

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**“CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE SEIS
ECOTIPOS DE ORÉGANO (*Origanum vulgare ssp.*) PROCEDENTES
DEL VALLE DE URUBAMBA – CUSCO; PERÚ”**

Presentada Por:

LENA ASUNCIÓN TELLEZ MONZÓN

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima Perú

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE SEIS
ECOTIPOS DE ORÉGANO (*Origanum vulgare ssp.*) PROCEDENTES
DEL VALLE DE URUBAMBA – CUSCO; PERÚ”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

LENA ASUNCIÓN TELLEZ MONZÓN

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Ritva Repo de Carrasco
PRESIDENTE

M.S. Gloria Pascual Chagman
PATROCINADOR

Mg.Sc. Beatriz Hatta Sokoda
MIEMBRO

Mg.Sc. Elva Ríos Ríos
MIEMBRO

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en las vicisitudes, enseñándome a ser resiliente y perseverar hasta lograr mi objetivo.

Dedico de manera especial a mi amada Hija Alessandra quien a su corta edad comprendio que todo lo que se inicia se termina, a mis padres Modesto y Asuncion, quienes con su amor, comprensión y apoyo incondicional. Gracias a ellos mi motor y motivo logre consolidar esta etapa tan ansida.

A mi Hermana Deycy quien con su amor y alegría me motiva siempre a ir por más metas.

AGRADECIMIENTO

La presente tesis a sido financiada por el Fondo de Innovación en Ciencia y Tecnología – FINCyT, Fondo de Investigación y Desarrollo Para la Competitividad (FIDECOM) con el Contrato PCyT – FIDECOM –Molinos Cusco S.A – Convenio N°049-2012.

Al Ph. D Lizardo Visitacion y Mgs Henry Juarez quienes confiaron en mi para la culminación del proyecto.

A mi Jurado quien me supo guía y orientar en cada etapa de la investigación.

A todos las pesonas que de una u otra manera colaboraron con un granito de arena para la culminación de mi investigación.

ÍNDICE GENERAL

I.INTRODUCCIÓN	1
II.REVISIÓN LITERARIA	3
2.1. Historia del Orégano;	3
2.2. El Oregano (Origanum vulgare spp.)	4
2.2.1. Generalidades	4
2.2.2Clasificación taxonomica y descripción morfológica.	4
2.3. Composición química del orégano	7
2.4. Aceite Esencial.	7
2.5. Composición Química del Aceite Esencial	8
2.6. Síntesis de los aceites esenciale (AEs).	9
2.6.1Terpenos.	9
2.6.2. Fenilpropaniodes/benzoides	10
2.7. Actividad Biológica de los Componentes del Orégano.....	10
2.8 Uso y aplicaciones del aceite esencial de orégano	11
2.9 Características Generales del Origanum vulgare	12
2.10 Extracción de Aceites Esenciales	13
2.10.1 Destilación Por Arrastre De Vapor	13
2.11. Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales y contenido total de fenoles	14
2.12. Metodo que mide la capacidad para secuestrar radicales	15
2.12.1. Capacidad antioxidante por el metodo Cation –radical ABTS+•	15
2.13. Determinacion del timol y carvacrol en el aceite esencial de orégano	16
2.13.1. Cromatografia liquididad de alto rendimiento HPLC	16
III.METODOLOGÍA Y MATERIALES	18
3.1 Lugar de ejecución	18
3.2 Materiales	18
3.2.1 Materia prima.	18
3.2.2.Materiales.....	18
3.2.3 Equipos y reactivos.	19
3.2.3.1 Equipos.....	19
3.2.3.2 Reactivos:	19

3.3 Metodos de analisis.....	20
3.3.1 Analisis Físico-Químico.....	20
3.3.1.1 Determinacion de color	20
3.3.1.2 Determinacion de la gravedad especifica	20
3.3.1.3 Índice de refracción	20
3.3.1.4 Determinacion de la solubilidad en alcohol	20
3.3.1.5 Porcentaje de acidez:	20
3.3.1.6 Determinacion de la capacidad antioxidante por el metodo del Radical ABTS+.....	20
3.3.1.7. Cuantificacion del timol y carvacrol por metodo de cromatografía líquida HPLC/FLD.....	21
3.4. Analisis estadístico.....	21
3.5 Metodos experimentales.....	22
3.5.1 Extraccion del aceite esencial.....	22
a) Materia prima:	24
b) Recolección.....	24
c) Transporte.....	24
d) Selección:	24
e). Clasificación:.....	24
f) Secado:.....	25
g) Extracción del aceite esencial	25
h) Decantado.....	25
i) Centrifugación.....	25
j)Purificado	25
k)Almaceando	25
3.5.2.1 Rendimiento de Extracción	25
3.5.3.Determinacion de timol y carvacrol del aceite esencial de orégano por HPLC	26
3.5.3.1. Determinacion de los parametros de timol y carvacrol del aceite esencial de orégano por cromatografía HPLC/FLD.	27
3.5.4. Cuantificación de timol y carvacrol del aceite esenciales de seis ecotipos de orégano por HPLC/FLD	28
3.6. Diseño Experimental.....	29
IV.RESULTADOS Y DISCURSIÓN	31

4.1. Rendimiento de los aceites esenciales de los seis ecotipos de oregano procedentes de diferentes altitudes	31
4.2. Determinación de timol y carvacrol por cromatografía líquida HPLC.	37
4.3. Cuantificación de timol y carvacrol del aceite esenciales de seis ecotipos de orégano por HPLC/FLD	41
4.3.1. Eleccion de la dilución optima para las muestra de aceite esencial de orégano.....	41
4.3.2. Influencia de las altitudes y ecotipos en la cuantificación de timol y carvacrol en el aceite esencial de oréganpp por cromatografía líquida HPLC/FLD.....	44
4.4.Caracterizar fisicoquímica del aceite esencialcon alta concetracion de timol y carvacrol.....	54
V.CONCLUSIONES	59
VI.RECOMENDACIONES.....	60
VII.AGRADECIMIENTO.....	61
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
IX.ANEXOS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras representativas de isoprenoides, aminoácidos volátiles y otros derivados de plantas	8
Figura 2: Principales componentes de un equipo de extracción por arrastre con vapor....	13
Figura .3. Generación del catión-radical ABTS+•.....	15
Figura 4: Flujo de operaciones para la obtención de aceite esencial de orégano.....	21
Figura 5: Localización y/o Altitudes de estudio.....	23
Figura 6: Diseño experimental para la evaluación de los ecotipos de orégano sembrado a diferentes altitudes, en cuanto a su rendimiento en aceite esencial y contenido de timol y carvacrol	30
Figura 7: Rendimiento de los 6 ecotipos de aceite esencial de orégano de las diferentes altitudes.....	32
Figura 8: Cromatograma de los estándares de carvacrol y timol	37
Figura 9: Curva de calibración del timol.....	38
Figura 10: Curva de calibración del carvacrol.....	39
Figura 11: Muestra de orégano Italiano - 3386 m.s.n.m(Jaquijaguana).....	42
Figura 12: Concentración de timol en el aceite esencial de orégano de los 6 ecotipos procedentes de las diferentes altitudes.....	45
Figura 13: Concentración de carvacrol en el aceite esencial de orégano de los 6 ecotipos procedentes de las diferentes altitudes.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación Taxonómica de las especies.....	5
Cuadro 2: Zonificación agroecológica y cosecha del oregano (<i>Origanum vulgare ssp</i>).....	22
Cuadro 3: Caracterización del clima de Urubamba - Cusco.....	22
Cuadro 4: Descripción de los ecotipos de orégano.....	24
Cuadro 5: Parámetros de Validación del HPLC.....	40
Cuadro 6: Determinación de los compuestos timol y carvacrol por cromatografía líquida HPLC.....	42
Cuadro 7: Cuantificación de la concentración de timol y carvacrol en los seis ecotipos de <i>Origanum vulgare</i> y las 5 altitudes por Cromatografía líquida HPLC.....	43
Cuadro 8: Determinación de los compuestos timol y carvacrol por HPLC del aceite esencial de orégano del ecotipo Italiano.....	51
Cuadro 9: Características fisicoquímicas del aceite esencial orégano del ecotipo Italiano.....	54

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo Caracterizar los aceites esenciales de seis ecotipos de orégano en base al contenido de timol y carvacrol procedentes de cinco altitudes de Urubamba-Cusco, El contenido de compuesto monoterpenos oxigenado (fenoles), fue realizado en seis ecotipos de orégano (Italiano, Oreja de elefante, Nigra, Chino, Floración temprana 1 y 2). procedentes de cinco altitudes 3042 m.s.n.m (Urubamba), 3092 m.s.n.m (Andahuaylillas), 3260 m.s.n.m (Cusipata), 3386 m.s.n.m (Jaquijaguana), y 3638 m.s.n.m (Sicuani)

La determinación de timol y carvacrol en muestras de aceite esencial de orégano y otras plantas, ha sido realizado por muchos autores utilizando métodos por cromatografía líquida HPLC.

Se encontraron diferencias en la concentración de timol y carvacrol para los seis ecotipos y la altitud de procedencia, lo que establecería diferencias sustanciales entre los ecotipos pertenecientes a la misma familia lamiaceae. La composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare* .varía con la ubicación geográfica del lugar de cosecha, el clima, la genética de la plananta y otros factores condicionantes ecológicos. La influencia de estos factores sobre los distintos *Origanum vulgare* define sus quimiotipo.

Asimismo, se pudo determinar que el rendimiento mas alto de aceite esencial de orégano se desarrollo a las altitudes de 3386 m.s.n.m, (Jaquijaguana) y 3638 m.s.n.m. (Sicuani), en el ecotipo Oreja de Elefante (2.8 %), y el rendimiento mas bajo se desarrollo a la altitud de 3092 m.s.n.m (Andahuaylillas), en el ecotipo Nigra (0.95%); la concentración mayor de timol y carvacrol se desarrollo en el ecotipoes Italiano (18.4 y 2.04 %) y la cocentracion menor de los mismo metabolitos fue de 2.4% de timol y 0.36% de carvacrol, en el ecotipo Chino a la altitud de 3386 m.s.n.m. El timol y carvacrol le otorga al orégano múltiples propiedades antioxidantes, microbiológicas y conservantes de alimentos, además de potenciales aplicaciones en perfumería y cosmética.

Palabras Claves: *Origanum vulgare ssp*, timol, carvacro, HPLC

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize the essential oils of six oregano ecotypes based on the content of thymol and carvacrol from five Urubamba-Cusco altitudes. The content of oxygenated monoterpene compound (phenols) was made in six ecotypes of oregano (Italian , Elephant ear, Nigra, Chinese, Early flowering 1 and 2). from five altitudes 3042 m.a.s.l. (Urubamba), 3092 m.a.s.l. (Andahuaylillas), 3260 m.a.s.l. (Cusipata), 3386 m.a.s.l. (Jaquijaguana), and 3638 m.a.s.l. (Sicuani)

The determination of thymol and carvacrol in samples of essential oil of oregano and other plants, has been carried out by many authors using methods by liquid chromatography HPLC.

Differences were found in the concentration of thymol and carvacrol for the six ecotypes and the altitude of origin, which would establish substantial differences between the ecotypes belonging to the same family Lamiaceae. The chemical composition of the essential oil of *Origanum vulgare* would vary with the geographical location of the harvest site, the climate, the genetics of the plant and other ecological conditioning factors. The influence of these factors on the different *Origanum vulgare* defines their chemotype.

Likewise, it was possible to determine that the highest yield of essential oil of oregano was developed at altitudes of 3386 m.a.s.l., (Jaquijaguana) and 3638 m.a.s.l.. (Sicuani), in the ecotype Oreja de Elefante (2.8%), and the lowest yield was developed at the altitude of 3092 m.a.s.l. (Andahuaylillas), in the Nigra ecotype (0.95%); the highest concentration of thymol and carvacrol was developed in the Italian ecotypes (18.4 and 2.04%) and the lowest concentration of the same metabolites was 2.4% thymol and 0.36% carvacrol, in the Chinese ecotype at the altitude of 3386 m.a.s.l.. Thymol and carvacrol give oregano multiple antioxidant, microbiological and food preservative properties, as well as potential applications in perfumery and cosmetics.

Keywords: *Origanum vulgare ssp*, thimol, carvacro, HPLC

I. INTRODUCCIÓN

Perú es uno de los países con mayor diversidad biológica del mundo, debido a su posición geográfica en el planeta. El país cuenta con 45 – 55 mil especies de plantas, de las cuales 2000 son promisorias. Debido a esta gran diversidad (fauna y flora) sus beneficios para alimentación, medicina e industria se pueden aprovechar.

El nombre orégano comprende más de veinticuatro diferentes especies de plantas, entre las que destacan el orégano europeo *Origanum vulgare* de la familia Lamiaceae, (Rzedowski, 1978 y Huerta, 1997). El año 2006, la exportación de orégano producido en Tacna ascendió a 72,2% del total de orégano exportado. Le siguieron en importancia Arequipa con 23,1% del total y Lima con 3,9%. Brasil es el mayor país importador de orégano de la región latinoamericana y sus importaciones muestran una firme tendencia alcista, lo que se ha reflejado en la última década en una tasa de crecimiento anual (ADEX, 2013). Esta especie aromática tiene un gran potencial económico.

El mayor porcentaje de aceites esenciales se logran en zonas de temperatura frías. Asimismo, es resistente al frío; a temperaturas menores a 5 grados centígrados afectan al cultivo de orégano retrasando el crecimiento y quemando los bordes de las hojas (Gonzales *et al.*, 2008). Sin embargo la composición y cantidad de los metabolitos secundarios de estas plantas dependen de la zona geográfica, factores climáticos, altitud, época de cosecha y su estado de crecimiento (Cimanga *et al.*, 2002; Lecona-Uribe *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2009).

El *Origanum vulgare ssp.* es una planta aromática tradicionalmente cultivada en la zona sur del país, la cual es sensible a la altitud (Vokou *et al.*, 1993). Se adapta muy bien a los valles interandinos sobre los 2600 m.s.n.m. Debajo de esa altitud, la concentración de aceite esencial (Timol y carvacrol) disminuye (Hernández y Madrid, 2004).

aceite esencial (AE) de plantas, son de mucho interés debido a las diferentes funcionalidades que cumplen: desde protección a la misma especie de la depredación hasta su polinización por insectos, etc, y por los usos terapéuticos de estas especies atribuibles a estos constituyentes. (Lecona-Uribe *et al.*,2003)

A la fecha existen numerosos estudios en los que se han identificado una gran cantidad de compuestos químicos que varían de acuerdo a la variedad de aceites esenciales (Pascual *et al.*, 2001, Bassole *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003, Hernández *et al.*, 2008, 2009). Actualmente se estudian y prueban propiedades como conservador de alimentos, anticancerígeno, plaguicida y antimicrobiano, (Zheng y Wang, 2001; Portillo *et al.*, 2004; Martinez-Rocha *et al.*, 2008). Es por esto que en la presente investigación planteamos el desarrollo de esta innovación va a permitir estudiar espacialmente la concentración de timol y carvacrol en el aceite esencial de orégano y establecer que quimitipo se desarrollo.

Los objetivos de la siguiente investigación fueron:

- Determinar el rendimiento del Aceite esencial de orégano por altitud y ecotipo.
- Establecer los parámetros para la determinación la concentración de timol y carvacrol por HPLC.
- Determinar timol y carvacrol de seis ecotipos de aceites esenciales de orégano por HPLC.
- Hacer la caracterización fisicoquímica del aceite esencial de orégano del mejor ecotipo en base al contenido de timol y carvacrol

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1 Historia del Orégano;

El orégano vulgar es una especie autóctona del Mediterráneo europeo, y las primeras referencias de su utilización culinaria y medicinal se encuentran en reseñas helénicas, aunque posiblemente su uso se remonte a pueblos de la prehistoria. El término *Origanum* proviene de dos palabras griegas: oros (montaña) y granos (ornamento), por lo que estos lo definirían como la belleza o el adorno de las montañas (Chávez et al., 2007).

También los romanos lo emplearían en sus platos, en algunos casos mezclándolo con el poderoso sabor del garum procedente de la colonia romana de Carthago Nova. Ambos pueblos conocían también las propiedades curativas del orégano y lo utilizaban para tratar trastornos nerviosos, retención de líquidos, contusiones y dolores articulares. Durante la Edad Media se empleó para tratar los problemas de hígado y como desinfectante del ambiente durante las epidemias, quemándolo en braseros mezclado con ramas de menta y tomillo (García et al., 2007).

Las variedades de esta hierba aromática se encuentran de forma silvestre por toda Europa y Asia occidental. La variedad más extendida es la mejorana común y de aroma más suave, ampliamente utilizada en la gastronomía tradicional italiana. El orégano común o mejorana picante crece más abundantemente en las montañas de la zona Mediterránea, con gran proliferación en las colinas del levante español, donde adquiere una amplia gama de perfumes e intensos aromas (Chávez et al., 2007).

El descubrimiento de América en el XV propició que los colonos llevaran semillas de esta especie para probar su cultivo en tierras sudamericanas, donde se adaptó con gran rapidez al nuevo clima. El orégano (*Origanum vulgare*) fue introducida a nuestro país por los españoles, actualmente se encuentra en los interandinos, principalmente en el sur del Perú.

Actualmente el comercio de esta hierba aromática se centra en el este mediterráneo, California y México, aunque países como Perú y Argentina están empleando grandes extensiones de tierra para la producción destinada a la exportación (Plauset *al.*, 2001).

2.2 El Oregano (*Origanum vulgare* spp.)

1.2.1 Generalidades

El orégano, cuyo nombre científico es *Origanum vulgare*, su desarrollo se da a lo largo del año y esto se debe a las excelentes condiciones climáticas que existen al sur del país. Se adapta a todo tipo de suelo, en especial en alturas comprendidas entre 2850 a 3400 m.s.n.m. (Bernal *et al.*, 2010). Las regiones que se dedican a sembrar el orégano es Tacna, Arequipa, Moquegua, Junin, Apurimac, Ayacucho, Puno, La Libertad. (SIEA, 2015)

Klauer (2009). menciona que el *Origanum vulgare*, es una planta extremadamente polimorfa (muchas formas), sus variaciones son influidas por el medio donde se desarrollan y la época del año, lo que ha generado un amplio número de variedades. Es considerado un cultivo marginal, porque se puede desarrollar en suelos pobres. Es una planta resistente al frío, las temperaturas menores de 5 °C afectan al cultivo, en su crecimiento y algunas veces el borde de sus hojas quemadas.

2.2.1 Clasificación taxonomica y descripción morfológica.

Bajo el nombre genérico de Orégano se reconoce especies de por lo menos tres generos diferentes, pertenecientes a la familia de Lamiaceae (Labiatae). (Zegarra, 1994 , Ugás *et al.*, 2000, y Arcila *et al.*, 2004)

La familia de las Lamiaceae son mayormente hierbas y arbustos, en el Cuadro 1 se presenta la clasificación taxonómica de las distintas especies.

Cuadro 1: Clasificación Taxonómica de las especies.

Angiospermae	Dicotiledoneae	Sympetaleae	Tubiflorae	Labitea	Albahaca, Mejorana, Menta, Orégano , Romero, Salvia, Tomillo.		
				Solanáceae	Chile, Pimenton, Pimiento, rojo		
				Perdaliaceae	Ajonjoli		
				Vervenaceae	Orégano Mexicano		
				Campunulatae	Compositae	Camomila, Chicoria, Estragón	
				Arquiclaamydeae	Piperales	Piperaceae	Cubeba, Pimienta larga, Pimienta.
						Myristicaceae	Macis, Nuez Moscada
					Ranales	Lauraceae	Laurel, Canela, Casia
						Magnoliaceae	Anis estrella
					Rhoeadales	Cruciferae	Mostaza, Wasabi
	Myrtiflorae	Myrtaceae	Pimienta inglesa, clavo.				
	Unbelliflorae	Umbelliferae	Anis, comino, apio, Chirivia, Cilantro, Comino, Eneldo, Hinojo, Perejil.				
	Monocotiledoneae	Liliiflorae	Liliaceae		Ajo, Cebolla		
			Iridaceae		Azafrán		
		Scitamineae	Zingiberaceae		Cardamomo, Jengibre		
		Orchidales	Orquidaceae	Vainilla			

Fuente: Adaptado de Nakatani y citado por Arcila (2004).

Ugás, (2000), Oliveira *et al.*,(2007) y Klauer,(2009) describe la ubicación taxonómica de la siguiente manera

División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Verbenales
Familia : Lamiaceae
Genero : *Origanum*.
Especie : *Origanum* spp L

En el Perú se cultivan principalmente 02 tipos de orégano: el orégano “zambito” que se comercializa en el mercado local como hierba fresca; y el denominado “Nigra”, que se produce para exportación. En algunas zonas cultivan otro tipo de orégano, el denominado “orégano chileno”, que posiblemente provenga de un cruzamiento de otros tipos de orégano, pero con poco valor comercial (Klauer, 2009)

Según Amanda Di Fabio (2000), los oréganos que se producen en el Perú (zambito y nigra) son híbridos que provienen del cruzamiento de la mejorana (*Origanum majorana*) con las subespecies de orégano *vulgaris* y *virens*. Por lo tanto, el orégano “zambito” sería el *Origanum x aplii* (Domin) Boros, proveniente del cruzamiento de *Origanum majorana* con *Origanum vulgare* ssp *vulgare*; y el orégano “nigra” sería el *Origanum x majoricum* Cambessedes, proveniente del cruzamiento de *Origanum majorana* con *Origanum vulgare* ssp. *Virens*. Existen otras variedades como el orégano turco, que presenta inflorescencias rosadas, y el orégano mexicano (*Lipia* spp) de sabor algo picante

Planta perenne de la familia de las labiadas de hasta 80 cm. Tallos erectos, pilosos y aromáticos. Hojas ovales, pecioladas, dentadas o enteras. Flores rosadas, violáceas o blancas de hasta 7 mm., reunidas en inflorescencias redondeadas terminales. Estambres sobresalientes. En herbazales secos y al lado de los bosques, los cuales tienen un potencial de aplicación en la alimentación animal debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Wenk, 2003).

2.3 Composición química del orégano

Las especies vegetales aromáticas contienen desde aceites esenciales (AE) o Aceites volátiles y oleorresinas hasta alcaloides y glicósidos de interés farmacológico son productos del metabolismo secundario.(Dewick, 2002)

- Ácidos: Rosmarínico (Planta y hojas) palmítico, esteárico, oleico, ursólico, cafeico, cáprico (Planta)
- Aceite esencial rico en timol, cineol, carvacrol, borneol, beta-bisoboleno, limoneno, alfa pineno, beta pineno, mirceno, camfeno, alfa terpineno.(Planta)
- Minerales: Potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, hierro (Planta)
- Taninos (Planta)
- Vitaminas: Niacina, beta-catoteno (Planta), (Stashenko *et al.*, 2010)

2.4 Aceite Esencial.

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en distintas partes del mismo vegetal: en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Según Briga (1962), estos aceites esenciales son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; todos ellos fácilmente separables ya sean por métodos químicos o físicos, como la destilación, refrigeración, centrifugación, etc.

Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos aromas volátiles pertenecientes a diferente clase de la química orgánica: hidrocarburos (compuestos terpenicos), Alcoholes, Aldehidos, cetonas, esterios, éteres y fenoles. Obtenidos de canela (Cinamaldehido), Clavo (eugenol), orégano (carvacrol), eucalipto (cineol) y tomillo (timol) entre otros (Vásquez., 2012).

Los componentes mayoritarios de los aceites pueden constituir hasta un 85% del total mientras que el resto se presentan como trazas. La concentración del compuesto concreto total de la mezcla de aceites de la planta puede ser muy variable. Un ejemplo es la concentración de cinamaldehido en la mezcla de aceites esenciales procedente de la canela

que puede variar entre el 60 y 75% (Duke *et al.*, 2002) mientras que el timol y carvacrol procedente del tomillo pueden variar entre el 3 y 60% del total (Lawrence.,2005).

2.5 Composición Química del Aceite Esencial

Los AEs se componen principalmente de terpenos y fenilpropenos; los terpenos contienen unidades de cinco carbonos llamadas isopreno (2-metil-1,3-butadieno). De acuerdo con sus unidades de isopreno, se clasifican en monoterpenos (C₁₀H₁₆), sesquiterpenos (C₁₅H₂₄), diterpenos (C₂₀H₃₂) y triterpenos (C₃₀H₄₈). Los terpenos en forma de alcoholes, aldehídos, cetonas, lactonas y ésteres también están presentes en algunas plantas (Xue *et al.*, 2004; Acevedo *et al.*, 2013 y Govindarajan *et al.*, 2016). Los fenilpropenos constan de un anillo aromático de seis carbonos con una cadena lateral de tres carbonos. Se ha estimado que hay más de 1000 monoterpenos y 3000 sesquiterpenos, y sólo se han descritos 50 fenilpropenos. Otros constituyentes importantes son los fenoles, éteres fenólicos, ácidos esterificados, lactonas, óxidos, acetales, aminas y compuestos con nitrógeno (Lee *et al.*, 2005) y Ricaldi (2006). En la Figura 1 se ilustra la estructura de algunos de estos compuestos.

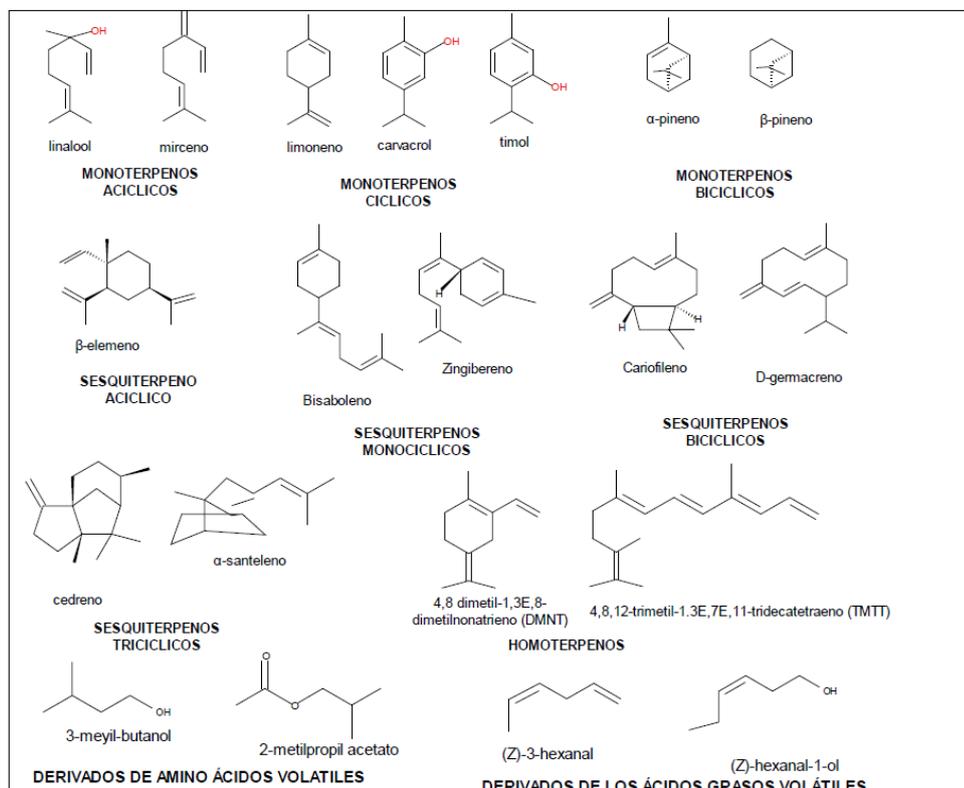


Figura 1 Estructuras representativas de isoprenoides, aminoácidos volátiles y otros derivados de plantas (Dudareda *et al.*,2006)

Los principales componentes del AEO son fenólicos, carvacrol y timol. Sin embargo, las composiciones químicas varían dependiendo de la región geográfica y la sesión de cosecha. (Faleiro *et al.*, 2003). La composición química del aceite esencial de *O. vulgare*. varía con la ubicación geográfica del lugar de cosecha, el clima y otros factores condicionantes ecológicos. La influencia de estos factores sobre los distintos *Origanum* definen sus quimiotipo. (Kumar *et al.*, 2007)

2.6 Síntesis de los aceites esencial (AEs).

1.2.1 Terpenos.

Los terpenos son originados de su precursor universal el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero el dimetil-alil-difosfato, los cuales son formados por dos vías. En el citosol, el IPP es sintetizado por la vía del ácido mevalónico a partir de tres moléculas de Acetil-CoA y en las plástidas es producido del piruvato y el gliceraldehido 3-fosfato por la vía del metileritrol-fosfato (Dudareva *et al.*, 2006).

Después de la formación del geranil pirofosfato y el farnesil un rango amplio de estructuras de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos cíclicos y acíclicos son producidos por una familia grande de enzimas conocidas como las terpenosintetasas/ciclasas. Una de las propiedades más sobresalientes de estas enzimas es su facilidad para hacer productos múltiples a partir de un sustrato simple fenil-di-fosfato. Hasta la fecha más de 100 terpeno sintetasas han sido aisladas y caracterizadas de diferentes especies de plantas. Reacciones de modificación también involucran la formación de terpenos con estructura acíclica irregular de C16 y C11, también llamados homoterpenos, los cuales son emitidos cuando hay un daño tisular (Martin *et al.*, 2004 y Dudareva *et al.*, 2006)

2.2.1 Fenilpropanoides/benzoides

Estos componentes derivados de L-fenilalanina, constituyen una clase de componentes volátiles estructuralmente diversos y que además están involucrados en la reproducción y defensa de las plantas. En el primer paso de la biosíntesis de los fenilpropanoides, la L-fenilalanina(Phe) es convertida a ácido *trans*-cinámico en una reacción catalizada por la L-fenilalanina amonio liasa (PAL). En los siguientes pasos comparte con la vía de la síntesis de lignina/lignano la formación de fenilpropenol (monolignol). Ácidos hidroxicinámicos, aldehídos y alcoholes son formados por la vía del ácido *trans*-cinámico.

Algunos intermediarios pueden ser convertidos a componentes volátiles como en el caso del eugenol y el isoeugenol, de la albahaca y la petunia, los cuales son formados a partir del acetato coniferil, en una reacción catalizada por la eugenol y la isoeugenol sintetasas. Los benzoides, también se originan del ácido *trans*-cinámico por la vía alterna del fenilpropanoide (Boatright *et al.*, 2004).

2.7 Actividad Biológica de los Componentes del Orégano

Dentro de las actividades biológicas del orégano (género *Origanum* y *Lippia*) se encuentran la actividad antimicrobiana, antiparasítica, estrogénica, antigenotóxica, insecticida y antioxidante. La principal es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Origanum*. La función antioxidante de diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención en relación con el papel que tienen en la dieta en la prevención de enfermedades (Kahkonen *et al.*, 1999). En algunos estudios de especias se han aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos. El efecto antioxidante de las plantas se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (Azuma *et al.*, 1999).

El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los fenoles carvacrol y timol (Deighton *et al.*, 1993). Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) (Baratta *et al.*, 1998 a y b).

Por otro lado, el timol y el carvacrol son compuestos fenólicos naturales, considerados como posibles antioxidantes, agentes antifúngicos y antibacteriales, acaricidas, analgésicas, antiacné, antiespasmódicas, desodorantes, dermatigénicas, expectorantes, insecticidas, larvicidas, pesticidas y vermicida presentes en cantidades significativas en los aceites esenciales (Duke, 2002).

Al respecto, de la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral, se ha observado una fuerte actividad antibacteriana contra distintas especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Alves de Azeredo *et al.*, 2010). Por otra parte, se destaca el efecto biocida sobre distintas especies pertenecientes al género *Candida* (Brum *et al.*, 2010).

En la industria alimenticia cobran especial importancia el uso de aceites esenciales ya que la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (21 CFR Sec. 182.10, 182.20, 482.40 y 182.50) dice que los complejos naturales de sabores o “*flavors*” como los aceites esenciales, son reconocidos como seguros (GRAS) para ser usados en forma intencionada en alimentos (Smith *et al.*, 2005). Dado a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales del orégano (Bhale *et al.*, 2007 y Dambolena *et al.*, 2010), esta hierba aromática o sus aceites esenciales pueden ser utilizados como conservantes naturales de alimentos que permiten prolongar la vida útil de los mismos.

2.8 Uso y aplicaciones del aceite esencial de orégano

El orégano se utiliza principalmente como condimento (Di Fabio, 2000; Arizio *et al.*, 2006 y Dambolena *et al.*, 2010). Se emplea como aromatizante de diversas formulaciones de licores, salsas de tomate y productos horneados (como pizzas y panes) y en aderezos para ensaladas (Koksal *et al.*, 2010). Como hierba medicinal se destacan sus propiedades antiespasmódicas, estimulantes, expectorantes, estomáquicas, diuréticas, antisépticas y cicatrizantes (Arias *et al.*, 2009). Estudios farmacológicos demostraron la actividad colerética, espasmolítica y antihipertensiva (Baser *et al.*, 2008.). Se lo utiliza también como calmante en pomadas y compresas ya que alivia dolores reumáticos y en la industria cosmética para la elaboración de perfumes y jabones (Arizio *et al.*, 2006).

Sobre el poder antiséptico de los aceites esenciales de plantas pertenecientes especialmente a las familias Labiadas hay amplia información. Todas contienen un compuesto o principio activo propio pero varios compuestos son comunes a numerosas especies. Las plantas de uso tradicional ofrecen posibilidades para la búsqueda de principios bioactivos o Etnomedicina siendo una alternativa de uso de antisépticos estándar (Albado y Saez, 2001).

2.9 Características Generales del *Origanum vulgare*

Origanum vulgare (Labiata) "orégano" es cultivado en Tacna (Tarata) (Cooperación Peruano-Alemana, 1983) en gran escala, cosechado, desecado y distribuido a los mercados nacionales y al exterior. Se utiliza en la preparación de alimentos. Las hojas y flores se aplican en el campo farmacéutico debido a las propiedades tónicas, amargo-excitantes, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas (Guerrero y Núñez, 1991).

Esta especie aromática tiene un gran potencial económico. Se ha analizado químicamente el orégano (*Origanum vulgare*) para determinar la variabilidad en la composición química causada por las condiciones climáticas de la región y puede desarrollarse desde 50 a 3400 msnm es decir casi desde el nivel del mar hasta la zona de las altas montañas. El mayor porcentaje de aceites esenciales se logran en zonas de temperatura frías. Asimismo, es resistente al frío; sin embargo, las temperaturas menores a 5 grados centígrados afectan al cultivo de orégano retrasando el crecimiento y quemando los bordes de las hojas (Gonzales *et al.*, 2008).

Origanum vulgare L. (orégano) es una planta herbácea perenne, con una amplia distribución en toda Europa, Asia y el Norte de África (Teuscher *et al.*, 2005) *Origanum vulgare* L. *ssp. Vulgare* es el más estudiado en cuanto a sus propiedades fitoquímicas y actividad biológica. Sin embargo especies relacionadas tales como *Origanum vulgare* L. *ssp. viride*, *Origanum Vulgare* L. *ssp. Hirtum*, *Origanum vulgare* L. *ssp. Heracloticum*, *Origanum vulgare* L. *ssp. Virens* *Origanum vulgare* L. *ssp. Glandulosum*. *Origanum Vulgare* L. *ssp. Gracile*. También son de interés (Teuscher *et al.*, 2005; Béjaoui *et al.*, 2013 y Lukas *et al.*, 2015).

Las especies de *Origanum* muestran una alta variabilidad del contenido de aceites esenciales (en términos de calidad y cantidad), debido a diferencias geográficas y etapa vegetativa. El aceite esencial de orégano comprende una serie de compuestos, entre los cuales el tímolo, el carvacrol, 1-terpineol, β -cariofileno y p-cimeno prevalecen. (Baranauskiene *et al.*, 2013; Béjaoui *et al.*, 2013; Asensio *et al.*, 2015; Vazirian *et al.*, 2015 y Lukas *et al.*, 2015)

Las partes aéreas de *Origanum vulgare* L. son una fuente de Flavonas, tales como glucósidos de kempferol, quercetina, miricetina, apigenina, naringenina, luteolina, acacetina y taxifolin. (Koukoulitsa *et al.*, 2006; Gulluce *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2014)

2.10 Extracción de Aceites Esenciales

La extracción de los aceites esenciales del material vegetal puede ser llevada a cabo por una variedad de procesos antiguos y nuevos, como la destilación con vapor, hidrodifusión, maceración, la extrusión mecánica (frío), extracción con disolventes y extracción con fluido supercrítico (EFS). Los aceites esenciales crudos producidos por cualquiera de estos

métodos pueden ser necesarios para ser refinados o adicionalmente procesados, ya sea por una combinación adecuada de los procesos anteriores o por redestilación, fraccionamiento, cromatografía, cristalización, tratamiento químico, etc., dependiendo de la naturaleza de la materia prima y la calidad deseada del producto y las especificaciones (Sarker *et al.*, 2006).

Los compuestos principales en el aceite esencial, el timol y carvacrol se informó que tienen el más alto antioxidante (Hamzeh, 2012 y Kucukbay *et al.*, 2014). Adicionalmente, el timol y el carvacrol exhiben diferentes actividades biológicas. Mientras que el timol tiene un antiséptico efecto, el carvacrol tiene características antifúngicas (Tepe *et al.*, 2011).

1.2.1 Destilación Por Arrastre De Vapor

Los aceites esenciales son predominantemente obtenidos por destilación con vapor, usando vapor directo o indirecto. El vapor se genera en una caldera individual y se inyecta en la parte inferior del recipiente con el material vegetal (Figura 2). La extracción del aceite esencial se ve facilitada por la destilación de dos líquidos inmiscibles, es decir, agua y aceite esencial. Luego el vapor de agua y vapores de aceites esenciales se condensan y se separan; el aceite generalmente es más ligero que el agua, flota en la parte superior y el agua va al fondo. (Clarke, 2008)

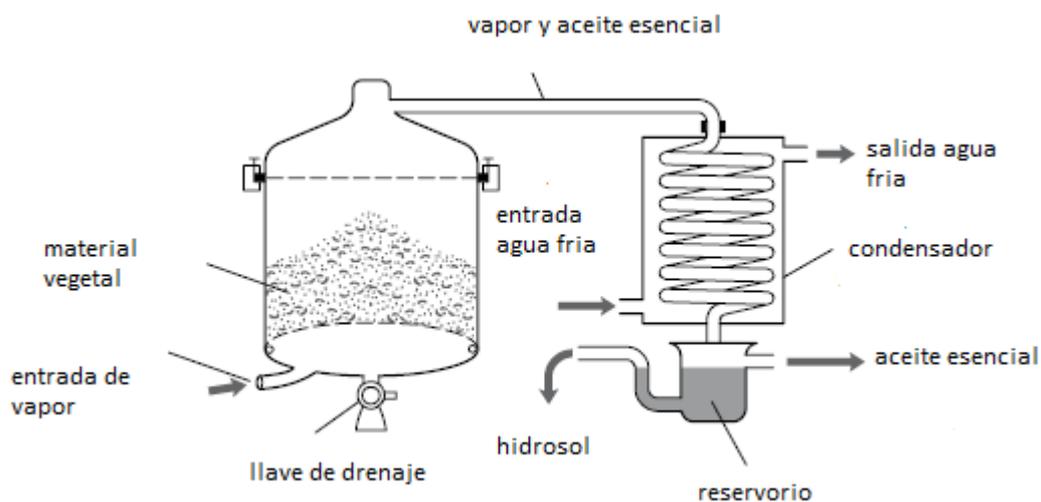


Figura 2: Principales componentes de un equipo de extracción por arrastre con vapor.

Fuente:Clarke, 2008

2.11 Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales y contenido total de fenoles

Un gran número de métodos han sido desarrollados para evaluar la capacidad antioxidante total de alimentos, suplementos dietarios, extractos vegetales o compuestos puros. Sin embargo, pocos de ellos han sido ampliamente utilizados debido a limitaciones relacionadas con cuestiones metodológicas y fuentes de radicales libres (Prior y Schaich., 2005 Schauss *et al.*, 2006; y Schauss *et al.*, 2006). Ensayos basados en el uso de radicales como DPPH. y ABTS.⁺ son los métodos espectrofotométricos más populares para la determinación de la capacidad antioxidante de alimentos, bebidas y extractos vegetales (Bendini *et al.*, 2006), los cuales han sido usados ya que son procedimientos simples, rápidos, sensibles y reproducibles (Ozcelik *et al.*, 2003).

Los antioxidantes pueden desactivar radicales por dos mecanismos principalmente: transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones. Los resultados finales son los mismos independientemente del mecanismo, pero la cinética y potencial de las reacciones difieren (Antolovich *et al.*, 2002; Prior y Schaich, 2005 y Moon y Shibamoto, 2009).

El aceite esencial de *Origanum. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol. Varios investigadores confirman dicho potencial antioxidante en extractos y aceites esenciales de diferentes especies de orégano (*Origanum vulgare*, *Origanum. compactum*, *Origanum. Majorana*) (Blanco, 2006 y Ghasemnezhad *et al.*, 2016).

2.12 Metodo que mide la capacidad para secuestrar radicales

Existen algunos métodos que miden la capacidad para secuestrar los radicales formados en los procesos de peroxidación lipídica. Uno de ellos consiste en medir la concentración de antioxidante requerido para secuestrar el 50% de los radicales en un tiempo determinado. ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico- 6) (ABTS⁺).

2.12.1. Capacidad antioxidante por el método de cation –radical ABTS⁺

El efecto protector de los AE y de las sustancias de referencia se determina, entre otros, por el método descrito por Re *et al.* (1999), el cual se fundamenta en la capacidad que tienen

algunos compuestos para atrapar radicales, *i.e.* ABTS⁺. La técnica se usa ampliamente para muestras biológicas, alimentos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica (Re *et al.*, 1999 y Kuskoski, *et al.*, 2005).

El ABTS⁺ es un cromógeno artificial que presenta un espectro ultravioleta (UV) con tres máximos de absorbancia a 414, 752 y 842 nm en medio acuoso, y a 414, 737, 873 nm en medio etanólico (Re, *et al.*, 1999; Nenadis, *et al.*, 2004 y Branchi, *et al.*, 2005). La reducción del catión-radical depende de la concentración del antioxidante y del tiempo de reacción. El grado de decoloración permite conocer el porcentaje de inhibición del catión radical ABTS⁺ en función de la concentración y el tiempo, y es calculado con respecto a la concentración del Trolox, utilizado como estándar bajo las mismas condiciones (Nenadis, *et al.*, 2004; Branchi, *et al.*, 2005). El catión radical nitrogenado es generado por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio, (Re *et al.*, 1999 y Nenadis, *et al.*, 2004), como se aprecia en la Figura 3.

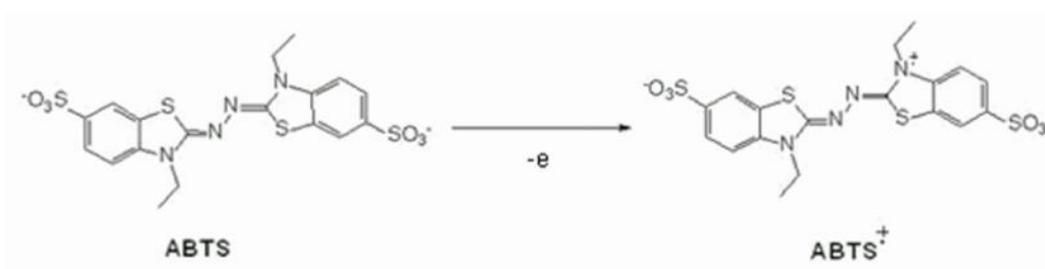


Figura 3: Generación del catión-radical ABTS⁺

Fuente: (Re *et al.* 1999; Nenadis, *et al.*, 2004).

2.13 Determinación del timol y carvacrol en el aceite esencial de orégano. .

2.13.1. Cromatografía líquido de alto rendimiento HPLC

Las técnicas de cromatografía de HPLC están siendo ampliamente usadas para la separación identificación y cuantificación de compuestos monoterpenos, terpenos y fenólicos, por su versatilidad, precisión y costo relativamente bajo. Con mayor frecuencia, el método que se emplea es la cromatografía de reparto en fase reversa, pues permite una considerable separación de las diferentes clases de compuestos monoterpenos y fenólicos, pues está compuesta de una fase estacionaria la cual es no polar y una fase móvil la cual es relativamente polar. La fase estacionaria no polar, está compuesta por una columna de un

relleno (siloxano) recubierto de grupos hidrocarburos (una cadena de C8 o C18); el gradiente de eluciones es generalmente realizado con sistema binario de solvente, como el agua que contiene acetato o formiato de amortiguamiento, y metanol o el acetonitrilo como modificador orgánico (el acetonitrilo es preferido al metanol ya que este último puede provocar un elevado ruido de interferencia). De otro lado la elución isocrática se ha utilizado por gradiente debido a la diversidad de compuesto monoterpénicos y fenólicos. Para obtener buenas resoluciones en un tiempo razonable, la polaridad de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente (Antolovich *et al.*, 2002; Parejo *et al.*, 2004 y Rijke *et al.*, 2006)

Una ventaja importante de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) sobre GC es la temperatura más baja usada durante el análisis, lo que reduce el riesgo de daños causados por el calor a los compuestos. (Zhiwei *et al.*, 2011)

La cromatografía líquida por lo general se realiza a temperatura ambiente, pero la temperatura hasta 40 °C a veces se recomienda para reducir el tiempo del análisis, si el principal propósito del estudio es determinar los principales flavonoides en una muestra.

Por otro lado, se ha demostrado que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es versátil y sensible para detectar los volátiles esenciales del aceite esencial (Stintzing *et al.*, 2011) y también termolábiles (Hagavall *et al.*, 2007) y sustancias menos volátiles (Stintzing *et al.*, 2012). Los terpenoides individuales de la fragancia se determinaron en aceites esenciales mediante HPLC (Wang y Liu., 2010 y Wu *et al.*, 2010)

La identificación de los compuestos fenólicos requiere el empleo de detectores de Uv-vis arreglo de diodos (DAD) y UV Fluorescencia (Nackz y shahidi, 2004). La detección de fluorescencia es uno de los métodos de detección más sensible, selectivo y específico para el análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos (Teye, 2016)

La determinación de timol y carvacrol en muestras de orégano y otras plantas, ha sido realizado por muchos autores utilizando métodos de cromatografía HPLC. (Hajimehdipoor *et al.*, 2010). El método por HPLC es una técnica muy precisa para cuantificar los componentes volátiles y no volátiles de una planta, logrando una buena separación (Zhiwei, 2011)

III. METODOLOGÍA Y MATERIALES

3.1 Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en: Laboratorio de análisis fisicoquímica de la facultad de industrias alimentarias, laboratorio de análisis químico de la facultad de ciencias y Instituto de investigación en bioquímica y biología molecular de la UNALM Lima –Perú.

3.2 Materiales

3.2.1 Materia prima.

La materia prima utilizada fueron los ecotipos de la familia de Lamiaceae, género de *Origanum*, especie (*vulgare* ssp.). Se utilizó plantas procedentes de la ciudad de Tacna y adaptadas a las altitudes , 3042 m.s.n.m (Urubamba), 3260 m.s.n.m (Cusipata), 3092 m.s.n.m (Andahuaylillas), 3386 m.s.n.m (Jaquijaguana), 3638 m.s.n.m (Sicuani), de Urubamba del Departamento de Cusco.

Los arbustos fueron previamente identificados por un especialista en Genética de UNALM por el método de electroforesis, en el cual se obtuvo los patrones de ADN de orégano los cuales se comparan con la especie “pampa oregano” proveniente de Tacna (anexo 1); demostrando que no es un híbrido.

Los ecotipo de *Origanum vulgare* ssp fueron: Italiano, Oreja de elefante, Nigra, Chino, Floración temprana 1 y floración temprana 2.

3.2.2. Materiales:

- Beakers de 50, 100, 250 ml
- Bureta de 25 ml
- Erlemeyers de 150, 250 y 500ml

- Pipetas de 0.5, 1 y 2 ml
- Probetas de 50, 100 y 1000 ml
- Viales de 1 ml
- Bureta 25 ml
- Fiolas de 10, 25, 100, 500 ml

3.2.3 Equipos y reactivos.

3.2.3.1 Equipos:

- Cromatografo HPLC.
 Marca: Hitachi Elite laChromm
 Columna C18 (Oven Model L-2300)
 UV Detector Model L-2400
 Software: Ezchrom Elite
- Estufa I
 Marca Memmert
 Serie: TV40l60903
- Balanza analítica
 Marca: OHAUS Precision 0.01mg
 Serie: D19311118253447
- Espectofotometro
 Marca: Milton
 Modelo: Spectronic Genesys.
 Serie: 3v97132003
- Camara de refrigeración
- Refractometro ABBE Marca AUS JENA
- Viscpsimetro cannon Fensle y otros similares
- Colorimetro A*B* y L*

3.2.3.2 Reactivo.

- Ácido Acetico glacial. (Merck)
- Ácido borico (Merck)
- Ácido clorhídrico (Merck)
- Ácido sulfúrico (Merck)
- Alcohol Etilico 95% (Merck)

- Acetonitrilo grado HPLC (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Metanol 98%(Merck)
- Hexano de grado QP (Merck)
- Hidroxido de sodio (Merck)
- Tetracloruro de sodio (Merck)
- Yoduro de Potasio (Merck)
- Sulfato de sodio anhidro (Merck)
- Estándar de cromatograficos para compuestos determinados por HPLC Timol y Carvacrol. (Sigma Adrich)

3.3 Metodos de análisis.

3.3.1. Analisis Físico-Químico.

3.3.1.1.. Determinacion de Color: Se determinó con el colorímetro Konica-Minolta. Los valores que arroja este análisis son el a* (verde y + rojo) b*(azul y +amarillo) y L*(luminosidad) Este método corresponde al descrito por Hunterlab (2008).

3.3.1.2.Determinación de la gravedad especifica: De acuerdo a la norma técnica Peruana N° 319.0818.

3.3.1.3.Índice de refracción: Mide el cambio de dirección que experimenta un haz de luz. Tal como se menciona en el método 921.08 AOAC (2007).

3.3.1.4.Determinación de la solubilidad en alcohol: Se realizó de acuerdo a la NTP N° 319.084. Se utilizo alcohol etílico de 99°, 96°, 90°, 80° y 70° GL.

3.3.1.5.Porcentaje de acidez: Consiste en cuantificar a los ácidos libres Lo mencionado anteriormente se detalla en el método 940.28 AOAC (2007).

3.3.1.6.Determinacion de la capacidad antioxidante por Metodo del Radical ABTS⁺: La actividad captadora del radical libre ABTS• se determinó empleando el método descrito por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones.

3.3.1.7. Cuantificación del timol y carvacrol por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu series 9^a, con un detector de fluorescencia junto con su software de manejo respectivo. (Hajimehdipoor *et al.*, 2010) (Anexo 6)

3.4 Análisis estadístico.

Se utilizó un diseño de bloques completo al azar ; donde los bloques fueron las altitudes de los sitios de donde procedían las plantas y los tratamientos fueron los diferentes ecotipos. Mediante el software “XLstar.2017.4” y aplicando la prueba de ANOVA y tukey se se determinó si existían diferencias significativas de los seis ecotipos de orégano, cultivado a diferentes altitudes y en cuanto al rendimiento de aceite esencial y contenido de timol y carvacrol.

3.5 Metodología experimental.

3.5.1 Extracción del aceite esencial

La extracción de AEO se hizo siguiendo el flujo de operaciones mostrado en la Figura 4, que se describe a continuación.

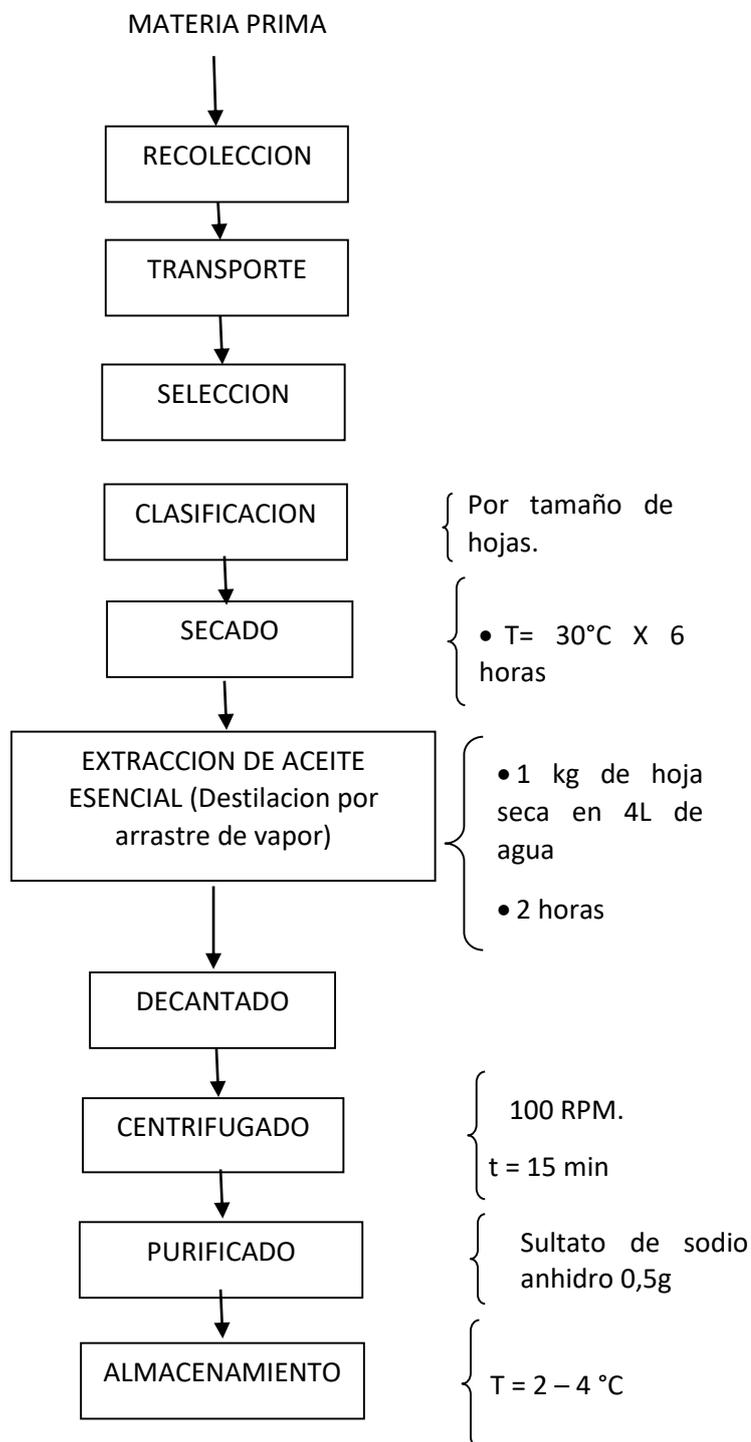


Figura 4: Flujo de Operaciones para la obtención de aceite esencial de orégano

a) Materia prima:

Se trabajó con hojas de orégano, cosechadas de 5 localidades del valle de Urubamba – Cusco y en cada localidad se acopio 6 ecotipos de *Origanum vulgare ssp.*, con tres repeticiones cada ecotipo proporcionados por la empresa Molinos cusco. SA.(fotos-Anexo2a) También se observa en el Cuadro 2 y (Anexo 2b), la procedencia de los ecotipos y en el cuadro 3 se observa las características climáticas. y en la Figura 5 se muestra las localidades y/o Alturas de estudio.

Cuadro 2: Zonificación agroecológica y cosecha del orégano (*Origanum vulgare ssp.*)

LOCALIDAD	LATITUD	ALTITUD	COSECHA
Urubamba	-13.28889	3042	Otoño
Andahuaylillas	-13.6595	3092	Otoño
Cusipata	-13.8945	3260	Otoño
Jaquijaguana	-13.9858	3386	Otoño
Sicuani	-14.3287	3638	Invierno

Fuente: Proyecto contrato FINCYT – FIDECOM – Molinos – Cusco – Convenio N°049-2012.

Cuadro 3: Caracterización del clima de Urubamba - Cusco

Localidad	Sicuani	Cusipata	Jaquijaguana	Andahuaylilla	Urubamba
Altitud msnm	3638	3260	3386	3092	3042
Promedio de temperatura (°C)	5.3	14.09	11.69	13.3	14.425
Promedio de Precipitaciones (mm)	10.43	3.75	3.79	4.4	46.26

Fuente: SENAMHI- 2013

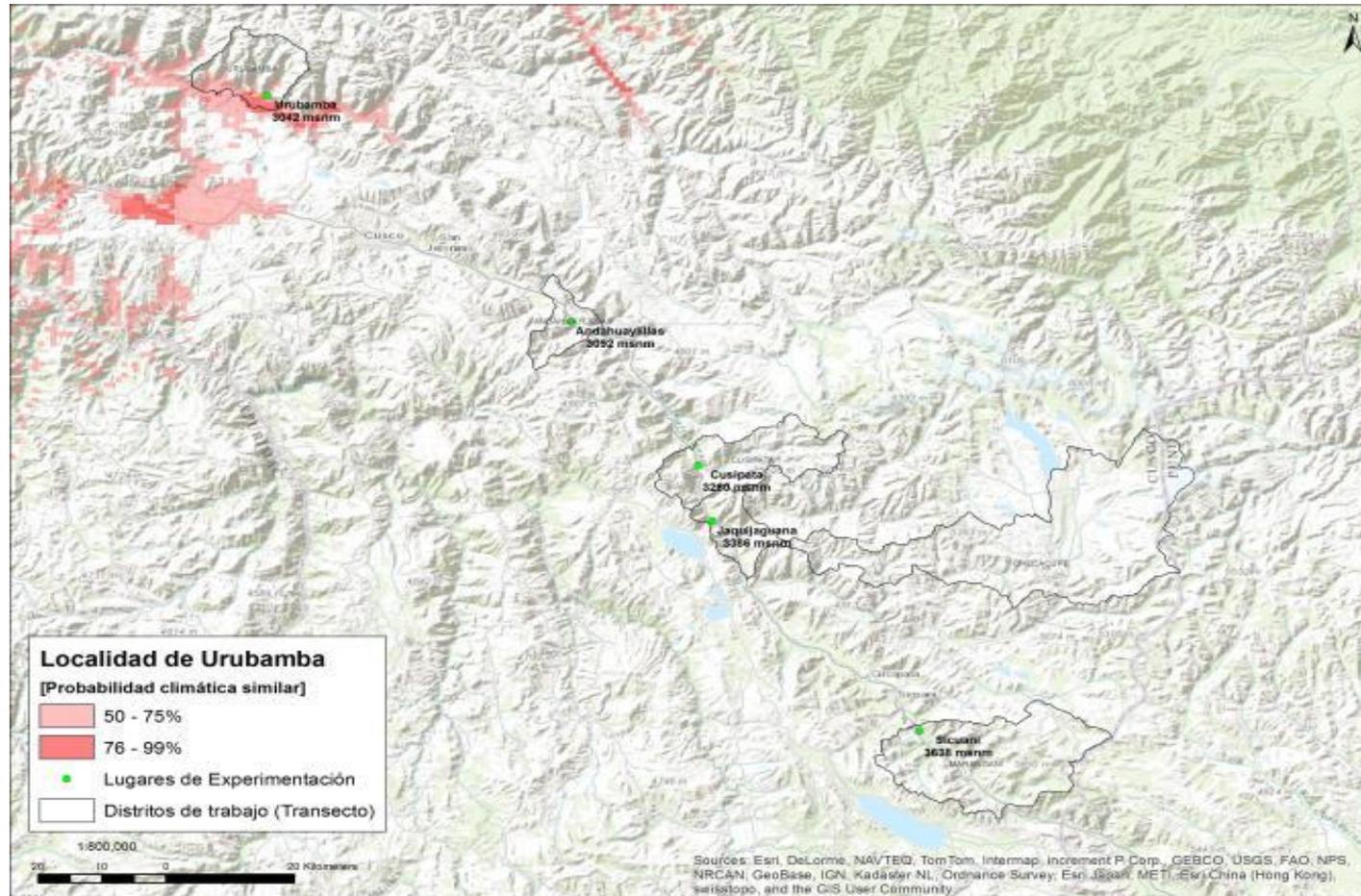


Figura 5: localidades y/o Altitudes de estudio
 Fuente: CIP -Geo base – Hong-kong 2013.

b) Recolección.

Se recolectó las hojas cuando la planta estaban en fase de floración, en horas de la mañana para evitar la transpiración y en forma manual.

c) Transporte.

Se empacó en bolsas de papel la materia prima evitando el apisonamiento, aumento de temperatura y pardeamiento.

d) Selección:

Se eliminó las hojas y tallos que presentaron deterioro (oscurecimiento). (Anexo 2 a)

e) Clasificación:

Se clasificó las hojas de acuerdo a su tamaño como se ve en la foto (Anexos 2b) y se clasifico los ecotipos de orégano de acuerdo a las características de las hojas (Cuadro 4.) Luego se procedió a pesar la materia prima.

Cuadro 4: Descripción de los ecotipos de orégano.

ECOTIPO OREGANO	DE	CARACTERISTICAS DE LA HOJA DE OREGANO	
		ALTURA (cm)	ANCHO (cm)
Chino		2,1	1,17
Italiano		2,3	1,22
Oreja de elefante		2,7	2
Nigra		2,7	1,5
Floración temprana 1		2,5	1,5
Floración temprana 2		2,7	1,6

f) Secado:

La materia prima se deshidrató en un secador por convección forzada a 30°C por 6 horas, cada batch fue 8 kg de hojas frescas con un rendimiento de 3kg de hojas secas y 10, 5% de humedad.

g) Extracción del aceite esencial:

Se llevó a cabo en un destilador por arrastre de vapor.(anexo 2c). Se utilizó 1 kg de hojas secas y 4L de agua. La extracción empezó después de la primera hora de calentamiento, La extracción duró 2 hrs, se obtuvo una mezcla de aceite esencial y agua.

h) Decantado:

Para separar el aceite esencial de Oregano (AEO) del agua se utilizó una pera de decantación.

i) Centrifugación:

Para eliminar el agua residual se utilizó una cetrifuga a 100 RPM por 15 min.

j) Purificado

La purificacin del aceite esencial se realizó utilizando sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4 en una proporción de 1g x 10g de muestra, y se mantuvo en estufa a 50°C, se agitó vigorosamente y filtro para obtener un filtrado claro.

k) Almacenamiento

El aceite esencial se envasó en frascos ámbar. Se almacenó en refrigeración (2 a 4°C) hasta el momento de su uso.

3.5.2. Determinacion del rendimiento de extracción

El rendimiento del aceite esencial para cada una de los ecotipos fue calculado dividiendo la cantidad de aceite obtenida de la muestra vegetal entre el peso de masa seca de la misma muestra.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{g del extracto}}{\text{g de material vegetal}} \times 100$$

3.5.3. Determinación de timol y carvacrol del aceite esencial de orégano

3.5.3.1. Determinación de los parámetros para concentración de timol y carvacrol por cromatografía líquida (HPLC).

La muestra fue depositada en viales (Agilent Technologies 5182-0553). Considerando lo descrito previamente por Hajimehdipoor *et al.*, (2010); se realizaron las adecuaciones pertinentes, de acuerdo al objetivo del estudio y el equipo de cromatografía líquidos de alta presión, Se trabajó bajo las siguientes condiciones:

- Cromatógrafo Hitachi Elite laChromm, con el software EZChrom Elite v3.3.2
- Equipado con bomba L-2130
- Válvula gradiente baja presión L-2130ACC
- Degasificadora L-2000ACC, Interface USB IFU
- Horno de columna L-2350
- Mezclador de cuaternario de solventes,
- Columna : RP-C18, 150 mm de largo y 4,6 mm
- Detector utilizado es Hitachi FLD Detector L-2485.
- Longitud de onda de excitación: 230nm.
- Longitud de onda de emisión: 280nm.
- Flujo de la fase móvil: 1ml/min
- Volumen de inyección : 20µl
- Fase móvil: 50% de agua y 50% de acetonitrilo (isocrática)
- Presión: 75 kgf/c
- Temperatura: 35 °C
- Tiempo de corrida 15 min.

Se realizó un acondicionamiento del equipo por 30 min con la mezcla acetonitrilo:agua (50:50), flujo 1ml/min, logrando la estabilización de la señal del equipo.

La corrida de los estándares fue realizada con una fase móvil isocrática formada por acetonitrilo y agua (ACN:H₂O) (50:50), columna purospher star rp18e (4.6x150mm, 5µm) flujo de 1 ml/min, volumen de inyección de todas las muestras y estándares de 20µL y un tiempo de 15 min.

El lavado fue utilizando 5min 100% agua flujo 1ml/min, 5.1min ,50:50 agua acetonitrilo flujo1ml/min, 10min 50:50 agua acetonitrilo flujo 2 mL/min, 30 -60 min 50:50 % agua acetonitrilo flujo 1min, 60 a 90 min 50:50% agua metanol flujo1mL/min.

a. Preparación de stock y soluciones estándares de timol y carvacrol.

Las soluciones Stock (Standares) de timol (3 mg/mL) y carvacrol (0,3 mg/mL) fueron preparadas separadamente con una mezcla de solventes acetonitrilo: agua, (Porel, 2014) en una proporción de ACN:H₂O (80:20). Se realizaron diferentes concentraciones a partir de la solución stock (0,6 - 18 µg/mL de Timol y 0,06 – 1,8 µg/mL para carvacrol) se plateo la curva de calibración del timol y carvacrol. Su estabilidad se comprobó a intervalos regulares mediante HPLC, comparando el área constante de cada pico individual, con el área obtenida para la solución recién preparada, que era bastante similar. Las soluciones de trabajo frescas se prepararon diariamente mediante la dilución apropiada de la solución madre utilizando la fase móvil ACN: H₂O como disolvente diluyente. (anexo 2-d).

b. Identificación y cuantificación

Se determinó la identidad de los componentes de la muestra en base a los tiempos de retención de los estándares puros. Se determino la concentración de los componentes de la muestra a partir de la curva de calibración por regresión lineal y luego se llevara a masa de la hoja (Roldán *et al*, 2010).(anexo 2-e)

c. Linealidad

Para la verificación de la distribución normal de los resultados, se evaluo la linealidad a través de la relación entre la concentración del timol - carvacrol y la absorbancia obtenidas por el detector de fluorescencia (FLD-HPLC). La determinación del coeficiente (r^2) se calculó por ajuste de mínimos cuadrados. La línea de calibración fue realizada a través de dos replicas para concentración de timol o carvacrol para conocer la extensión de la variabilidad total de la respuesta que puede ser explicada por el modelo de regresión lineal.

Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) fueron calculados usando las expresiones $3.3\sigma/s$ y $10\sigma/s$, respectivamente, en donde σ es la desviación estándar interceptada y s es la pendiente de la curva de calibración.

Selectividad

Para el desarrollo del método cromatográfico, se requiere de una separación de los picos, se evaluó la resolución de los picos de Timol y Carvacrol.

Precisión

La precisión del método indica el grado de dispersión entre la determinación de la misma muestra. Tres muestras en tres intervalos (80, 100 y 120 %) fueron analizadas en el mismo día (intra diario) y por tres días consecutivos (interdiario) y se determinó la desviación estándar relativa (% RSD). Las tres muestras de cada nivel fueron preparadas e inyectadas en el HPLC por tres veces.

Recuperación

Este parámetro muestra la proximidad entre el valor experimental y el valor real. Esto asegura que no se han producido pérdidas durante el proceso de análisis. Este método fue llevado por el método recuperación después de la adición de dos concentraciones de estándar 0,1 y 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de Carvacrol y 0,7 y 7,0 $\mu\text{g/mL}$ de Timol. Para cada nivel se realizó la determinación por triplicado en el equipo de HPLC. Se determinó con las muestras de menor concentración de Carvacrol y Timol.

3.5.4. Cuantificación de timol y carvacrol del aceite esenciales de seis ecotipos de orégano por cromatografía líquida HPLC/FLD

a) Preparación de la muestra del aceite esencial de oregano.

Se utilizó 200 mg/L de muestra del aceite esencial disueltos en ACN:H₂O (80:20). (Galehassadi *et al.*, 2014) Se inyectó por triplicado, al HPLC/FLD bajo las condiciones establecidas líneas arriba (Hajimehdipoor *et al.*, 2010 y Velásquez *et al.*, 2017)

b) Expresión de resultados

$$\text{mg timol/100 mg de aceite esencial} = L_{\text{HPLC}} * F * 100 / C_o$$

Donde:

L_{HPLC} :mg/l de carvacrol o timol medidos en el HPLC

F : Factor de dilución ejm 1 en 10 =10

C_o : Concentración del aceite esencial en la muestra a analizar mg/L

3.6. Diseño experimental

El diseño experimental para llevar a cabo la investigación se muestra en la Figura 6.

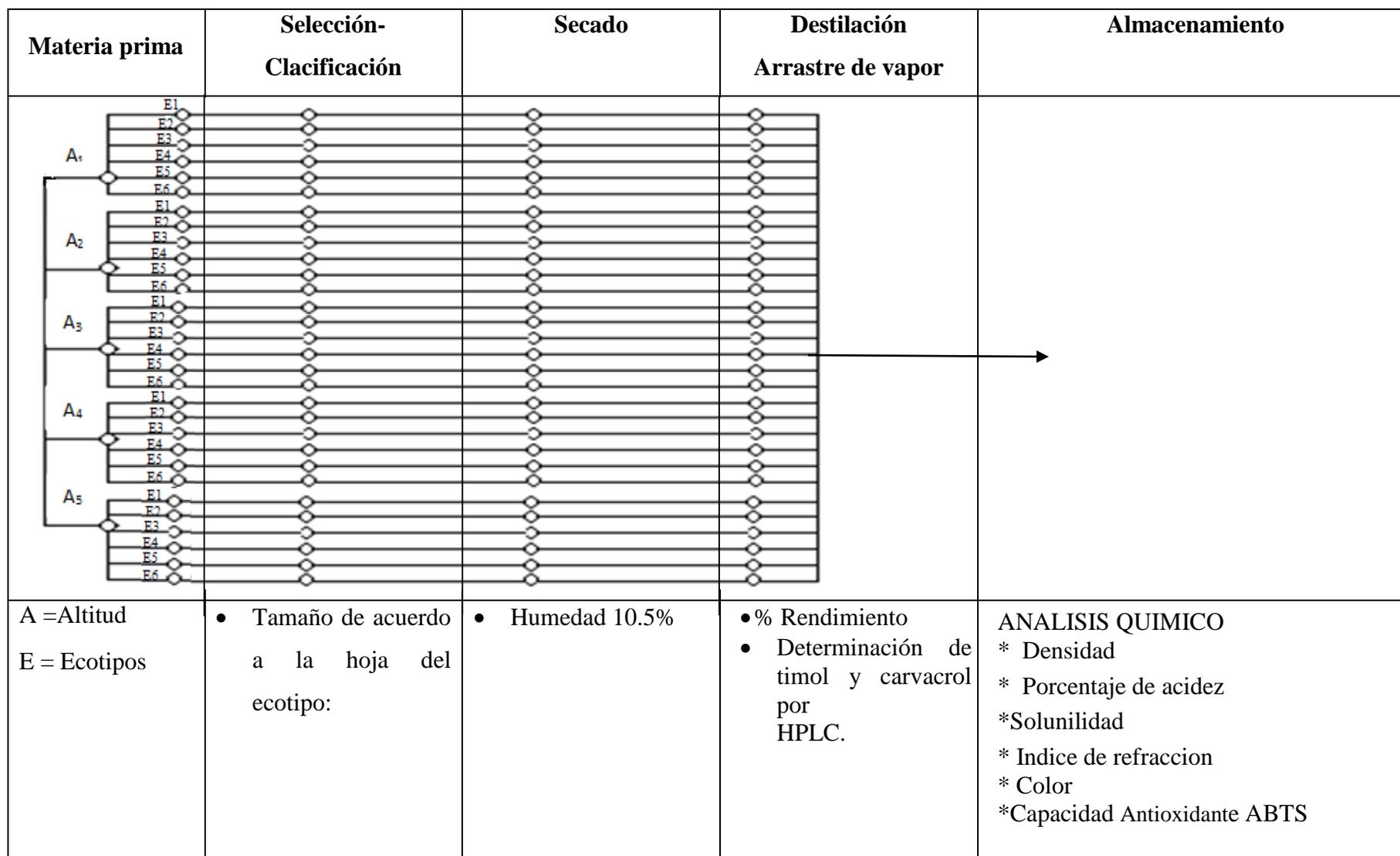


FIGURA 6: Diseño experimental para la evaluación de los ecotipos de orégano sembrado a diferentes altitudes, en cuanto a su rendimiento en aceite esencial y contenido de timol y carvacrol.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Rendimiento de los aceites esenciales de los seis ecotipos de orégano procedentes de diferentes altitudes.

En la Figura 7 y Anexo 6.1 se reportan los rendimientos en aceite esencial de cada uno de los 6 ecotipos de orégano (*origanum vulgare spp*), cosechadas a diferentes altitudes. El análisis estadístico, con un nivel de confianza de 99% determinó que la altitud y el ecotipo influyen en el rendimiento del aceite esencial de orégano., presentando los mayores rendimientos las plantas sembradas a altitudes más elevadas (3638 – 3386 m.s.n.m) siendo el ecotipo oreja de elefante el de mayor rendimiento (2.7 a 2.8 por ciento) y el ecotipo nigra el de menor rendimiento (0.95 por ciento) el cual fue sembrado a una altitud de 3092 m.s.n.m. Al respecto, Milos *et al.*, (2000) reportan que el rendimiento se encuentra en el rango 2 y 6 por ciento, el cual se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo y por la época de recolección. Asimismo, Villavicencio *et al.*, (2016) mencionan que el rendimiento está en un promedio de 0.22 a 2.7 por ciento, también se ve afectado por la altitud. Igualmente, en otras investigaciones reportadas por Stashenko *et al.*, (2010) a una altitud de 850 m.s.n.m, se encontraron rendimientos entre 2.4 – 3.1 por ciento. De Mastro *et al.*,(2017) indican que el rendimiento es de 0.96 - 5.1 por ciento, a diferentes altitudes (347 a 973 m.s.n.m.), los rendimientos varían según la altitud de cultivo.

Klauer (2009) sostiene que el orégano se desarrolla desde el nivel del mar hasta 3800 m.s.n.m. sin afectar el rendimiento del AEO, estando los resultados dentro de rango señalado.

Ugás (2000) y Barreyro (2003), sostienen que el orégano puede ser cultivado desde 50 a 3400 m.s.n.m., ya que tolera las altitudes, mientras que Caceres *et al.*,(2012) dicen desarrolla mejor a 3330 m.s.n.m.

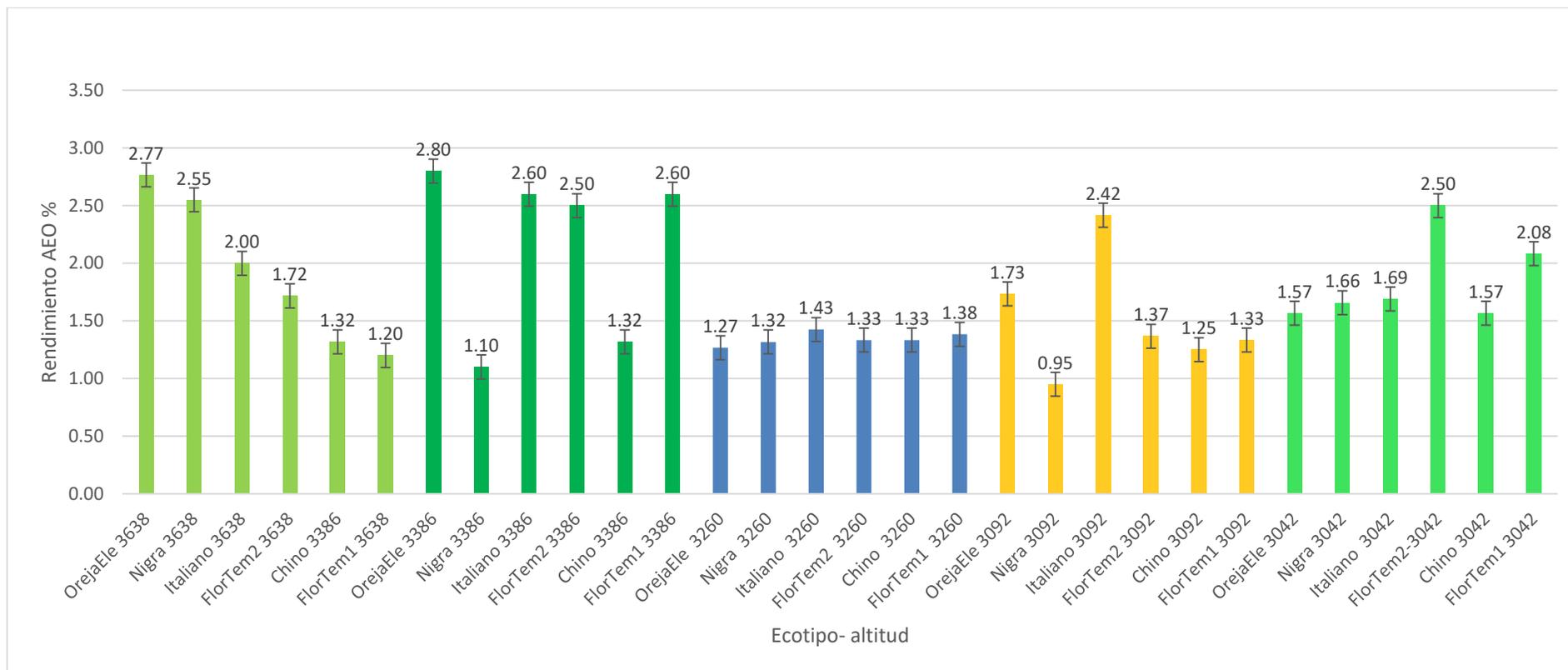


Figura 7: Rendimiento de los seis ecotipos de aceite esencial de orégano en las diferentes Altitudes.

A mayor altitud y sobre todo en época de otoño e invierno, las temperaturas a las que fue cosechada las plantas fueron bastante bajas entre 5.3 -11.69°C, estas condiciones lejos de afectar el rendimiento lo favoreció, como lo indican varios autores (Ugás *et al.*, 2000, Milos *et al.*, 2000 y Roldan *et al.*, 2010), ya que el estrés abiótico o estrés hídrico, provocó cambios en la emisión y acumulación de compuestos orgánicos volátiles en las plantas (ecotipo de oreja de elefante), tal como lo señala (Wink, 2003; Edreva *et al.*, 2008 y Bistgani *et al.*, 2017) similar comportamiento cita Maffei *et al.*, (2010) que algunos compuestos derivados del isopreno pueden estabilizar las membranas de los tilacoides e incrementar la tolerancia a situaciones de estrés. Ahora bien, el estrés hídrico medio que sufrió el orégano a 3386 m.s.n.m. y además fue cosechado en plena floración, al respecto otros investigadores como (Fatima *et al.*, 2000; Said-Al Ahl *et al.*, 2009 y Azizi *et al.*, 2009) refieren que el hecho de restricción en el aporte de agua al cultivo después del comienzo de la floración incrementa la cantidad y calidad del aceite esencial extraído, lo que favoreció al rendimiento de AEO a esta altitud. Además, Ghasemi *et al.*, 2013 indica que la altitud, el manejo agronómico y las condiciones ambientales también influyen en la composición del aceite esencial (rendimiento). Algunos autores (Lawso *et al.*, 1999, Crocoll *et al.*, 2010 y Acevedo *et al.*, 2013) refieren que el habitat modifica el contenido de los aceites esenciales, corroborando lo obtenido en la presente investigación. También; Rodríguez, (2014), señalan que la radiación solar es menor en otoño, por lo que, los efectos de la sombra pudieran tener un déficit de radiación en los meses de otoño e invierno, justificando los resultados del rendimiento de AEO cosechado a estas altitudes.

Además, Fernandez *et al.*, (2008), mencionan que, en zonas con altitudes mayores a 3500 m.s.n.m., se presentan heladas que dañan el desarrollo de las plantas de orégano, es por ello que se cree que las horas de luz fueron mayores y las temperaturas fueron extremas, como se evidencia en la altitud de 3638 m.s.n.m., al respecto, (Zobayed, *et al.*, 2005 y Owen y Peñuelas, 2005), señalan que más afectan a los procesos fisiológicos de las plantas, especialmente a la fotosíntesis y al crecimiento, es la temperatura. También, el estrés conduce a cambios fisiológicos, desarrollando mecanismos de defensa y cambiando la magnitud de emisión de aceites esenciales citado por (Owen y Peñuelas, 2005). Lo que justificaría el incremento del rendimiento de aceite a esta altitud. Otros autores señalan que la cantidad de aceite esencial producido ante situaciones de estrés hídrico se puede mantener o incrementar, dependiendo de la especie o la magnitud del

estrés. (Sangwan *et al.*, 2001), al respecto Bistgani *et al.*,(2017) sostienen que a estrés hídrico severo daña las membranas de las hojas por ende afecta el rendimiento de AE; por lo tanto, el rendimiento de AEO a esta altitud 3638 m.s.n.m, se ve afectado por ser sometido a un estrés severo.

También, a estas altitudes (3638 y 3386 m.s.n.m.) el rendimiento porcentual del aceite esencial del orégano presenta una apreciable variabilidad con la altitud 3092 m.s.n.m, de acuerdo con el estado de la hoja y el lugar de recolección, lo cual está de acuerdo con estudios reportados para especies aromáticas muy conocidas, como en los casos del orégano (D'Antuono *et al.*,2000), tomillo (Ortiz y Martos, 2006), jengibre (Leiva *et al.*,2007). Además, Gendy *et al.*,(2015) reportan un rendimiento de AEO (*Origanum syriacum*) de 5.0 y 4.0 por ciento, a una altitud de (1574 – 1362 m.s.n.m) con una temperatura entre 23.8 a 10 °C. Mientras que en el presente estudio la temperatura fue de 6.3 a 13.7°C, lo que hace indicar que la temperatura y la altitud si afecta significativamente en el rendimiento del AEO.

Asímismo, de acuerdo a otras investigaciones realizadas por Arias *et al.*,(2013), se consiguen rendimientos satisfactorios en altitudes entre 2400 y 3300 m.s.n.m. donde se concentra mayor rendimiento del AEO, sin embargo en la práctica no se cumple. Otros autores como Melito *et al.*,(2015) refieren que las condiciones ambientales múltiples (tipo de suelo, hábitat y altitud), afectan el rendimiento del AEO.

A la altura de 3092 m.s.n.m , el rendimiento de AEO es el menor de todas las altitudes, se evidencia que el óregano sufrió de estrés hídrico, térmico, intensidad luminosa y salino, alterando la fisiología de la planta y con ello el rendimiento de AEO tal como señala Zobayend *et al.*,(2005), Al respecto, Melito *et al.*,(2016) indicaron que la composición y el rendimiento de los aceites esenciales están influenciados por las prácticas de manejo, las condiciones ecológicas y climáticas.

En cuanto al ecotipo, cada uno de ellos tiene hojas diferentes en cuanto a tamaño y estructura y esto influye en el rendimiento tal como lo dice Weserker *et al.*, (1985). Mientras que Arizio *et al.*, (2006) señalan que los sitios de acumulación de los aceites esenciales son los tricomas glandulares, distribuidos sobre la epidermis de hojas del *Origanum vulgare*, lo cual hace indicar que las diferentes áreas de las hojas de orégano

(Cuadro 4), fueron sometidos a diferentes intensidad de luminosidad, estrés hídrico y altitud, influenciando estos factores ambientales significativamente en el rendimiento de los diferentes ecotipos de orégano., lo que nos indica que el ecotipo oreja de elefante tiene mayor área de contacto y por ende mayor significancia entre los ecotipos.

También, la producción y composición del aceite esencial está influenciada por condiciones genéticas y ambientales que pueden dar lugar a alteraciones bioquímicas y fisiológicas en las plantas (Hajiabad *et al.*, 2014), tal como a quedado demostrado en los ecotipos de orégano (Italiano, nigra, chino, oreja de elefante, floración temprana 1 y 2), cada uno reacciono de forma diferente en cuanto a su producción de AEO. Al respecto, Baranauskienė *et al.*,(2013); Azizi *et al.*, (2012) y Tibaldi *et al.*, (2011) citan que los factores ambientales y genéticos no son los únicos que influyen en el rendimiento, también afecta, el tiempo de cosecha y el manejo postcosecha sobre la concentración de aceite esencial y la composición de las plantas de *Origanum*. Lo que justificaría la diferencia del rendimiento de los aceites esenciales de los ecotipos en estudio.

La variabilidad del rendimiento de AEO se le atribuye al poliformismo de la familia de *Lamiaceae* (Johnson *et al.*, 2004); evidenciando los resultados obtenidos en la figura 7, lo cual concuerda con lo reportado por Roldan *et al.*, (2010) y Acevedo *et al.*, (2013) quienes citan que el rendimiento de los AEO dentro de una especie está influenciado por varios factores, los cuales incluyen: características genéticas, condiciones geográficas, climáticas, condiciones del suelo y fertilización, estado productivo de la planta e incluso el método de extracción, explicando ello la diversificación en el rendimiento del AEO *Origanum vulgare ssp.* Además, Melito *et al.*,(2013), menciona que presenta una alta variabilidad en los rasgos morfológicos y químicos, que son el resultado de procesos de adaptación de las plantas. Por lo tanto, los orígenes geográficos causan poliformismo en la composición y el rendimiento del aceite esencial.

Las diferencias de rendimientos observadas entre los ecotipos nigra y oreja de elefante; se atribuye a las mezclas químicas complejas que son los aceites esenciales (rendimiento), suelen ser difíciles de asignar a muestras provenientes de quimiotipos concretos, como consecuencia de procesos de adaptación de las plantas a cambios ambientales, tal como señalan Franz y Novak,(2010). No obstante, los cambios en la

composición química debido a diferencias genéticas son mayores que los cambios debido a la influencia de las condiciones ambientales, según lo indica Paula *et al.*, (2011) lo que hace definir que los ecotipo de orégano (Oreja de elefante) utilizados si influyen significativamente en el rendimiento de AE. Otros resultados similares respecto a variación química de planta a planta en poblaciones naturales se han observado en especies como *Achillea* sp. (Rauchensteiner *et al.*, 2004 y Franz y Novak, 2010).

En las plantas aromáticas la evaluación de numerosos individuos o poblaciones es una necesidad ineludible. Por lo que se puede afirmar, a la vista de los resultados descritos y de otros estudios, que es casi imposible lograr dos aceites esenciales idénticos en su composición química y rendimiento. Este hecho es debido, principalmente, a la época de recolección, los individuos analizados e incluso el método de extracción, la genética de la planta, factores ambientales y las cosechas. (Franz y Novak, 2010; Hajiabad *et al.*, 2014 y Zeljković *et al.*, 2015)

Las altitudes de 3260 y 3042 m.s.n.m, no presentan diferencias significativas estadísticamente entre ellas, ni los ecotipos (Chino, Floración temprana 1 y 2, Nigra, Italiano y oreja de elefante) en cuanto al rendimiento de aceite esencial de orégano. Por lo que, la altitud ni el ecotipo influyen en su desarrollo de aceite esencial de orégano, como se puede observar en la Figura 12. Esto se debe a la genética de las plantas que se adaptó homogéneamente en todos los ecotipos y en ambas altitudes. Al respecto, Melito *et al.*, (2016). indican que la composición y el rendimiento de los aceites esenciales de las plantas medicinales están influenciados por las prácticas de manejo, las condiciones ecológicas y climáticas.

Finalmente, los factores ambientales afectan y alteran la expresión genética de los organismos, mientras que los genes pueden definir cómo los organismos responden a diferentes ambientes (Rajendra *et al.*, 2016) por lo que, el rendimiento del AEO no solo se ve afectado por la altitud y el ecotipo sino también por sus genes.

4.2. Determinación de timol y carvacrol del aceite esencial de orégano

4.2.1. Determinación de los parámetros para la cuantificación de timol y carvacrol por cromatografía líquida (HPLC).

La proporción para la fase móvil (acetonitrilo: agua) y columna, fue (50:50 y C-18). Al respecto, Hajimehdipoor *et al.*, (2010) y Porel *et al.*, (2014) reportan la misma fase móvil y columna lo que indica que, se logró una mejor migración y separación cromatográfica de todos los componentes en la muestra. También, Gaonkar *et al.*, (2016) reportan la misma columna C-18 y las condiciones de fase móvil isocrática, por lo tanto la columna y la fase móvil fue óptima para determinar los metabolitos.

a) Identificación.

Se determinó que los estándares de carvacrol y timol se encuentran bien definidos con tiempos de retención de 9,5 y 10,6 min como se observa en el cromatograma siguiente (Figura 8)

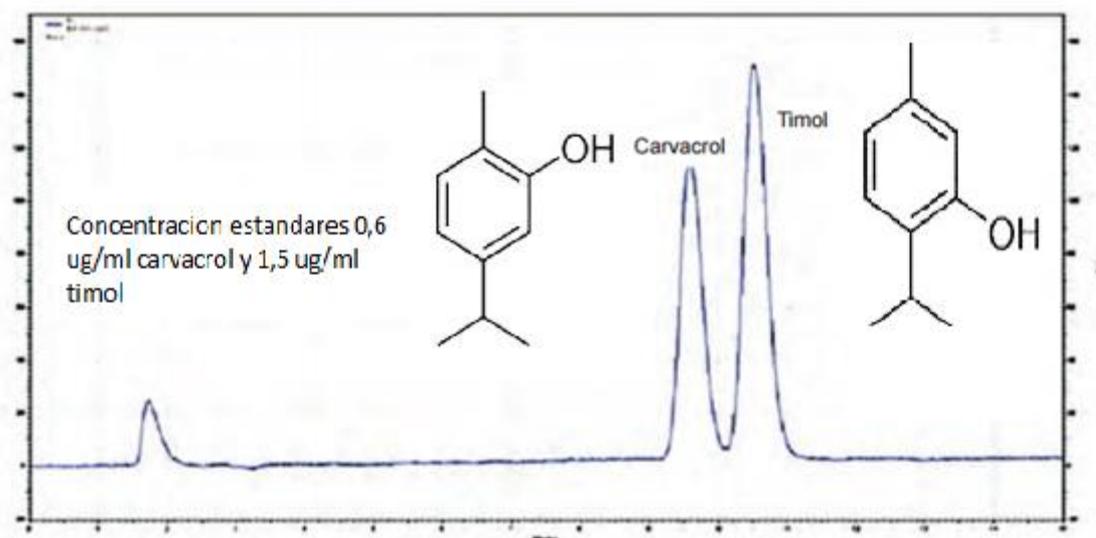


Figura 8: Cromatograma de los estándares de carvacrol y timol

b) Validación del Método.

El método fue validado de acuerdo con ICH (International Conference on Harmonization, 1995) directrices para la validación de métodos analíticos. Los

parámetros validados fueron: linealidad, precisión, especificidad. La linealidad del método se determinó utilizando timol y carvacrol como referencia a cinco niveles de concentración. Se prepararon dos curvas de calibración como se ilustra en las Figuras 9 y 10. Luego, las pendientes y las intersecciones se calcularon mediante las líneas de regresión lineal. Además, se midió el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) a partir de los valores de desviación estándar de la concentración y pendientes.

La exactitud y especificidad se midieron mediante recuperación, en la que se añadió cantidad conocida de timol y carvacrol a la solución. Se calcularon el SD y el RSD y se analizó el contenido de timol y carvacrol observado del análisis trazando la curva de calibración. La recuperación se calculó como el porcentaje de timol y carvacrol obtenido a la concentración teórica de timol y carvacrol añadida a la mezcla.

Linealidad

Como se observa en la Figura 9 la curva de calibración del timol presenta el valor de r^2 de 0,999967 para concentraciones de 0,3 hasta 9,6 mg/L.

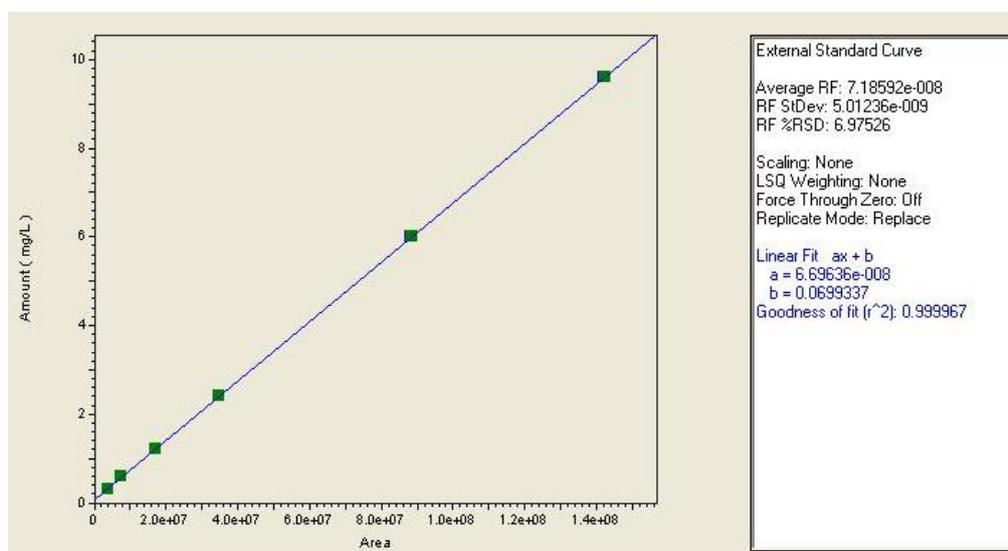


Figura 9: Curva de calibración de timol.

Como se observa en la Figura 10 la curva de calibración del carvacrol presenta un valor de r^2 de 0,999811 para concentraciones de 0,03 hasta 0,96 mg/L

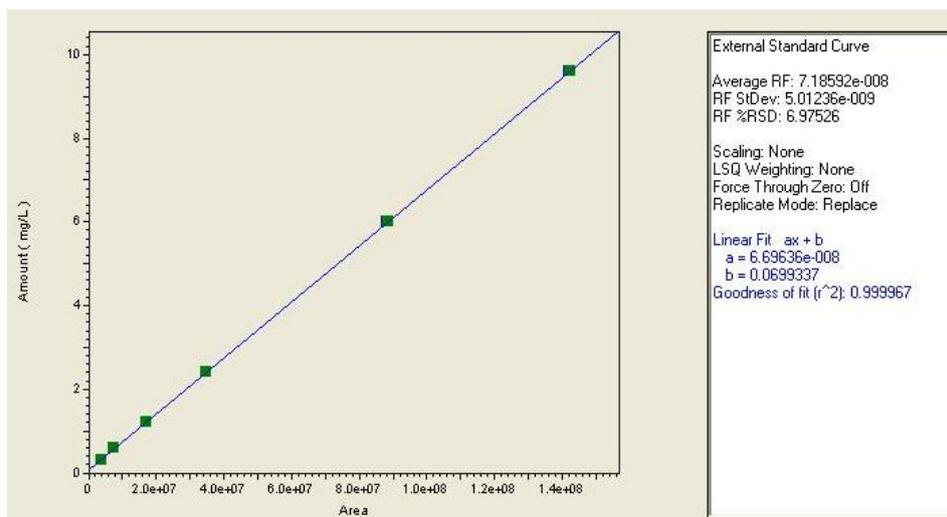


Figura 10: Curva de calibración del carvacrol.

c) Límites de detección y cuantificación

De acuerdo con las directrices de la ICH, LOD es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como valor exacto y LOQ de un procedimiento analítico individual como la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con adecuada precisión y exactitud. (Chang et al, 2011) al respecto, el límite de detección determinado LOD (concentración de detección del analito) del timol es 0,0007 mg/L, y el límite de cuantificación o de determinación LOQ que sirve para obtener la mínima cantidad del analito presente en un compuesto es 0,002 mg/L. Para el Carvacrol, el límite de detección determinado LOD es 0,002 mg/L y el límite de cuantificación LOQ es 0,005 mg/L.

d) Selectividad

Se ha determinado un valor de resolución R_s de 1.65, lo que indica una buena resolución de los picos de Timol y Carvacrol.

e) **Precisión** La precisión de los resultados del análisis de timol y Carvacrol, respectivamente fue $RSD\% \leq 2,27$ y $2,4$ intra día, y $RSD\% \leq 2,47$ y $1,94$ inter diario para el Carvacrol y timol respectivamente.

f) Recuperación

Se obtuvo una recuperación máxima de Carvacrol y Timol de 98,68 % y 90,95 % respectivamente para los dos niveles

El análisis de monoterpenos oxigenados (timol y carvacrol) por HPLC/FLD permite obtener excelentes resultados en poco tiempo y a partir de pequeñas cantidades de muestra, al mismo tiempo que proporciona una selectividad, resolución y sensibilidad como se observa en el Cuadro 5. Al respecto, Ji *et al.*,(2004) y Abas-Gracia *et al.*,(2009) corrobora los resultados de la presente investigación.

Cuadro 5 : Parámetros de la validación de HPLC

Parámetros	Resultados	
	Timol	Carvacrol
LOD & LOQ (mg/ml)	0,0007 – 0,002	0,002 – 0,005
Selectividad	1,65	1,65
Linealidad (r2)	0,999967	0,99981
Precisión intra día 80 100 120%(n=3, RSD%)	≤ 2,27	≤ 2,4
Precisión inter diario 80 100 120%(n=3, RSD%)	≤ 2,47	≤1,94
Recuperación (%)	98,68	90,95

Fuente: elaboración propia.

Con relación a los límites de detección y cuantificación (LOD & LOQ) para el timol y carvacrol fueron inferiores a los determinados por Cantalapiedra *et al.*, (2014) y Rodríguez-Solana *et al.*, (2015), el detector de fluorescencia (FLD) contribuye en si mismo a aumentar la selectividad (preciso) (Zainab *et al.*,2015); con un alto porcentaje de recuperación (Chang *et al.*, 2011), Por lo que, se afirma que los resultados son óptimos.

La precisión se estudió mediante dos inyecciones (en triplicado) el mismo día (repetibilidad intra-día) y la precisión intermedia del método fue validada por dos inyecciones durante tres

días consecutivos (repetibilidad inter-día) con la mezcla única de una concentración específica de timol y carvacrol. Los resultados fueron como se muestra en cuadro 5. La RSD de la repetibilidad del promedio de seis inyecciones fue de 2,27 y 2.4 (timol) y 2.47 y 1.94 (carvacrol). El método mostró una muy buena precisión tanto en el análisis intra-día como inter-día.

Aunque es deseable obtener recuperaciones tan cerca a 100% como sea posible, los resultados están de acuerdo con los criterios para métodos análisis de timol proporcionado por el reglamento europeo (UE) N1426/2015. Por lo tanto, la exactitud del método se consideró adecuada para los terpenos analizados.

La verificación de la distribución normal de los resultados, se evaluó con la linealidad a través de la relación entre la concentración del timol/carvacrol y la absorbancia del detector de HPLC. La línea de calibración fue realizada tanto para timol como para carvacrol, y de esta manera conocer la extensión de la variabilidad total de la respuesta que puede ser explicada por el modelo de regresión lineal (Ji *et al.*,2004, Hajimehdipoor *et al.*,2010), Gaonkar *et al.*,2016 y Velásquez *et al.*,2017).

4.3. Cuantificación de timol y carvacrol del aceite esenciales de seis ecotipos de orégano por HPLC/FLD

El método validado fue utilizado para analizar el contenido de Timol y carvacrol de los aceites esenciales extraídos de los seis ecotipos (Italiano, Oreja de Elefante, Nigra, Chino, Floración temprana 1 y 2) de *Origanum vulgare spp.* El porcentaje de timol y carvacrol se determino usando la curva de calibración para timol y carvacrol estándar.

4.3.1. Elección de la dilución óptima de las muestras

De la muestra de 200 mg/L del aceite esencial disueltos en ACN:H₂O (80:20), se requirió una dilución 1:10. Se obtuvo el cromatograma de la Figura 11. Asimismo se analizaron un total de 90 muestras (repeticiones por ecotipo y altitud), aplicando el método de HPLC/FLD, los tiempo de retención de los estandaras se observan en el cuadro 6, la cuantificación de timol y carvacrol se evidencian en el cuadro 7 y anexo 6.

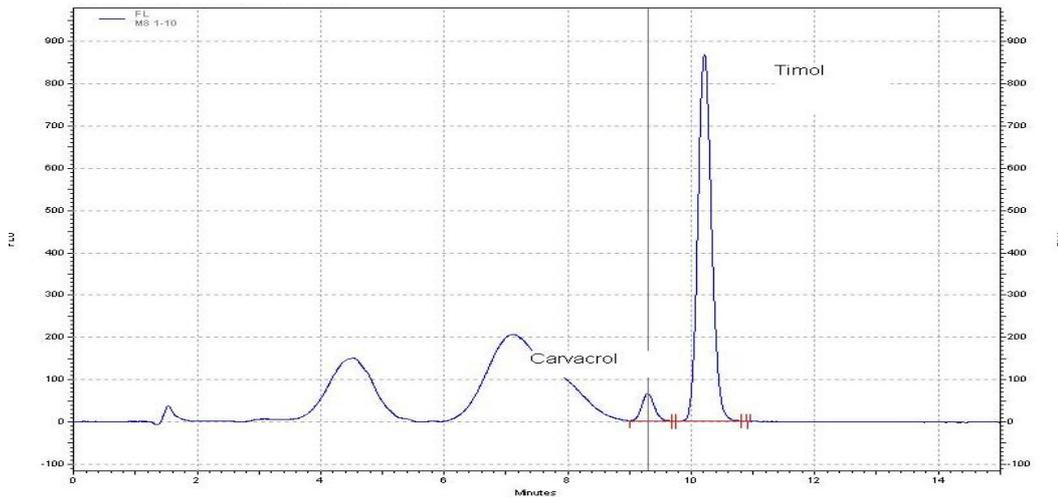


Figura 11: Muestra de oregano Italiano - 3386 m.s.n.m(Jaquijaguana)

Cuadro 6: Determinacion de los compuestos timol y carvacrol por cromatografía líquida HPLC

Tipo de muestra	Compuesto	*tr
Estandar	Timol	10,6
	Carvacrol	9,5
Orégano (<i>Origanum vulgare ssp.</i>)	Timol	10,35
	Carvacrol	9,25

*tr= Tiempos de retención obtenidos de los compuestos sobre la columna RP 18.

El tiempo de retención obtenidos coinciden con lo reportado por (Aghamohammadi *et al.*, 2016 y Velásquez *et al.*, 2017).

Expresión de resultados

El porcentaje de Carvacrol y Timol en el aceite esencial en hoja:

$$\text{mg Carvacrol}/100 \text{ mg aceite esencial} = L_{HPLC} * F * 5 \quad \text{Ec 1}$$

$$\text{mg Timol}/100 \text{ mg aceite esencial} = L_{HPLC} * F * 5 \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

Dónde:

L_{HPLC}: mg/L de Carvacrol o Timol medidos en el HPLC

F: Factor de dilución

Cuadro 7. Cuantificación de la concentración de timol y carvacrol en los seis ecotipos de *Origanum vulgare* y las 5 altitudes por Cromatografía líquida HPLC/FL

Ecotipo Altitud	Medias LS* Timol %	significativo	Ecotipo Altitud	Medias LS* Carvacrol %	Significancia
Italiano 3386	18.364	S	Italiano 3386	2.043	S
Italiano 3092	15.695	NS	OrejaEle 3638	1.709	NS
OrejaEle 3638	15.054	NS	Italiano 3092	1.635	NS
OrejaEle3386	14.699	NS	OrejaEle3386	1.525	NS
Italiano 3638	14.120	NS	FlorTem2 3386	1.470	NS
FlorTem2 3386	13.917	NS	Nigra 3638	1.457	NS
OrejaEle 3092	13.917	NS	FlorTem1 3386	1.376	NS
Nigra 3638	13.795	NS	FlorTem2-3042	1.246	NS
Chino AN 3092	13.692	NS	Italiano 3638	1.160	NS
FlorTem1 3386	13.124	NS	FlorTem2 3638	1.142	NS
OrejaEle 3042	13.065	NS	FlorTem2 3042	0.888	NS
FlorTem2 3638	12.112	NS	Nigra 3260	0.869	NS
Chino 3638	11.619	NS	OrejaEle 3042	0.807	NS
FlorTem1 3638	11.592	NS	Italiano 3042	0.707	NS
FlorTem2 3638	11.358	NS	OrejaEle 3092	0.691	NS
Nigra 3092	11.114	NS	Nigra 3042	0.680	NS
FlorTem2-3042	10.946	NS	OrejaEle 3386	0.651	NS
Italiano 3042	10.192	NS	Chino 3092	0.647	NS
Chino 3042	9.452	NS	Chino 3042	0.644	NS
Nigra 3042	9.156	NS	Nigra 3092	0.639	NS
Chino 3092	9.125	NS	FlorTem1 3042	0.598	NS
FlorTem2 3260	9.021	NS	Chino 3638	0.558	NS
Italiano 3260	8.936	NS	Nigra 3386	0.524	NS
Italiano 3260	8.887	NS	FlorTem2 3638	0.463	NS
OrejaEle 3260	8.696	NS	FlorTem1 3638	0.399	NS
FlorTem1 3260	8.280	NS	Chino 3092	0.391	NS
Nigra 3386	8.217	NS	OrejaEle 3260	0.390	NS
Nigra 3260	8.194	NS	FlorTem2 3260	0.369	NS
Chino 3260	7.926	NS	Chino 3386	0.364	NS
FlorTem1 3042	7.247	NS	Italiano 3260	0.359	NS
OrejaEle 3386	7.082	NS	Italiano 3260	0.351	NS
FlorTem1 3092	5.359	NS	FlorTem1 3260	0.339	NS
FlorTem2 3042	5.291	NS	Chino 3260	0.323	NS
FlorTem2 3092	5.271	NS	FlorTem1 3092	0.227	NS
Chino 3386	2.360	S	FlorTem2 3092	0.207	S

Los resultados son expresados como el promedio de las medias; n=3;

NS: no significativo, S: Significativo. *LS: Limite superior

4.3.2. Influencia de las Altitudes y ecotipos en la cuantificación de timol y carvacrol en el aceite esencial de orégano por cromatografía líquida HPLC/FLD

En las Figura 12 y 13, (Anexos 6.1 y 6.2) se aprecian los resultados de la concentración del timol y carvacrol de los 6 ecotipos cultivados en las 5 altitudes. Luego de realizar la evaluación estadística de la concentración del timol, se determinó que si existe diferencia significativa entre las plantas procedentes de las altitudes y ecotipos (p valor < 0.01), existiendo suficiente evidencia estadística con un 99 por ciento de confiabilidad para aceptar que los factores de altitud y ecotipo influyen en la concentración de timol en el AEO. Siendo las de mayor concentración de timol los aceites esenciales de las plantas sembradas a mayor altitud y en cuanto al ecotipo, el de mayor contenido fue el ecotipo Italiano y el de menor el Chino. Al respecto, Ghasemi. *et al.*, (2013) señalan que además de la altitud, que influye en la composición de AE se considera el manejo agronómico y las condiciones ambientales.

Ahora bien, teniendo presente que los ecotipos se han desarrollado en el mismo ambiente, se aprecia que no hay similitud en la composición química del AEO. Este hecho indica que, el *Origanum vulgare*. almacena el AE en los tricomas glandulares de las hojas, los cuales están influenciados por las condiciones ambientales, estado de desarrollo y fenológico de las plantas (Maffei *et al.*, 2010). Asimismo, los tricomas glandulares actúan como una especie de fábrica de producción de metabolitos secundarios. (Schimiller *et al.*, 2008 y Tissier, 2012). Consecuentemente el área de la superficie de la hoja del ecotipo Italiano se ve influenciada por los tipos de tricomas y con ello mayor concentración de timol.

Zeljkočić *et al.*, (2015) y Hajiabad *et al.*, (2014) sostienen que se encontró una estrecha correlación entre los grupos químicos, el hábitat y tipos de tricomas, los cuales influyen en la composición química del AEO. Ahora bien, Elechosa *et al.*, (2017) señalan que la genética de la planta, y las poscosecha, producen alteraciones bioquímicas y fisiológicas en las plantas lo que conlleva a una mayor desarrollo de timol en el ecotipo italiano.

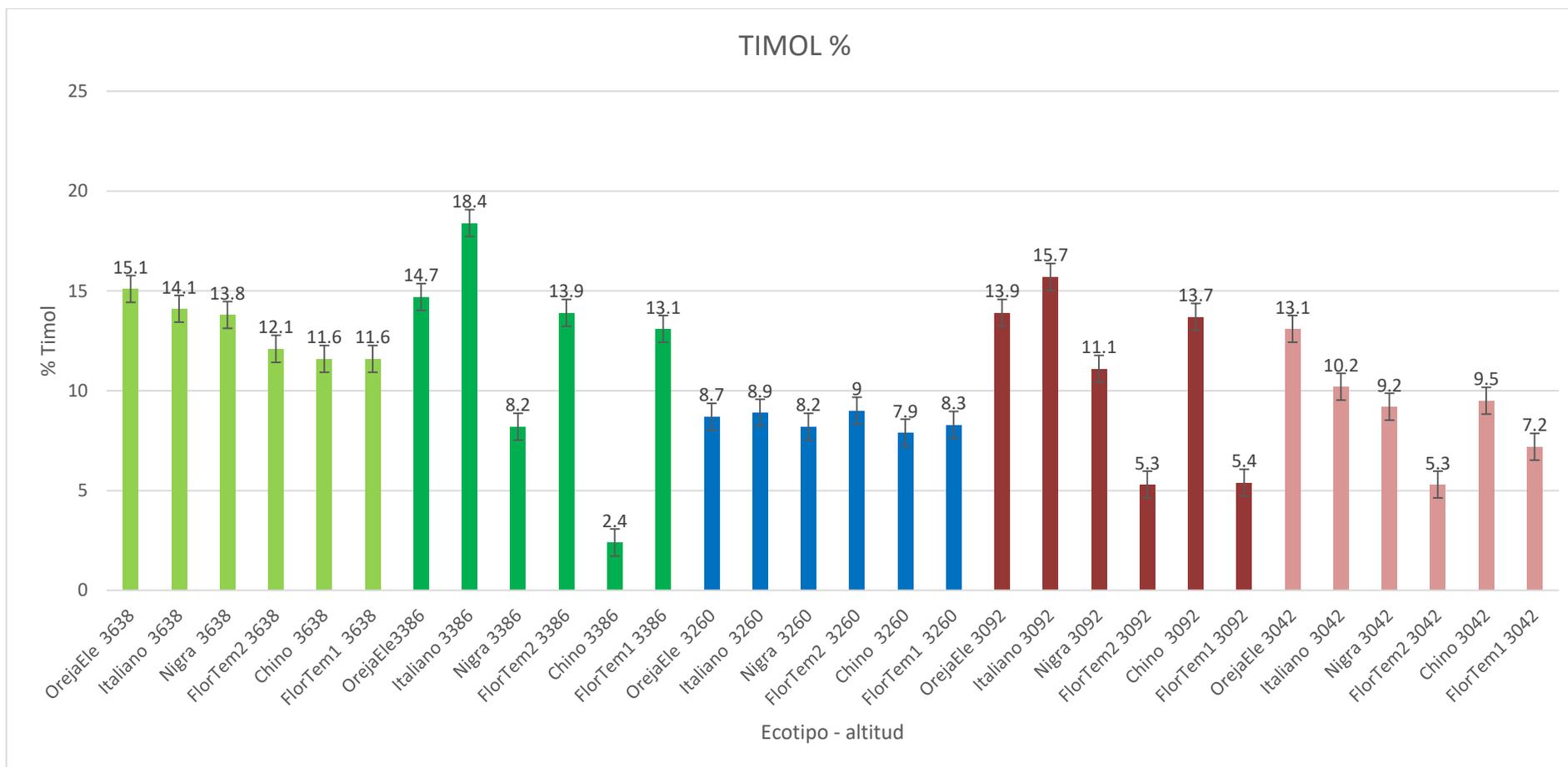


Figura 12: Concentración de Timol en el aceite esencial de orégano de los 6 ecotipos procedentes de las 5 altitud

Asímismo, el estrés hídrico medio y clima semiárido que sufrió el orégano (ecotipo italiano), provocó que se desarrollara el timol. Al respecto, Melito *et al.*, (2016) indican que la concentración de algunos compuestos químicos importantes en el aceite esencial, como el timol se ven influenciados por el estrés hídrico. También, el orégano usa sus propios metabolitos secundarios para controlar la oxidación, y para proteger las células de daño oxidativo causado por el estrés hídrico, lo que genera mayor producción de monoterpenos como el timol (Fadil *et al.*, 2016), lo que indica, que la mayor concentración de timol es producto del estrés hídrico al que fue sometido el ecotipo.

El poliformismo del *Origanum vulgare* favorece en su adaptación a las altitudes y en especial a su genética; varios investigadores como Melito *et al.*, (2013); Nezhadali *et al.*, (2014), Sadeghi *et al.*, (2015) y Vaičiulytė *et al.*, (2017) mencionan que la alta variabilidad química en el AEO es el resultado de procesos de adaptación ecológica, al tiempo de cosecha y especialmente a las condiciones ambientales, altitud, radiación solar y otros. Lo que evidencia que la composición química de un AEO de un ecotipo es diferente a otro. Sin embargo De Mastro *et al.*, (2017) indican que la variabilidad en la composición de AEO dependen del origen vegetal, de la época de cosecha y, por supuesto, de factores intrínsecos como la sexualidad polimorfismo o mecanismo genético, particularmente los componentes fenólicos. Luego, Kremer *et al.*, (2015) citan que el factor genético, evolución, variación geográfica, (es decir, la fecha de cosecha, el tiempo de siembra), variaciones fisiológicas (es decir, órgano y la posición de la hoja), y la etapa de desarrollo se sabe que afectan a la biosíntesis del AE. En consecuencia, la base genética influye en la composición química de los AEO del ecotipo italiano y chino.

Además, cada ecotipo reacciona según su genética como es el caso del ecotipo Chino que a mayor altitud menos concentración de timol (Dizajeyekan *et al.*, 2016) lo que evidencia que los genes pueden definir cómo los organismos responden a los factores ambientales (Rajendra *et al.*, 2016).

En la figura 13 y Anexo 6.3, se puede apreciar, la distribución de las concentraciones del carvacrol en los diferentes ecotipos (Floración temprana 2, Chino, Nigra, Italiano, Floración

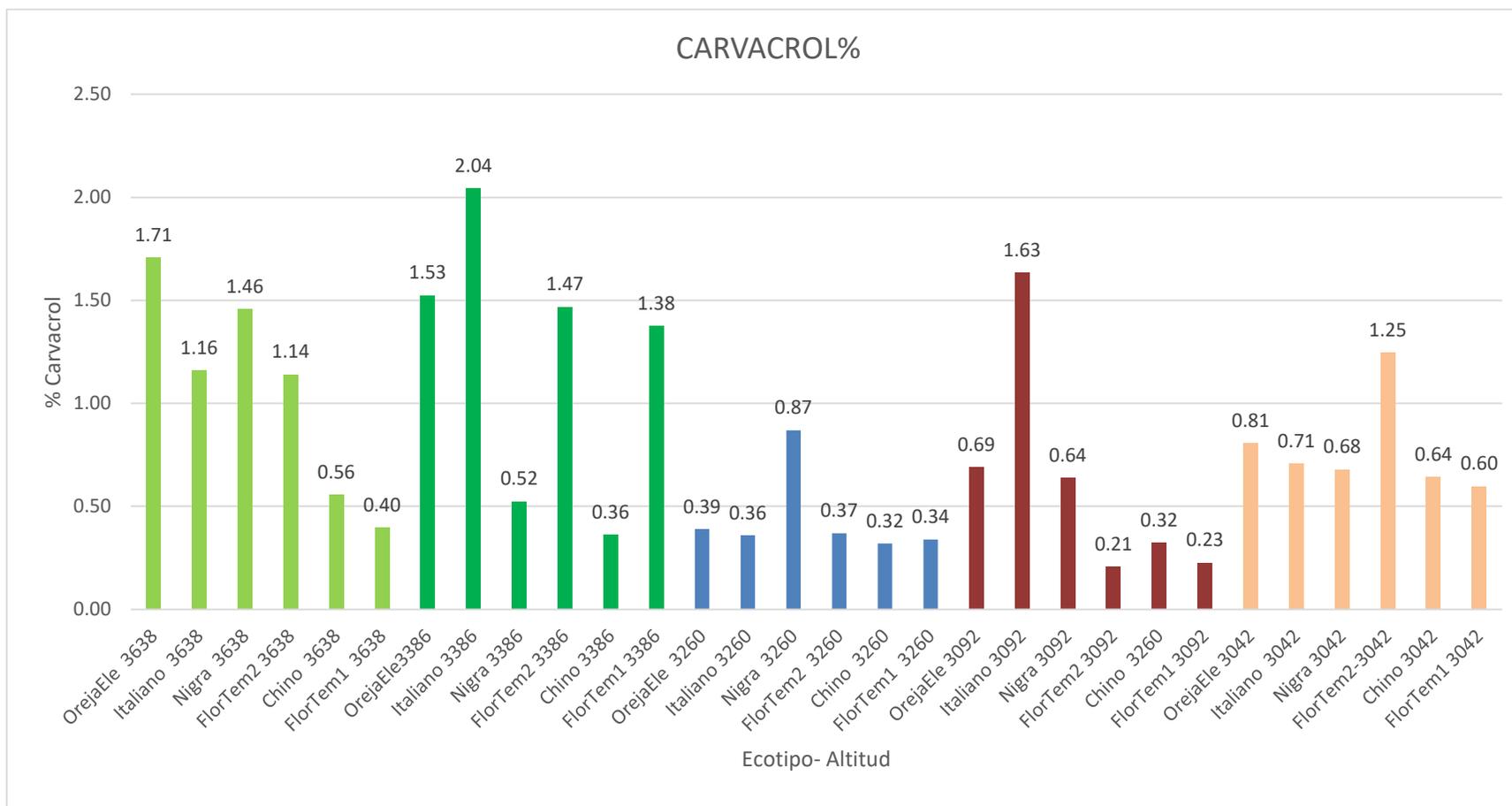


Figura 13 : Concentración de carvacrol en el aceite esencial de orégano de los 6 ecotipos procedentes de las diferentes altitudes.

temprana 1 y oreja de elefante) y las diferentes altitudes de 3042 m.s.n.m, (Urubamba); 3260., m.s.n.m. (Cusipata); altitudes de 3092 m.s.n.m (Andahualillas), 3386 m.s.n.m (Jaquijahuana) y 3638 m.s.n.m. (Sicuani).

El análisis estadístico, con un nivel de confianza de 99 por ciento determinó que la altitud y el ecotipo influyen en la concentración del carvacrol., presentando los mayores concentración a la altitud (3386 m.s.n.m) siendo el ecotipo Italiano el de mayor concentración de carvacrol y el ecotipo Floracion temprana 2 el de menor concentración a una altitud de (3092m.s.n.m.). Al respecto,(Franz y Novak, 2010), revelan que, en especies de orégano (*Origanum vulgare ssp.*), el compuesto carvacrol y timol se ve influenciado por la temperatura., se refeja en su composicion quimica de los aceites esenciales, al igual que ocurre con otros factores ambientales, no se deducen resultados homogeneos, además en el orégano, el estres por cambios de temperatura, generalmente induce a aumentar las formas de reaccionar del oxigeno, también, causa importantes cambios fisiologicos, bioquimicos y moleculares en el metabolismo vegetal (Usano *et al.*, 2014). Ciertos estudios demuestran que los patrones fitoquimicos estan condicionados en su mayor parte por factores geneticos, como lo cita Rajendra *et al.*, (2016), quienes señala que los genes pueden definir cómo los organismos responden a diferentes ambientes y estrés abióticos.

En el presente estudio en la altitud de 3386 ms.n.m fue sometido a un estrés hídrico lo que causo que, las plantas acumulan carbono debido a la restriccion del crecimiento por la limitacion de agua. Se supone que este carbono esta dirigido a la sintesis de compuestos de defensa como los monoterpenos (Usano *et al.*, 2016). En *Hypericum brasiliense* Choisy (Nacif *et al.*, 2005), el deficit de agua incrementa la concentracion de compuestos fenolicos. En *Thymus vulgaris* L. (Usano *et al.*, 2014) estas mismas condiciones de déficit hidrico maximizan la concentracion de timol y carvacrol, y en *Thymus zygis* L. incrementan las concentraciones de aceite esencial. Lo que hace indicar que, la concentración de carvacrol en el ecotipo Italiano se ve influenciado por el estrés hidrico y por ello su alta concentracion.

En las altitud de 3092 m.s.n.m tiene resultados estadísticos bajos.El AE varía mucho dependiendo de la altitud, el clima (Huaman *et al.*, 2016). Los resultados revelalón que si hay diferencias en volátiles de plantas de diferentes altitudes, confirmando la influencia de las condiciones ambientales en la producción de metabolitos, una tendencia similar fue observada por Zeljković *et al.*, (2015). quienes afirmaron que *H. Italicum* AE de Croacia

presenta un nivel decreciente de compuestos monoterpénicos de acuerdo a la altitud y la exposición solar. Además, las diferencias genéticas y los eventos locales de selección natural podrían explicar parcialmente el polimorfismo químico encontrado entre las diferentes altitudes.

Obsérvese en la Figura 13, que la altitud de 3092 m.s.n.m.(Andahuaylillas) caracteriza los sitios de valle donde el estrés hídrico fue muy bajo, por lo tanto se minimiza la concentración de carvacrol; reaccionando de forma inversa a lo reportado por (Usano *et al.*,2016).

El ecotipo de Floración temprana 2, presenta la concentración de carvacrol mas baja a una altitud de 3092 ms.n.m, asimismo, tiene diferencia significativa (P- valor <0.01); en cuanto a la concentración de monoterpenos (carvacrol), tiene una característica peculiar (hoja) de 2.7 cm de largo y 1.6 cm ancho, lo cual hace que los órganos aéreos del orégano estén expuestas mas a los factores ambientales, Ante ello Wagner, (2004), menciona que las hojas tienen una gran densidad de tricomas no glandulares los cuales consideran principalmente implicados en la defensa mecánica de la planta contra las plagas de las plantas. También, la luz incide de mayor manera sobre las hojas del ecotipo, es por ello que el isopreno tiene la propiedad de estabilizar las membranas de los tilacoides y ejercer en ellas un efecto antioxidante, lo cual incrementa la tolerancia de la planta ante el estrés ambiental (Maffei *et al.*, 2010 y Usano *et al.*, 2016). Sin embargo, las temperaturas son muy bajas dañando las hojas del ecotipo, y por ende disminuyendo el área de las hojas, la densidad de tricomas no glandulares y la incidencia de luz, trayendo como consecuencia la disminución de la concentración de carvacrol. Otros autores manifiestan que en la composición del aceite esencial influye el genotipo, el medio ambiente y las prácticas culturales. (Berghold *et al.*, 2008 y Giuliani *et al.*, 2013). Lo que indica que el ecotipo floración temprana 2 se adaptaron mostrando cambios significativos en su composición (concentración baja) debido a su genética propia de del ecotipo.

En relación a la época de cosecha fue en otoño - invierno (cuadro 2), se conjetura que influyo en los ecotipos (composición química); como lo asevera, Verma *et al.*, (2012), quienes indican que las variaciones en la composición química de AEO son bastante comunes y pueden reflejar el origen, las condiciones, el quimiotipo / genotipo y el desarrollo etapa en la que se recogieron los materiales vegetales, es decir, la estación de cosecha. Asimismo,

Gupta *et al.*, (2017), Segarra *et al.*, (2016) señalan que la variación en la composición de AE está influenciada principalmente por variabilidad genética individual, variación entre diferentes partes de las plantas y sus diferentes etapas de desarrollo, y modificaciones debido al medio ambiente. Estos factores, influyen en las rutas biosintéticas de la planta y, en consecuencia, afectan la proporción de los principales constituyentes., lo cual hace indicar que la genética de cada ecotipo se haya adaptado y generado la diferencia de concentraciones de timol y carvacrol en los seis ecotipos en estudio.

Finalmente, se puede afirmar que la variación en la composición química de la AEO está vinculada a las características genéticas de diferentes biotipos (Tuttolomondo *et al.*, 2015 y Elechosa *et al.*, 2017) lo cual fue revelado con el ecotipo italiano, al desarrollar el quimiotipo Timol y carvacrol. Diversas investigaciones mencionan que la presencia y alta concentración de timol en aceite esencial del género *Origanum*; se debe a la actividad de la enzima terpeno-sintetasa que regula la conversión de terpineno a timol (Crocchi *et al.*, 2010 y Huaman, *et al.*, 2016). Es importante resaltar que la composición de los compuestos volátiles es extremadamente variable entre especies de este género; por lo general estas diferencias se encuentran en la distribución y composición de sus monoterpenos. (Huaman *et al.*, 2016 y Elechosa *et al.*, 2017) lo cual hace indicar que la actividad enzimática varía por genética del ecotipo y con ello varía los monoterpenos.

Los resultados obtenidos (Cuadro 8) en comparación con otros estudios presentan valores relativamente altos en la concentración de timol y baja concentración de carvacrol (Kubezka *et al.*, 1996, Crocchi *et al.*, 2010, Gong *et al.*, 2014, Huaman *et al.*, 2016). Al respecto, Kubezka *et al.*, (1997) y Huaman *et al.*, (2016), señalan que las especies del género *Origanum vulgare ssp.* contienen una mayor proporción de carvacrol y timol en el verano que en el otoño; es decir, si se cosecha en verano los días son largos y habrá mayor exposición a la radiación solar, a diferencia del otoño los días cortos y tienen una menor exposición a la radiación solar. Además como se ha puesto de manifiesto que el carvacrol se desarrolla más en verano y la cosecha fue realizada en otoño se evidencia la variabilidad en los resultados.

Cuadro 8: Determinación de los compuestos timol y carvacrol por HPLC del aceite esencial de orégano del ecotipo Italiano

Tipo de muestra	Compuesto	*t _R	Porcentaje	Ecotipo	Estado de la planta	Mes
Orégano (<i>Oreganum vulgare ssp.</i>)	Timol	10,35	18,6%	Italiano	En plena Floración	Otoño
	Carvacrol	9,25	2,1%	Italeano		

*t_R= Tiempos de retención obtenidos de los compuestos sobre la columna RP 18.

Se determinó que la altitud y ecotipo influyen en la concentración de timol en el AEO, presentando los mayores concentración de timol en las plantas sembradas en altitudes más elevadas (3386 m.s.n.m) cuando el ecotipo Italiano el de mayor concentración (18.36 por ciento) con p valor < 0.01 y con grado de confiabilidad del 99%. Mientras que la concentración de carvacrol en las plantas sembradas a la misma altitud y ecotipo., evidenciando mayor concentración (2.04 por ciento), con p valor < 0.01 (Anexo 6.2 y 6.3) y teniendo la suficiente evidencia estadística para aceptar los resultados. La variación tan grande es por el tipo de especie, genética y la distribución geográfica que influyen sobre el contenido de estos compuestos, Al respecto (Huaman et al., 2016) reporta el contenido de timol varía de 7 a 14 por ciento y el contenido de carvacrol varía de 37 a 49 por ciento; siendo lo opuesto a lo reportado, también Alekseeva *et al.*, 2009, reporta valores inferiores a los mencionados y la variación se debe a las altitudes y factores ambientales. Los valores similares al presente estudio lo reportó (Amadio et al.,2011). Por lo que, es importante resaltar lo mencionado por Stashenko *et al* (2003), quien indica que al ser los aceites esenciales de origen natural la composición química es variable. Entre los factores que influyeron en esta variación fueron: el estado físico de la planta (Secado) y las condiciones agrícolas de cultivo. También, las concentraciones se ven afectado por la altitud del lugar de cultivo (Carhuapoma *et al.*, 2006), y por la época de recolección, siendo este más bajo en el otoño (Arcila *et al.*, 2004). Al respecto el ecotipo Italiano fue cosechados en otoño y bajo esta condición se desarrolló más timol por que, fue sometido a estrés térmico, sin embargo al carvacrol no le favorece el estrés térmico.

Roldán (2010), reportó que el carvacrol 50,86 por ciento y timol 3,54 por ciento, esta concentración de los analitos se contraponen a los resultados obtenidos en la presente

investigación. Este resultado, puede ser atribuido a condiciones geográficas y de manejo controladas en invernadero. En el presente estudio no se realizó la adaptación del orégano en invernaderos.

Asimismo, Arango *et al.*, (2012) evaluó el efecto del origen, orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K), y genotipo, donde el contenido de timol (57,7 por ciento) es alto. También, (Aghamohammadi *et al.*, 2016) quien estudió la cuantificación de timol en *Zataria multiflora* y reportó que timol (7,5 por ciento), un valor menor y está relacionado a la concentración del etanol (disolvente de extracción). Por lo tanto, se deduce que el origen y el disolvente influyen en la cuantificación del analito de interés. Lo que sugiere que la base de variación en la composición del AE podría ser las diferencias en la zona geográfica del lugar de recolección, la altitud y los tipos de extracción.

También, otros autores manifestaron que AEO (*Origanum vulgare ssp.*) tiene la concentración de timol alta semejante a lo obtenido (Hajimehdipour *et al.*, 2010,). Por lo tanto, las diferencias cuantitativas pueden atribuirse a los métodos de obtención, fecha y tiempo transcurrido entre la recolección y el proceso de obtención del aceite esencial (Farías *al et.*, 2010). De igual forma, (Crocchi *et al.*, 2010), menciona que variables como las condiciones geobotánicas, tipo de suelo, época de recolección y edad de la planta, entre otros, son factores que influyen en la diferencia cuantitativa de concentración de timol y carvacrol.

Además, la peculiaridad del ecotipo Italiano al desarrollar mayor timol y carvacrol a la misma altitud, indica que los factores climáticos y genéticos influyen en el timol y carvacrol, los cuales son isómeros, esto puede revelar una correlación genética como se informó en el estudio realizado por Gendy *et al.*, (2015). Lo contrario ocurre en el estudio realizado en Turquía en el que la altitud tiene un efecto positivo sobre el timol y un efecto negativo sobre el carvacrol, lo que también revela factores climáticos y genéticos (Avci *et al.*, 2011). Algunos estudios demostraron que el cambio de la composición química en diferentes regiones se debe a los factores ambientales que afectan a la ruta de biosíntesis, en la que esta vía comienza por la conversión autooxidativa de γ -terpineno a p -cimeno y luego hidroxilación de p -cimeno a timol o carvacrol y esta vía activada durante la fase de floración (Gendy *et al.*, 2015).

Es importante mencionar que las diferencias en la composición química de los aceites esenciales (AE) depende de factores genéticos, bioquímicos, climáticos, estacionales, la altitud, la época de cosecha, y su estado de crecimiento (Baydar *et al.*, 2004; Arcila *et al.*, 2004; Gendy *et al.*, 2015, Tuttolomondo *et al.*, 2015 y Elechosa *et al.*, 2017) Adicionalmente, la proporción de los constituyentes pueden variar de acuerdo con la fase productiva de la planta (Miguel *et al.*, 2004). método de cultivo (Chaquilla *et al.*, 2011). Lo que explica la diversificación de la cuantificación del quimiotipo en estudio. La diferencia, en la concentración de timol y carvacrol, probablemente se asocie a la variabilidad genética del germoplasma; no obstante que las regiones (altitudes) son geográficamente muy cercanas, los pequeños cambios climáticos (temperatura) afectan la producción de los aceites esenciales (Oliva *et al.*, 2006).

La mayoría de las accesiones a altas altitudes mostraron el mayor contenido de timol, cuya formación es favorecida por la altitud y se vuelve más eficiente que la vía biosintética del carvacrol. Así, la variación microclimática podría actuar como una fuerza importante en la selección de genotipos especializados mejor adaptados a los ambientes locales. (De Mastro *et al.*, 2017), lo que hace indicar que a altitudes altas el ecotipo Italeano tiene mejor adaptación y el ecotipo Chino tiene una adaptación en una altitud de 3386 m.s.n.m. por su genética.

Otros aceites esenciales que fueron extraídos por arrastre de vapor y analizados por HPLC, también varían la concentración de timol y carvacrol, atribuyendo este comportamiento a su hábitat, la humedad, la variación de temperatura y la elevación del nivel del mar afecta el contenido de componentes de aceites especies (timol y carvacrol) (Alekseeva *et al.*, 2009). Lo que respalda los resultados del presente estudio.

Algunos autores Albado y Sean, (2001); Arcila *et al.*, (2004) y Shiva *et al.*, (2012) manifiestan que la composición de AEO en el Perú es variable, y a veces incluye timol y otras al carvacrol. Demostrando con ellos que dependerá de las condiciones a las que fueron sometidas el *Origaum vulgare* en el proceso de siembra y cosecha. lo cual hace afirmar que los factores climáticos, el estrés hídrico y/o térmico, época de cosecha, la altitud y genética de la planta influyen en su composición química (timol y carvacrol).

4.4 Caracterización fisicoquímica del aceite esencial con alta concentración de timol y carvacrol

El rendimiento y algunas características fisicoquímicas del AE de orégano del ecotipo Italiano procedente de la altitud 3386 m.s.n.m., de la localidad de Jaquijaguana se muestran en la Cuadro 9.

Cuadro 9: Características fisicoquímicas del aceite esencial orégano del ecotipo Italiano.

Muestra	<i>Origanum vulgare</i>
Tiempo de destilación	90 min
Rendimiento (%)	2,6
Densidad específica (g/ml) 20°C	0,9132
Índice de refracción 20°C	1,475
Solubilidad en alcohol (v/v)%	70
Color	L* 60,51; a* -2,83, b* 120
Índice de acidez mg KOH/g AEO	3.34
%AGL	1.68
ABTS (µM trolox/kg)	55.1

El orégano (Italiano), presentó un rendimiento del 2.6 por ciento de aceite esencial. Al comparar los rendimientos de aceite esencial obtenido con los reportados para *Origanum vulgare*, son similares de aceite esencial (Corella *et al.*, 2013). Ante ello (Carhuapoma *et al.*, 2006) citan que el porcentaje del rendimiento es influenciado por la altitud del lugar de cultivo.

Mientras que algunos autores como Kulisic *et al.*, (2004) obtuvieron aceite de orégano mediante hidrodestilación con un rendimiento del 2,9 por ciento. Adicionalmente, los valores obtenidos fueron inferiores a los reportados por otros autores. Albado, *et al.* (2001), determinaron el rendimiento del AE de *Origanum vulgare*, menor a lo obtenido. Es importante resaltar que existen otros factores que probablemente pudieron influir sobre el rendimiento de los AE como son: los métodos de cultivo y las condiciones geobotánicas:

clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad, pluviosidad, temperatura; método de extracción del aceite, época de recolección y edad de las plantas (Stashenko *et al.*, 2010).

El valor de densidad fue de 0,9132 relativamente similar a lo reportado por Albado *et al.*,(2001), Mendoza *et al.* ,(2008) y Corral *et al.*, (2008). La similitud en los resultados favorece lo manifestado por mendoza sobre la densidad como un parámetro de aceptación para los AEO.

Según lo reportado en la literatura, los AE con un menor valor del índice de refracción y densidad está relacionado con una menor cantidad de fenoles (Hüsnü *et al.*, 2007). Pero, Granados *et al.*, (2012) citan que los AE con índices de refracción mayores a 1.47 y densidades superiores a 0.9 g/mL tienen en su composición cantidades importantes de compuestos oxigenados aromáticos. Estos datos corresponden a los valores determinados experimentalmente para todos los aceites extraídos.

Con respecto al índice de refracción (1,475); éste ligeramente menor en comparación por Poulouse *et al.*, (1978) y diferente con lo citado por Navarro, (2012). Mientras que Ortega-Nieblas, (2011), fue ligeramente superior. Tomando en cuenta que este parámetro es exclusivo de cada AE, es muy importante su determinación debido a que su valor cambia si el AE se diluye o mezcla con otras sustancias; y por lo tanto; es una medida de la calidad y un parámetro que ayuda a controlar la adulteración (Ortuño, 2006).

La prueba de solubilidad en etanol al 70 por ciento fue positiva para AE de orégano. El comportamiento de solubilidad es semejante a lo reportado por Mendoza *et al.*, (2008); lo anterior, se debe principalmente al contenido de compuestos oxigenados en los AE. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente y adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrogeno; por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los AE, aumentan su solubilidad en etanol haciéndolos mas aptos para su aplicación en la industria.

El color de las muestras, Poseen un color en la gama del amarillo, (Muñoz, 2002; Peter, 2004).

El Índice de Acidez sirve como prueba de pureza del aceite esencial y, en ocasiones, permite tener conclusiones acerca del tratamiento o reacciones de degradación que se hayan producido. El valor obtenido 3.34 mg KOH/g AEO se encuentra dentro de estos parámetros establecidos por Zarate *et al.*, (1989) indicaron un valor de 7,9 de índice de acidez superior al valor obtenido en el presente estudio. Mattisek *et al.*, (1998) Menciona que el índice de acidez es una medida del contenido de ácidos libres presentes y en ocasiones, permite tener conclusiones acerca del tratamiento o reacciones de degradación que se hayan producido.

Por otro lado, no se han reportado valores máximo de Índice de acidez para el aceite esencial de oregano. Sin embargo, el código alimentario argentino (Capítulo XVI Sustancia Aromatizantes: Aceites Esenciales. Art1300) reporta valores máximos, para algunos aceites esenciales, de 1mg a 4 mg KOH/g AEO.

La capacidad antioxidante de un producto alimenticio está determinada por las interacciones que ocurren entre los diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción, por este motivo la determinación de la capacidad antioxidante en extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que consideran diversos mecanismos de acción (Floegel, *et al.*, 2011).

Los resultados del análisis para la determinación de la capacidad antioxidante dio un valor de 1379,970 $\mu\text{g/mL}$ que es equivalente a 55,1 Trolox ($\mu\text{M/kg}$) que equivale a un 79% de inhibición

Otros autores como Granados *et al.*, (2012) manifiestan que los resultados de la actividad captadora de radicales ABTS $\bullet+$ fueron 23.97 a 1971.89 $\mu\text{g/mL}$, asimismo los resultados obtenidos en la presente investigación se encuentran dentro del rango señalado. Mientras que Skendi *et al.*, (2017) reportan un valor superior a lo revelado, esto se debe por su genética y variedad. También, Asensio *et al.*, (2015), indican un valor menor y esto debido a su variedad y altitud. Con ello se demuestra que la genética, variedad y altitud influyen en la variación de la actividad antioxidante del *Origanum vulgare*.

La capacidad antioxidante de los AE obtenidos de las especies de orégano se atribuye a los compuestos activos presentes en ellos; es decir, la actividad se debe a los componentes principales, de tipo monoterpeno y propanoides como el carvacrol, el timol y otros tipos de fenoles; pero además, se puede atribuir a la presencia de constituyentes en pequeñas

cantidades o a la sinergia que se puede presentar entre ellos, como se reporta generalmente en la literatura (Torrenegra, 2014),

Adicionalmente, autores como Williams *et al.*, (1995), Choi *et al.*, (2000) y Puertas *et al.*, (2002), han mostrado que algunos aceites esenciales y sus fitoconstituyentes poseen la capacidad de atrapamiento del catión- radical 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina- ácido sulfónico) ABTS⁺. Puertas *et al.*, (2002) quien mostro que los aceites esenciales de orégano y romero poseen una capacidad alta para el atrapamiento del radical ABTS⁺, la cual es similar a la presente investigación.

Granados *et al.*, (2012.). quien han determinado la capacidad antioxidante de muchas especies, entre ellas: el orégano y la infusión de té, debido a la presencia de polifenoles. .Dada la complejidad química de los AE, el ensayo de actividad antioxidante puede arrojar resultados dispersos dependiendo del test empleado Por lo tanto, es aconsejable un enfoque con múltiples ensayos.

La variabilidad en la actividad antioxidante exhibida por los AE de orégano obtenidos por Hidrodestilacion (arrastre de vapor) posiblemente se debe a que en la hidrodestilación cuando se lleva el agua hasta su punto de ebullición, mediante transferencia de calor, ella está en contacto directo con el material vegetal de tal forma que los vapores generados atraviesan los tejidos de la planta arrastrando las sustancias de interés; al aumentar la temperatura del medio, se rompen las estructuras celulares que contienen al aceite esencial por efecto de su presión de vapor. El aceite esencial es liberado y se disuelve parcialmente en el agua que actúa como disolvente, como un resultando el aceite pierde componentes oxigenados y se obtiene un AE de menor calidad. Igualmente, algunos componentes como los ésteres pueden experimentar hidrólisis y algunos hidrocarburos monoterpénicos, especialmente los aldehídos, son susceptibles a la polimerización y los compuestos más oxigenados tienden a ser muy solubles en agua (Bandoni *et al.*, 2002). El timol, este compuesto es conocido por tener propiedades antioxidantes. La presencia de grupos funcionales en los anillos terminales de los compuestos aromáticos modula la actividad reductora del ABTS + (Müller *et al.*, 2011). El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol. Varios investigadores confirman dicho potencial antioxidante en extractos y aceites esenciales de

diferentes especies de orégano (*Origanum . vulgare*, *Origanum. compactum*, *Origanum. majorana*) (Blanco *et al*, 2006 y Ghasemnezhad *et al*, 2016).

Se debe tener en cuenta que el tiempo de hidrodestilación influye tanto sobre la cantidad de aceite obtenido o cantidad que se puede procesar en el tiempo, como en su composición y calidad (Stashenko, *et al.*, 2010)

La mayoría de los estudios sobre la composición del aceite de oregano, ha demostrado que el rendimiento y composición de los mismos depende de las condiciones del crecimiento de la planta, su hábitat y de su proceso de extracción (Dos santos *et al.*, 2004, Juliani *et al.*, 2008 y Avila-Sosa *et al*; 2010) .

V. CONCLUSIONES

- Los rendimientos del aceite esencial de orégano, de los 6 ecotipos sembrados a diferentes altitudes, varió entre 0.95 – 2.8 por ciento.
- La altitud donde se obtuvo el mayor rendimiento de aceite esencial fue 3386 m.s.n.m (Jaquijaguana) y 3638 m.s.n.m (Sicuani) con 2.8 por ciento y el ecotipo que se adaptó y tuvo mas aceite esencial de orégano fue Oreja de elefante en ambas altitudes.
- Las altitudes de 3042 y 3260 m.s.n.m, no influyen en el rendimiento ni los ecotipos.
- Los factores de altitud, tipo de extracción, especie, habitad, estrés hídrico y/o termico, luz, época de cosecha y la genética influyen en la concentración del timol y carvacrol en los aceites esenciales de orégano procedentes de los 6 ecotipos.
- La metodología de cromatografía líquida por fluorescencia es confiable por tener alta sensibilidad y precisión, con una columna C18, a una longitud de onda 230 nm – 280 nm, siendo sus tiempos de retención para el carvacrol y timol se 9,5 y 10,6 min, respectivamente.
- Este método HPLC es selectivo, preciso y exacto para el análisis cuantitativo de timol y carvacrol, siendo un método de control de calidad eficaz y económico.
- El ecotipo que tuvo mayor contenido de timol y carvacrol fue el Italiano, producido a una altitud 3386 m.s. n.m (Jaquijaguana). Estos compuestos

permiten dar gran valor agregado a esta planta, la que tiene propiedades antioxidantes, microbiológicas y puede ser usado como conservantes de alimentos.

- El índice de refracción fue 1.475, densidad fue 0.9132 g/ml, la solubilidad fue en 70% etanol; el color fue L*60.51; a*-2.83, b*120; índice de acidez fue 3.34 mg KOH/g AEO, son parámetros de calidad del aceite esencial de orégano del ecotipo Italiano, a una altitud de 3386 m.s.n.m..
- La actividad antioxidante del AEO (ecotipo Italiano) es alta 55.1 μ M trolox/kg y se debe a la presencia de timol y carvacrol.

V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda estudiar la composición química del aceite esencial de orégano antes y después de floración.
- Evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano del aceite esencial de orégano.
- Evaluar la composición química del aceite esencial obtenido mediante diferentes métodos de extracción.
- Evaluar la composición química del aceite esencial en diferentes zonas del país durante un año.
- Evaluar la composición química del aceite esencial de de oregano de tallos y hojas, solo tallos, o de flores teniendo en cuenta la cosecha y tipo de extracción.
- Utilizar el aceite esencial como preservante en películas comestibles.
- Evaluar la relación carbono nitrógeno del suelo con la biosíntesis de los terpenos en aceites esenciales y su poder antioxidante.

VI. AGRADECIMIENTO.

Se agradece a la Empresa Molinos Cusco. S.A, Se encargo de financiar parcialmente el presente trabajo de investigación.

VII. 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.
- ADEX. 2013. Boletín agropecuario y agroindustrial, Lima, Perú. Disponible en: <http://www.adexdatatrade.com> (Julio 2013).
- ABAS-GRACÍA. B., BERRUETA. L., GARMÓN-LOBATO. S., GALLO B, VICENTE. F. 2009. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. Journal of Chromatography. 1216:5398-415.
- AGHAMOHAMMADI, A., AZADBAKHT, M., HOSSEINIMEHR, S. 2016. Quantification of thymol content in different extracts of *Zataria multiflora* by HPLC method. Pharmaceutical and Biomedical Research. mazums-pbr 2016, 2(1): 8-13
- ALBADO, P.; SAEZ, F. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano), Revista de Medicina. Hered 12(1):23-32.
- ALEKSEEVA, L. 2009. Determining thymol and carvacrol by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Pharmaceutical Chemistry Journal 43: 12

- ALVES DE AZEREDO, G., MONTENEGRO, L., CAMPOS, P., GOMES, J., GOMES DE OLIVEIRA, E. y LEITE DE SOUZA, E. 2010. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44: 1541-1548.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. 2002. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. 127: 183-198.
- AMADIO, C., ZIMMERMANN, C.M. E., MEDINA, R., MIRALLES, S., DEDIOL, C. 2011. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Revista . Facultad UNCUYO*. ISSN 0370-4661, 2011, 43(1): 237-245
- A.O.A.C. 2007. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists international. Vol, 1 y 2. 18 th edition. USA.
- AOAC . 1995. Method number: 950.48. Official Methods of Analysis. 16th Edition, Arlington.
- ARANGO, O., BOLAÑOS, F., VILLOTA, O., HURTADO, A., TORO, I. 2012. Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 10:2 (217 - 226).
- ARANGO, B.O., PANTOJA, D.D., SANTACRUZ, CH.L., HURTADO, M.H., 2012 actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*lippia organoides* h.b.k) del alto patía. *Revista . Bio.Agro*. 10:2
- ARIAS, B. 2009. Diversidad de usos, prácticas de recolección & diferencias según género & edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8: 389 –401.

- ARCILA,C.; LOARCA, G.; LECONA, S.; GONZÁLEZ, E. 2004. El orégano: propiedades composición y actividad biológica de sus componentes. Archivo. Latin. Nutricion.. 54: 1-25.
- ARIZIO, O., CURIONI, A., SANCHEZ, G. y GARCÍA M. 2006. El cultivo de orégano (*Origanum sp*). En: Plantas Aromáticas y Medicinales: Labiadas. Arizio, O. y Curioni, A. (Eds.). Editorial Hemisferio Sur. pp. 57-92
- ARIAS C.J., 2013. Zonificación agroecológica del cultivo de orégano (*Origanum Vulgare L.*) en el Distrito de Tarata Provincia de Tarata- Tacna. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo .UNJBG. Tacna – Perú.
- ARTS, M.J.T.J; DALLING, J.S; VOSS, H.P.; HAENEN, G.R.M.M ANDA BAST, A. 2004. Acritical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. Food Chem.80; 409-414.
- ASENSIO C., GROSSO N.R., JULIANI H.R. 2015. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. LWT-Food Science and Technology. 60: 664-671.
- AVCI, A.B., 2011. Chemical Variation on the Essential Oil of *Thymus praecox* ssp. *scorpilii* var. *laniger*. International Journal of Agriculture and Biology, 13: 607-10.
- AVILA-SOSA, R., GASTÉLUM-FRANCO, M. G., CAMACHO-DÁVILA, A., TORRES-MUÑOZ, J. V. Y NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V. 2010. Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with Antioxidant and Antimicrobial Activity. Food Bioprocess Technol. 3:434–440

- AZIZI, A., YAN, F. & HONERMEIER. 2009. Herbage yield, Essentials oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*, 29, 554-561.
- AZIZI, A., HADIAN, J, GHOLAMI, M., FRIEDT, W., HONERMEIER B. 2012. correlaciones entre las diversidades genéticas, morfológicas y químicas en una colección de germoplasma de la planta medicinal *Origanum vulgare* L. *Chemistry & Biodiversity*, 9 : 2784 - 2801
- AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAOKA, J. 1999. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 2010-2016.
- BANDONI, A. L. 2002. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. *Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED*. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata – Argentina. 27-34,180-242.
- BARANAUSKIENE B., VENSKUTONIS P.R., DAMBRAUSKIENE E., VIŠKELIS P., 2013 Harvesting time influences the yield and composition of *Origanum vulgare* L., ssp. *vulgare* and ssp. *hirtum*. *Industrial Crops and Products*,; 49: 43-51.
- BARATTA, M.T.; DORMAN, H.; DEANS, S.J.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. 1998a. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour. And Fragrance Journal*. 13: 235-244.
- BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.; DEANS, S.J.; BIONDI, D.M.; RUBERTO, G.1998b. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal. Essential Oil Research*. 10: 618-627.
- BASER, C. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design* 14: 3106-3120.

- BASSOLE, I. H.; OUATTARA, A. S.; NEBIE, R.; OUATTARA, C. A.; KABORE, Z. I. & TRAORE, S. A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochem*, 62:209-12.
- BAYDAR, H., SAGDIC, O., OZKAN, G. AND KARADOGAN, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15: 169–172.
- BLANCO, M.; RODRÍGUEZ, L.; MELGAREJO, L. 2006. Composición y rendimiento del aceite esencial de *Lippia origanoides* (Verbenaceae) en el cañón del Chicamocha, Santander. Segundo Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional De Colombia, Sede Palmira.
- BRANCHI, B., GALLI, C. AND GENTILI, P. 2005 Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the cation and radical-cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox, *Organic y .Biomolecular. Chemmistry*. 3: 2604-2614.
- BRIGA, J. 1962. Los aromáticos en la industria moderna. 2da Edición Editorial Sintet, Barcelona, España, p 34.
- BRUM . M., XAVIER,. R., SCHUCH, M., ARAÚJO, F., ALVES,. C., Y BRAGA DE MELLO, R. 2010. In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 116-123
- BARREYRO R., RINGUELET. J. 2003 Fertilización nitrogenada y rendimiento en Orégano (*Origanum x applit*). Tesis de Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales U.N.L.P. LaPlata, Argentina 15 pp.
- BERGHOLD, H.; WAGNER, S.; MANDI, M.; THALLER, A.; MULLER, M.; RAKOWITZ, M.; PASTEINER, S.; BOECHZELT, H. YIELD, 2008 content and composition of the essential oil of 5 oregano strains (*Origanum vulgare* L.)

depending on the developmental stage *Zeitschrift fur Arznei und Gewurzpflanzen* 13(1): 36–43

- BÉJAOUÏ A., BOULILA A., BOUSSAÏD M. 2013 Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*; 7(32): 2429-2435
- BENDINI, A.; BENDINI, A.; CERRETANI, L.; PIZZOLANTE, L.; TOSCHI, T.G.; GUZZO, F.; CEOLDO, S.; MARCONI, A.M.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. 2006. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. *Extracts Eur. Food Research and Technology*. 223: 102–109.
- BERNAL, T. 2010. XXV Congreso Peruano de Química. Ing. Quim. M Sc. Dionisio Ugaz Mont., 1er Edición, Editorial Sociedad Química.- Lima
- BHALE, Z., PRINYAWIWATKUL, W., KING, M. AND GODBER, S. 2007. Oregano and rosemary extracts inhibit oxidation of long-chain n-3 fatty acids in menhaden oil *Journal of Food Science* 7: 504-508.
- BISTGANI, Z. E; SIADAT, S. A.; BAKHSHANDEH, A.; PIRBALOUTI, A G.; HASHEMI, M. 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenesis* Celak. *The Crop Journal*, 5(5):407-415
- BOATRIGHT, J., NEGRE, F., CHEN, X., KISH, C., WOOD, B., PEEL, G., ORLOVA, I., GANG, D., RHODES, D., DUDAREVA, N. 2004. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiology*, 135: 1993–2011.
- CACERES, B. F. 2012. El género *Origanum* L. (Lamboaceae) en la región Arequipa morfología y taxonomía. Edición 1er. Editorial UNSA-Arequipa.

- CANTALA PIEDA, A., GISMERA, J, SEVILLA, T., PROCOPIO , R. 2014. Sensitive and selective determination of phenolic compounds of aromatic plants using an electrochemical detection coupled with the HPLC method. *Journals Phytochemical Analysis* 25 (3): 247-54
- CARHUAPOMA, M., 2006. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray “arrayán”. Tesis de maestría, Facultad de farmacia y bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- CHANG, K., 2011 Límite de detección y su establecimiento en química analítica. *Salud Ambiental. J. 2* , p. 38 – 43
- CHAQUILLA, G.; ESTELA, W.; TORRES, V.; BALLINA, M.; GASTÉLUM, M.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. 2011. Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña *Minthostachys setosa* Briq Epl yaís *Pimpinella anísom* L. Chihuahua, primera edición, Libro digital, Mexico
- CHAVEZ, J. 2007. Ficha técnica del cultivo del orégano, Soluciones Practicas-ITDG, Lima, Perú. Disponible en: <http://www.solucionespracticass.org.pe>. (Mayo 2013).
- CHIA-WEN LIN; CHIA-WEN YU; SUNG-CHUAN WU; KUANG-HWAY YIH . 2012. DPPH Free-Radical Scavenging Activity, Total Phenolic Contents and Chemical Composition Analysis of Forty-Two Kinds of Essential Oils. *Journal of food & Drug Análisis*. 17,5p 386-395
- CHOI, H. S.; SONG, H. S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. 2000. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of. Agricultural and Food Chemistry* .48: 4156-4160

- CLARKE, S. 2008. Essential chemistry for aromatherapy. Second edition. Churchill livingstone. Elsevier. USA. 320 p.
- CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTÉ, J.; PIETERS, L. & VLIETINCK, A. J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal Ethnopharmacol., 79:213-20.
- CIP 2013. Centro internacional de la papa, software de Geo base – Hong-kong.
- CROCOLL CH, ASBACHJ, NOVAK J, GERSHENZON J.2010. Terpene synthases of oregano (*origanum Vulgare L*) and their roles in the pathway and regulation of biosynthesis. Plant Molecular Biology.73(6) : 587-603
- COOPERACIÓN PERUANO-ALEMANA. 1983. Secador solar. Centro de Energía Renovable. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima. Perú.
- CORELLA, R., ORTEGA, M. 2013. Importancia del aceite esencial y la producción de oregano *lippie palmari Watson* en el estado de Sonora. Biotecnia XV(1):57-64
- CORRAL T. C. L. 2008. Monitoreo de control de calidad sobre el efecto de diferentes materiales en la composición del aceite esencial de orégano. Tesis Profesional. Instituto Tecnológico De Durango. Durango, Méx.
- DAMBOLENA, S., ZUNINO, P., LUCINI, I., OLMEDO, R., BANCHIO, E., BIMA, J. y ZYGADLO, A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 1115-1120.
- DEIGHTON, N.; GRIDWELL, S.M.; DEANS, S.J.; GROODMAN, B.A. 1993. Identification by EPR spectroscopy of Carvacrol and Thymol as the major sources

of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.63: 221-225.

- DE MASTRO, G., TARRAL, W., VERDINI, L., BRUNETTI, G., RUTA, C. 2017. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Food Chemistry*. 235: 1-6.
- D'antuono, L. F., Galletti, G., Bocchini, P. (2000). Variability of Essential Oil Content and Composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). *Annals of Botany*, 86, 471-478.
- DEWICK, P. 2002. *Medicinal Natural Products*. Wiley and sons, Ltd. Great Britain 507 p.
- DI FABIO, A. (2000) *Cultivo de Orégano*. I Jornadas Iberoamericanas de Plantas Aromáticas, Aceites Esenciales y Capsicum, CD-ROM, Cochabamba, Bolivia
- DIZAJEYKAN, Y.I., HAGHIGHI, A.R., GAJOTI, T.E. 2016. Regional altitude and soil physicochemical factors influence the essential oil of *thymus pubescens* (Lamiales: lamiaceae). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 10 (29):45–51
- DUDAREVA, N., FLORENCE NEGRE, F., DINESH, A., IRINA, O. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25: 417– 440.
- DUKE, J. A. 2002. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press. USA.. 870 p.
- EDREVA, A., VELIKOVA, V., TSONEV, T., DAGNORN, S., GÜREL, A., AKTAS, L. & GESHEVA. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *General and Applied Plant Physiology*, 34:67-78.

- ELECHOSA, M., DIO LEO, P., JUÁREZ, M., VITURRO, C., HEIT, C., MOLINA, A., MARTINEZ, A., LÓPEZ, S., MOLINA, A., VAN, C., BANDONI, A. 2017. essential oil chemotypes of *aloesia citrodora*(verbenaceae) in northwestern argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*.74-p 19-29
- FADIL, M., FARAH, A., IHSSANE, B., HALOUI, T., LEBRAZI, S., ZGHARI, B., RACHIQ, S., 2016. Chemometric investigation of light-shade effects on essential oil yield and morphology of Moroccan *Myrtus communis*. *Springer Plus* 5 (1):1–14.
- FALEIRO, L., MIGUEL, G., LADEIRO, F., VENANCIO, F., TAVARES, R., BRITO, J., FIGUEIREDO, C., BARROSO, J., PEDRO, J. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*, Letón. *Appl. Microbiol.*, 36: 35-40
- FARÍAS G., BRUTTI O., GRAU G., DILEO LIRA R., RETTAD D., VAN BAREN C., VENTOD S., BANDONI A 2010..Morphological, yielding and quality descriptors of four clones of *Origanum spp. (Lamiaceae)* from the Argentine Littoral region Germplasm bank. *Industrial Crops and Products*.32: 472–480.
- FATIMA, S.F., FAROOQI, A.H.A., SRIKANT, S. 2000. Effect of drought stress and plant density on growth and essential oil metabolism in citronella java (*Cymbopogon winterianus*). *Journal of Aromatic and Medicinal Plants*, 22:563-567.
- FERNANDEZ C. O; ALE F. O; ZEGARRA Z. R. 2 008. Cultivo del Orégano Tacna – Peru. 99
- FRANZ, C. & NOVAK J. 2010. In: *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application*. Baser, K.H.C & Buchbauer, G. Taylor & Francis Group. Boca Ratón.

- FRANZ, H.; JENDREIZIK, V: 2013 Fluorescence Method Development Handbook. Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany; 1 -2
- FLOEGEL A, KIM DO, CHUNG SJ, KOO SI, CHUN OK. 2011 Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24 (7): 1043-1048.
- GAONKAR, R., YALLAPPA, S., DHANANJAYA, B., HEGDE, G: 2016.. development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography for citral analysis from essential oils. *Journal Chromatogr b analy Technol Biomed Life Sciences*. 1036-1037:50-56.
- GARCÍA, A.; LEYVA, M.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E. 2007. Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* (Piperaceae) difundida en la costa Colombiana. *ScientiaET Technica*, 13:439-442.
- GALEHASSADI M, REZAI E, NAJAVAND S, MAHKAM M AND MOHAMMADZADEH, G.N. 2014. Isolation of carvacol from *Origanum vulgare*, synthesis of some organosilicon derivatives, and investigating of its antioxidant, antibacterial activities. *Standard Scientific Research and Essays*. 2 (9): 438-450.
- GHASEMNEZHAD, R.; CHANGIZI,V.; HADDAD, F.; HOMAYOUN, M.; SOLEYMANIFARD., S. 2016. *Origanum vulgare* leaf extract protects mice bone marrow cells against ionizing radiation *Avicenna Journal of Phytomedicine* 6(6):678-685.
- GHASEMI. P., HASHEMI. M., GHAFAROKHI. M. 2013. Essential oils and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L.. *Industrial. Crops and Products*. 48:43-48

- GRANADOS C.C ., YÁÑEZ R.X ., SANTAFÉ P.G. 2012. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 10(1):12-23
- GENDY, N., LEONARDO, M., MUGNAINI, L., PISTELLI, L. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Industrial Crops and Products*. 67:201-207
- GULLUCE M., KARADAYI M., GUVENALP Z., OZBEK H., ARASOGLU T., BARIS O. 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food Chemistry*, 130: 248-253.
- GUERRERO L. Y NÚÑEZ MJ. Obtención de Aceites Esenciales de Eucalipto y Orégano. *Industria Farmacéutica* 1991; Julio/Agosto :73-79.
- GUPTA, A.K., MISHRA, R., SINGH, A.K., SRIVASTAVA, A., LAL, R.K., 2017. Genetic variability and correlations of essential oil yield with agro-economic traits in *Mentha* species and identification of promising cultivars. *Industrial Crops and Products*. 95: 726–732.
- GIULIANI, C.; MAGGI, F.; PAPA, F.; MALECI BINI, L. 2013. Congruence of phytochemical and morphological profiles along an altitudinal gradient in *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* from Venetian Region (NE Italy). *Chemistry. Biodiversity*. 10:569–583.
- GONZALES, G.; SOTO, H.; KITE, G.; MARTINEZ. 2008. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de oregano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var *Berlandier schauer*) *Revista Fitotécnica Mexicana*. 30:49-49.

- GOVINDARAJAN, M.;RAJESWARYA, M.;HOTIB, S.L.; &BENELLIC G. (2016).Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culexquinquefasciatus* and *Culextritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Research in Veterinary Science*, 104, 77-82.
- GONG HY, LIU WH, LV G.Y, ZHOU X. 2014. Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 24 (1):25–32
- GRANADOS, C., YÁÑEZ, Y., SANTAFÉ, G. 2012. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 10(1):12-23.
- HAGVALL L, BÄCKTORP C, SVENSSON S, NYMAN G, BÖRJE A, KARLBERG AT. 2007. The geraniol fragrance compound forms contact allergens on exposure to air. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization. *Chemical Research in Toxicology* 20:807 - 14
- HAMZEH A. 2012. Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evid Based Complementary and alternative medicine*.;728065,8
- HAJIMEHDIPOOR, M., SHEKARCHI, M. KHANAVI, N. ABID, M. AMRI, A. 2010. Validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine*; 6 (23): 154-158.
- HAJIABAD, M., HARDT, M., HONERMEIER, B. 2014. Comparative research on the morphology of common oregano trichome (*Origanum vulgare* L. subsp.

Vulgare) and Greek oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *Hirtum*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1, (2): 50-58

- HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; ÁVILA, J. G.; GARCÍA, A. M.; MERAZ, S. & DURAN, A. 2008. Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* Desf. And *Lippia graveolens* H.B.K. of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamer Caribe Plant Medicinal. Aromatic.*, 7:203-7.
- HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; ÁVILA, J. G.; GARCÍA, A. M.; MERAZ, S.; CABALLERO, J. & LIRA, R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Boletín Latinoamer Caribe Plant Medicinal. Aromatic.*, 8:295-300.
- HONERMEIER. 2009. Herbage yield, Essentials oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*, 29, 554-561.
- HUAMÁN, N., ALLCCA, E., ARROYO, G., QUINTANA, J. 2016. Microextracción en fase sólida (SMPE) de compuestos volátiles del género *Origanum*. *Revista Sociedad. Química. Perú*. 82(2)
- HUERTA, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. *Biodiversitas*, 3:8-13.
- HUNTERLAB. CIE L*a*b*. HunterLab. 2008: The world's true measure of color. Disponible en < http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf > (Mayo 2013).
- HÜSNÜ, K.; BAŞER, C.; & DEMIRCI, F. (2007). "Chemistry of Essential Oils. *Flavours and Fragrances*. 1, 43-86.
- ICH. 1995. Conferencia Internacional de Armonización, 1995. Q2 (R1) Validación de procedimientos analíticos: Texto y metodología. CPMP / ICH / 381/95.

- JI L, WANG F, LIU YY, TONG Y, LI XD, FENG XF. 2004 Determination of carvacrol and thymol in *Molsa chinensis* by HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 29:1030-2.
- JOHNSON, C.B., KAZANTZIS, A., SKOULA, M., MITTEREGGER, U. & NOVAK, J. 2004. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. *Phytochemistry Annals*, 15:286-292.
- JULIANI, H. R. & SIMON, J. E. 2008. Chemical Diversity of *Lippia multiflora* Essential Oils from West Africa. *Journal of Essential oil Research* 20: 49-55.
- KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUCRELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, T.S.; HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal. Agricultural Food Chemmistry*. 47: 3954-3962.
- KINTZIOS, E. 2002. *Orégano: The genera Origanum and Lippia*. Frist Published, This edition published en Taylor & Francis. USA a Canada. 267 p.
- KOKSAL, O., GUNES, E., ORKAN, O. y OZDEN, M. 2010. Analysis of effective factors on information sources at Turkish oregano farms. *African Journal of Agricultural Research* 5: 142-149.
- KOUKOULITSA C., KARIOTI A., BERGONZI M.C., PESCIPELLI G., DI BARI L., SKALTSA H. 2006. Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* growing wild in Greece. *Journal. Agricultural Food Chemmistry*. 54(15): 5388-5392.
- KLAUER, G. 2009. Manual tecnico de cultivo ecologico de oregano (*Origanum sp L.*).El taller asociacion de promocion y desarrollo. Arequipa- Peru. 9 p

- KUCUKBAY, F.Z., KUYUMCU, E., CELEN, S., AZAZ, A.D., ARABACI, T., 2014. Chemical composition of the essential oils of three *Thymus* taxa from taxa from Turkey with antimicrobial and antioxidant activities. *Journal. Agricultural Food Chemmistry*. 8, 110–120.
- KUMAR, N., SHUKLA, R., YADAV, A., BAGCHI, G. 2007. Essential oil constituents of *Origanum vulgare* collected from a high altitude of Himachal Pradesh. *Indian Perfumer*, 51, pp. 31–33d
- KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G., TRONCOSO, A. M. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia e Tecnologia Alimentos*. 25 (4), p.p. 726-732.
- KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. 2004 Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemmistry*. 85: 633-644.
- KUBEZKA KH. 1997. New approaches in essential oil analysis using polymer coated silica fibers. In: Franz Ch, MathéA, Buchbauer G. (Eds.). *Essential Oils, Basic and Applied Research. Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils*; 8 – 11 september 1996; Vienna. Carol Stream: Allured Publishing Corp; 7 : 139-146.
- KREMER, D., BOLARIĆ, S., BALLIAN, D., BOGUNIĆ, F., STEŠEVIĆ, D., KARLOVIĆ, K. 2015. Morphological, genetic and phytochemical variation of the endemic *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry* 116, 111–119.
- LAWSON, H. 1999. “Aceites y grasas alimentarias”, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- LAWRENCE B. 2005. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfum. Flavorist.*; 9 (5): 41-44, 49-51.

- LECONA-URIBE, S.; LOARCA-PIÑA, F. G.; ARCILA-LOZANO, C.; DÍAZ-MOSCOSO, C. & OCAMPO, R. 2003. Nutraceutical potential of Mexican oregano (*Lippia graveolens* K). IFT Annual Meeting, 14E-28.
- LEE, S.J., UMANO, K., SHIBAMOTO, T. AND LEE, K.G. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry, 91:131-137.
- Leiva, M. et al. (2007). Rendimiento y Composición Química del Aceite Esencial de *Zingiber officinale* en Función del Diámetro de Partícula. Scientia et Technica, 13(33): 187-188.
- LUKAS, B., SCHMIDERER C., NOVAK J.,2015. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). Phytochemistry; 119: 32-40
- MAFFEI, M.E. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. South African Journal of Botany, 76, 612-631.
- MARTINS N., BAROS L., SANTOS-BUELGA C., HENRIQUES M., SILVA S., FERREIRA I. 2014 Decoction, infusion, and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. Food Chemistry. 158: 73-80
- MARTINEZ-ROCHA A.; PURGA, R.; HERMÁNDEZ-SANDOVAL, L.; LOARCA-PIÑA, G.; Y MENDOZA, S. 2008. Antioxidant and antimutagenic activities of mexican oregano (*lippia graveolens kunth*). Plant Foods Human Nutrition. 63: 1-5.
- Mastro . G.; Tarraf, W.; Verdini, L.; Brunetti, G.; Ruta, C. 2017. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. Food Chemistry,235:1-6

- MATTISEK,R., SCHNEPEL, F., Y STEINER,. 1998. análisis de los alimentyos: fundamentos, métodos aplicaciones. Editorial Acribia S.A., Zaragoza. España p 144.
- MELITO , A. SIAS , GL PETRETTO , M. CHESSA , G. PINTORE , A. PORCED DU. 2013. genetic and metabolite diversity of sardinian populations f helichrysum italicum. Plos One , 8 (11):79043
- MELITO. S;,, RAPPOSELLI. E; BARMINA. G;FODDAI. M; AZARA. E;SCARPA.G. 2015. Relationship Between Soil and Essential Oil Profiles in Salvia desoleana Populations: Preliminary Results. Natural Product Communications. 10(9):1615-1618
- MELITO. S; PETRETTO. G.L.; PODANI. J; FODDAI. M; CHESSA. M; PINTORE. G. 2016. Altitude and climate influence Helichrysum italicum subsp. Microphyllum composition of essential oils. Industrial crops and products. 80(1): 242-250
- MENDOZA M. M..2008. Influencia del tiempo de almacenamiento en la calidad del aceite esencial de orégano lippia graveolens h.b.k. f. berlandieri schauer. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. UJED. Durango.
- MIGUEL, G. SIMOES, M., FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G. PEDRO, L.G. AND CARVALHO, L. 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphorates* and *Thymus mastichina*. Food Chemistry, 86: 183-188.
- MILOS, M. J.; MASTELIC, I.; JERKOVIC M. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compound from orégano (*Origanum vulgare L. Ssp hirtum*). Journal Food Chemistry (71):79-83

- MILLER, N.J., RICE-EVANS, C.A., DAVIES, M.J; GOPINATHAN, V.;MILNER, A. 1993. Anovel Method For Measuring Antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84: 407-412
- MOLLER, S.J.; LINDBERG, M.H.; AALTONEN, T.; SKIBSTED, L.H.1999. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*.. 64: 215-219.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1655-1666.
- MÜLLER, L., FRÖHLICH, K. & BÖHM, V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* 129:139- 148.
- MUÑOZ, F.2002. *Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado*. 4ª Reimpresión. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España.
- NACIF, I. y MAZZAFERA P. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:241-248.
- NAVARRO M. 2012. *Potencial de los aceites esenciales de toronjil (melissa officinalis), orégano (origanum vulgare l) y bleo (pereskia bleo), para ser utilizados como saborizantes en aceites comestibles de mesa*. Tesis Facultad de ingeniería programa de ingeniería de alimentos. Universidad de Cartajena
- NENADIS, N., WANG, L-F., TSIMIDOU, M., AND ZHANG, H-Y., 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS.+ Assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4669-4674

- NEZHADALI, A., NABAVI, M., RAJABIAN, M., AKBARPOUR, M., POURALI, M. 2014. Chemical variation of the essential oil of leaves in different stages of plant growth and the in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 3 : 87 - 92
- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. AND LEITÃO, S. G. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H. B. K. Food Chemistry. 101:236-240
- OLIVA, M. L., . SHANNON, D. A. SLEPER, M. R. ELLERSIECK, A. J. CARDINAL, R. L. PARIS AND J. D. LEE. 2006. Stability of fatty acid profile in Soybean genotypes with modified seed oil composition. Crop Science 46:2069-2075.
- ORTEGA- NIEBLAS, N; ROBLES. B.R; ACEDO, F. E; GONZÁLES, L. A.; MORALES. T. A.; VAZQUEZ, M. L. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*lippia palmeri* s. Wats) essential oil. Revista. Fitotecnia. Mexico. 34 (1): 11 – 17
- ORTIZ, M.,MARTOS, J. (2006). Estudio Comparativo de Rendimientos y Composición de Aceites Esenciales de Tomillos Autóctonos en Cultivo. Revista Técnica de Fitopatología y Entomología, 23,(89); 97-101.
- ORTUÑO, M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyama, España; 1ed. pp.7-109.
- OWEN, S., y PEÑUELAS, J. 2005. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. Trends in Plant Science, 10: 420-426.
- OZCELIK, B.; LEE, J.H.; MIN, D.B. 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. Journal of Food Science. 68: 487-490.

- PAREJO, I., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., Y CODINA, C. 2004. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Analytica Chimica Acta*, 512: 271-280
- PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, M. D. & VILLAR, A. 2001 Lippia: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.*, 76:201-14.
- PAULA, J.A.M., FERRI, P.H., BARA, M.T.F., TRESVENZOL, L.M.F., SA, F.A.S. & PAULA, J.R. 2011. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 643-650.
- PLAUS, E.; FLORES, G.; ATAUCUSI, S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana*. 12.:16-19.
- PETER, K.V. 2004. *Handbook of Herbs and Spices*. Woodhead Publishing Limited: London, England.
- PORTILLO R., M. C., 2004. Actividad inhibitoria de orégano mexicano sobre hongos contaminantes de alimentos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Edición especial No. 5. Congreso de Inocuidad alimentaria http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-5-2004/cartel_control_juany/10.htm. (Consultado el 13 de octubre del 2014)
- POREL, A., SANYAL, Y., KUNDU, A. 2014. Simultaneous HPLC determination of 22 essential oil components; robustness of the experimental design method. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 76:19 - 30

- POULOSE, A.J.; CROTEAU, R. 1978. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of gamma-terpinene to p-cymene and thymol in thymus vulgaris L. Archves Biochemistry. Biophysics.. 187: 307-314.
- PUERTAS, M. (2002). Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante *in vitro* de algunos productos naturales y sintéticos. Tesis de doctorado. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry.53: 4290-4302.
- PROMPERÚ, 2012 Desarrollo del comercio exterior agroexportador, disponible en <http://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/sectoresproductivos/DESENVOLVIMIENTO%20V1.%202012%20-%20copia.pdf>. (Mayo del 2012).
- PROYECTO CONTRATO FINCYT – FIDECOM – Molinos – Cusco –Convenio N°049-2012. Desarrollar un proceso de identificación del ecotipo de exportación de orégano para cinco zonas de producción (2700-3900 msnm) de acuerdo a los niveles de concentración de los aceites esenciales y productividad en el valle sagrado de los incas para aprovechar el nicho de mercado en Brasil.
- RAJENDRA. P.P.; RAKSHAPAL. S; RAJESWARA RAO. B.R; SINGH , R.R.; ABHILASHA, S.; LAL. R. K. 2016. Differential Response Of Genotype × Environment On Phenology, Essential Oil Yield And Quality Of Natural Aroma Chemicals Of Five *Ocimum* Species. Industrial Crops and Products. 87(9): 210-217.

- RAUCHENSTEINER, F., NEJATI, S. & SAUKEL, J. 2004. The *Achillea millefolium* group (Asteraceae) in Middle Europe and the Balkans: a diverse source for the crude *Herba Millefolii*. *Journal of Traditional Medicines*, 21:113-119.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M RICE-EVANS. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1232-1237
- RIJKE, E., OUT, P., NIESSEN, W. M. A., ARIESE, F., GOOIJER, C., Y BRINKMAN. U. A. TH. 2006. Review: Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112: 31-63
- RICALDI, J. 2006. Extracción y caracterización físico-química del aceite esencial de chiuque (*Satureja incana*) obtenida mediante arrastre de vapor. Tesis. Facultad de ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional del Centro del Perú. Tarma Junin Perú, 66p.
- RODRÍGUEZ, SP; 2014. evaluación estacional de la producción y calidad del aceite esencial en plantas de orégano (*poliomintha longiflora gray*) en dos sistemas de cultivo, Tesis para optar el grado de maestría en ciencias en producción agrícola. Universidad autónoma de nuevo león, Escobedo, Mexico.
- RODRIGUEZ-SOLANA, R., SALGADO, J.M., DOMINGUEZ, J.M., CORTES-DIEGUEZ, S., 2015. Comparison of Soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC-MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC-ESI/MS/MS) from Lamiaceae species. *Phytochemical Analysis* 26:61-71
- ROLDÁN, L.; ARIZA. C.; DIAZ. G.; AFANADOR. G. 2010. "The effects of the dietary supplementation with essential oils from selected species of the Lamiaceae family on the performance of growing broilers chickens". *Journal of Animal*.88:2 .94

- RUSSO, M G.; GALLETTI, P.; BROCCINI, A.; CAMACINI, A. 1998. Essential oli chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*origanum vulre ssp hirtum*): A preliminary evaluation of their use in Chemotaxonomy by cluster analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:3741-3746.
- RZEDOWSKI, 1978. J. *Vegetación de México*. México D.F., Editorial Limusa, pp.432.
- SADEGHI,H., BASTAN, M., 2015. Essential oil variations among the natura populations of *francoeuria undalata*. *Progress in biological sciences*. 5(1):85-96.
- SAID-AL AHL, H.A.A, OMER, E.A. & NAGUIB. 2009. Effect of water stress and nitrogen fertilizer on herb and essential oil of oregano. *International Agrophysics*, 23:269-275.
- SALGUEIRO, L. R.; CAVALEIRO, C.; GONCALVES, M. J. & PROENCA DA CUNHA, A. , 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medicinal.*, 69:80-3.
- SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F. & SANGWAN, R.S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Grow Regulation*, 43: 3-21.
- SARKER, S.D.; LATIF, Z.; GRAY, A.I. 2006. *Natural products isolation*. Second edition. Humana Press. USA. 513p.
- SENAMHI. 2013. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. <http://www.senamhi.gob.pe/?p=data-historica> visitado en Agosto del 2017.
- SEGARRA-MORAGUES, J.G., CARRIÓN MARCO, Y., CASTELLANOS, M.C., MOLINA, M.J., GARCÍA-FAYOS, P. 2016. Ecological and historical determinants

of population genetic structure and diversity in the Mediterranean shrub *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* . 180 (1), 50–63.

- SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G.S.; HART, A.N.; SHANBROM, E. 2006. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart (Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8604-8610.
- SCHILLMILLER, L., LAST, L., PICHERSKY, E. 2008. Harnessing the biochemistry of plant trichome for the production of useful compounds *The Plant Journal* , 54 :702 – 711
- SKENDI , A., IRAKLI, M., CHATZOPOULOU, P. 2017. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of the Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 6: 2–69.
- SHIVA, C., BERNAL, S., SAUVAIN, M., CALDAS, J., KALINOWSKI, J., FALCÓN, N., ROJAS, R. 2012. Evaluación del aceite esencial de orégano (*origanum vulgare*) y extracto deshidratado de jengibre (*zingiber officinale*) como potenciales promotores de crecimiento en pollos de engorde. *Revista. Investigacion. Veterinaria. Perú* 23:2.
- SIEA. 2015. Sistema integrado de estadística agraria. Consultado en junio del 2015. <http://siea.minag.gob.pe/siea/>
- SOLTANIPOOR, A.; JONOUBI, P.; HEJAZI, H.; MIRZA, M. 2015. Effect of some ecological factors on quantity and quality of the essential oils of *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants and By-Products* .4 (1) :45-50.
- SOUTO, F.A.; DE JESUS, M.; CARDENAS, O. 1996. Hernandulcin is the major constituent of *Lippia dulcis* Trev. (Verbenaceae). *Natural Product Letters* .8: 151-158.

- SOUTO, F.A.; DE JESUS, M.; CARDENAS, O.; ACUNA, M.F.; MELENDEZ, P.A.; ROMERO, L. 1997. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry*. 44: 1077-1086.
- SMITH, L., COHEN, M., DOULL, J., FERON, J., GOODMAN, I., MARNETT, J., PORTOGHESE, S., WADDELL, J., WAGNER, M., HALL, L., HIGLEY, A., LUCAS-GAVIN, C. Y ADAMS, B. 2005. A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 43: 345-363.
- STASHENKO E., JARAMILLO B. Y MARTINES J. 2003. Comparacion de la composición química de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. *Revista Academica Colombiana Científica* 27(105): 579 -597.
- STASHENKO, E.; RUÍZ, C.A.; ARIAS, G.; DURÁN, D.C.; SALGAR, W.; CALA, M.; MARTÍNEZ, M.R. 2010. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *Journal of Separation. Science*.33: 93-103.
- STINTZING , F., TUREK C . 2011 . Application of high performance liquid chromatography diode array and mass spectrometry for the analysis of characteristic compounds in various essential oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400:3109 - 23 .
- STINTZING F., TUREK, C. 2012. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. *Food Research International* 46 :41 - 53 .
- TEPE, B., SARIKURKCU, C., BERK, S., ALIM, A., AKPULA, H.A., 2011. Chemical composition, radical scavenging and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus boveii* and *Thymus hyemalis*. *Records of Natural Products*. 5: 208–220.

- TEUSCHER E., ANTON R., LOBSTEIN A., 2005 *Plantes aromatiques*, Ed Tec & Doc; Paris, 361-365.
- TEYE, J.; YU,X.; LI, J.; HAO, J.; CAO, J.; AN, M.; TAN, Z.; CHANG, Y. 2016. Simultaneous Determination of Bergapten, Imperatorin, Notopterol, and Isoimperatorin in Rat Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Its Application to Pharmacokinetic and Excretion Study after Oral Administration of *Notopterygium incisum* Extract. *International Journal of Analytical. Chemistry*.9:507-246.
- TIBALDI, G. , FONTANA, E. , NICOLA, S. 2011. Growth conditions and postharvest handling may affect *Origanum vulgare* L essential oil. *ssp.hirtum* (Link) Letswaart. *Industrial Crops and Products*. 34 (3): 1516 – 1522.
- TISSIER, A., 2012. *Agricultural and Biological Sciences* Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/transgenic-plants-advances-andlimitations/trichome-specific-expressionpromoters-and-their-applications> Visitado el Noviembre 2017
- TORRENEGRA A.M.. 2014. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de orégano (*Origanum vulgare*), orégano “borde blanco” (*Origanum vulgare* ssp) y oreganito (*Lippia alba*) cultivado en La zona Norte del departamento de Bolívar (Colombia). Maestría thesis, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- TUTTOLOMONDO, T., DUGO, G., RUBERTO, G., LETO, C., NAPOLI, E.M., CICERO, N., ET AL., 2015. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Natural Product Research* 29 (20): 1928–1934.
- UGÁS R, SIURA S, DELGADO F, CASAS A, TOLEDO J. 2000. *Hortalizas datos Básicos*. 3 ra Edicion, Edi Agraria, UNALM, Lima

- UE N1426/2015. Reclamo de ejecución de la comición, diario oficialde la UE L223/6.
- USANO, J., PALÁ , J., HERRAIZ, D., 2014. Temperature stress causes different profiles of volatile compounds in two chemotypes of *salvia lavandulifolia* vahl. *Biochemical systematics and ecology*. 54: 166-171
- USANO, J., PALÁ , J., HERRAIZ, D., 2016. essential oil yields and qualities of different clonal lines of *salvia lavandulifolia* monitored in spain over four years of cultivation. *Industrial crops and products*. 80: 251-261.
- VAZIRIAN M., MOHAMMADI M., FARZAEI M.H., AMIN G., AMANZADEH Y. 2015. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2(1): 41-46
- VÁSQUEZ D, 2012. El oregano de monte (*lippia origanoides*) del alto patía: efecto del métpdp de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos, Universidad nacional de colombia tesis en magister en Ciencias químicas.
- VAIČIULYTĖ, V., LOŽIENĖ K., TARAŠKEVIČIUS, R., BUTKIENĖ, R. **2017**. variation of essential oil composition of *thymus pulegioides* in relation to soil chemistry. *Industrial Crops and Products* 95: 422-433
- VELÁSQUEZ, D. Q., .SÁNCHEZ, V. A., TORRES. O. J., GARCÍA, O. J., SALAZAR, B.A., HERNÁNDEZ, M.L. 2017. Cuantificación por hplc del contenido de timol y carvacrol en *lippia graveolens* hbk s.l., nativa de reynosa, tamaulipas, México. *Revista Boliviana De Química*. 34(1) : 33-39

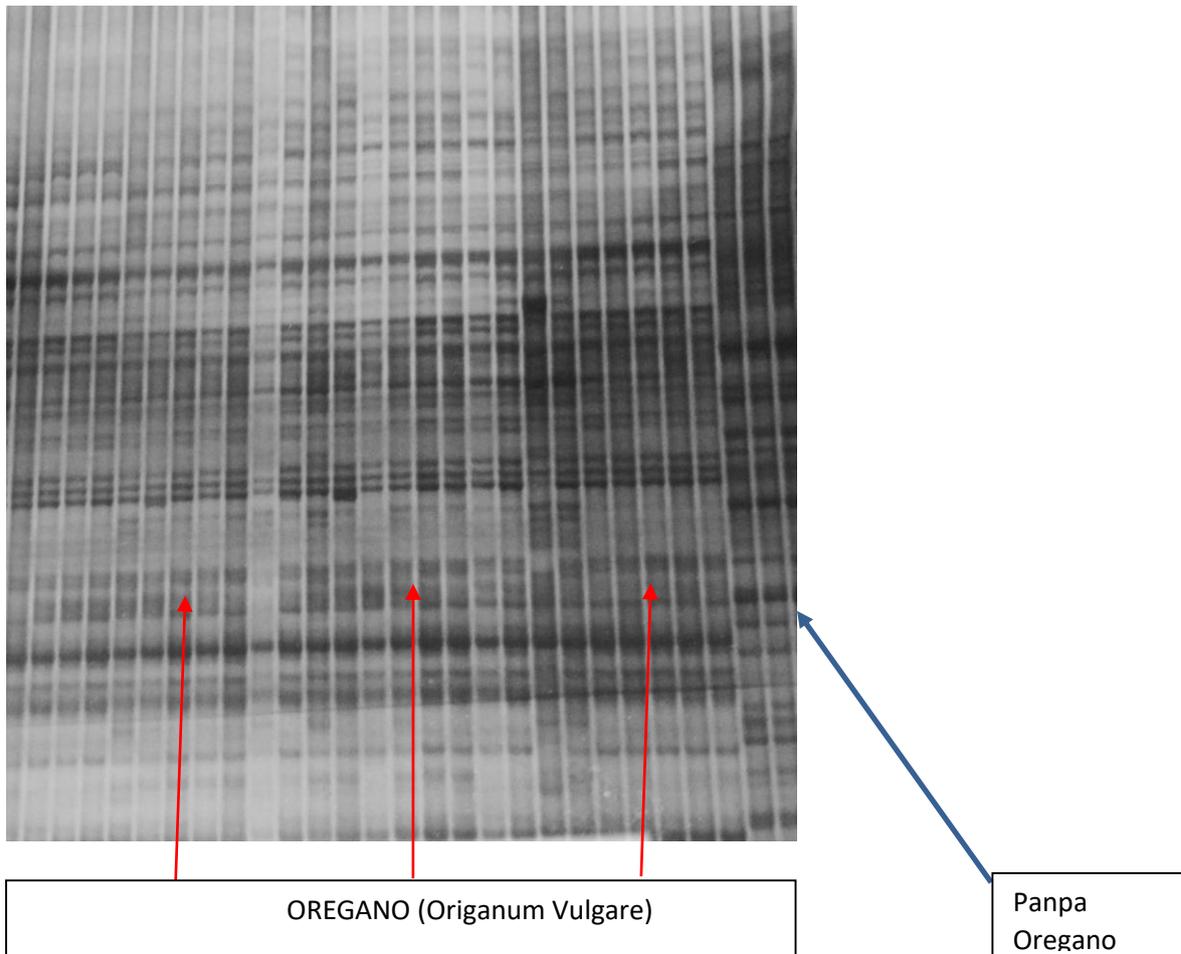
- VILLAVICENCIO, J., MOROMI, H., SALCEDO, M., PINEDA, M., RAMOS, J., ZAMBRANO, L., MARTÍNEZ, E., MENDOZA, G., PETKOVA, M., BARDALES.,R. 2016 Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans*. *Odontol. Sanmarquina*. 19(2):5-8.
- VOKOU, D.; KOKKINI, S. AND BESSIERE, J.M. 1993. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematic and Ecology*. 21: 287–295.
- WANG LH , LIU HJ . 2010 . Determination of fragrance allergens in essential oils and evaluation of their in vitro permeation from formulations of essential oils through cultured skin. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*. 2:72 - 6 .
- WENK, C., 2003. Herbs and botanicals in the nutrition of monogastric animals. 9. Syposium Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier am 24.und 25.09. Jena/Thueringen, 45–60.
- WILLIAMS, W. B.; COVELIER, M. E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel.-Wissenschaft and Technologie*. 28: 25
- WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.
- Wu S , Lu G , Zhao L , Chen S , Zhou H , Li Q . 2010 . Determination of β -elemene in volatile oil of *Sarcandra glabra* (Thunb.) Fresh Nakai by HPLC . *Zhongguo Xiandai Yingyong Yaoxue* 27:59 - 61
- XUE, C., HUGELL, H.M., LI, C., STORY, D. 2004. Efficacy, chemistry and pharmacology of Chinese herbal medicine for allergic rhinitis. *Current Medicinal Chemistry*, 11:1403-1421.

- YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; GORDON, M.H.; RANEVA, V.G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64: 59-66.
- ZAINAB A. J.; NEGREI. C.; CRISTIAN. B. 2015. HPLC-FL method for tramadol quantification in human plasma S. Miriana. *Toxicology letters*. 283.(2) 378-379
- ZARATE, A. 1989. Extracción y aplicación del aceite de cedron ((*Aloysia triphylla*) tesis Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú Huancayo Junin Peru.
- ZEGARRA, R. 1994. La vegetación desértica perenne de Tacna: estudio biosistemático y sus recursos naturales. *Revista Nueva Imagen Uiversidad Nacional Jorge Basabre Groman, Tacna* (5):53-66.
- ZELIKOVIĆ. S.Ć1; ŠOLIĆ. M.E; MAKSIMOVIĆ M.2015. Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. *Natural Product Research* 29(19):1874-7.
- ZHENG, W.; WANG, S. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry* 49:5165-5170.
- ZHIWEI, S.; JINMAO, Y.; CUIHUA, S.; LIAN, X. 2011. Identification and determination of carboxylic acids in food samples using 2-(2-(anthracen-10-yl)-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-1-yl)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (APIETS) as labeling reagent by HPLC with FLD and APCI/MS. *Talanta* 85: 1088–1099.
- ZOBAYED, S.M.A., AFREEN, F. & KOZAI, T. 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metaoblite concentrations in *St. John's ort*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 977-984.

ANEXOS

Anexo 1: Método de electroforesis del Orégano (*Origanum vulgare*).

Las flechas rojas nos señalan que cuando comparamos dos especies, algunas como en este caso el “pampa orégano” presenta fragmentos de ADN que no los tiene el orégano, que como se aprecia en las flechas azules, el número de fragmentos de ADN coincidentes es muy alto, debido a que se trata de una especie. Si fuera un híbrido, entonces los patrones de variación serían mucho más altos entre los individuos. Pero, en este caso, notamos que la homogeneidad genética es muy alta, por lo que se puede afirmar con mucha confianza estadística que si se trata de la misma especie.



Anexo 2: Fotos

a) Fotos del proceso de selección de hojas .



b) Fotos de ecotipos de Oregano (Fuentes: southernperu)



c) Extracción de aceite esencial.

I Oregano en incitu



II. Selección



III. Secado



IV. Extracción por arrastre de vapor



V. Obtención del aceite.



VI. Almacenamiento.



d) Preparacion de la muestra para analisada por HPLC/FLD



e) Analisis de Cromatografia HPLC /FLD



ANEXO 3: Rendimiento de aceite esencial de los ecotipos de oregano.

Codigo de muestra	Zona de cultivo	Ecotipo de oregano	Altitudes (m.s.n.m)	RENDIMIENTO (%)
				% AE
M1	Urubamba	Floración Temprana 2	3042	2.5
M1	Urubamba	Floración Temprana 2	3042	2.5
M2	Urubamba	Chino	3042	1.5
M2	Urubamba	Chino	3042	1.5
M3	Urubamba	Nigra	3042	1.57
M4	Urubamba	Italiano	3042	1.57
M4	Urubamba	Italiano	3042	1.57
M5	Urubamba	Floración Temprana 1	3042	2.6
M5	Urubamba	Floración Temprana 1	3042	2.6
M6	Urubamba	Italiano	3042	1.8
M6	Urubamba	Italiano	3042	1.8
M7	Urubamba	Chino	3042	1.6
M7	Urubamba	Chino	3042	1.6

M8 CONC	Urubamba	Oreja de Elefante	3042	1.5
M9	Urubamba	Nigra	3042	1.8
M9	Urubamba	Nigra	3042	1.8
M10	Urubamba	Oreja de Elefante	3042	1.6
M10	Urubamba	Oreja de Elefante	3042	1.6
M11	Urubamba	Italiano	3042	1.7
M11	Urubamba	Italiano	3042	1.7
M12	Urubamba	Floración Temprana 1	3042	1.8
M12	Urubamba	Floración Temprana 1	3042	1.8
M13	Urubamba	Floración Temprana 2	3042	2.75
M13	Urubamba	Floración Temprana 2	3042	2.75
M14	Urubamba	Chino	3042	1.6
M14	Urubamba	Chino	3042	1.6
M15	Urubamba	Oreja de Elefante	3042	1.6
M15	Urubamba	Oreja de Elefante	3042	1.6
M16	Urubamba	Floración Temprana 2	3042	2.7
M16	Urubamba	Floración Temprana 2	3042	2.7
M17	Urubamba	Nigra	3042	1.6
M17	Urubamba	Nigra	3042	1.6
M18	Urubamba	Floración Temprana 1	3042	1.85
M18	Urubamba	Floración Temprana 1	3042	1.85
M19	Cusipata	Chino	3260	1.4
Codigo de muestra	Zona de cultivo	Ecotipo de oregano	Altitudes (m.s.n.m)	RENDIMIENTO (%)
M19	Cusipata	Chino	3260	1.4
M21	Cusipata	Nigra	3260	1.3
M21	Cusipata	Nigra	3260	1.3
M23	Cusipata	Chino	3260	1.3
M23	Cusipata	Chino	3260	1.3
M24	Cusipata	Floración Temprana 1	3260	1.3
M24	Cusipata	Floración Temprana 1	3260	1.3
M25	Cusipata	Chino	3260	1.3
M25	Cusipata	Chino	3260	1.3
M27	Cusipata	Floración Temprana 1	3260	1.45
M27	Cusipata	Floración Temprana 1	3260	1.45
M28	Cusipata	Nigra	3260	1.35
M28	Cusipata	Nigra	3260	1.35
M29	Cusipata	Floración Temprana 1	3260	1.4
M29	Cusipata	Floración Temprana 1	3260	1.4
M30	Cusipata	Nigra	3260	1.3
M30	Cusipata	Nigra	3260	1.3
M31	Cusipata	Oreja de Elefante	3260	1.25
M31	Cusipata	Oreja de Elefante	3260	1.25

M33	Cusipata	Italiano	3260	1.3
M33	Cusipata	Italiano	3260	1.3
M34	Cusipata	Oreja de Elefante	3260	1.25
M34	Cusipata	Oreja de Elefante	3260	1.25
M35	Cusipata	Oreja de Elefante	3260	1.3
M35	Cusipata	Oreja de Elefante	3260	1.3
M36	Cusipata	Floración Temprana 2	3260	1.4
M36	Cusipata	Floración Temprana 2	3260	1.4
M37	Cusipata	Italiano	3260	1.4
M37	Cusipata	Italiano	3260	1.4
M39	Cusipata	Floración Temprana 2	3260	1.25
M39	Cusipata	Floración Temprana 2	3260	1.25
M40	Cusipata	Italiano	3260	1.45
M40	Cusipata	Italiano	3260	1.45
M42	Cusipata	Floración Temprana 2	3260	1.35
M42	Cusipata	Floración Temprana 2	3260	1.35
M20	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	3092	1.4
M20	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	3092	1.4
M22	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	3092	1.3
M22	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	3092	1.3
M26	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	3092	1.3
M26	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	3092	1.3
M32	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	3092	1.35
M32	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	3092	1.35
Codigo de muestra	Zona de cultivo	Ecotipo de oregano	Altitudes (m.s.n.m)	RENDIMIENTO (%)
M38	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	3092	1.4
M38	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	3092	1.4
M41	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	3092	1.35
M41	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	3092	1.35
M48	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	3092	2.8
M48	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	3092	2.8
M51	Andahuaylillas	Nigra	3092	0.85
M51	Andahuaylillas	Nigra	3092	0.85
M52	Andahuaylillas	Nigra	3092	0.85
M52	Andahuaylillas	Nigra	3092	0.85
M55	Andahuaylillas	Nigra	3092	1.15
M55	Andahuaylillas	Nigra	3092	1.15
M56	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	3092	1.2
M56	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	3092	1.2
M58	Andahuaylillas	Chino	3092	1.3
M58	Andahuaylillas	Chino	3092	1.3
M59	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	3092	1.2
M59	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	3092	1.2

M60	Andahuaylillas	Italiano	3092	2.7
M60	Andahuaylillas	Italiano	3092	2.7
M63	Andahuaylillas	Chino	3092	1
M63	Andahuaylillas	Chino	3092	1
M64	Andahuaylillas	Italiano	3092	2
M64	Andahuaylillas	Italiano	3092	2
M67	Andahuaylillas	Chino	3092	1.25
M67	Andahuaylillas	Chino	3092	1.25
M69	Andahuaylillas	Italiano	3092	2.55
M69	Andahuaylillas	Italiano	3092	2.55
M43	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	3386	2.8
M43	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	3386	2.8
M44	Jaquijaguana	Chino	3386	1.4
M44	Jaquijaguana	Chino	3386	1.4
M45	Jaquijaguana	Nigra	3386	1.2
M45	Jaquijaguana	Nigra	3386	1.2
M46	Jaquijaguana	Chino	3386	1.3
M46	Jaquijaguana	Chino	3386	1.3
M47	Jaquijaguana	Chino	3386	1.25
M47	Jaquijaguana	Chino	3386	1.25
M49	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	3386	2.8
M49	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	3386	2.8
M50	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	3386	2.8
M50	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	3386	2.8
M53	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	3386	2.4
Codigo de muestra	Zona de cultivo	Ecotipo de oregano	Altitudes (m.s.n.m)	RENDIMIENTO (%)
M53	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	3386	2.4
M54	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	3386	2.7
M54	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	3386	2.7
M57	Jaquijaguana	Nigra	3386	1.1
M57	Jaquijaguana	Nigra	3386	1.1
M61	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	3386	2.5
M61	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	3386	2.5
M62	Jaquijaguana	Italiano	3386	2.5
M62	Jaquijaguana	Italiano	3386	2.5
M62	Jaquijaguana	Italiano	3386	2.5
M65	Jaquijaguana	Nigra	3386	1
M65	Jaquijaguana	Nigra	3386	1
M66	Jaquijaguana	Italiano	3386	2.6
M66	Jaquijaguana	Italiano	3386	2.6
M68	Jaquijaguana	Italiano	3386	2.7
M68	Jaquijaguana	Italiano	3386	2.7
M70	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	3386	2.6

M70	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	3386	2.6
M71	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	3386	2.2
M71	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	3386	2.2
M72	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	3386	2.5
M72	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	3386	2.5
M73	Sicuani	Chino	3638	1.25
M73	Sicuani	Chino	3638	1.25
M74	Sicuani	Chino	3638	1.3
M74	Sicuani	Chino	3638	1.3
M75	Sicuani	Chino	3638	1.2
M75	Sicuani	Chino	3638	1.2
M76	Sicuani	Floración Temprana 1	3638	1.2
M76	Sicuani	Floración Temprana 1	3638	1.2
M77	Sicuani	Floración Temprana 1	3638	1.2
M77	Sicuani	Floración Temprana 1	3638	1.2
M78	Sicuani	Floración Temprana 1	3638	1.2
M78	Sicuani	Floración Temprana 1	3638	1.2
M79	Sicuani	Floración Temprana 2	3638	2.55
M79	Sicuani	Floración Temprana 2	3638	2.55
M80	Sicuani	Floración Temprana 2	3638	1.35
M80	Sicuani	Floración Temprana 2	3638	1.35
M81	Sicuani	Floración Temprana 2	3638	1.25
M81	Sicuani	Floración Temprana 2	3638	1.25
M82	Sicuani	Italiano	3638	1.2
M82	Sicuani	Italiano	3638	1.2
M83	Sicuani	Italiano	3638	2.1
Codigo de muestra	Zona de cultivo	Ecotipo de oregano	Latitud (altura) msnm	RENDIMIENTO
M83	Sicuani	Italiano	3638	2.1
M84	Sicuani	Italiano	3638	2.7
M84	Sicuani	Italiano	3638	2.7
M85	Sicuani	Nigra	3638	2.4
M85	Sicuani	Nigra	3638	2.4
M86	Sicuani	Nigra	3638	2.7
M86	Sicuani	Nigra	3638	2.7
M87	Sicuani	Nigra	3638	2.55
M87	Sicuani	Nigra	3638	2.55
M88	Sicuani	Oreja de Elefante	3638	2.7
M88	Sicuani	Oreja de Elefante	3638	2.7
M89	Sicuani	Oreja de Elefante	3638	2.8
M89	Sicuani	Oreja de Elefante	3638	2.8
M90	Sicuani	Oreja de Elefante	3638	2.8
M90	Sicuani	Oreja de Elefante	3638	2.8

Anexo 4: Cuantificación de timol y carvacrol en el aceite esencial de oregano

Codigo de la muestra	Distritos (Altitudes)	Ecotipo de Oregano	Aceite Esencial		Hoja	
			% carv	% timol	ppm carv	ppm timol
M1	Urubamba	Floración Temprana 2	1.25	11.00	2.809	24.743
M1	Urubamba	Floración Temprana 2	1.24	10.89	2.798	24.511
M2	Urubamba	Chino	0.51	8.97	0.694	12.109
M2	Urubamba	Chino	0.52	9.00	0.696	12.156
M3	Urubamba	Nigra	0.81	13.64	1.140	19.273
M4	Urubamba	Italiano	0.96	10.40	1.353	14.697
M4	Urubamba	Italiano	0.94	10.38	1.327	14.662
M5	Urubamba	Floración Temprana 1	1.05	10.96	2.462	25.637
M5	Urubamba	Floración Temprana 1	1.05	10.91	2.446	25.535
M6	Urubamba	Italiano	0.61	10.05	0.989	16.275
M6	Urubamba	Italiano	0.62	10.06	1.002	16.291
M7	Urubamba	Chino	0.86	10.12	1.238	14.569
M7	Urubamba	Chino	0.87	10.02	1.256	14.432
M8	Urubamba	Oreja de Elefante	0.86	19.64	1.167	26.511
M9	Urubamba	Nigra	0.68	9.38	1.098	15.193
M9	Urubamba	Nigra	0.69	9.42	1.114	15.263
M10	Urubamba	Oreja de Elefante	0.91	9.68	1.314	13.939
M10	Urubamba	Oreja de Elefante	0.91	9.74	1.310	14.027
M11	Urubamba	Italiano	0.56	10.14	0.850	15.515
M11	Urubamba	Italiano	0.56	10.13	0.858	15.496
M12	Urubamba	Floración Temprana 1	0.19	0.75	0.309	1.212
M12	Urubamba	Floración Temprana 1	0.20	0.74	0.320	1.203
M13	Urubamba	Floración Temprana 2	1.68	10.26	4.170	25.386
M13	Urubamba	Floración Temprana 2	1.65	10.29	4.081	25.458
M14	Urubamba	Chino	0.56	9.32	0.812	13.419
M14	Urubamba	Chino	0.54	9.28	0.777	13.366
M15	Urubamba	Oreja de Elefante	0.65	9.82	0.940	14.145
M15	Urubamba	Oreja de Elefante	0.65	9.87	0.932	14.209
M16	Urubamba	Floración Temprana 2	0.11	0.31	0.258	0.761
M16	Urubamba	Floración Temprana 2	0.11	0.31	0.277	0.753
M17	Urubamba	Nigra	0.57	9.69	0.814	13.952
M17	Urubamba	Nigra	0.54	9.58	0.775	13.794

M18	Urubamba	Floración Temprana 1	0.55	10.00	0.908	16.658
Codigo de la muestra	Distritos (Altitudes)	Ecotipo de Oregano	Aceite Esencial		Hoja	
			% carv	% timol	ppm carv	ppm timol
M19	Cusipata	Chino	0.36	8.86	0.457	11.161
M19	Cusipata	Chino	0.36	8.83	0.460	11.128
M21	Cusipata	Nigra	0.35	8.43	0.414	9.862
M21	Cusipata	Nigra	3.56	8.44	4.164	9.872
M23	Cusipata	Chino	0.25	6.31	0.296	7.388
M23	Cusipata	Chino	0.26	6.32	0.299	7.394
M24	Cusipata	Floración Temprana 1	0.38	9.31	0.442	10.896
M24	Cusipata	Floración Temprana 1	0.38	9.29	0.440	10.872
M25	Cusipata	Chino	0.36	8.58	0.417	10.041
M25	Cusipata	Chino	0.35	8.65	0.406	10.123
M27	Cusipata	Floración Temprana 1	0.28	6.88	0.366	8.976
M27	Cusipata	Floración Temprana 1	0.28	6.86	0.367	8.956
M28	Cusipata	Nigra	0.32	7.98	0.392	9.699
M28	Cusipata	Nigra	0.32	7.88	0.390	9.579
M29	Cusipata	Floración Temprana 1	0.36	8.63	0.452	10.870
M29	Cusipata	Floración Temprana 1	0.36	8.71	0.450	10.972
M30	Cusipata	Nigra	0.34	8.22	0.395	9.614
M30	Cusipata	Nigra	0.33	8.22	0.387	9.612
M31	Cusipata	Oreja de Elefante	0.49	9.17	0.554	10.321
M31	Cusipata	Oreja de Elefante	0.50	9.17	0.561	10.318
M33	Cusipata	Italiano	0.36	8.94	0.425	10.458
M33	Cusipata	Italiano	0.36	8.84	0.416	10.338
M34	Cusipata	Oreja de Elefante	0.33	8.17	0.369	9.193
M34	Cusipata	Oreja de Elefante	0.33	8.19	0.371	9.218
M35	Cusipata	Oreja de Elefante	0.35	8.71	0.405	10.196
M35	Cusipata	Oreja de Elefante	0.34	8.75	0.403	10.236
M36	Cusipata	Floración Temprana 2	0.36	8.97	0.449	11.308
M36	Cusipata	Floración Temprana 2	0.35	9.02	0.442	11.365
M37	Cusipata	Italiano	0.35	8.97	0.446	11.300
M37	Cusipata	Italiano	0.36	9.00	0.450	11.336
M39	Cusipata	Floración Temprana 2	0.38	8.73	0.423	9.818
M39	Cusipata	Floración Temprana 2	0.39	8.71	0.434	9.799
M40	Cusipata	Italiano	0.35	8.94	0.454	11.663
M40	Cusipata	Italiano	0.34	8.84	0.449	11.537

M42	Cusipata	Floración Temprana 2	0.37	9.30	0.454	11.299
M42	Cusipata	Floración Temprana 2	0.37	9.39	0.452	11.408
Codigo de la muestra	Distritos (Altitudes)	Ecotipo de Oregano	Aceite Esencial		Hoja	
			% carv	% timol	ppm carv	ppm timol
M20	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	0.19	4.31	0.236	5.431
M20	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	0.19	4.32	0.236	5.444
M22	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	0.44	10.57	0.512	12.369
M22	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	0.44	10.58	0.520	12.380
M26	Andahuaylillas	Floración Temprana 1	0.06	1.20	0.067	1.410
M32	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	0.28	7.06	0.341	8.578
M32	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	0.28	7.02	0.335	8.535
M38	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	0.33	8.28	0.420	10.437
M38	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	0.33	8.20	0.413	10.331
M41	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	0.01	0.52	0.015	0.637
M41	Andahuaylillas	Floración Temprana 2	0.02	0.53	0.018	0.646
M48	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	0.92	10.09	2.326	25.419
M48	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	0.94	10.17	2.371	25.634
M51	Andahuaylillas	Nigra	0.28	7.50	0.214	5.734
M51	Andahuaylillas	Nigra	0.20	6.71	0.156	5.132
M52	Andahuaylillas	Nigra	0.77	12.47	0.591	9.539
M52	Andahuaylillas	Nigra	0.75	12.48	0.573	9.544
M55	Andahuaylillas	Nigra	0.92	13.81	0.957	14.293
M55	Andahuaylillas	Nigra	0.90	13.73	0.935	14.209
M56	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	0.65	12.82	0.700	13.848
M56	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	0.66	12.88	0.717	13.912
M58	Andahuaylillas	Chino	0.54	15.08	0.632	17.643
M58	Andahuaylillas	Chino	0.54	14.92	0.627	17.461
M59	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	0.48	12.50	0.524	13.495
M59	Andahuaylillas	Oreja de Elefante	0.49	12.47	0.525	13.472
M60	Andahuaylillas	Italiano	1.72	17.12	4.180	41.606
M60	Andahuaylillas	Italiano	1.74	17.10	4.232	41.563
M63	Andahuaylillas	Chino	0.65	12.35	0.583	11.111
M63	Andahuaylillas	Chino	0.65	12.42	0.581	11.178
M64	Andahuaylillas	Italiano	1.74	15.27	3.124	27.486
M64	Andahuaylillas	Italiano	1.70	15.33	3.058	27.594
M67	Andahuaylillas	Chino	0.25	9.25	0.277	10.407

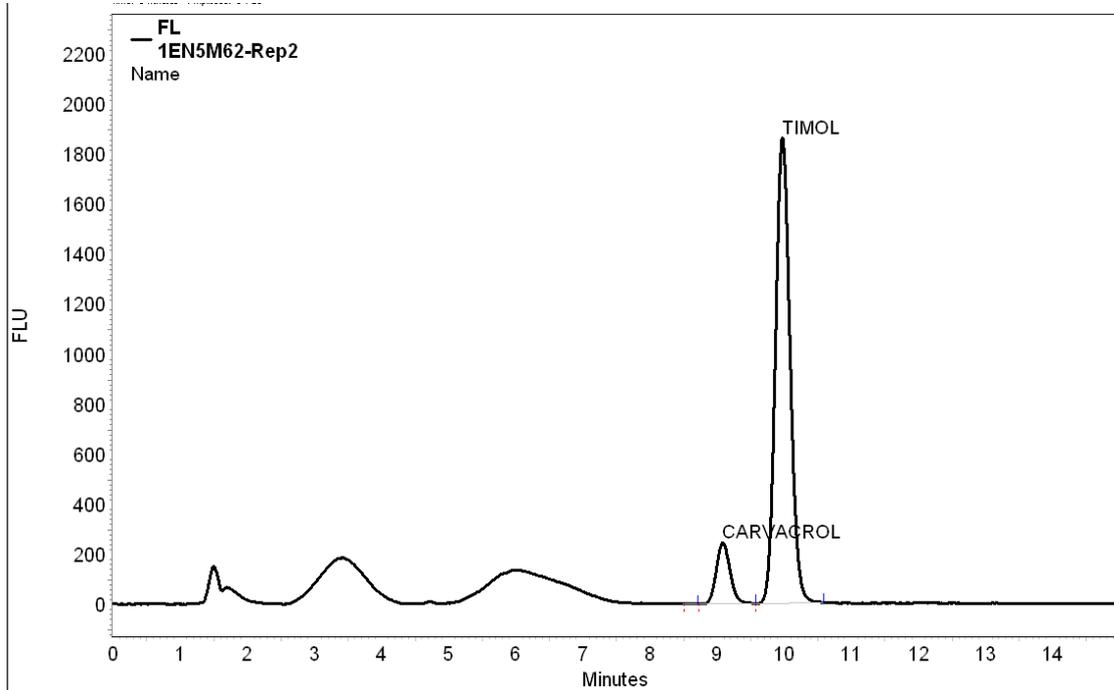
M67	Andahuaylillas	Chino	0.24	9.00	0.270	10.124
M69	Andahuaylillas	Italiano	1.49	15.11	3.419	34.679
M69	Andahuaylillas	Italiano	1.42	14.23	3.262	32.668
M43	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	0.90	9.85	2.278	24.833
Codigo de la muestra	Distritos (Altitudes)	Ecotipo de Oregano	Aceite Esencial		Hoja	
			% carv	% timol	ppm carv	ppm timol
M43	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	0.91	9.88	2.286	24.887
M44	Jaquijaguana	Chino	0.03	0.82	0.040	1.039
M44	Jaquijaguana	Chino	0.03	0.85	0.037	1.068
M45	Jaquijaguana	Nigra	0.57	10.34	0.621	11.167
M45	Jaquijaguana	Nigra	0.58	10.28	0.631	11.102
M46	Jaquijaguana	Chino	0.06	1.70	0.072	1.989
M46	Jaquijaguana	Chino	0.06	1.68	0.073	1.961
M47	Jaquijaguana	Chino	0.20	4.52	0.222	5.089
M47	Jaquijaguana	Chino	0.20	4.59	0.220	5.162
M49	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	0.65	7.06	1.643	17.796
M49	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	0.65	7.10	1.640	17.897
M50	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	0.99	10.02	2.501	25.257
M50	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	0.98	9.97	2.472	25.119
M53	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	1.44	14.70	3.119	31.756
M53	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	1.48	14.61	3.192	31.554
M54	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	1.50	14.09	3.647	34.234
M54	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	1.49	14.18	3.623	34.457
M57	Jaquijaguana	Nigra	0.09	2.65	0.092	2.624
M57	Jaquijaguana	Nigra	0.09	2.63	0.093	2.606
M61	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	1.55	15.23	3.487	34.277
M61	Jaquijaguana	Oreja de Elefante	1.56	15.29	3.508	34.407
M62	Jaquijaguana	Italiano	2.23	20.36	5.015	45.816
M62	Jaquijaguana	Italiano	2.23	20.21	5.015	45.468
M62	Jaquijaguana	Italiano	2.32	21.08	5.222	47.420
M65	Jaquijaguana	Nigra	0.42	11.54	0.378	10.389
M65	Jaquijaguana	Nigra	0.48	11.85	0.429	10.668
M66	Jaquijaguana	Italiano	1.94	17.28	4.540	40.434
M66	Jaquijaguana	Italiano	1.94	17.17	4.533	40.172
M68	Jaquijaguana	Italiano	1.97	17.67	4.794	42.936
M68	Jaquijaguana	Italiano	1.89	16.97	4.593	41.235
M70	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	1.74	15.23	4.067	35.631
M70	Jaquijaguana	Floración Temprana 1	1.62	14.21	3.802	33.263
M71	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	1.78	16.46	3.521	32.581

M71	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	1.65	15.19	3.266	30.075
M72	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	1.85	16.68	4.154	37.541
M72	Jaquijaguana	Floración Temprana 2	1.73	15.44	3.902	34.748
M73	Sicuani	Chino	0.75	13.08	0.845	14.711
Codigo de la muestra	Distritos (Altitudes)	Ecotipo de Oregano	Aceite Esencial		Hoja	
			% carv	% timol	ppm carv	ppm timol
M73	Sicuani	Chino	0.69	11.98	0.778	13.474
M74	Sicuani	Chino	0.69	12.73	0.803	14.890
M74	Sicuani	Chino	0.62	11.58	0.729	13.544
M75	Sicuani	Chino	0.29	10.69	0.319	11.551
M75	Sicuani	Chino	0.30	9.66	0.324	10.438
M76	Sicuani	Floración Temprana 1	0.68	15.77	0.738	17.036
M76	Sicuani	Floración Temprana 1	0.58	14.02	0.632	15.144
M77	Sicuani	Floración Temprana 1	0.26	9.30	0.286	10.041
M77	Sicuani	Floración Temprana 1	0.23	8.48	0.244	9.153
M78	Sicuani	Floración Temprana 1	0.34	11.50	0.371	12.424
M78	Sicuani	Floración Temprana 1	0.29	10.48	0.313	11.319
M79	Sicuani	Floración Temprana 2	1.19	12.72	2.726	29.195
M79	Sicuani	Floración Temprana 2	1.10	11.50	2.514	26.401
M80	Sicuani	Floración Temprana 2	0.43	11.90	0.517	14.457
M80	Sicuani	Floración Temprana 2	0.36	10.99	0.442	13.355
M81	Sicuani	Floración Temprana 2	0.57	11.83	0.640	13.309
M81	Sicuani	Floración Temprana 2	0.49	10.71	0.556	12.048
M82	Sicuani	Italiano	0.35	12.38	0.382	13.371
M82	Sicuani	Italiano	0.32	11.20	0.344	12.098
M83	Sicuani	Italiano	1.74	16.47	3.290	31.129
M83	Sicuani	Italiano	1.58	15.26	2.978	28.840
M84	Sicuani	Italiano	1.57	15.39	3.812	37.402
M84	Sicuani	Italiano	1.41	14.02	3.416	34.065
M85	Sicuani	Nigra	1.51	14.59	3.264	31.505
M85	Sicuani	Nigra	1.37	13.08	2.961	28.261
M86	Sicuani	Nigra	1.55	14.50	3.773	35.226
M86	Sicuani	Nigra	1.40	13.12	3.401	31.882
M87	Sicuani	Nigra	1.54	14.44	3.526	33.135
M87	Sicuani	Nigra	1.37	13.05	3.146	29.939

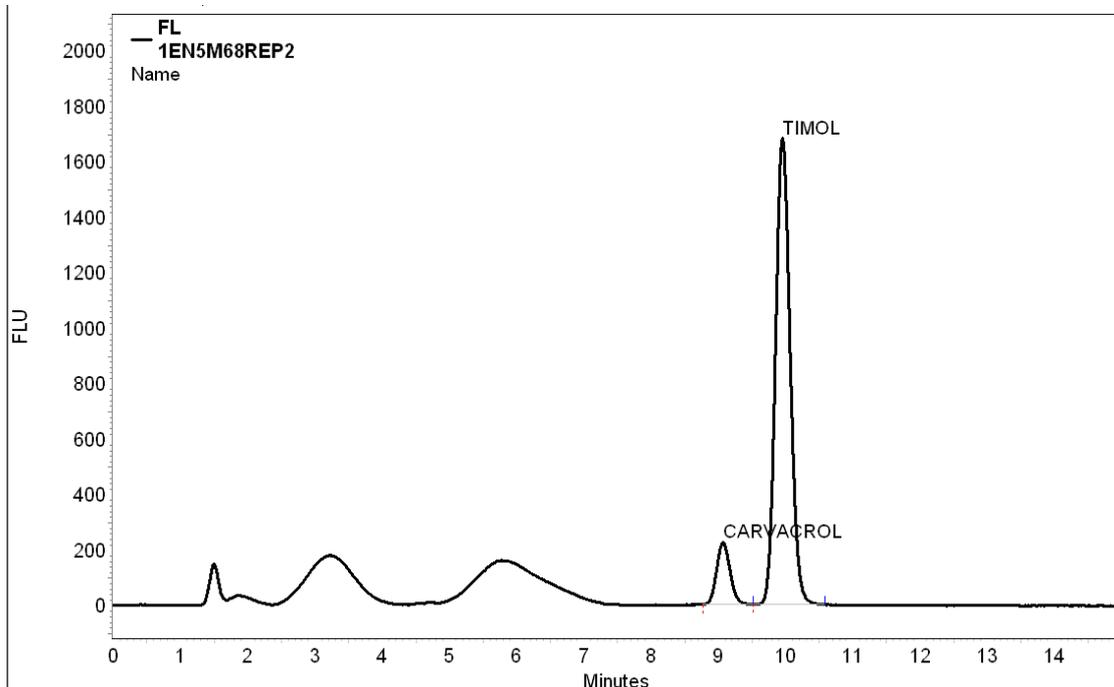
M88	Sicuani	Oreja de Elefante	1.90	16.77	4.628	40.749
M88	Sicuani	Oreja de Elefante	1.69	15.27	4.116	37.117
M89	Sicuani	Oreja de Elefante	1.67	15.04	4.203	37.901
M89	Sicuani	Oreja de Elefante	1.57	13.85	3.962	34.899
M90	Sicuani	Oreja de Elefante	1.80	15.42	4.526	38.864
M90	Sicuani	Oreja de Elefante	1.62	13.97	4.080	35.202

Anexo 5: Cromatograma de HPLC/FLD muestra de AEO de Jaquijahuana (italiano) y Sicuani (Oreja de elefante).

a) Muestra de AEO de Jaquijahuana (italiano)



b) Muestra de AEO de Sicuani (Oreja de elefante)



Anexo 6: Estadística

6.1. Rendimiento

XLSTAT 2017.5.47892 - ANOVA

Y / Variables dependientes: Libro = RENDIMIENTO2.xlsx / Hoja = DATOS / Rango = DATOS!\$B\$2:\$B\$92 / 90 filas y 1 columna

X / Cualitativas: Libro = RENDIMIENTO2.xlsx / Hoja = DATOS / Rango = DATOS!\$A\$2:\$A\$92 / 90 filas y 1 columna

Restricciones: an=0

Intervalo de confianza (%): 99

Tolerancia: 0.0001

Estadísticos descriptivos (Datos cuantitativos):

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típica
% AE	90	0	90	0.850	2.800	1.749	0.616

Análisis de varianza (% AE):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	33	28.614	0.867	9.382	< 0.0001
Error	56	5.175	0.092		
Total corregido	89	33.790			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

Coefficientes estandarizados (% AE):

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t	Límite inferior (99%)	Límite superior (99%)
Intercepción	2.600	0.215	12.095	< 0.0001	2.027	3.173
ECOT+ALT-Chino 3260	-1.267	0.278	-4.564	< 0.0001	-2.007	-0.527
ECOT+ALT-Chino 3042	-1.033	0.278	-3.724	0.000	-1.773	-0.293
ECOT+ALT-Chino 3092	-1.350	0.372	-3.626	0.001	-2.343	-0.357
ECOT+ALT-Chino 3386	-1.283	0.278	-4.624	< 0.0001	-2.023	-0.543
ECOT+ALT-Chino 3680	-1.350	0.278	-4.865	< 0.0001	-2.090	-0.610
ECOT+ALT-Chino AN 3092	-1.450	0.304	-4.770	< 0.0001	-2.261	-0.639
ECOT+ALT-FlorTem1 3260	-1.217	0.278	-4.384	< 0.0001	-1.957	-0.477
ECOT+ALT-FlorTem1 3042	-0.517	0.278	-1.862	0.068	-1.257	0.223
ECOT+ALT-FlorTem1 3092	-1.267	0.278	-4.564	< 0.0001	-2.007	-0.527
ECOT+ALT-FlorTem1 3386	0.000	0.278	0.000	1.000	-0.740	0.740
ECOT+ALT-FlorTem1 3680	-1.400	0.278	-5.045	< 0.0001	-2.140	-0.660
ECOT+ALT-FlorTem2 3260	-1.267	0.278	-4.564	< 0.0001	-2.007	-0.527
ECOT+ALT-FlorTem2 3042	0.125	0.304	0.411	0.683	-0.686	0.936
ECOT+ALT-FlorTem2 3092	-1.233	0.278	-4.444	< 0.0001	-1.973	-0.493
ECOT+ALT-FlorTem2 3386	-0.100	0.278	-0.360	0.720	-0.840	0.640
ECOT+ALT-FlorTem2 3680	-0.883	0.278	-3.183	0.002	-1.623	-0.143
ECOT+ALT-FlorTem2-3042	-0.100	0.372	-0.269	0.789	-1.093	0.893
ECOT+ALT-Italiano 3042	-0.910	0.278	-3.279	0.002	-1.650	-0.170
ECOT+ALT-Italiano 3260	-1.175	0.304	-3.865	0.000	-1.986	-0.364
ECOT+ALT-Italiano 3092	-0.183	0.278	-0.661	0.512	-0.923	0.557
ECOT+ALT-Italiano 3260	-1.300	0.372	-3.492	0.001	-2.293	-0.307
ECOT+ALT-Italiano 3386	0.000	0.278	0.000	1.000	-0.740	0.740
ECOT+ALT-Italiano 3680	-0.600	0.278	-2.162	0.035	-1.340	0.140
ECOT+ALT-Nigra 3260	-1.283	0.278	-4.624	< 0.0001	-2.023	-0.543
ECOT+ALT-Nigra 3042	-0.943	0.278	-3.399	0.001	-1.683	-0.203
ECOT+ALT-Nigra 3092	-1.650	0.278	-5.946	< 0.0001	-2.390	-0.910
ECOT+ALT-Nigra 3386	-1.500	0.278	-5.405	< 0.0001	-2.240	-0.760
ECOT+ALT-Nigra 3680	-0.050	0.278	-0.180	0.858	-0.790	0.690
ECOT+ALT-OrejaEle 3260	-1.333	0.278	-4.805	< 0.0001	-2.073	-0.593
ECOT+ALT-OrejaEle 3042	-1.033	0.278	-3.724	0.000	-1.773	-0.293
ECOT+ALT-OrejaEle 3092	-0.867	0.278	-3.123	0.003	-1.607	-0.127
ECOT+ALT-OrejaEle 3386	0.200	0.372	0.537	0.593	-0.793	1.193
ECOT+ALT-OrejaEle 3680	0.167	0.278	0.601	0.551	-0.573	0.907

Resumen de las comparaciones por pares para ECOT+ALT (Tukey (HSD)):

Categoría	Medias LS(% AE)	Grupos					
OrejaEle 3386	2.800	A					
OrejaEle 3680	2.767	A					
FlorTem2 3042	2.725	A	B				
FlorTem1 3386	2.600	A	B				
Italiano 3386	2.600	A	B				
OrejaEle3386	2.600	A	B				
Nigra 3680	2.550	A	B	C			
FlorTem2 3386	2.500	A	B	C	D		
FlorTem2-3042	2.500	A	B	C	D		
Italiano 3092	2.417	A	B	C	D	E	
FlorTem1 3042	2.083	A	B	C	D	E	F
Italiano 3680	2.000	A	B	C	D	E	F
OrejaEle 3092	1.733	A	B	C	D	E	F
FlorTem2 3680	1.717	A	B	C	D	E	F
Italiano 3042	1.690	A	B	C	D	E	F
Nigra 3042	1.657	A	B	C	D	E	F
Chino 3042	1.567	A	B	C	D	E	F
OrejaEle 3042	1.567	A	B	C	D	E	F
Italiano 3260	1.425		B	C	D	E	F
FlorTem1 3260	1.383		B	C	D	E	F
FlorTem2 3092	1.367		B	C	D	E	F
FlorTem2 3260	1.333		B	C	D	E	F
FlorTem1 3092	1.333		B	C	D	E	F
Chino 3260	1.333		B	C	D	E	F
Nigra 3260	1.317		B	C	D	E	F
Chino 3386	1.317		B	C	D	E	F
Italiano 3260	1.300			C	D	E	F
OrejaEle 3260	1.267			C	D	E	F
Chino 3680	1.250				D	E	F
Chino 3092	1.250				D	E	F
FlorTem1 3680	1.200					E	F
Chino 3092	1.150					E	F
Nigra 3386	1.100					E	F
Nigra 3092	0.950						F

6.2. Concentración de timol en el aceite esencial de orégano de los 6 ecotipos a 5 altitudes

XLSTAT 2017.5.47892 - ANOVA

Y / Variables dependientes: Libro = timol.xlsx / Hoja = Datos / Rango = Datos!\$B\$3:\$B\$93 / 90 filas y 1 columna

X / Cualitativas: Libro = timol.xlsx / Hoja = Datos / Rango = Datos!\$A\$3:\$A\$93 / 90 filas y 1 columna

Restricciones: an=0

Intervalo de confianza (%): 99

Estadísticos descriptivos (Datos cuantitativos):

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típica
TIMOL %	90	0	90	0.311	20.549	10.559	4.235

Análisis de varianza (TIMOL %):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	cuadrados med	F	Pr > F
Modelo	34	1137.859	33.466	4.015	< 0.0001
Error	55	458.499	8.336		
Total corregido	89	1596.358			

Calculado contra el modelo $Y = \text{Media}(Y)$

Parámetros del modelo (TIMOL %):

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t	Límite inferior (99%)	Límite superior (99%)
ECO- ALT-Chino 3260	-0.289	0.112	-2.569	0.013	-0.588	0.011
ECO- ALT-Chino 3638	-0.131	0.112	-1.168	0.248	-0.431	0.169
ECO- ALT-Chino 3042	-0.224	0.112	-1.990	0.052	-0.523	0.076
ECO- ALT-Chino 3092	-0.139	0.088	-1.576	0.121	-0.374	0.096
ECO- ALT-Chino 3386	-0.526	0.112	-4.681	< 0.0001	-0.826	-0.226
ECO- ALT-Chino AN 3092	-0.035	0.101	-0.349	0.729	-0.305	0.234
ECO- ALT-FlorTem1 3260	-0.274	0.112	-2.435	0.018	-0.573	0.026
ECO- ALT-FlorTem1 3638	-0.132	0.112	-1.179	0.244	-0.432	0.167
ECO- ALT-FlorTem1 3042	-0.318	0.112	-2.827	0.007	-0.617	-0.018
ECO- ALT-FlorTem1 3092	-0.398	0.112	-3.543	0.001	-0.698	-0.098
ECO- ALT-FlorTem1 3386	-0.067	0.112	-0.598	0.553	-0.367	0.233
ECO- ALT-FlorTem2 3260	-0.242	0.112	-2.154	0.036	-0.542	0.058
ECO- ALT-FlorTem2 3638	-0.117	0.101	-1.157	0.252	-0.387	0.153
ECO- ALT-FlorTem2 3042	-0.329	0.101	-3.258	0.002	-0.599	-0.060
ECO- ALT-FlorTem2 3092	-0.402	0.112	-3.577	0.001	-0.702	-0.102
ECO- ALT-FlorTem2 3386	-0.033	0.112	-0.296	0.768	-0.333	0.266
ECO- ALT-FlorTem2 3638	-0.064	0.088	-0.731	0.468	-0.299	0.170
ECO- ALT-FlorTem2-3042	-0.093	0.088	-1.061	0.293	-0.328	0.141

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t	Límite inferior (99%)	Límite superior (99%)
ECO- ALT-Italiano 3042	-0.192	0.112	-1.710	0.093	-0.492	0.108
ECO- ALT-Italiano 3260	-0.202	0.101	-1.996	0.051	-0.471	0.068
ECO- ALT-Italiano 3638	-0.025	0.112	-0.219	0.827	-0.324	0.275
ECO- ALT-Italiano 3092	0.042	0.112	0.378	0.707	-0.257	0.342
ECO- ALT-Italiano 3260	-0.145	0.088	-1.643	0.106	-0.379	0.090
ECO- ALT-Italiano 3386	0.156	0.112	1.391	0.170	-0.144	0.456
ECO- ALT-Nigra 3260	-0.277	0.112	-2.468	0.017	-0.577	0.023
ECO- ALT-Nigra 3638	-0.039	0.112	-0.343	0.733	-0.338	0.261
ECO- ALT-Nigra 3042	-0.236	0.112	-2.103	0.040	-0.536	0.064
ECO- ALT-Nigra 3092	-0.153	0.112	-1.360	0.179	-0.453	0.147
ECO- ALT-Nigra 3386	-0.276	0.112	-2.459	0.017	-0.576	0.023
ECO- ALT-OrejaEle 3260	-0.256	0.112	-2.278	0.027	-0.556	0.044
ECO- ALT-OrejaEle 3638	0.015	0.112	0.135	0.893	-0.285	0.315
ECO- ALT-OrejaEle 3042	-0.070	0.112	-0.620	0.538	-0.369	0.230
ECO- ALT-OrejaEle 3092	-0.033	0.112	-0.296	0.768	-0.333	0.266
ECO- ALT-OrejaEle 3386	-0.190	0.088	-2.154	0.036	-0.424	0.045

Resumen de las comparaciones por pares para ECO- ALT (Tukey (HSD)):

Categoría	Medias	
	LS(TIMOL %)	Grupos
Italiano 3386	18.4 abc	A
Italiano 3092	15.7 abc	A B
OrejaEle 3638	15.1 abc	A B
OrejaEle3386	14.7 abc	A B C
Italiano 3638	14.1 abc	A B C
FlorTem2 3386	13.9 abc	A B C
OrejaEle 3092	13.9 abc	A B C
Nigra 3638	13.8 abc	A B C
Chino AN 3092	13.7 abc	A B C
FlorTem1 3386	13.1 abc	A B C
OrejaEle 3042	13.1 abc	A B C
FlorTem2 3638	12.1 abc	A B C
Chino 3638	11.6 abc	A B C
FlorTem1 3638	11.6 abc	A B C
FlorTem2 3638	11.4 abc	A B C
Nigra 3092	11.1 abc	A B C
FlorTem2-3042	10.9 abc	A B C
Italiano 3042	10.2 abc	A B C
Chino 3042	9.5 abc	A B C
Nigra 3042	9.2 abc	A B C

Chino 3092	9.1 abc	A	B	C
FlorTem2 3260	9.0 abc	A	B	C
Italiano 3260	8.9 abc	A	B	C
Italiano 3260	8.9 abc	A	B	C
OrejaEle 3260	8.7 abc	A	B	C
Medias				
Categoría	LS(TIMOL %)	Grupos		
FlorTem1 3260	8.3 abc	A	B	C
Nigra 3386	8.2 abc	A	B	C
Nigra 3260	8.2 abc	A	B	C
Chino 3260	7.9 abc	A	B	C
FlorTem1 3042	7.2 abc	A	B	C
OrejaEle 3386	7.1 abc	A	B	C
FlorTem1 3092	5.4 abc		B	C
FlorTem2 3042	5.3 abc		B	C
FlorTem2 3092	5.3 abc		B	C
Chino 3386	2.4 abc			C

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	34	22.094	0.650	4.975	< 0.0001
Error	55	7.183	0.131		
Total corregido	89	29.277			

6.3. Concentración de Carvacrol en el aceite esencial de orégano de los 6 ecotipos a 5 altitudes

XLSTAT 2017.4.46442 - ANOVA –

Intervalo de confianza (%): 99

Tolerancia: 0.0001

Estadísticos descriptivos (Datos cuantitativos):

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típica
CARVACROL%	90	0	90	0.014	2.260	0.798	0.574

Análisis de Varianza (carvacrol%)

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t	Límite inferior (99%)	Límite superior (99%)
ECO- ALT-Chino 3260	-0.378	0.104	-3.643	0.051	-0.655	-0.101
ECO- ALT-Chino 3638	-0.304	0.104	-2.931	0.055	-0.581	-0.027
ECO- ALT-Chino 3042	-0.277	0.104	-2.670	0.060	-0.554	0.000
ECO- ALT-Chino 3092	-0.161	0.081	-1.984	0.052	-0.378	0.056
ECO- ALT-Chino 3386	-0.365	0.104	-3.519	0.001	-0.642	-0.088
ECO- ALT-Chino AN 3092	-0.293	0.093	-3.139	0.053	-0.542	-0.044
ECO- ALT-FlorTem1 3260	-0.373	0.104	-3.596	0.061	-0.650	-0.096
ECO- ALT-FlorTem1 3638	-0.354	0.104	-3.414	0.071	-0.632	-0.077
ECO- ALT-FlorTem1 3042	-0.292	0.104	-2.810	0.077	-0.569	-0.015
ECO- ALT-FlorTem1 3092	-0.409	0.104	-3.935	0.070	-0.686	-0.132
ECO- ALT-FlorTem1 3386	-0.047	0.104	-0.451	0.654	-0.324	0.230
ECO- ALT-FlorTem2 3260	-0.364	0.104	-3.504	0.061	-0.641	-0.087

ECO- ALT-FlorTem2 3638	-0.275	0.093	-2.939	0.055	-0.524	-0.025
ECO- ALT-FlorTem2 3042	-0.165	0.093	-1.762	0.084	-0.414	0.085
ECO- ALT-FlorTem2 3092	-0.415	0.104	-3.996	0.056	-0.692	-0.138
ECO- ALT-FlorTem2 3386	-0.017	0.104	-0.167	0.868	-0.294	0.260
						0.147
ECO- ALT-FlorTem2 3638	-0.070	0.081	-0.866	0.390	-0.288	
Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t	Límite inferior (99%)	Límite superior (99%)
ECO- ALT-FlorTem2-3042	-0.051	0.081	-0.631	0.531	-0.268	0.166
ECO- ALT-Italiano 3042	-0.257	0.104	-2.480	0.016	-0.535	0.020
ECO- ALT-Italiano 3260	-0.303	0.093	-3.249	0.222	-0.553	-0.054
ECO- ALT-Italiano 3638	-0.115	0.104	-1.105	0.274	-0.392	0.162
ECO- ALT-Italiano 3092	0.034	0.104	0.332	0.741	-0.243	0.312
ECO- ALT-Italiano 3260	-0.214	0.081	-2.634	0.011	-0.431	0.003
ECO- ALT-Italiano 3386	0.163	0.104	1.571	0.002	-0.114	0.440
ECO- ALT-Nigra 3260	-0.206	0.104	-1.988	0.052	-0.483	0.071
ECO- ALT-Nigra 3638	-0.021	0.104	-0.207	0.837	-0.299	0.256
ECO- ALT-Nigra 3042	-0.266	0.104	-2.561	0.013	-0.543	0.011
ECO- ALT-Nigra 3092	-0.279	0.104	-2.686	0.050	-0.556	-0.002
ECO- ALT-Nigra 3386	-0.315	0.104	-3.034	0.054	-0.592	-0.038
ECO- ALT-OrejaEle 3260	-0.357	0.104	-3.441	0.061	-0.634	-0.080
ECO- ALT-OrejaEle 3638	0.058	0.104	0.557	0.580	-0.219	0.335
ECO- ALT-OrejaEle 3042	-0.226	0.104	-2.176	0.034	-0.503	0.051
ECO- ALT-OrejaEle 3092	-0.262	0.104	-2.528	0.014	-0.540	0.015
ECO- ALT-OrejaEle 3386	-0.161	0.081	-1.974	0.053	-0.378	0.056

Resumen de las comparaciones por pares para ECO- ALT (Tukey (HSD)):

Categoría	Medias LS(CARVACROL%)	Grupos	
Italiano 3386	2.043	A	
OrejaEle 3638	1.709	A	B
Italiano 3092	1.635	A	B
OrejaEle3386	1.525	A	B
FlorTem2 3386	1.470	A	B
Nigra 3638	1.457	A	B
FlorTem1 3386	1.376	A	B
FlorTem2-3042	1.246	A	B
Italiano 3638	1.160	A	B
FlorTem2 3638	1.142	A	B
FlorTem2 3042	0.888	A	B
Nigra 3260	0.869	A	B
OrejaEle 3042	0.807	A	B
Italiano 3042	0.707	A	B
OrejaEle 3092	0.691	A	B
Nigra 3042	0.680	A	B

OrejaEle 3386	0.651	A	B
Chino 3092	0.647	A	B
Chino 3042	0.644	A	B
Nigra 3092	0.639	A	B
FlorTem1 3042	0.598	A	B
Chino 3638	0.558	A	B
Nigra 3386	0.524	A	B

Medias			
Categoría	LS(CARVACROL%)	Grupos	Categoría
FlorTem2 3638	0.463	A	B
FlorTem1 3638	0.399	A	B
Chino AN 3092	0.391	A	B
OrejaEle 3260	0.390	A	B
FlorTem2 3260	0.369	A	B
Flortem2 3092	0.364	A	B
Italiano 3260	0.359	A	B
Italiano 3260	0.351	A	B
FlorTem1 3260	0.339	A	B
Chino 3260	0.323	A	B
FlorTem1 3092	0.227	A	B
Chino 3386	0.207		B

ANEXOS 7: Parametros fisicoquímicos

1. ANALISIS DE INDICE DE ACIDEZ (mg de KOH necesarios para neutralizar 1g de muestra)

<i>Fecha</i>	<i>Producto</i>	<i>gr. muestra</i>	<i>gasto</i>	<i>Normalidad</i>	<i>%AGL</i>	<i>Promedio %AGL</i>	<i>Desvi Estan</i>
06/11/2014	Aceite esencial de oregano	2.3146	2.05	0.067480357	1.69	1.68	0.0
		2.697	2.40	0.067480357	1.69		
		2.4071	2.10	0.067480357	1.66		

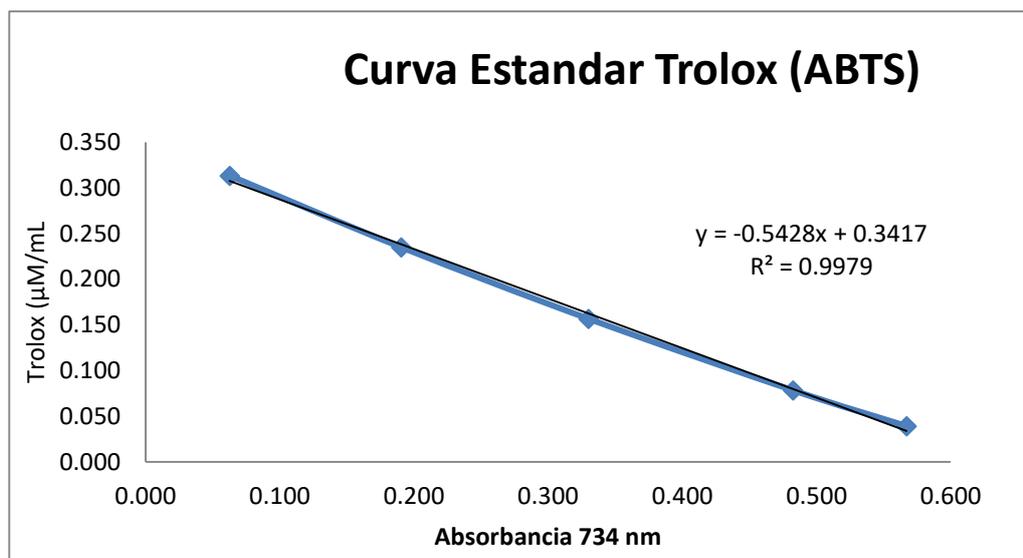
Estandarización del NaOH

<i>Fecha</i>	<i>gr.</i>	<i>gasto</i>	<i>NC</i>	<i>Promedio</i>
18/11/2014	0.2162	15.6	0.06786296	0.06748036
	0.2028	14.8	0.06709775	

2. ANALISIS DE INDICE DE REFRACCIÓN

<i>Producto</i>	<i>Lectura</i>
Aceite esencial de oregano	1.475
	1.475

3. CURVA ESTANDAR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS



Cuadro de concentraciones y absorvancias

Concentracion Trolox (μM/mL)	Absorbancia
0.039	0.567
0.078	0.482
0.157	0.330
0.235	0.190
0.313	0.063

Cuadro de los promedios para la concentracion de Trolox (μM/ml)

Muestra	Absorbancia	g muestra	Volumen a diluir (ml)	CONC (μM/mL)	Promedio (μM/mL) o (mM/kg)
Aceite esencial de oregano	0.1	0.01	2	57.5	55.1
	0.115	0.01	2	55.9	
	0.133	0.01	2	53.9	
	0.139	0.01	2	53.3	

