



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EFECTO ANTIOXIDANTE DE UN EXTRACTO DE
ROMERO (*Rosmarinus officinalis L.*) SOBRE ACEITE
COMESTIBLE PREMEDITADAMENTE OXIDADO”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ARACELY JANNETH NARANJO VITERI

DIRECTOR: Dr. GALO ALBERTO INSUASTI CASTELO MSc.

Riobamba - Ecuador

2021

©2021, Aracely Janneth Naranjo Viteri

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Aracely Janneth Naranjo Viteri, declaro que el presente trabajo de integración curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de integración curricular: El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 05 de julio de 2021

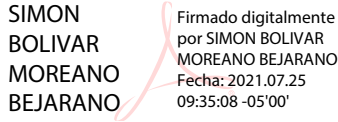
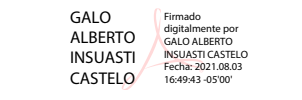



Aracely Janneth Naranjo Viteri

060395637-6

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: el Trabajo de Integración Curricular: Tipo Trabajo Experimental. **“EFECTO ANTIOXIDANTE DE UN EXTRACTO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis L.*) SOBRE ACEITE COMESTIBLE PREMEDITADAMENTE OXIDADO”**, realizado por la señorita **ARACELY JANNETH NARANJO VITERI**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de integración curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Prof. Simón Bolívar Moreano Bejarano MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 SIMON BOLIVAR MOREANO BEJARANO Firmado digitalmente por SIMON BOLIVAR MOREANO BEJARANO Fecha: 2021.07.25 09:35:08 -05'00'	2021/07/05
Dr. Galo Alberto Insuasti Castelo MSc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 GALO ALBERTO INSUASTI CASTELO Firmado digitalmente por GALO ALBERTO INSUASTI CASTELO Fecha: 2021.08.03 16:49:43 -05'00'	2021/07/05
Ing. Violeta Maricela Dalgo Flores MSc. MIEMBRO DE TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: VIOLETA MARICELA DALGO FLORES	2021/07/05

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios él ha sido mi paz en medio de cualquier tormenta, a pesar de las pruebas cada día siento su gracia y amor hacia mí, sé que si no hubiese conocido del evangelio no sé dónde estaría hoy, todo lo puedo en él que me fortalece y guía mis pasos, aunque me encuentre en valle de sombra no temeré a nada porque Dios está conmigo. A mis padres Manuel e Hilda que son mis mejores amigos siempre brindándome su apoyo, amor, paciencia, consejos y lo más importante guiándome en los caminos del Señor, sin su presencia en mi vida no sería ni la mitad de la persona que soy. A mis hermanos Wilson y Joana que me han apoyado de todas las formas inimaginables en el largo camino de la vida en momentos buenos y malos, dándome siempre su cariño. A mis sobrinos Luciana, Abigail y Enrique por regalarme su cariño e inocencia. A mis cuñados Marcela y Nelson por sus consejos, bromas e incentivándome a ser una mejor persona con su ejemplo de superación. A Roberto mi compañero de vida que impulsó mis sueños y nunca permitió que me rinda, siempre ha creído que todo lo que me proponga puedo conseguirlo, me ha dado paciencia, amor, cuidado y protección que nadie lograría darme, ninguna medida de tiempo podrá ser suficiente para compartirlo junto a ti, por tal motivo empezemos con siempre. A mis mascotas Spanky†, Joe, Coffe, Haba, Chilis y Chispita, que están junto a mi llenándome de alegría y amor. *“Yo seré tu paz a un en medio de tu tormenta y te daré la calma”*
Salmos 37:39

Arita Naranjo Viteri

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre darme su amor, regalarme un día más para adorarle y permitirme corregir mis errores que me han cambiado la vida, motivos que me hicieron volver a él con más fe y amor. A mis padres que siempre me han brindado su amor, consejos y siendo mi motor para continuar a pesar de todos los obstáculos personales, siempre le agradezco a Dios por tenerlos junto a mí. A mis hermanos, cuñados y sobrinos que siempre me han dado su apoyo y cariño sincero. A Roberto, que ha puesto en mi amor, dándome el valor agregado que me faltaba para luchar por mis sueños cuando me pierdo, siendo mi inspiración para continuar. A mi tutor, Dr. Galito Insuasti por su ayuda para el desarrollo de este trabajo, su paciencia y apoyo han sido fundamental, siempre le estaré eternamente agradecida por compartirme sus conocimientos, consejos y experiencias como tutor, docente y amigo. A la Ing. Violeta Dalgo y BQF. John Quispillo por su participación en el desarrollo de este trabajo. A la ESPOCH, pero sobre todo a mis docentes y mentores que me han compartido su conocimiento y amistad en especial a: Dra. Ana Albuja.; BQF. Valeria Rodríguez; Ing. Paola Arguello; Dra. Irene Gavilanes; Lic. Fausto Tapia; Simón Moreano MSc.; Lic. Yolanda Rodríguez; Ing. Pablo Bustos; Ing. Guillermo Olalla; Ing. Diego Pilamonta y Dr. Sergio Flores. A la empresa PARMALAT ECUADOR S.A y cada uno de sus integrantes, por acogerme como parte de esa gran familia y ayudarme a crecer no solo como profesional si no como persona. A mis familiares en especial a la familia Montoya Viteri y Viteri Molina por brindarme su cariño. A mi pastor Víctor Zambrano y su esposa que han sido como unos segundos padres siempre corriéndome y encaminándome en base a los preceptos de Cristo. A Lisbeth Quinapanta mi mejor amiga por su amistad incondicional, sincera, y acompañarme en cada uno de mis sueños, una verdadera amiga como lo es Lis es una hermana en todo tiempo. A todos mis amigos que me han apoyado y brindado su amistad en especial a: Melani Luna †, Erika Arias, Libia Quishpe, Joselyn Ochoa, María José Guevara, Mery Sisa, Danilo Jaramillo, Ana Miranda, Víctor León, Karina Morales, Marcela Úrgiles y Joselyn Sánchez.

Arita Naranjo Viteri

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN.....	18

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO.....	21
1.1.	Romero.....	21
1.1.1.	<i>Taxonomía</i>	21
1.1.2.	<i>Historia</i>	22
1.1.3.	<i>Descripción botánica</i>	22
1.1.4.	<i>Distribución geográfica</i>	22
1.1.5.	<i>Producción de romero en Ecuador</i>	23
1.1.6.	<i>Usos</i>	23
1.1.7.	<i>Composición Química</i>	23
1.1.8.	<i>Compuestos Antioxidantes</i>	24
1.1.8.1.	<i>Ácido Carnósico</i>	24
1.1.8.2.	<i>Carnosol</i>	25
1.2.	Aceites comestibles.....	27
1.2.1.	<i>Historia</i>	27
1.2.2.	<i>Girasol</i>	28
1.2.2.1.	<i>Taxonomía</i>	29
1.2.2.2.	<i>Historia</i>	29
1.2.2.3.	<i>Descripción botánica</i>	29
1.2.2.4.	<i>Distribución geográfica</i>	30
1.2.3.	<i>Aceite de girasol</i>	30
1.2.3.1.	<i>Composición química del aceite de girasol</i>	30
1.2.3.2.	<i>Producción de aceite de girasol en Ecuador</i>	31
1.2.3.3.	<i>Extracción del aceite refinado de girasol</i>	31
1.2.3.4.	<i>Especificaciones del aceite de girasol</i>	36

1.2.4.	<i>Oxidación de aceites comestibles</i>	36
1.2.4.1.	<i>Estrés oxidativo</i>	36
1.2.4.2.	<i>Radicales libres</i>	37
1.3.	Antioxidantes	38
1.3.1.	<i>Características de los antioxidantes</i>	38
1.3.2.	<i>Importancia</i>	38
1.3.3.	<i>Mecanismo</i>	39
1.3.4.	<i>Antioxidantes sintéticos</i>	40
1.3.5.	<i>Antioxidantes naturales</i>	41
1.3.6.	<i>Antioxidantes y su relación con la salud</i>	42
1.4.	Puntos críticos de oxidación durante la extracción del aceite refinado de girasol	43
1.5.	Actividad antioxidante del romero sobre aceites comestibles	45
1.6.	Métodos de extracción	45
1.6.1.	<i>Maceración</i>	45
1.7.	Métodos para determinar el grado de oxidación	45
1.7.1.	<i>Índice de peróxido</i>	45
1.7.1.1.	<i>NTE INEN 277:1978</i>	46
1.7.1.2.	<i>NTE INEN-ISO 3960:2013</i>	46

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	47
2.1.	Lugar de la Investigación	47
2.2.	Tipo y diseño de investigación	47
2.3.	Población de estudio	47
2.4.	Tamaño de muestra	47
2.5.	Selección de la muestra	48
2.5.1.	<i>Hojas de romero</i>	48
2.5.1.1.	<i>Criterios de inclusión</i>	48
2.5.1.2.	<i>Criterios de exclusión</i>	48
2.5.2.	<i>Aceite</i>	48
2.5.2.1.	<i>Criterios de inclusión</i>	48
2.5.2.2.	<i>Criterios de exclusión</i>	49
2.6.	Hipótesis general	49
2.6.1.	<i>Hipótesis nula</i>	49

2.6.2.	<i>Hipótesis alternativa</i>	49
2.7.	Identificación general de variables	49
2.8.	Factores experimentales de estudio	50
2.9.	Parte Experimental	51
2.6.1.	<i>Recolección, selección y preparación de las hojas de romero</i>	51
2.6.2.	<i>Diseño del extracto etanólico (extracto etanólico diseñado de romero)</i>	53
2.6.2.1.	<i>Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración</i>	53
2.6.2.2.	<i>Extracto etanólico diseñado de romero, versión alta concentración</i>	53
2.6.3.	<i>Tratamiento común para la oxidación premeditado de aceite de girasol con el extracto etanólico diseñado de romero de versiones baja y alta concentración</i> ...53	
2.6.3.1.	<i>Tratamiento para la oxidación premeditada del aceite de girasol y valoración del efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero de baja y alta concentración</i>	55
2.6.3.2.	<i>Tratamiento para la oxidación premeditada del aceite de girasol y valoración del efecto antioxidante sin el extracto etanólico</i>	56
2.6.4.	<i>Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido (Norma NTE INEN 277:1978)</i>	56
2.6.4.1.	<i>Determinación del índice de peróxido (Norma NTE INEN 277:1978)</i>	57
2.6.5.	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	59

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	61
3.6.	Recolección, selección y preparación de hojas pulverizadas de romero	61
3.7.	Diseño del extracto etanólico (extracto etanólico diseñado de romero)	61
3.7.1.	<i>Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración</i>	61
3.7.2.	<i>Extracto etanólico diseñado de romero, versión alta concentración</i>	65
3.8.	Tratamientos para detección del efecto antioxidante del extracto etanólico de hojas de romero sobre aceite comestible (versión baja y alta concentración) .68	
3.9.	Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido (Norma NTE INEN 277:1978)	69
3.9.1.	<i>Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración</i>	69
3.9.1.1.	<i>Prueba de hipótesis</i>	74
3.9.2.	<i>Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración</i>	76

3.9.2.1.	<i>Prueba de hipótesis.....</i>	81
3.9.3.	<i>Efecto antioxidante comparativo (PV) entre el extracto etanólico diseñado de romero de alta y baja concentración</i>	83
3.9.4.	<i>Análisis organoléptico del aceite comestible comercial de girasol y de su tratamiento antioxidante con extracto de romero de baja y alta concentración ..</i>	85
CONCLUSIONES		87
RECOMENDACIONES		88
GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Perfil de ácidos grasos en el aceite comestible de girasol.	30
Tabla 2-1:	Especificaciones del aceite de girasol según NTE INEN 26:2012.	36
Tabla 1-2:	Factores de estudio.	50
Tabla 2-2:	Tratamientos de oxidación.	50
Tabla 3-2:	Factores de estudio.	54
Tabla 4-2:	Tratamientos de oxidación.	54
Tabla 1-3:	Tratamientos de detección del efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero de baja y alta concentración sobre el aceite de girasol.	68
Tabla 2-3:	Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración.	69
Tabla 3-3:	Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible sin protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración.	70
Tabla 4-3:	Comparación (PV) del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Bc) del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado.	72
Tabla 5-3:	Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración.	74
Tabla 6-3:	Análisis de varianza de un factor ANOVA.	74
Tabla 7-3:	Comprobación de la hipótesis.	75
Tabla 8-3:	Prueba de Tukey.	75
Tabla 9-3:	Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración.	76
Tabla 10-3:	Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible sin protección del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración.	77
Tabla 11-3:	Comparación (PV) del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Ac) del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado.	79
Tabla 12-3:	Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración.	81
Tabla 13-3:	Análisis de varianza de un factor ANOVA.	81
Tabla 14-3:	Comprobación de la hipótesis.	82
Tabla 15-3:	Prueba de Tukey.	82

Tabla 16-3: Índices de peróxido del tratamiento oxidativo del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja y alta concentración.....	83
Tabla 17-3: Características organolépticas del aceite de girasol premeditadamente oxidado y de los tratamientos antioxidantes con el extracto de romero de Bc y Ac concentración.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Planta de romero.....	21
Figura 4-1:	Girasol.....	28
Figura 6-1:	Extracción del aceite refinado de girasol	35
Figura 7-1:	Mecanismo de los antioxidantes sobre aceites comestibles	40
Figura 8-1:	Puntos críticos de oxidación durante la extracción del aceite refinado de girasol..	44
Figura 9-1:	Formación de hidroperóxidos en aceites	45
Figura 1-2:	Recolección, selección y preparación de pulverizado de hojas de romero	52
Figura 2-2:	Determinación del efecto antioxidante del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado	55
Figura 3-2:	Determinación de la prueba del índice de peróxido.....	57
Figura 1-3:	Esquema general de elaboración del extracto etanólico diseñado de romero de (Bc).....	64
Figura 1-3:	Esquema general de elaboración del extracto etanólico diseñado de romero de (Ac).....	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-3:** Efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Bc) sobre aceite girasol premeditadamente oxidado.71
- Gráfico 2-3:** Comparación del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Bc) del aceite de girasol premeditadamente oxidado.73
- Gráfico 3-3:** Efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Ac) sobre aceite girasol premeditadamente oxidado.78
- Gráfico 4-3:** Comparación del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Ac) del aceite de girasol premeditadamente oxidado.80
- Gráfico 5-3:** Comparación del efecto antioxidante entre el extracto etanólico diseñado de romero (Bc) y (Ac) sobre aceite girasol premeditadamente oxidado.83

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Acondicionamiento del romero
- ANEXO B:** Preparación del extracto etanólico diseñado de romero
- ANEXO C:** Solubilidad y homogeneidad del extracto etanólico con el aceite
- ANEXO D:** Proceso oxidativo premeditado con factores ambientales
- ANEXO E:** Generación de yodo por oxidación de los peróxidos al KI (extracto Bc)
- ANEXO F:** Generación de yodo por oxidación de los peróxidos al KI (extracto Ac)
- ANEXO G:** Cambios organolépticos (extracto Bc)
- ANEXO H:** Cambios organolépticos (extracto Ac)
- ANEXO I:** Análisis por medio del índice de peróxido
- ANEXO J:** Análisis estadístico mediante el programa Minitab

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

a₀	Concentración de extracto etanólico diseñado de romero
b	Tiempo de exposición al proceso de oxidación
Ac	Alta concentración
Bc	Baja concentración
CHCl₃	Cloroformo
CH₃COOH	Ácido acético
c₀	Aceite comestible no oxidado que actuará como testigo
g	Gramos
I₂	Yodo molecular
Kg	Kilogramos
KI	Yoduro de potasio
m	Masa
meq O₂	Miliequivalentes de oxígeno
meq O₂/Kg	Miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra
min	Minutos
mL	Mililitros
N	Normalidad
NaI	Yoduro de sodio
Na₂S₄O	Tetrasulfato de sodio
Na₂S₂O₃	Tiosulfato de sodio
NTE INEN	Norma técnica ecuatoriana - Instituto ecuatoriano de normalización
PV	Índice de peróxido
R·	Radical libre
RPM	Revoluciones por minuto
T	Tiempo de exposición para el deterioro del aceite comestible
TAG	Triacilgliceroles
V	Volumen

RESUMEN

El presente trabajo buscó aplicativamente valorar el efecto antioxidante de un extracto etanólico de hojas de romero de la especie *Rosmarinus officinalis L.*, para lo cual se aplicó el extracto previamente diseñado y elaborado a un aceite comestible de girasol que tiene una oxidación premeditada en proporción (1:10) respectivamente, a los 0, 4, 9 y 15 días; oxidación que fue monitoreada utilizando la prueba del índice de peróxido (PV) de manera comparativa entre el aceite con extracto de romero y el aceite sin extracto. El extracto etanólico de romero se lo obtuvo por maceración progresiva por cinco ocasiones de un total de 600gr de hojas de romero en 500mL de etanol (96%) sin adición de volúmenes extras y finalmente concentrado hasta aproximadamente la tercera parte del volumen obtenido de las maceraciones. El nivel de oxidación observado comparativamente entre el aceite sin extracto de romero y el aceite con extracto de romero mostró una disminución en el porcentaje de oxidación: (día 0: 0,00%, se mantiene en 0,00%), (día 4: de 29,03% disminuye a 0,00%), (día 9: de 41,93% disminuye a 9,68%) y (día 15: de 100,00% disminuye a 22,57%), resultados que han sido respaldados estadísticamente mediante ANOVA (Minitab - Excel 2019). Según la normativa NTE INEN 26, el aceite oxidado premeditadamente y tratado con el extracto de romero por 15 días mostró un PV que se encuentra en el rango de cumplimiento de la especificación de la norma (0,00 a 10,00meq O₂/Kg de aceite), indicativo que para un aceite sin oxidarlo premeditadamente obtendría un efecto protector aceptable a mayor tiempo. La actividad antioxidante del extracto etanólico de romero determinada en el presente estudio, aplicativamente puede aprovecharse especialmente en aceites crudos previos a su refinación.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS>, <ANTIOXIDANTE NATURAL>, <CONSERVACIÓN DE ACEITES>, <EXTRACCIÓN DE ACEITES>, <OXIDACIÓN DE ACEITES>, < ROMERO (*Rosmarinus officinalis L.*)>, <OXIDACIÓN PREMEDITADA>.



1413-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

The present study sought to assess the antioxidant effect of an ethanolic extract of rosemary leaves from the species of *Rosmarinus officinalis L.*, for which the extract was apply previously designed and elaborated from edible sunflower oil that has premeditated oxidation in the proportion of (1:10) respectively, at 0, 4, 9 and 15 days; the oxidation was monitored using the peroxide value test (PV) comparatively between the oil that contains rosemary extract and the oil without extract. The ethanolic extract of rosemary was obtained by a progressive maceration on five occasions of a total of 600gr of rosemary leaves in 500mL of ethanol (96%) without adding any extra volumes and finally concentrated until only one-third of its volume was obtained from the macerations. The level of oxidation observed between the oil without rosemary extract, and the oil with rosemary extract showed a decrease in the percentage of oxidation: (day 0: 0.00%, it remains at 0.00%), (day 4: from 29.03% decreases to 0.00%), (day 9: from 41.93% decreases to 9.68%) and (day 15: from 100.00% decreases to 22.57%), the results have been statistically supported using ANOVA (Minitab - Excel 2019). According to the NTE INEN 26 regulation, the oil deliberately oxidized and treated with the rosemary extract for 15 days showed a PV inside the compliance range of the standard specification (0.00 to 10.00meq O₂/ Kg of oil), indicative that for oil without previous oxidation it would obtain an acceptable protection effect for longer periods. The antioxidant activity of ethanolic extract of rosemary determined in the study showed that it can be applied especially in raw oils before refining these.

Keywords: <FOOD BIOCHEMISTRY>, <NATURAL ANTIOXIDANT>, <PRESERVATION OF OILS>, <EXTRACTION OF OILS>, <OXIDATION OF OILS>, <ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis L.*)>, <PREMEDITED OXIDATION>.

INTRODUCCIÓN

Los aceites comestibles han incrementado su uso en los últimos años, por tal motivo las empresas que se dedican a su fabricación han buscado alternativas para la conservación de estos, por medio del uso de antioxidantes que evitan la oxidación de los aceites.

Los aceites comestibles proveen al alimento un sabor agradable y facilitan su fritura, estos pueden provenir de diversas fuentes vegetales como es la palma, semillas de girasol, oliva, entre otros. Al igual pueden sufrir un deterioro oxidativo en cualquiera de las fases de la extracción y purificación, el uso de antioxidantes permitirá inhibir o retrasar la formación de radicales libres debido a que estos son altamente reactivos.

En la actualidad varios alimentos son elaborados a base de aceites comestibles, por medio de la fritura, que es una operación unitaria con la que se elaboran estos alimentos, los cuales tienen la particularidad de sufrir una oxidación y de esta manera generar radicales libres.

Al momento de estar en contacto los aceites con el aire, humedad o temperaturas elevadas pueden sufrir un enranciamiento oxidativo, polimerización y de esta forma crean aldehídos, cetonas o compuestos de bajo peso molecular, para esto se ha recurrido al uso de antioxidantes sintéticos como son el galato de propilo, hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT); estos son encontrados fácilmente y bastante efectivos al momento de su uso. Como antioxidantes naturales se hace uso del ácido ascórbico (vitamina C) o tocoferoles (vitamina E).

El romero es una planta aromática de fácil cultivo la cual es usada con diversos fines terapéuticos como la astenia, circulación sanguínea, entre otros. La hoja de romero posee compuestos polifenoles como el ácido carnósico y el carnosol los cuales son los que van a dar la actividad antioxidante que es característica en esta planta, por lo tanto, se desea aprovechar en este estudio para los aceites comestibles.

Los aceites presentan una gran demanda a nivel mundial y varios alimentos están elaborados a base de estos, por lo tanto, no se descarta la presencia de radicales libres, afectando la salud del ser humano y provocando enfermedades neurodegenerativas como cáncer, arteriosclerosis y cardiomiopatías (Avello y Suwalsky., 2006, pp. 161-162).

El romero otorga una capacidad antioxidante debido a la composición química que posee, teniendo como antioxidantes al ácido carnósico y el carnosol que son los que van a dar esta característica; pero a más de esto posee propiedades antiespasmódicas, hepatoprotectores, diurético, antiinflamatorio, entre otras (Reubaudiana, 2016, párr.1-2).

Para identificar la oxidación del aceite se puede recurrir a la prueba del índice de peróxido que permite determinar en el aceite la oxidación de los iones yoduro del yoduro de potasio y esto es valorado volumétricamente con tiosulfato de sodio usando como indicador una solución saturada de almidón.

Se han buscado alternativas para la conservación de aceites comestibles con la finalidad de reducir el uso de antioxidantes sintéticos, *de esta forma conservar los aceites comestibles antes de que lleguen al refinamiento* y sobre todo haciendo uso de antioxidantes de origen natural, sin afectar la finalidad que tienen los aceites comestibles antes y después de su refinamiento.

Objetivos

General

- Valorar el efecto antioxidante de un extracto de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre aceite comestible premeditadamente oxidado.

Específicos

- Recolectar, seleccionar y preparar hojas de romero.
- Diseñar un proceso ordenado de obtención de un extracto etanólico de hojas de romero y evaluar la solubilidad en aceite comestible de girasol.
- Realizar tratamientos para detectar el efecto antioxidante del extracto etanólico de hojas de romero sobre aceite comestible oxidado en tres intervalos de tiempo.
- Evaluar el efecto antioxidante sobre el aceite comestible, analizando el estado de oxidación de tratamientos oxidativos mediante la prueba del índice de peróxido.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Romero

Las plantas medicinales con el pasar de los años han tomado una gran importancia debido a sus características y componentes químicos, estos son ampliamente aprovechados en la elaboración de productos de uso y consumo humano, el romero es una planta medicinal que tiene varios usos, pero se sigue investigando en obtener nuevos beneficios.

1.1.1. Taxonomía

REINO: Plantae.

SUBREINO: Tracheobionta.

DIVISIÓN: Magnoliophyta.

CLASE: Magnoliopsida.

SUBCLASE: Asteridae.

ORDEN: Lamiales.

FAMILIA: Lamiaceae.

SUBFAMILIA: Nepetoideae.

GÉNERO: *Rosmarinus*.

ESPECIE: *Rosmarinus officinalis*. L.

NOMBRE COMÚN: Romero / Hierba de la memoria / Hierba de las coronas (Inka Plus, 2015, p.1).



Figura 1-1. Planta de romero.

Fuente: (Naranjo, 2020).

1.1.2. Historia

El romero proviene del griego “*rhops* y *myrinos*” que se traduce en “arbusto marino”, siendo una planta de fines medicinales y terapéuticos, usado desde las épocas antiguas en Egipto en forma de ramos para ser colocados en las tumbas y dar un olor agradable (Rodenas y Rodríguez, 2018, pp.34-36).

Los griegos y romanos consideraban que el romero es una planta sagrada y simbolizaba el amor y la muerte por su uso en matrimonios y funerales, los griegos también tenían la costumbre de quemar unas ramas en los templos (Lax, 2014, pp.10-11).

En la época de la edad media esta planta era usada con fines alimentarios y medicinales, aplicado para la fumigación de plagas y contra los malos espíritus (Lax, 2014, pp.10-12).

En 1330 Arnau de Villanova realizó extracciones de aceites esenciales los cuales serían usados en la industria de la perfumería y como un remedio paliativo, en el siglo XVI la reina Isabel de Hungría usaba el aceite de romero para tratar sus problemas de reumatismo (Rodenas y Rodríguez, 2018, pp.34-38).

1.1.3. Descripción botánica

El romero posee un tallo leñoso, ramificado, sus hojas son alargadas y estrechas con una medida de 3cm x 3mm, de característica rígida como agujas, con bordes enrollados. En la época de otoño es común ver la aparición de flores, suelen estas flores desarrollarse dos veces cada año (Inka Plus, 2015, p.1).

Las flores miden 5mm de largo, son de color violeta pálido, blanco o rosadas con un cáliz bilabiado de color rojizo o verde, su androceo está conformado por dos estambres con filamentos bastante largos y el gineceo es bicarpelar (Rodenas y Rodríguez, 2018, pp.35-36).

1.1.4. Distribución geográfica

El romero se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, sobre todo en la región del Mediterráneo, en suelos áridos y calizos, también se encuentra distribuido al sur de Europa, norte de África, Asia y Sudamérica (Rodenas y Rodríguez, 2018, pp.35-37).

Además se encuentra en los países de España, Perú, Ecuador tanto en la costa, sierra y oriente; sobreviviendo la planta a climas áridos y con poca agua, así como climas húmedos y el sol no es un limitante para su supervivencia (Rodenas y Rodríguez, 2018, pp.35-37).

1.1.5. Producción de romero en Ecuador

El romero es una planta que crece en ambientes cálidos, arenosos y permeables, además de adaptarse perfectamente a estos ambientes, forma parte de los matorrales en sitios secos y soleados, en la actualidad puede ser cultivada en varias partes del mundo (Estrada, 2010, pp.6-8).

En el Ecuador por lo general se desarrolla en ambientes áridos y cálidos, inclusive pueden ser cultivadas en la comodidad del hogar, cabe recalcar que en el Ecuador es muy poco potencializado su cultivo, siendo que tiene propiedades muy relevantes con actividades alimentarias y farmacológicas (Estrada, 2010, pp.6-8).

1.1.6. Usos

El romero se puede aplicar por vía tópica en forma de aceite esencial otorgando una actividad analgésica, permite aliviar los reumatismos tanto articulares como musculares, es usado en forma de infusión o decocción actuando como un estimulante (Reubaudiana, 2016, párr.1).

Es usado también como tónico general para disminuir la irrigación periférica e hipotensión, suele ser usado para problemas de estrés y depresión, ya que actúa sobre el sistema nervioso. Además se puede usar el agua decocción como un antiparasitario (Reubaudiana, 2016, párr.1).

El romero puede ser utilizado como un conservante y antioxidante natural en la industria alimentaria, debido a que contiene antioxidantes como el carnosol y diterpenos. Puede ser usada como condimento en preparaciones culinarias (Reubaudiana, 2016, párr.1).

1.1.7. Composición Química

- **Ácidos fenólicos:** Cafeico, labiático, neoclorogénico, colina, taninos, lupeol.
- **Ácidos triterpénicos:** Ácido ursólico.
- **Alcaloide:** Rosmaricina (bajas proporciones).
- **Alcoholes triterpénicos:** α y β -amirina, betulósido.
- **Diterpenos:** Carnosol, rosamadial, rosmanol.
- **Flavonoides:** Diosmetina, diosmina, apigenina, luteolina, cirsimarina, nepritina.
- **Terpenoides:** Picrosalvina o carnosol, ácido carnósico, rosmaridienol, ácido oleánico, ácido aleanólico, ácido ursólico, α -amirenoma, β -amirenoma (Estrada, 2010, p.8).

1.1.8. Compuestos Antioxidantes

Las propiedades antioxidantes del romero fueron descubiertas en 1955, por medio de diferentes extractos, abriendo campos para determinar nuevas técnicas que se han usado para diversas áreas como es la alimentaria, farmacia o cosmética, todo relacionándose a enfermedades que son la causa del estrés oxidativo (Illera, 2012, pp.15-18).

1.1.8.1. Ácido Carnósico

El principal componente que le confiere al romero la actividad antioxidante es el ácido carnósico, cuya estructura química fue determinada en 1982 por Linde en Salvia (Illera, 2012, pp.15-18).

Según los estudios se han demostrado que el ácido carnósico se encuentra presente en el romero para evitar que los cloroplastos sufran un estrés oxidativo, cuando se produce una sequía la fotooxidación puede eliminar especies que son reactivas y contienen oxígeno dando paso a la presencia de alcoholes diterpénicos como es isorosmanol y productos de oxidación que se encuentran metilados, cuando mayor son las metilaciones aumenta la lipofilicidad (Birtic et al., 2015, p.13).

A. Estructura Química

Es un compuesto diterpeno que en su estructura posee un grupo fenólico; su fórmula es $C_{20}H_{28}O_4$, como se observa en la Figura 2-1 este contiene un grupo fenólico que es por lo general un polifenol y el ácido carnósico que no es distribuido de manera uniforme en las hojas, además de encontrarse en la tricoma del romero en una proporción considerable (Soliz, 2014, pp.15).

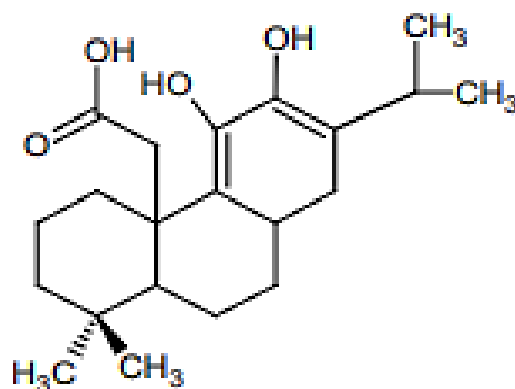


Figura 2-1. Ácido carnósico.

Fuente: (Illera, 2012, p.16).

B. Características Físico – Químicas

Las características físico-químicas que posee el ácido carnósico constituyen un peso molecular de 332,400g/mol, masa molecular 332,199 g/mol y como carga formal del ácido carnósico presenta un valor de 0 (Soliz, 2014, pp.15-17).

C. Propiedades

El ácido carnósico posee propiedades antiinflamatorias pero sobre todo antioxidantes las cuales son aprovechadas en la alimentación, cosmética y farmacia; durante años se han realizado estudios de los extractos de romero para determinar las aplicaciones (Soliz, 2014, pp.15-17).

Otra de sus propiedades son antimicrobianas, demostrando que el romero tiene una mejor actividad antimicrobiana cuando el pH disminuye, actuando sobre bacterias Gram positivas como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* o bacterias Gram negativas como *Escherinchia*, *Salmonella* o *Campylobacter* (Birtić et al., 2015, pp.14).

Presentando un mejor espectro sobre bacterias Gram positivas en relación con bacterias Gram negativas, demostrando que medicamentos como la tetraciclina, eritromicina o el bromuro de etidio al adicionar 10g/mL de ácido carnósico mejoró su actividad 8 veces más contra *Staphylococcus aureus*, mientras que al adicionar 8g/mL de ácido carnósico mejoró su actividad 16 veces más contra *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* (Birtić et al., 2015, pp.14).

1.1.8.2. Carnosol

El carnosol es otro compuesto que le confiere la actividad antioxidante al romero el cual fue aislado del romero por Brieskorn y colaboradores en 1966, muchos investigadores mencionan que el carnosol es el compuesto que mayoritariamente conforma parte de los extractos de romero (Illera, 2012, pp.15-17).

El carnosol se acumulan sobre los tejidos verdes fotosintéticos como son las hojas y los pétalos de las flores, principalmente localizado en los cloroplastos, tanto el ácido carnósico como el carnosol actúa sobre los radicales libres que se producen en los lípidos (Loussouarn et al., 2017, pp.2-8).

A. Estructura Química

El carnosol deriva del ácido carnósico, es un diterpeno fenólico como se observa en la Figura 3-1 el cual se encuentra en el romero, el 90% de la actividad antioxidante de un extracto de romero se le atribuye al ácido carnósico y el carnosol; el ácido carnósico se convierte a carnosol por la reacción de oxidación (Kim et al., 2006, p.1729).

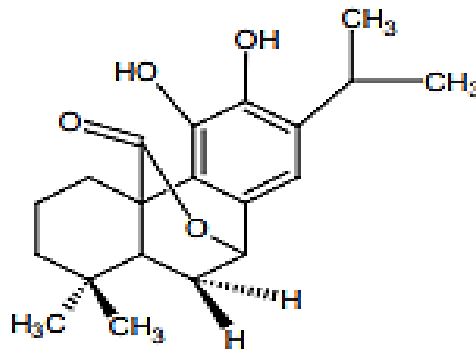


Figura 3-1. Carnosol.

Fuente: (Illera, 2012, p.16).

B. Características Físico – Químicas

Las características físico-químicas que posee el carnosol constituyen el peso molecular con un valor de 330,400g/mol, masa molecular 330,183 g/mol y como carga formal del carnosol presenta un valor de 0 (Kim et al., 2006, p.1729).

C. Propiedades

El carnosol tiene diversas propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias, neuroprotectores y sobre todo antioxidantes las cuales puede reducir el riesgo de enfermedades neurodegenerativas (Kim et al., 2006, p.1729).

Además de ser aprovechado en esta investigación para la elaboración de un nuevo antioxidante en aceites comestibles, la cual conjuntamente con el ácido carnósico se desea evitar la formación de radicales libres y compuestos de bajo peso molecular, ya que son factores que alteran el organismo del hombre (Kim et al., 2006, p.1729).

1.2. Aceites comestibles

El aceite proviene del griego “*elaca*” que significa olivo, los lípidos son macronutrientes de gran estudio por varias décadas, toda materia grasa es de importancia en la nutrición siendo importante los lípidos al igual que otros macronutrientes como las proteínas y carbohidratos (Valenzuela y Morgado, 2005, p.3).

Los aceites se encuentran presentes en varios productos que se utilizan en la vida diaria como productos de consumo y limpieza, con finalidades de bastante importancia para el consumidor (Valenzuela y Morgado, 2005, pp.3-5).

A nivel nutricional los aceites y grasas son una gran fuente de energía, aportando con 9kcal/g, las grasas (origen animal) están compuestas por ácidos grasos saturados, los cuales no son muy recomendados por la salud del consumidor, mientras que los aceites (origen vegetal) están compuestos por ácidos grasos insaturados que son los responsables de dar esa característica líquida al aceite a temperaturas ambientales (Paucar et al., 2015, pp.280).

Los aceites comestibles son creados a partir de semillas o frutos, los cuales son aptos para la alimentación, presentando un aspecto límpido, olor y sabor agradable, pueden contener aditivos para su conservación (Espinoza y Zapata, 2010, pp.8-10).

Son muy importantes los aceites comestibles para el funcionamiento del organismo, debido a que aportan con un 30% de energía, pero es necesario que estos sean consumidos de forma adecuada para no provocar futuras enfermedades (Espinoza y Zapata, 2010, pp.6-7).

Su uso ha sido principalmente para procesar y condimentar diversos alimentos, dándole un sabor y consistencia agradable, siendo de una elevada demanda en el mercado, para la elección de aceites comestibles el consumidor es bastante exigente. En el Ecuador el consumidor se fija que la etiqueta mencione el origen (semilla o fruto) de donde ha sido extraído, además que el producto se encuentre libre de grasas trans (Medina, 2013, pp.1-2).

Durante los últimos años el consumo de aceites aumentado considerablemente a nivel mundial, es así que la industria que se dedica a la fabricación de aceites provee al consumidor productos innovadores obtenidos de diversas fuentes vegetales, considerando costos y que se ajusten a las exigencias del consumidor (Paucar et al., 2015, pp.280-281).

1.2.1. Historia

Los aceites y grasas forman parte del origen de nuestra civilización ancestral, debido a que han sido usados para la elaboración de alimentos y combustibles, en los años paleolíticos la grasa era usada para elaborar grabados y pinturas (Valenzuela y Morgado, 2005, pp.4-6).

En las civilizaciones antiguas como Grecia y Egipto se utilizaba los aceites con fines culinarios y combustible, mientras que en Roma los luchadores impregnaban en su cuerpo aceite con la finalidad de mantener el cuerpo hidratado, los aceites eran buenos disolventes para pigmentos, permitiendo colorear el rostro, ojos y algunas partes del cuerpo (Valenzuela y Morgado, 2005, pp.4-7). La estructura química de las grasas y aceites fue descubierta por el químico francés Michel Chevreul, el cual trabajaba como profesor de química orgánica en la Universidad de París, para su estudio trató las grasas de los animales con álcali creando así la glicerina, a más de esto pudo extraer agua y de esta forma obtener los jabones (Valenzuela y Morgado, 2005, pp.4-7).

Michel Chevreul dio otro aporte significativo en 1824 al separar la colesiterina de la bilis humana a lo cual se le conoce como el colesterol, la colesiterina es un componente fundamental de los cálculos biliares (Valenzuela y Morgado, 2005, pp.4-7).

Nikolai Anichkov en 1913 descubrió la relación que existe entre la arteriosclerosis y el colesterol, determinando la importancia que tienen las grasas a nivel de las enfermedades vasculares (Valenzuela y Morgado, 2005, pp.5-9).

1.2.2. Girasol

El girasol es una planta anual, su color amarillo característico le da una tonalidad agradable a la vista como se observa en la Figura 4-1, el girasol es bastante cultivado en todo el mundo debido a la producción de aceite, es así como es el tercer cultivo más representativo en España, debido a la demanda en la industria extractora de aceite (Gómez, 1988, p.3).



Figura 4-1. Girasol.

Fuente: (Gómez, 1988, p.9).

1.2.2.1. *Taxonomía*

REINO: Plantae.

SUBREINO: Tracheobionta.

DIVISIÓN: Magnoliophyta.

CLASE: Magnoliopsida.

SUBCLASE: Asteridae.

ORDEN: Asterales.

FAMILIA: Asteraceae.

SUBFAMILIA: Asteroideae.

GÉNERO: *Helianthus*

ESPECIE: *Helianthus annuus*

NOMBRE COMÚN: Girasol / Maíz de Texas / Lampote / Flor de sol (Poverene et al., 2002, p.101).

1.2.2.2. *Historia*

El girasol es propio de América y llevado a España como una planta ornamental después de la conquista española, en 1835 D. I. Bokariov realizó ensayos para la cultivación de girasol y de esta manera industrializarlo para la producción de aceite, obteniendo un cultivo a gran escala (García, 1971, p.2).

En el año de 1965 se creó alrededor de 4.510.000 hectáreas para la producción de aceite en la Unión Soviética, después se aprovechó esta producción en países de América como es Argentina, Uruguay y Estados Unidos con resultados exitosos, el girasol resistía fuertes sequías (García, 1971, pp.2-3).

1.2.2.3. *Descripción botánica*

Su raíz puede llegar a medir hasta 4 metros y se une al tallo por la parte inferior, el tallo es cilíndrico estriado y contiene unas espesas vellosidades puede medir hasta 4 metros de altura, mientras que las hojas son largas hasta de 10 cm de largo, de forma ovalada, con ápice afilado, conteniendo hasta 7 a 25 pares de hojas (García, 1971, pp.4-5).

Sus flores se encuentran reunidas a nivel de la inflorescencia, éstas son numerosas y con esto atraen a los insectos y las abejas. La semilla está cubierta por un pericarpio o conocido como “cáscara” esta sirve como protección evitando que sea atacado por la polilla que se forma en el girasol (García, 1971, pp.6-9).

1.2.2.4. *Distribución geográfica*

El cultivo del girasol ha tomado una gran trascendencia a nivel mundial por su demanda en la industria productora de aceite, su cultivo ha sido bastante promovido a nivel mundial siendo así entre los países más productores de girasol se encuentra Rusia, Argentina, Estados Unidos, Rumania y España (Vásquez, 2001, pp.21-23).

1.2.3. *Aceite de girasol*

El aceite de girasol proviene de las semillas de girasol de lugares como España, con el tiempo se extendió a otras partes del mundo, ya que resulta ser una opción saludable y económica entre varios tipos de aceites, los cuales son obtenidos por medio de las semillas de girasol (Zudaire, 2009, párr.1).

1.2.3.1. *Composición química del aceite de girasol*

El aceite de girasol está constituido por ácidos grasos poliinsaturados, destacando el linoleico que es un ácido graso esencial y deben ser proporcionados en la dieta, debido a que organismo del ser humano no puede sintetizarlo (Zudaire, 2009, párr.1).

Tabla 1-1: Perfil de ácidos grasos en el aceite comestible de girasol.

ÁCIDO GRASO	FÓRMULA MOLECULAR	CANTIDAD DE ÁCIDO GRASO PRESENTE EN EL ACEITE DE GIRASOL (%)	VARIACIÓN DE LA CANTIDAD DE ÁCIDO GRASO PRESENTE EN EL ACEITE DE GIRASOL (%)
Linoleico	C18:2n6c	55,40	±0,54
Oleico	C18:1n9c	17,49	±0,05
Palmítico	C16:0	6,09	±0,15
Araquidónico	C20:4n6	4,94	±0,52
Palmitoleico	C16:1	4,90	±0,01
Esteárico	C18:0	4,66	±0,08
Elaídico	C18:1n9t	2,88	±0,04

Fuente: (Segura et al., 2014, p.930).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

1.2.3.2. *Producción de aceite de girasol en Ecuador*

En el país existen empresas que se encargan del tratamiento de aceites comestibles de girasol, por ejemplo, LA FABRIL es uno de los mayores productores en la elaboración de aceites, promoviendo así su producto con la marca “GIRASOL” (Guerrero, 2016, pp.12-14).

Además, se han realizado estudios por la Universidad Técnica del Norte en los cuales buscan factibilidad del proceso de aceite de girasol. La elaboración de aceite de girasol ha ganado fuerza debido a su perfil de ácidos grasos que posee ácidos grasos esenciales (Guerrero, 2016, p.14).

1.2.3.3. *Extracción del aceite refinado de girasol*

La extracción del aceite de girasol es una opción que ha tomado bastante relevancia en el mercado debido a sus altas ventas, este aceite proviene de las semillas de girasol el cual debe pasar por diversas fases para poder extraer el aceite de la semilla. A continuación, se presentan las fases para el proceso de elaboración del aceite de girasol.

- *Obtención de la materia prima*

Se obtiene la materia prima, que constituyen las semillas de girasol. Éstas son importantes para la elaboración del aceite de girasol, se encuentran en la flor a nivel del receptáculo como se observa en la Figura 5-1, que es la parte interna de la flor, a estas semillas se las conoce vulgarmente como “pipas” (Gómez, 1988, pp.9-10).



Figura 5-1. Flor del girasol.

Fuente: (Gómez, 1988, p.9).

- *Limpieza*

Una vez obtenida la semilla se limpia para eliminar algún material que no se desea que formen parte de la materia prima para la obtención del aceite, para esto se usa tambores rotatorios eliminando todo tipo de tallos, hojas, suciedad u otros desechos que pueden estar presentes al momento de su limpieza. Además, se eliminan las partículas de metal específicamente de hierro, por medio de imanes electromagnéticos (Gómez, 1988, pp.9-10).

- *Secado*

Para el secado las semillas se colocan a la exposición solar, de esta manera se logra destruir bacterias y hongos para obtener un prensado adecuado y solubilizar los fosfatos (Gómez, 1988, pp.10-11).

- *Acondicionamiento y eliminación de la cáscara*

El acondicionamiento permite realizar una limpieza de la semilla para eliminar la mayor parte de las impurezas y secarlo hasta un humedad del 6%, mientras que para eliminar el pericarpio o “cáscara” que rodea la semilla se realiza un impacto de rodillos, otra alternativa es utilizar una zaranda o aire en contracorriente (Gómez, 1988, pp.10-11).

- *Prensado*

Una vez acondicionado el material pasa por unas prensas de tornillos los cuales van a arrastrar las semillas y comprimirlas hasta que el aceite se desprenda de la semilla, de esta manera se obtiene aceite crudo de prensa y el residuo que es la denominada “torta” (Gómez, 1988, pp.10-11).

- *Extracción con solvente*

Para aprovechar el residuo que es la torta se puede utilizar métodos que extraen la mayor cantidad de aceites de las semillas, dejando en la semilla menos del 1% de aceites, la torta contiene alrededor del 15% de aceite. Para extraer el aceite se puede utilizar diversos métodos, el más conocido es la extracción por soxhlet y utilizando como solvente hexano (Gómez, 1988, pp.10-11).

- *Harina proteica*

Una vez extraído de la semilla la mayor cantidad de aceite, se genera un residuo con un alto contenido de fibra, el cual se procede a tostar para después transformarlo en lo que se conoce como pellet. Este residuo al contener una alta cantidad de fibra puede ser utilizado en alimento para animales como pollos, cerdos, rumiantes y conejos, esto le otorga al animal un alto valor energético (Santina, 2020, pp.1-3).

- *Refinación del aceite crudo de girasol*

Para refinar el aceite se debe primero remover las impurezas como son los ácidos grasos libres, pigmentos, entre otros, estos son los responsables de la presencia de turbidez, también se eliminan las ceras que se encuentran presentes en el aceite de girasol. Esto se realiza cuando el aceite alcanza un punto de fusión de 74°C, este punto de fusión es clave, debido a que no permiten la formación de un precipitado cristalino (Estar, 2015, pp.5-6).

- *Desecación por vía húmeda*

Se realiza una neutralización cuando el aceite se encuentra caliente para después enfriarlo hasta 6 a 8°C durante 8 a 10 horas, después se agrega de 3 a 5% de agua con una solución de soda cáustica diluida (Estar, 2015, pp.5-6).

Todo esto con la finalidad de aprovechar la hidrofiliadad que tienen las ceras y que estas sean separadas. Además, los electrolitos permiten que las ceras pasen de la fase oleosa a la fase acuosa para después calentar de 20 a 25 °C y al final centrifugarlos (Estar, 2015, pp.5-7).

- *Blanqueamiento*

Los aceites pueden contener una pequeña cantidad de pigmentos, jabones, fosfolípidos y minerales, estos son removidos por medio de un tratamiento que se realiza a 100°C al vacío durante 15 minutos, una vez finalizado se filtra para eliminar diversas partículas e impurezas (Estar, 2015, pp.5-7).

Este es un punto crítico, ya que se debe eliminar el aire antes de que entre al vacío, si no se elimina el aire puede generar una oxidación de los aceites (Estar, 2015, pp.5-7).

- *Pulido*

En este punto se elimina la mayor parte de ceras presentes en el aceite después del proceso de blanqueado, para esto se realiza una maduración de los cristales y una filtración (Estar, 2015, pp.5-7).

- *Desodorizado*

La desodorización se realiza para eliminar sustancias que son volátiles y de esta manera eliminar olores y sabores que son desagradables. En este proceso se destruye peróxidos y se eliminan aldehídos y productos que se pudieron formar durante el proceso, mismo que se realiza a 240°C y una presión de 2 a 3 mmHg (Estar, 2015, pp.6-7).

- *Adición de antioxidantes*

Antes de terminar el proceso de refinamiento del aceite de girasol se puede colocar o no los antioxidantes, todo esto va a depender del uso que se le vaya a dar al aceite antes de ser envasado y almacenado (Estar, 2015, pp.6-7).

- *Envasado y almacenamiento*

Para realizar el envasado es esencial proteger al aceite con nitrógeno, evitando su contacto con el oxígeno del aire y se vuelva inestable. Para realizar el envasado se utiliza material plástico, metal o de vidrio, los cuales deben ser inertes y con una gran resistencia a la ruptura, para envasar y entregar los productos al mercado. Las empresas por lo general realizan este proceso en envases con capacidades de 500 mL, 1000 mL, 1500 mL, 3000 mL y 5000 mL (Estar, 2015, pp.7-8).

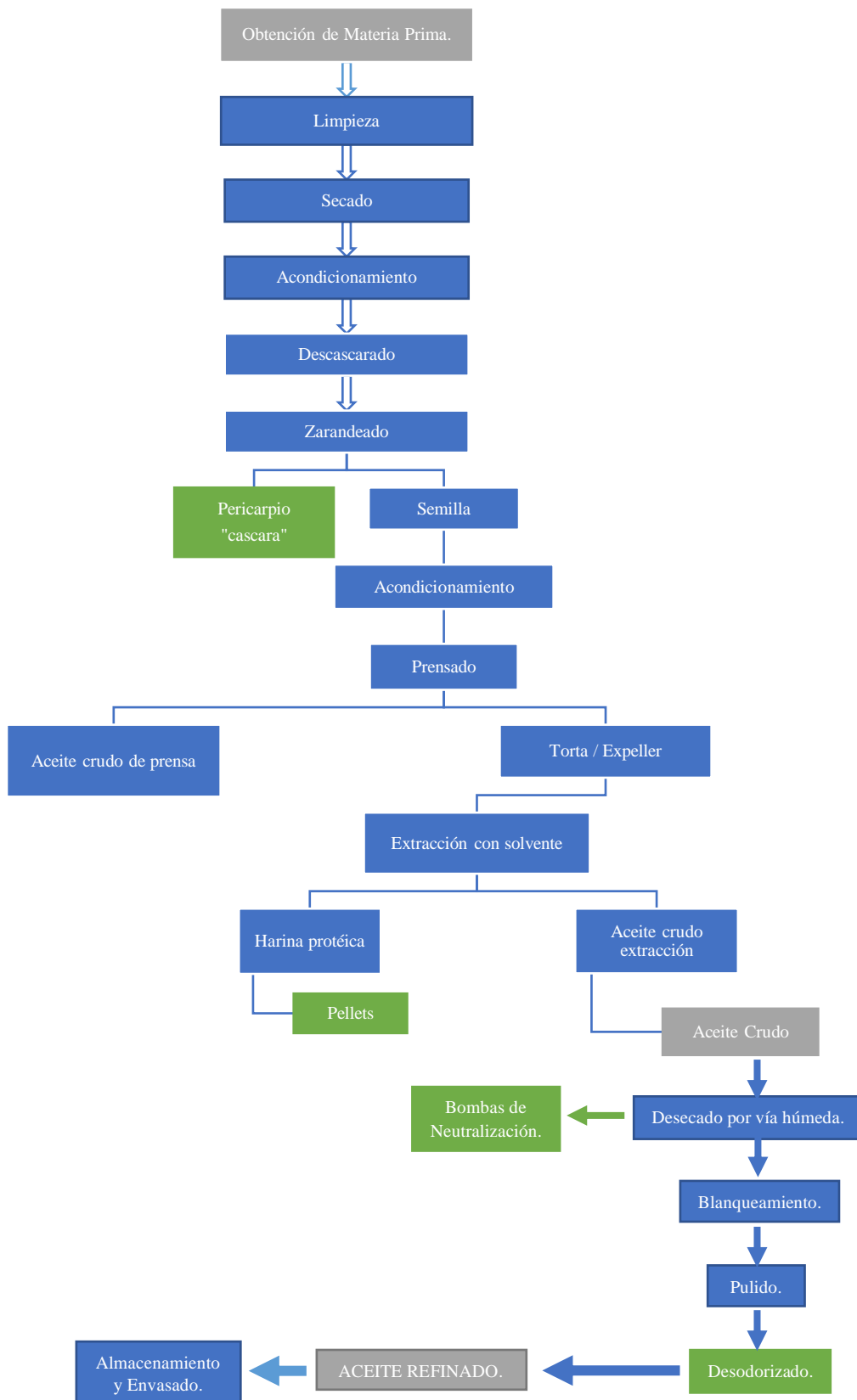


Figura 6-1. Extracción del aceite refinado de girasol.

Fuente: (Guerrero, 2016, p.11).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

1.2.3.4. Especificaciones del aceite de girasol

Tabla 2-1: Especificaciones del aceite de girasol según NTE INEN 26:2012.

PARÁMETRO	Min	Máx.	UNIDADES
Densidad relativa, 25/25°C	0,910	0,921	-
Índice de yodo	123	137	cg/g
Acidez libre (como ácido oleico)	-	0,2	%
Perdida por calentamiento	-	0,05	%
Índice de refracción a 25°C	1,471	1,475	-
Índice de peróxido	-	10	meqO ₂ /Kg

Fuente: (NTE INEN 26, 2012, p.2).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

1.2.4. Oxidación de aceites comestibles

Las materias grasas puede sufrir deterioro dándose una serie de reacciones como la autooxidación, polimerización térmica, oxidación térmica, isomerización, ciclación e hidrólisis (Juárez y Sammán, 2007, p.6).

En el caso de la oxidación, se da a nivel de los ácido grasos insaturados de los triglicéridos debido a que el oxígeno que se encuentra a nivel atmosférico reacciona con el aceite sobre todo en los dobles enlaces como consecuencia de esto se da malos olores (Juárez y Sammán, 2007, p.6).

La polimerización está asociado a un proceso de autooxidación el cual va a producir radicales libres, los hidroperóxidos se descomponen de forma inmediata en compuestos de bajo peso molecular (Juárez y Sammán, 2007, p.7).

Mientras que la hidrólisis se produce cuando el vapor de agua reacciona con el aceite específicamente reacciona con los triglicéridos provocando una hidrólisis y consigo liberando ácido grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y glicerol (Juárez y Sammán, 2007, p.7).

1.2.4.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio que se puede dar a nivel de los antioxidantes produciendo una alteración y cambios en las biomoléculas. Esta alteración es un efecto adverso que se produce en la sangre y tejidos de un ser vivo, ya que aquí se da una degradación a nivel de las biomoléculas generando radicales libres de oxígeno y conduciendo a la muerte celular (Lima, 2005, pp.2-3).

Es necesario que se conozca que el estrés oxidativo se produce a nivel del mecanismo celular y con una acción a nivel de los radicales libres, debido a que esto puede afectar el equilibrio que se da entre radicales libres y otras especies reactivas. Estas especies reactivas tienen una actividad antioxidante y pueden ser de carácter endógeno o exógeno (Coronado et al., 2015, pp.2-4).

El equilibrio permite que la toxicidad disminuya y se presente un menor daño a nivel de la célula, si no existe un equilibrio se puede dar un déficit de antioxidantes o una proliferación incontrolable de los radicales libres (Coronado et al., 2015, pp.2-4).

1.2.4.2. Radicales libres

Los radicales libres o también conocidos como especies reactivas de oxígeno son moléculas o átomos los cuales tienen presentes electrones no apareados en el orbital externo, estos van a generar una gran reactividad a nivel de estructura provocando varios procesos bioquímicos que se dan a nivel celular (Lima, 2005, pp.2-4).

Uno de los principales productores de especies reactivas de oxígeno es la mitocondria, la mayor parte de oxígeno (90%) inhalado es consumido por la mitocondria, mientras que sólo el 2% de oxígeno reducido puede formar el radical superóxido (O_2) (Lima, 2005, pp.2-4).

El radical superóxido puede transformarse en un radical hidroxilo (OH) que es bastante reactivo en relación con el radical superóxido, el óxido nítrico (NO) es un radical que se encuentra libre en estado fisiológico y se produce a nivel del endotelio vascular y puede transformarse a peróxido nítrico (ONOO) siendo el responsable de varias enfermedades (Lima, 2005, pp.2-4).

La formación de radicales libres puede darse debido a que se presentan reacciones bioquímicas de oxidación y reducción, esto es propio del metabolismo de una célula normal pero puede verse influenciado por factores externos como dietas desbalanceadas o hipercalóricas, ejercicio extenuante, compuestos tóxicos, factores ambientales, humo del cigarrillo, radiaciones gamma, entre otros (Lima, 2005, pp.3-5).

Las especies reactivas de oxígeno pueden ser controladas por mecanismos fisiológicos de defensa que son antioxidantes, estos tienen el objetivo de evitar el exceso de oxidación que se da en la célula, ya que con el paso del tiempo se vuelve más crítica la situación provocando un deterioro de los tejidos, órganos y finalmente provocando una enfermedad (Lima, 2005, pp.3-5).

Estas enfermedades son el resultado de un desequilibrio interno a nivel de las especies reactivas de oxígeno y antioxidantes. Los sistemas de defensa propios del organismo no solo son los antioxidantes, si no también enzimas que van a eliminar o a su vez separar las moléculas que han sufrido una oxidación, el principal complejo enzimático está compuesto por 4 enzimas que son de relevancia estas son superóxido dismutasa, glutatión reductasa, glutatión catalasa y glutatión peroxidasa (Lima, 2005, pp.3-6).

1.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben la oxidación de los sustratos que son susceptibles a las especies reactivas de oxígeno, es así como pueden existir antioxidantes que son exógenos (Lima, 2005, pp.3-5).

Los antioxidantes exógenos pueden ser tomados por la dieta y son los más importantes, siempre y cuando el individuo tenga una dieta saludable, la concentración de los antioxidantes va a depender de cada persona, recalcando que si la dieta es balanceada va a existir una gran cantidad de antioxidantes (Lima, 2005, pp.3-5).

Las reacciones de autooxidación provocan en el aceite la aparición de aromas desagradables, esto hablando en el aspecto organoléptico pero también causa una disminución de la calidad nutricional que provee dicho aceite (Lima, 2005, pp.3-5).

En la industria alimentaria se busca métodos como el empleo de atmósferas inertes para minimizar que el aceite se encuentre en contacto con el oxígeno, al igual se busca emplear bajas temperaturas de esta forma disminuir las reacciones que se encuentran inmersas e inactivar las enzimas que pueden catalizar tanto la oxidación e inhibir a los antioxidantes (Losada, 2013, pp.24-25).

1.3.1. Características de los antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia la cual a bajas concentraciones en relación con el sustrato puede actuar reduciendo, previniendo o eliminando la oxidación que se puede presentar en los aceites. Para que un antioxidante cumpla con los criterios debe tener las siguientes características (Losada, 2013, pp.25-26).

- Seguro.
- Efectivo al colocar una concentración baja.
- Inocuo.
- Estable frente a métodos de procesamiento a los que se puede someter un alimento
- No cambiar el color, olor y sabor del aceite, esto puede ser desagradable al momento de consumirlo.
- El costo no debe de ser relevado porque esto generará que el producto eleve su precio (Losada, 2013, pp.25-26).

1.3.2. Importancia

Uno de los métodos más económicos y eficaces para evitar la autooxidación es el uso de antioxidantes trayendo al aceite ventajas principalmente si se hace empleo de antioxidantes de origen natural estos traen varios beneficios cómo son los siguientes (Losada, 2013, pp.26-27).

- Mantener la calidad nutricional en los aceites y alimentos, evitando la oxidación que se da a nivel de los ácidos grasos insaturados que presentan los aceites, vitaminas liposolubles y algunos aminoácidos.
- Mejorar las características organolépticas de los alimentos, debido a que la oxidación puede provocar en el aceite que se produzcan olores desagradables, decoloraciones, enranciamiento del aceite y malos sabores.
- Lo más esencial es buscar que no se generen problemas toxicológicos en el consumidor, debido a las reacciones de oxidación lipídica y estas pueden llegar a provocar daños a nivel de los tejidos y órganos, finalmente generando una enfermedad que a la larga puede provocar inclusive la muerte (Losada, 2013, pp.26-27).

1.3.3. Mecanismo

Los antioxidantes previenen o retardan la oxidación que se puede dar a nivel de los aceites y grasas, en los aceites comestibles se encuentran los electrones apareados a nivel de los orbitales como se observa en la Figura 7-1. en el inciso A (Alomar, 2007, pp.6-7).

Los electrones se pueden ver afectados por diversos factores como luz, aire y temperaturas elevadas esto se observa en el inciso B, ya que provoca la formación de radicales libres, perdiéndose un electrón y quedando un compuesto inestable como son los radicales libres (Coronado et al., 2015, pp.207-208).

En el inciso C se puede observar la presencia de un antioxidante el cual es un donante de electrones, este va a donar un electrón hacia el radical libre y de esta manera el antioxidante al ser un donador del electrón se oxida, mientras que el compuesto que se encuentra en el aceite se va a reducir, debido a que gana un electrón y de esta manera forma una molécula estable como se observa en el inciso D (Coronado et al., 2015, pp.207-208).

La regeneración del antioxidante se da gracias a la presencia de otro antioxidante el cual dona un electrón como se muestra en el inciso E, es así como se estabiliza el antioxidante todo esto se produce hasta que no se termine el reductor (Coronado et al., 2015, pp.207-208).

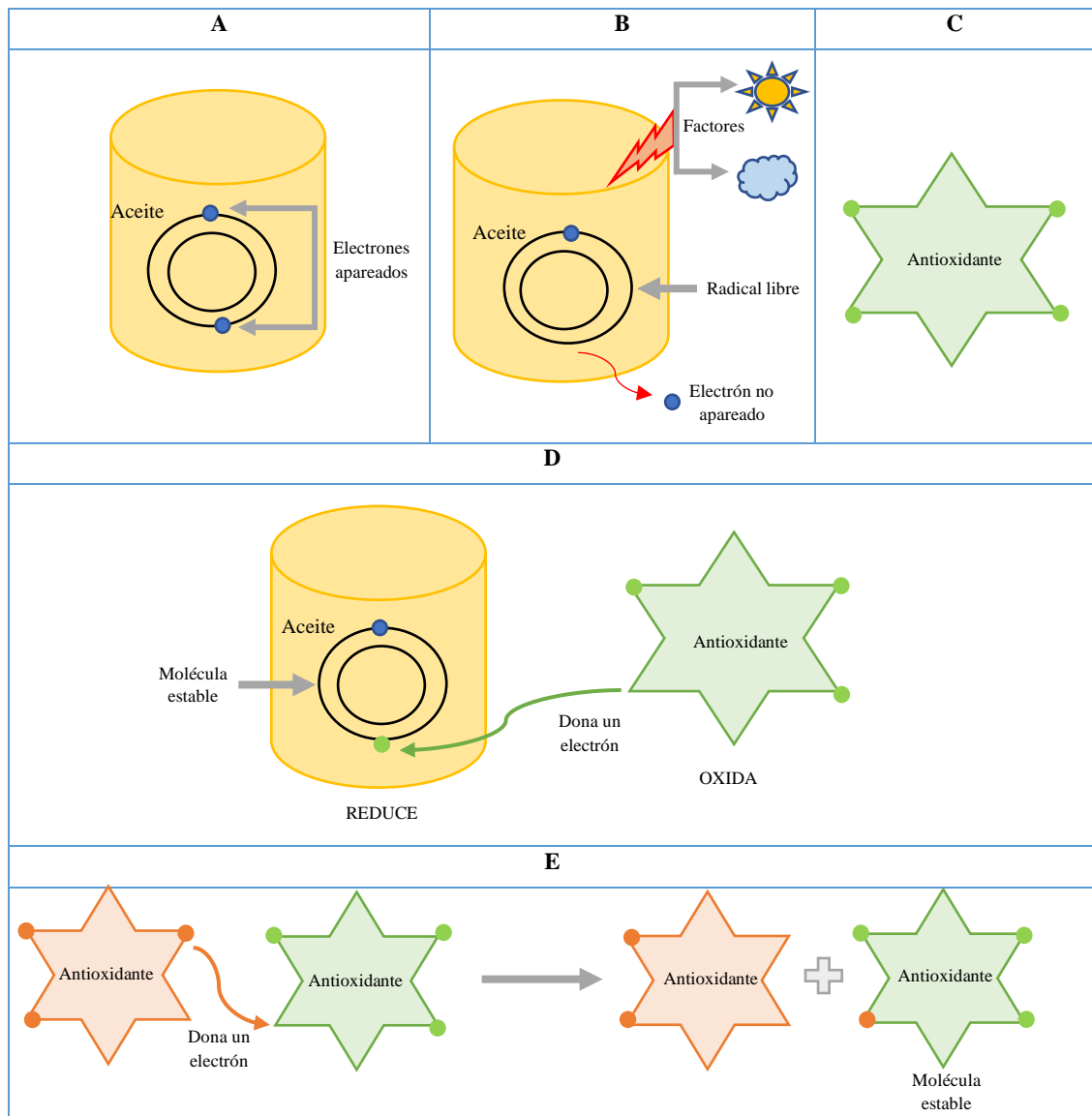


Figura 7-1. Mecanismo de los antioxidantes sobre aceites comestibles.

Fuente: (Coronado et al., 2015, pp.207-208).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

1.3.4. Antioxidantes sintéticos

Estos son conocidos también como antioxidantes primarios, tienen la capacidad de ceder átomos de hidrogeno a los radicales libres formados durante el proceso de oxidación, convirtiendo así moléculas más estables electrónicamente y de esta manera se detiene a la oxidación que se puede dar a nivel de los aceites (Vargas, 2009, pp.30-31).

Los antioxidantes sintéticos son utilizados para la fabricación de alimentos, fármacos y cosméticos, estos han sido ampliamente usados debido a su efecto de larga duración y estabilidad, pero en la industria alimentaria provoca una cierta preocupación por la seguridad que pueden otorgar estos antioxidantes y la factibilidad de ser remplazados por antioxidantes de origen natural (Vargas, 2009, pp.30-31).

Los antioxidantes más utilizados son butilhidroxianisol BHA, butilhidroxitolueno BHT, terbutilhidroxiquinona TBHQ y esteres de ácido gálico (Laboratorios Vitafor SRL, 2005, p.3).

- *Butilhidroxianisol*

Este antioxidante contiene un anillo aromático conjugado el cual tiene la capacidad de estabilizar a los radicales libres, el butil hidroxianisol es una mezcla de dos isómeros (3-terbutil-hidroxianisol y 2-terbutil-hidroxianisol), siendo que predomina en un 90% el 3-terbutil-hidroxianisol, es insoluble en agua fría pero soluble en parafinas, propilenglicol y aceites de origen vegetal (Vargas, 2009, pp.31-32).

- *Butilhidroxitolueno*

Proviene de la industria petrolífera, es un polvo cristalino de color blanco es insoluble en agua fría y propilenglicol pero soluble para parafinas, aceites y alcoholes como el etanol, es bastante usado para la conservación de la oxidación de grasas (Vargas, 2009, pp.32-33).

- *Ter-butilhidroxiquinona.*

Es un sólido de color blanco y cristalino con una elevada capacidad antioxidante para la mayor parte de aceites vegetales, pero su uso no se encuentra aprobado por la Unión Europea (Vargas, 2009, pp.32-33).

- *Esteres de ácido gálico*

Es un antioxidante que tiene un alto potencial, pero su uso es limitado debido a que sensible a calor y puede unirse al hierro, si se desea utilizar este antioxidante se debe realizarlo con el ácido cítrico porque así se logrará quelar el hierro (Vargas, 2009, pp.31-32).

1.3.5. Antioxidantes naturales

El uso de antioxidantes sintéticos ha llamado la atención de los consumidores, ya que no se tiene la certeza si proporciona una seguridad alimentaria, por tal motivo se ha buscado aprovechar obteniendo nuevos antioxidantes provenientes de fuentes naturales, estos puedan ser reemplazados a los antioxidantes de origen sintético (Vargas, 2009, p.33).

Los antioxidantes secundarios o naturales que tienen un mayor uso ya sea en la industria alimentaria o farmacéutica son el ácido ascórbico, tocoferoles o los beta-carotenos (Vargas, 2009, pp.33-34).

- *Ácido ascórbico*

Conocido también como vitamina C es un antioxidante de origen natural soluble en agua, adquirido por medio de la dieta en frutas (kiwi, naranja, fresas, entre otros) y en vegetales (brócoli, espinacas, tomate riñón, entre otros) (Lima, 2005, pp.5-6).

- *Tocoferoles*

Es un antioxidante soluble en medios apolares, la vitamina E es un antioxidante natural el cual se puede obtener a partir de aceites (girasol, soya, oliva, almendras, entre otros) y de alimentos de uso diario como son los huevos, leche y mantequillas (Lima, 2005, pp.5-6).

- *Carotenoides*

Este antioxidante de origen natural proviene principalmente de la zanahoria, espinaca, calabaza y pimientos, pueden sufrir daños al mantenerse en calor, por tal motivo se recomienda que los vegetales que poseen este antioxidante no sean cocinados a elevadas temperaturas, estos antioxidantes son solubles en grasas pero no en medios acuosos (Lima, 2005, pp.5-6).

1.3.6. Antioxidantes y su relación con la salud

La presencia de radicales libres puede producir en el organismo del ser humano enfermedades como el cáncer, problemas neurológicos, cardiovasculares y respiratorios, aterosclerosis. (Coronado et al., 2015, pp.209-210).

Los antioxidantes que son consumidos en la dieta diaria (origen natural o primario) son transportados en el organismo por medio de las lipoproteínas de baja densidad LDL, es así que los tocoferoles (Vitamina E) permiten reducir los procesos de oxidación. (Calixto, 2017, pp.188-189). Los antioxidantes pueden reducir los radicales libres que se forman y son los responsables de provocar cáncer, los radicales libres incrementa la mutación en la división celular dándose un mayor riesgo de provocar cáncer (Velamazán, 2005, pp.422-423).

El cáncer de pulmón está relacionado por el uso del consumo de tabaco, pero esto puede protegerse por medio del consumo de alimentos antioxidantes en especial el ácido ascórbico que tiene la capacidad de inhibir la nitrosación causado por el óxido nítrico (NO), esto es liberado en altas cantidades cuando una persona sufre un proceso inflamatorio (Velamazán, 2005, pp.422-423).

A nivel inmunológico se presenta una oxidación en los linfocitos T y B, Células Natural Killer NK pero el uso de antioxidantes puede frenar este proceso de oxidación, aumentando la vida media de los linfocitos, ya que retardan la involución a nivel del timo (Velamazán, 2005, pp.422-423).

El peroxinitrilo es un agente causal de producir daños neurológicos como son los accidentes cerebro vasculares, además la presencia de radicales está relacionada con enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica (Velamazán, 2005, pp.422-423).

1.4. Puntos críticos de oxidación durante la extracción del aceite refinado de girasol

El aceite de girasol puede sufrir un proceso de oxidación en diversos puntos críticos PC que se dan a nivel del proceso de extracción del aceite, para prevenir esta oxidación se ha buscado como alternativa obtener un antioxidante natural que no afecte a la composición del aceite ni a sus características organolépticas.

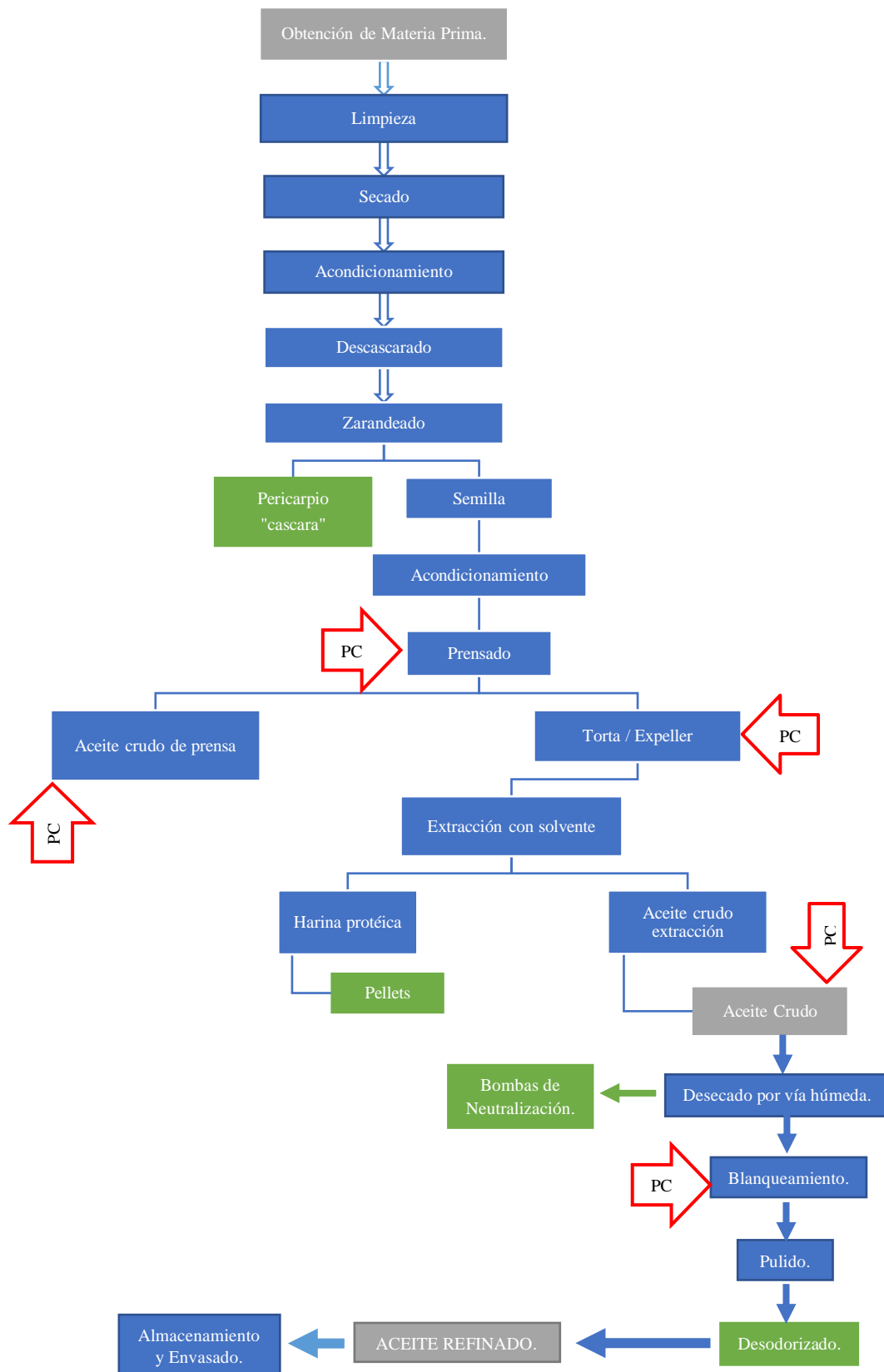


Figura 8-1. Puntos críticos de oxidación durante la extracción del aceite refinado de girasol.

Fuente: (Guerrero, 2016, p.11).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

1.5. Actividad antioxidante del romero sobre aceites comestibles

El extracto de romero contiene compuestos que son antioxidantes como el ácido carnósico, carnosol, rosmanol entre otros, estos no dan al alimento un olor ni sabor desagradable y otorgan una capacidad antioxidante sobre los alimentos (Vargas, 2009, pp.35-36).

Puede ser utilizado en la industria alimentaria no sólo para los aceites comestibles sino para mayonesa, pollo, salsas, entre otros. El romero tiene una capacidad antioxidante, buena resistencia térmica y una actividad antimicrobiana (Vargas, 2009, pp.35-36).

1.6. Métodos de extracción

1.6.1. Maceración

Uno de los procesos de extracción sólido-líquido que se encuentra implicado en varios procesos tecnológicos en la industria química y farmacéutica es la maceración, la maceración es una operación unitaria que se basa en la solubilidad que posee la materia sobre el medio líquido con el que se desea realizar la extracción (Erkan et al., 2008, pp.78-79).

1.7. Métodos para determinar el grado de oxidación

1.7.1. Índice de peróxido

El índice de peróxido es un método que se basa en la capacidad que tienen los peróxidos de oxidar los iones de yoduro de potasio KI y producir yodo el cual va a ser valorado con tiosulfato en presencia de un indicador como es la solución de almidón (Comesaña et al., 2017, p.11).

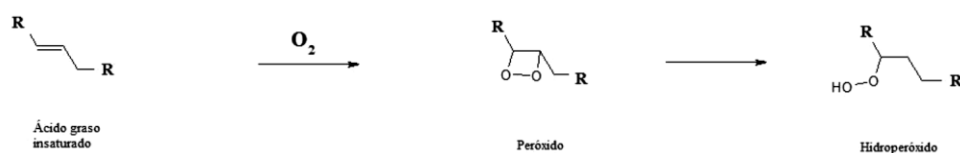


Figura 9-1. Formación de hidroperóxidos en aceites.

Fuente: (Comesaña et al., 2017, p.11).

1.7.1.1. NTE INEN 277:1978

El índice de peróxido es el número de miliequivalentes de oxígeno que se encuentra presente por kilogramo de muestra, en esta normativa se valora la cantidad de yodo liberado en la muestra con una solución de tiosulfato de sodio (NTE INEN 277, 1978, pp.1-3).

1.7.1.2. NTE INEN-ISO 3960:2013

Para determinar el índice de peróxido la muestra de aceite se disuelve en isooctano y ácido acético glacial, a esto se le añade ioduro potásico, el iodo liberado por los peróxidos se determina iodométricamente con la solución de tiosulfato sódico, utilizando como indicador almidón, el punto de equivalencia se determina iodométricamente (NTE INEN-ISO 3960, 2013, pp.1-3).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de la Investigación

La investigación se realizó en los laboratorios de Bromatología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Tipo y diseño de investigación

El diseño del estudio se ajusta a una investigación de tipo experimental, al determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre muestras de aceite comestible comercial premeditadamente oxidado, utilizando un método analítico que genera resultados cuantitativos y prospectivos, debido a que los datos derivan de una observación directa a los hechos según los avances de la investigación.

2.3. Población de estudio

Para el desarrollo de este estudio se obtuvieron hojas de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) en cantidades suficientes del centro comercial “LA CONDAMINE”, el aceite de girasol comestible (*Helianthus annuus*) se consiguió en el supermercado “SUPERMAXI”, de la marca “Aceite de girasol” producido por la empresa la “LA FABRIL” en cantidad suficiente para asegurar disponibilidad y mismas características.

2.4. Tamaño de muestra

Se utilizarán 100g de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) previamente acondicionadas y divididas en cantidades de 100g. La cantidad de aceite de girasol comestible comercial corresponde a 1000mL dividido de alícuotas de 100mL, usando un muestreo aleatorio simple y considerando una muestra representativa tanto de hojas de romero como de aceite de girasol comestible.

2.5. Selección de la muestra

2.5.1. Hojas de romero

El romero corresponde a la especie *Rosmarinus officinalis L.* perteneciente a la familia Lamiaceae localizada ampliamente dentro del Ecuador principalmente en zonas andinas, al igual que en jardines, campos agrícolas y matorrales.

Para la recolección del material vegetal se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

2.5.1.1. Criterios de inclusión

Hojas de romero *Rosmarinus officinalis L.* con superficies integrales.

2.5.1.2. Criterios de exclusión

Aquellas hojas con daños por acción de animales o insectos, ejemplares que presenten deterioro por factores ambientales, proceso de descomposición o contaminación.

2.5.2. Aceite

El aceite de girasol comestible comercial, de la marca “Aceite de girasol” de la empresa “LA FABRIL”.

2.5.2.1. Criterios de inclusión

En el estudio se considera experimentalmente a las muestras de aceite de girasol comestible comercial sellado como un sustituto referencial de un aceite crudo antes de proceso de refinación.

Este aceite debe guardar experimentalmente para representatividad de resultados características similares como: mismo lote, hora de envasado, fecha de elaboración, fecha de vencimiento, cabezal de dispensación.

2.5.2.2. *Criterios de exclusión*

Muestras de aceite comercial que no presenten un mismo lote, fecha de elaboración, fecha de vencimiento, cabezal de dispensación, hora de envasado, conservación adecuada frente a la luz, aire o un sellado de fábrica.

2.6. **Hipótesis general**

El extracto etanólico diseñado de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) muestra actividad antioxidante sobre el aceite de girasol comestible a diferentes tiempos.

2.6.1. *Hipótesis nula*

- El extracto etanólico diseñado de romero no muestra actividad antioxidante sobre el aceite de girasol comestible a diferentes tiempos.

2.6.2. *Hipótesis alternativa*

- El extracto etanólico diseñado de romero si muestra actividad antioxidante sobre el aceite de girasol comestible a diferentes tiempos.

2.7. **Identificación general de variables**

Variable dependiente: Efecto antioxidante (índice de peróxido).

Variable independiente: Factores oxidantes (tiempo de exposición oxidativa).

2.8. Factores experimentales de estudio

Tabla 1-2: Factores de estudio.

FACTOR	DESCRIPCIÓN DEL FACTOR	DESCRIPCIÓN DEL NIVEL	NIVEL
A	Extracto etanólico diseñado de hojas de romero con aceite comestible.	Concentración de extracto etanólico diseñado de romero en aceite	a ₀
B	Tiempo de exposición oxidativa del aceite comestible.	4 días. 9 días. 15 días.	b ₁ b ₂ b ₃
C	Aceite comestible no oxidado (testigo).	0 días.	c ₀

Realizado por: Naranjo, A; Insuasti, G. 2021.

Tabla 2-2: Tratamientos de oxidación.

TRATAMIENTOS	COMBINACIÓN DE NIVELES.	VARIABLE DEPENDIENTE.
T ₀	c ₀	PV ₀
T ₁	a ₀ b ₁	PV ₁
T ₂	a ₀ b ₂	PV ₂
T ₃	a ₀ b ₃	PV ₃

a₀= Extracto etanólico diseñado de hojas de romero con aceite comestible de girasol.
 C₀= Aceite comestible no oxidado (testigo).
 b(n)= días de exposición oxidativa del aceite comestible.
 PV= Índice de peróxido.
 T= Tratamiento

Realizado por: Naranjo, A; Insuasti, G. 2021.

2.9. Parte Experimental

El ensayo oxidativo del aceite de girasol comestible que simula un aceite crudo se realizó con un extracto etanólico diseñado de romero a dos concentraciones que son identificadas como baja concentración (Bc) y alta concentración (Ac).

El ensayo de oxidación premeditado del aceite de girasol comestible a 3 tiempos se realizó comparativamente con dos estados del aceite de girasol comestible, uno protegido con el extracto etanólico diseñado de romero y otro el aceite fresco de girasol comestible sellado.

2.6.1. Recolección, selección y preparación de las hojas de romero

Se recolectan hojas de romero *Rosmarinus officinalis L.* del centro comercial LA CONDAMINE, se procede a lavar con agua corriente, buscando evitando la proliferación de algún tipo de insecto o microorganismo, luego de esto las hojas deberán ser suspendidas en el aire durante un mes y luego proceder a desprender las hojas del tallo correspondiente.

Una vez que las hojas de romero han sido desprendidas del tallo seleccionar con base a los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el presente trabajo “*inciso 2.5.1 Hojas de romero*”, estas deben estar en buenas condiciones y que no afecten la elaboración del extracto.

Una vez que las hojas se seleccionan se procede a prepararlas para elaborar el extracto etanólico triturándolas con la ayuda de un mortero hasta un tamaño de $1\pm 0,5\text{cm}$ y posterior a esto conservarlas en fundas ziplocs.

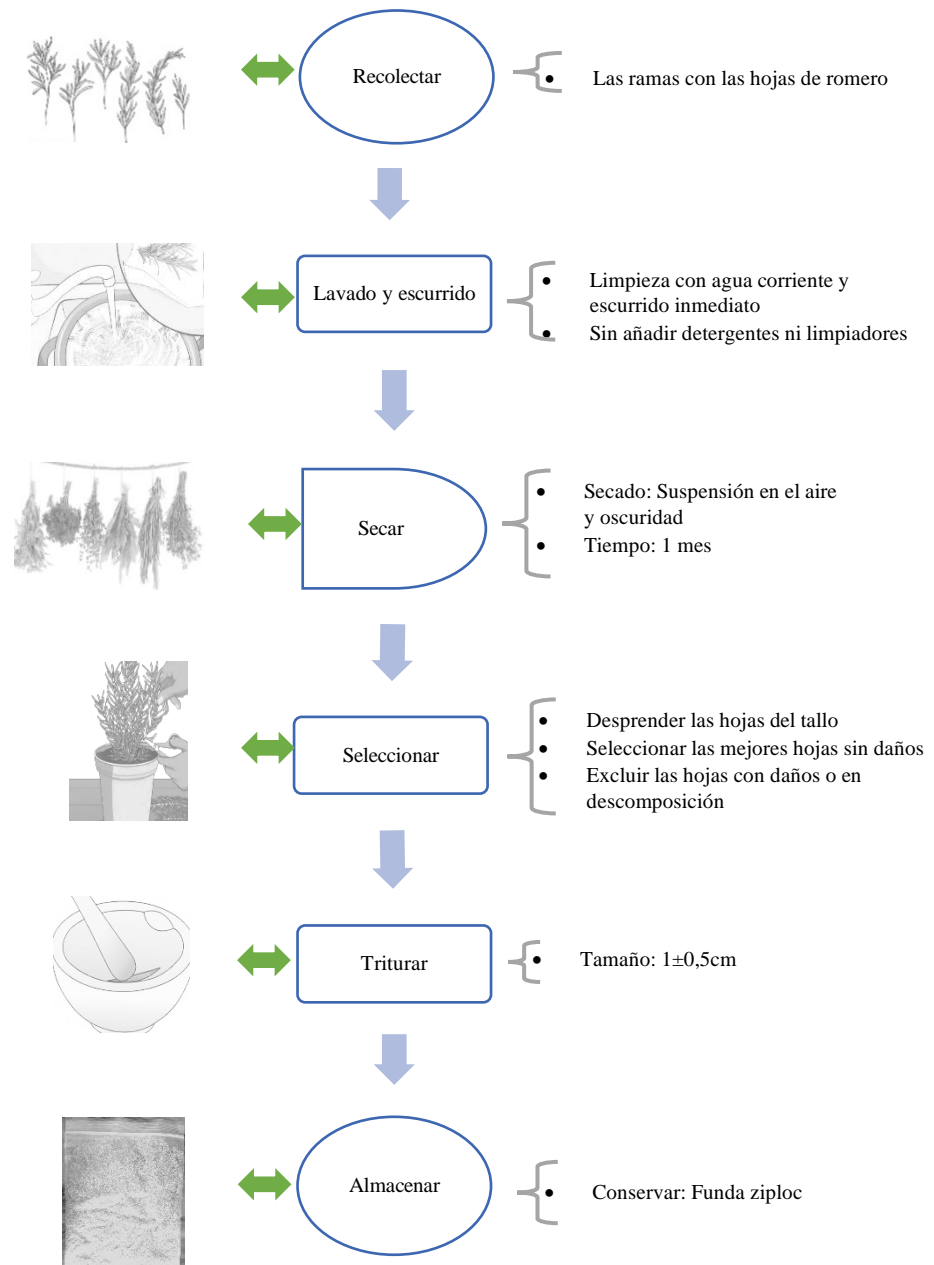


Figura 1-2. Recolección, selección y preparación de pulverizado de hojas de romero.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

2.6.2. *Diseño del extracto etanólico (extracto etanólico diseñado de romero)*

Durante este estudio se diseñó dos extractos etanólicos de hojas de romero, identificándolos: uno versión de baja concentración y otro como versión de alta concentración. Es importante mencionar que el extracto de alta concentración deberá tener mayor cantidad de hojas de romero respecto a la versión de baja concentración con la finalidad experimentalmente asegurar de manera más diferenciada el efecto antioxidante que se busca hipotéticamente definir.

En base a los resultados obtenidos durante el estudio se establecerá el extracto que otorgue una mayor capacidad antioxidante sobre el aceite de girasol comestible.

2.6.2.1. *Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración*

Metodológicamente en el diseño del extracto se contempla realizar operaciones unitarias sobre 100g de hojas de romero iniciales, estas son: agitación, filtración, y por *tres ocasiones* enriquecimiento de concentración del extracto filtrado, maceración, filtración de la maceración y finalmente concentración del extracto final y almacenamiento. Donde cada operación unitaria deberá ser estandarizada procedimentalmente para cuando se requiera replicar el trabajo en igual escala o a mayor escala.

2.6.2.2. *Extracto etanólico diseñado de romero, versión alta concentración*

Metodológicamente en el diseño del extracto se contempla realizar operaciones unitarias sobre 100g de hojas de romero iniciales, estas son: agitación, filtración, y por *cinco ocasiones* enriquecimiento de concentración del extracto filtrado, maceración, filtración de la maceración y finalmente concentración del extracto final y almacenamiento. Donde cada operación unitaria deberá ser estandarizada procedimentalmente para cuando se requiera replicar el trabajo en igual escala o a mayor escala.

2.6.3. *Tratamiento común para la oxidación premeditado de aceite de girasol con el extracto etanólico diseñado de romero de versiones baja y alta concentración*

El efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración se lo definirá en base a los factores de estudio y los tratamientos que se detallan a continuación, realizando mediciones del índice de peróxido como indicador a nueve tiempos diferentes, aparte del testigo (día 0). Se acompañará el estudio de manera adjunta un aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado y referencialmente un testigo de aceite de girasol comestible sellado.

Tabla 3-2: Factores de estudio.

FACTOR	DESCRIPCIÓN DEL FACTOR	DESCRIPCIÓN DEL NIVEL	NIVEL
A	Extracto etanólico diseñado de hojas de romero con aceite comestible.	Concentración de extracto etanólico diseñado de romero en aceite	a ₀
B	Tiempo de exposición oxidativa del aceite comestible.	4 días. 9 días. 15 días.	b ₁ b ₂ b ₃
C	Aceite comestible no oxidado (testigo).	0 días.	c ₀

Realizado por: Naranjo, A; Insuasti, G. 2021.

Tabla 4-2: Tratamientos de oxidación.

TRATAMIENTOS	COMBINACIÓN DE NIVELES.	VARIABLE DEPENDIENTE.
T₀	c ₀	PV ₀
T₁	a ₀ b ₁	PV ₁
T₂	a ₀ b ₂	PV ₂
T₃	a ₀ b ₃	PV ₃

a₀= Extracto etanólico diseñado de hojas de romero con aceite comestible de girasol.

C₀= Aceite comestible no oxidado (testigo).

b(n)= días de exposición oxidativa del aceite comestible.

PV= Índice de peróxido.

T= Tratamiento.

Realizado por: Naranjo, A; Insuasti, G. 2021.

2.6.3.1. *Tratamiento para la oxidación premeditada del aceite de girasol y valoración del efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero de baja y alta concentración*

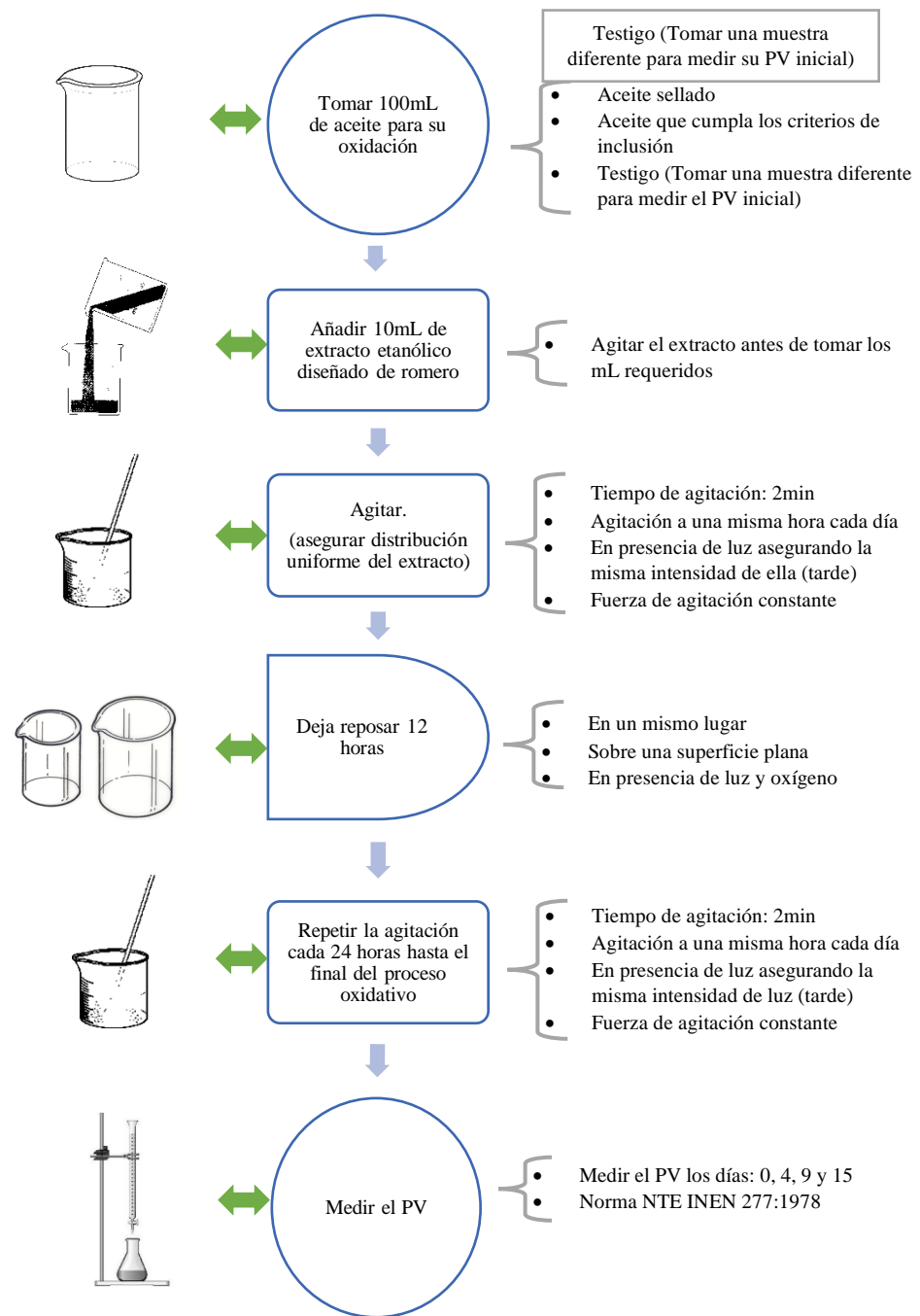


Figura 2-2. Determinación del efecto antioxidante del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

2.6.3.2. *Tratamiento para la oxidación premeditada del aceite de girasol y valoración del efecto antioxidante sin el extracto etanólico*

El procedimiento para la oxidación del aceite de girasol sellado es similar al que consta en la Figura 2-2, sin la adición del extracto de hojas de romero.

2.6.4. *Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido (Norma NTE INEN 277:1978)*

Definición: El índice de peróxido mide el estado de oxidación de un aceite indicando los miliequivalentes de oxígeno de forma de peróxido presentes en una muestra por kilogramos de grasa o aceite (Clayton, 1987, p.1).

Fundamento: El índice de peróxido es un método que se basa en la capacidad que tienen los peróxidos de oxidar los iones yoduro del yoduro de potasio y producir yodo el cual va a ser valorado con tiosulfato en presencia de un indicador de almidón. (Comesaña et al., 2017, p.11-12).

2.6.4.1. Determinación del índice de peróxido (Norma NTE INEN 277:1978)

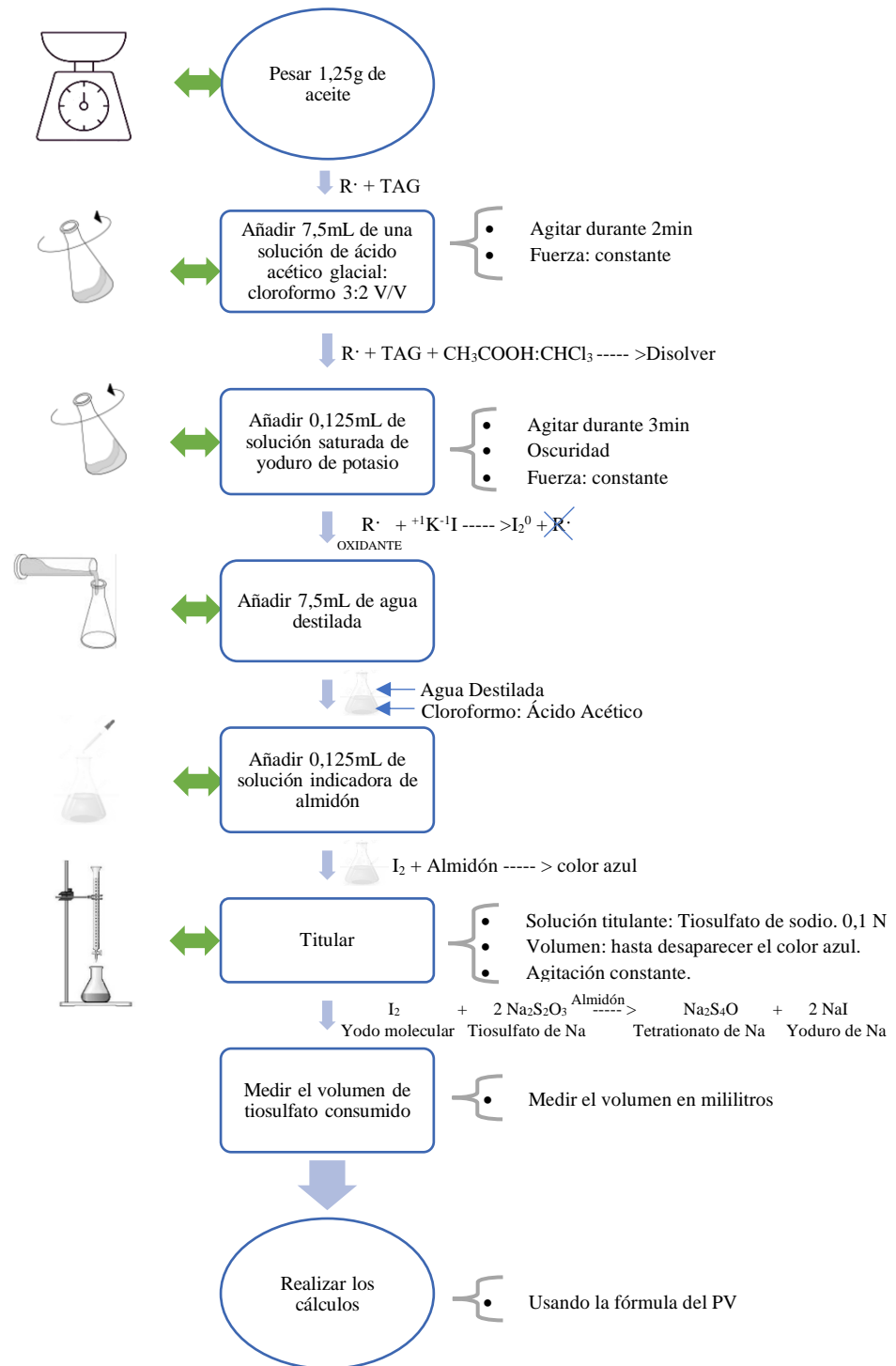


Figura 3-2. Determinación de la prueba del índice de peróxido.

Fuente: (NTE INEN 26, 1973, p. 2).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Para calcular el índice de peróxido se debe considerar la siguiente fórmula:

$$PV(\text{meq O}_2 / \text{Kg de aceite}) = \frac{V \times N}{m} \times 1000$$

Donde:

PV= índice de peróxido

MeqO₂/Kg de aceite= miliequivalente de oxígeno por cada Kg de aceite

V= volumen de tiosulfato de sodio agregado a la muestra de aceite (mL)

N=normalidad del tiosulfato de sodio (0,01N)

m= masa de la muestra de aceite (g)

2.6.5. *Materiales, equipos y reactivos*

Materiales

- Balón de aforo 250mL
- Balón esmerilado
- Buretas de 25mL
- Embudo simple mediano
- Envase ámbar
- Espátula
- Matraz Erlenmeyer 250mL
- Mortero con pistilo
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Pera de succión
- Pinzas para bureta
- Pipetas gravimétricas 5mL
- Pipetas gravimétricas 1mL
- Probeta 100mL
- Soporte de buretas
- Vaso de precipitación 100mL
- Vaso de precipitación 250mL
- Varilla de agitación
- Vidrio reloj

Equipos

- Agitador Magnético
- Balanza Analítica
- Desecador
- Rotavapor
- Sorbona

Reactivos

- Ácido acético glacial
- Agua destilada
- Cloroformo
- Etanol 96%
- Solución indicadora de almidón
- Tiosulfato de sodio pentahidratado 0,1N
- Yoduro de potasio

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

3.6. Recolección, selección y preparación de hojas pulverizadas de romero

Durante la recolección de la planta de romero se escogieron las mejores especies, encontrándose éstas en buen estado para previamente pasar por un proceso de limpieza, pero la planta tiene la cualidad de ser resistente a lugares desérticos, por tal motivo todas las plantas de romero ocupadas para este estudio se encontraban en buen estado lo que facilitó su limpieza y secado.

El proceso de secado de la planta de romero no sufrió ninguna proliferación de hongos y emanando un olor característico al romero en todo el tiempo de su secado, además se desprendió fácilmente del tallo, lo que permitió que se pueda seleccionar las hojas, encontrándose el 100% de ellas en excelentes condiciones.

Durante la preparación de las muestras de hojas de romero se redujo el tamaño de partícula, para conseguir una mayor superficie de contacto con el etanol y por consiguiente una maceración más eficiente asegurando que el romero pulverizado presente los principios activos en su forma más nativa.

Es así que la recolección, selección, y preparación no afecta sobre la actividad antioxidante que otorga el romero, además el almacenamiento en excelentes condiciones (sin la presencia de humedad y luz) y que pueda ser usado en cualquier momento durante el desarrollo de este estudio.

3.7. Diseño del extracto etanólico (extracto etanólico diseñado de romero)

3.7.1. *Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración*

- *Agitación*

Colocar 100 gramos de hojas de romero en un matraz Erlenmeyer y añadir 500mL de etanol 96%, después llevar al agitador magnético durante 4 horas a temperatura ambiente a una velocidad de 200RPM y sin calor.

- *Filtración*

Filtrar la muestra haciendo uso de papel filtro en un embudo simple para eliminar los restos de las hojas que se encontraron en el extracto *sin añadir cantidad alguna de solvente* (V_1 aproximadamente 380mL).

- *Enriquecimiento de concentración del extracto filtrado*

Pesar 100 gramos de un extra de hojas de romero trituradas para adicionar al extracto filtrado anteriormente (V_1 aproximadamente 380mL).

- *Maceración*

Adicionar los 100gramos de hojas de romero secas en un frasco ámbar al extracto filtrado (V_1 aproximadamente 380mL), cerrar el envase y dejar macerar durante 2 días a una temperatura de 3 a 5°C, evitando el contacto con la luz.

- *Filtración de la maceración*

Filtrar la muestra macerada después de los dos días haciendo uso de papel filtro en un embudo simple para eliminar los restos del material vegetal *sin adicionar algún volumen extra de solvente* (V_2).

Repetir los pasos anteriores de enriquecimiento de concentración del extracto filtrado, maceración y filtración de la maceración. Este proceso debe realizarse únicamente 2 veces más sobre los filtrados (V_3 ; V_4)

- *Concentración del extracto final (V_4)*

El fiel cumplimiento del procedimiento descrito en **3.2.1.**, genera un filtrado de volumen (V_4) aproximado de 212mL. Para concentrar los compuestos antioxidante presentes en el extracto, este volumen debe evaporarse el etanol en un rotavapor BUCHI SWITZERLAND (Heating Bath B-300 Base) hasta aproximadamente la tercera parte del volumen del extracto etanólico V_4 (temperatura máxima 40°C al vacío), durante 15min y obteniendo un extracto etanólico de romero final de 95mL.

- *Almacenamiento.*

Almacenar en frasco ámbar herméticamente cerrado a una temperatura de 3 a 5°C, evitando contacto con la luz hasta el momento que se considere utilizarlo como un antioxidante de un aceite comestible según el procedimiento que se detalla.

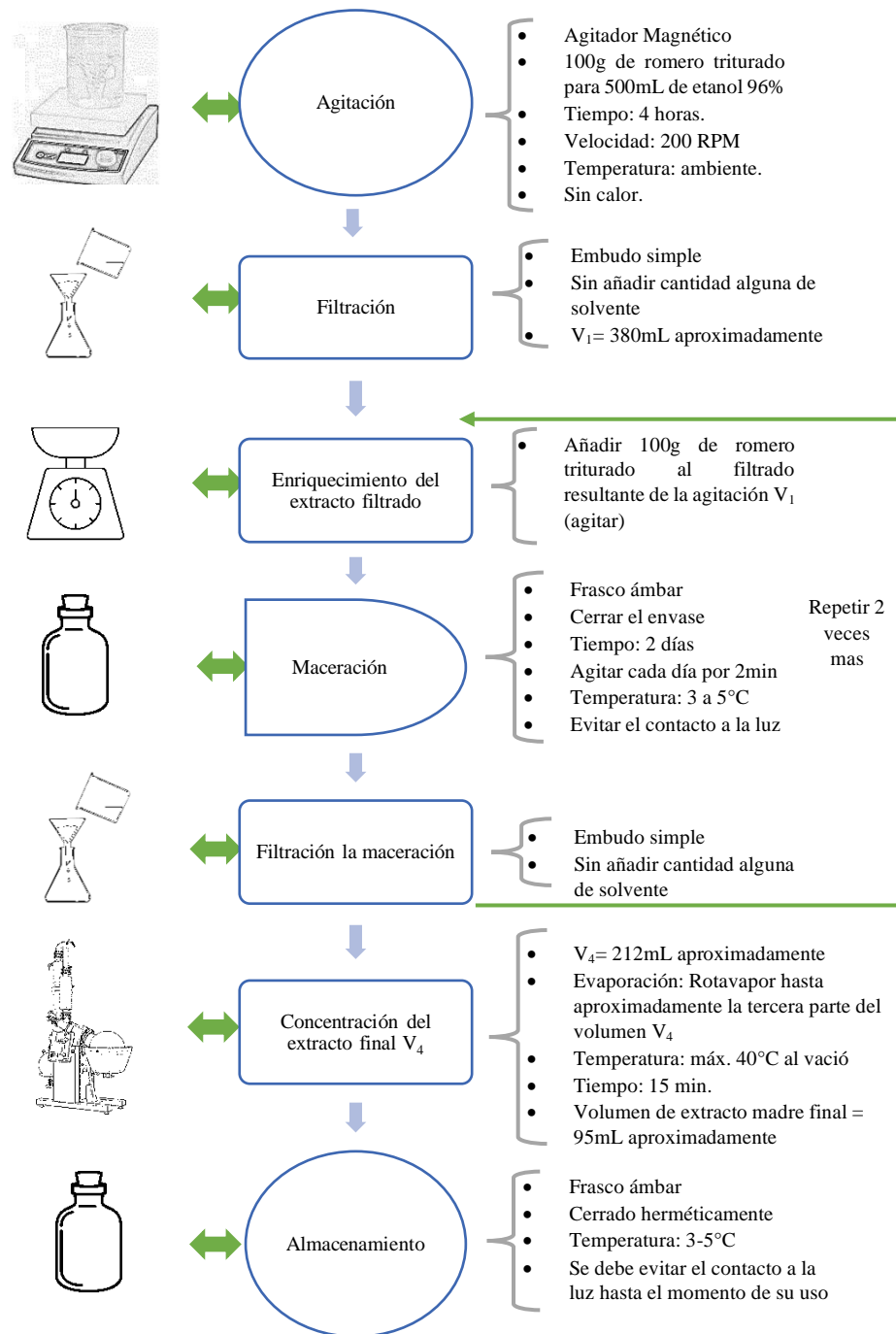


Figura 1-3. Esquema general de elaboración del extracto etanólico diseñado de romero de (Bc).

Fuente: (Erkan et al., 2008, pp.78).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Cuantitativamente el proceso diseñado generó finalmente 95mL de extracto etanólico de romero catalogado como de baja concentración (concentración madre) a partir de 400g de romero. Para el tratamiento se tomó una alícuota de volumen de extracto madre de 1mL para cada 10mL de aceite de girasol comestible (1:10), proporción que experimentalmente muestra una buena distribución (extracto: aceite).

El presente procedimiento propuesto como resultado genera un extracto que manifiesta capacidad antioxidante no muy diferenciada, respaldada en base a los resultados del efecto antioxidante que constan en el numeral **3.4.1. Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración**. Esta particularidad motivó replicar el procedimiento con mayor cantidad de hojas de romero y un mayor número de maceraciones, procedimiento que lo denominamos como *extracto etanólico diseñado de romero, versión alta concentración*.

3.7.2. Extracto etanólico diseñado de romero, versión alta concentración

El proceso de obtención del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración es idéntico al descrito en el numeral **3.2.1.** que corresponde al **Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración**, con la diferencia que en total se adicionó 600gramos de romero y se realizó un total de 5 maceraciones.

Este procedimiento se describe abreviadamente a continuación

- *Agitación*

Ver: **3.2.1. Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración**; inciso: “Agitación”.

- *Filtración*

Ver: **3.2.1. Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración**; inciso: “Filtración”.

- *Enriquecimiento de concentración del extracto filtrado*

Ver: **3.2.1. Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración**; inciso: “*Enriquecimiento de concentración del extracto filtrado*”.

- *Maceración*

Ver: **3.2.1. Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración**; inciso: “*Maceración*”.

- *Filtración de la maceración*

Ver: **3.2.1. Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración**; inciso: “*Filtración de la maceración*”.

Repetir los pasos anteriores de enriquecimiento de concentración del extracto filtrado, maceración y filtración de la maceración. Este proceso debe realizarse únicamente 4 veces más sobre los filtrados (V_3 ; V_4 ; V_5 ; V_6).

- *Concentración del extracto final (V_6)*

El fiel cumplimiento del procedimiento descrito en **3.2.2.**, genera un filtrado de volumen (V_6) aproximado de 98mL. Para concentrar los compuestos antioxidante presentes en el extracto, este volumen debe evaporarse el etanol en un rotavapor BUCHI SWITZERLAND (Heating Bath B-300 Base), hasta aproximadamente la tercera parte del volumen del extracto etanólico V_6 (temperatura máxima 40°C al vacío), durante 15min y obteniendo un extracto etanólico de romero final de 43mL.

- *Almacenamiento.*

Ver: **3.2.1. Extracto etanólico diseñado de romero, versión baja concentración**; inciso: “*Almacenamiento*”.

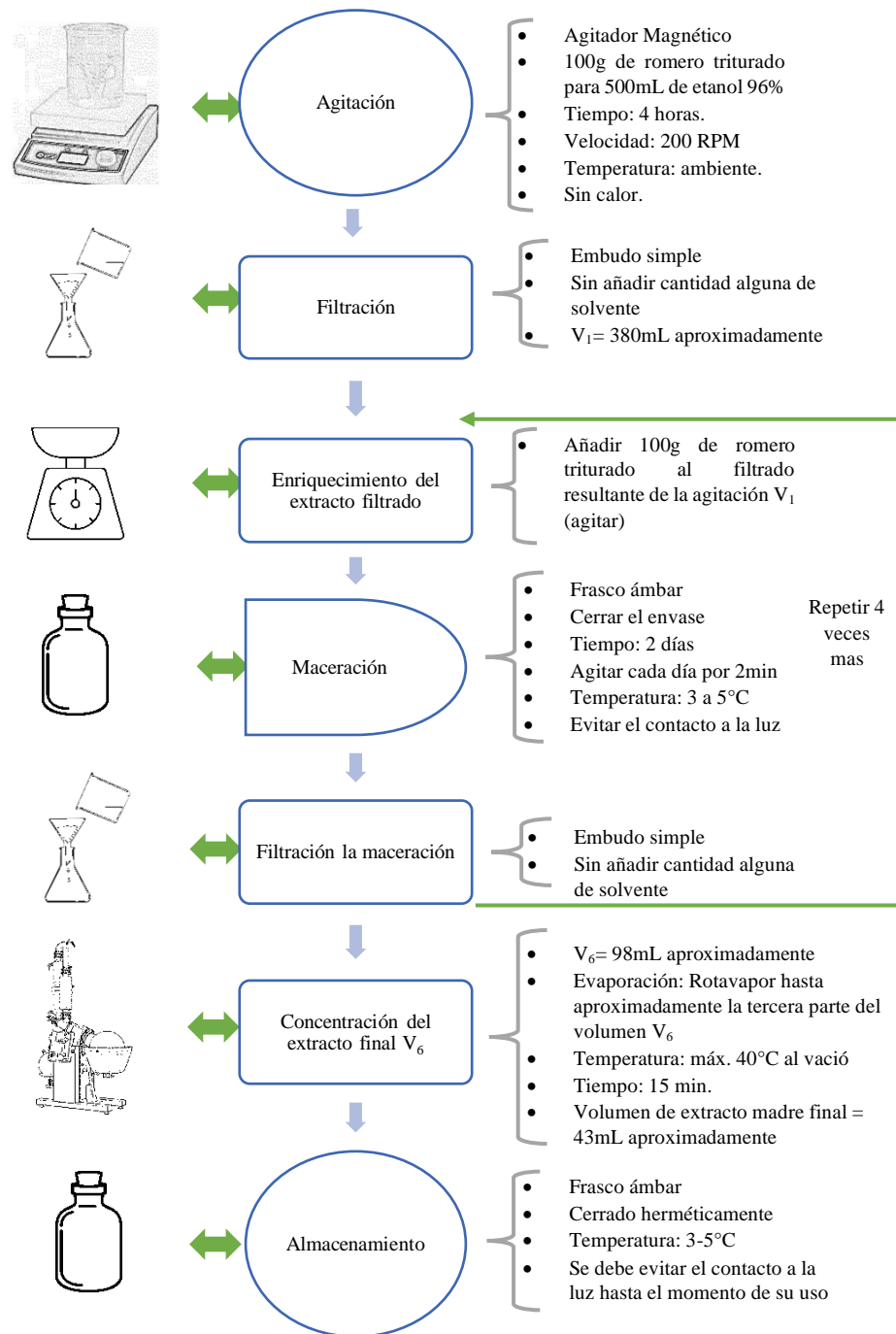


Figura 1-3. Esquema general de elaboración del extracto etanólico diseñado de romero de (Ac).

Fuente: (Erkan et al., 2008, pp.78).

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Cuantitativamente el proceso diseñado generó finalmente 43mL de extracto etanólico de romero catalogado como de alta concentración (concentración madre) a partir de 600g de romero. Para el tratamiento se tomó una alícuota de volumen de extracto madre de 1mL para cada 10mL de aceite de girasol comestible (1:10), proporción que experimentalmente muestra una buena distribución (extracto: aceite).

3.8. Tratamientos para detección del efecto antioxidante del extracto etanólico de hojas de romero sobre aceite comestible (versión baja y alta concentración)

Los tratamientos programados para la detección del efecto antioxidante se observan en la tabla siguiente.

Tabla 1-3: Tratamientos de detección del efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero de baja y alta concentración sobre el aceite de girasol.

	Concentración de extracto etanólico diseñado de romero en aceite (A0)	Tiempo de tratamiento (días)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)				Aumento del PV en cada día (meq O ₂ /Kg)	% del PV que representa cada día durante todo el proceso	% del PV por día
			R1	R2	R3	\bar{x}			
Aceite de girasol comestible sellado (testigo)	A0	0							
T2	A0	2							
T3	A0	4							
T4	A0	7							
T5	A0	9							
T6	A0	11							
T7	A0	15							
T8	A0	21							
T9	A0	23							

*Durante este estudio los tres tiempos a considerar son: 0, 4, 9 y 15 días; los otros tiempos ayudan a observar la progresión de oxidación del aceite.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

La programación de tratamientos que se observa en la tabla anterior, permite reunir valores indicadores de índice de peróxido del efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero sobre la oxidación premeditada del aceite comestible, a los 0, 4, 9 y 15 días.

3.9. Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido (Norma NTE INEN 277:1978)

3.9.1. Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración

A continuación, se observa el efecto antioxidante en base al índice de peróxido del aceite comestible premeditadamente oxidado protegido por el extracto etanólico diseñado de romero y del mismo aceite premeditadamente oxidado sin la protección del extracto etanólico diseñado de romero, a tres tiempos diferentes aparte del día 0 de oxidación.

Tabla 2-3: Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración.

	Concentración de extracto etanólico diseñado de romero en aceite (A0)	Tiempo de tratamiento (días)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)				Aumento del PV en cada día (meq O ₂ /Kg)	% del PV que representa cada día durante todo el proceso	% del PV por día
			R1	R2	R3	\bar{x}			
Aceite de girasol comestible sellado (testigo)	A0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	A0	2	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	3,09	10,71
T3	A0	4	4,00	4,00	4,00	4,00	0,00	3,09	10,71
T4	A0	7	8,00	4,00	8,00	6,67	2,67	5,15	17,86
T5	A0	9	8,00	4,00	8,00	6,67	0,00	5,15	17,86
T6	A0	11	8,00	8,00	12,00	9,33	2,67	7,22	25,00
T7	A0	15	28,00	32,00	28,00	29,33	20,00	22,68	78,57
T8	A0	17	32,00	32,00	32,00	32,00	2,67	24,74	85,71
T9	A0	23	32,00	40,00	40,00	37,33	5,33	28,87	100,00

*Durante este estudio los tres tiempos a considerar son: 0, 4, 9 y 15 días; los otros tiempos ayudan a observar la progresión de oxidación del aceite.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Tabla 3-3: Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible sin protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración.

	Tiempo de tratamiento (días)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)				Aumento del PV en cada día (meq O ₂ /Kg)	% del PV que representa cada día durante todo el proceso	% del PV por día
		R1	R2	R3	\bar{x}			
Aceite de girasol comestible sellado (testigo)	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	2	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	3,73	17,00
T3	4	16,00	16,00	12,00	14,67	6,67	6,83	31,00
T4	7	16,00	16,00	20,00	17,33	2,67	8,07	36,00
T5	9	16,00	16,00	20,00	17,33	0,00	8,07	36,00
T6	11	20,00	20,00	20,00	20,00	2,67	9,32	42,00
T7	15	40,00	40,00	48,00	42,67	22,67	19,88	89,00
T8	17	48,00	48,00	44,00	46,67	4,00	21,74	97,00
T9	23	48,00	56,00	40,00	48,00	1,33	22,36	100,00

*Durante este estudio los tres tiempos a considerar son: 0, 4, 9 y 15 días; los otros tiempos ayudan a observar la progresión de oxidación del aceite.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

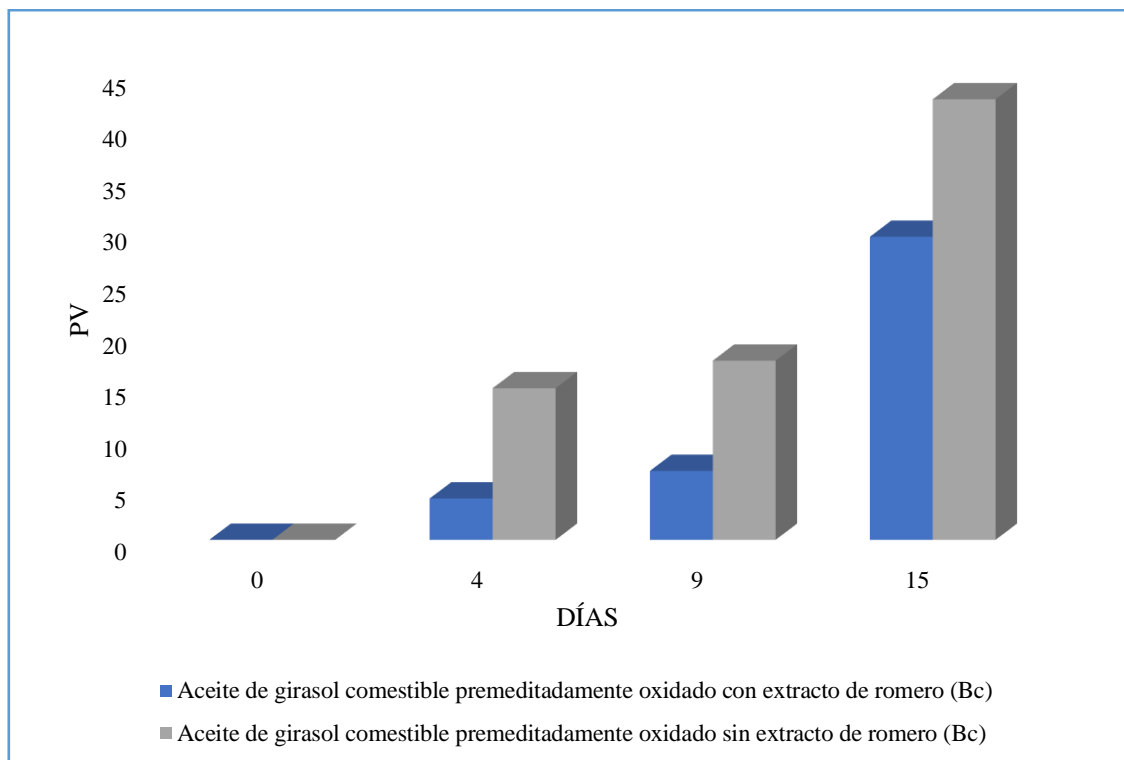


Gráfico 1-3. Efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Bc) sobre aceite girasol premeditadamente oxidado.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

El aceite de girasol premeditadamente oxidado, protegido *con* el extracto etanólico diseñado de romero de Bc en los días 4; 9 y 15 presenta un PV de 4,00; 6,67 y 29,33meq O₂/Kg respectivamente; mientras que el aceite de girasol premeditadamente oxidado *sin* la protección del extracto etanólico diseñado de romero de Bc, presenta valores de PV más altos en los días 4; 9 y 15, de: 14,67; 17,33 y 42,67meq O₂/Kg respectivamente, es importante mencionar que en el día 0 los dos aceites de girasol comestible presentan un PV de 0,00meq O₂/Kg, los cuales constituyen ser testigos del efecto oxidante en el aceite tratado con extracto antioxidante de romero y el aceite sin extracto antioxidante.

Los resultados obtenidos del PV del aceite de girasol premeditadamente oxidado *sin* la protección del extracto etanólico de romero de Bc indican que existe una mayor oxidación en relación al aceite premeditadamente oxidado *con* protección del extracto etanólico diseñado de romero de Bc, esto indica que el extracto etanólico diseñado de romero de Bc otorga una actividad antioxidante.

La variación del PV del aceite de girasol premeditadamente oxidado *con* y *sin* protección del extracto etanólico diseñado de romero de Bc, puede ser discutida desde el punto de vista desde el porcentaje de protección que ha mostrado en los tratamientos realizados, estos porcentajes se observan en la Tabla 4-3.

Es importante mencionar que el 100,00% de oxidación del aceite sin protección se atribuye a la oxidación alcanzada en 15 día (PV 42,67meq O₂/Kg), valor con el cual se procede a evaluar el porcentaje de oxidación en cada uno de los días en la versión de protegida con el extracto y la no protegida con el extracto.

El porcentaje de protección en cada día se obtiene por diferencia del 100,00% de oxidación. En el presente trabajo el referente para observar el efecto antioxidante es de 15 días, pues no excluye la oxidación progresiva a mayores días, sin embargo, en el trabajo realizado lo prioritario es detectar el efecto antioxidante que si se ha observado hasta el día 15 por parte del extracto etanólico diseñado de romero de Bc.

Tabla 4-3: Comparación (PV) del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Bc) del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado.

Tiempo de tratamiento (días)	Aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado					
	Con extracto de romero (Bc)			Sin extracto de romero (Bc)		
	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)	% de oxidación. (0-15 días)	% de protección. (0-15 días)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)	% de oxidación. (0-15 días)	% de protección. (0-15 días)
0	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00
4	4,00	9,37	90,63	14,67	34,38	65,62
9	6,67	15,63	84,37	17,33	40,61	59,39
15	29,33	68,74	31,26	42,67	100,00	0,00

*El PV del día 15 se considera como el 100% de oxidación.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

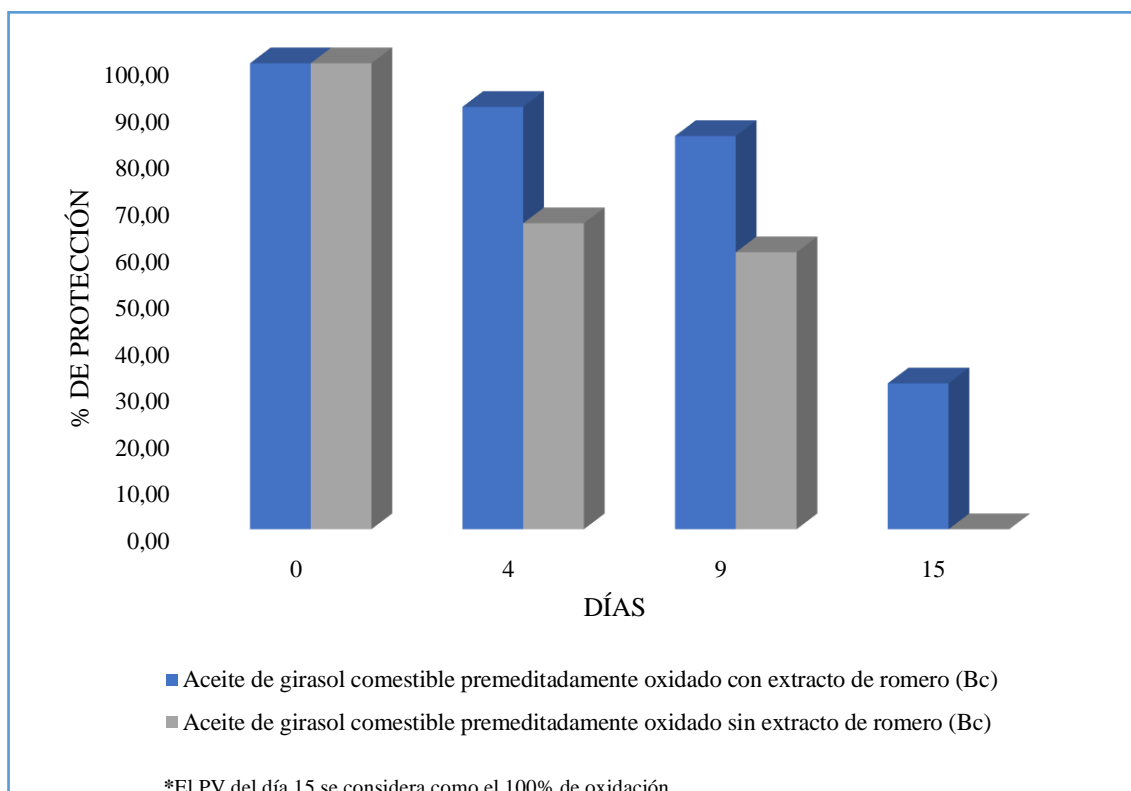


Gráfico 2-3. Comparación del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Bc) del aceite de girasol premeditadamente oxidado.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

En los resultados observados en el Gráfico 2-3 se considera una protección inicial del 100,00% en el día 0 en ambos aceites, es así que el aceite de girasol premeditadamente oxidado protegido *con* el extracto etanólico diseñado de romero de Bc en los días 4; 9 y 15 se observa un porcentaje de protección de 90,63; 84,37 y 31,26% respectivamente; mientras que el aceite de girasol premeditadamente oxidado *sin* la protección del extracto etanólico diseñado de romero de Bc, comparativamente presenta una disminución del porcentaje de protección, en los días 4; 9 y 15 con porcentaje de protección de 65,62; 59,39 y 0,00% respectivamente, es necesario mencionar que en el estudio se ha realizado una oxidación forzada usando luz y aire ambiental.

Finalmente se puede afirmar que el aceite *con* el extracto etanólico diseñado de romero de Bc, si otorga una protección efectiva al aceite, al comparar con el aceite que no tiene la presencia del extracto de etanólico diseñado de romero en los diferentes tiempos considerados, evitando de ese modo la generación de radicales libres. Para que el resultado del efecto antioxidante sea más notorio, experimentalmente motivó realizar el mismo procedimiento con un extracto etanólico más concentrado de hojas de romero con el mismo diseño de elaboración del extracto de baja concentración.

3.9.1.1. Prueba de hipótesis

Los índices de peróxido de la Tabla 5-3 del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado protegido con el extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración a 3 tiempos, fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA de un solo factor utilizando el programa Excel 2019, con un diseño completamente al azar y tres repeticiones por cada día.

A continuación, en la siguiente tabla se encuentran resumido los índices de peróxido de los tratamientos realizados.

Tabla 5-3: Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración.

REPETICIONES	TRATAMIENTOS			
	T0 (DÍA 0) sin extracto	T1 (DÍA 4)	T2 (DÍA 9)	T3 (DÍA 15)
R1	0,00	4,00	8,00	28,00
R2	0,00	4,00	4,00	32,00
R3	0,00	4,00	8,00	32,00
PROMEDIO	0,00	4,00	6,67	30,67

T= Tratamiento de oxidativo de aceite de girasol a distintos tiempos
R= Repeticiones

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Tabla 6-3: Análisis de varianza de un factor ANOVA.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
DÍA 4	3,00	12,00	4,00	0,00		
DÍA 9	3,00	20,00	6,67	5,33		
DÍA 15	3,00	92,00	30,67	5,33		
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1294,22	2,00	647,11	182,00	4,26x10 ⁻⁶	5,14
Dentro de los grupos	21,33	6,00	3,56			
Total	1315,56	8,00				

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Tabla 7-3: Comprobación de la hipótesis.

Probabilidad y Significancia		Prueba de Fisher	
ACEPTA Ho	Si Valor de $P > \alpha$	ACEPTA Ho	Si $F_{cal} < F_{crít}$
RECHAZA Ho	Si Valor de $P < \alpha$	RECHAZA Ho	Si $F_{cal} > F_{crít}$
$4,26 \times 10^{-6} < 0,05$		$182,00 > 5,14$	
Durante este estudio se determinó que P es menor que α , por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa con un nivel de confianza del 95%		Durante este estudio se determinó que Fcal es mayor que Fcrít, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa con un nivel de confianza del 95%	
Ho= Hipótesis nula P= probabilidad Fcal= F calculado Fcrít= F crítico			

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

La prueba de ANOVA con un nivel de confianza del 95% realizada permite aceptar la hipótesis alternativa, es decir que el extracto etanólico diseñado de romero si tiene un efecto antioxidante sobre un aceite comestible, en este estudio experimentalmente de un aceite premeditadamente oxidado a diferentes tiempos.

Tabla 8-3: Prueba de Tukey.

DATOS	Diferencia honesta significativa	HSD=	4,73
		Multiplicador=	4,34
	Cuadrado del error medio	Mse=	3,56
		n=	3,00
	A	B	C
A		<u>-2,67</u>	-26,67
B	<u>2,67</u>		-24,00
C	26,67	24,00	

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

La prueba de Tukey permite observar que si hay diferencia significativa en el tratamiento aplicado al aceite de girasol premeditadamente oxidado con el extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración en los tiempos considerados.

3.9.2. Evaluación del efecto antioxidante con la prueba del índice de peróxido del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración

A continuación, se observa el efecto antioxidante en base al índice de peróxido del aceite comestible premeditadamente oxidado protegido por el extracto etanólico diseñado de romero y del mismo aceite premeditadamente oxidado sin la protección del extracto etanólico diseñado de romero, a tres tiempos diferentes, aparte del día 0 de oxidación.

Tabla 9-3: Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración.

	Concentración de extracto etanólico diseñado de romero en aceite (A0)	Tiempo de tratamiento (días)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)				Aumento del PV en cada día (meq O ₂ /Kg)	% del PV que representa cada día durante todo el proceso	% del PV por día
			R1	R2	R3	\bar{x}			
Aceite de girasol comestible sellado (testigo)	A0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	A0	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T3	A0	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T4	A0	7	4,00	0,00	4,00	2,67	2,67	5,00	15,38
T5	A0	9	4,00	4,00	4,00	4,00	1,33	7,50	23,08
T6	A0	11	8,00	4,00	8,00	6,67	2,67	12,50	38,46
T7	A0	15	12,00	8,00	8,00	9,33	2,67	17,50	53,85
T8	A0	21	12,00	16,00	16,00	14,70	5,33	26,83	84,62
T9	A0	23	16,00	20,00	16,00	17,33	2,67	31,71	100,00

*Durante este estudio los tres tiempos a considerar son: 0, 4, 9 y 15 días; los otros tiempos ayudan a observar la progresión de oxidación del aceite.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Tabla 10-3: Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible sin protección del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración.

	Tiempo de tratamiento (días)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)				Aumento del PV en cada día (meq O ₂ /Kg)	% del PV que representa cada día durante todo el proceso	% del PV por día
		R1	R2	R3	\bar{x}			
Aceite de girasol comestible sellado (testigo)	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	2	8,00	8,00	4,00	6,67	6,67	3,27	15,00
T3	4	16,00	8,00	12,00	12,00	5,33	5,88	26,00
T4	7	16,00	16,00	16,00	16,00	4,00	7,84	35,00
T5	9	16,00	16,00	20,00	17,33	1,33	8,50	38,00
T6	11	20,00	20,00	20,00	20,00	2,67	9,80	44,00
T7	15	40,00	40,00	44,00	41,33	21,33	20,26	91,00
T8	21	48,00	48,00	40,00	45,33	4,00	22,08	97,00
T9	23	48,00	44,00	48,00	46,67	1,33	22,73	100,00

*Durante este estudio los tres tiempos a considerar son: 0, 4, 9 y 15 días; los otros tiempos ayudan a observar la progresión de oxidación del aceite.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

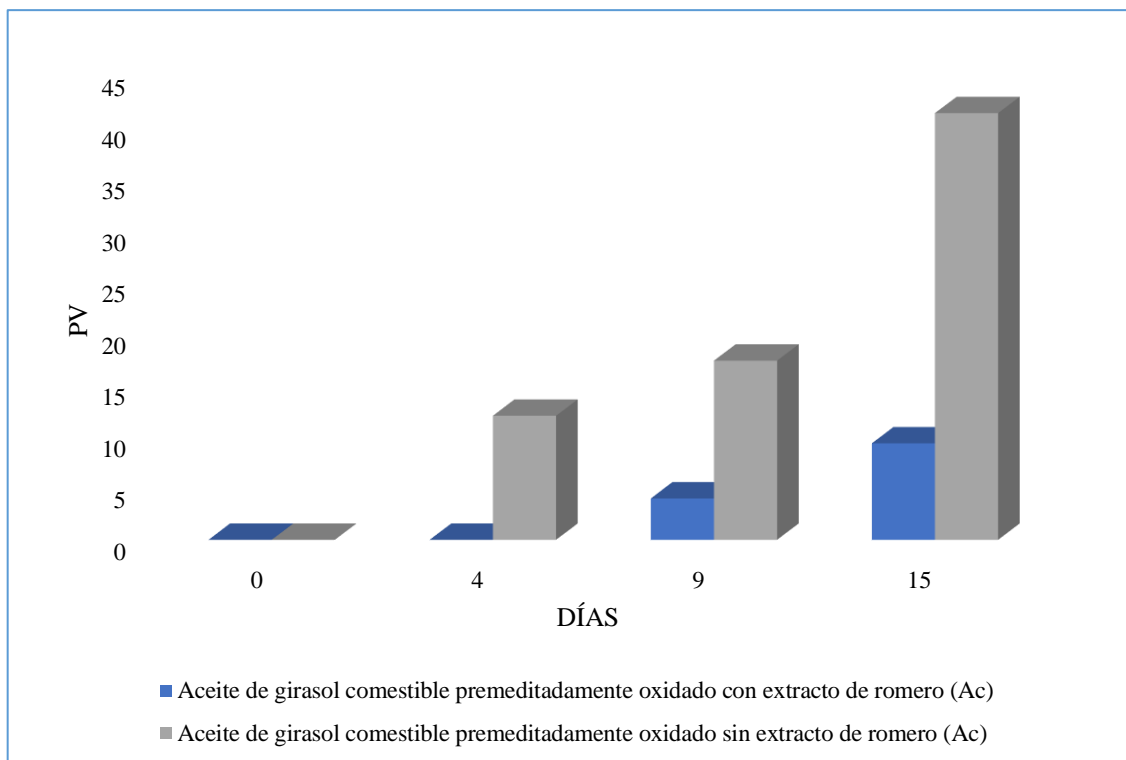


Gráfico 3-3. Efecto antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Ac) sobre aceite girasol premeditadamente oxidado.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

El aceite de girasol premeditadamente oxidado, protegido *con* el extracto etanólico diseñado de romero de Ac en los días 4; 9 y 15 presenta un PV de 0,00; 4,00 y 9,33meq O₂/Kg respectivamente; mientras que el aceite de girasol premeditadamente oxidado *sin* la protección del extracto etanólico diseñado de romero de Ac, presenta valores de PV más altos en los días 4; 9 y 15, de: 12,00; 17,33 y 41,33meq O₂/Kg respectivamente, es importante mencionar que en el día 0 los dos aceites de girasol comestible presentan un PV de 0,00meq O₂/Kg, los cuales constituyen ser testigos del efecto oxidante en el aceite tratado con extracto antioxidante de romero y el aceite sin extracto antioxidante.

Los resultados obtenidos del PV del aceite de girasol premeditadamente oxidado *sin* la protección del extracto etanólico de romero de Ac indican que existe una mayor oxidación en relación al aceite premeditadamente oxidado *con* protección del extracto etanólico diseñado de romero de Ac, esto indica que el extracto etanólico diseñado de romero de Ac otorga una actividad antioxidante.

La variación del PV del aceite de girasol premeditadamente oxidado *con* y *sin* protección del extracto etanólico diseñado de romero de Ac, puede ser discutida desde el punto de vista desde el porcentaje de protección que ha mostrado en los tratamientos realizados, resultados que se observan en la Tabla 11-3.

Es importante mencionar que el 100,00% de oxidación del aceite sin protección se atribuye a la oxidación alcanzada en el día 15 (PV 41,33 meq O₂/Kg), valor con el cual se procede a evaluar el porcentaje de oxidación en cada uno de los días tanto del aceite protegido con el extracto y el aceite no protegido con el extracto.

El porcentaje de protección en cada día se obtiene por diferencia del 100% de oxidación. En el presente trabajo el referente para observar el efecto antioxidante es de 15 días, pues no excluye la oxidación progresiva a mayores días, sin embargo, en el trabajo realizado lo prioritario es detectar el efecto antioxidante que si se ha observado hasta el día 15 por parte del extracto etanólico diseñado de romero de Ac.

Tabla 11-3: Comparación (PV) del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Ac) del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado.

Tiempo de tratamiento (días)	Aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado					
	Con extracto de romero (Ac)			Sin extracto de romero (Ac)		
	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)	% de oxidación. (0-15 días)	% de protección. (0-15 días)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)	% de oxidación. (0-15 días)	% de protección. (0-15 días)
0	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00
4	0,00	0,00	100,00	12,00	29,03	70,97
9	4,00	9,68	90,32	17,33	41,93	58,07
15	9,33	22,57	77,43	41,33	100,00	0,00

*El PV del día 15 se considera como el 100% de oxidación

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

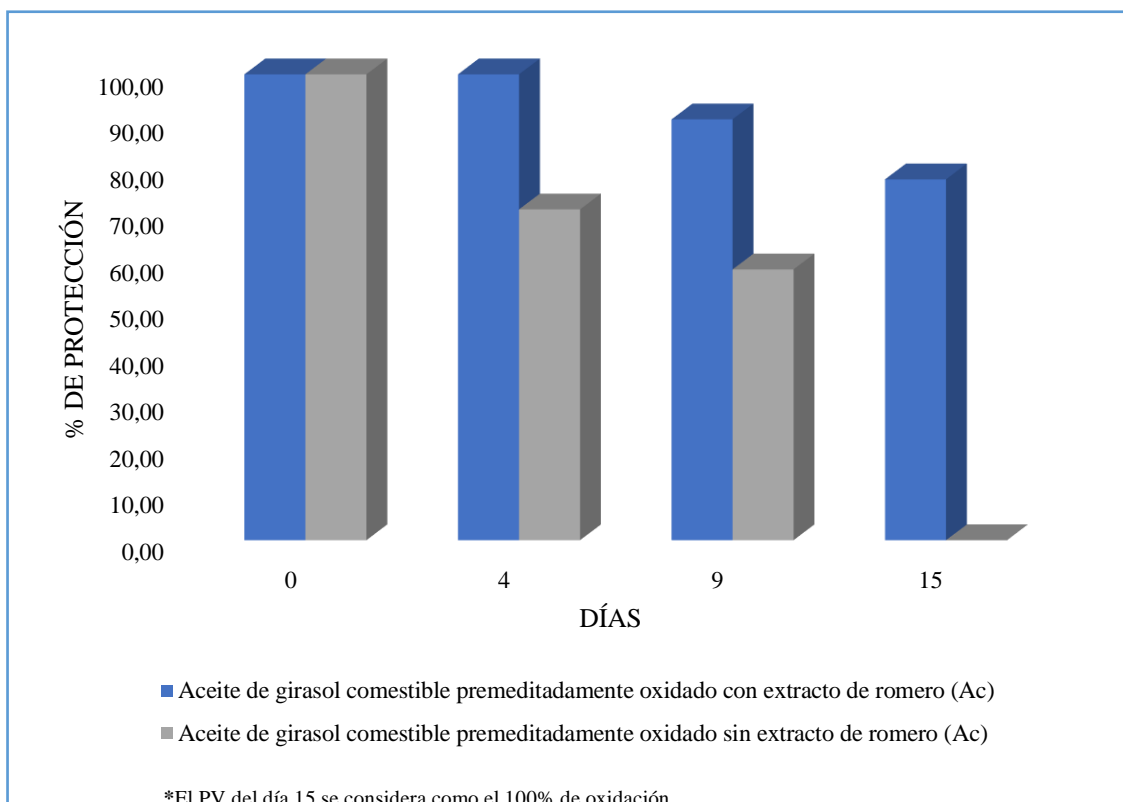


Gráfico 4-3. Comparación del porcentaje de protección antioxidante del extracto etanólico diseñado de romero (Ac) del aceite de girasol premeditadamente oxidado.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

En los resultados observados en el Gráfico 4-3 se considera una protección inicial del 100,00% en el día 0 en ambos aceites, es así que el aceite de girasol premeditadamente oxidado protegido *con* el extracto etanólico diseñado de romero de Ac en los días 4; 9 y 15 se observa un porcentaje de protección de 100,00; 90,32; y 77,43% respectivamente; mientras que el aceite de girasol premeditadamente oxidado *sin* la protección del extracto etanólico diseñado de romero de Ac, comparativamente presenta una disminución del porcentaje de protección, en los días 4; 9 y 15 con porcentaje de protección de 70,97; 58,07 y 0,00% respectivamente, es necesario mencionar que en el estudio se ha realizado una oxidación forzada usando luz y aire ambiental.

Finalmente se puede afirmar que el aceite *con* el extracto etanólico diseñado de romero de Ac, si otorga una protección efectiva al aceite, al comparar con el aceite que no tiene la presencia del extracto de etanólico diseñado de romero en los diferentes tiempos considerados, evitando de ese modo la generación de radicales libres.

3.9.2.1. Prueba de hipótesis

Los índices de peróxido de la Tabla 12-3 del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado protegido con el extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración a 3 tiempos, fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA de un solo factor utilizando el programa Excel 2019, con un diseño completamente al azar y tres repeticiones por cada día.

A continuación, en la siguiente tabla se encuentra resumido los índices de peróxido de los tratamientos realizados.

Tabla 12-3: Índices de peróxido de la oxidación premeditada del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración.

REPETICIONES	TRATAMIENTOS			
	T0 (DÍA 0) sin extracto	T1 (DÍA 4)	T2 (DÍA 9)	T3 (DÍA 15)
R1	0,00	0,00	4,00	12,00
R2	0,00	0,00	4,00	8,00
R3	0,00	0,00	4,00	8,00
PROMEDIO	0,00	0,00	4,00	9,33

T= Tratamiento de oxidativo de aceite de girasol a distintos tiempos
R= Repeticiones

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Tabla 13-3: Análisis de varianza de un factor ANOVA.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
DÍA 4	3,00	0,00	0,00	0,00		
DÍA 9	3,00	12,00	4,00	0,00		
DÍA 15	3,00	28,00	9,33	5,33		
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	131,56	2,00	65,78	37,00	4,2x10 ⁻⁴	5,14
Dentro de los grupos	10,67	6,00	1,78			
Total	142,22					

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Tabla 14-3: Comprobación de la hipótesis.

Probabilidad y Significancia		Prueba de Fisher	
ACEPTA Ho	Si Valor de $P > \alpha$	ACEPTA Ho	Si $F_{cal} < F_{crít}$
RECHAZA Ho	Si Valor de $P < \alpha$	RECHAZA Ho	Si $F_{cal} > F_{crít}$
$4,2 \times 10^{-4} < 0,05$		$37,00 > 5,14$	
Durante este estudio se determinó que P es menor que α , por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa con un nivel de confianza del 95%		Durante este estudio se determinó que F_{cal} es mayor que $F_{crít}$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa con un nivel de confianza del 95%	
Ho= Hipótesis nula P= probabilidad Fcal= F calculado Fcrít= F crítico			

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

La prueba de ANOVA con un nivel de confianza del 95% realizada permite aceptar la hipótesis alternativa, es decir que el extracto etanólico diseñado de romero si tiene un efecto antioxidante sobre un aceite comestible, en este caso experimentalmente de un aceite premeditadamente oxidado a diferentes tiempos.

Tabla 15-3: Prueba de Tukey.

DATOS	Diferencia honesta significativa	HSD=	3,34
		Multiplicador=	4,34
	Cuadrado del error medio	Mse=	1,78
		n=	3,00
	A	B	C
A		-4,00	-9,33
B	4,00		-5,33
C	9,33	5,33	

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

La prueba de Tukey permite observar que si hay diferencia significativa en el tratamiento aplicado al aceite de girasol premeditadamente oxidado con el extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración en los tiempos considerados.

3.9.3. Efecto antioxidante comparativo (PV) entre el extracto etanólico diseñado de romero de alta y baja concentración

Tabla 16-3: Índices de peróxido del tratamiento oxidativo del aceite de girasol comestible con protección del extracto etanólico diseñado de romero de baja y alta concentración.

Tiempo de tratamiento (días)	Aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado	
	Con extracto de romero (Bc)	Con extracto de romero (Ac)
	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)	Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)
0	0,00	0,00
4	4,00	14,67
9	6,67	17,33
15	29,33	42,67

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

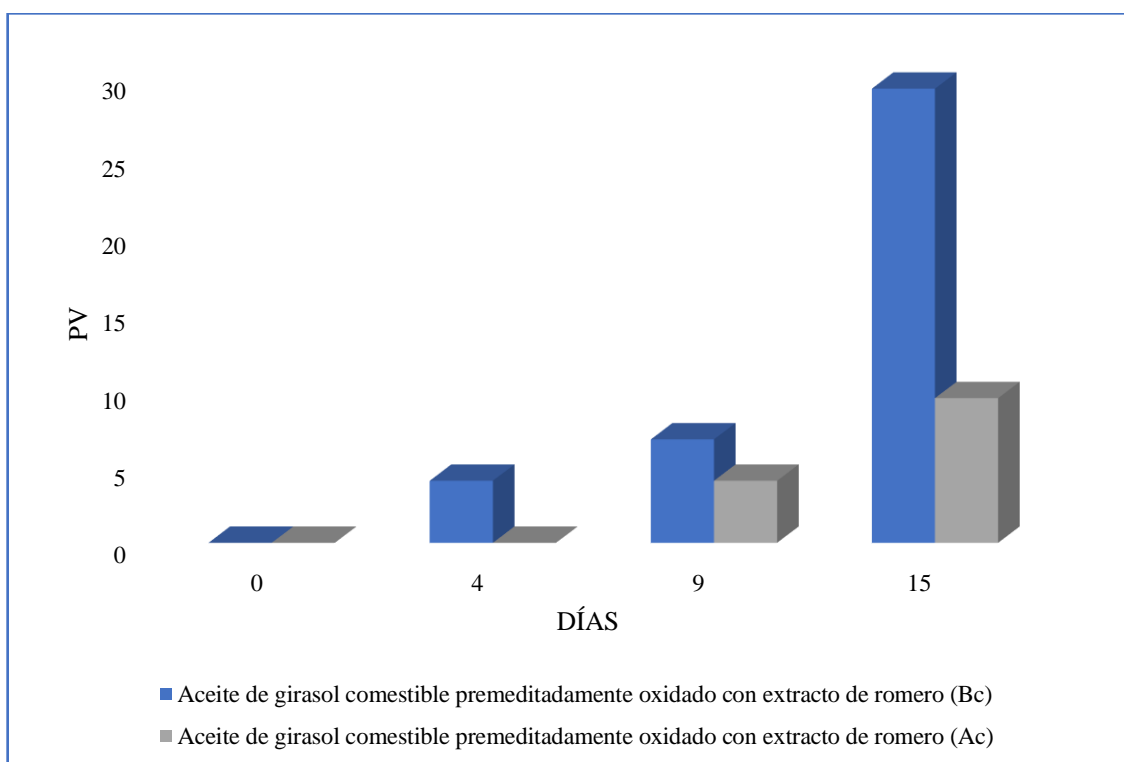


Gráfico 5-3. Comparación del efecto antioxidante entre el extracto etanólico diseñado de romero (Bc) y (Ac) sobre aceite girasol premeditadamente oxidado.

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Según lo manifestado por NTE INEN 26 (2012, p.2) el índice de peróxido en el aceite de girasol comestible oscila un rango aceptable de 0,00 a 10,00meqO₂/Kg, dando a notar que el extracto etanólico diseñado de romero de Ac puede mantener las características del aceite de girasol hasta el día 15, debido a que presenta un índice de peróxido de 9,33meqO₂/Kg, evitando la oxidación y por consiguiente la generación de radicales libres.

No obstante, hasta el día 15 el extracto etanólico diseñado de romero de Bc presenta un índice de peróxido de 29,33 meqO₂/Kg, mientras que el extracto etanólico diseñado de romero de Ac presenta un índice de peróxido de 9,33meqO₂/Kg, por tal motivo el extracto etanólico diseñado de romero de Ac permite conservar por más tiempo el aceite de girasol incluso cumpliendo con la normativa NTE INEN 26 (2012, p. 2).

El romero le otorga cambios organolépticos bastante notorios al aceite sobre todo en su color dándole en los primeros días un color verde por la presencia de clorofila en la planta, pero con el pasar de los días el color tiende aclararse a un amarillo claro, pero a más de esto le otorga al aceite un olor agradable característico al romero.

3.9.4. Análisis organoléptico del aceite comestible comercial de girasol y de su tratamiento antioxidante con extracto de romero de baja y alta concentración

Tabla 17-3: Características organolépticas del aceite de girasol premeditadamente oxidado y de los tratamientos antioxidantes con el extracto de romero de Bc y Ac concentración.

	DÍA	COLOR	OLOR	ASPECTO
ACEITE OXIDADO + EXTRACTO DE ROMERO (BC)	0	Verde Claro	Característico a romero	Líquido
	4	Verde Oscuro	Característico a romero	Líquido y Sedimentado
	9	Amarillo Oscuro	Característico a romero	Líquido y Sedimentado
	15	Amarillo Claro	No se puede apreciar ningún olor	Líquido y Sedimentado
ACEITE OXIDADO + EXTRACTO DE ROMERO (AC)	0	Verde Oscuro	Característico a romero	Líquido
	4	Verde Oscuro	Característico a romero	Líquido y Sedimentado
	9	Café	Característico a romero	Líquido y Sedimentado
	15	Amarillo Oscuro	Característico a romero	Líquido y Sedimentado
ACEITE OXIDADO	0	Característico	Característico	Líquido
	4	Característico	Característico	Líquido
	9	Característico	Rancio	Ligeramente turbio
	15	Característico	Rancio	Ligeramente turbio

Realizado por: Naranjo, A. 2021.

Durante este estudio se puede evidenciar cambios en las características organolépticas del aceite de girasol premeditadamente oxidado con y sin el extracto etanólico diseñado de romero de baja y alta concentración, es así como el aceite de girasol premeditadamente oxidado durante los 15 días mantiene su color característico, no obstante, a partir del día 9 el olor es rancio y con un aspecto ligeramente turbio.

Mientras que el extracto etanólico de romero de Bc y Ac, otorga al aceite un olor agradable característico a romero, el color con el pasar de los días cambia de verde por la presencia de clorofila a un amarillo y manteniendo el aspecto líquido característico con un ligero sedimento. El extracto etanólico diseñado de romero mejora las características organolépticas del aceite principalmente otorgando un olor agradable.

CONCLUSIONES

La adecuada recolección de las plantas de romero y las condiciones óptimas de secado, separación selectiva y trituración de las hojas de la especie *Rosmarinus officinalis L.* garantizan la presencia activa de compuestos antioxidantes como el ácido carnósico y carnosol, afirmación respaldada en los resultados obtenidos del índice de peróxido realizado en este estudio.

Los resultados de la presente investigación demuestran que el extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración permite un mejor efecto antioxidante para el aceite comestible de girasol premeditadamente oxidado en relación al de baja concentración. Diseño que se efectuó mediante el enriquecimiento progresivo (cinco repeticiones) de 600gramos de hojas de romero con un total de 500mL de etanol (96%) y finalmente concentrado hasta un volumen de 43mL. Además, se concluye que las proporciones de extracto etanólico de romero y aceite de girasol comestible (1:10) muestran adecuada y homogénea solubilidad.

Los tratamientos del aceite de girasol comestible con y sin extracto etanólico de hojas de romero sometidos a un proceso oxidativo premeditado y progresivo de 0, 4, 9 y 15 días, permite medir el porcentaje de actividad antioxidante de los principios activos presentes en el vegetal utilizando la prueba del índice de peróxido.

El porcentaje de oxidación progresivo del aceite de girasol comestible premeditadamente oxidado disminuye en los tiempos propuestos para los tratamientos. Al comparar el aceite no protegido con el protegido con el extracto etanólico diseñado de romero se confirma su efecto antioxidante con los siguientes resultados: (día 0: 0,00%, se mantiene en 0,00%), (día 4: de 29,03% disminuye a 0,00%), (día 9: de 41,93% disminuye a 9,68%) y (día 15: de 100,00% disminuye a 22,57%), concluyendo que el efecto antioxidante del extracto etanólico de romero puede ser aplicativamente utilizado en aceites previos a su refinación.

RECOMENDACIONES

Observando que el extracto de romero tiene una actividad antioxidante se podría realizar un estudio de ese efecto sobre aceites refinados como sustituto de antioxidantes sintéticos.

La limpieza de las hojas de romero se debe realizar con agua corriente y el secado suspendiéndolas en el aire en ausencia de luz, con esto se evitará que en la planta se pueda alojar algún tipo de hongo o parásito que afecte su uso en el estudio.

Es esencial que la planta de romero se encuentre seca para su fácil desprendimiento de la hoja y del tallo, para así lograr una mejor maceración.

Es recomendable que la maceración y el almacenamiento se realice en condiciones de refrigeración, esto permitirá que los componentes que le otorgan la actividad antioxidante se conserven hasta su uso.

Durante la concentración del extracto en el rotavapor al vacío se debe controlar los factores del tiempo y la temperatura que se aplica al solvente.

Los aceites comestibles se recomiendan almacenar oculto de la luz y cerrados a pesar de que contienen antioxidantes sintéticos.

El extracto de romero debe ser aplicado en el aceite en una cantidad pequeña, ya que un antioxidante en mínimas cantidades debe cumplir con su finalidad.

Durante el análisis del índice de peróxido es necesario que se prepare el yoduro de potasio en ese instante hasta su saturación.

GLOSARIO

Aceite comestible: Los aceites comestibles son de origen vegetal o animal, en su mayoría son de origen vegetal, estos son aptos para el consumo humano y se mantiene líquidos al medio ambiente (Guerrero, 2016, p.12).

Aceite comestible de girasol: Es un aceite de origen vegetal proveniente de las semillas de girasol, el cual es destinado al consumo humano y sujeto a normas que regulan su expendio y comercialización (Guerrero, 2016, p.12).

Antioxidante: Son sustancias ya sean de origen natural o sintético que tienen como objetivo prevenir o retardar la oxidación por la formación de radicales libres de esta forma evitando problemas graves para la salud (Coronado et al., 2015, p.2).

Concentración: Es una magnitud química la cual permite medir la cantidad de un soluto o solvente que se encuentra en una disolución, esto puede ser expresado en unidades de volumen (Erkan et al., 2008, p.78).

Extracto Diseñado: Proceso detallado de la elaboración de un extracto en el ámbito de una investigación particular (Erkan et al., 2008, p.78).

Índice de peróxido: Es un análisis que se realiza ya sea en aceites o grasas que permite determinar el estado de oxidación que está sufriendo la muestra analizada, esto es expresado en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra ya sea aceite o grasa (NTE INEN 277, 1978, p.1).

Maceración: Es un proceso que busca extraer los compuestos químicos que se encuentran presentes en una materia prima en estado sólido, haciendo uso de solventes que sean afines al compuesto al que se desea extraer, cambiando diferentes factores como luz, temperatura, agitación, entre otros (Erkan et al., 2008, p.78).

Oxidación en aceites: Es un proceso irreversible que se da en los aceites al momento que el oxígeno del ambiente se pone en contacto con el aceite, debido a esto se genera una pérdida de electrones generándose compuestos inestables como son los radicales libres (Coronado et al., 2015, p.2).

Oxidación premeditada: Proceso detallado y programado de oxidación de una muestra de aceite para aplicar en una investigación particular (Coronado et al., 2015, p.2).

Radicales libres: Los radicales libres son moléculas las cuales han perdido un electrón, esto le convierte en una molécula muy inestable y reactiva la cual reaccionará con otra molécula para tomar un electrón por medio del proceso de oxidación (Coronado et al., 2015, p.2).

BIBLIOGRAFÍA

- ALOMAR, M.** *Antioxidante: captadores de radicales libres ó sinónimo de salud* [en línea]. 2007. [Consulta: 20 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.soarme.com/archivos/1324143195.pdf>
- AVELLO, M.; & SUWALSKY, M.** "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección". *Scielo* [en línea], 2006, pp. 161-172. [Consulta: 05 noviembre 2020]. ISSN 0718-0462. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/atenea/n494/art10.pdf>
- BIRTIC, S.; DUSSORT, P.; PIERRE, F.; BILY, A.; & ROLLER, B.** "Carnosic acid". *Science Direct* [en línea], 2015, pp. 9-19. [Consulta: 12 noviembre 2020]. ISSN 00319422. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942214005585>
- CALIXTO, F.** "Antioxidantes macromoleculares: importancia en salud y perspectivas". *Archivos de Medicina del Deporte* [en línea], 2017, pp. 188-189. [Consulta: 15 noviembre 2020]. ISSN 02128799. Disponible en: http://archivosdemedicinadeldeporte.com/articulos/upload/EDITORIAL_180.pdf
- CLAYTON, A.** " Determinación del índice de peróxido para alimentos, aceites y grasas vegetales o animales ". *Colpos.Mx* [en línea], 1987, pp. 3-6. [Consulta: 10 diciembre 2020]. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- CORONADO, H.; VEGA, S.; GUTIÉRREZ, R.; VÁZQUEZ, M.; & RADILLA, C.** " Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana ". *Scielo* [en línea], 2015, (Chile) 42, pp. 206-212. [Consulta: 18 noviembre 2020]. ISSN 07177518. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
- ERKAN, N.; AYRANCI, G.; & AYRANCI, E.** " Actividades antioxidantes de romero (*Officinalis Rosmarinus FFI L.*), Extracto de blackseed (*Nigella sativa L.*) aceite esencial, ácido carnósico, ácido rosmarínico y sesamol". *ScienceDirect* [en línea], 2008, pp. 76-82. [Consulta: 21 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/222138166_Antioxidant_activities_of_rosemary_Rosmarinus_Officinalis_L_extract_blackseed_Nigella_Sativa_L_essential_oil_carnosic_acid_rosmarinic_acid_and_sesamol

- ESPINOZA, A.; & ZAPATA, L.** *Estudio de aceites vegetales comestibles* [en línea]. 2010. pp. 1-32. [Consulta: 14 diciembre 2020]. Disponible en: <http://www.odecu.cl/wp-content/uploads/2017/12/2010-estudio-aceites-vegetales.pdf>
- ESTAR, L.** *Producción de aceite de girasol* [blog]. 2015. [Consulta: 20 enero 2021]. Disponible en: https://www.taringa.net/+apuntes_y_monografias/produccion-aceite-girasol-monografiacompleta_h4pxl
- ESTRADA, S.** Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2010 pp. 87. [Consulta: 04 enero 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/699/1/56T00229.pdf>
- GARCÍA, J.** *El girasol oleaginoso* [en línea]. Madrid - España: Aragón, 1971. [Consulta: 28 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1971_10.pdf
- GÓMEZ, J.** *El cultivo del girasol* [en línea]. Sevilla - España: Cónдор, 2009. [Consulta: 20 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1988_20.pdf
- GUERRERO, A.** Estudio de factibilidad para el procesamiento de aceite de girasol (*helianthus annuus*) en el cantón Urcuquí y su comercialización a nivel nacional [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. 2016 pp. 8-111. [Consulta: 08 noviembre 2020]. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/6847>
- ILLERA, G.** Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus officinalis*) [en línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. 2012 pp. 233. [Consulta: 19 febrero 2021]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101589/1/extractos%20supecr%C3%ADticos%20de%20romero.pdf>
- INKA PLUS.** *Romero* [en línea]. 2015. [Consulta: 19 noviembre 2020]. Disponible en: <http://www.inkaplus.com/media/web/pdf/Romero.pdf>

JUÁREZ, D.; & SAMMÁN, N. " El deterioro de los aceites durante la fritura ". *Revista Española de Nutricion Comunitaria* [en línea], 2007, pp. 82-94. [Consulta: 30 diciembre 2020]. ISSN 11353074. Disponible en: <http://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/0032007.pdf>

KIM, S.J.; KIM, J.S.; CHO, H.; JUNG, H.; YONG, S.; KIM, S.; YOUNG, S.; & SUNG, H. "Carnosol, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) protects nigral dopaminergic neuronal cells". *NIH* [en línea], 2006, pp. 1729-1733. [Consulta: 12 noviembre 2020]. ISSN 09594965. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17047462/>

LABORATORIOS VITAFOR SRL. *Antioxidantes* [en línea]. 2005. [Consulta: 09 diciembre 2020]. Disponible en: http://www.dirico.com.ec/archivos/Presentacion_Antioxidantes.pdf

LAX, V. Estudio de la variabilidad química : propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *rosmarinus officinalis* L. en la Región de Murcia [en línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Murcia, Murcia, España. 2014 pp. 1-152. [Consulta: 18 enero 2021]. Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/41969/1/Tesis%20Vanesa%20Lax%20S in%20publicaciones.pdf>

LIMA, L. *Estres oxidativo y antioxidantes* [en línea]. 2005. [Consulta: 14 enero 2021]. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/estres_oxidativo_y_antioxidantes.pdf

LOSADA, S. Estabilidad oxidativa y distribución de antioxidantes en emulsiones formadas por aceites vegetales de uso culinario [en línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Vigo, Pontevedra, España. 2013 pp. 1-282. [Consulta: 25 enero 2021]. Disponible en: <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/191/Estabilidad%20oxidativa%20y%20distribuci%C3%B3n%20de%20antioxidantes.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

LOUSSOUARM, M.; KRIEGER, A.; SVILAR, L.; BILY, A.; BIRTIC, S.; & HAVAUX, M.

" Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms". *Plant Physiology* [en línea], 2017, pp. 1381-1394. [Consulta: 15 noviembre 2020]. ISSN 15322548. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664485/pdf/PP_PP2017RA01183D.pdf

MEDINA, G. *Aceites y grasas comestibles* [en línea]. Medellín- Colombia: Antioquia, 2013.

[Consulta: 13 enero 2021]. Disponible en: http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/424/Gilma_Medina/Grasasyaceites/Documento_Grasas_y_aceites.pdf

NTE INEN 26. *Aceite de girasol, Requisitos* [en línea]. 1973. [Consulta: 23 diciembre 2020].

Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/26.pdf>

NTE INEN 26. *Aceite de girasol, Requisitos* [en línea]. 2012. [Consulta: 23 diciembre 2020].

Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/26-1.pdf>

NTE INEN 277. *Grasas y aceites, Determinación del índice de peróxido* [en línea]. 1978.

[Consulta: 23 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/277.pdf>

NTE INEN-ISO 3960. *Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de peróxido. Determinación yodometrica (visual) del punto final. (IDT)* [en línea]. 2013.

[Consulta: 25 noviembre 2020]. Disponible en: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_3960_extracto.pdf

PAUCAR, L.; SALVADOR, R.; GUILLÉN, J.; CAPA, J.; & MORENO, C. "Comparative

study of physical-chemical features of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.), olive oil (*Olea europaea*) and fish oil Luz ". *Scientia Agropecuaria* [en línea], 2015, pp. 279-290. [Consulta: 8 noviembre 2020]. ISSN 20779917. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/289569762_Comparative_study_of_physical-chemical_features_of_sacha_inchi_oil_Plukenetia_volubilis_L_olive_oil_Olea_europaea_and_fish_oil

- POVERENE, M.; CANTAMUITTO, M.; CARRERA, A.; URETA, M.; SALABERRY, M.; ECHEVERRIA, M.; & RODRIGUEZ, R.** " El girasol silvestre (*Helianthus spp.*) en la Argentina: Caracterización para la liberación de cultivares transgénicos". *INTA* [en línea], 2002, pp. 97-116. [Consulta: 16 diciembre 2020]. ISSN 1669-2314. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/864/86431207.pdf>
- REUBAUDIANA, S.** *El romero* [blog]. 2016. [Consulta: 14 enero 2021]. Disponible en: <https://www.elhuertourbano.net/aromaticas/el-romero/>
- RODENAS, D.; & RODRÍGUEZ, A.** Efecto antibacteriano del extracto etanolico de tallos de *Rosmarinus officinalis. L* (romero) en cultivos de "*Staphylococcus aureus*" estudio invitro [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Lima, Perú. 2018 pp. 1-97. [Consulta: 25 febrero 2021]. Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2632/TESIS_DIANA%20CAROLINA_%26_AIDELY%20RODRIGUEZ.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- SANTINA, L.** *Pellets de girasol* [en línea]. 2020. [Consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: <http://grupolasantina.com/pdf/Espanol/Pellets%20de%20Girasol.pdf>
- SEGURA, C.; GONZÁLEZ, G.; ACERETO, P.; ROSADO, G.; CHEL, L.; & BETANCUR, D.** " Fatty acid profile of mero (*Epinephelus morio*) raw and processed oil captured in the Yucatan Peninsula, Mexico". *NIH* [en línea], 2014, pp. 928-935. [Consulta: 14 enero 2021]. ISSN 16995198. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25617583/>
- SOLIZ, R.** Efectos de los compuestos activos y funcionales del romero (*Rosmarinus officinalis*) en el control del peso corporal y del metabolismo energético. [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad de les Illes Balears, Palma de Mallorca, España. 2014 pp. 1-30. [Consulta: 09 enero 2021]. Disponible en: https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/1673/TFG_GBIQ_JRSolizRueda.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- VALENZUELA, A.; & MORGADO, N.** "Las grasas y aceites en la nutrición humana". *Scielo* [en línea], 2005, pp. 187. [Consulta: 21 noviembre 2020]. ISSN 0956-7976. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0717-75182005000200002&lng=pt&nrm=iso

VARGAS, M. Determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri schauer*) sobre aceites comestibles [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buena Vista, México. 2009 pp. 1-79. [Consulta: 5 enero 2021]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/402/60745s.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

VÁSQUEZ, J. El cultivo de girasol (*Helianthus annuus L.*) como una alternativa económica en México [en línea] (Monografía). (Pregrado) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buena Vista, México. 2001 pp. 1-157. [Consulta: 9 enero 2021]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/772/T12269%20V%20E1squez%20%20Mendoza%20Joel%20%20%20tesis.pdf?sequence=1>

VELAMAZÁN, A. "Antioxidantes: una respuesta natural". *Medicina Naturista* [en línea], 2005, pp. 45-52. [Consulta: 14 diciembre 2020]. ISSN 1576-3080. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2050610.pdf>

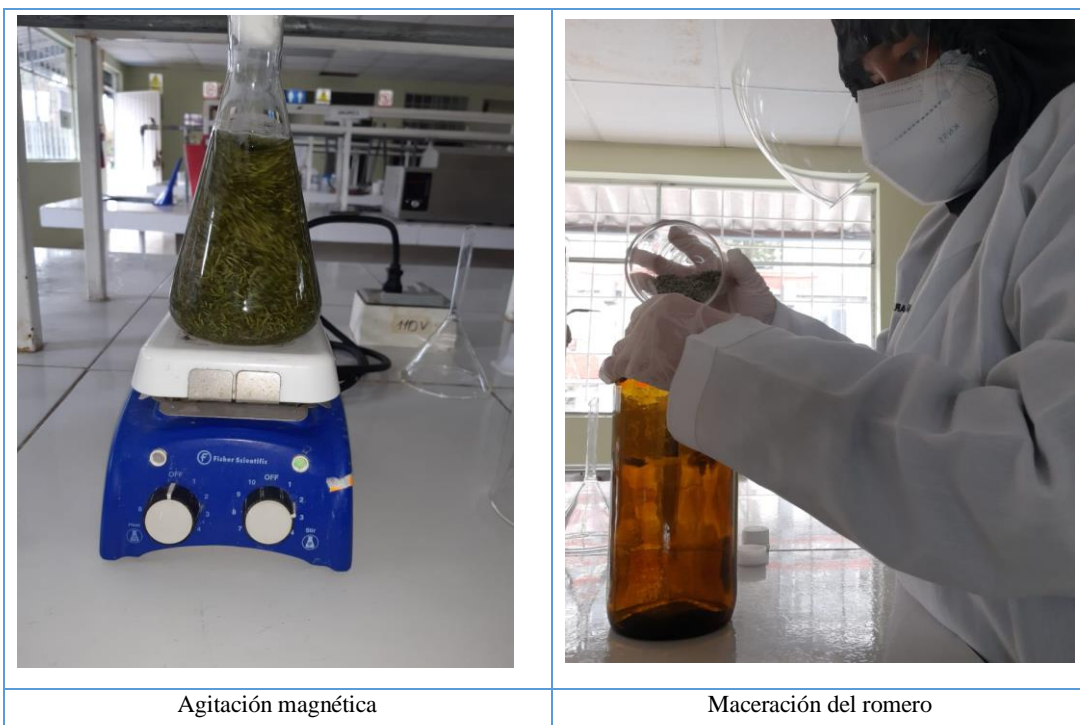
ZUDAIRE, M. *El aceite de girasol* [blog]. 2009. [Consulta: 13 enero 2021] Disponible en: <https://www.consumer.es/alimentacion/el-aceite-de-girasol.html>

ANEXOS

ANEXO A: Acondicionamiento del romero



ANEXO B: Preparación del extracto etanólico diseñado de romero



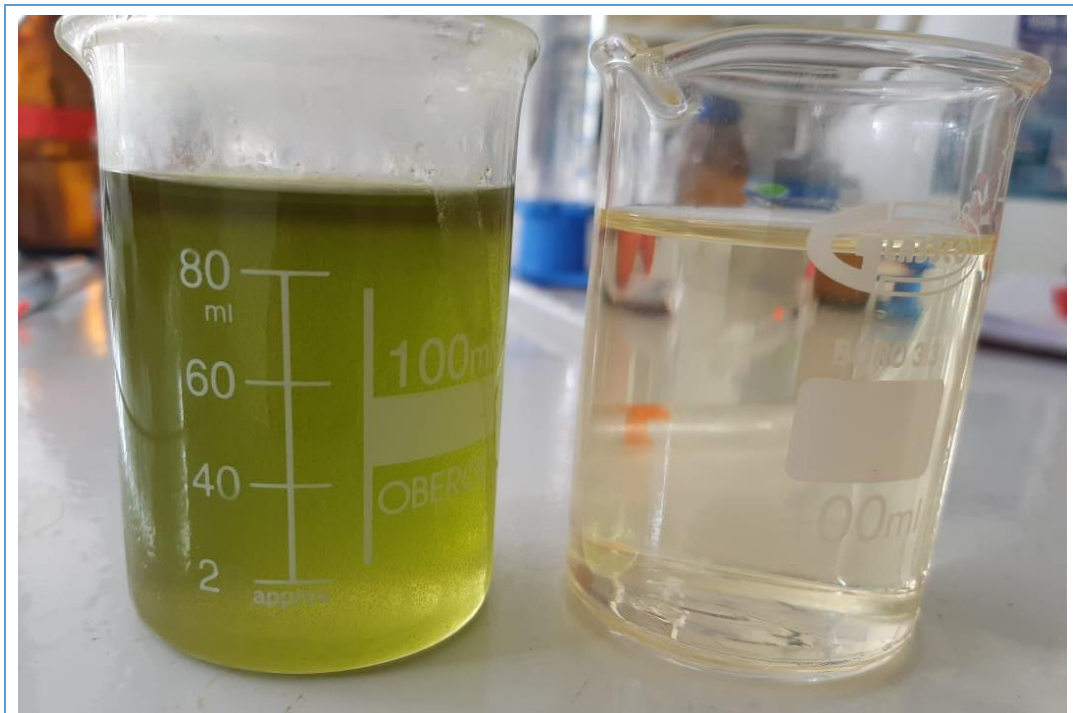


Filtración



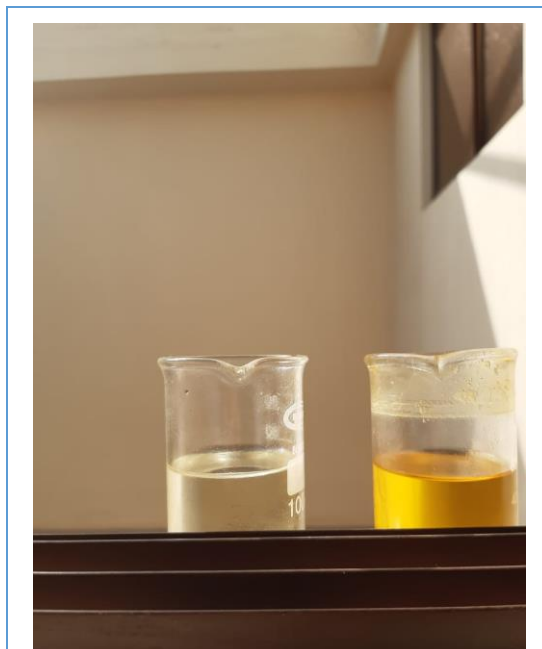
Concentración del extracto

ANEXO C: Solubilidad y homogeneidad del extracto etanólico con el aceite









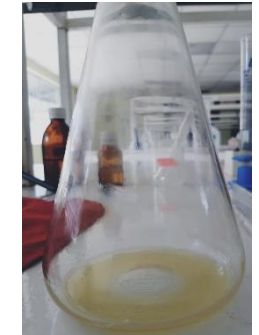

Preparación y etiquetado de las muestras antes de la oxidación

ANEXO D: Proceso oxidativo premeditado con factores ambientales

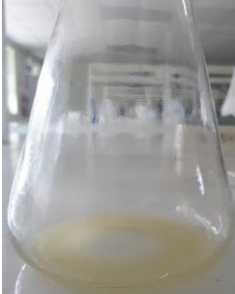









Proceso de oxidación

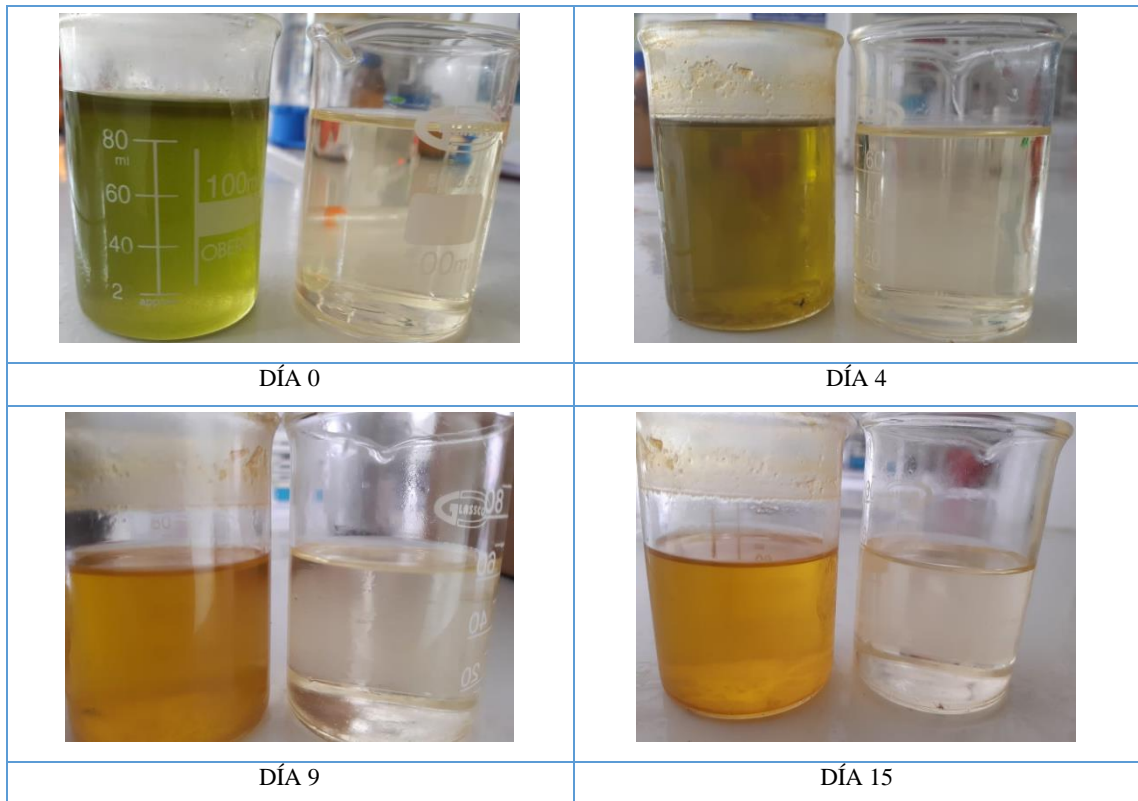
ANEXO E: Generación de yodo por oxidación de los peróxidos al KI (extracto Bc)

			
ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE	ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE
DÍA 0		DÍA 4	
			
ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE	ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE
DÍA 9		DÍA 15	

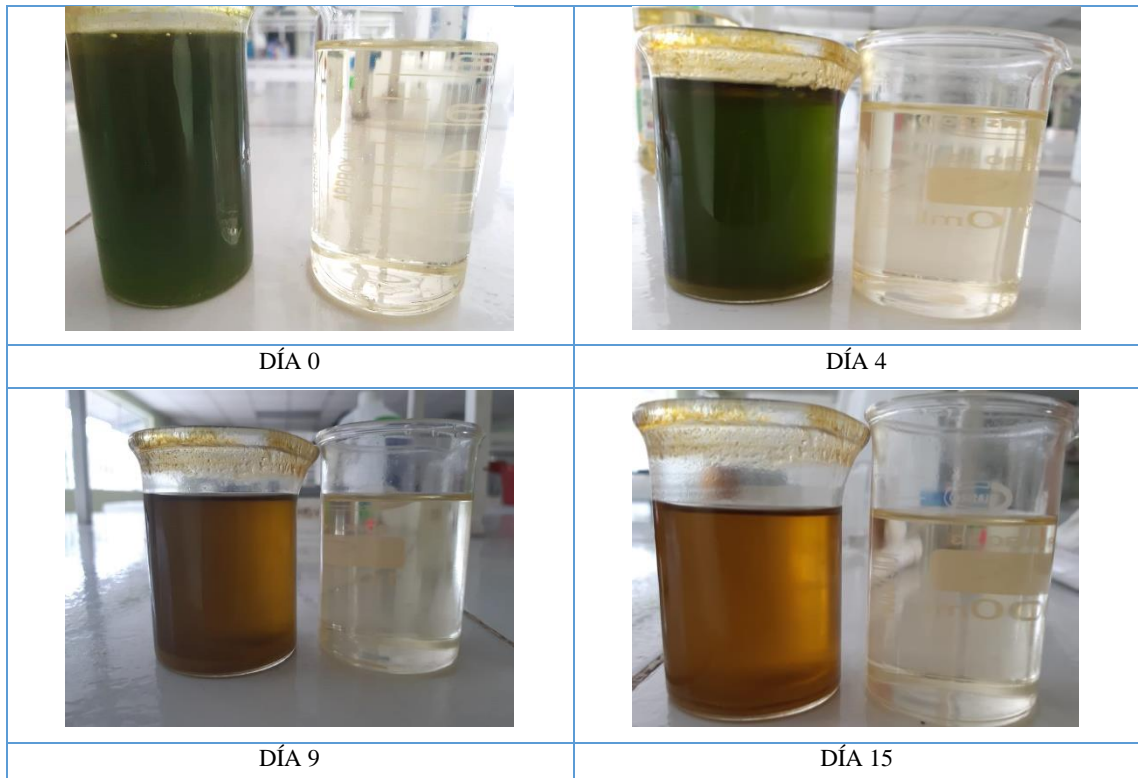
ANEXO F: Generación de yodo por oxidación de los peróxidos al KI (extracto Ac)

			
ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE	ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE
DÍA 0		DÍA 4	
			
ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE	ACEITE COMESTIBLE + EXTRACTO	ACEITE COMESTIBLE
DÍA 9		DÍA 15	

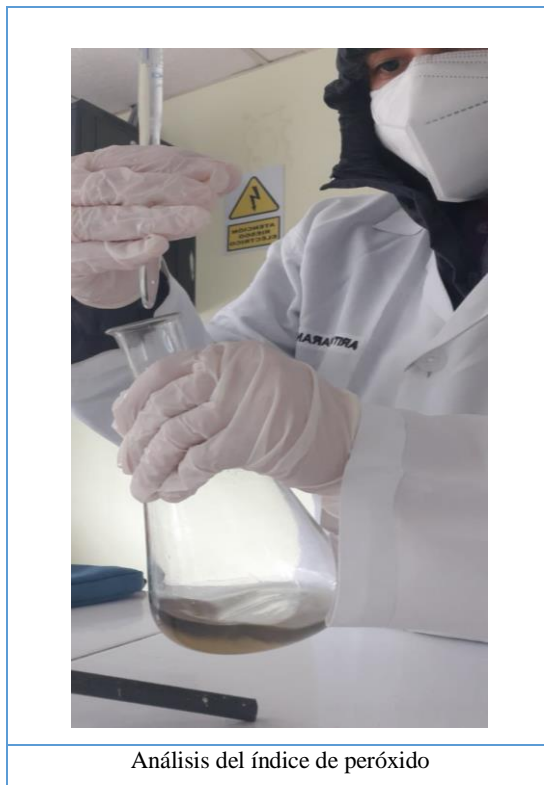
ANEXO G: Cambios organolépticos (extracto Bc)



ANEXO H: Cambios organolépticos (extracto Ac)



ANEXO I: Análisis por medio del índice de peróxido



Análisis del índice de peróxido

ANEXO J: Análisis estadístico mediante el programa Minitab

Aceite de girasol comestible con extracto etanólico diseñado de romero de baja concentración

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	3	DÍA 4; DÍA 9; DÍA 15

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	1294,22	647,111	182,00	0,000
Error	6	21,33	3,556		
Total	8	1315,56			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,88562	98,38%	97,84%	96,35%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
DÍA 4	3	4,000	0,000	(1,336; 6,664)
DÍA 9	3	6,67	2,31	(4,00; 9,33)
DÍA 15	3	30,67	2,31	(28,00; 33,33)

Desv.Est. agrupada = 1,88562

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

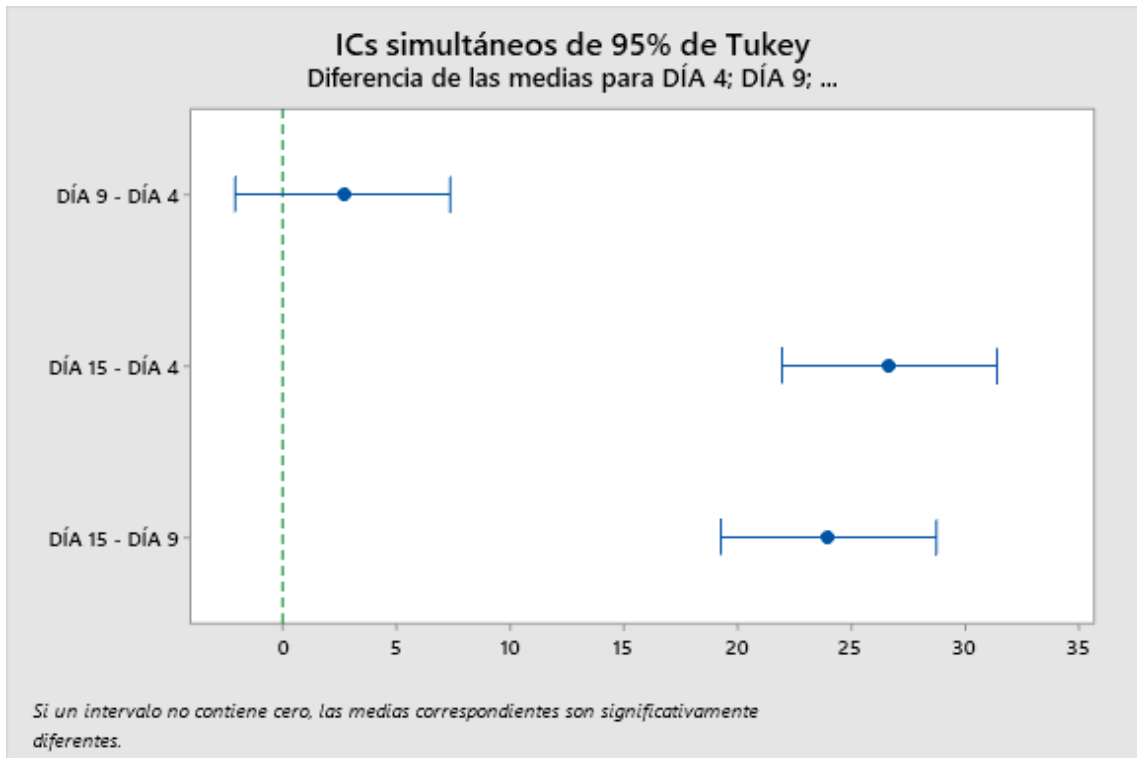
Factor	N	Media	Agrupación
DÍA 15	3	30,67	A
DÍA 9	3	6,67	B
DÍA 4	3	4,000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia			Valor T	Valor p ajustado
	de las medias	EE de diferencia	IC de 95%		
DÍA 9 - DÍA 4	2,67	1,54	(-2,06; 7,39)	1,73	0,269
DÍA 15 - DÍA 4	26,67	1,54	(21,94; 31,39)	17,32	0,000
DÍA 15 - DÍA 9	24,00	1,54	(19,28; 28,72)	15,59	0,000

Nivel de confianza individual = 97,80%



Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

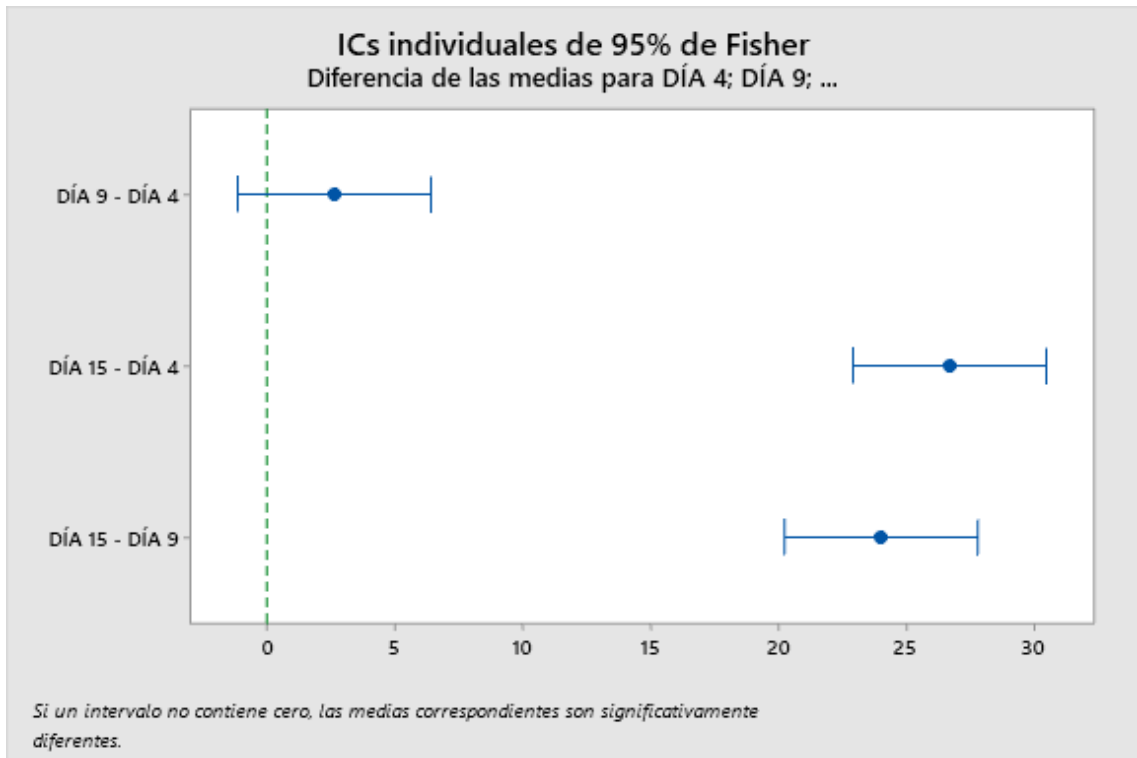
Factor	N	Media	Agrupación
DÍA 15	3	30,67	A
DÍA 9	3	6,67	B
DÍA 4	3	4,000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia			Valor T	Valor p ajustado
	de las medias	EE de diferencia	IC de 95%		
DÍA 9 - DÍA 4	2,67	1,54	(-1,10; 6,43)	1,73	0,134
DÍA 15 - DÍA 4	26,67	1,54	(22,90; 30,43)	17,32	0,000
DÍA 15 - DÍA 9	24,00	1,54	(20,23; 27,77)	15,59	0,000

Nivel de confianza simultánea = 89,08%



Aceite de girasol comestible con extracto etanólico diseñado de romero de alta concentración

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	3	DÍA 4; DÍA 9; DÍA 15

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	131,56	65,778	37,00	0,000
Error	6	10,67	1,778		
Total	8	142,22			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,33333	92,50%	90,00%	83,13%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
DÍA 4	3	0,000000	0,000000	(-1,883634; 1,883634)
DÍA 9	3	4,000	0,000	(2,116; 5,884)
DÍA 15	3	9,33	2,31	(7,45; 11,22)

Desv.Est. agrupada = 1,33333

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

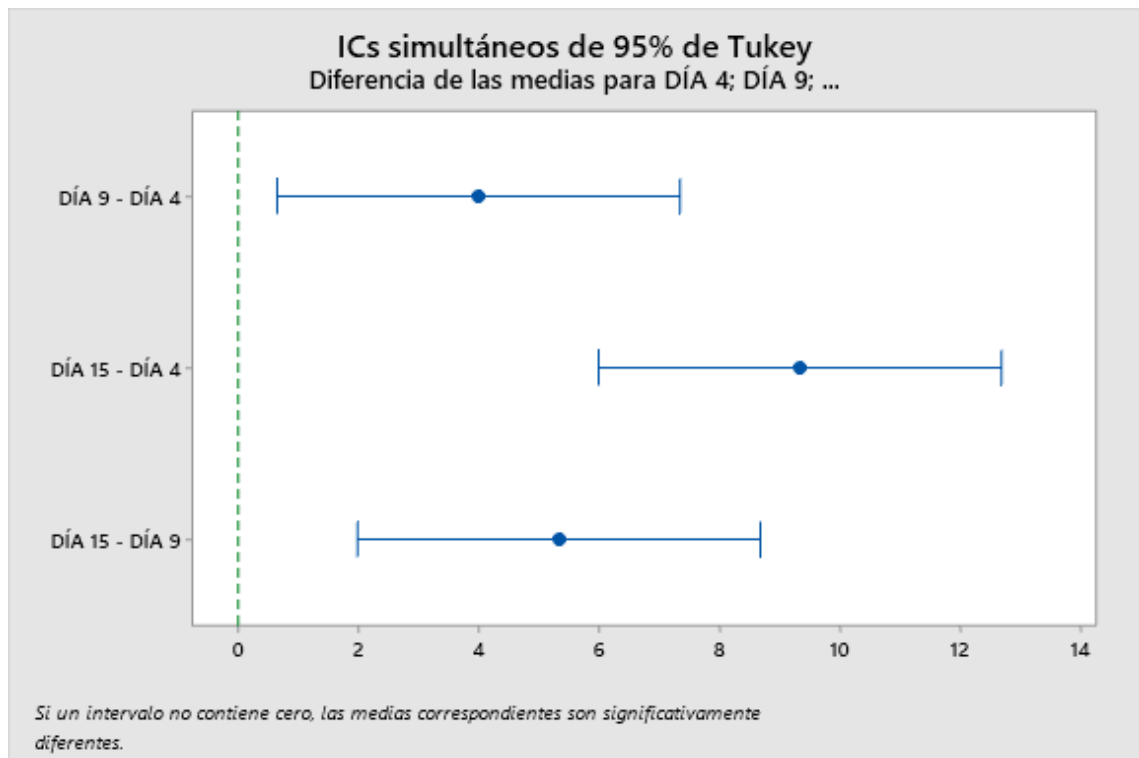
Factor	N	Media	Agrupación
DÍA 15	3	9,33	A
DÍA 9	3	4,000	B
DÍA 4	3	0,000000	C

Las medias que no compartan una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia			Valor T	Valor p ajustado
	de las medias	EE de diferencia	IC de 95%		
DÍA 9 - DÍA 4	4,00	1,09	(0,66; 7,34)	3,67	0,024
DÍA 15 - DÍA 4	9,33	1,09	(5,99; 12,67)	8,57	0,000
DÍA 15 - DÍA 9	5,33	1,09	(1,99; 8,67)	4,90	0,006

Nivel de confianza individual = 97,80%



Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

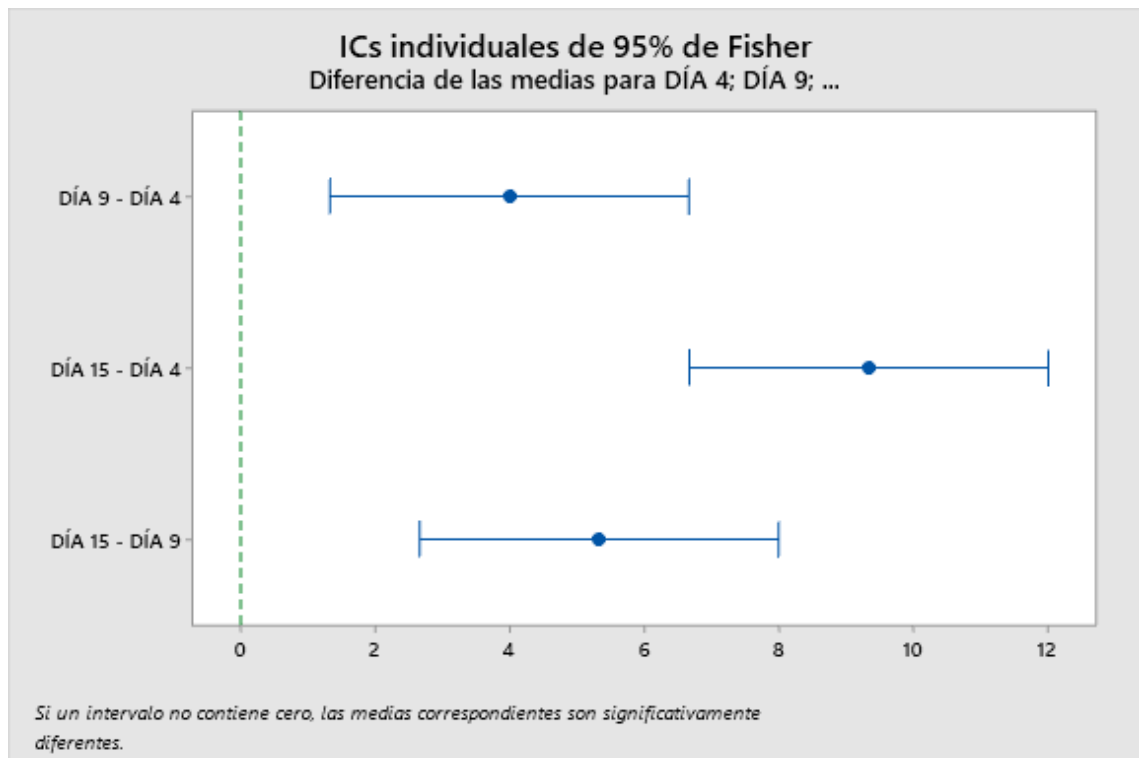
Factor	N	Media	Agrupación
DÍA 15	3	9,33	A
DÍA 9	3	4,000	B
DÍA 4	3	0,000000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia		IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
	de las medias	EE de diferencia			
DÍA 9 - DÍA 4	4,00	1,09	(1,34; 6,66)	3,67	0,010
DÍA 15 - DÍA 4	9,33	1,09	(6,67; 12,00)	8,57	0,000
DÍA 15 - DÍA 9	5,33	1,09	(2,67; 8,00)	4,90	0,003

Nivel de confianza simultánea = 89,08%





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 20 / 07 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Aracely Janneth Naranjo Viteri</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Bioquímica y Farmacia</i>
Título a optar: <i>Bioquímica Farmacéutica</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

LEONARDO
FABIO
MEDINA
NUSTE
Firmado digitalmente por LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.07.20 09:51:31 -05'00'



1413-DBRA-UTP-2021