultravioleta b como tecnología en poscosecha en *Origanum Vulgare* L. convierte esta investigación pionera y en punto de partido para futuras investigaciones.
- Los compuestos mayoritarios en el extracto de *Origanum vulgare* L. fueron el Carvacrol, β -Fenchyl alcohol, Timol, Terpinene y Terpeneol.
- El Carvacrol y el Timol fueron los compuestos que presentaron mayor elicitación.
- Los terpenoides y alcoholes, se vieron afectados por la radiación UV-B debido a la inhibición de su ruta biosintética.

5.2.Recomendaciones

- Implementar otras técnicas de medición de actividad antioxidante para evaluar la existencia de diferencia significativa y correlación entre las técnicas.
- Evaluar otros tiempos de adaptación y si estos tienen correlación y diferencias significativas entre los tratamientos y los controles.
- Se sugiere alternar la radiación ultravioleta con luz natural como se ha realizado en estudios anteriores, donde se evidencio una diferencia significativa de la actividad antioxidante y contenido total de fenoles.
- Implementar medios de extracción convencionales y alternos.

6. Referencias bibliográficas

Acevedo D., Navarro M., Monroy L. (2013) Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*origanum vulgare*). Información tecnológica; 24: 43-48

Alam Md. N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal; 21:143-152.

Albarracín, G. & Gallo, S. (diciembre de 2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando *piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera (tesis de licenciatura). Universidad nacional de Colombia sede Manizales. Pp. 103. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/989/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>

Alma, M.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Digrak, M.; Hirata, T. 2003. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. Pharm. Bull. 26(12): 1725-1729.

Almajano, M. P., 2009. Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de Goji. Consorci Escola Industrial de Barcelona. Septiembre–Octubre. Barcelona. España.

Amadio, C., Medina, Rosa., Dediol, C., Zimmermann, M., Miralles, S.(2011) Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. Rev. FCA UNCUYO. 43(1): 237-245.

Anzora, A., Fuentes, C. (junio de 2008). Obtención de un colorante a partir de *Musa paradisiaca* (PLATANO VERDE) con aplicación en la industria textil. (Tesis de licenciatura). Universidad del salvador. Pp. 38. Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/2921/1/16100230.pdf>

A.O.A.C. 2004. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists.E.U.A. Washington, D.C.

Arango, G.(2010). Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido Shikímico. Universidad de Antioquia. Medellín. Pp. 18-19. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/355494265/shikimico-pdf>

Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., Gonzales de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN* 54(1)

Arnous, A., Makris, D., Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp. Anal.* 15: 655-665.

Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mut. Res.* 52(3): 9-20.

Ávalos, A. & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.

Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(6), 1076–9.

Bauer, Kurt., GARBE, Dorothea. (2001) *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. Fourth Completely Revised Edition.* Wiley-VCH. Weinheim. 176-177.

Beyer/ Walter, versión española de la 19ª edición Alemana *Manual de química orgánica.*

Brand, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. technol.* 28: 25-30.

Burt, S.A., Van der Zee, R., Koets, Ad. P., De Graaff, A. M., Van Knape, F., Gaastra, W., Haagsman, H. y Veldhuizen, J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escheria Coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiolog*, 73(14):4484-4490.

Caldwell, M. M. Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B., Ziegler, H. (Eds.). *Plant response to solar ultraviolet radiation.* (1981) *Encyclopedia of plant Physiology, Physiological Plant Ecology*, Springer – Verlag. 12(1): 169:197.

Castro, D., Díaz, J., Serna, R., Martínez, M., Urrea, P., Muñoz, K., Osorio, E. (2013). Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. (Universidad Católica de Oriente). 94p. Recuperado de <http://www.uco.edu.co/investigacion/fondoeditorial/libros/Documents/Libro%20Plantas%20Aromaticas%202013.pdf>

Carrasco L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas. IDESIA 27 (3): 59-76

Clarke, S., (2008). Essential chemistry for aromatherapy. Second edition. Churchill livingstone. Elsevier. 320 p.

Ceaușescu, E.(1984). La polimerización estereoespecifica del isopreno. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de [https://books.google.com.co/books?id=Rf6-isl37FEC&pg=PA8&lpg=PA8&dq=Ceau%20C5%9Fescu,+E.+\(1984\).+La+polimeri](https://books.google.com.co/books?id=Rf6-isl37FEC&pg=PA8&lpg=PA8&dq=Ceau%20C5%9Fescu,+E.+(1984).+La+polimeri)

Cerpa, M. (2007) Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid. Recuperado de <http://www.anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceites-esenciales.pdf>

Cheng, Z., Moore, J., YU, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*. 40: 1-7.

Cisneros, L. (2003). The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables. *Journal of food science*. 68 (5): 1560-1565.

Chun, S.S., Vatter, D., Lin, Y., Shetty, K.(2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem*. 40: 809-816.

Copia, J., Gaete, H., Zuñiga, G., Hidalgo, M., Cabrera, E. (2012). Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella* sp. *Latin american journal of aquatic research*. 40(1).

Dos Santos, F., Arimatéia, J., Gracas, A., Lima, S., Reis, F. Composition and Biological Activity of Essential Oil from *Lippia organoides* H.B.K. *J. Essen. Oil Res*. 2004. 16: 504-506.

Dozal, M. (2010). Técnica de análisis aceite esencial de orégano por cromatografía de grasas. Institutotecnológico de Durango. Recuperado de <http://tecno.cruzfierro.com/residencias/05040909-dozal-residencia>

Felix, F., Jorge, M., Zeneida, T., Margareth, M., Julio Cesar, E. (2013). Evaluación de las condiciones de extracción por hidrodestilación-cohobación del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea Morelet var. Caribaea* (droga seca). 25(1).

Ferré, (2010). Diseño factorial completo 2², Grupo de Quimiometria y Cualimetria. Universidad Rovira i Virgili (Tarragona)

Fiscus, El., FI, Booker. (1995). Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity. *Photosynthesis Research* 43: 81 – 92.

Floegel A, Kim DO Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011; 24 (7): 1043-1048.

Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80: 192,5-1941.

Frederick JE., He Snell., Ek Heywood, (1989). Solar ultraviolet radiation at the Earth's surface. *Photochemistry and Photobiology.* 50: 443 – 450.

Fukomoto, L. R., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agriculture and food chemistry*. Vol 48 Pp: 3597-3604.

García M., E, Fernandez S., I, Fuentes L, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu. Universitat Politecnica de Valencia.

García R., M, Palou E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Universidad de las Américas.

Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P., Mosquera, A., Tamayo, A., Lopera, Y., Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6):519-528.

Giordano, C. (2003). Efectos de la radiación ultravioleta-B solar sobre *Gunnera magellanica*, una planta nativa de tierra del fuego. Universidad de Buenos Aires.

GIUSTI, M.M., WROLSTAD, R., E. Unit.F1.2.1-13. (2001). Anthocyanins.Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: Current Protocols in Food Anal.Chem. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/230254710_Characterization_and_Measurement_of_Anthocyanins_by_UV-Visible_Spectroscopy

Glicerio, L., Osorio, F., M,Torrenegra., M, E., Gonzales, J.(2015). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *plectranthus amboinicus* L.Rev.Cub. Far. 49(4):708-718.

Granados, C., C., Yañez, R, X, Santafé P. (2012) Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calypus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander.Bistua. 10(1): 12-23.

Grob, L.,John Wiley & Sons.Inc, (1995) Modern practice of gas chromatography. New York: 896.

Herman, A., Tambor, K. (2016) Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. Curr Microbiol. 72(2):165-172.

Hollósy F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells.Micron. 33: 179-197.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.J. Agric. Food Chem.53: 1841-1856.

Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Rad. Biol. Med. 30(4): 433- 46.

Jansen, M., Gaba, V., Greenberg, B., (1998).Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Trends in plant science. 3: 131 – 135.

Jaramillo, B., Duarte,E, Martelo, I. (2011) Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. Rev cubana Plant Med. 16(2).

Katsube ,N., Keiko, I., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. (2003). Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 51: 68-75

Kim, D-O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals.*J. Agric. Food Chem.* 50: 3713-3717.

Kintzios, E. Orégano. The genera *Origanum* and *Lippia*. Taylor & Francis. 2002. 267 p.

Kirchhoff, F., Zamorano, C., Casiccia. (1997). UV-B enhancements at Punta Arenas, Chile.*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38: 174 – 177.

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A. (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos.*Cienc. Technol. Aliment.*25 (4).

Lawrence, Brian M. *Essential Oils* (1995-2000).Editor Natural Flavor and Fragrance, Materials Perfumer &Flavorist.PublishedbyAllured Publishing Corporation. 2003; pp. 26-29; 146-148; 225-235.

Linares, P. *Prácticas de química de los aceites esenciales*. Universidad de Jaén. 2008.

López, JB., Rojano, B., Lasso, C., Sánchez, I. (2008). Evaluación genotóxica y citotóxica del isoespintanol en cultivos de linfocitos humanos. Tercer Congreso Colombiano De Biotecnología - Segundo Seminario Internacional de Bionegocios. Cartagena.

Masada, Y. (1997). *Analysis of Essential Oils by gas chromatography and Mass spectrometry*, Ed, John Wiley, N.Y, 330 p.

Mazza, C., Boccalandro, E., Giordano, V., Battista, D., Scopel, A.Ballare, C. (2000). Functional Significance and Induction by Solar Radiation of Ultraviolet-Absorbing Sunscreens in Field-Grown Soybean Crops. *122*(1): 117-126.

Meijkamp, B., Aerts, R., Van Der Staaij, J., Tosserams, M., Ernst, W., Rozema, J.; (1999). Effects of UV-B on secondary metabolites on plants. In: Rozema J, editor; stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems. Leiden, The Netherlands: BackhuysPublishers. pp. 71–100.

Méndez, G., Osorio, M., Torrenegra, M., Gonzales J. (2015). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *plectranthus amboinicus* L. Rev cubana de farmacia. 49(4):708-718.

Moon, J.K., Shilbamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1655 – 1666.

Muñoz, A., Ramos, D., Alvarado, C., Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Rev Soc Quim Perú. 73(3):142 – 149.

Namdeo, A. (2007). Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews.* 1 (1): 69-79.

Ocampo, D., Valverde, L., Colmenares, J., Isaza, H. (2014). Fenoles totales y actividad antioxidante en hojas de dos especies colombianas del genero *Meriania*(melastomataceae). Rev.Colomb.Quim. 43(2):41-46.

Pérez C.P., Ulrichs, C., Huyskens-Keil, S., Schreiner, M., Krumbein, A., Schwarz, D. and Kläring, H.P. 2009. Composition of carotenoids in tomato fruits as affected by moderate UV-B radiation before harvest. *Acta Hort. (ISHS).* 821: 217-222.

Pérez C.P., Ulrichs, C., Huyskens-Keil, S. 2010. Physiologische Veränderungen in fruchten der Solanaceengewächse in Abhängigkeit von physikalischen elicitoren während der production und nach der Ernte. Humnoldt – Universität zu Berlin. ISBN 978-3- 86247-066-2.1-115

Peréz, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev. Cubana de invest Bioméd. 2(1): 48-57.

Peréz, G., T. (2003) Los flavonoids: antioxidantes o prooxidantes. Centro de investigaciones Biomédicas. Instituto de ciencias básicas y preclínicas. Rev cubana Invest Biomed 22(1): 48 – 57.

Pinto, M., Lizana, C., Pastenes, C., Riquelme, A., Berti, M., (2000). Efecto de la radiación ultravioleta-B sobre el crecimiento y la fotosíntesis de siete

variedades de trigo (*Triticumaestivum L.*). Revista Chilena de Historia Natural. 73:55-66.

Poulose, A.J., Croteau, R. (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of gamma-terpinene to p-cymene and thymol in thymus vulgaris L. Arch. Biochem. Biophys. 187: 307-314.

Prior, L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003). Assay for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) plasma and other biological and food samples. J. Agric. Food Chem. 51: 3273-3279.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 53: 4290-4302.

Puma, Lupe. (2010). Eficiencia del ácido ascórbico, ácido salicílico y extracto de dulcamara (*Bryophyllum gastonis B.*) en la prevención de mildew veloso (*Perenosso pulverulenta*) en Gypsophila (*Gypsophila paniculata*) variedad party time. Universidad Politecnica Salesiana. Cayambe.

Ramírez, R., A. (2016) Evaluación del efecto de la radiación UV-B durante la poscosecha en la calidad de los extractos de tomillo (*Thymus vulgaris L.*). (Tesis Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/51914/>

Ray, M. (2002). Flavor, fragrance and odor analysis. Ed. Marcel Dekker, INC., New York; 424 p

Re, R., Pellregini, N., Proteggente, A., Pan-Nala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26(9-10): 1231-1237.

Rivera, D, D. (2008). Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del genero piper y evaluación de la actividad citotóxica. (Tesis en química). Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2677.pdf

Rojano, B., Gaviria, C., Gil, M., Saez, J., Schinella, G., Tournier, H. (2008) a. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae* 15(1):173-181.

Rojano, B., Saez, J., Schinella, G., Quijano, J., Vélez, E., Gil, A. (2008)b. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2- Isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J Mol Struct* 877:1- 6.

Rocha, N.E., Gallegos, J.A., Gonzalez, R.F., Ramos, M., Rodriguez, M.E.; Reynoso, R.; Rocha, A., Roque, M.R.(2007). Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. *Food Chem.* 102: 330-335.

Roy G.; Gies P.; Elliot G.(1990) Ozone depletion. *Nature* 347: 50 – 56.

Ruiz, C., Tunarosa, F., Martínez, J., Stashenko, E. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia* organoides H.B.K, obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia Techn.* 2007. 33: 325-328.

Salgar, W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in vitro de aceites esenciales extraídos de las plantas pertenecientes a la familia Labiatae. Tesis de maestría. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga. 2002.

Sánchez, F.J. (2006). Extracción De Aceites Esenciales. Experiencia colombiana. II Segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas. Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. (2006). Natural products isolation. Humana Press. 515p.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287–306.

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1era. Edición. Colombia. Pp179-189,198-204,247.

Skoog *et al.* 2001. Química Analítica. 7ª. Edición. Mexico. Editorial McGraw-Hill- 687 – 696.

Souza Brito, A. R. M. 1(995). Farmacologia de plantas medicinais. En: Staci, L. C. plantas medicinais: arte e ciencia. Um guia de estudo interdisciplinar. UNESP, 87:97.

Stashenko, E., Ruíz, C.A., Arias, G., Durán, D.C., Salgar, W., Cala, M., Martínez, M.R. (2010) a *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. J. Sep. Sci. 33: 93-103.

Stashenko, R., Martinez, R.J.,(2010) b. Algunos aspectos practicos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. S.C. 2(1):29 - 47.

Sugiura M, Takeda Y. Nucleic acids. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. pp. 260- 310. Buchanan BB, Gruissen W, Jones RL (eds). Rockville, Am Soc Plant Physiol, 2000.

Tafurt G, Geovanna; Martinez, Jairo R and Stashenko, Elena E. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. Rev.Colomb.Quim. 2005; 34(1): 43-55

Taiz, L., Zeiger, E.(2002) Plant Physiology. Boston: Sinauer Associates, 171-175.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido,EM., Garrido, J, Borges, F.(2013).Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. Biomed Res Int.

Torrenegra, M.E. (2014). Evaluación De La Actividad Antioxidante Del Aceite Esencial Foliar Extraído De Especies De Oregano (*Origanum Vulgare*), Oregano “Borde Blanco” (*Origanum Vulgare Ssp*) Y Oreganito (*Lippia Alba*) Cultivado En La Zona Norte Del Departamento De Bolívar (Colombia). (Tesis Maestría) Medellín. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/39674/1/45506760.2014.pdf>

Van der Merwe,J.(2014). Thymol Synthesis by Acid Catalysed Isopropylation of m-Cresol.(Tesis de Maestría). University of Cap Town. Recuperado de https://open.uct.ac.za/bitstream/item/9311/thesis_ebe_2014_vandermerwe_jacobus.pdf?sequence=1

Vásquez, D. (2012) El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la

actividad antioxidante de los mismos. (Tesis Maestría).Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/9018/1/197514.2012.pdf>

Visentín, A., Cismondi, M., Maestri, D. (2011). Supercritical CO₂ fractionation of rosemary ethanolic oleoresins as a method to improve carnosic acid recovery. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 142–145.

Wang, G. & Schimel, D. (2003). Climate change, climate modes, and climate impacts. *Annu.Rev. Environ. Resour.* 28:1–28.

Williams, B., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.Wiss. Technol* 22: 25-30.

Wootton-Beard, Peter C, Moran A, Ryan L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin – Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44: 217-224.

Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J.Agric. Food Chem.* 52: 4026-37.

Zitlalpopoca A. (2008). Destilación Simple. Laboratorio de procesos de separación. Universidad Iberoamericana. Ciudad de México.

Zuleta, A., Esteve, M., Frigola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*; 114: 310-316.

Anexos

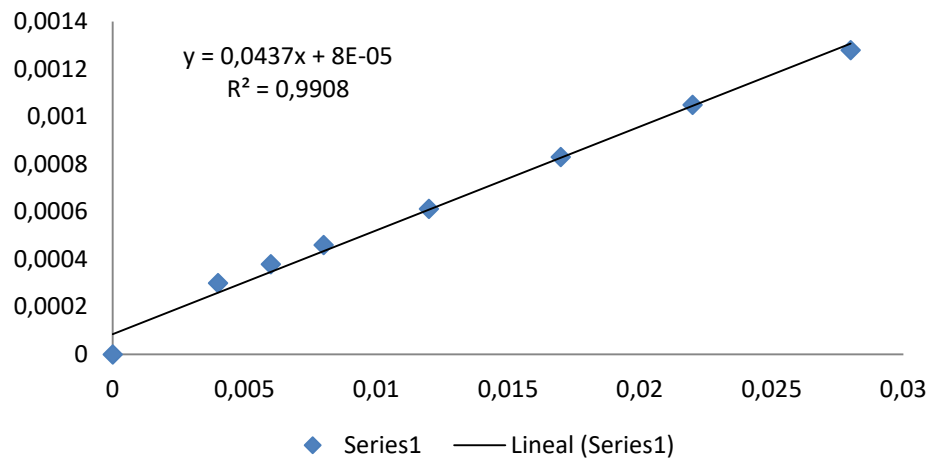
A. Anexo A: Curvas de calibración para cada uno de los métodos empleados en la medición de la actividad antioxidante y contenido total de fenoles (CTF)

Actividad antioxidante	Curva de calibración	
DPPH	$Y = 0,0437x + 8E-05$	$R^2 = 0,9908$
ABTS	$Y = 0,4847x + 0,0066$	$R^2 = 0,9912$
FOLIN CIOCALTEU	$Y = 0,0067x - 0,0025$	$R^2 = 0,9966$

Determinación de la actividad antioxidante por medio de método de atrapamiento de radicales 2,2'- difenil-1- picrilhidrazil (DPPH)

curva de calibración DPPH	
Concentración (mg/mL)	Absorbancia (517nm)
0	0
0,004	0,0003
0,006	0,00039
0,008	0,00046
0,012	0,0006
0,017	0,00087
0,022	0
0,028	0,00128

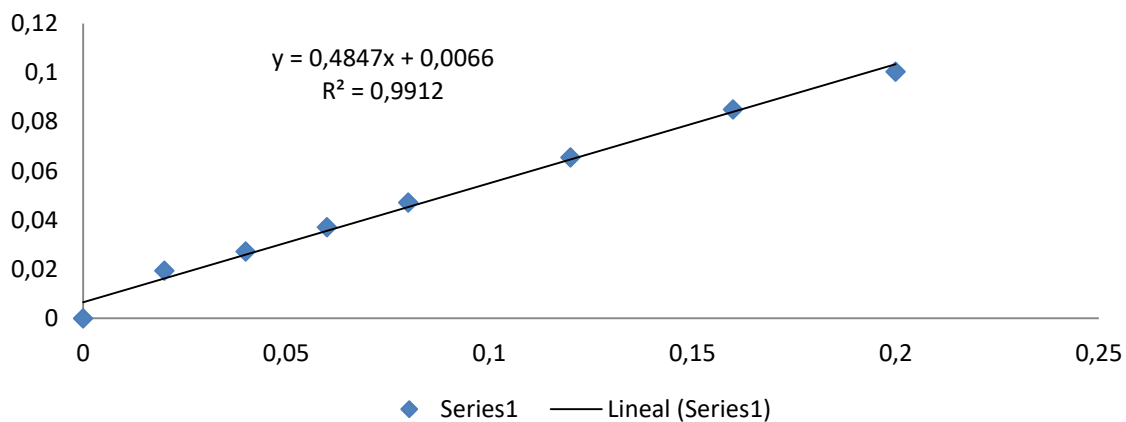
Curva de calibración 517 nm DPPH



Determinación de la actividad antioxidante por medio del método ABTS

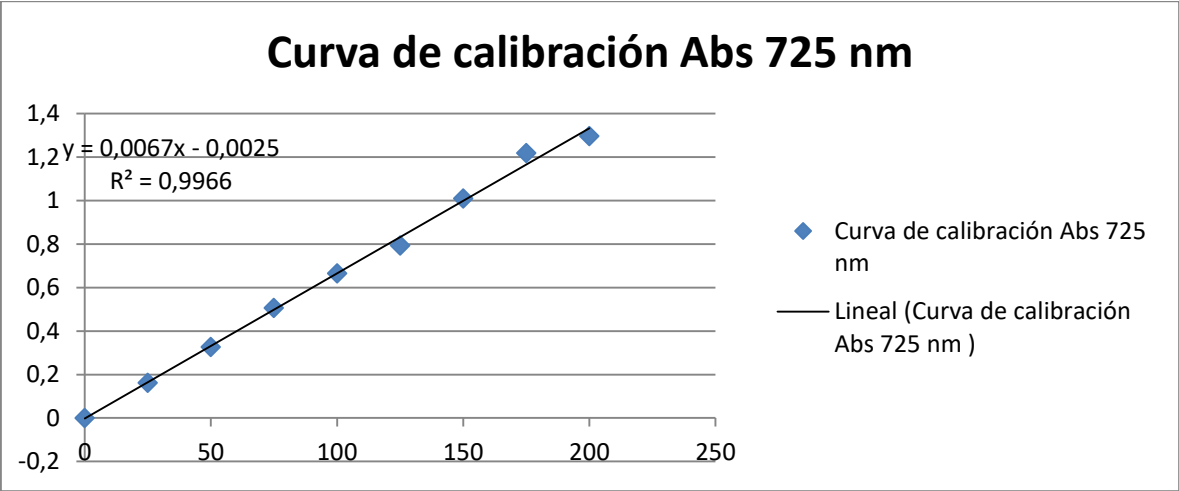
Curva de calibración ABTS	
Concentración (mg/mL)	Absorbancia (734 nm)
0	0
0,02	0,0194
0,04	0,0273
0,06	0,0372
0,08	0,0472
0,12	0,0655
0,16	0,0851
0,2	0,1005

Curva de calibración 734 nm ABTS

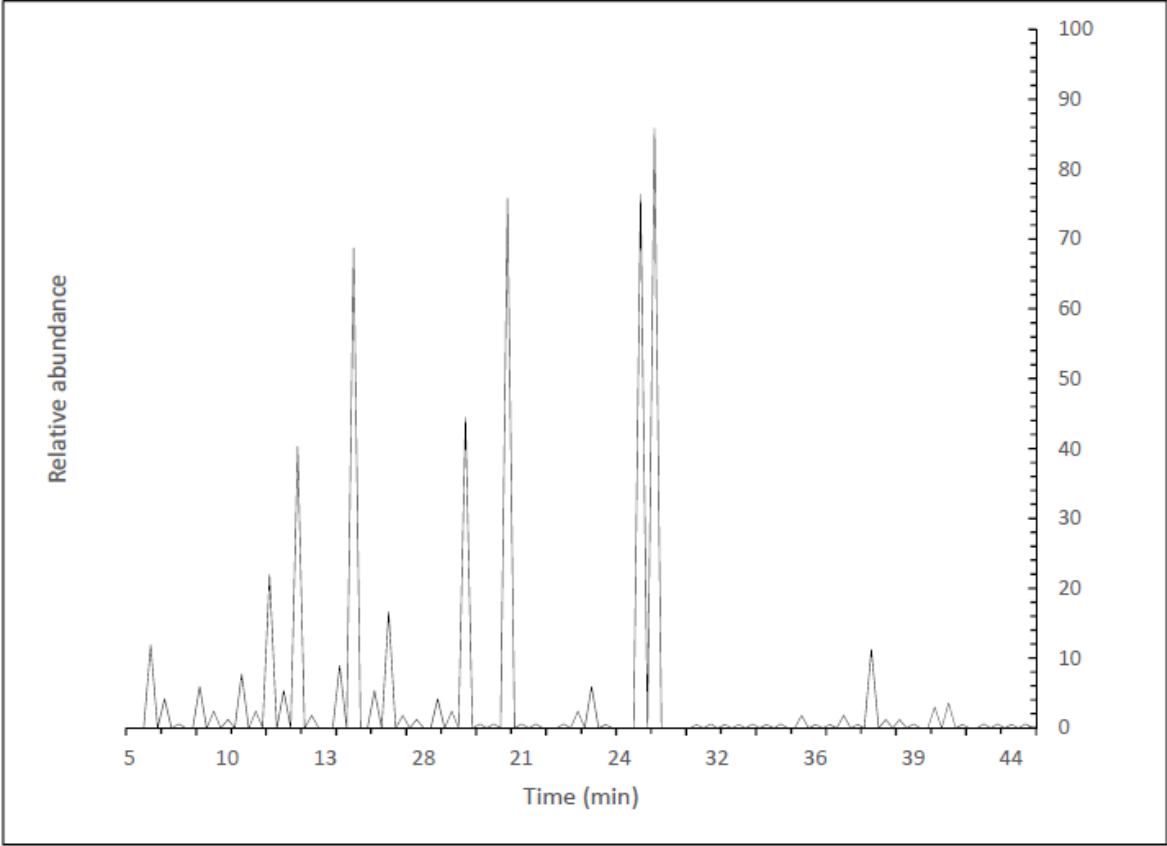


Determinación del contenido total de fenoles por medio del método Folin Clocalteu

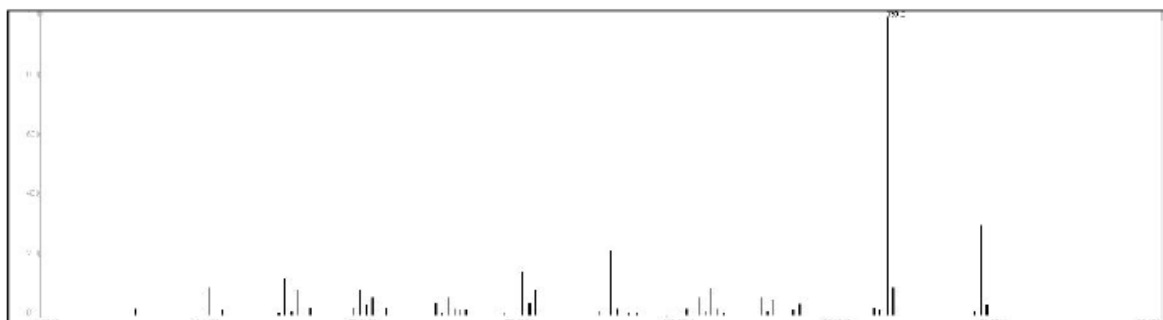
Concentración µg/ mL	Curva de calibración Abs 725 nm
0	0
25	0,163
50	0,327
75	0,507
100	0,666
125	0,794
150	1,01
175	1,219
200	1,297



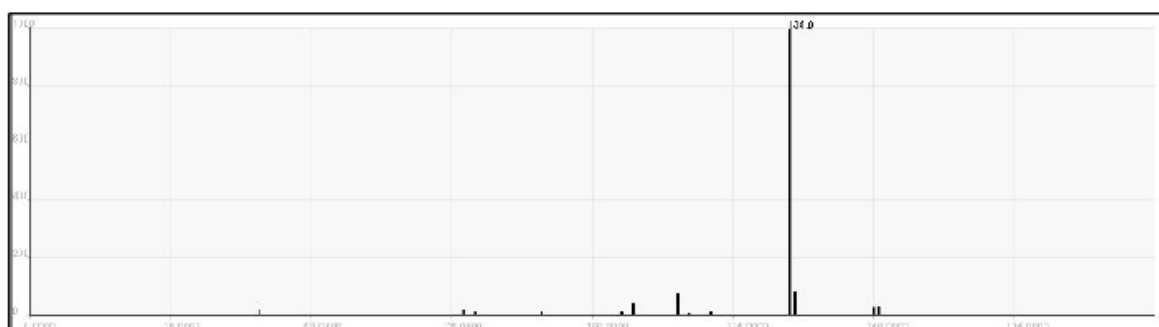
b. Anexo B: Perfiles cromatográficos controles a 48 horas de adaptación.



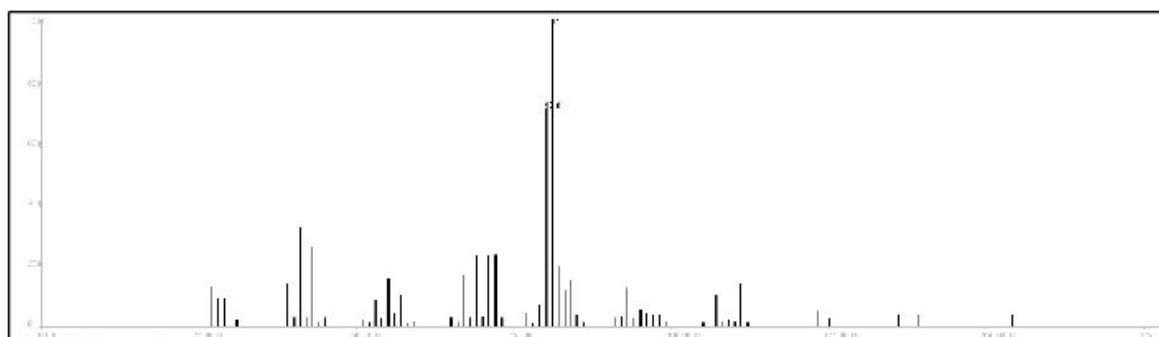
	RT	PEAK AREA	AREA %
Carvacrol	26,76	3864040,75	15,86



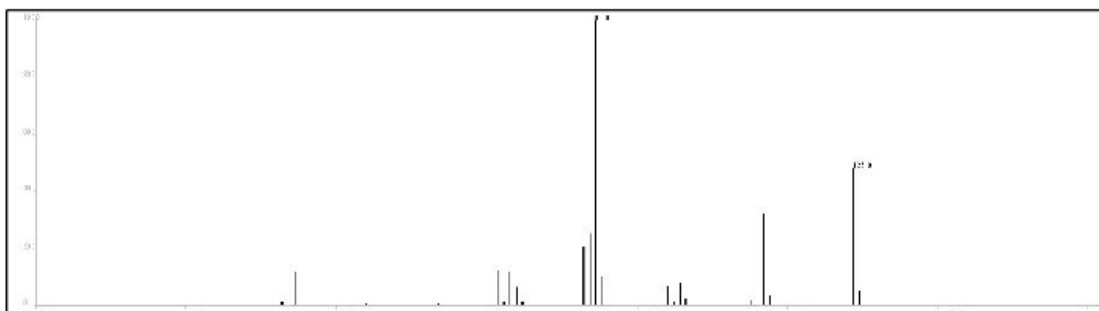
	RT	PEAK AREA	AREA %
Thymol	26,16	3437663,84	14,11



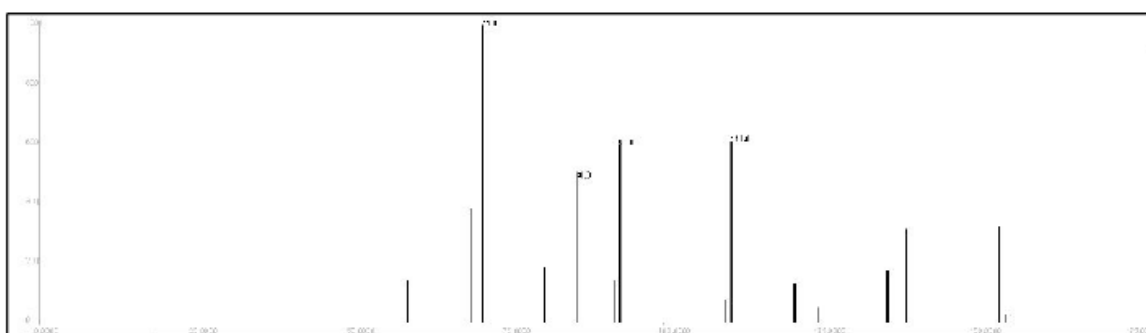
	RT	PEAK AREA	AREA %
β -Fenchyl alcohol	21,16	3411015,28	14,00



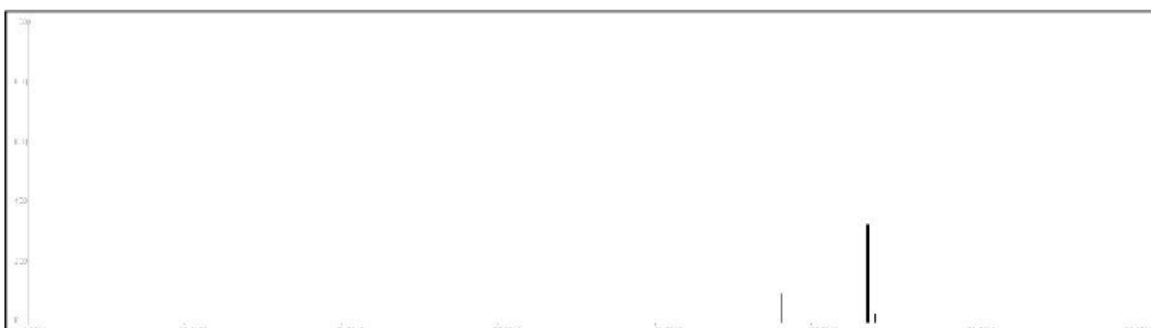
	RT	PEAK AREA	AREA %
γ Terpinene	13,99	3091232,60	12,69



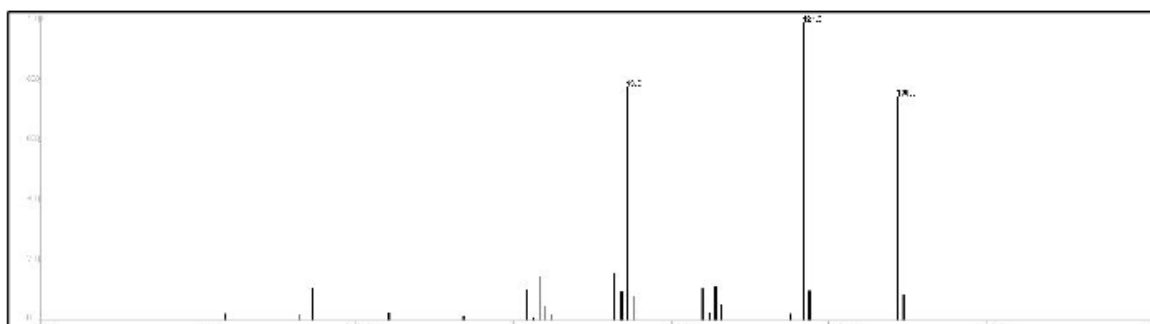
	RT	PEAK AREA	AREA %
δ -Terpineol	20,10	1998641,77	8,21



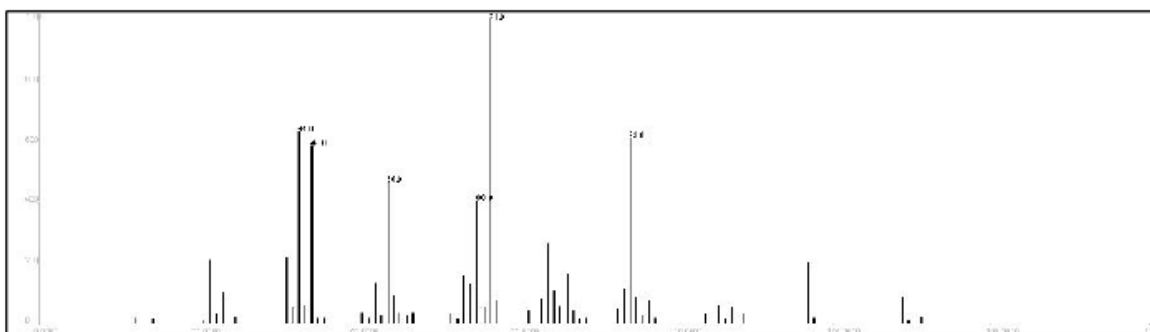
	RT	PEAK AREA	AREA %
1-Methyl-3-(1-methylethyl)-benzene	12,71	1812101,87	7,44



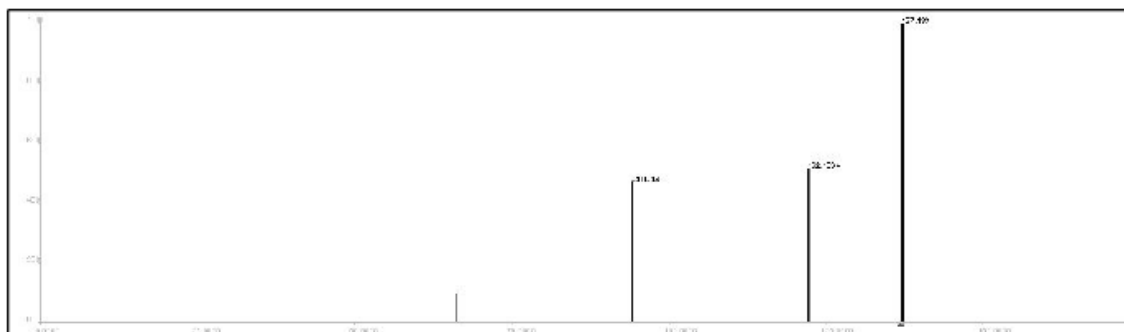
	RT	PEAK AREA	AREA %
α -Terpinene	11,92	985996,61	4,05



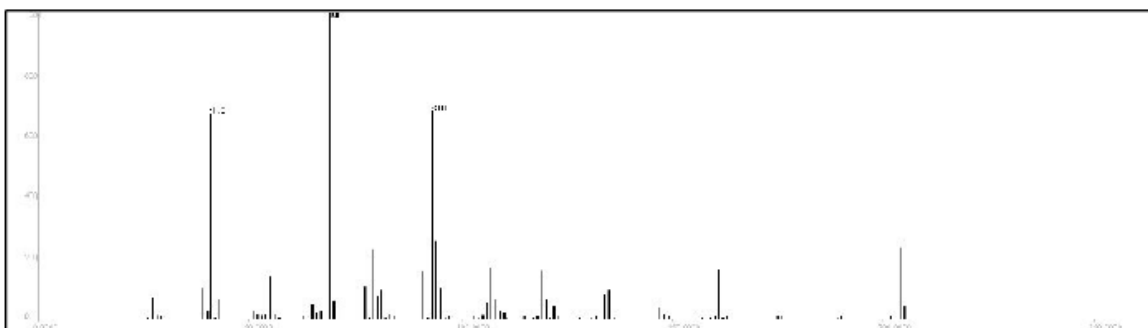
	RT	PEAK AREA	AREA %
Linalool	16,31	746159,59	3,06



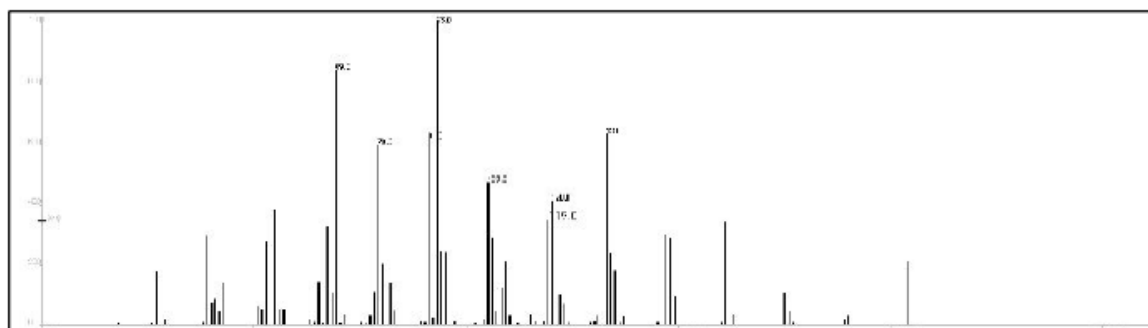
	RT	PEAK AREA	AREA %
α -Thujene	7,99	532971,14	2,19



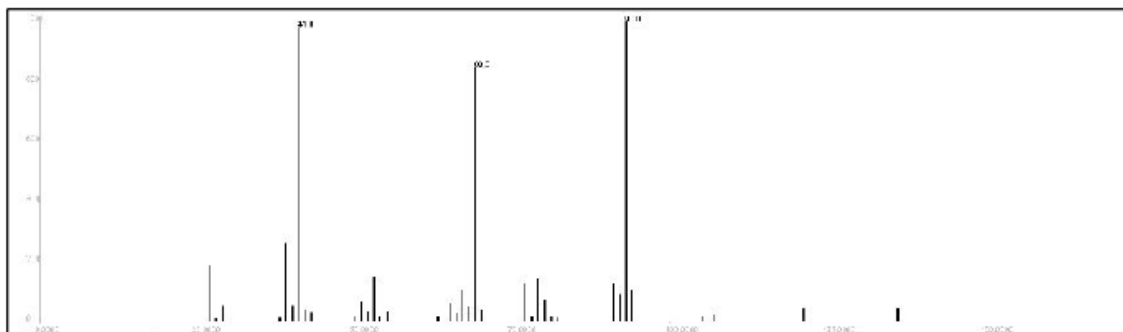
	RT	PEAK AREA	AREA %
β -Bisabolene	37,35	506322,58	2,08



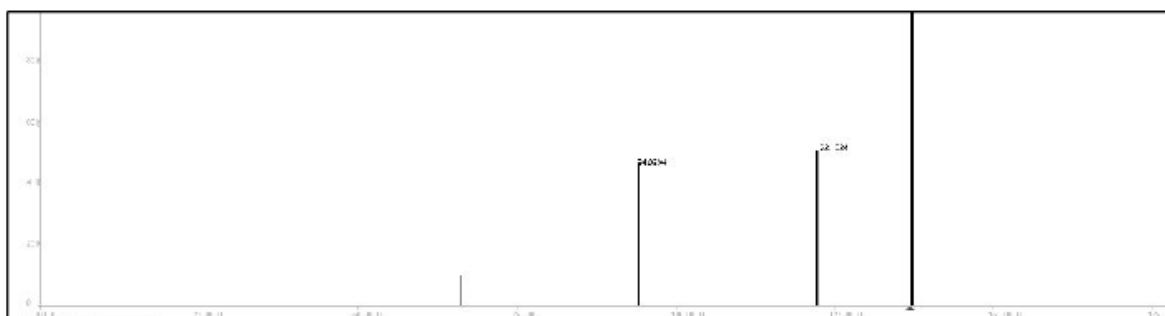
	RT	PEAK AREA	AREA %
trans- β -Ocimene	13,46	399728,35	1,64



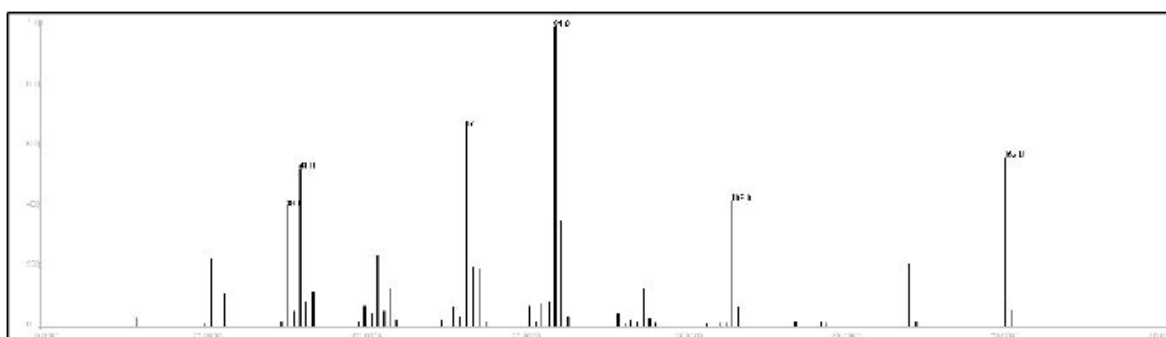
	RT	PEAK AREA	AREA %
β -Myrcene	10,74	346431,24	1,42



	RT	PEAK AREA	AREA %
Sabinene	10,00	266485,57	1,09

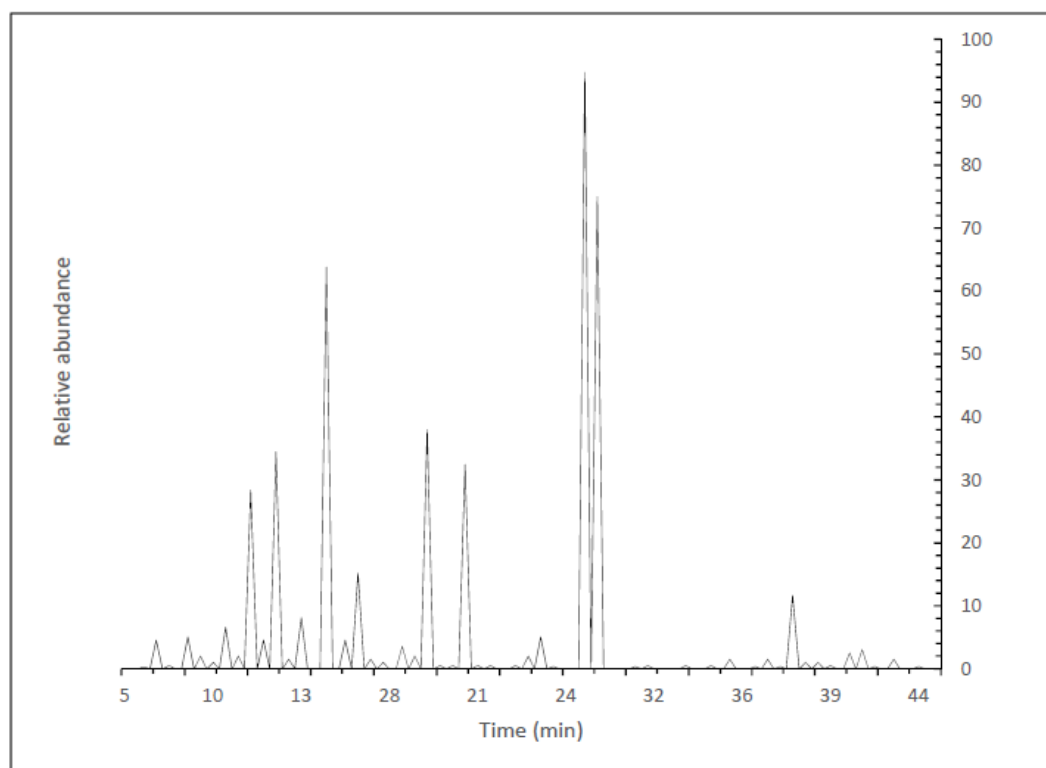


	RT	PEAK AREA	AREA %
Pulegone	23,86	266485,57	1,09

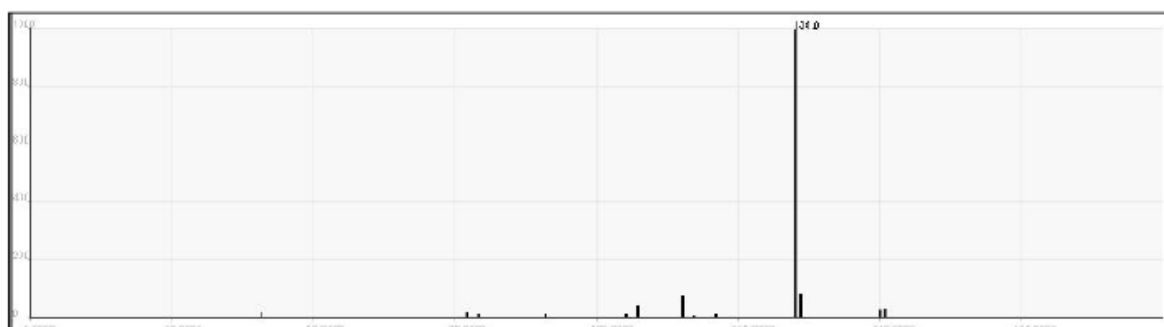


N° Pico	Identificación Cualitativa	Quimiotipo	Cantidad Relativa
1	Carvacrol	Fp	15,81%
2	Thymol	Fp	14,06%
3	β -Fenchyl alcohol	C-OH	13,96%
4	γ Terpinene	M	11,12%
5	δ Terpineol	M	8,18%
6	1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene	MO	7,85%
7	α -terpinene	M	4,03%
8	Linalool	MO	3,49%
9	α -Thujene	M	2,40%
10	β -Bisabolene	S	2,08%
11	Trans- β -Ocimene	M	1,64%
12	Sabinene	M	1,09%
13	Pulegone	MO	1,09%
14	α Phellandrene	M	0,98%
15	β Phellandrene	M	0,98%
16	Cis- β -Ocimene	M	0,98%
17	α -Terpinolene	M	0,98%
18	α -Pinene	M	0,76%
19	α -Terpineol	M	0,76%
20	Menthone	MO	0,76%
21	Caryophyllene oxide	S	0,65%
22	1-Octen-3-ol	C-OH	0,55%
23	(+)-Spathulenol	S	0,55%
24	β -Pinene	M	0,44%
25	Borneol	M	0,44%
26	Carvacryl methyl ether	MO	0,44%
27	Eucalyptol	MO	0,33%
28	Trans-1-Methyl-4-(1-methyl)-2-cyclohexen-1-ol	MO	0,33%
29	Germacrene D	SO	0,33%
30	Bicyclogermacrene	SO	0,33%
Abreviaturas	Familias de compuestos aislados		Cantidad Relativa
F-P	Fenil propanoide		22,84%
C-OH	Alcohol		7,53%
M-O	Monoterpenos oxigenados		7,56%
S	Hidrocarburos sesquiterpenicos		1,89%
S-O	Sesquiterpenos oxigenados		0,50%
M	Hidrocarburos Monoterpenicos		24,45%

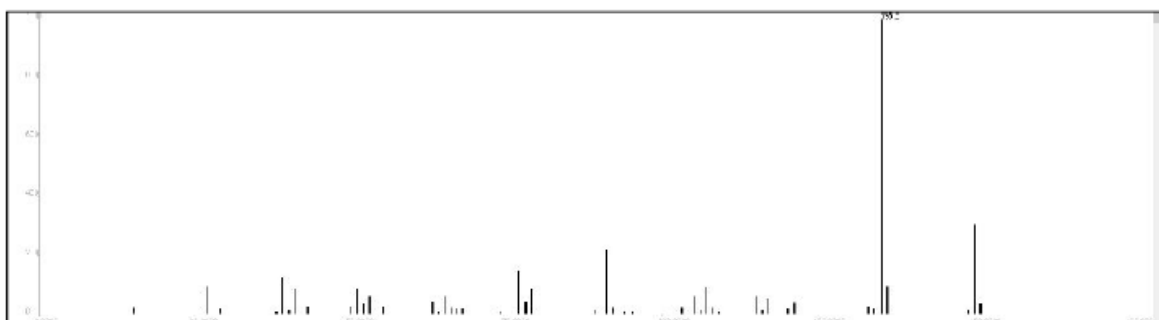
Perfiles cromatográficos tratamiento a 48 horas de adaptación



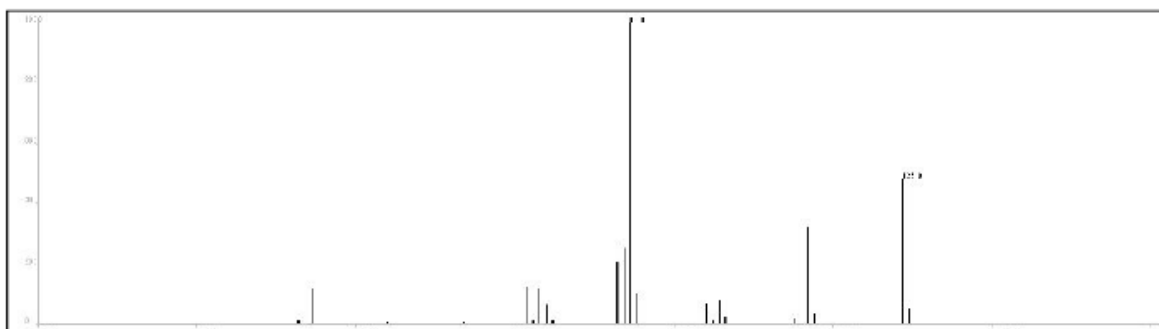
	RT	PEAK AREA	AREA %
Thymol	26,16	7579486,63	20,21



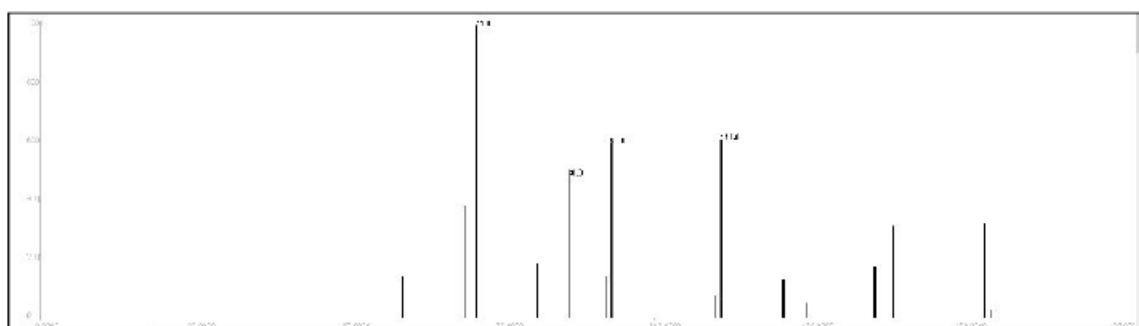
	RT	PEAK AREA	AREA %
Carvacrol	26,76	5998738,08	15,99



	RT	PEAK AREA	AREA %
γ Terpinene	13,99	5107033,77	13,61



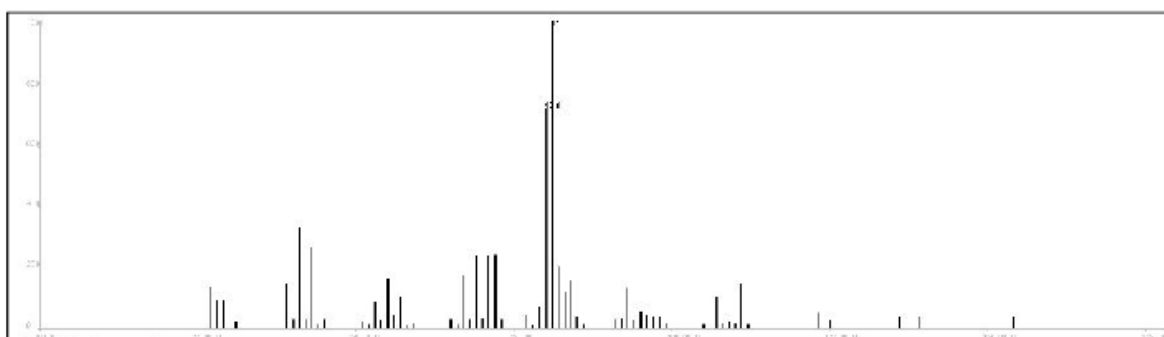
	RT	PEAK AREA	AREA %
δ -Terpineol	20,10	3039901,05	8,10



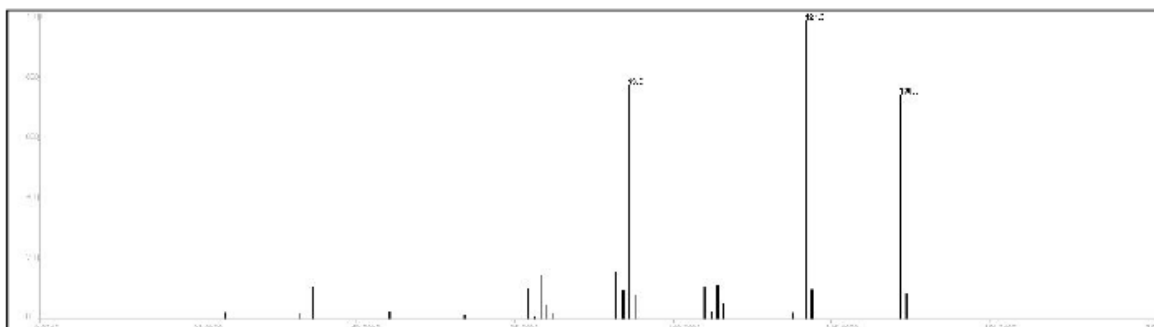
	RT	PEAK AREA	AREA %
1-Methyl-3-(1-methylethyl)-benzene	12,71	2756176,96	7,35



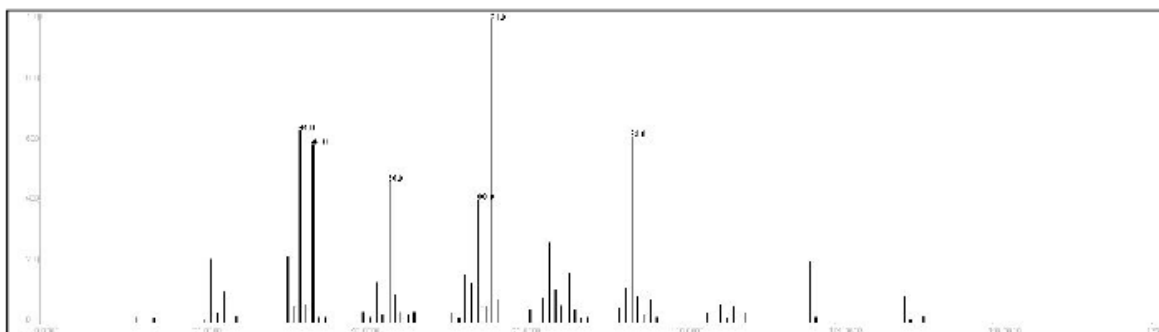
	RT	PEAK AREA	AREA %
β -Fenchyl alcohol	21,16	2594048,90	6,92



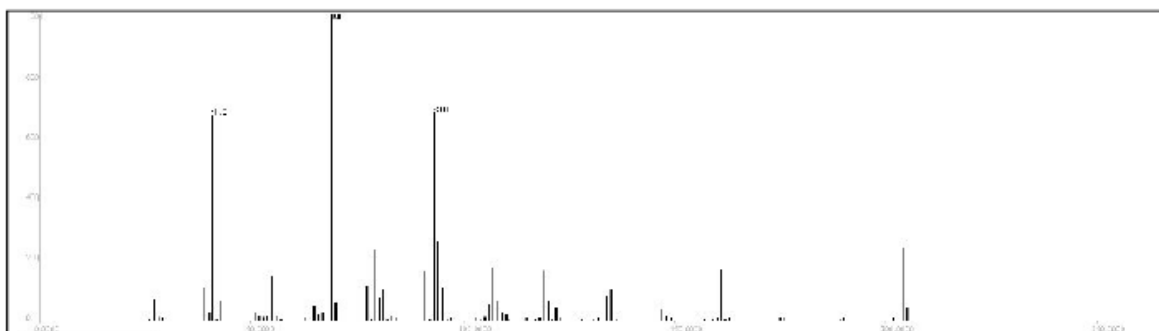
	RT	PEAK AREA	AREA %
α -Terpinene	11,92	2269792,79	6,05



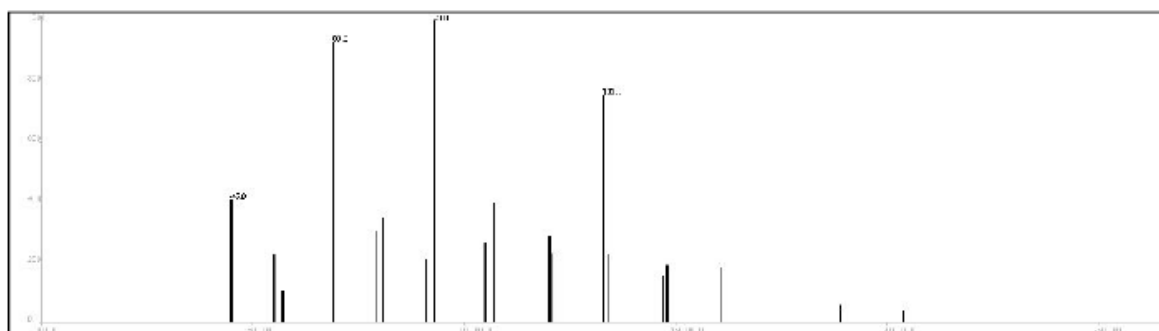
	RT	PEAK AREA	AREA %
Linalool	16,31	1215960,42	3,24



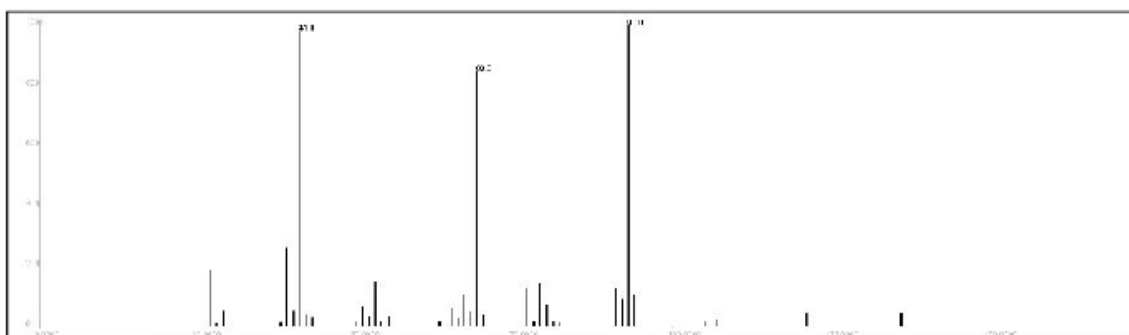
	RT	PEAK AREA	AREA %
β -Bisabolene	37,35	932236,32	2,49



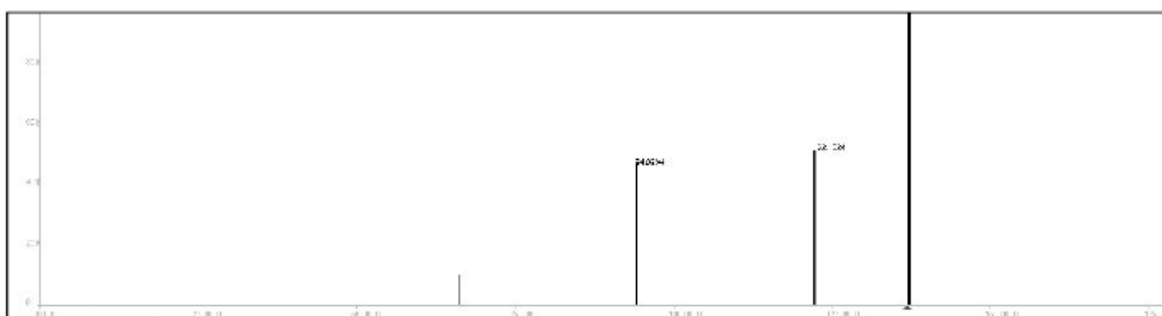
	RT	PEAK AREA	AREA %
cis- β -Ocimene	13,01	648512,22	1,73



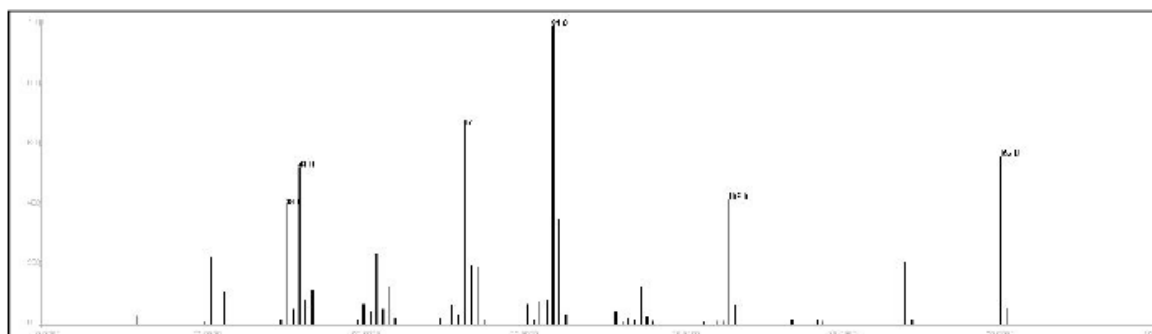
	RT	PEAK AREA	AREA %
β -Myrcene	10,74	526916,18	1,40



	RT	PEAK AREA	AREA %
Sabinene	10,00	405320,14	1,08



	RT	PEAK AREA	AREA %
Pulegone	23,86	405320,14	1,08



N° Pico	Identificación Cualitativa	Quimiotipo	Cantidad Relativa
1	Thymol	Fp	20,21%
2	Carvacrol	Fp	15,99%
3	γ Terpinene	M	13,61%
4	δ Terpineol	M	8,10%
5	1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene	MO	7,35%
6	β- Fenchyl Alcohol	C-OH	6,92%
7	α- terpinene	M	6,05%
8	Linalool	MO	3,24%
9	β-Bisabolene	S	2,49%
10	Cis-β-Ocimene	M	1,73%
11	β-Myrcene	M	1,40%
12	Sabinene	M	1,08%
13	Pulegone	MO	1,08%
14	α-Pinene	M	0,97%
15	β Phellandrene	M	0,98%
16	α-Terpinolene	M	0,97%
17	Menthone	M	0,76%
18	Caryophyllene oxide	S	0,65%
19	(+)-Spathulenol	S	0,54%
20	β-Pinene	M	0,43%
21	α Phellandrene	M	0,43%
22	Borneol	M	0,43%
23	Carvacryl methyl ether	S	0,43%
24	Eucalyptol	MO	0,32%
25	Trans-1-Methyl-4-(1-methyl)-2-cyclohexen-1-ol	MO	0,32%
26	Germacrene D	SO	0,32%
27	Bicyclgermacrene	SO	0,32%
28	Isospathulenol	SO	0,32%
29	1-Octen-3-ol	C-OH	0,22%
30	α-Terpineol	M	0,22%
Abreviaturas	Familias de compuestos aislados		Cantidad Relativa
F-P	Fenil propanoide		28,21%
C-OH	Alcohol		3,68%
M-O	Monoterpenos oxigenados		6,43%
S	Hidrocarburos sesquiterpenicos		2,24%
S-O	Sesquiterpenos oxigenados		0,75%
M	Hidrocarburos Monoterpenicos		18,55%

c. Anexo C: Dosis de radiación aplicada a Orégano con 24 horas después de punto de corte vs Tiempo.

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
1	1,709	47	2,073	93	2,322	139	2,427
2	1,717	48	2,084	94	2,325	140	2,428
3	1,724	49	2,088	95	2,329	141	2,43
4	1,734	50	2,093	96	2,332	142	2,432
5	1,739	51	2,101	97	2,336	143	2,432
6	1,746	52	2,106	98	2,339	144	2,434
7	1,753	53	2,112	99	2,341	145	2,435
8	1,762	54	2,127	100	2,344	146	2,437
9	1,771	55	2,129	101	2,347	147	2,437
10	1,777	56	2,137	102	2,35	148	2,439
11	1,787	57	2,144	103	2,353	149	2,439
12	1,794	58	2,15	104	2,356	150	2,441
13	1,802	59	2,159	105	2,357	151	2,442
14	1,809	60	2,165	106	2,361	152	2,442
15	1,809	61	2,171	107	2,361	153	2,443
16	1,823	62	2,181	108	2,365	154	2,446
17	1,826	63	2,186	109	2,369	155	2,448
18	1,838	64	2,194	110	2,371	156	2,448
19	1,849	65	2,201	111	2,374	157	2,448
20	1,856	66	2,204	112	2,377	158	2,45
21	1,863	67	2,209	113	2,38	159	2,451
22	1,873	68	2,214	114	2,38	160	2,453
23	1,882	69	2,222	115	2,384	161	2,453
24	1,888	70	2,225	116	2,386	162	2,455
25	1,902	71	2,231	117	2,389	163	2,455
26	1,91	72	2,235	118	2,392	164	2,456
27	1,921	73	2,241	119	2,394	165	2,458
28	1,93	74	2,241	120	2,396	166	2,458
29	1,937	75	2,248	121	2,398	167	2,459
30	1,947	76	2,253	122	2,4	168	2,46
31	1,953	77	2,255	123	2,402	169	2,46
32	1,961	78	2,262	124	2,403	170	2,461
33	1,968	79	2,267	125	2,406	171	2,462
34	1,975	80	2,271	126	2,407	172	2,463
35	1,987	81	2,274	127	2,409	173	2,463
36	1,995	82	2,28	128	2,411	174	2,464
37	2	83	2,285	129	2,413	175	2,465
38	2,013	84	2,289	130	2,415	176	2,466
39	2,021	85	2,291	131	2,416	177	2,466
40	2,024	86	2,297	132	2,418	178	2,467

41	2,029		87	2,301		133	2,42		179	2,468
42	2,034		88	2,304		134	2,42		180	2,468
43	2,043		89	2,305		135	2,421		181	2,469
44	2,051		90	2,311		136	2,423		182	2,469
45	2,058		91	2,316		137	2,425		183	2,47
46	2,064		92	2,319		138	2,425		184	2,47

t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)
185	2,47		231	2,478		277	2,478		323	2,475
186	2,471		232	2,478		278	2,478		324	2,475
187	2,471		233	2,479		279	2,478		325	2,475
188	2,472		234	2,479		280	2,478		326	2,475
189	2,472		235	2,479		281	2,478		327	2,475
190	2,473		236	2,479		282	2,478		328	2,475
191	2,473		237	2,479		283	2,478		329	2,475
192	2,473		238	2,479		284	2,478		330	2,475
193	2,474		239	2,479		285	2,478		331	2,475
194	2,474		240	2,479		286	2,478		332	2,475
195	2,474		241	2,479		287	2,478		333	2,475
196	2,475		242	2,479		288	2,478		334	2,474
197	2,475		243	2,479		289	2,477		335	2,474
198	2,476		244	2,479		290	2,477		336	2,474
199	2,476		245	2,479		291	2,477		337	2,474
200	2,476		246	2,479		292	2,477		338	2,474
201	2,476		247	2,479		293	2,477		339	2,474
202	2,476		248	2,479		294	2,477		340	2,473
203	2,477		249	2,479		295	2,477		341	2,473
204	2,477		250	2,479		296	2,477		342	2,473
205	2,477		251	2,479		297	2,477		343	2,474
206	2,477		252	2,479		298	2,477		344	2,474
207	2,477		253	2,48		299	2,477		345	2,473
208	2,477		254	2,479		300	2,477		346	2,473
209	2,477		255	2,479		301	2,477		347	2,473
210	2,477		256	2,479		302	2,477		348	2,473
211	2,477		257	2,479		303	2,476		349	2,473
212	2,477		258	2,479		304	2,476		350	2,473
213	2,477		259	2,479		305	2,476		351	2,473
214	2,477		260	2,479		306	2,476		352	2,473
215	2,477		261	2,479		307	2,476		353	2,473
216	2,477		262	2,479		308	2,476		354	2,473
217	2,477		263	2,479		309	2,476		355	2,473
218	2,477		264	2,479		310	2,476		356	2,473
219	2,477		265	2,479		311	2,476		357	2,473
220	2,477		266	2,479		312	2,475		358	2,473
221	2,477		267	2,479		313	2,476		359	2,473
222	2,478		268	2,479		314	2,476		360	2,473

223	2,478	269	2,479	315	2,476	361	2,473
224	2,478	270	2,479	316	2,475	362	2,473
225	2,478	271	2,479	317	2,475	363	2,473
226	2,478	272	2,479	318	2,475	364	2,473
227	2,478	273	2,479	319	2,475	365	2,473
228	2,478	274	2,479	320	2,475	366	2,473
229	2,478	275	2,478	321	2,475	367	2,473
230	2,478	276	2,478	322	2,475	368	2,473

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
369	2,473	415	2,472	461	2,472	507	2,471
370	2,473	416	2,472	462	2,472	508	2,471
371	2,473	417	2,472	463	2,472	509	2,471
372	2,473	418	2,472	464	2,472	510	2,47
373	2,473	419	2,472	465	2,472	511	2,47
374	2,473	420	2,472	466	2,472	512	2,47
375	2,473	421	2,472	467	2,472	513	2,47
376	2,473	422	2,472	468	2,472	514	2,47
377	2,473	423	2,472	469	2,472	515	2,47
378	2,473	424	2,472	470	2,472	516	2,47
379	2,473	425	2,472	471	2,473	517	2,47
380	2,473	426	2,472	472	2,473	518	2,47
381	2,473	427	2,472	473	2,472	519	2,47
382	2,472	428	2,472	474	2,472	520	2,47
383	2,472	429	2,472	475	2,472	521	2,47
384	2,472	430	2,472	476	2,473	522	2,47
385	2,472	431	2,472	477	2,473	523	2,47
386	2,473	432	2,472	478	2,473	524	2,47
387	2,473	433	2,472	479	2,473	525	2,47
388	2,473	434	2,472	480	2,473	526	2,47
389	2,473	435	2,472	481	2,473	527	2,47
390	2,472	436	2,472	482	2,473	528	2,47
391	2,472	437	2,472	483	2,472	529	2,47
392	2,472	438	2,472	484	2,472	530	2,47
393	2,472	439	2,472	485	2,472	531	2,47
394	2,472	440	2,472	486	2,472	532	2,47
395	2,472	441	2,472	487	2,472	533	2,47
396	2,472	442	2,472	488	2,472	534	2,469
397	2,472	443	2,472	489	2,472	535	2,469
398	2,472	444	2,472	490	2,472	536	2,469
399	2,472	445	2,471	491	2,472	537	2,469
400	2,472	446	2,471	492	2,472	538	2,468
401	2,472	447	2,471	493	2,472	539	2,468
402	2,472	448	2,471	494	2,472	540	2,468

403	2,472	449	2,471	495	2,471	541	2,468
404	2,472	450	2,472	496	2,471	542	2,468
405	2,472	451	2,472	497	2,471	543	2,468
406	2,472	452	2,472	498	2,471	544	2,468
407	2,472	453	2,472	499	2,471	545	2,468
408	2,472	454	2,472	500	2,471	546	2,467
409	2,472	455	2,472	501	2,471	547	2,467
410	2,472	456	2,472	502	2,471	548	2,467
411	2,473	457	2,472	503	2,471	549	2,467
412	2,473	458	2,472	504	2,471	550	2,468
413	2,473	459	2,472	505	2,471	551	2,468
414	2,473	460	2,472	506	2,471	552	2,467

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
553	2,467	599	2,465	645	2,463	691	2,462
554	2,467	600	2,465	646	2,463	692	2,462
555	2,467	601	2,465	647	2,463	693	2,462
556	2,467	602	2,465	648	2,463	694	2,462
557	2,467	603	2,465	649	2,463	695	2,462
558	2,467	604	2,464	650	2,463	696	2,462
559	2,467	605	2,464	651	2,463	697	2,462
560	2,467	606	2,464	652	2,463	698	2,462
561	2,467	607	2,464	653	2,463	699	2,462
562	2,467	608	2,464	654	2,463	700	2,463
563	2,467	609	2,464	655	2,463	701	2,463
564	2,467	610	2,464	656	2,463	702	2,463
565	2,467	611	2,464	657	2,463	703	2,463
566	2,467	612	2,464	658	2,463	704	2,463
567	2,467	613	2,464	659	2,463	705	2,463
568	2,467	614	2,464	660	2,463	706	2,463
569	2,467	615	2,465	661	2,463	707	2,463
570	2,467	616	2,464	662	2,463	708	2,463
571	2,467	617	2,464	663	2,463	709	2,463
572	2,466	618	2,464	664	2,462	710	2,463
573	2,466	619	2,464	665	2,462	711	2,463
574	2,466	620	2,464	666	2,462	712	2,463
575	2,466	621	2,464	667	2,462	713	2,463
576	2,466	622	2,464	668	2,462	714	2,463
577	2,466	623	2,464	669	2,462	715	2,463
578	2,466	624	2,464	670	2,462	716	2,463
579	2,466	625	2,464	671	2,462	717	2,463
580	2,466	626	2,464	672	2,462	718	2,463
581	2,466	627	2,464	673	2,462	719	2,463
582	2,466	628	2,464	674	2,462	720	2,463

583	2,466	629	2,464	675	2,462	721	2,463
584	2,465	630	2,464	676	2,462	722	2,463
585	2,465	631	2,465	677	2,462	723	2,463
586	2,465	632	2,465	678	2,462	724	2,463
587	2,465	633	2,465	679	2,462	725	2,463
588	2,465	634	2,465	680	2,462	726	2,463
589	2,465	635	2,465	681	2,462	727	2,463
590	2,465	636	2,464	682	2,462	728	2,463
591	2,465	637	2,464	683	2,462	729	2,463
592	2,465	638	2,464	684	2,462	730	2,463
593	2,465	639	2,464	685	2,462	731	2,464
594	2,465	640	2,464	686	2,462	732	2,464
595	2,465	641	2,464	687	2,462	733	2,464
596	2,465	642	2,464	688	2,462	734	2,464
597	2,465	643	2,464	689	2,462	735	2,464
598	2,465	644	2,463	690	2,462	736	2,463

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
737	2,463	783	2,466	829	2,466	875	2,464
738	2,463	784	2,466	830	2,466	876	2,464
739	2,463	785	2,466	831	2,466	877	2,464
740	2,463	786	2,466	832	2,466	878	2,464
741	2,463	787	2,466	833	2,466	879	2,464
742	2,463	788	2,466	834	2,466	880	2,465
743	2,463	789	2,466	835	2,466	881	2,465
744	2,463	790	2,466	836	2,465	882	2,465
745	2,463	791	2,466	837	2,465	883	2,465
746	2,463	792	2,466	838	2,465	884	2,465
747	2,463	793	2,466	839	2,465	885	2,465
748	2,463	794	2,466	840	2,465	886	2,466
749	2,463	795	2,466	841	2,465	887	2,466
750	2,463	796	2,466	842	2,465	888	2,466
751	2,463	797	2,466	843	2,465	889	2,466
752	2,464	798	2,466	844	2,465	890	2,467
753	2,464	799	2,466	845	2,465	891	2,467
754	2,463	800	2,466	846	2,465	892	2,467
755	2,463	801	2,466	847	2,465	893	2,467
756	2,463	802	2,466	848	2,465	894	2,468
757	2,464	803	2,466	849	2,464	895	2,47
758	2,464	804	2,467	850	2,464	896	2,47
759	2,464	805	2,467	851	2,464	897	2,47
760	2,464	806	2,467	852	2,464	898	2,47
761	2,464	807	2,467	853	2,464	899	2,471
762	2,464	808	2,467	854	2,464	900	2,471

763	2,464	809	2,467	855	2,464	901	2,471
764	2,464	810	2,467	856	2,464	902	2,471
765	2,464	811	2,467	857	2,463	903	2,472
766	2,464	812	2,467	858	2,463	904	2,472
767	2,464	813	2,466	859	2,463	905	2,472
768	2,464	814	2,466	860	2,463	906	2,473
769	2,465	815	2,466	861	2,463	907	2,473
770	2,465	816	2,466	862	2,463	908	2,474
771	2,465	817	2,466	863	2,463	909	2,474
772	2,465	818	2,466	864	2,463	910	2,474
773	2,465	819	2,466	865	2,463	911	2,475
774	2,465	820	2,466	866	2,463	912	2,475
775	2,465	821	2,466	867	2,464	913	2,475
776	2,465	822	2,466	868	2,464	914	2,475
777	2,465	823	2,466	869	2,464	915	2,475
778	2,466	824	2,466	870	2,464	916	2,475
779	2,466	825	2,466	871	2,464	917	2,475
780	2,466	826	2,466	872	2,464	918	2,475
781	2,466	827	2,466	873	2,464	919	2,476
782	2,466	828	2,466	874	2,464	920	2,476

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
921	2,476	967	2,475	1013	2,468	1059	2,466
922	2,476	968	2,475	1014	2,468	1060	2,466
923	2,476	969	2,475	1015	2,468	1061	2,466
924	2,476	970	2,474	1016	2,468	1062	2,467
925	2,476	971	2,474	1017	2,468	1063	2,467
926	2,476	972	2,474	1018	2,468	1064	2,467
927	2,476	973	2,474	1019	2,468	1065	2,467
928	2,476	974	2,474	1020	2,468	1066	2,467
929	2,476	975	2,473	1021	2,468	1067	2,467
930	2,477	976	2,473	1022	2,468	1068	2,467
931	2,477	977	2,473	1023	2,468	1069	2,467
932	2,477	978	2,473	1024	2,467	1070	2,467
933	2,477	979	2,472	1025	2,467	1071	2,467
934	2,477	980	2,472	1026	2,467	1072	2,467
935	2,478	981	2,472	1027	2,468	1073	2,468
936	2,478	982	2,471	1028	2,468	1074	2,468
937	2,478	983	2,471	1029	2,468	1075	2,468
938	2,478	984	2,471	1030	2,468	1076	2,468
939	2,478	985	2,471	1031	2,468	1077	2,468
940	2,478	986	2,471	1032	2,467	1078	2,468
941	2,478	987	2,471	1033	2,467	1079	2,468
942	2,477	988	2,47	1034	2,467	1080	2,468

943	2,477	989	2,47	1035	2,467	1081	2,468
944	2,477	990	2,47	1036	2,467	1082	2,468
945	2,477	991	2,47	1037	2,467	1083	2,468
946	2,477	992	2,47	1038	2,467	1084	2,469
947	2,477	993	2,47	1039	2,467	1085	2,469
948	2,477	994	2,469	1040	2,466	1086	2,469
949	2,477	995	2,469	1041	2,466	1087	2,469
950	2,477	996	2,469	1042	2,466	1088	2,469
951	2,477	997	2,469	1043	2,466	1089	2,468
952	2,477	998	2,469	1044	2,466	1090	2,468
953	2,477	999	2,469	1045	2,466	1091	2,468
954	2,477	1000	2,469	1046	2,466	1092	2,468
955	2,477	1001	2,469	1047	2,466	1093	2,468
956	2,477	1002	2,469	1048	2,466	1094	2,468
957	2,476	1003	2,469	1049	2,466	1095	2,468
958	2,476	1004	2,469	1050	2,466	1096	2,468
959	2,476	1005	2,469	1051	2,466	1097	2,468
960	2,476	1006	2,469	1052	2,466	1098	2,468
961	2,476	1007	2,469	1053	2,466	1099	2,468
962	2,476	1008	2,469	1054	2,466	1100	2,468
963	2,476	1009	2,469	1055	2,466	1101	2,468
964	2,475	1010	2,469	1056	2,466	1102	2,468
965	2,475	1011	2,468	1057	2,466	1103	2,468
966	2,475	1012	2,468	1058	2,466	1104	2,468

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
1105	2,468	1151	2,471	1197	2,471	1243	2,472
1106	2,468	1152	2,471	1198	2,471	1244	2,472
1107	2,468	1153	2,471	1199	2,471	1245	2,472
1108	2,468	1154	2,471	1200	2,471	1246	2,472
1109	2,468	1155	2,471	1201	2,471	1247	2,472
1110	2,468	1156	2,471	1202	2,471	1248	2,472
1111	2,468	1157	2,471	1203	2,471	1249	2,472
1112	2,468	1158	2,472	1204	2,471	1250	2,472
1113	2,468	1159	2,472	1205	2,471	1251	2,472
1114	2,468	1160	2,472	1206	2,471	1252	2,472
1115	2,468	1161	2,472	1207	2,471	1253	2,473
1116	2,468	1162	2,472	1208	2,471	1254	2,473
1117	2,468	1163	2,472	1209	2,47	1255	2,473
1118	2,469	1164	2,472	1210	2,47	1256	2,473
1119	2,469	1165	2,472	1211	2,47	1257	2,473
1120	2,469	1166	2,472	1212	2,47	1258	2,473
1121	2,469	1167	2,472	1213	2,47	1259	2,473
1122	2,469	1168	2,472	1214	2,471	1260	2,473

1123	2,469	1169	2,472	1215	2,471	1261	2,473
1124	2,469	1170	2,472	1216	2,471	1262	2,473
1125	2,469	1171	2,472	1217	2,471	1263	2,474
1126	2,469	1172	2,472	1218	2,471	1264	2,474
1127	2,469	1173	2,472	1219	2,471	1265	2,474
1128	2,469	1174	2,472	1220	2,471	1266	2,474
1129	2,469	1175	2,472	1221	2,471	1267	2,474
1130	2,469	1176	2,472	1222	2,471	1268	2,474
1131	2,47	1177	2,472	1223	2,471	1269	2,474
1132	2,47	1178	2,472	1224	2,471	1270	2,474
1133	2,47	1179	2,472	1225	2,471	1271	2,474
1134	2,47	1180	2,472	1226	2,471	1272	2,474
1135	2,47	1181	2,472	1227	2,471	1273	2,474
1136	2,47	1182	2,472	1228	2,471	1274	2,474
1137	2,47	1183	2,472	1229	2,471	1275	2,475
1138	2,47	1184	2,472	1230	2,471	1276	2,475
1139	2,47	1185	2,472	1231	2,471	1277	2,475
1140	2,47	1186	2,472	1232	2,471	1278	2,475
1141	2,47	1187	2,472	1233	2,471	1279	2,475
1142	2,47	1188	2,472	1234	2,471	1280	2,475
1143	2,47	1189	2,472	1235	2,471	1281	2,475
1144	2,47	1190	2,471	1236	2,471	1282	2,475
1145	2,47	1191	2,471	1237	2,471	1283	2,475
1146	2,47	1192	2,471	1238	2,472	1284	2,476
1147	2,47	1193	2,471	1239	2,472	1285	2,476
1148	2,471	1194	2,471	1240	2,472	1286	2,476
1149	2,471	1195	2,471	1241	2,472	1287	2,476
1150	2,471	1196	2,471	1242	2,472	1288	2,476

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
1289	2,476	1335	2,476	1381	2,475	1427	2,476
1290	2,476	1336	2,476	1382	2,475	1428	2,476
1291	2,477	1337	2,476	1383	2,475	1429	2,476
1292	2,477	1338	2,475	1384	2,475	1430	2,475
1293	2,477	1339	2,475	1385	2,475	1431	2,475
1294	2,477	1340	2,475	1386	2,476	1432	2,475
1295	2,477	1341	2,475	1387	2,476	1433	2,475
1296	2,477	1342	2,475	1388	2,476	1434	2,475
1297	2,477	1343	2,476	1389	2,476	1435	2,475
1298	2,477	1344	2,475	1390	2,476	1436	2,475
1299	2,477	1345	2,475	1391	2,477	1437	2,475
1300	2,477	1346	2,475	1392	2,477	1438	2,475
1301	2,477	1347	2,475	1393	2,476	1439	2,475
1302	2,477	1348	2,475	1394	2,476	1440	2,476

1303	2,477	1349	2,475	1395	2,476	1441	2,476
1304	2,477	1350	2,475	1396	2,476	1442	2,476
1305	2,477	1351	2,475	1397	2,476	1443	2,476
1306	2,477	1352	2,475	1398	2,476	1444	2,475
1307	2,477	1353	2,475	1399	2,476	1445	2,475
1308	2,477	1354	2,475	1400	2,476	1446	2,475
1309	2,476	1355	2,475	1401	2,476	1447	2,475
1310	2,476	1356	2,475	1402	2,476	1448	2,475
1311	2,476	1357	2,475	1403	2,477	1449	2,475
1312	2,476	1358	2,475	1404	2,477	1450	2,476
1313	2,476	1359	2,475	1405	2,477	1451	2,476
1314	2,476	1360	2,475	1406	2,477	1452	2,476
1315	2,476	1361	2,475	1407	2,477	1453	2,476
1316	2,476	1362	2,475	1408	2,477	1454	2,476
1317	2,476	1363	2,475	1409	2,477	1455	2,476
1318	2,476	1364	2,475	1410	2,477	1456	2,476
1319	2,476	1365	2,475	1411	2,477	1457	2,476
1320	2,476	1366	2,475	1412	2,477	1458	2,476
1321	2,476	1367	2,475	1413	2,477	1459	2,476
1322	2,476	1368	2,475	1414	2,477	1460	2,476
1323	2,476	1369	2,474	1415	2,477	1461	2,476
1324	2,476	1370	2,474	1416	2,477	1462	2,476
1325	2,476	1371	2,474	1417	2,477	1463	2,476
1326	2,476	1372	2,474	1418	2,477	1464	2,476
1327	2,476	1373	2,474	1419	2,476	1465	2,476
1328	2,476	1374	2,474	1420	2,476	1466	2,476
1329	2,476	1375	2,474	1421	2,476	1467	2,476
1330	2,476	1376	2,474	1422	2,476	1468	2,477
1331	2,475	1377	2,474	1423	2,476	1469	2,477
1332	2,475	1378	2,474	1424	2,476	1470	2,477
1333	2,475	1379	2,474	1425	2,476	1471	2,477
1334	2,475	1380	2,474	1426	2,476	1472	2,477

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
1473	2,477	1519	2,49	1565	2,499	1611	2,502
1474	2,477	1520	2,491	1566	2,499	1612	2,502
1475	2,478	1521	2,491	1567	2,499	1613	2,502
1476	2,478	1522	2,491	1568	2,5	1614	2,502
1477	2,478	1523	2,492	1569	2,5	1615	2,502
1478	2,478	1524	2,492	1570	2,5	1616	2,502
1479	2,478	1525	2,492	1571	2,5	1617	2,502
1480	2,478	1526	2,492	1572	2,5	1618	2,502
1481	2,479	1527	2,493	1573	2,5	1619	2,502
1482	2,479	1528	2,493	1574	2,5	1620	2,502
1483	2,479	1529	2,493	1575	2,501	1621	2,502

1484	2,479	1530	2,493	1576	2,501	1622	2,502
1485	2,479	1531	2,493	1577	2,501	1623	2,502
1486	2,48	1532	2,493	1578	2,501	1624	2,502
1487	2,48	1533	2,493	1579	2,501	1625	2,502
1488	2,48	1534	2,493	1580	2,501	1626	2,502
1489	2,48	1535	2,494	1581	2,501	1627	2,502
1490	2,48	1536	2,494	1582	2,501	1628	2,502
1491	2,48	1537	2,494	1583	2,501	1629	2,502
1492	2,481	1538	2,494	1584	2,501	1630	2,502
1493	2,481	1539	2,494	1585	2,501	1631	2,501
1494	2,481	1540	2,494	1586	2,501	1632	2,501
1495	2,482	1541	2,494	1587	2,501	1633	2,501
1496	2,482	1542	2,494	1588	2,501	1634	2,501
1497	2,482	1543	2,494	1589	2,501	1635	2,502
1498	2,483	1544	2,495	1590	2,501	1636	2,501
1499	2,483	1545	2,495	1591	2,501	1637	2,501
1500	2,483	1546	2,495	1592	2,501	1638	2,502
1501	2,484	1547	2,495	1593	2,501	1639	2,502
1502	2,484	1548	2,495	1594	2,501	1640	2,502
1503	2,484	1549	2,495	1595	2,501	1641	2,502
1504	2,484	1550	2,495	1596	2,501	1642	2,502
1505	2,485	1551	2,496	1597	2,501	1643	2,502
1506	2,485	1552	2,496	1598	2,501	1644	2,502
1507	2,486	1553	2,496	1599	2,501	1645	2,502
1508	2,486	1554	2,496	1600	2,501	1646	2,502
1509	2,486	1555	2,496	1601	2,501	1647	2,503
1510	2,487	1556	2,497	1602	2,501	1648	2,503
1511	2,487	1557	2,497	1603	2,501	1649	2,503
1512	2,488	1558	2,497	1604	2,501	1650	2,503
1513	2,488	1559	2,497	1605	2,502	1651	2,503
1514	2,488	1560	2,498	1606	2,502	1652	2,504
1515	2,489	1561	2,498	1607	2,502	1653	2,504
1516	2,489	1562	2,498	1608	2,502	1654	2,504
1517	2,489	1563	2,499	1609	2,502	1655	2,504
1518	2,49	1564	2,499	1610	2,502	1656	2,504

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
1657	2,504	1703	2,507	1749	2,501	1795	2,496
1658	2,504	1704	2,507	1750	2,501	1796	2,496
1659	2,505	1705	2,507	1751	2,501	1797	2,495
1660	2,505	1706	2,507	1752	2,501	1798	2,495
1661	2,505	1707	2,507	1753	2,501	1799	2,495
1662	2,505	1708	2,507	1754	2,5	1800	2,495
1663	2,505	1709	2,507	1755	2,5	1801	2,495

1664	2,505	1710	2,507	1756	2,5	1802	2,494
1665	2,505	1711	2,507	1757	2,5	1803	2,494
1666	2,505	1712	2,507	1758	2,5	1804	2,494
1667	2,506	1713	2,507	1759	2,499	1805	2,494
1668	2,506	1714	2,506	1760	2,499	1806	2,494
1669	2,506	1715	2,506	1761	2,499	1807	2,494
1670	2,506	1716	2,506	1762	2,499	1808	2,494
1671	2,506	1717	2,506	1763	2,499	1809	2,494
1672	2,506	1718	2,506	1764	2,499	1810	2,494
1673	2,506	1719	2,505	1765	2,499	1811	2,494
1674	2,506	1720	2,505	1766	2,499	1812	2,493
1675	2,507	1721	2,505	1767	2,499	1813	2,493
1676	2,507	1722	2,505	1768	2,498	1814	2,493
1677	2,507	1723	2,505	1769	2,498	1815	2,493
1678	2,507	1724	2,505	1770	2,498	1816	2,493
1679	2,507	1725	2,505	1771	2,498	1817	2,493
1680	2,507	1726	2,505	1772	2,498	1818	2,493
1681	2,507	1727	2,505	1773	2,498	1819	2,493
1682	2,507	1728	2,505	1774	2,498	1820	2,493
1683	2,507	1729	2,504	1775	2,498	1821	2,492
1684	2,507	1730	2,504	1776	2,498	1822	2,492
1685	2,507	1731	2,504	1777	2,497	1823	2,492
1686	2,507	1732	2,504	1778	2,497	1824	2,492
1687	2,507	1733	2,504	1779	2,497	1825	2,492
1688	2,507	1734	2,503	1780	2,497	1826	2,492
1689	2,508	1735	2,503	1781	2,497	1827	2,492
1690	2,508	1736	2,503	1782	2,497	1828	2,491
1691	2,508	1737	2,503	1783	2,496	1829	2,491
1692	2,508	1738	2,503	1784	2,496	1830	2,491
1693	2,508	1739	2,503	1785	2,496	1831	2,491
1694	2,507	1740	2,502	1786	2,496	1832	2,49
1695	2,507	1741	2,502	1787	2,496	1833	2,49
1696	2,507	1742	2,502	1788	2,496	1834	2,49
1697	2,507	1743	2,502	1789	2,496	1835	2,49
1698	2,507	1744	2,502	1790	2,496	1836	2,49
1699	2,507	1745	2,502	1791	2,496	1837	2,49
1700	2,507	1746	2,501	1792	2,496	1838	2,489
1701	2,507	1747	2,501	1793	2,496	1839	2,489
1702	2,507	1748	2,501	1794	2,496	1840	2,49

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
1841	2,49	1887	2,486	1933	2,483	1979	2,485
1842	2,49	1888	2,486	1934	2,483	1980	2,485
1843	2,49	1889	2,486	1935	2,483	1981	2,485
1844	2,489	1890	2,486	1936	2,483	1982	2,485
1845	2,489	1891	2,486	1937	2,483	1983	2,485

1846	2,489	1892	2,486	1938	2,483	1984	2,485
1847	2,489	1893	2,486	1939	2,483	1985	2,485
1848	2,489	1894	2,486	1940	2,483	1986	2,485
1849	2,489	1895	2,486	1941	2,483	1987	2,485
1850	2,489	1896	2,486	1942	2,483	1988	2,484
1851	2,489	1897	2,486	1943	2,483	1989	2,484
1852	2,489	1898	2,486	1944	2,483	1990	2,484
1853	2,489	1899	2,486	1945	2,483	1991	2,484
1854	2,489	1900	2,486	1946	2,483	1992	2,484
1855	2,489	1901	2,486	1947	2,483	1993	2,484
1856	2,489	1902	2,486	1948	2,483	1994	2,485
1857	2,488	1903	2,486	1949	2,483	1995	2,485
1858	2,488	1904	2,486	1950	2,483	1996	2,484
1859	2,488	1905	2,486	1951	2,483	1997	2,484
1860	2,488	1906	2,486	1952	2,484	1998	2,484
1861	2,488	1907	2,486	1953	2,484	1999	2,484
1862	2,488	1908	2,485	1954	2,484	2000	2,484
1863	2,487	1909	2,485	1955	2,484	2001	2,484
1864	2,487	1910	2,485	1956	2,484	2002	2,484
1865	2,487	1911	2,485	1957	2,484	2003	2,484
1866	2,487	1912	2,485	1958	2,484	2004	2,484
1867	2,486	1913	2,485	1959	2,484	2005	2,484
1868	2,486	1914	2,485	1960	2,484	2006	2,484
1869	2,486	1915	2,485	1961	2,484	2007	2,484
1870	2,486	1916	2,485	1962	2,484	2008	2,484
1871	2,486	1917	2,485	1963	2,484	2009	2,484
1872	2,486	1918	2,485	1964	2,484	2010	2,484
1873	2,486	1919	2,485	1965	2,484	2011	2,484
1874	2,486	1920	2,485	1966	2,484	2012	2,484
1875	2,486	1921	2,484	1967	2,484	2013	2,484
1876	2,486	1922	2,484	1968	2,484	2014	2,484
1877	2,486	1923	2,484	1969	2,484	2015	2,484
1878	2,486	1924	2,484	1970	2,485	2016	2,484
1879	2,486	1925	2,484	1971	2,485	2017	2,484
1880	2,486	1926	2,484	1972	2,485	2018	2,484
1881	2,486	1927	2,484	1973	2,485	2019	2,484
1882	2,486	1928	2,484	1974	2,485	2020	2,484
1883	2,486	1929	2,484	1975	2,485	2021	2,484
1884	2,486	1930	2,484	1976	2,485	2022	2,484
1885	2,486	1931	2,484	1977	2,485	2023	2,484
1886	2,486	1932	2,483	1978	2,485	2024	2,484

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
2025	2,484	2071	2,485	2117	2,487	2163	2,486
2026	2,484	2072	2,485	2118	2,487	2164	2,486

2027	2,484	2073	2,485	2119	2,487	2165	2,486
2028	2,484	2074	2,485	2120	2,487	2166	2,486
2029	2,484	2075	2,485	2121	2,487	2167	2,486
2030	2,484	2076	2,486	2122	2,487	2168	2,486
2031	2,484	2077	2,486	2123	2,487	2169	2,486
2032	2,484	2078	2,486	2124	2,487	2170	2,486
2033	2,484	2079	2,486	2125	2,487	2171	2,486
2034	2,484	2080	2,486	2126	2,487	2172	2,486
2035	2,484	2081	2,486	2127	2,487	2173	2,486
2036	2,484	2082	2,486	2128	2,487	2174	2,486
2037	2,484	2083	2,486	2129	2,487	2175	2,486
2038	2,484	2084	2,486	2130	2,487	2176	2,486
2039	2,484	2085	2,486	2131	2,487	2177	2,486
2040	2,484	2086	2,486	2132	2,487	2178	2,486
2041	2,484	2087	2,486	2133	2,487	2179	2,486
2042	2,484	2088	2,487	2134	2,487	2180	2,486
2043	2,484	2089	2,487	2135	2,487	2181	2,486
2044	2,484	2090	2,487	2136	2,487	2182	2,486
2045	2,484	2091	2,487	2137	2,487	2183	2,486
2046	2,484	2092	2,487	2138	2,487	2184	2,486
2047	2,484	2093	2,487	2139	2,487	2185	2,485
2048	2,483	2094	2,487	2140	2,487	2186	2,485
2049	2,483	2095	2,487	2141	2,487	2187	2,485
2050	2,483	2096	2,487	2142	2,487	2188	2,485
2051	2,483	2097	2,487	2143	2,487	2189	2,485
2052	2,483	2098	2,487	2144	2,487	2190	2,485
2053	2,483	2099	2,487	2145	2,486	2191	2,485
2054	2,484	2100	2,487	2146	2,486	2192	2,485
2055	2,484	2101	2,487	2147	2,486	2193	2,485
2056	2,484	2102	2,487	2148	2,486	2194	2,485
2057	2,484	2103	2,487	2149	2,486	2195	2,485
2058	2,484	2104	2,487	2150	2,486	2196	2,485
2059	2,484	2105	2,487	2151	2,486	2197	2,485
2060	2,484	2106	2,487	2152	2,486	2198	2,485
2061	2,484	2107	2,487	2153	2,486	2199	2,485
2062	2,484	2108	2,487	2154	2,486	2200	2,485
2063	2,484	2109	2,487	2155	2,486	2201	2,485
2064	2,484	2110	2,487	2156	2,486	2202	2,485
2065	2,484	2111	2,487	2157	2,486	2203	2,485
2066	2,485	2112	2,487	2158	2,486	2204	2,485
2067	2,485	2113	2,487	2159	2,486	2205	2,485
2068	2,485	2114	2,487	2160	2,486	2206	2,485
2069	2,485	2115	2,487	2161	2,486	2207	2,485
2070	2,485	2116	2,487	2162	2,486	2208	2,485

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
2209	2,485	2255	2,484	2301	2,485	2347	2,484
2210	2,485	2256	2,484	2302	2,485	2348	2,484
2211	2,485	2257	2,484	2303	2,486	2349	2,484
2212	2,485	2258	2,484	2304	2,486	2350	2,484
2213	2,485	2259	2,484	2305	2,486	2351	2,484
2214	2,484	2260	2,484	2306	2,486	2352	2,484
2215	2,484	2261	2,484	2307	2,486	2353	2,484
2216	2,484	2262	2,484	2308	2,486	2354	2,484
2217	2,484	2263	2,484	2309	2,486	2355	2,484
2218	2,484	2264	2,484	2310	2,486	2356	2,484
2219	2,484	2265	2,484	2311	2,486	2357	2,484
2220	2,484	2266	2,484	2312	2,485	2358	2,484
2221	2,483	2267	2,484	2313	2,485	2359	2,484
2222	2,483	2268	2,484	2314	2,485	2360	2,484
2223	2,483	2269	2,484	2315	2,485	2361	2,484
2224	2,483	2270	2,484	2316	2,486	2362	2,484
2225	2,483	2271	2,484	2317	2,486	2363	2,484
2226	2,483	2272	2,484	2318	2,486	2364	2,484
2227	2,483	2273	2,484	2319	2,485	2365	2,484
2228	2,483	2274	2,485	2320	2,485	2366	2,484
2229	2,483	2275	2,485	2321	2,485	2367	2,484
2230	2,483	2276	2,485	2322	2,485	2368	2,484
2231	2,483	2277	2,485	2323	2,485	2369	2,484
2232	2,483	2278	2,485	2324	2,485	2370	2,484
2233	2,483	2279	2,485	2325	2,485	2371	2,484
2234	2,483	2280	2,485	2326	2,485	2372	2,484
2235	2,483	2281	2,485	2327	2,485	2373	2,484
2236	2,483	2282	2,485	2328	2,485	2374	2,484
2237	2,483	2283	2,485	2329	2,485	2375	2,484
2238	2,483	2284	2,486	2330	2,485	2376	2,484
2239	2,483	2285	2,486	2331	2,485	2377	2,485
2240	2,483	2286	2,486	2332	2,485	2378	2,485
2241	2,483	2287	2,486	2333	2,485	2379	2,485
2242	2,483	2288	2,486	2334	2,485	2380	2,485
2243	2,483	2289	2,485	2335	2,484	2381	2,485
2244	2,483	2290	2,485	2336	2,484	2382	2,485
2245	2,483	2291	2,485	2337	2,484	2383	2,485
2246	2,483	2292	2,485	2338	2,484	2384	2,485
2247	2,483	2293	2,485	2339	2,484	2385	2,485
2248	2,483	2294	2,485	2340	2,484	2386	2,485
2249	2,483	2295	2,485	2341	2,484	2387	2,485
2250	2,483	2296	2,485	2342	2,484	2388	2,485
2251	2,483	2297	2,485	2343	2,484	2389	2,486
2252	2,484	2298	2,485	2344	2,484	2390	2,486
2253	2,484	2299	2,485	2345	2,484	2391	2,486

2254	2,484	□	2300	2,485	□	2346	2,484	□	2392	2,486
------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---	------	-------

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
2393	2,486	2439	2,489	2485	2,488	2531	2,486
2394	2,486	2440	2,489	2486	2,488	2532	2,486
2395	2,486	2441	2,489	2487	2,488	2533	2,486
2396	2,486	2442	2,489	2488	2,487	2534	2,486
2397	2,487	2443	2,489	2489	2,487	2535	2,486
2398	2,487	2444	2,489	2490	2,487	2536	2,486
2399	2,487	2445	2,489	2491	2,487	2537	2,486
2400	2,487	2446	2,489	2492	2,487	2538	2,486
2401	2,487	2447	2,489	2493	2,486	2539	2,486
2402	2,487	2448	2,489	2494	2,486	2540	2,487
2403	2,487	2449	2,489	2495	2,486	2541	2,487
2404	2,487	2450	2,489	2496	2,486	2542	2,487
2405	2,487	2451	2,489	2497	2,486	2543	2,487
2406	2,487	2452	2,489	2498	2,486	2544	2,487
2407	2,487	2453	2,489	2499	2,486	2545	2,487
2408	2,487	2454	2,489	2500	2,486	2546	2,487
2409	2,487	2455	2,489	2501	2,486	2547	2,487
2410	2,487	2456	2,489	2502	2,486	2548	2,487
2411	2,488	2457	2,489	2503	2,486	2549	2,488
2412	2,488	2458	2,489	2504	2,486	2550	2,488
2413	2,488	2459	2,489	2505	2,485	2551	2,488
2414	2,488	2460	2,489	2506	2,486	2552	2,488
2415	2,488	2461	2,489	2507	2,486	2553	2,488
2416	2,488	2462	2,489	2508	2,485	2554	2,487
2417	2,488	2463	2,489	2509	2,485	2555	2,487
2418	2,489	2464	2,489	2510	2,485	2556	2,487
2419	2,489	2465	2,489	2511	2,485	2557	2,487
2420	2,489	2466	2,489	2512	2,485	2558	2,487
2421	2,489	2467	2,489	2513	2,485	2559	2,487
2422	2,489	2468	2,49	2514	2,485	2560	2,487
2423	2,489	2469	2,49	2515	2,486	2561	2,487
2424	2,489	2470	2,49	2516	2,486	2562	2,487
2425	2,489	2471	2,49	2517	2,486	2563	2,487
2426	2,489	2472	2,49	2518	2,486	2564	2,487
2427	2,489	2473	2,49	2519	2,486	2565	2,488
2428	2,489	2474	2,489	2520	2,485	2566	2,488
2429	2,489	2475	2,489	2521	2,486	2567	2,488
2430	2,489	2476	2,489	2522	2,486	2568	2,488
2431	2,489	2477	2,489	2523	2,486	2569	2,488
2432	2,489	2478	2,489	2524	2,486	2570	2,488
2433	2,489	2479	2,489	2525	2,486	2571	2,488
2434	2,489	2480	2,489	2526	2,486	2572	2,488

2435	2,489		2481	2,489		2527	2,486		2573	2,489
2436	2,489		2482	2,489		2528	2,486		2574	2,489
2437	2,489		2483	2,489		2529	2,486		2575	2,489
2438	2,489		2484	2,488		2530	2,486		2576	2,489

t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)
2577	2,489		2623	2,489		2669	2,492		2715	2,491
2578	2,489		2624	2,489		2670	2,492		2716	2,491
2579	2,489		2625	2,489		2671	2,492		2717	2,491
2580	2,489		2626	2,489		2672	2,492		2718	2,491
2581	2,489		2627	2,489		2673	2,492		2719	2,491
2582	2,489		2628	2,489		2674	2,492		2720	2,491
2583	2,489		2629	2,489		2675	2,492		2721	2,491
2584	2,489		2630	2,489		2676	2,492		2722	2,491
2585	2,488		2631	2,489		2677	2,492		2723	2,491
2586	2,489		2632	2,489		2678	2,492		2724	2,491
2587	2,489		2633	2,489		2679	2,492		2725	2,491
2588	2,489		2634	2,489		2680	2,492		2726	2,49
2589	2,489		2635	2,489		2681	2,492		2727	2,49
2590	2,489		2636	2,49		2682	2,492		2728	2,49
2591	2,49		2637	2,49		2683	2,492		2729	2,49
2592	2,49		2638	2,49		2684	2,492		2730	2,49
2593	2,49		2639	2,49		2685	2,492		2731	2,49
2594	2,49		2640	2,49		2686	2,492		2732	2,49
2595	2,49		2641	2,49		2687	2,492		2733	2,49
2596	2,49		2642	2,49		2688	2,492		2734	2,49
2597	2,49		2643	2,49		2689	2,492		2735	2,49
2598	2,49		2644	2,49		2690	2,492		2736	2,49
2599	2,49		2645	2,49		2691	2,492		2737	2,49
2600	2,49		2646	2,49		2692	2,492		2738	2,49
2601	2,49		2647	2,49		2693	2,492		2739	2,49
2602	2,49		2648	2,49		2694	2,492		2740	2,49
2603	2,49		2649	2,49		2695	2,492		2741	2,49
2604	2,49		2650	2,49		2696	2,492		2742	2,49
2605	2,49		2651	2,491		2697	2,492		2743	2,49
2606	2,49		2652	2,491		2698	2,492		2744	2,49
2607	2,49		2653	2,491		2699	2,492		2745	2,49
2608	2,49		2654	2,491		2700	2,492		2746	2,489
2609	2,49		2655	2,491		2701	2,491		2747	2,489
2610	2,489		2656	2,491		2702	2,491		2748	2,489
2611	2,489		2657	2,491		2703	2,492		2749	2,489
2612	2,489		2658	2,491		2704	2,492		2750	2,489
2613	2,489		2659	2,491		2705	2,492		2751	2,489
2614	2,489		2660	2,491		2706	2,492		2752	2,489
2615	2,489		2661	2,491		2707	2,492		2753	2,489

2616	2,489		2662	2,491		2708	2,492		2754	2,489
2617	2,489		2663	2,492		2709	2,491		2755	2,489
2618	2,489		2664	2,492		2710	2,491		2756	2,489
2619	2,488		2665	2,492		2711	2,491		2757	2,489
2620	2,488		2666	2,492		2712	2,491		2758	2,49
2621	2,488		2667	2,492		2713	2,491		2759	2,49
2622	2,488		2668	2,492		2714	2,491		2760	2,49

t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)
2761	2,49		2807	2,492		2853	2,49		2899	2,49
2762	2,49		2808	2,492		2854	2,49		2900	2,489
2763	2,49		2809	2,492		2855	2,49		2901	2,49
2764	2,49		2810	2,492		2856	2,491		2902	2,49
2765	2,49		2811	2,492		2857	2,491		2903	2,489
2766	2,49		2812	2,492		2858	2,491		2904	2,489
2767	2,49		2813	2,492		2859	2,491		2905	2,489
2768	2,491		2814	2,492		2860	2,491		2906	2,489
2769	2,491		2815	2,492		2861	2,491		2907	2,489
2770	2,491		2816	2,492		2862	2,491		2908	2,489
2771	2,491		2817	2,492		2863	2,491		2909	2,489
2772	2,491		2818	2,492		2864	2,491		2910	2,489
2773	2,491		2819	2,492		2865	2,493		2911	2,489
2774	2,491		2820	2,492		2866	2,493		2912	2,488
2775	2,491		2821	2,492		2867	2,493		2913	2,488
2776	2,491		2822	2,492		2868	2,492		2914	2,488
2777	2,491		2823	2,492		2869	2,492		2915	2,488
2778	2,491		2824	2,492		2870	2,492		2916	2,488
2779	2,491		2825	2,492		2871	2,492		2917	2,488
2780	2,491		2826	2,492		2872	2,492		2918	2,488
2781	2,491		2827	2,491		2873	2,492		2919	2,488
2782	2,491		2828	2,491		2874	2,491		2920	2,487
2783	2,491		2829	2,491		2875	2,491		2921	2,487
2784	2,491		2830	2,491		2876	2,491		2922	2,487
2785	2,491		2831	2,491		2877	2,491		2923	2,487
2786	2,491		2832	2,491		2878	2,491		2924	2,487
2787	2,491		2833	2,491		2879	2,491		2925	2,487
2788	2,491		2834	2,491		2880	2,491		2926	2,487
2789	2,491		2835	2,491		2881	2,491		2927	2,487
2790	2,491		2836	2,491		2882	2,491		2928	2,486
2791	2,491		2837	2,491		2883	2,491		2929	2,486
2792	2,491		2838	2,491		2884	2,491		2930	2,486
2793	2,491		2839	2,491		2885	2,491		2931	2,486
2794	2,491		2840	2,491		2886	2,491		2932	2,486
2795	2,491		2841	2,491		2887	2,491		2933	2,486
2796	2,491		2842	2,491		2888	2,491		2934	2,486

2797	2,491	2843	2,491	2889	2,49	2935	2,486
2798	2,491	2844	2,491	2890	2,49	2936	2,486
2799	2,492	2845	2,491	2891	2,49	2937	2,485
2800	2,492	2846	2,491	2892	2,49	2938	2,485
2801	2,492	2847	2,491	2893	2,49	2939	2,485
2802	2,492	2848	2,491	2894	2,49	2940	2,485
2803	2,492	2849	2,491	2895	2,49	2941	2,485
2804	2,492	2850	2,491	2896	2,49	2942	2,485
2805	2,492	2851	2,491	2897	2,49	2943	2,485
2806	2,492	2852	2,49	2898	2,49	2944	2,485

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
2945	2,485	2991	2,484	3037	2,489	3083	2,492
2946	2,485	2992	2,484	3038	2,49	3084	2,492
2947	2,485	2993	2,484	3039	2,49	3085	2,492
2948	2,485	2994	2,484	3040	2,49	3086	2,492
2949	2,485	2995	2,484	3041	2,49	3087	2,492
2950	2,485	2996	2,484	3042	2,491	3088	2,492
2951	2,485	2997	2,484	3043	2,491	3089	2,492
2952	2,485	2998	2,484	3044	2,491	3090	2,492
2953	2,485	2999	2,484	3045	2,491	3091	2,492
2954	2,485	3000	2,485	3046	2,491	3092	2,492
2955	2,485	3001	2,485	3047	2,492	3093	2,492
2956	2,485	3002	2,485	3048	2,492	3094	2,492
2957	2,485	3003	2,485	3049	2,492	3095	2,492
2958	2,485	3004	2,485	3050	2,492	3096	2,492
2959	2,485	3005	2,485	3051	2,492	3097	2,493
2960	2,485	3006	2,486	3052	2,492	3098	2,493
2961	2,485	3007	2,486	3053	2,492	3099	2,493
2962	2,485	3008	2,486	3054	2,492	3100	2,493
2963	2,486	3009	2,486	3055	2,492	3101	2,493
2964	2,486	3010	2,486	3056	2,492	3102	2,493
2965	2,486	3011	2,486	3057	2,492	3103	2,493
2966	2,486	3012	2,487	3058	2,492	3104	2,493
2967	2,485	3013	2,487	3059	2,492	3105	2,493
2968	2,485	3014	2,487	3060	2,492	3106	2,494
2969	2,485	3015	2,487	3061	2,492	3107	2,494
2970	2,486	3016	2,487	3062	2,492	3108	2,494
2971	2,486	3017	2,487	3063	2,492	3109	2,494
2972	2,485	3018	2,487	3064	2,492	3110	2,494
2973	2,485	3019	2,487	3065	2,492	3111	2,494
2974	2,485	3020	2,487	3066	2,492	3112	2,494
2975	2,485	3021	2,487	3067	2,492	3113	2,494
2976	2,485	3022	2,487	3068	2,492	3114	2,495
2977	2,485	3023	2,487	3069	2,492	3115	2,495

2978	2,485		3024	2,487		3070	2,492		3116	2,495
2979	2,485		3025	2,488		3071	2,492		3117	2,495
2980	2,485		3026	2,488		3072	2,492		3118	2,495
2981	2,485		3027	2,488		3073	2,492		3119	2,495
2982	2,485		3028	2,488		3074	2,492		3120	2,495
2983	2,485		3029	2,488		3075	2,492		3121	2,495
2984	2,485		3030	2,488		3076	2,492		3122	2,495
2985	2,485		3031	2,488		3077	2,492		3123	2,495
2986	2,485		3032	2,488		3078	2,492		3124	2,495
2987	2,484		3033	2,489		3079	2,492		3125	2,495
2988	2,484		3034	2,489		3080	2,492		3126	2,495
2989	2,484		3035	2,489		3081	2,492		3127	2,495
2990	2,484		3036	2,489		3082	2,492		3128	2,495

t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)		t (s)	D. R. (Wh.m-2)
3129	2,496		3175	2,499		3221	2,503		3267	2,503
3130	2,496		3176	2,5		3222	2,503		3268	2,503
3131	2,496		3177	2,5		3223	2,503		3269	2,504
3132	2,496		3178	2,5		3224	2,503		3270	2,504
3133	2,496		3179	2,5		3225	2,503		3271	2,503
3134	2,496		3180	2,5		3226	2,503		3272	2,503
3135	2,496		3181	2,5		3227	2,503		3273	2,503
3136	2,496		3182	2,501		3228	2,503		3274	2,503
3137	2,496		3183	2,501		3229	2,503		3275	2,503
3138	2,496		3184	2,501		3230	2,503		3276	2,503
3139	2,496		3185	2,501		3231	2,503		3277	2,503
3140	2,496		3186	2,501		3232	2,503		3278	2,503
3141	2,496		3187	2,502		3233	2,504		3279	2,503
3142	2,496		3188	2,502		3234	2,504		3280	2,502
3143	2,496		3189	2,502		3235	2,504		3281	2,502
3144	2,496		3190	2,502		3236	2,504		3282	2,502
3145	2,496		3191	2,502		3237	2,504		3283	2,502
3146	2,497		3192	2,502		3238	2,504		3284	2,502
3147	2,497		3193	2,502		3239	2,504		3285	2,502
3148	2,497		3194	2,502		3240	2,504		3286	2,502
3149	2,497		3195	2,503		3241	2,504		3287	2,502
3150	2,497		3196	2,503		3242	2,504		3288	2,502
3151	2,497		3197	2,503		3243	2,504		3289	2,502
3152	2,497		3198	2,503		3244	2,504		3290	2,501
3153	2,497		3199	2,503		3245	2,504		3291	2,501
3154	2,497		3200	2,503		3246	2,504		3292	2,501
3155	2,497		3201	2,503		3247	2,505		3293	2,501
3156	2,497		3202	2,503		3248	2,505		3294	2,501
3157	2,497		3203	2,503		3249	2,505		3295	2,501
3158	2,498		3204	2,503		3250	2,505		3296	2,501

3159	2,497	3205	2,503	3251	2,505	3297	2,501
3160	2,497	3206	2,503	3252	2,505	3298	2,501
3161	2,497	3207	2,503	3253	2,505	3299	2,501
3162	2,498	3208	2,503	3254	2,505	3300	2,501
3163	2,498	3209	2,503	3255	2,505	3301	2,5
3164	2,498	3210	2,503	3256	2,504	3302	2,5
3165	2,498	3211	2,503	3257	2,504	3303	2,5
3166	2,498	3212	2,503	3258	2,504	3304	2,5
3167	2,498	3213	2,503	3259	2,504	3305	2,5
3168	2,498	3214	2,503	3260	2,504	3306	2,5
3169	2,498	3215	2,503	3261	2,504	3307	2,5
3170	2,499	3216	2,503	3262	2,504	3308	2,5
3171	2,499	3217	2,503	3263	2,504	3309	2,5
3172	2,499	3218	2,503	3264	2,504	3310	2,5
3173	2,499	3219	2,503	3265	2,504	3311	2,5
3174	2,499	3220	2,503	3266	2,504	3312	2,5

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
3313	2,5	3359	2,496	3405	2,489	3451	2,485
3314	2,5	3360	2,496	3406	2,489	3452	2,485
3315	2,5	3361	2,496	3407	2,488	3453	2,485
3316	2,5	3362	2,496	3408	2,488	3454	2,485
3317	2,5	3363	2,496	3409	2,488	3455	2,485
3318	2,5	3364	2,495	3410	2,488	3456	2,485
3319	2,5	3365	2,495	3411	2,488	3457	2,485
3320	2,499	3366	2,495	3412	2,488	3458	2,485
3321	2,499	3367	2,495	3413	2,488	3459	2,485
3322	2,499	3368	2,495	3414	2,488	3460	2,485
3323	2,499	3369	2,495	3415	2,488	3461	2,485
3324	2,499	3370	2,495	3416	2,488	3462	2,485
3325	2,499	3371	2,494	3417	2,488	3463	2,485
3326	2,499	3372	2,494	3418	2,488	3464	2,485
3327	2,498	3373	2,494	3419	2,488	3465	2,485
3328	2,498	3374	2,494	3420	2,488	3466	2,485
3329	2,498	3375	2,494	3421	2,487	3467	2,485
3330	2,498	3376	2,493	3422	2,487	3468	2,485
3331	2,498	3377	2,493	3423	2,487	3469	2,485
3332	2,498	3378	2,493	3424	2,487	3470	2,485
3333	2,498	3379	2,493	3425	2,487	3471	2,485
3334	2,498	3380	2,493	3426	2,487	3472	2,486
3335	2,498	3381	2,493	3427	2,487	3473	2,486
3336	2,498	3382	2,493	3428	2,487	3474	2,486
3337	2,498	3383	2,492	3429	2,486	3475	2,486
3338	2,497	3384	2,492	3430	2,486	3476	2,485
3339	2,497	3385	2,492	3431	2,486	3477	2,485

3340	2,497	3386	2,492	3432	2,486	3478	2,485
3341	2,497	3387	2,492	3433	2,486	3479	2,485
3342	2,497	3388	2,491	3434	2,486	3480	2,485
3343	2,497	3389	2,491	3435	2,486	3481	2,485
3344	2,497	3390	2,491	3436	2,486	3482	2,485
3345	2,497	3391	2,491	3437	2,485	3483	2,485
3346	2,497	3392	2,491	3438	2,485	3484	2,485
3347	2,497	3393	2,491	3439	2,485	3485	2,485
3348	2,497	3394	2,49	3440	2,485	3486	2,485
3349	2,497	3395	2,49	3441	2,485	3487	2,486
3350	2,497	3396	2,49	3442	2,485	3488	2,486
3351	2,497	3397	2,489	3443	2,485	3489	2,485
3352	2,497	3398	2,489	3444	2,485	3490	2,485
3353	2,497	3399	2,489	3445	2,485	3491	2,485
3354	2,497	3400	2,489	3446	2,485	3492	2,486
3355	2,497	3401	2,489	3447	2,485	3493	2,486
3356	2,496	3402	2,489	3448	2,485	3494	2,486
3357	2,496	3403	2,489	3449	2,485	3495	2,485
3358	2,496	3404	2,489	3450	2,485	3496	2,485

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
3497	2,485	3543	2,483	3589	2,484	3635	2,487
3498	2,485	3544	2,483	3590	2,485	3636	2,487
3499	2,485	3545	2,483	3591	2,485	3637	2,487
3500	2,485	3546	2,483	3592	2,485	3638	2,487
3501	2,485	3547	2,482	3593	2,485	3639	2,487
3502	2,485	3548	2,483	3594	2,485	3640	2,487
3503	2,484	3549	2,483	3595	2,485	3641	2,487
3504	2,484	3550	2,483	3596	2,485	3642	2,487
3505	2,484	3551	2,483	3597	2,485	3643	2,487
3506	2,484	3552	2,483	3598	2,485	3644	2,487
3507	2,484	3553	2,483	3599	2,485	3645	2,487
3508	2,484	3554	2,483	3600	2,485	3646	2,487
3509	2,484	3555	2,483	3601	2,485	3647	2,487
3510	2,484	3556	2,483	3602	2,485	3648	2,487
3511	2,484	3557	2,483	3603	2,485	3649	2,487
3512	2,484	3558	2,481	3604	2,485	3650	2,487
3513	2,484	3559	2,481	3605	2,485	3651	2,487
3514	2,484	3560	2,482	3606	2,485	3652	2,487
3515	2,484	3561	2,482	3607	2,485	3653	2,487
3516	2,484	3562	2,482	3608	2,485	3654	2,487
3517	2,484	3563	2,482	3609	2,485	3655	2,486
3518	2,484	3564	2,482	3610	2,485	3656	2,486
3519	2,484	3565	2,482	3611	2,485	3657	2,486
3520	2,484	3566	2,482	3612	2,485	3658	2,486

3521	2,484	3567	2,482	3613	2,485	3659	2,486
3522	2,483	3568	2,482	3614	2,485	3660	2,486
3523	2,483	3569	2,482	3615	2,485	3661	2,486
3524	2,483	3570	2,482	3616	2,486	3662	2,486
3525	2,483	3571	2,482	3617	2,486	3663	2,486
3526	2,483	3572	2,483	3618	2,486	3664	2,486
3527	2,483	3573	2,483	3619	2,486	3665	2,486
3528	2,483	3574	2,483	3620	2,486	3666	2,486
3529	2,483	3575	2,483	3621	2,486	3667	2,486
3530	2,483	3576	2,483	3622	2,486	3668	2,486
3531	2,483	3577	2,483	3623	2,486	3669	2,486
3532	2,483	3578	2,483	3624	2,486	3670	2,486
3533	2,483	3579	2,484	3625	2,486	3671	2,486
3534	2,483	3580	2,484	3626	2,486	3672	2,486
3535	2,483	3581	2,484	3627	2,486	3673	2,486
3536	2,483	3582	2,484	3628	2,486	3674	2,486
3537	2,483	3583	2,484	3629	2,486	3675	2,486
3538	2,483	3584	2,484	3630	2,487	3676	2,486
3539	2,482	3585	2,484	3631	2,487	3677	2,486
3540	2,482	3586	2,484	3632	2,487	3678	2,486
3541	2,482	3587	2,484	3633	2,487	3679	2,486
3542	2,483	3588	2,484	3634	2,487	3680	2,486

t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)	t (s)	D. R. (Wh.m-2)
3681	2,486	3727	2,486	3773	2,489	3819	2,496
3682	2,486	3728	2,486	3774	2,489	3820	2,497
3683	2,486	3729	2,486	3775	2,489	3821	2,497
3684	2,486	3730	2,486	3776	2,489	3822	2,497
3685	2,487	3731	2,486	3777	2,489	3823	2,497
3686	2,487	3732	2,486	3778	2,489	3824	2,497
3687	2,487	3733	2,486	3779	2,49	3825	2,498
3688	2,487	3734	2,486	3780	2,49	3826	2,498
3689	2,487	3735	2,486	3781	2,49	3827	2,498
3690	2,487	3736	2,486	3782	2,49	3828	2,498
3691	2,487	3737	2,486	3783	2,49	3829	2,498
3692	2,487	3738	2,486	3784	2,49	3830	2,498
3693	2,487	3739	2,486	3785	2,49	3831	2,499
3694	2,487	3740	2,486	3786	2,49	3832	2,499
3695	2,486	3741	2,486	3787	2,49	3833	2,499
3696	2,486	3742	2,486	3788	2,491	3834	2,499
3697	2,486	3743	2,486	3789	2,491	3835	2,499
3698	2,486	3744	2,486	3790	2,491	3836	2,499
3699	2,486	3745	2,486	3791	2,491	3837	2,5
3700	2,486	3746	2,486	3792	2,491	3838	2,5
3701	2,486	3747	2,486	3793	2,492	3839	2,5

Datos de Radiación UV-B aplicada a Orégano	
Radiación acumulada aplicada (Wh.m⁻²)	9640,607
Radiación aplicada en 1 hora (Wh.m⁻²)	0,041
Radiación aplicada por minuto (Wh.m⁻²)	0,001
Radiación aplicada en 1 hora 5 minutos (Wh.m⁻²)	0,045
Desviación aproximada (Wh.m⁻²)	0,005