



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



**“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES
SECUNDARIOS DEL ROMERO (*Rosmarinus officinalis L.*) PARA PROMOVER
LA OBTENCIÓN Y LA APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES
SOBRE GRASAS Y ACEITES”**

Informe de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI), presentado como requisito previo para la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Autor: Nelly Patricia González Villalva

Tutora: Ing. Mg. María Teresa Pacheco Tigselema

Ambato – Ecuador
2013

APROBACIÓN DE LA TUTORA

Ing. Mg. María Teresa Pacheco

Siendo la Tutora del Trabajo de Investigación realizado bajo el tema: “EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS DEL ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) PARA PROMOVER LA OBTENCIÓN Y LA APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES SOBRE GRASAS Y ACEITES”, por la egresada Nelly Patricia González Villalva; tengo a bien afirmar que el estudio es idóneo y reúne los requisitos de un trabajo de investigación de Ingeniería en Alimentos; y la señorita egresada posee los méritos académicos suficientes para ser sometida a la evaluación del Jurado Examinador que sea designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Septiembre del 2013.

.....

Ing. Mg. María Teresa Pacheco

TUTORA

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS DEL ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) PARA PROMOVER LA OBTENCIÓN Y LA APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES SOBRE GRASAS Y ACEITES”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido y efectos académicos que se desprendan del mismo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Ambato, Septiembre del 2013.

.....
Nelly Patricia González Villalva.

CI: 180428990-6

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Septiembre del 2013.

Para constancia firman:

.....

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios por llenarme de bendiciones en todo momento y darme sabiduría, fortaleza y paciencia para culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis padres, Luis y Nelly por ser la fuerza motora que con amor y paciencia guían mi caminar y por luchar todos los días para ser el mejor ejemplo de perseverancia, humildad y dedicación.

A Xime por ser la hermana y amiga que me apoyó en la realización de este trabajo y me contagia todos los días de alegría, entusiasmo y felicidad.

A cada uno de mis familiares por apoyarme en mi formación profesional y acompañarme en todos los momentos especiales de mi vida.

Paty

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por brindar una educación de calidad y fomentar la preparación tanto personal como profesional.

A los docentes de la FCIAL, por impartir sus valiosos conocimientos y compartir cada una de sus experiencias.

A la Ing. María Teresa Pacheco, Tutora del Trabajo de Investigación, gracias por su valiosa asesoría, conocimientos compartidos, tiempo y especialmente por su amistad.

A José Luis, por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo y por ensañarme que con amor se puede llegar muy lejos.

A mis amigos y amigas, por compartir grandes e inolvidables momentos.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1.	Tema.....	1
1.2.	Planteamiento del problema.....	1
1.2.1.	Contextualización	1
1.2.2.	Análisis crítico	4
1.2.3.	Prognosis	5
1.2.4.	Formulación del problema	5
1.2.5.	Interrogantes	5
1.2.6.	Delimitación del objeto de investigación.....	6
1.3.	Justificación.....	6
1.4.	Objetivos	8
1.4.1.	Objetivo general	8
1.4.2.	Objetivos específicos.....	8

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1.	Antecedentes investigativos.....	9
2.2.	Fundamentación filosófica	11
2.3.	Fundamentación legal.....	11
2.4.	Categorías fundamentales	12
2.4.1.	Marco conceptual variable independiente	13
2.4.1.1.	Romero	13
2.4.1.2.	Extracción por solventes	16
2.4.1.3.	Antioxidantes	17
2.4.1.4.	Estrés oxidativo.....	19
2.4.2.	Marco conceptual variable dependiente	20
2.4.2.1.	Compuestos fenólicos.....	20

2.4.3.	Aplicación	21
2.4.3.1.	Aceite de aguacate	21
2.5.	Hipótesis	22
2.6.	Señalamiento de variables de la hipótesis	23

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1.	El enfoque	24
3.2.	Modalidad básica de la investigación	24
3.3.	Nivel o tipo de investigación	25
3.4.	Población y muestra	25
3.4.1.	Diseño experimental	25
3.4.2.	Respuestas experimentales	26
3.5.	La operacionalización de variables	28
3.6.	Recolección de información	30
3.7.	Plan de procesamiento de la información	34

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.	Contenido de compuestos fenólicos de los extractos de romero	35
4.2.	Rendimiento de los extractos de romero	38
4.3.	Caracterización del antioxidante de romero (mejor tratamiento)	40
4.4.	Cinética química de la oxidación de aceite de aguacate con antioxidantes	41
4.5.	Análisis sensorial	45
4.6.	Verificación de hipótesis	46

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones	47
5.2.	Recomendaciones	48

CAPÍTULO VI PROPUESTA

6.1.	Datos informativos	50
6.2.	Antecedentes de la propuesta	51
6.3.	Justificación	52
6.4.	Objetivos	53
6.4.1.	Objetivo General.....	53
6.4.2.	Objetivos Específicos	53
6.5.	Análisis de factibilidad.....	53
6.6.	Fundamentación	54
6.7.	Metodología	55
6.8.	Administración	56
6.9.	Prevención de la evaluación	57

MATERIAL DE REFERENCIA

Bibliografía.....	58
Anexos.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	13
Figura N°2: Estructura química de ácido carnósico, carnosol, epirosmanol, rosmaridifenol, ácido rosmarínico, compuestos activos encontrados en la planta de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	15
Figura N°3: Diagrama de flujo del proceso de extracción con solventes.....	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Tratamientos a aplicar en la extracción de antioxidantes del romero..	27
Tabla N°2: Variables Independientes: Relación romero - solvente, Formulación del solvente y Tiempo de maceración.....	28
Tabla N°3: Variables dependientes: Rendimiento y Contenido fenólico.....	29
Tabla N°4: Contenido de compuestos fenólicos promedio en extractos de romero.....	36
Tabla N°5: Rendimiento promedio de los extractos de romero.....	38
Tabla N° 6: Características organolépticas y físico- químicas de los extractos de romero.....	40
Tabla N°7: Ecuaciones Cinéticas para la Autoxidación de Aceite de Aguacate con Antioxidantes.....	43
Tabla N°8: Modelo Operativo (Plan de acción).....	55
Tabla N°9: Administración de la Propuesta.....	56
Tabla N°10: Prevención de la evaluación.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°1: Árbol de problemas del estudio extracción y caracterización de los antioxidantes del romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>) para promover la obtención y la aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites.....	4
Gráfico N°2: Categorías fundamentales del estudio Extracción y caracterización de los antioxidantes del romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>) para promover la obtención y la aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites.....	12

Gráfico N°3: Incremento del índice de peróxidos con el tiempo en aceite de aguacate con antioxidantes.....	42
Gráfico N°4: Representación de la cinética de medio orden para la autoxidación de aceite de aguacate con antioxidantes.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. RESPUESTAS EXPERIMENTALES

Figura A-1: Curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 760 nm.

Tabla A-1: Valores de absorbancia promedio de los extractos de romero a 760 nm

Tabla A-2: Contenido de compuestos fenólicos en extractos de romero

Tabla A-3: Pesos y rendimientos de los extractos de romero

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Contenido fenólico

Tabla B-1: Análisis de varianza del contenido fenólico de los extractos de romero obtenido con los diferentes tratamientos

Tabla B-2: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para contenido fenólico según la relación romero-solvente

Tabla B-3: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para contenido fenólico según la formulación del solvente

Tabla B-4: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para contenido fenólico según el tiempo de maceración

Figura B-1: Interacción e intervalos LSD al 95% para la formulación del solvente y la relación romero:solvente

Figura B-2: Interacción e intervalos LSD al 95% para la relación romero:solvente y el tiempo de maceración

Figura B-3: Interacción e intervalos LSD al 95% para la formulación del solvente y el tiempo de maceración

Rendimiento

Tabla B-5: Análisis de varianza del rendimiento de los extractos de romero obtenido con los diferentes tratamientos

Tabla B-6: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para rendimiento según la relación romero-solvente

Tabla B-7: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para rendimiento según la formulación del solvente

Tabla B-8: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para rendimiento según el tiempo de maceración

Figura B-4: Interacción e intervalos LSD al 95% para la formulación del solvente y la relación romero:solvente

Figura B-5: Interacción e intervalos LSD al 95% para la relación romero:solvente y el tiempo de maceración

Figura B-6: Interacción e intervalos LSD al 95% para la formulación del solvente y el tiempo de maceración

ANEXO C. ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN ACEITE DE AGUACATE

Tabla C-1: Valores del Índice de Peróxidos Promedio Registrados en Aceite de Aguacate Mantenido en contacto con Aire a 20°C durante 20 días

Tabla C-2: Valores del Índice de Peróxidos Promedio Registrados en Aceite de Aguacate con Antioxidante de Romero (BHT) Mantenido en contacto con Aire a 20°C durante 20 días

Tabla C-3: Valores del Índice de Peróxidos Promedio Registrados en Aceite de Aguacate con Antioxidante Sintético (BHT) Mantenido en contacto con Aire a 20°C durante 20 días

ANEXO D. FICHAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS SENSORIAL

Ficha D-1: Evaluación sensorial de aceite de aguacate

Ficha D-2: Evaluación sensorial de ensalada fría con aceite de aguacate

Ficha D-3: Evaluación sensorial de papas fritas en aceite de aguacate

ANEXO E. RESULTADOS DEL ANÁLISIS SENSORIAL DEL MEJOR TRATAMIENTO APLICADO EN ACEITE DE AGUACATE

Análisis sensorial de aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-1: Puntaje total del análisis sensorial de aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-2: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al color de aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-3: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al olor de aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-4: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto a la aceptabilidad de aceite de aguacate con antioxidantes

Análisis sensorial de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-5: Puntaje total del análisis sensorial de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-6: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al color de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-7: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al olor de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-8: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al sabor de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-9: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto a la aceptabilidad de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

Análisis sensorial de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-10: Puntaje total del análisis sensorial de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-11: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al color de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-12: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al olor de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-13: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al sabor de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

Tabla E-14: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto a la aceptabilidad de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

ANEXO F. DIAGRAMAS DE FLUJO

Anexo F-1. Diagrama de flujo para la extracción de antioxidantes de Romero (*Rosmarinus officinalis L.*)

Anexo F-2. Diagrama de flujo para la extracción de aceite de aguacate

Anexo F-3. Balance de materiales del mejor tratamiento (1:5 romero:solvente, 75 % etanol: 25 % agua y 48 horas de maceración) para la extracción de antioxidantes de Romero (*Rosmarinus officinalis L.*)

ANEXO G. ANÁLISIS ECONÓMICO

Tabla G-1: Materiales directos e indirectos

Tabla G-2: Equipos y utensilios

Tabla G-3: Suministros

Tabla G-4: Personal

Tabla G-5: Inversión estimada para la obtención del extracto

ANEXO I. FOTOGRAFÍAS

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS DEL ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) PARA PROMOVER LA OBTENCIÓN Y LA APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES SOBRE GRASAS Y ACEITES

González, Patricia y Pacheco, María Teresa
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
e-mail: paty_good18@yahoo.es
AMBATO -ECUADOR

RESUMEN

Se realizó la extracción de los antioxidantes del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) mediante maceración de las hojas secadas y molidas, centrifugación y evaporación del solvente. Aplicando un diseño factorial 2^n y con un 95 % de confianza, se pudo determinar que la relación romero – solvente, la formulación del solvente, y el tiempo de maceración, influyen significativamente sobre el rendimiento y el contenido fenólico de los extractos del romero.

El mejor tratamiento fue: la relación 1:5 romero:solvente, 75 % etanol:25 % agua y 48 horas de maceración. El contenido de compuestos fenólicos del extracto de romero fue de 638,9 mg GA / g extracto, el rendimiento fue del 14,81 %, la densidad relativa 1,028, el índice de refracción 1,3655 y el pH 4,95.

Al comparar el índice de peróxidos resultante de aplicar: el antioxidante del romero y Butil Hidroxi Tolueno (BHT) sobre aceite de aguacate, se observó un valor de 13,50 m eq. O_2 /Kg de grasa, frente a 13,00 m eq. O_2 /Kg de grasa, mismos que no mostraron diferencia significativa.

El costo del mililitro de extracto de romero fue 0.93 USD, valor relativamente alto pero que podría reducirse si se trabaja a nivel industrial; y en vista de que, aplicado sobre ensaladas frías y productos procesados no existe diferencias sensoriales significativas, el uso del antioxidante de romero puede reemplazar el empleo de antioxidantes químicos como el BHT.

Palabras clave: romero, antioxidantes, BHT, contenido fenólico, aceite de aguacate.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

Extracción y caracterización de los antioxidantes secundarios del romero para promover la obtención y la aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites.

1.2. Planteamiento del problema

El problema que ha motivado la realización de este trabajo es el “desarrollo de enfermedades relacionadas con el uso de productos sintéticos como estabilizantes de grasas y aceites en la industria de los alimentos”.

1.2.1. Contextualización

Los antioxidantes, tanto sintéticos como naturales, se añaden a aceites y grasas, así como a los alimentos, para prevenir la formación de colores, aromas y sabores no deseables y de otros compuestos que se originan en la oxidación de los lípidos. Entre los antioxidantes sintéticos, los más empleados son el ter-butil-hidroxi-tolueno (BHT), el ter-butii-hidroxi-anisol (BHA) y later-butil-hidroxi-quinona (TBHQ). Se estima que la vida útil de muchos productos alimentarios aumenta entre un 15 y un 200 % por el empleo de antioxidantes (Kramer, 1985).

Los antioxidantes sintéticos citados presentan muchos inconvenientes. Para empezar son bastante volátiles y se descomponen con facilidad a temperaturas altas, por lo que no son satisfactorios en alimentos como patatas

fritas. En aceites vegetales refinados, estos compuestos no evitan la reversión, que produce un aroma y sabor no agradable (Chang, et al. 1975).

Desde hace algunos años se ha trabajado mucho en comprobar la seguridad de los antioxidantes sintéticos para alimentos, cuyo uso ha sido regulado y restringido en muchos países, ya que se comprobó que niveles altos de BHT, BHA y TBHQ producen un aumento significativo del peso del hígado y una marcada proliferación del retículo endoplasmático. Otras alteraciones señaladas han sido una disminución del crecimiento y caída del pelo en ratas, hiperplasia de las células epiteliales de los pliegues del estómago y un efecto tóxico en células de mono por parte del BHT (Hirose, et al. 1986). Otros estudios indican que el BHT puede ocasionar daños en otros órganos, como los pulmones y la mucosa gastro-intestinal (Branen, 1975). Por estas razones ha sido eliminado de la lista de aditivos para alimentos considerados como seguros (GRAS) (Federal Regist., 1977).

Algunos países han desarrollado límites o prohibido el uso de estos antioxidantes sintéticos por los efectos secundarios tóxicos en el cuerpo humano, En el norte de Europa se ha prohibido el uso del BHA. En los Estados Unidos, Japón y países de Europa Occidental el BHA y el BHT tienen un uso limitado.

La industria de los antioxidantes naturales muestra un sostenido y sólido crecimiento mundial; destacan los tocoferoles, con tasas de crecimiento de dos dígitos en la última década, y se prevé que será aún mayor en el futuro cercano. Éstos son productos muy importantes en la industria de los aceites, ya que inhiben la oxidación lipídica, evitando el deterioro de los alimentos. Internacionalmente destacan por su producción y comercialización Henkel Corporation de Alemania, con la marca COVI – OX, considerado el más grande; Riken y Eisai de Japón, además de Eastman Chemical Company (Fundación para la Innovación Agraria. 2008).

El romero es una especie cuyo hábitat natural es la región mediterránea, sur de Europa, norte de África y también Asia Menor (LLacsa, L. 2009).

Este arbusto, propio de zonas secas y áridas, tiene como principales países productores a España, Marruecos y Túnez. La recolección se realiza entre los meses de abril a julio, y se conserva en cajas de cartón o bolsas de papel (Arteche, et al., 1998).

En Latinoamérica el cultivo de romero es uno de los más importantes dentro del mercado de las plantas aromáticas y medicinales. En el 2002, Colombia exportó romero a Estados Unidos a valores de \$2,6/kg con volúmenes de 285 t (Proexport, 2002). Así mismo, la producción del romero como hierba aromática condimentaria y especialmente como esencia, se perfila como una actividad promisoriosa (Westervelt, 2003).

Pese a los estudios que demuestran la toxicidad de antioxidantes sintéticos, la Norma Ecuatoriana sobre grasas y aceites, admiten BHA y BHT en dosis máxima de 0.02 % (NTE INEN 46-1973).

Dada la importancia de los antioxidantes naturales existen algunos estudios sobre la forma de obtención y propiedades, pero la escasa difusión de los mismos y las diferentes condiciones de experimentación, hacen que se requiera el ajuste de ciertos parámetros de extracción y dosificación para que en nuestro medio puedan ser aprovechados.

1.2.2. Análisis crítico

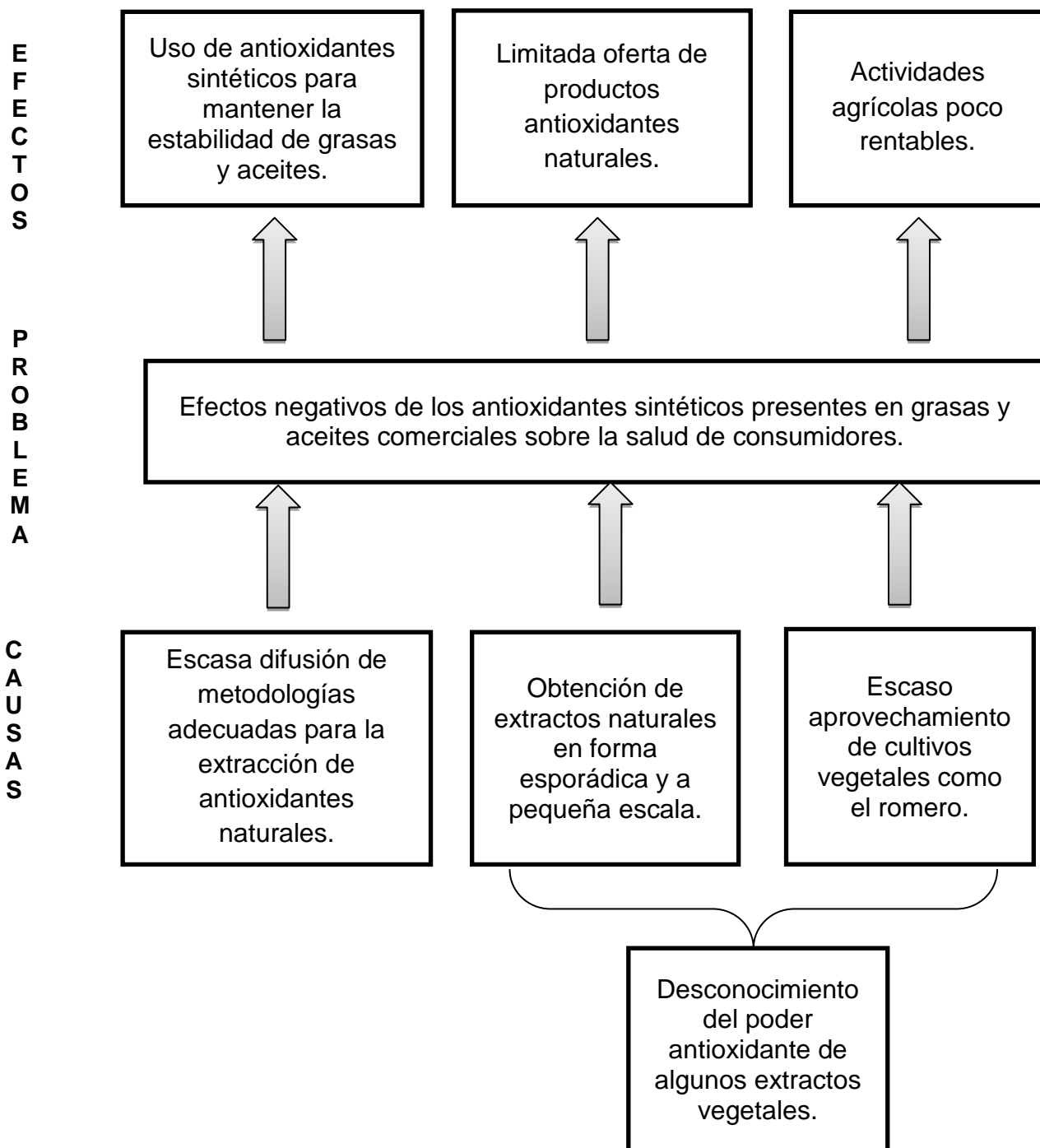


Gráfico Nº 1: Árbol de problemas

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

1.2.3. Prognosis

En el caso de no ejecutarse la presente investigación, no se daría solución a los problemas relacionados con la utilización de antioxidantes sintéticos para el control oxidativo de aceites y se incrementarían los problemas de salud en las personas.

Además al no dar utilidad a principios activos y aditivos presentes en algunos productos vegetales como el romero, el cultivo de los mismos se reduciría cada vez más repercutiendo sobre la variedad de especies naturales existentes y sobre la calidad de vida del agricultor.

1.2.4. Formulación del problema

¿Cómo puede contribuir el estudio de la extracción y aplicación de los antioxidantes del romero para reducir el uso de productos sintéticos en la conservación de grasas y aceites?

1.2.5. Interrogantes

- ¿Qué solventes y en qué proporción permitirán la máxima extracción de los antioxidantes del romero?
- ¿Qué cantidad de materia prima se necesitará aplicar para un cierto volumen de mezcla solvente?
- ¿Qué tiempo de maceración será necesario para obtener el mayor rendimiento de los extractos de romero?
- ¿Cuál será el rendimiento de extracción de los antioxidantes del romero y el contenido fenólico de los mismos?

- Cuál será la eficacia de los antioxidantes del romero en comparación con antioxidantes como el BHT?

1.2.6. Delimitación del objeto de investigación

Área: Alimentos.

Subárea: Grasas y Aceites.

Categoría: Aditivos.

Subcategoría: Antioxidantes para grasas.

Delimitación Temporal: El trabajo de investigación se realizó desde diciembre 2012 hasta junio 2013.

Delimitación Espacial: Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

1.3. Justificación

Entre las sustancias sintéticas utilizadas para el control de grasas y aceites, están los antioxidantes mismos que cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo, en concentraciones bajas comparadas con las de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato.

Los antioxidantes sintéticos se están restringiendo ya que se ha comprobado por medio de estudios toxicológicos que en animales, causan problemas a la salud; de modo que su uso está sujeto a las normas oficiales de cada país, además de la FDA.

Una de las tendencias actuales es obtener antioxidantes naturales que permitan disminuir el consumo de productos sintéticos y garanticen la

ausencia de toxicidad; estos antioxidantes se encuentran comúnmente en hierbas, especias y otros materiales de origen vegetal.

Por tal motivo, se ha escogido el extracto de romero como fuente principal de antioxidantes para el control oxidativo de grasas y aceites. Teniendo en cuenta que el romero, es una planta rica en principios activos, ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos.

Por otro lado, el aprovechar la riqueza natural, en cuanto a la producción de especias de origen vegetal impulsando al procesamiento de materias primas en la extracción de antioxidantes a partir de romero, permitiría generar un valor agregado al romero y por ende su aprovechamiento industrial; además ayudaría a reducir la importación de aditivos alimentarios y generaría una participación activa de la población en el fortalecimiento de la soberanía alimentaria a través de la recuperación de los cultivos ancestrales andinos actualmente subexplotados.

De esta manera, se benefician las familias campesinas de las comunidades de Ecuador que cultivan romero únicamente como planta curativa y medicinal, la industria que requiere aditivos alimentarios que controlen la oxidación de grasas y que estén permitidos por los organismos pertinentes; además, del consumidor final que adquiere productos con antioxidantes naturales que no representan un riesgo para su salud.

La SENPLADES (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo) de Ecuador en el Plan Nacional para el Buen Vivir 2009, expresa que es fundamental fomentar el conocimiento, la valoración de los saberes ancestrales y las formas de producción que permitan una adecuada regeneración de la naturaleza, todo ello en el marco del apoyo que el Estado debe brindar a la producción social y solidaria, y al cambio en los patrones de consumo. Fortalecer la soberanía alimentaria a través de la capacidad endógena de desarrollar tecnología agropecuaria y el aprovechamiento sustentable de los alimentos culturalmente adecuados, que logre sustituir

importaciones, permitirá construir un círculo virtuoso que apunte a la reducción de la dependencia externa para la provisión de alimentos, ampliando la participación de la producción nacional.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Extraer y caracterizar los antioxidantes del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) para contribuir al desarrollo y aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites.

1.4.2. Objetivos específicos

- Analizar la influencia de la relación romero – solvente, formulación del solvente y tiempo de maceración, sobre el rendimiento y el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de romero.
- Comparar el índice de peróxidos resultante de aplicar: el antioxidante del romero y un antioxidante sintético (BHT), sobre un aceite de aguacate extraído en el laboratorio.
- Promover la extracción de antioxidantes de romero y su aplicación en grasas y aceites, para mejorar la salud de los consumidores.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

La investigación que servirá de soporte para la presente investigación, es la realizada por Guerrero, A. y Rodríguez R. (2012) en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato acerca de los antioxidantes en alimentos. En dicho trabajo se evaluó el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante (primaria) de cultivos ancestrales andinos, los resultados indicaron que los cultivos que mejor respuesta dieron sobre el contenido de compuestos fenólicos fueron: tomate de árbol, mora, taxo y mortiño, estos datos muestran la potencialidad de los cultivos ancestrales andinos como agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de daños causados por estrés oxidativo de las células.

Por otra parte, existen varios estudios realizados en otros países que son de gran importancia para el presente trabajo de investigación, por lo cual se los menciona a continuación.

Martinello, M y Pramparo, M en el 2005, estudiaron el poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. Inicialmente las hojas de romero secas y molidas se sometieron a un proceso de extracción en un equipo de lixiviación. La corriente de destilado consistió en un líquido levemente coloreado de verde, mientras que el residuo mantuvo un aspecto más parecido a la alimentación. El poder antioxidativo de ambos extractos fue medido, sobre aceite de uva crudo, aceite de uva blanqueado y aceite de uva desodorizado, agregando el destilado y el residuo. En los tres tipos de aceites, el extracto obtenido como residuo de la destilación molecular mostró mayor poder antioxidante que el extracto obtenido como destilado. Por otra parte,

ambos extractos probaron su potencial antioxidante al ser contrastados con muestras control (sin agregado de extractos).

Monroy, A. et al en el 2007, estudiaron el chile ancho y el romero como fuentes naturales de antioxidantes; realizaron extracciones a diferentes proporciones de etanol: agua, y compararon la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales de los extractos de romero y chile con los antioxidantes BHA y BHT. Los resultados indicaron que el mejor extracto con actividad antioxidante fue el correspondiente a la muestra de romero, con un 89 %; mientras que, el extracto de chile ancho presentó un 52 % de actividad antioxidante. La proporción etanol-agua con un mayor rendimiento, en cuanto a la extracción de polifenoles en muestras de romero, fue de 75:25, mientras que para muestras de chile ancho la mejor fue de 50:50.

Estudios realizados por el profesor Cheng Olin en el Departamento de Química Aplicada de la Universidad Yunnan durante los últimos 10 años, indican que los antioxidantes de romero aplicados en grasas animales, vegetales y aceites, previenen y retrasan la rancidez, y por ello extienden la vida útil de los alimentos. Además indican que el romero proporciona un antioxidante seguro, eficiente, resistente al calor, con efecto anti-oxidante, y características de amplia aplicación (Fooding, 2012).

Avila, R et al en el 2011 revisaron el estado del arte del romero desde el punto de vista científico obtenido de las principales publicaciones. La revisión contiene entre sus puntos principales el análisis químico de los principales componentes del romero, su capacidad antioxidante, sus principales efectos terapéuticos y aplicaciones medicinales, el uso de los diversos extractos de romero en la industria de alimentos así como sus principales efectos toxicológicos. Mencionan que el valor de utilizar el romero con fines no culinarios depende, además de su riqueza en principios activos, de la rareza con la que se encuentra en la naturaleza y de las dificultades para su extracción. Por lo que es motivo para seguir generando conocimiento para desarrollar posibles aplicaciones útiles para la humanidad.

2.2. Fundamentación filosófica

La presente investigación se basa en el paradigma positivista que según Hernández, et al. (2008), tiene como escenario la investigación de laboratorio a través de un diseño preestructurado y esquematizado; su lógica de análisis está orientada a lo confirmatorio, reduccionista, verificación, inferencial e hipotética deductivo mediante el respectivo análisis de resultados. Teniendo como fundamento experiencias. Además la realidad es única y fragmentable en partes que se puede manipular independientemente.

Al tratarse de una investigación experimental, donde se busca la explicación, predicción y control de fenómenos físicos y químicos; el estudio se puede relacionar con un enfoque crítico propositivo, donde la generalización científica se basa en leyes naturales inmutables para dar solución a problemas reales, según lo mencionado por Herrera, et al. (2008).

2.3. Fundamentación legal

Determinación del contenido fenólico mediante el ensayo de fenoles totales de Folin Ciocalteau (Gracia, 2007).

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 277, 1978-02. Grasas y aceites. Determinación del índice de peróxido.

Norma CODEX STAN 19-1981 para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales.

Norma Mexicana NMX-F-052-SCFI-2008: Aceites y grasas- aceite de aguacate – especificaciones.

Artículos 13, 32 y 400 de la Constitución de la República del Ecuador (Asamblea Nacional Constituyente, 2008).

Artículo 6.8 del Plan Nacional para el Buen Vivir, Política 1.1, Literal c; Política 1.8, Literal c, d; Política 5.3. Literal a, b (SENPLADES, 2009).

2.4. Categorías fundamentales

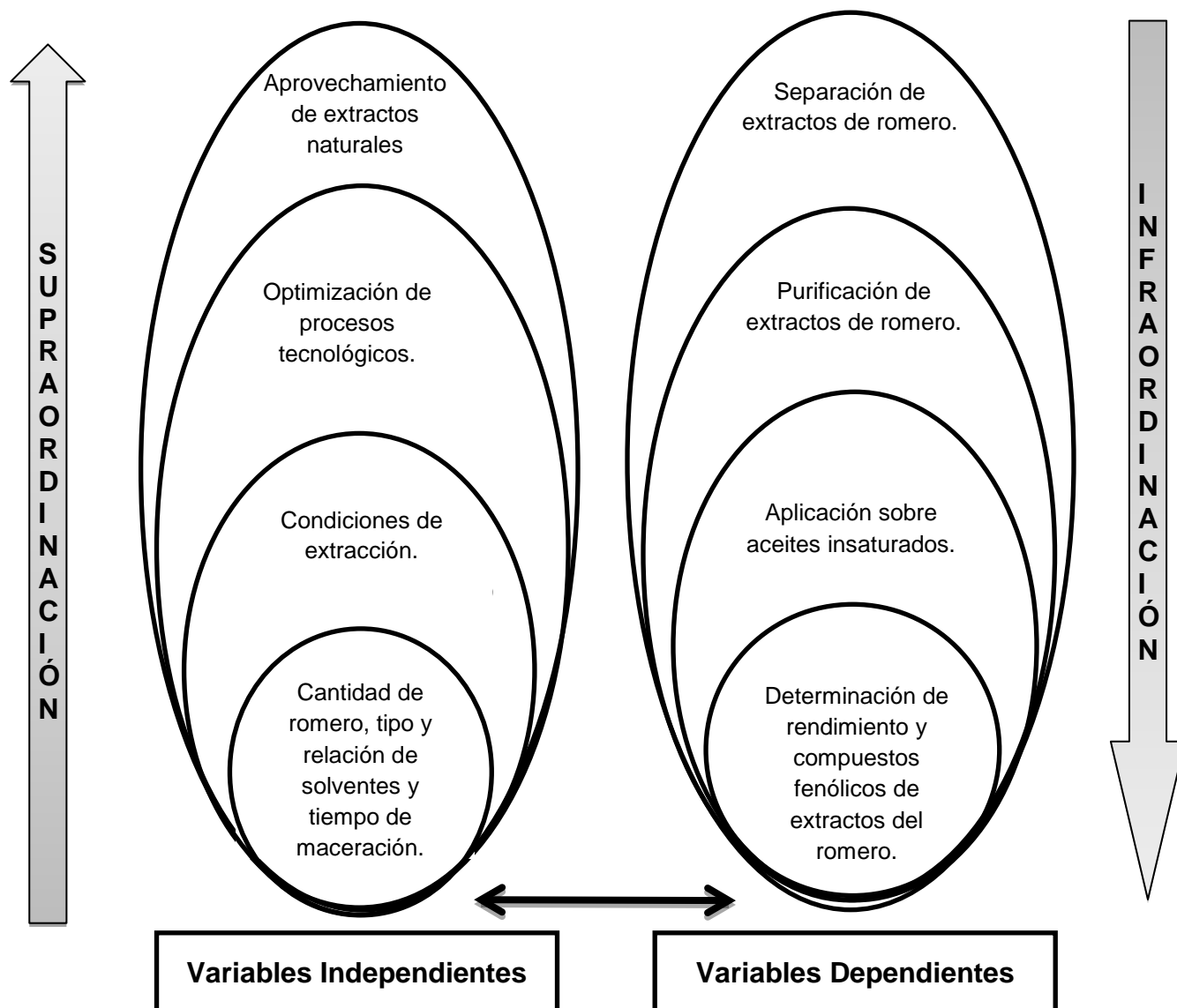


Gráfico N° 2: Categorías fundamentales

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

2.4.1. Marco conceptual variable independiente

2.5. Romero

a) Generalidades



Figura N° 1: Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Fuente: López, M. 2008.

El romero es una planta mediterránea cuyo término se deriva del griego “rhops y myrinos” que significa “arbusto marino” por su crecimiento cercano a las costas (Alonso, 2004). Generalmente se encuentra de forma silvestre en zonas rocosas y arenosas cercanas al mar pero debido a su adaptabilidad y poca exigencia para cultivarse se reproduce con facilidad en otras zonas. El romero pertenece a la familia Lamiaceae (*Labiatae Labiadas*), es una planta arbustiva con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas, tienen forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos y tallos leñosos y ramificados (Sotelo et al. 2002, Sardans et al. 2005). El tamaño varía de 0.5 a 1 metro de altura, florece dos veces al año en primavera y otoño, las flores se caracterizan por un color azul claro con pequeñas manchas violetas (Khorshidi et al. 2009).

El romero se utiliza desde la antigüedad como condimento y en la medicina tradicional, gracias a las múltiples propiedades que se le han atribuido históricamente. De todas, son sus aplicaciones externas las más populares. Sin embargo, el interés que despierta esta planta aromática en la actualidad radica en el potente efecto antioxidante de algunos de sus componentes (López, 2008).

El romero es una planta rústica, tolerante a la sequía, se adapta muy bien en suelos calcáreos, arenosos, pedregosos, con buen drenaje de al menos 20 cm de profundidad y en un amplio rango de pH (4,5 a 8,7). Su sistema radical profundo ayuda a estabilizar el suelo y le permite tolerar en mejor forma períodos calurosos y secos. Requiere clima templado-cálido (9-28 °C), con alta radiación y precipitaciones anuales entre 300 y 2.700 mm y no es resistente al frío (Simon *et al.*, 1984; Rühlemann, 2002).

Toda la planta desprende un fuerte y aromático olor, algo alcanforado. Su sabor característico también es aromático, pero áspero y algo picante (Arteche, *et al.*, 1998).

b) Composición química

En la planta se han reportado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos (Caribe & Campos 1991, Botsaris 1995, Atti-Santos 2005). El aceite esencial de romero es el componente más estudiado cualitativamente, algunas de las principales estructuras químicas activas se muestran en la Figura 2.

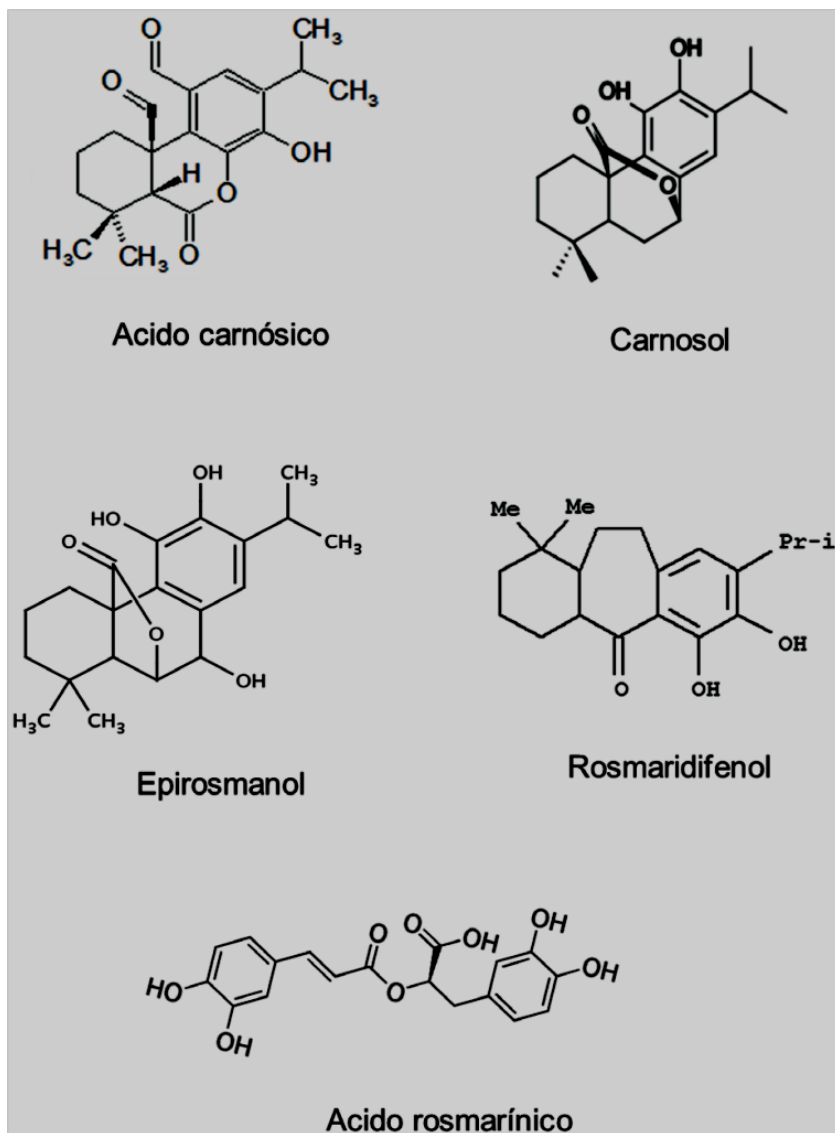


Figura Nº 2: Estructura química de ácido carnósico, carnosol, epirosmanol, rosmaridifenol, ácido rosmarínico, compuestos activos encontrados en la planta de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Fuente: Shahidi *et al.* 1992, Zheng *et al.* 2001.

Se ha identificado además la presencia de α -pineno, β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, isobanil-acetato y β -cariofileno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, α -amirina, β -amirina, borneol y

acetato de bornilo (Ruiz 2000, Almela 2006, Montes de Oca 2010, Tschinggeri & Bucar 2010).

En el caso de las hojas del romero prevalece un alto contenido de ácido rosmarínico y su derivado rosmaricina, también está presente el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable, su degradación se da por incremento de la temperatura y exposición a la luz; en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7- metil-epirosmanol (Arévalo *et al.* 2009, Djeddi *et al.* 2007, Peyman & Reza 2007, Mierlici 2009).

2.6. Extracción por solventes

La extracción con disolventes es una operación de transferencia de masas en un sistema de dos fases líquidas. Se basa en el principio por el cual un soluto (ión metálico) puede distribuirse en cierta proporción entre dos disolventes inmiscibles, uno de los cuales es usualmente agua y el otro un disolvente orgánico como benceno, keroseno, cloroformo o cualquier otro que sea inmisible en el agua.

Los antioxidantes son solubles en disolventes polares, generalmente mediante el uso de agua, metanol o etanol que contiene una pequeña cantidad de ácido clorhídrico o el ácido fórmico.

La variable más importante en este tipo de extracción es la temperatura. La temperatura óptima de extracción reportada por García *et al.* (1998), Mantell *et al.* (2002) y Vatai *et al.* (2008), se encuentra entre 50 y 75 °C. Otra variable a tener en cuenta es la relación extracto-solvente.

El proceso de extracción con solventes, tiene tres etapas principales. Inicialmente, el material vegetal debe ser reducido de tamaño con el fin de aumentar el área de contacto e incrementar la transferencia de masa, posteriormente el material es secado para evitar problemas de inhibición en la

extracción. La segunda etapa consiste en la extracción de los componentes con propiedades antioxidantes, la cual debe realizarse a una temperatura menor a 60 °C para evitar la degradación por temperatura de los componentes. Finalmente, la última etapa consiste en la concentración del extracto. Para esto es necesario evaporar el solvente, por medio de destilación o evaporación y para eliminar las trazas de solventes se puede efectuar una ultrafiltración acompañada de una liofilización. En la Figura 3, se muestra un esquema convencional del proceso de extracción con solventes.

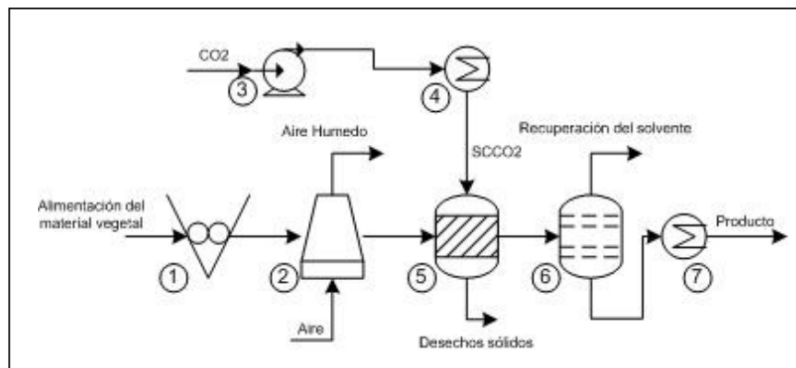


Figura Nº 3: Diagrama de flujo del proceso de extracción con solventes.

1: Molino; 2: Secador; 3: Intercambiador de calor; 4: Extractor; 5: Evaporador; 6: Secador.

Fuente: Cerón I. et al., 2010.

Cuando se realiza extracción con solventes, se requiere un fraccionamiento del extracto y eliminación del solvente, evitando la degradación del producto (compuestos termolábiles). Además, es inevitable la presencia de residuos del solvente en el producto final (Floris et al., 2010).

2.7. Antioxidantes

Los antioxidantes son definidos por la Food and Drug Administration (FDA) como sustancias que pueden ser aplicadas a los alimentos con el objeto de

preservarlos, ya que retrasan el deterioro, rancidez y cambios de coloración debido a la oxidación.

Los antioxidantes pueden actuar en los alimentos por diferentes mecanismos: (1) atrapar a radicales libres que inducen reacciones de iniciación de oxidación, (2) inactivar iones metálicos, (3) quitar las especies reactivas de oxígeno como radicales libres, (4) romper la cadena de reacciones de iniciación y (5) reducir los peróxidos para prevenir la formación de radicales libres (Eskin y Robinson, 2001).

Los antioxidantes pueden ser sintéticos o naturales. Entre los antioxidantes sintéticos que más se utilizan en alimentos se encuentran el Hidroxianisol Butilado (BHA) y el Hidroxitolueno Butilado (BHT). Estos compuestos tienen la desventaja de ser muy volátiles y de cierta manera perjudiciales para la salud. Debido a esto, en la actualidad existe una importante presión del medio consumidor que incentiva la elaboración de productos que provengan de fuentes naturales (Valenzuela y Nieto, 1995; Damechki et al., 2001).

Los antioxidantes se clasifican en dos principales categorías: primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios son aquellos que reaccionan con especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son varias formas de activación del oxígeno, que incluyen a los radicales libres como iones de superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo ($-OH$) (Rajeshwar et. al., 2005). Los antioxidantes secundarios actúan debido a numerosos mecanismos reduciendo la velocidad de oxidación de lípidos por varias acciones. También pueden desactivar metales pesados prooxidantes o ceder hidrógeno a los antioxidantes primarios provocando su regeneración (Harbone, 1994; Akoh y Min, 2002).

2.8. Estrés oxidativo

Es el producto de la acción que tienen los radicales libres sobre las células que componen el cuerpo humano. Un radical libre es un átomo o molécula que contiene un electrón desapareado en su orbital exterior, dicho electrón confiere alta reactividad oxidante por ser muy inestable, por lo que reacciona de inmediato ante otras sustancias que estén cercanas, la principal molécula generadora de radicales libres es la del oxígeno (Gutiérrez et al, 2004). Lo que resulta contradictorio tomando en consideración que el oxígeno es la base de la vida debido a que los seres humanos son organismos aeróbicos, resulta incoherente el hecho de que el oxígeno siendo tan importante para la sobrevivencia de dichos organismos, sean la causa de daños en el mismo, pero esta acción surge debido a que el oxígeno al entrar a al organismo interviene en una serie de reacciones de oxido-reducción complejas en las que se producen algunas especies derivadas de este que son reactivas y se convierten en lo que son los radicales libres que son llamados ERO (especies reactivas del oxígeno). La mitocondria es el principal productor de las ERO, ya que la respiración celular se verifica específicamente a este nivel; como se sabe, el 90 % del total del oxígeno inhalado se consume en la mitocondria y alrededor del 2 % del oxígeno reducido se transforma en el radical superóxido. Estas especies son las que principalmente contribuyen al estrés oxidativo, que ha sido relacionado con varias enfermedades como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, derrame cerebral, artritis, enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer, entre otras enfermedades degenerativas (Lini et al, 2011).

2.8.1. Marco conceptual variable dependiente

2.9. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales, donde tienen diversas funciones fisiológicas. Entre otros, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en los procesos defensivos, (patógenos, depredadores, incluso radiación ultravioleta). Los compuestos fenólicos presentan un anillo benzo hidroxilado, como un elemento común en todas sus estructuras moleculares, las cuáles pueden incluir grupos funcionales como esteres, metil-esteres, y glicósidos.

En la actualidad, este grupo de compuestos de origen vegetal, presentan un gran interés nutricional, por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De hecho, desde 1.990 diversas organizaciones internacionales en el ámbito de la nutrición, recomiendan un consumo diario como mínimo de cinco raciones de fruta o verdura, para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Almajano, 2009).

Los polifenoles poseen actividad antioxidante observada en estudios in vivo e in vitro, teniendo como resultado que estos poseen actividad antiinflamatoria, antioxidativa, quimioprotectora, neuroprotectora, reguladora de la glucosa, moderadora del metabolismo de lípidos. Los polifenoles se encuentran relacionados con la diabetes, ya que ayudan a controlarla, esto se debe a posibles mecanismos que tienen en el cuerpo humano como: inhibición de la digestión de carbohidratos y de la glucosa en el intestino, estimulación de la secreción de insulina de las células β , modulación de la liberación de glucosa por el hígado, activación de los receptores de insulina y de recaptura de glucosa en los tejidos sensibles a la hormona, modulación de las vías de señalización intracelular y de la expresión genética (Carmona, 2010).

2.9.1. Aplicación

2.10. Aceite de aguacate

El aguacate (*Persea americana*) pertenece a la familia de las lauráceas, nativo de Centro América. Es un árbol de tamaño variable dependiendo de la variedad, origen y condiciones ambientales. El fruto constituye una baya voluminosa con una semilla grande. Presenta cuatro formas: alargada, aperada, redondeada y ovalada. El fruto consta de tres partes: corteza, pulpa y semilla (OAS, 2013).

La superficie sembrada de aguacate en Ecuador, de acuerdo al último Censo Nacional Agropecuario, es de 2290 hectáreas como cultivo solo, y como cultivo asociado, de 5507 hectáreas. Las principales zonas de producción se encuentran a lo largo de los valles del Callejón Interandino, principalmente en los valles de Guayllabamba (Pichincha), Chota y Atuntaqui (Imbabura). Entre las variedades de aguacate más utilizadas en el Ecuador están Nacional, Guatemalteca, Hass, Booth 8, Fuerte, Tonnage, y Choquete. El cultivo de aguacate en Ecuador se realiza en alturas comprendidas entre los 400 y 2500 msnm, y a temperaturas que van entre los 15 y 30°C (Solagro, 2006).

La pulpa de aguacate posee un alto contenido de agua (70 %) (Ortiz *et al.*, 2003). Respecto a los nutrientes presentes en la pulpa destacan los minerales, los aminoácidos esenciales y algunas vitaminas. En 100 g de pulpa de aguacate se encuentran: potasio 340, fósforo 38, calcio 10, hierro 6,0 y sodio 3,0 mg (Batista *et al.*, 1993). Contiene siete de los ocho aminoácidos esenciales: valina 63, lisina 59, fenilalanina 48, isoleucina 47, leucina 46, treonina 40 y metionina 29 mg/100 g de pulpa (Ortega, 2003). Entre las cantidades significativas de vitaminas liposolubles: vitamina D 10 µg y E 3 µg, e hidrosolubles: vitamina B6 0,4 mg; C 14 mg y B2 0,2 mg; por lo que de forma

general todos estos nutrientes proporcionan importantes cantidades porcentuales en los requerimientos diarios de la dieta (Batista *et al.*, 1993).

La cantidad de lípidos en la pulpa de aguacate es considerable, se han informado valores de 21 % (Ortiz *et al.*, 2003) y 33 % (Ortiz. *et al.*, 2004), lo que lo hace una fuente potencial de aceite (Ortiz *et al.*, 2003). El aceite, contiene ácidos grasos saturados (16-22 %) e insaturados (74-83 %), y dependiendo de la variedad y estado de madurez su concentración varía (Ratovohery *et al.*,1988).

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, las propiedades nutricionales del aceite de aguacate son similares a las del aceite de oliva (Ortiz *et al.*, 2004). El principal ácido graso monoinsaturado es el oleico (C18:1 ó ω -9), encontrándose en cantidades de 60,28 % (Ortiz *et al.*, 2003).

El aceite es altamente digestivo y similar al aceite de oliva, aunque cambia según la variedad; es menor en la antillana; intermedio en la guatemalteca y mayor en la mexicana (OAS, 2013).

La extracción de los aceites vegetales generalmente se realizaba mediante prensado y posteriormente se introdujo la extracción con disolventes orgánicos para mejorar el rendimiento, por ejemplo, se utiliza hexano (70°C) y acetona (55 °C), entre otros (Ortiz *et al.*, 2003).

2.11. Hipótesis

Hipótesis nula (H₀):

H₀: La relación romero-solvente, el tiempo de maceración y la formulación del solvente no tienen influencia significativa sobre el rendimiento y el contenido fenólico de los extractos de romero.

Hipótesis alternativas (H₁):

H₁: La relación romero-solvente, el tiempo de maceración y la formulación del solvente influyen en el rendimiento y el contenido fenólico de los extractos de romero.

2.12. Señalamiento de variables de la hipótesis

Variables independientes

- Relación romero – solvente.
- Formulación del solvente.
- Tiempo de maceración.

Variable dependiente

- Rendimiento.
- Contenido fenólico.

Estudios adicionales:

- Caracterización de los antioxidantes del romero.
- Estabilidad oxidativa de un aceite de aguacate extraído en el laboratorio, tratado con los antioxidantes obtenidos.
- Eficacia de la acción antioxidante del romero, comparada con antioxidantes sintéticos empleados en grasas y aceites comerciales.
- Análisis de costos.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. El enfoque

Herrera, et al., 2008, señalan que el enfoque asumido por el investigador está permanentemente en todo el proceso de estudio. El presente trabajo se realizó de manera cuantitativa, ya que se puso énfasis en la obtención de datos experimentales reales que permitieron extraer y caracterizar los antioxidantes secundarios del romero para promover la aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites.

3.2. Modalidad básica de la investigación

a) Investigación de campo.- Es el estudio sistemático de los hechos en el lugar en el que se producen los acontecimientos. En esta modalidad se toma contacto en forma directa con la realidad (fuentes primarias), para obtener información de acuerdo con los objetivos del proyecto.

b) Investigación documental-bibliográfica.- Tiene el propósito de conocer, comparar, ampliar, profundizar y deducir diferentes enfoques, teorías, conceptualizaciones y criterios de diversos autores sobre una cuestión determinada, basándose en documentos o en libros, revistas, periódicos, y otras publicaciones (Herrera et al., 2008).

3.3. Nivel o tipo de investigación

Se ha aplicado una investigación:

- Explorativa, puesto existe información limitada acerca de la extracción, caracterización y aplicación de los antioxidantes del romero en grasas y aceites, siendo necesaria la investigación experimental.
- Correlacional, la cual se refiere al grado de relación (no causal) que existe entre dos o más variables. Para realizar este tipo de estudio se ha medido la asociatividad de las variables mediante pruebas de hipótesis y la aplicación de técnicas estadísticas, que determinarán el efecto de la relación romero- solvente, la formulación del solvente y el tiempo de maceración sobre el rendimiento y la capacidad oxidativa de los extractos de romero.

3.4. Población y muestra

3.4.1. Diseño experimental

Se ha aplicado un diseño factorial completo 2^n (2^3) obteniéndose un total de 8 tratamientos, con una réplica, es decir se estudiaron 16 muestras.

Modelo Matemático

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + R_l + \epsilon_{ijkl}$$

Dónde:

μ = efecto global

A_i = efecto del i-ésimo nivel del factor A

B_j = efecto del j-ésimo nivel del factor B

C_k = efecto del k-ésimo nivel del factor C

$(AB)_{ij}$ = efecto de la interacción entre los factores A y B

$(AC)_{ik}$ = efecto de la interacción entre los factores A y C

$(BC)_{jk}$ = efecto de la interacción entre los factores B y C

$(ABC)_{ijk}$ = efecto de la interacción entre los factores A, B y C

R_l = efecto de la replicación del experimento

ϵ_{ijkl} = residuo o error experimental

A continuación se detallan los factores y los niveles tomados en cuenta para el diseño experimental:

Factores	Niveles
A: Relación romero - solvente	a_0 : 1:5 (romero :solvente) a_1 : 2:5 (romero : solvente)
B: Formulación del solvente	b_0 : 75 % :25 % (etanol : agua) b_1 : 100 % :0 % (etanol : agua)
C: Tiempo de maceración	c_0 : 24 h c_1 : 48 h

3.4.2. Respuestas experimentales

- Rendimiento.
- Contenido fenólico.

Tabla N°1: Tratamientos aplicados en la extracción de antioxidantes del romero.

Tratamientos	Significado
a ₀ b ₀ c ₀	1:5 (romero : solvente), 75 % : 25 % (etanol : agua), 24 h.
a ₀ b ₁ c ₀	1:5 (romero : solvente), 100 % : 0 % (etanol : agua), 24 h.
a ₀ b ₀ c ₁	1:5 (romero : solvente), 75 % : 25 % (etanol : agua), 48 h.
a ₀ b ₁ c ₁	1:5 (romero : solvente), 100 % : 0 % (etanol : agua), 48 h.
a ₁ b ₀ c ₀	2:5 (romero : solvente), 75 % : 25 % (etanol : agua), 24 h.
a ₁ b ₁ c ₀	2:5 (romero : solvente), 100 % : 0 % (etanol : agua), 24 h.
a ₁ b ₀ c ₁	2:5 (romero : solvente), 75 % : 25 % (etanol : agua), 48 h.
a ₁ b ₁ c ₁	2:5 (romero : solvente), 100 % : 0 % (etanol : agua), 48 h.

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

3.5. La operacionalización de variables

Tabla N°2: Variables Independientes: Relación romero - solvente, Formulación del solvente y Tiempo de maceración.

Descripción	Conceptualización	Categoría	Indicadores	Ítems	Técnicas e Instrumentos
Relación romero – solvente.	Romero es una planta aromática conocida y utilizada desde la antigüedad como condimento y con fines medicinales.	Plantas ornamentales	Peso en gramos.	Influirá la cantidad de romero en el rendimiento y capacidad antioxidante del extracto obtenido?	Determinación de masa seca. Estufa, termómetro, balanza gravimétrica
Formulación del solvente.	El agua es disolvente polar que disuelve sustancias iónicas y polares. El etanol es un compuesto orgánico polar ampliamente utilizado como solvente.	Agua: Polar Etanol: Polar de alto poder solvente de grasas	Volumen y concentración (p/v)	Influirá el tipo y la cantidad de solventes en el rendimiento y capacidad antioxidante de extracción de los antioxidantes del romero?	Preparación de soluciones estándar. Material volumétrico Agua y Etanol al 95 %
Tiempo de maceración.	Maceración es una operación para separar los constituyentes solubles de un sólido inerte con un solvente. Corresponde a una extracción sólido líquido.	Método de separación sólido - líquido	Tiempo en horas.	Influirá el tiempo de maceración en el rendimiento y capacidad antioxidante del extracto obtenido?	Control cronometrado del proceso en la oscuridad y en condiciones anaerobias.

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla N°3: Variables dependientes: Rendimiento y Contenido fenólico

Descripción	Conceptualización	Categoría	Indicadores	Ítems	Técnicas e Instrumentos
Rendimiento	El rendimiento es un parámetro de control de calidad, que relaciona los medios empleados para obtener un producto y el resultado que se consigue.	Determinación de la calidad de aplicación de un proceso o de la materia prima	Peso del extracto / Peso de la materia prima (g)	La aplicación de los diferentes tratamientos influirán sobre el rendimiento de extractos de romero?	Determinación de masa seca de la materia prima y volumen de los extractos finales Estufa, termómetro, balanza gravimétrica, material volumétrico.
Contenido fenólico	Es un método colorimétrico que cuantifica la concentración de polifenoles totales en una muestra.	Caracterización de extractos antioxidantes.	Valores de absorbancia a 760 nm.	La aplicación de los diferentes tratamientos influirán sobre el contenido fenólico de extractos de romero?	Reactivo de Folin Ciocalteu Espectrofotómetro Estufa, termómetro, balanza gravimétrica, material volumétrico.

Elaborado por: Nelly Patricia González. 2013.

3.6. Recolección de información

La recolección de información se realizó durante el desarrollo de la fase experimental de acuerdo al diseño planteado, se dispuso de 16 tratamientos y en vista de que se realizó un duplicado de las determinaciones, para cada análisis se efectuaron 32 corridas experimentales.

Preparación de la materia prima

Se partió de romero fresco, se eliminaron las impurezas presentes y se retiraron los tallos para facilitar la operación de secado, dejando únicamente las ramas que son las necesarias para el estudio. El material vegetal se lavó y se colocó en bandejas dentro del túnel de secado del laboratorio de procesos de la FCIAL, a temperatura menor de 55°C, hasta una humedad final del $12 \pm 1\%$. Posteriormente se procedió al molido, en un molino de mano y finalmente se procedió a tamizar en un cedazo de 50 mesh.

Extracción de antioxidantes por maceración

Para extraer el antioxidante se procedió a macerar el romero seco y molido con soluciones etanol:agua, empleando diferentes proporciones volumen/volumen (v/v) de etanol y agua (75:25, 100:0) (Pietta et al., 1998; Almeida y Regitano, 2000; Kaur y Kapoor, 2002; Zaporozhets et al., 2004; Almaraz et al., 2007; Vourela et al., 2005).

La relación de romero – solvente fue otro factor de estudio que se tomó en cuenta, es así que se mezcló 1 g de romero por cada 5 ml de solución etanol:agua y 2 g de romero por cada 5 ml de solución etanol:agua

Considerando que la eficiencia de la extracción depende del tiempo que se emplee en dicha operación, se ensayó la maceración en un lapso de 24 y 48 h antes de proceder a la concentración.

Filtración y Centrifugación

La filtración se realizó con la finalidad de eliminar las partículas de mayor tamaño presentes en el macerado, como paso previo a la concentración, para la cual se utilizó lienzos estériles. Persiguiendo el mismo objetivo se realizó la centrifugación por 8 min a 4500 rpm y se separó el sobrenadante para la concentración.

Concentración

Una vez realizada la maceración, se procedió a una concentración durante 60 min y a 2000 rpm con el uso del rotavapor adaptado a una bomba de vacío, que permite disminuir la presión atmosférica en su interior y que la solución hierva a una temperatura menor a 70°C; esto facilita el desprendimiento de los solventes utilizados.

Los extractos concentrados fueron refrigerados a 4°C hasta realizar los análisis del contenido fenólico de todos los tratamientos.

Determinación del contenido de compuestos fenólicos

Se realizó mediante el ensayo de fenoles totales de Folin Ciocalteu, el cual se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción que es el mecanismo molecular, gracias al carácter reductor del reactivo F-C, que utiliza una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una λ de 760 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por g de muestra (Prior et al., 2005).

Se realizaron observaciones de las 16 muestras por duplicado. Se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 ml de agua destilada. Se diluyó 1:10 en agua destilada y de ésta solución se tomaron 100 μ l para después completarse a 500 μ l con agua destilada. A cada una de las muestras se le adicionaron 250 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó por 5 minutos. Posteriormente se

adicionaron 1250 µl de Na₂CO₃ al 20 % y se dejó reposar por 2 horas. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto) (Gracia, 2007).

La presencia de fenoles totales se determinó a partir de una curva de calibración preparada con una solución estándar de ácido gálico. Para la preparación de la misma se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/ml) de la cual se tomaron volúmenes de 0 µl a 160 µl en intervalos de 20 µl y se completó el volumen de cada uno a 500 µl con agua destilada, la curva de calibración se reporta en el anexo A.

Determinación del rendimiento

Se determinó el rendimiento en peso de cada uno de los tratamientos, en relación a la materia prima empleada para la extracción del antioxidante. Para lo cual se registraron los pesos utilizando una balanza digital de precisión 0,001 g.

CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO

Extracción del aceite de aguacate

Se depositó en un recipiente la pulpa de aguacate y se agregó como solvente acetona (del 90 % de concentración), en relación 1:1, se mezcló hasta homogenizar la muestra. Se filtró en un lienzo estéril y se centrifugó el líquido resultante a 4500 rpm, durante 10 minutos. Finalmente se separó la fase oleosa y se evaporó el solvente residual en el rotavapor adaptado a una bomba de vacío, hasta no detectar olor a solvente.

El solvente recuperado y que se encontraba mezclado con residuos de aceite, se destiló a 70°C para reutilizarlo, se empleó un destilador simple.

Aplicación del mejor tratamiento sobre el aceite de aguacate

Se aplicó el antioxidante de romero en una muestra de aceite de aguacate, y un antioxidante sintético (BHT) para comparar el efecto, trabajando con una

tercera muestra de aceite sin antioxidante, como blanco. El porcentaje de adición fue del 0,02 % según lo indicado en la Norma INEN 46 (1973).

Determinación del Índice de Peróxidos

Se procedió según lo indicado por Alvarado (1996): en cajas de Petri de 12 cm de diámetro, se colocó aproximadamente 20 ml de aceite, se trabajó por duplicado con los tres aceites. Se colocó las cajas abiertas en una cámara a temperatura constante (20°C); todos los días se agitó el aceite para evitar la formación de costras superficiales, cada tres días se retiró alícuotas para la determinación del índice de peróxido durante un lapso de quince días.

Se determinó por duplicado el índice de peróxidos de cada uno de los aceites, utilizando el método señalado en la norma INEN 277 (1973).

Análisis Sensorial

Como parte de la caracterización del mejor tratamiento y de la aplicación del mismo en aceite de aguacate se realizó el análisis sensorial de la aceptabilidad del antioxidante natural frente al antioxidante comercial en productos frescos y procesados. Para lo cual se preparó tres muestras, la primera aceite de aguacate puro, la segunda aceite de aguacate con antioxidante de romero y la última con antioxidante BHT, se utilizó el modelo de efectos fijos para el diseño de un factor, ya que este diseño se utiliza cuando los datos o resultados experimentales resultan de la variación de un solo factor de estudio y el investigador “fija” los tratamientos experimentales con los cuales desea trabajar (Saltos, 2010).

Se realizaron tres cataciones de efectos fijos de las tres muestras que fueron evaluadas por quince catadores semi entrenados. La primera consistió en muestras de aceite de aguacate en las cuales se evaluó color, olor y aceptabilidad, para la segunda prueba se adicionó aceite de aguacate a ensaladas frías de lechuga, tomate y cebolla perla y por último se utilizó las muestras de aceite para la fritura de papas prefritas congeladas.

Para todos los indicadores se utilizó una escala hedónica de uno a cinco, considerando que lo mayor es mejor, como se observa en las Tablas del Anexo D.

3.7. Plan de procesamiento de la información

El procesamiento y análisis estadístico de datos se realizó en los paquetes informáticos: Excel 2010 y STATGRAPHICS. Se aplicó el análisis de varianza ANOVA y pruebas de comparación múltiple para la elección del mejor tratamiento, con un intervalo de confianza del 95 %.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se utilizó romero (*Rosmarinus officinalis L.*), proveniente de las zonas altas de la Provincia, mismo que se adquirió en el Mercado Mayorista de la Ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua.

El romero fue seleccionado, lavado, secado a temperatura menor de 55°C, hasta una humedad final del 12 ± 1 %, molido y tamizado en un cedazo de 50 mesh.

4.1. Contenido de compuestos fenólicos de los extractos de romero

Los compuestos fenólicos son muy importantes como constituyentes de las plantas debido a su habilidad para secuestrar radicales libres, que está relacionada con la presencia del grupo hidroxilo (Gülçin et al., 2003). La Tabla A-1 muestra los valores de absorbancia obtenidos en la determinación de polifenoles dependiendo de los factores de estudio, además se observa en la Tabla A-2 los resultados del contenido de polifenoles de las muestras, mismos que fueron calculados a partir de la curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 760 nm (Figura A-1).

Tabla N°4: Contenido de compuestos fenólicos promedio en extractos de romero

Tratamientos	mg GA / g extracto
$a_0b_0c_0$	231,2 ± 8,0
$a_0b_1c_0$	180,1 ± 5,4
$a_0b_0c_1$	638,9 ± 14,7
$a_0b_1c_1$	400,5 ± 9,4
$a_1b_0c_0$	256,7 ± 6,7
$a_1b_1c_0$	147,9 ± 5,4
$a_1b_0c_1$	398,6 ± 4,0
$a_1b_1c_1$	331,4 ± 8,0

GA: Ácido Gálico

a_0	1:5 (romero : solvente)	b_0	75 % : 25 % (etanol : agua)	c_0	24 h
a_1	2:5 (romero : solvente)	b_1	100 % : 0 % (etanol : agua)	c_1	48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Los resultados promedios luego del respectivo análisis estadístico, indican que los tratamientos con mayor contenido de compuestos fenólicos son el $a_0b_0c_1$ (638,9 mg GA / g extracto) y el $a_0b_1c_1$ (400,5 mg GA / g extracto).

En la Tabla B-1. se reportan los resultados del análisis de varianza para los valores de compuestos fenólicos, utilizando el 95 % de nivel de confianza se demuestra que existe diferencia significativa al aplicar los niveles del factor A (Relación romero:solvente), B (Formulación del solvente) y C (Tiempo de maceración), al igual que el efecto combinado de los factores sobre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos.

La prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de la Tabla B-2 con respecto a la relación romero:solvente con un 95 % de nivel de confianza, indica que los tratamientos con relación 1:5 presenta mayor contenido de compuestos fenólicos con un promedio de 362,7 mg GA / g extracto, a diferencia de los que su relación es menor (2:5) con 283,7 mg GA / g extracto. Estos datos corroboran lo indicado por Monroy et al. (2007) y Martinelo et al. (2005) quienes utilizaron una relación sólido-solvente (p/p) de 1:5 para la obtención de extractos antioxidantes.

Además, la Tabla B-3 de la prueba LSD para la formulación del solvente muestra que los mejores resultados en cuanto al contenido de polifenoles se obtiene al aplicar 75 % de etanol y 25 % de agua con un promedio de 381,3 mg GA / g extracto, mientras que con 100 % etanol el promedio fue de 265,0 mg GA / g extracto. Las diferencias se explican predominantemente por la composición química del extracto, pues cada proporción de etanol:agua presenta una polaridad diferente y por tal motivo se generan contrastes en la extracción (Zaporozhets et al., 2004). Los resultados confirman lo expuesto por Monroy et al. (2007), quienes concluyen que la proporción etanol:agua con mayor rendimiento en cuanto a la extracción de polifenoles es muestras de romero es 75:25.

Por otra parte, el análisis LSD para el tiempo de maceración de la Tabla B-4 indica que los mejores resultados en cuanto al contenido de compuestos fenólicos se obtuvo al someter al romero a 48h de maceración con un valor de 442,4 frente a los 204,0 resultado de aplicar únicamente 24 horas. La diferencia marcada entre estos valores indica que este factor influye significativamente en el valor de compuestos fenólicos de los extractos analizados. Pacheco et al. (2006) indican que la eficiencia de la maceración está directamente relacionada con el tiempo de contacto entre el solvente y la materia prima.

Lo mencionado además, se evidencia en las figuras B-1, B-2 y B-3 que muestran las interacciones e intervalos LSD al 95 % para la formulación del solvente y la relación romero:solvente, la relación romero:solvente y el tiempo de maceración, y la formulación del solvente y el tiempo de maceración respectivamente. En cada uno de las figuras de interacción doble se evidencia que los niveles que mayor influencia tienen en el contenido de polifenoles de los extractos de romero son a_0 (1:5 romero:solvente), b_0 (75 % etanol: 25 % agua) y c_1 (48 horas de maceración).

4.2. Rendimiento de los extractos de romero

En la Tabla A-3 se registran los datos de pesos y rendimientos de los extractos de romero, cuyos promedios también se evidencian en la Tabla 5. Martinelo et al. (2005) indica que un valor referencial de la eficiencia de extracción por solventes de extractos antioxidantes es del 15,5 %, que al ser concentrados reducen su rendimiento entre 1,5 y 2 %, es decir son comparables valores del 13 al 15 %.

Tabla N° 5: Rendimiento promedio de los extractos de romero

Tratamientos	Promedio (%)
$a_0b_0c_0$	10,65
$a_0b_1c_0$	11,48
$a_0b_0c_1$	14,81
$a_0b_1c_1$	15,78
$a_1b_0c_0$	8,80
$a_1b_1c_0$	10,40
$a_1b_0c_1$	14,05
$a_1b_1c_1$	14,23

a_0	1:5 (romero : solvente)	b_0	75 % : 25 % (etanol : agua)	c_0	24 h
a_1	2:5 (romero : solvente)	b_1	100 % : 0 % (etanol : agua)	c_1	48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Los datos evidencian que los tratamientos con mayor rendimiento son el $a_0b_1c_1$ (15,78 %), $a_0b_0c_1$ (14,81 %), $a_1b_1c_1$ (14,23 %), $a_1b_0c_1$ (14,05 %), mientras que, los que los registran menor promedio son el $a_0b_1c_0$ (11,48 %), $a_0b_0c_0$ (10,65 %), $a_1b_1c_0$ (10,40 %), $a_1b_0c_0$ (8,80 %), es decir el factor que mayor relevancia tiene sobre el rendimiento es el tiempo de maceración de las muestras de romero, siendo así que todos las muestras que se sometieron a 48 horas registran valores más altos y que se encuentran dentro del rango referencial para este tipo de extracción.

En la Tabla B-4 se reportan los resultados del análisis de varianza para los valores de rendimiento, utilizando el 95 % de nivel de confianza se demuestra

que existe diferencia significativa al aplicar los niveles del factor A (Relación romero:solvente), B (Formulación del solvente) y C (Tiempo de maceración), al igual que el efecto combinado de los factores sobre el rendimiento de los extractos.

La prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de la Tabla B-6 con respecto a la relación romero:solvente con un 95 % de nivel de confianza, indica que los tratamientos con relación 1:5 presenta mayor rendimiento con un promedio de 13,02 % a diferencia de los que su relación es menor (2:5) con 11,87 %. Además, la Tabla B-7 de la prueba LSD para la formulación del solvente muestra que los mejores resultados se obtiene al aplicar 100 % etanol con un promedio de 12,97 %, esto se debe a que el etanol disuelve de mejor manera los compuestos orgánicos en relación al agua, ya que su polaridad genera contrastes en la extracción y permite obtener mayores rendimientos. Suhaj en el (2006) indicó que si se pretende obtener fracciones desodorizadas que conserven sus propiedades antioxidantes a partir de extractos naturales, se recurre, entre otros, a procesos de extracción por disolvente (etanol, metanol, acetona, hexano) para conseguir las denominadas oleorresinas, teniendo en cuenta que la polaridad del disolvente va a determinar la proporción entre los diferentes compuestos presentes en los extractos como se evidenció en la parte superior, ya que si bien el uso de etanol como solvente proporciona mayores rendimientos, influye significativamente en el contenido de compuestos fenólicos de las muestras que aumentan al utilizar 75 % etanol:25 % agua como solventes.

Por otra parte, el análisis LSD para el tiempo de maceración de la Tabla B-8 indica que los mejores resultados en cuanto al rendimiento se obtuvo al someter al romero a 48h de maceración con un valor de 14,56 % frente al 10,33 % resultado de aplicar únicamente 24 horas. La diferencia marcada entre estos valores indica que este factor influye significativamente en el valor de rendimiento de los extractos analizados, al igual que en el contenido de compuestos fenólicos.

Lo discutido además, se evidencia en las figuras B-4, B-5 y B-6 que muestran las Interacciones e intervalos LSD al 95 % para la formulación del solvente y la relación romero:solvente; la relación romero:solvente y el tiempo de maceración y la formulación del solvente y el tiempo de maceración respectivamente. En cada uno de las figuras de interacción doble se evidencia que los niveles que mayor influencia tienen en el rendimiento de los extractos de romero son a_0 (1:5 romero:solvente), b_1 (100 % etanol: 0 % agua) y c_1 (48 horas de maceración).

Después del análisis realizado a los resultados de las respuestas experimentales contenido fenólico y rendimiento de los tratamientos, se deduce que el mejor tratamiento para la extracción de antioxidantes de romero es el $a_0b_0c_1$, que combina el nivel bajo del factor A relación romero solvente a_0 (1:5 romero:solvente), el nivel bajo del factor B formulación del solvente b_0 (75 % etanol:25 % agua) y el nivel alto del factor C Tiempo de maceración c_1 (48 horas).

4.3. Caracterización del antioxidante de romero (mejor tratamiento)

Tabla N° 6: Características organolépticas y físico- químicas de los extractos de romero

Características	Descripción
Aspecto	Líquido
Color	Café oscuro
Olor	Característico
Densidad relativa	1,028
pH	4,95
Índice de refracción (20°C)	1,3655

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Las características organolépticas del extracto de romero de la Tabla 6, indican que el producto final es un líquido café oscuro de olor característico, resultados similares a los reportados por Estrada (2010) sobre la identificación de un extracto hidroalcohólico de romero, los valores de índice de refracción

también son similares, sin embargo el valor de pH difiere significativamente ya que se reporta un valor neutro de 7,47 debido al proceso de extracción.

4.4. Cinética química de la oxidación de aceite de aguacate con antioxidantes

La oxidación de lípidos es una de las principales causas de deterioro de los alimentos y por ende, de la pérdida de calidad, ya que convierte a los productos en inaceptables para el consumo. Las reacciones oxidativas, además de afectar a las características organolépticas (color, sabor y textura) y la disminución de valor nutricional debido a la degradación de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y ácidos grasos esenciales (ácidos linolénico y linoleico), también son responsables de la formación de compuestos poliméricos potencialmente tóxicos (Nawar, 1985 y Sherwin, 1978)

Con el fin de prevenir o retrasar el deterioro oxidativo, los antioxidantes han sido ampliamente utilizados. Pueden actuar como desactivadores de radicales libres, reduciendo compuestos, neutralizadores de las especies reactivas del oxígeno y, como inactivadores de iones metálicos (Dorko, 1994; Hudson, 1990; Shahidi et al., 1996 y Sherwin, 1978).

Por ello se aplicó el mejor extracto antioxidante de romero a₀b₀c₁ (1:5 romero:solvente, 75 % etanol:25 % agua y 48 horas de maceración) en aceite de aguacate extraído en el laboratorio, se midió el índice de peróxido durante el tiempo de almacenamiento como se muestra en la Tabla C-2, pero además se comparó el efecto del extracto con un antioxidante comercial BHT cuyos datos se registran en la Tabla C-3 y con un blanco, es decir aceite de aguacate sin antioxidante Tabla C-1.

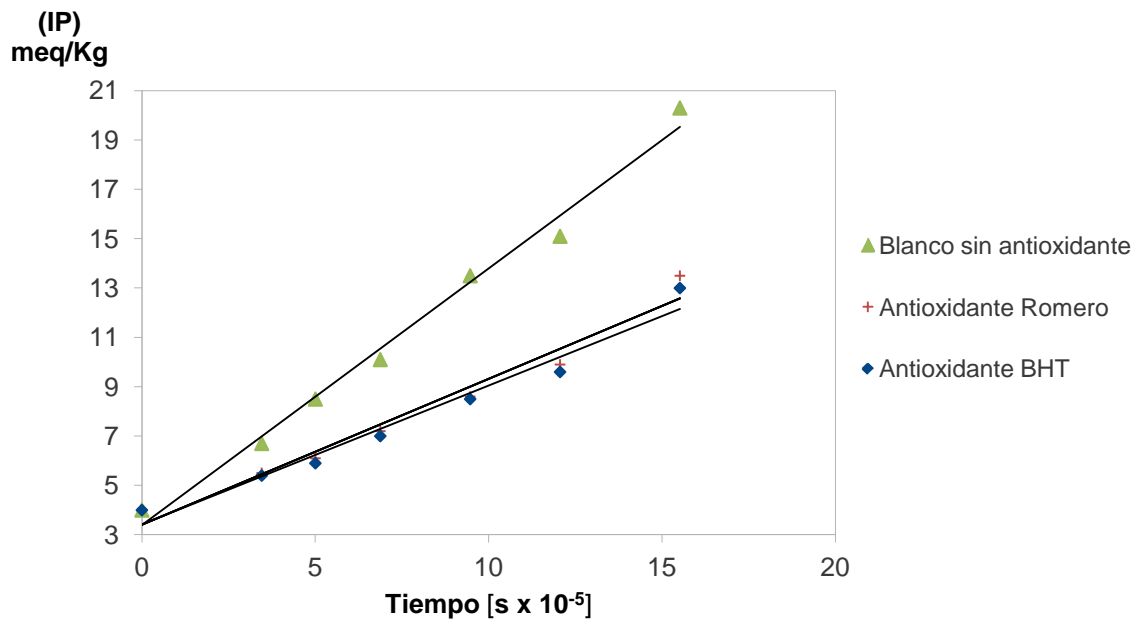


Gráfico N°3: Incremento del índice de peróxidos con el tiempo en aceite de aguacate con antioxidantes.

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Los datos graficados en el Gráfico 3 corresponden a la ecuación cinética de cero orden, se observa que los valores son más altos en el aceite sin antioxidantes, mientras que la linealización de datos de las muestras con antioxidante de romero y sintético son muy similares.

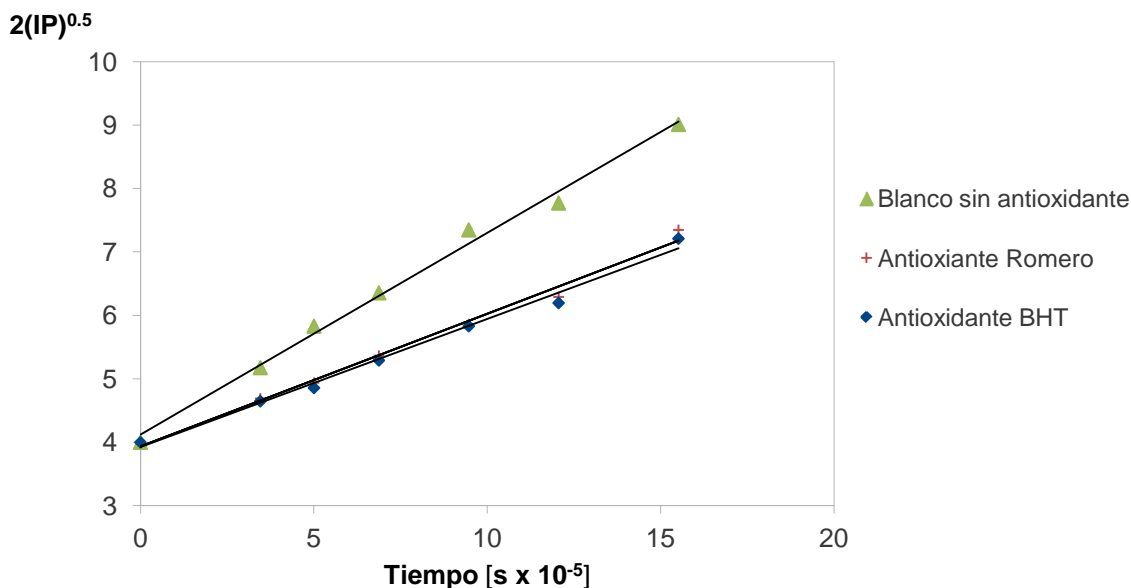


Gráfico N°4: Representación de la cinética de medio orden para la autoxidación de aceite de aguacate con antioxidantes.

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

El Gráfico 4 corresponde a la ecuación cinética de medio orden, el comportamiento de las muestras es similar al del gráfico anterior, ya que posee valores mayores el aceite sin antioxidantes, y datos muy similares los aceites con antioxidantes de romero y BHT, sin embargo la correlación de los datos es mucho mayor como se observa en la Tabla 7, lo que indica que estas ecuaciones son adecuadas para describir la velocidad de reacción.

Tabla N°7: Ecuaciones Cinéticas para la Autoxidación de Aceite de Aguacate con Antioxidantes

Producto Aplicado	Cero orden	Medio orden
Ningún Antioxidante	(IP) = 3,389 + 10,40*10 ⁻⁶ t (r=0,994)	2(IP) ^{0,5} = 4,120 + 3,179*10 ⁻⁶ t (r=0,997)
Antioxidante Romero	(IP) = 3,411 + 5,903*10 ⁻⁶ t (r=0,984)	2(IP) ^{0,5} = 3,936 + 2,091*10 ⁻⁶ t (r=0,996)
Antioxidante BHT	(IP) = 3,414 + 5,632*10 ⁻⁶ t (r=0,985)	2(IP) ^{0,5} = 3,922 + 2,020*10 ⁻⁶ t (r=0,995)

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

La comparación de los coeficientes de correlación (r) de la Tabla 7 y en vista de que los valores más altos corresponden a la cinética de medio orden, se puede precisar que esta es la más adecuada para describir la autoxidación del aceite de aguacate con y sin antioxidantes, mantenidos en condiciones isotérmicas y al ambiente.

Alvarado (1996) indica que los valores de índice de peróxido analizados en el tiempo, en muestras de aceite con diferentes antioxidantes, permiten seleccionar el mejor producto, que corresponderá al que determine el menor valor de la constante de velocidad de reacción.

De las ecuaciones de regresión, los valores de la constante de velocidad de reacción son:

$$\text{Aceite sin antioxidante} = 3,179 \cdot 10^{-6} \text{ [m eq. O}_2\text{/Kg]}^{0.5}\text{/[s]}$$

$$\text{Aceite con antioxidante Romero} = 2,091 \cdot 10^{-6} \text{ [m eq. O}_2\text{/Kg]}^{0.5}\text{/[s]}$$

$$\text{Aceite con antioxidante BHT} = 2,020 \cdot 10^{-6} \text{ [m eq. O}_2\text{/Kg]}^{0.5}\text{/[s]}$$

El signo positivo se explica por la determinación del producto resultante, que se incrementa con relación al tiempo.

La constante de velocidad del aceite con antioxidante de Romero y BHT es similar, lo que indica que el efecto antioxidante del extracto de romero es comparable con el antioxidante sintético, cabe mencionar que los dos se adicionaron en la misma concentración (0,02). Esto se corrobora con lo mencionado por Monroy et al. (2007), quienes concluyen que el antioxidante de romero es equiparable al antioxidante más empleado en la industria de los alimentos que es el BHT.

Almeida y Regitano (2000) indicaron que los extractos etanólicos de romero pueden ser utilizados como antioxidantes naturales y presentan la misma eficacia que la mezcla de los antioxidantes sintéticos BHA + BHT. Además

concluyen que los antioxidantes naturales en forma de extractos etanólicos puede ser una alternativa en la preservación de los aceites.

4.5. Análisis sensorial

Se realizó el análisis sensorial sobre la aceptabilidad del uso del antioxidante natural frente al antioxidante comercial en productos frescos y procesados, como se indica en las Tablas del Anexo E.

La Tabla E-1 muestra los puntajes totales del análisis sensorial de aceite de aguacate con antioxidantes, según el color, olor y aceptabilidad de las muestras, teniendo en cuenta que estos indicadores son los más importantes en la evaluación de la calidad sensorial de los aceites (Aparicio, et al. 2003). Los resultados del análisis de varianza para cada uno de los indicadores (Tablas E-2, E-3 y E-4), utilizando el 95 % de nivel de confianza demuestran que no existe diferencia significativa al aplicar los diferentes antioxidantes sobre la calidad sensorial del aceite de aguacate.

La aplicación del antioxidante natural en productos frescos se realizó mediante la adición de los aceites de aguacate con los diferentes antioxidantes en ensaladas frías de lechuga, tomate y cebolla perla, los resultados de las Tablas E-5, E-6, E-7, E-8 y E-9 indican que no existe diferencias significativas entre las muestras, es decir la adición del antioxidante de romero al aceite de aguacate no posee un efecto significativo sobre la calidad sensorial del aceite como aderezo en productos frescos ni procesados ya que los resultados de las cataciones de las muestras de aceite para la fritura de papas prefritas congeladas con antioxidantes indican que de igual manera no existe diferencias significativas (Tablas E-10, E-11, E-12, E-13 Y E14).

Sin embargo las observaciones y puntuaciones otorgadas a las muestras catadas en las diferentes sesiones muestran que el aceite de aguacate no es tan apetecido por el panel de cata y por ende las valoraciones de manera

general no son tan altas, esto indica la falta de consumo de este tipo de aceite en nuestro medio y el desconocimiento de sus características nutricionales.

4.6. Verificación de hipótesis

En base a todo lo mencionado y puesto que a un nivel de confianza del 95 % se determinó una diferencia significativa, “se acepta la hipótesis alternativa”, es decir “la relación romero-solvente (1:5 romero:solvente), tiempo de maceración (48 horas) y la formulación del solvente (75 % etanol:25 % agua) si influyen sobre el rendimiento (14,81 %) y sobre el contenido fenólico (638,9 mg GA / g extracto) de los extractos de romero”.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- A nivel experimental y en condiciones de laboratorio, se realizó la extracción de los antioxidantes de romero mediante la maceración de las hojas previamente secadas y molidas, la centrifugación y evaporación del solvente de los extractos. La caracterización indicó que la densidad relativa del extracto es 1,028, el índice de refracción es 1,3655, el pH es 4,95 y las características organolépticas indica que el extracto es un líquido café oscuro de olor característico. La aplicación se realizó sobre aceite de aguacate puro extraído en el laboratorio, la eficiencia fue similar al antioxidante comercial BHT y se probó así la utilidad de los estabilizantes oxidativos naturales sobre grasas y aceites.
- Los factores relación romero – solvente, formulación del solvente, y tiempo de maceración influyen significativamente sobre el rendimiento y el contenido fenólico de los extractos del romero analizados al 95 % del nivel de confianza, por ello se realizó la prueba LSD y se determinó que la mejor combinación de los niveles de cada factor y por ende el mejor tratamiento para la extracción de antioxidantes de romero es el $a_0b_0c_1$, que combina el nivel bajo del factor A relación romero solvente a_0 (1:5 romero:solvente), el nivel bajo del factor B formulación del solvente b_0 (75 % etanol:25 % agua) y el nivel alto del factor C Tiempo de maceración c_1 (48 horas).
- Al comprar el índice de peróxidos resultante de aplicar: el antioxidante del romero y un antioxidante sintético (BHT), sobre un aceite de aguacate virgen extraído en el laboratorio durante 20 días, se observó que el valor

máximo alcanzado por el primero es de 13,50 y del segundo 13,00, frente a 20,30 del blanco es decir sin antioxidante. Además los valores del coeficiente cinético de las muestras es de $2,091 \cdot 10^{-6}$ y $2,020 \cdot 10^{-6}$ [m eq. O_2/Kg]^{0.5}/[s] lo que indica que no existe diferencias significativas entre los antioxidantes utilizados y se obtienen beneficios similares en cuanto al incremento del valor del peróxido con el tiempo. Además los resultados indicaron que la reacción cinética de medio orden es la que mejor ajusta los datos.

- El análisis económico del mejor tratamiento indica que el mililitro de extracto de romero tiene un costo de 0.93 dólares, considerando una utilidad del 30 % y las condiciones de laboratorio empleadas para la obtención del extracto.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un análisis cromatográfico del extracto de romero, con la finalidad de conocer con certeza los componentes antioxidantes del mismo.
- Entrenar un panel de cata para que las pruebas sensoriales de aplicación del antioxidante de romero frente a otros antioxidantes en productos frescos y procesados muestre con mayor certeza las diferencias existentes, especialmente al aplicarlos en diferentes aceites como el de aguacate.
- Extender el estudio del mejor tratamiento y determinar la capacidad antioxidante del mismo mediante diferentes métodos para comparar y asegurar los resultados.
- Efectuar un estudio comparativo del poder antioxidante de los distintos grupos fenólicos presentes en el extracto de romero.

- Comparar el contenido fenólico y actividad antioxidante de extractos de romero de diferentes variedades.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos informativos

- **Título**

Obtención de un extracto antioxidante de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), mediante el empleo de solventes por maceración.

- **Institución ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato – Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

- **Beneficiarios:**

- ✓ Familias campesinas de comunidades del Ecuador que cultivan Romero únicamente como planta curativa y medicinal.
- ✓ La industria que requiere aditivos alimentarios que controlen la oxidación de grasas y que estén permitidos por los organismos pertinentes al ser aditivos naturales.
- ✓ El consumidor final que adquiere productos con antioxidantes naturales que no representan un riesgo para su salud.

- **Ubicación:** Ambato – Ecuador

- **Tiempo estimado para la ejecución:** 7 meses

- **Equipo técnico responsable:** Egda. Nelly Patricia González, Ing. Mg. María Teresa Pacheco.

- **Costo:** \$ 2860

6.2. Antecedentes de la propuesta

Los antioxidantes, tanto sintéticos como naturales, se añaden a aceites y grasas, así como a los alimentos, para prevenir la formación de colores, aromas y sabores no deseables y de otros compuestos que se originan en la oxidación de los lípidos. Entre los antioxidantes sintéticos, los más empleados son el ter-butil-hidroxi-tolueno (BHT), el ter-butii-hidroxi-anisol(BHA)y later-butil-hidroxi-quinona(TBHQ).Se estima que la vida útil de muchos productos alimentarios aumenta entre un 15 y un 200 % por el empleo de antioxidantes (Kramer, 1985).

En los últimos años los antioxidantes naturales han adquirido importancia debido a su función de prevenir o retardar el daño oxidativo que afecta a los lípidos y, en menor grado, a las proteínas presentes en los alimentos, protegiéndolos de la progresiva alteración, la industria alimentaria de distintos países se ha interesado en su uso y lo están incluyendo como aditivos naturales (Fundación para la Innovación Agraria. 2008).

El romero es una especie cuyo hábitat natural es la región mediterránea, sur de Europa, norte de África y también Asia Menor (LLacsa, L. 2009). Este arbusto, propio de zonas secas y áridas, tiene como principales países productores a España, Marruecos y Túnez (Arteche, et al., 1998).

Estudios realizados por el profesor Cheng Olin en el Departamento de Química Aplicada de la Universidad Yunnan durante los últimos 10 años indican que los antioxidantes de romero aplicados en grasas animales, vegetales y aceites, previenen y retrasan la rancidez, y por ello extienden la vida útil de los alimentos. Además indican que el romero proporciona un antioxidante seguro, eficiente, resistente al calor, con efecto anti-oxidante, y características de amplia aplicación (Fooding, 2012)

Pese a que existen estudios sobre la forma de obtención y propiedades de los antioxidantes naturales, la escasa difusión de los mismos en nuestro medio, hace que se requiera el ajuste de ciertos parámetros de extracción y dosificación; razón por la cual en nuestro país, estos productos siguen siendo poco aprovechados.

6.3. Justificación

En la actualidad se trata de obtener antioxidantes naturales que permitan disminuir el consumo de productos sintéticos y garanticen la ausencia de toxicidad. Estos antioxidantes se encuentran comúnmente en hierbas, especias y otros materiales de origen vegetal.

Por tal motivo, se ha escogido el extracto de romero como fuente principal de antioxidantes para el control oxidativo de grasas y aceites. Teniendo en cuenta que el romero (*Rosmarinus officinalis L.*), es una planta rica en principios activos y con acción sobre casi todos los órganos de cuerpo humano. Al tener un alto contenido en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos.

El aprovechar la riqueza natural, en cuanto a la producción de especias de origen vegetal impulsando al procesamiento de materias primas en la extracción de antioxidantes a partir de romero, permitiría generar un valor agregado al romero y su ende su aprovechamiento industrial, además ayudaría a reducir el número de importaciones de aditivos alimentarios y generaría una participación activa de la población en el fortalecimiento de la soberanía alimentaria a través de la recuperación de los cultivos ancestrales andinos actualmente subexplotados.

6.4. Objetivos

6.4.1. Objetivo General

- Extraer los antioxidantes del romero (*Rosmarinus officinalis L.*), mediante el empleo de solventes en relación 75 % etanol: 25 % agua, relación 1:5 romero-solvente y 48 horas de maceración.

6.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar el rendimiento y contenido de polifenoles del extracto antioxidante de romero.
- Comparar el índice de peróxidos resultantes de aplicar: el antioxidante del romero y un antioxidante sintético (BHT), sobre un aceite de aguacate virgen extraído en el laboratorio.
- Establecer el efecto de la utilización del antioxidante del romero y antioxidante sintético (BHT), sobre la calidad sensorial de un aceite de aguacate virgen extraído en el laboratorio, aplicado en productos frescos y procesados.

6.5. Análisis de factibilidad

El proyecto de investigación es de tipo tecnológico, ya que con ello es posible implementar una nueva metodología para la extracción de los antioxidantes del romero (*Rosmarinus officinalis L.*), procurando así obtener un aditivo alimentario natural que ayude a la conservación de grasas y aceites en la industria de los alimentos.

El análisis de factibilidad es además de carácter socio económico y ambiental, puesto que se incentivaría el interés en explotar el romero incrementando su cultivo; esto permitiría general un valor agregado al romero y por ende el aprovechamiento industrial, además ayudaría a reducir el número de importaciones de aditivos alimentarios y generaría una participación activa de la población en el fortalecimiento de la soberanía alimentaria a través de la recuperación de los cultivos ancestrales andinos actualmente subexplotados.

Existe suficiente información bibliográfica referente a la extracción de antioxidantes naturales, lo que permite tener una guía base para el desarrollo de la presente propuesta. Hay disponibilidad de la materia prima por ser el romero producido en Ecuador.

6.6. Fundamentación

Aditivos alimentarios

Norma CODEX STAN 192-1995 para los aditivos alimentarios

Antioxidantes como aditivos alimentarios

Los aditivos antioxidantes cumplen un papel importante dentro de la industria alimentaria ya que protegen a los alimentos de la auto-oxidación de las grasas, fenómeno que origina productos potencialmente tóxicos (peróxidos, radicales libres). Los antioxidantes se unen a los radicales libres que puedan formarse, convirtiéndolos en inactivos.

6.7. Metodología

Según el diagrama de flujo del Anexo F.

Tabla N°8: Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la propuesta	Explotación e industrialización del romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>), mediante la obtención de un extracto antioxidante.	Revisión bibliográfica y procesos de elaboración.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 1000	1 mes
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta	Pruebas preliminares de la extracción del antioxidante.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 3500	2 meses
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Aplicación de tecnología de extracción del producto	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 7500	4 meses
4. Evaluación de la propuesta	Comprobación del proceso	Encuestas a consumidores	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 1000	1 mes

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013

6.8. Administración

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto Ing. Mg. Mayte Pacheco y Egda. Patricia González.

Tabla N°9: Administración de la Propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Obtención de un extracto antioxidante de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.), mediante el empleo de solventes por maceración.	Baja oferta antioxidantes naturales para el control oxidativo de grasas y aceites	Obtener un extracto antioxidante de romero que ayude al control oxidativo de grasas y aceites	-Realizar la maceración, centrifugación y evaporación del solvente para obtener el extracto de romero -Establecer el efecto de la utilización de mezclas de solventes sobre la cantidad de fenoles totales del extracto -Evaluar la capacidad antioxidante del extracto en comparación con un antioxidante sintético (BHT)	Investigador: Egda. Patricia González, Ing. Mayte Pacheco.

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

6.9. Prevención de la evaluación

Tabla N°10: Prevención de la evaluación

¿Quiénes solicitan evaluar?	-Productores de romero -Industrias procesadoras de alimentos con antioxidantes -Consumidores
¿Por qué evaluar?	-Verificar la calidad del producto final -Corregir errores en la tecnología de elaboración
¿Para qué evaluar?	-Determinar la tecnología adecuada de extracción de un compuesto antioxidante natural
¿Qué evaluar?	-Tecnología utilizada. -Materias primas. -Resultados obtenidos -Producto terminado
¿Quién evalúa?	-Director del proyecto -Tutor -Calificadores
¿Cuándo evaluar?	-Todo el tiempo desde las pruebas preliminares, hasta la obtención del producto.
¿Cómo evaluar?	-Mediante instrumentos de evaluación .
¿Con qué evaluar?	-Experimentación. -Normas establecidas

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

MATERIAL DE REFERENCIA

Bibliografía

Akoh, C.C. y Min, D.B. 2002. Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology. 2a Ed. New York. Marcel Dekker.

Almajano, M. 2009. Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de Goji. Consorci Escola Industrial de Barcelona.

Almaraz, N.; Da Grapa, M.; Avila, J.; Naranjo, N.; Herrera, J. y Gonzalez, L. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). Journal of Food Composition and Analysis: an Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems. 20(2):119.

Almeida, D. y Regitano, D. 2000. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. Ciencia E Tecnologia De Alimentos. 20 (2)

Almela, L.; Sánchez, B.; Fernández, J.A.; Roca, M.J. and Rabe, V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. Journal of Chromatography, 1120(2): 221-229.

Alonso, J.R. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos, 2a. ed., Corpus, Buenos Aires, 545 pp

Alvarado, J. de D. 1996. Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos. Radio Comunicaciones. Quito-Ecuador. p 66-72.

Aparicio, R. y Hardwood, J. 2003. Manual del aceite de oliva. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. p 345-380

Arévalo, Y.; Robledo, S. y Muñoz, L. 2009. Evaluación *in vitro* de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas, 38(2): 131-141.

Arteche, A.; Vanaclocha, B.; Güenechea, J. 1998. Fitoterapia. Tercera edición. Vademécum de prescripción. Plantas medicinales. Barcelona: Masson.

Asamblea Nacional Constituyente. 2008. Constitución de la República del Ecuador. Quito – Ecuador. Obtenido vía online en: <http://www.asambleanacional.gob.ec> (2012/12/23)

Atti-Santos, C.; Rossato, M. and Fernandez, P. 2005. Physicochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52(6):1035-1039.

Avila, R.; Navarro, A.; Vera, O.; Dávila, R.; Melgoza, N. y Meza, R. 2011. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar, 15(43): 23-36

Azti, Tecnalía. 2007. Los aditivos antioxidantes cumplen un papel importante dentro de la industria alimentaria ya que protegen a los alimentos de la auto-oxidación de las grasas, fenómeno que origina productos potencialmente tóxicos. España.

Batista, A.; Cerezal, P. y Fung, V. 1993. El aguacate (*Persea americana*, M.). 1. Valor nutricional y composición. Alimentaria. 247:63-69.

Botsaris, A.S. 1995. Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras. Ícone, São Paulo, 234 pp.

Branen, A. 1975. "Toxicology and Biochemistry of BHA and BHT". J. Am. Oil Chemists' Soc. 82, 59-63.

Caribe, J. y Campos, J.M. 1991. Plantas que ayudan o homem-guia práctico para a época atual. Cultrix/ Pensamento, São Paulo, 356 pp.

Carmona, T. 2010. "Polifenoles, el metabolismo de carbohidratos y su relación con la DM2". Consultada en Kofee.com, Artículos científicos el 16 de agosto de 2011.

Cerón, I.; Higuera, J.; y Cardona, C. 2010. Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. Vector, 5:17-26

Chang, S.; Ostric, B.; Hsieh, O. y Huang, C. 1975. "Production of natural antioxidant from Rosmary and Sage". Patente U.S. n°. 3.950.266.

Codex Stan 192-1995. Norma General del Codex para los aditivos alimentarios.

Damechki, M.; Sotiropoulou, S. and Tsimidou, M. 2001. Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. Grasas y Aceites. 52 (3-4): 207-213. Djeddi, A.; Bauchenah, N. and Settar, I. 2007. Composition and

antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algerian Chemistry of Natural Compounds, 43(4): 487-490.

Dorko, C. 1994. Antioxidants used in foods. Food Technology. 48(4): 33.

Eskin, N.A.M. y Robinson, D.S. 2001. Food shelf live stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes. CRC series in contemporary food science. Boca Raton: CRC Press.

Estrada, S. 2010. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Tesis de grado de Bioquímico Farmacéutico. ESPOCH-Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador.

Federal Register Archives. 1977. Catalog of Federal Register Publications & Online Services. www.ofr.gov. (22/12/2012)

Floris, T.; Filippino, G.; Scrugli, S.; Pinna, M.B.; Argiolas, F.; Argiolas, A.; Murru, M. and Reverchon, E. 2010. Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process. The Journal of Supercritical Fluids, 54(2):165-170.

FOODING. 2012. Trusted source-quality ingredients. Aditivos alimentarios extracto de romero. www.chinafooding.com. (21/12/2012)

Fundación para la Innovación Agraria. 2008. Producción de Romero y Tomillo. Proyectos de Innovación en la V Región de Valparaíso. Serie Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario. Ministerio de Agricultura. Chile

García, C.; Zafrilla, P. y Tomás, F. 1998. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. Phytochemical Analysis, 9(6):274-277.

Gracia, M. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Obtenido vía online en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf. (2013/01/10)

Guerrero, A y Rodríguez, R. 2012. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en fibra dietética extraída de cultivos ancestrales andinos para su utilización como suplemento alimenticio. Tesis de grado de Ingeniería en Bioquímica. UTA-FCIAL. Ambato-Ecuador.

Gülçin, Ý.; Oktay, M.; Kierçci, E. and Küfreviolu, Ö.Ý. 2003. Screening of antioxidante and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food Chemistry. 83: 371-382.

Gutiérrez, J. y Morales, J. A. 2004. "Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito". Rev. Medicina Interna de México. 20 (4) julio-agosto.

Harbone, J.B. 1994. The flavonoids, advances in research since 1986. 2a. Ed. Great Britain: Capman y Hall.

Hernández, Fernández y Batista. 2008. Metodología de la Investigación. Edición Mac Graw Hill. México. 850 págs.

Herrera, E.; Medina, F. y Naranjo, L. 2008. Tutoría de la Investigación. Edición Universitaria. Ambato, Ecuador. 250. págs.

Hirose, M.; Hagiwara, A.; Hasui, T.; Inoue, K. and Ito, N. 1986. "Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats".CaneerLett. 30, 169-174. C.A. 105:59592j.

Hudson, B.J.F. 1990. Food Antioxidants. New York: Elsevier Science Publishers Ltda, chap. 1, p. 1-18, chap. 3, p. 64-98.

Huo, L.; Lu, R.; Li, P.; Liao, Y.; Chen, R.; Deng, C.; Lu, C.; Wei, X. and Li, Y. 2011. "Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts from the stems of *Jasminum nervosum* Lour". Grasas y aceites, 62 (2), abril-junio, 149-154.

Kaur, E. and Kapoor, H. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science and Technology. 37:153-161.

Khorshidi, J.; Rahmat, M.; Mohamed, F.T. and Himan, N. 2009. Influence of drying methods, extraction time, and organ type on essential oil content of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Natural Science, 7(11): 42-44.

Kramer, R. 1985. "Antioxidants in clove".-J. Am. Oil Chemists' Soc. 62, 111-113.

LLacsa, L. 2009. Ficha técnica Romero. Red Peruana de Alimentación y Nutrición. Publicación virtual. Lima - Perú.

López, M. 2008. El romero planta aromática con fines antioxidantes. Ámbito farmacéutico. Fitoterapia. 27(7):60-63

Mantell, C.; Rodríguez, M.; Martínez de la Ossa, E. 2002. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling. *Chemical Engineering Science*, 57(18):3831-3838.

Martinello, M. y Pramparo, M. 2005. Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. *Inf. Tecnol.* 16(5):17-20

Mierlici, I.D. 2009. Phytochemical study of some active principles with antioxidant action from the *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* species. *Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ioan Cuza. Génova Italia*.

Monroy, A.; Totosaus, A.; González, L.; De la fuente, K. y García, I. 2007. Antioxidantes I. Chile ancho (*Capsicum annum* L.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) como fuentes naturales de antioxidantes. *Ciencia y Tecnología*. 6(6):112-116

Montes de Oca, R.G. 2010. Elaboración y control de comprimidos fitofarmacéuticos de ajeno (*Artemisia absinthium* L), romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) para combatir la menstruación dolorosa. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

Nawar, W.W. 1985. Lipids. In FENNEMA, O.R. *Food Chemistry*. 2 ed. New York, Marcel Dekker. p. 139-244.

Norma CODEX STAN 19-1981 para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales.

Norma Mexicana NMX-F-052-SCFI-2008: Aceites y grasas- aceite de aguacate – especificaciones.

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 277, 1978-02. Grasas y aceites. Determinación del índice de peróxido.

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 46, 1973: Grasas y Aceites Comestibles Aditivos.

Organización de los Estados Americanos (OAS). 2013. Industrialización del aguacate. Plan de Desarrollo Región I. República del Ecuador - Inerhi Conade. Obtenido vía online en: <http://www.oas.org/dsd/publications/unit/oea60s/ch21.htm> (2013/05/10)

Ortega, M. 2003. Valor nutrimental de la pulpa fresca de aguacate Hass. In Proceedings of V World Avocado Congress. 19-24 Octubre. pp. 741-748. Granada-Málaga, España.

Ortiz, A.; Dorantes, L.; Galíndez, J. y Cárdenas, E. 2004. Effect of a novel oil extraction method on avocado (*Persea Americana* Mill.) pulp microstructure. Plant Foods for Human Nutrition. 59(1):11-14.

Ortiz, A.; Dorantes, L.; Galíndez, J. y Guzmán, R. 2003. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea Americana* Mill.) oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(8):2216-2221.

Pacheco, M.; Pujos, M.; Vasconez, C. y Saltos, H. 2006. Extracción y caracterización del colorante amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) para la utilización en la elaboración de yogurt Tesis de grado de Ingeniería en Alimentos. UTA-FCIAL. Ambato-Ecuador.

Peyman, S. and Reza, F.A. 2007. Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L., by hydrodistillation-head space solvent microextraction. Journal of Flavour and Fragrance, 10(5): 1002-1007.

Pietta, P.; Simonetti, P. and Mauri, P. 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46:4487-4490

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

Proexport. 2002. Exportaciones colombianas totales según sectores de promoción. En: <http://www.proexport.com.co/intelelexport/aplicacion/frames.asp>; (2002/05/14)

Rajeshwar, Y.; Gupta, M. y Mazumder, K. 2005. In vitro lipid peroxidation and antimicrobial activity of mucuna pruriens seeds. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics. 4(1):32-35.

Ratovohery, V.; Lozano, F. and Gaydou, M. 1988. Fruit development effect on fatty acid composition of *Persea americana* fruit mesocarp. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 36(2):287-293.

Rühlemann, O. 2002. Katalog 2002. Gärtnerei Rühlemanns Kräuter & Duftpflanzen. 27367 Horstedt, Alemania.

- Ruiz, O.M. 2000. Tratado de Botánica, 3a. ed., Porrúa, México D.F., 1256 pp.
- Saltos, H. 2010. Sensometría: Análisis en el Desarrollo de Alimentos Procesados. Editorial pedagógica Freire. Ambato – Ecuador. Págs.: 266 – 279.
- Sardans, J.; Roda, F. and Peñuelas, J. 2005. Effects of water and nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. Environmental and Experimental Botany, 53(1): 1-11.
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES). 2009. Plan Nacional para el Buen Vivir. Quito – Ecuador. Obtenido vía online en: <http://www.planificacion.gob.ec>. (2012/12/23)
- Shahidi, F.; Janitha, P.K. and Wanasundara, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 32(1): 67-103.
- Shahidi, F.; Wanasundara, U.N. 1996. Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity. In: SHAHIDI, F. (Ed) Natural antioxidants – Chemistry, health effects and applications. Champaign: AOCS Press. Chap. 24, p. 379-395.
- Sherwin, E.R. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. Journal of the American Oil Chemists' Society, 55(3):809-814.
- Simon, J.E.; Chadwick, A.F. and Cracker, L.E. 1984. Herbs: an indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books. 770 pp., Hamden, CT. Disponible en: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/med-aro/factsheets/roseMarY.html>. (2008/03)
- SOLAGRO. 2006. Aguacate. Obtenido vía online en: <http://www.solagro.com.ec/cultdet.php?vcultivo=Aguacate> (2013/05/10)
- Sotelo, J.I.; Martinez, D. and Marriel. P. 2002. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride induced acute hepatocytotoxicity in the rat. Journal of Ethnopharmacology, 81(3):145-154.
- Suhaj, M. 2006. Spice antioxidant isolation and their antiradical activity: a review. J. Food Comp. Anal. 19: 531-537.
- Tschinggerl, C. and Bucar, F. 2010. Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts. Scientia Pharmaceutica, 1(4): 483-492.

Valenzuela, A y Nieto, S. 1995. Los antioxidantes: protectores de la Calidad en la Industria Alimentaria. Aceites y Grasas. Septiembre, 310-321.

Vatai, T.; Skerget, M.; Knez, Z.; Kareth, S.; Wehowski, M. and Weidner, E. 2008. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. The Journal of Supercritical Fluids, 45(1):32-36

Vourela, S.; Meyer, A. y Heinonen, M. 2005. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapessed meal phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(26):8202-8207.

Westervelt, P. 2003. Effect of growing medium and irrigation rate on growth of *Rosmarinus officinalis*. M.Sc. thesis. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.

Zaporozhets, O.; Krushynska, O.; Lipkovska, N. y Barvinchenko, V. 2004. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(1):21-25.

Zheng, W. and Wang, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49(11): 5165-5170.

ANEXO A

RESPUESTAS EXPERIMENTALES

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Tabla A-1: Valores de absorbancia promedio de los extractos de romero a 760 nm

Tratamientos	R 1	R 2	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	0,158	0,152	0,155 ± 0,0042
a ₀ b ₁ c ₀	0,126	0,130	0,128 ± 0,0028
a ₀ b ₀ c ₁	0,376	0,365	0,371 ± 0,0078
a ₀ b ₁ c ₁	0,241	0,248	0,245 ± 0,0049
a ₁ b ₀ c ₀	0,166	0,171	0,169 ± 0,0035
a ₁ b ₁ c ₀	0,113	0,109	0,111 ± 0,0028
a ₁ b ₀ c ₁	0,242	0,245	0,244 ± 0,0021
a ₁ b ₁ c ₁	0,211	0,205	0,208 ± 0,0042

a ₀ 1:5 (romero : solvente)	b ₀ 75 % : 25 % (etanol : agua)	c ₀ 24 h
a ₁ 2:5 (romero : solvente)	b ₁ 100 % : 0 % (etanol : agua)	c ₁ 48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

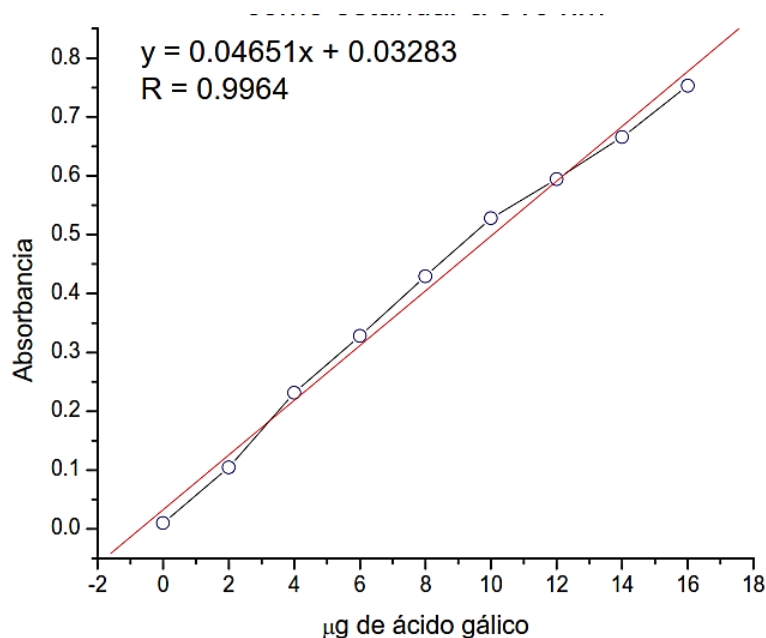


Figura A-1: Curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 760 nm.

Fuente: Gracia M. 2007.

Tabla A-2: Contenido de compuestos fenólicos en extractos de romero

Tratamientos	R 1	R 2	Promedio
	mg GA / g extracto		
a ₀ b ₀ c ₀	236,8	225,5	231,2 ± 8,0
a ₀ b ₁ c ₀	176,3	183,9	180,1 ± 5,4
a ₀ b ₀ c ₁	649,3	628,5	638,9 ± 14,7
a ₀ b ₁ c ₁	393,9	407,1	400,5 ± 9,4
a ₁ b ₀ c ₀	252,0	261,4	256,7 ± 6,7
a ₁ b ₁ c ₀	151,7	144,1	147,9 ± 5,4
a ₁ b ₀ c ₁	395,8	401,4	398,6 ± 4,0
a ₁ b ₁ c ₁	337,1	325,8	331,4 ± 8,0

GA: Ácido Gálico

a₀ 1:5 (romero : solvente) b₀ 75 % : 25 % (etanol : agua) c₀ 24 h
a₁ 2:5 (romero : solvente) b₁ 100 % : 0 % (etanol : agua) c₁ 48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

RENDIMIENTO

Tabla A-3: Pesos y rendimientos de los extractos de romero

Tratamientos	Materia prima (g)	Extracto (g)		Promedio (g)	Promedio (%)
		R 1	R 2		
a ₀ b ₀ c ₀	200,00	21,20	21,40	21,30	10,65
a ₀ b ₁ c ₀	200,00	22,90	23,00	22,95	11,48
a ₀ b ₀ c ₁	200,00	28,67	28,57	28,62	14,81
a ₀ b ₁ c ₁	200,00	31,50	31,60	31,55	15,78
a ₁ b ₀ c ₀	200,00	17,70	17,50	17,60	8,80
a ₁ b ₁ c ₀	200,00	20,80	20,80	20,80	10,40
a ₁ b ₀ c ₁	200,00	28,20	28,00	28,10	14,05
a ₁ b ₁ c ₁	200,00	28,40	28,50	28,45	14,23

a₀ 1:5 (romero : solvente) b₀ 75 % : 25 % (etanol : agua) c₀ 24 h
a₁ 2:5 (romero : solvente) b₁ 100 % : 0 % (etanol : agua) c₁ 48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

CONTENIDO FENÓLICO

Tabla B-1: Análisis de varianza del contenido fenólico de los extractos de romero obtenido con los diferentes tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Relación romero-solvente	24960,1000	1	24960,1000	362,20	0,0000*
B:Formulación del solvente	54160,6000	1	54160,6000	785,94	0,0000*
C:Tiempo de maceración	227338,0000	1	227338,0000	3298,96	0,0000*
INTERACCIONES					
AB	3221,9500	1	3221,9500	46,75	0,0001*
AC	22911,4000	1	22911,4000	332,47	0,0000*
BC	5306,3600	1	5306,3600	77,00	0,0000*
ABC	13103,3000	1	13103,3000	190,15	0,0000*
RESIDUAL	551,2970	8	68,9121		
TOTAL (CORREGIDO)	351554,0000	15			

Nivel de confianza = 95 %

* = significancia

a ₀ 1:5 (romero : solvente)	b ₀ 75 % : 25 % (etanol : agua)	c ₀ 24 h
a ₁ 2:5 (romero : solvente)	b ₁ 100 % : 0 % (etanol : agua)	c ₁ 48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla B-2: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para contenido fenólico según la relación romero-solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Relación romero-solvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2:5	8	283,7	b
1:5	8	362,7	a

a ₀ 1:5 (romero : solvente)	b ₀ 75 % : 25 % (etanol : agua)	c ₀ 24 h
a ₁ 2:5 (romero : solvente)	b ₁ 100 % : 0 % (etanol : agua)	c ₁ 48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla B-3: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para contenido fenólico según la formulación del solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Formulación del solvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 % : 0 %	8	265,0	b
75 % : 25 %	8	381,3	a

a ₀	1:5 (romero : solvente)	b ₀	75 % : 25 % (etanol : agua)	c ₀	24 h
a ₁	2:5 (romero : solvente)	b ₁	100 % : 0 % (etanol : agua)	c ₁	48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla B-4: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para contenido fenólico según el tiempo de maceración

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tiempo de maceración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
24 h	8	204,0	b
48 h	8	442,4	a

a ₀	1:5 (romero : solvente)	b ₀	75 % : 25 % (etanol : agua)	c ₀	24 h
a ₁	2:5 (romero : solvente)	b ₁	100 % : 0 % (etanol : agua)	c ₁	48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

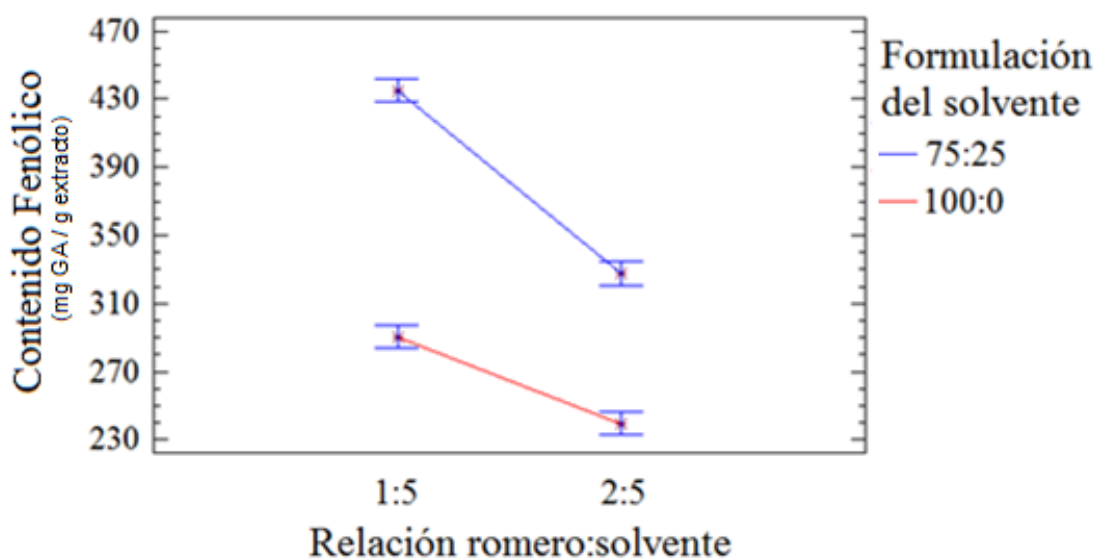


Figura B-1: Interacción e intervalos LSD al 95 % para la formulación del solvente y la relación romero:solvente

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

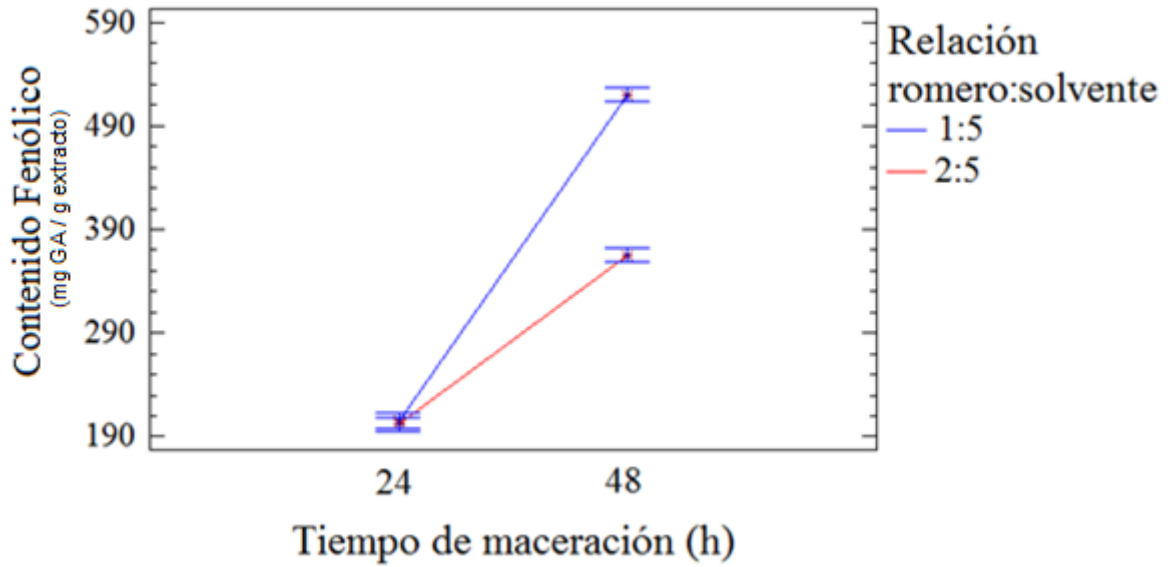


Figura B-2: Interacción e intervalos LSD al 95 % para la relación romero:solvente y el tiempo de maceración

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

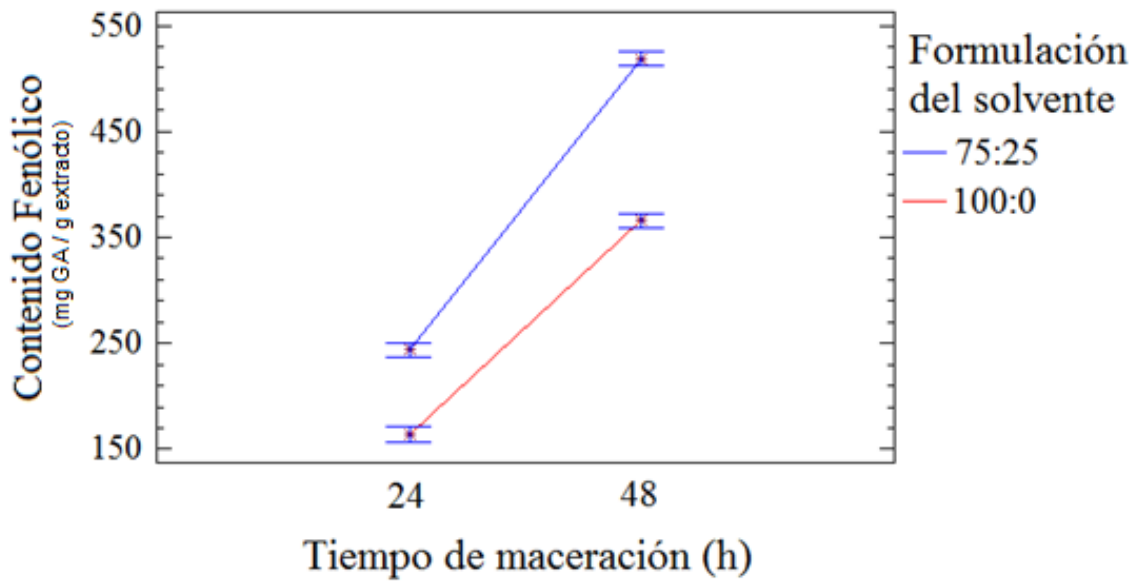


Figura B-3: Interacción e intervalos LSD al 95 % para la formulación del solvente y el tiempo de maceración

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

RENDIMIENTO

Tabla B-5: Análisis de varianza del rendimiento de los extractos de romero obtenido con los diferentes tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Relación romero-solvente	5,2900	1	5,2900	2116,00	0,0000*
B:Formulación del solvente	4,4100	1	4,4100	1764,00	0,0000*
C:Tiempo de maceración	71,4025	1	71,4025	28561,00	0,0000*
INTERACCIONES					
AB	0,1056	1	0,1056	42,25	0,0002*
AC	0,3906	1	0,3906	156,25	0,0000*
BC	0,1056	1	0,1056	42,25	0,0002*
ABC	1,2100	1	1,2100	484,00	0,0000*
RESIDUAL	0,0200	8	0,0025		
TOTAL (CORREGIDO)	82,9344	15			

Nivel de confianza = 95 %

* = significancia

a₀ 1:5 (romero : solvente) b₀ 75 % : 25 % (etanol : agua) c₀ 24 h
a₁ 2:5 (romero : solvente) b₁ 100 % : 0 % (etanol : agua) c₁ 48 h

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla B-6: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para rendimiento según la relación romero-solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Relación romero-solvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2:5	8	11,87	b
1:5	8	13,02	a

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla B-7: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para rendimiento según la formulación del solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Formulación del solvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
75 % : 25 %	8	11,92	b
100 % : 0 %	8	12,97	a

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla B-8: Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para rendimiento según el tiempo de maceración

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tiempo de maceración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
24 h	8	10,33	b
48 h	8	14,56	a

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

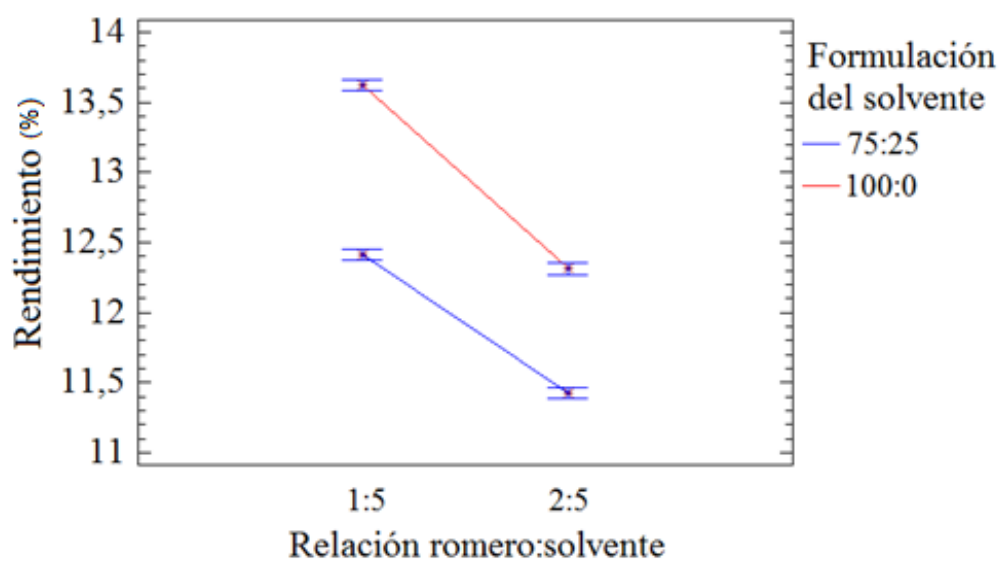


Figura B-4: Interacción e intervalos LSD al 95 % para la formulación del solvente y la relación romero:solvente

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

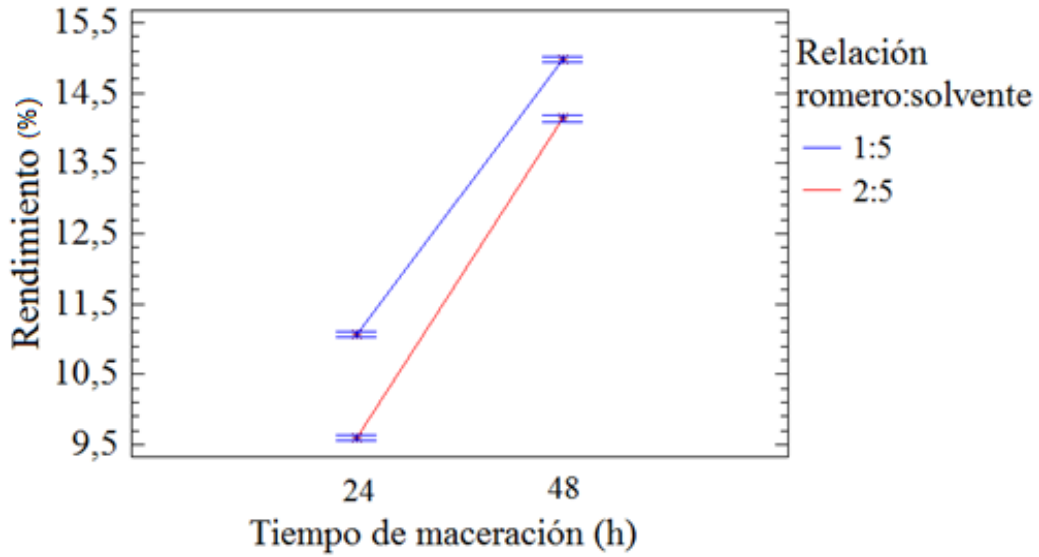


Figura B-5: Interacción e intervalos LSD al 95 % para la relación romero:solvente y el tiempo de maceración

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

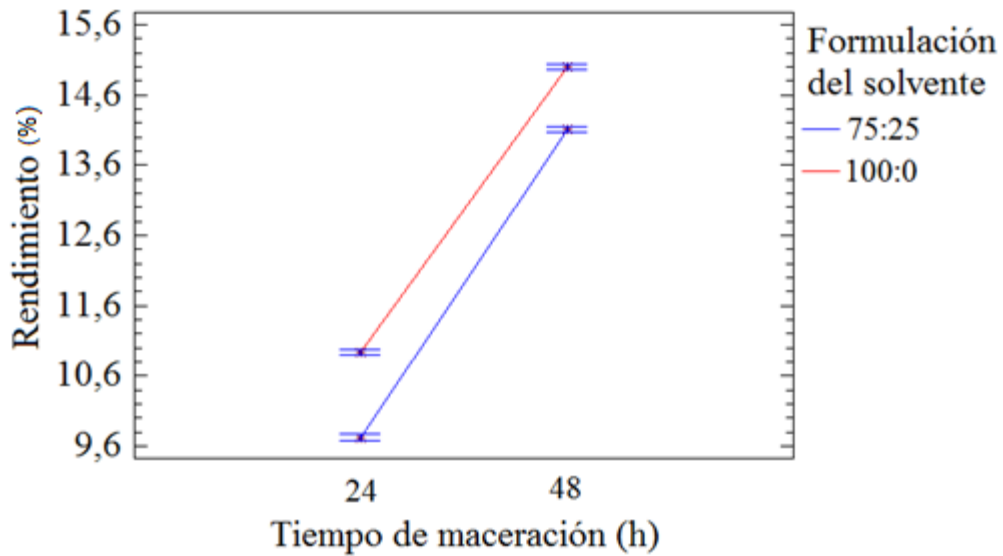


Figura B-6: Interacción e intervalos LSD al 95 % para la formulación del solvente y el tiempo de maceración

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANEXO C

ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN ACEITE DE AGUACATE

Tabla C-1: Valores del Índice de Peróxidos Promedio Registrados en Aceite de Aguacate Mantenido en contacto con Aire a 20°C durante 20 días

Tiempo		(IP)	2(IP) ^{0.5}
Horas	s x 10 ⁻⁵		
0,00	0,00	4,00	4,00
96,00	3,46	6,70	5,18
139,00	5,00	8,50	5,83
191,00	6,88	10,10	6,36
263,00	9,47	13,50	7,35
335,00	12,06	15,10	7,77
431,00	15,52	20,30	9,01

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla C-2: Valores del Índice de Peróxidos Promedio Registrados en Aceite de Aguacate con Antioxidante de Romero (BHT) Mantenido en contacto con Aire a 20°C durante 20 días

Tiempo		(IP)	2(IP) ^{0.5}
Horas	s x 10 ⁻⁵		
0,00	0,00	4,00	4,00
96,00	3,46	5,50	4,69
139,00	5,00	6,10	4,94
191,00	6,88	7,20	5,37
263,00	9,47	8,60	5,87
335,00	12,06	9,90	6,29
431,00	15,52	13,50	7,35

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla C-3: Valores del Índice de Peróxidos Promedio Registrados en Aceite de Aguacate con Antioxidante Sintético (BHT) Mantenido en contacto con Aire a 20°C durante 20 días

Tiempo		(IP)	2(IP) ^{0.5}
Horas	s x 10 ⁻⁵		
0,00	0,00	4,00	4,00
96,00	3,46	5,40	4,65
139,00	5,00	5,90	4,86
191,00	6,88	7,00	5,29
263,00	9,47	8,50	5,83
335,00	12,06	9,60	6,20
431,00	15,52	13,00	7,21

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANEXO D

FICHAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEITE DE AGUACATE SOBRE EL CUAL SE HA APLICADO:

472: Extracto de Romero

501: BHT

726: Blanco

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
EVALUACIÓN SENSORIAL DE ACEITE DE AGUACATE

Nombre:.....

Fecha:.....

Sírvase evaluar cada uno de los atributos aquí planteados y clasifique según su apreciación personal con numeración del 1 al 5, siendo 5 característica de mayor valor y 1 característica de menor valor.

ATRIBUTOS	CARACTERÍSTICAS	MUESTRAS		
		472	501	726
COLOR	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			
OLOR	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			
ACEPTABILIDAD	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			

MUCHAS GRACIAS!

RECOMENDACIONES:-----

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
EVALUACIÓN SENSORIAL DE ENSALADA FRÍA CON ACEITE DE
AGUACATE

Nombre:.....

Fecha:.....

Sírvase evaluar cada uno de los atributos aquí planteados y clasifique según su apreciación personal con numeración del 1 al 5, siendo 5 característica de mayor valor y 1 característica de menor valor.

ATRIBUTOS	CARACTERÍSTICAS	MUESTRAS		
		472	501	726
COLOR	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			
OLOR	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			
SABOR	1 Disgusta mucho			
	2 Disgusta poco			
	3 Ni gusta ni disgusta			
	4 Gusta poco			
	5 Gusta mucho			
ACEPTABILIDAD	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			

MUCHAS GRACIAS!

RECOMENDACIONES:-----

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
EVALUACIÓN SENSORIAL DE PAPAS FRITAS EN ACEITE DE AGUACATE

Nombre:.....

Fecha:.....

Sírvase evaluar cada uno de los atributos aquí planteados y clasifique según su apreciación personal con numeración del 1 al 5, siendo 5 característica de mayor valor y 1 característica de menor valor.

ATRIBUTOS	CARACTERÍSTICAS	MUESTRAS		
		472	501	726
COLOR	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			
OLOR	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			
SABOR	1 Disgusta mucho			
	2 Disgusta poco			
	3 Ni gusta ni disgusta			
	4 Gusta poco			
	5 Gusta mucho			
ACEPTABILIDAD	1 Desagrada mucho			
	2 Desagrada			
	3 Ni agrada ni desagrada			
	4 Agrada			
	5 Agrada mucho			

MUCHAS GRACIAS!

RECOMENDACIONES:-----

ANEXO E

RESULTADOS DEL ANÁLISIS SENSORIAL DEL MEJOR TRATAMIENTO APLICADO EN ACEITE DE AGUACATE

ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEITE DE AGUACATE CON ANTIOXIDANTES

Tabla E-1: Puntaje total del análisis sensorial de aceite de aguacate con antioxidantes

Atributos	Réplicas	Muestras		
		Aceite con AS	Aceite con AN	Aceite
Color	R1	46	41	46
	R2	43	44	44
Olor	R1	43	44	39
	R2	45	44	42
Aceptabilidad	R1	41	43	45
	R2	44	45	43

AS = Antioxidante Sintético (BHT)

AN = Antioxidante Natural (Extracto de Romero)

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-2: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al color de aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Color del aceite	7,00	2	3,500	0,9545	0,478
RESIDUAL	11,00	3	3,667		
TOTAL (CORREGIDO)	18,00	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-3: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al olor de aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Olor del aceite	16,33	2	8,167	3,7692	0,152
RESIDUAL	6,50	3	2,167		
TOTAL (CORREGIDO)	22,83	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-4: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto a la aceptabilidad de aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Aceptabilidad del aceite	3,00	2	1,500	0,5294	0,636
RESIDUAL	8,50	3	2,830		
TOTAL (CORREGIDO)	11,50	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANÁLISIS SENSORIAL DE ENSALADA FRÍA CON ACEITE DE AGUACATE CON ANTIOXIDANTES

Tabla E-5: Puntaje total del análisis sensorial de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

Atributos	Réplicas	Muestras		
		Aceite con AS	Aceite con AN	Aceite
Color	R1	46	45	43
	R2	44	47	46
Olor	R1	45	41	43
	R2	46	48	47
Sabor	R1	48	43	41
	R2	46	44	47
Aceptabilidad	R1	47	45	43
	R2	44	48	45

AS = Antioxidante Sintético (BHT)

AN = Antioxidante Natural (Extracto de Romero)

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-6: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al color de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Color del aceite	2,33	2	1,167	0,4118	0,695
RESIDUAL	8,50	3	2,833		
TOTAL (CORREGIDO)	10,83	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-7: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al olor de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Olor del aceite	1	2	0,5	0,0454	0,956
RESIDUAL	33	3	11,0		
TOTAL (CORREGIDO)	34	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-8: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al sabor de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Sabor del aceite	14,33	2	7,167	1,0488	0,451
RESIDUAL	20,50	3	6,833		
TOTAL (CORREGIDO)	34,83	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-9: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto a la aceptabilidad de ensalada fría con aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Aceptabilidad del aceite	6,33	2	3,167	0,8636	0,506
RESIDUAL	11,00	3	3,667		
TOTAL (CORREGIDO)	17,33	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANÁLISIS SENSORIAL DE PAPAS FRITAS EN ACEITE DE AGUACATE CON ANTIOXIDANTES

Tabla E-10: Puntaje total del análisis sensorial de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

Atributos	Réplicas	Muestras		
		Aceite con AS	Aceite con AN	Aceite
Color	R1	47	46	50
	R2	45	49	47
Olor	R1	46	42	43
	R2	44	43	44
Sabor	R1	45	48	44
	R2	46	47	49
Aceptabilidad	R1	43	47	44
	R2	45	47	48

AS = Antioxidante Sintético (BHT)

AN = Antioxidante Natural (Extracto de Romero)

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-11: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al color de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Color del aceite	6,33	2	3,167	0,8636	0,506
RESIDUAL	11,00	3	3,667		
TOTAL (CORREGIDO)	17,33	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-12: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al olor de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Olor del aceite	6,33	2	3,167	3,1667	0,182
RESIDUAL	3,00	3	1,000		
TOTAL (CORREGIDO)	9,33	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-13: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto al sabor de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Sabor del aceite	4,00	2	2,000	0,4444	0,678
RESIDUAL	13,50	3	4,500		
TOTAL (CORREGIDO)	17,50	5			

Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla E-14: Análisis de varianza del análisis sensorial respecto a la aceptabilidad de papas fritas en aceite de aguacate con antioxidantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TRATAMIENTOS					
Aceptabilidad del aceite	9,33	2	4,667	1,4000	0,372
RESIDUAL	10,00	3	3,333		
TOTAL (CORREGIDO)	19,33	5			

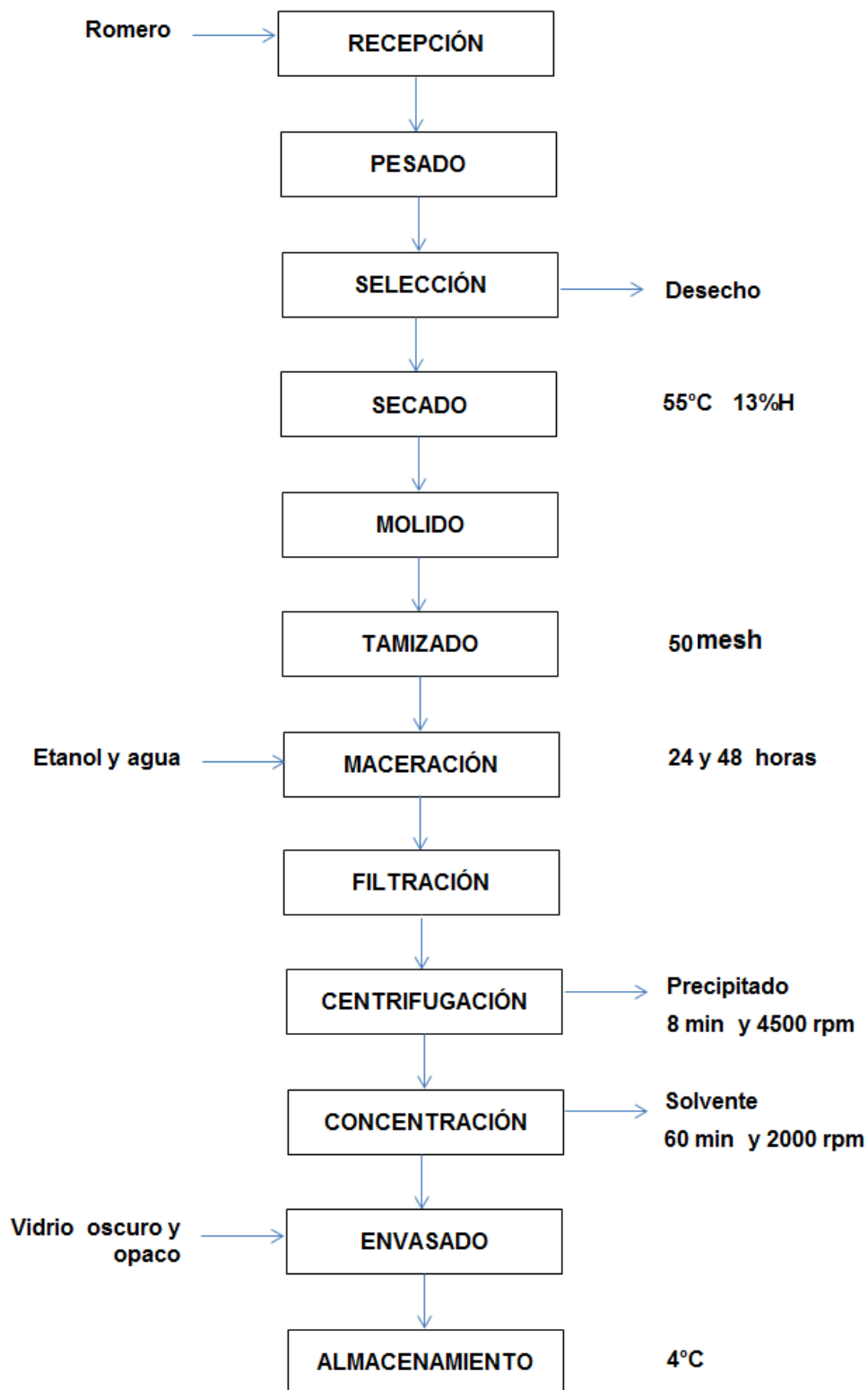
Nivel de confianza = 95 %

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANEXO F

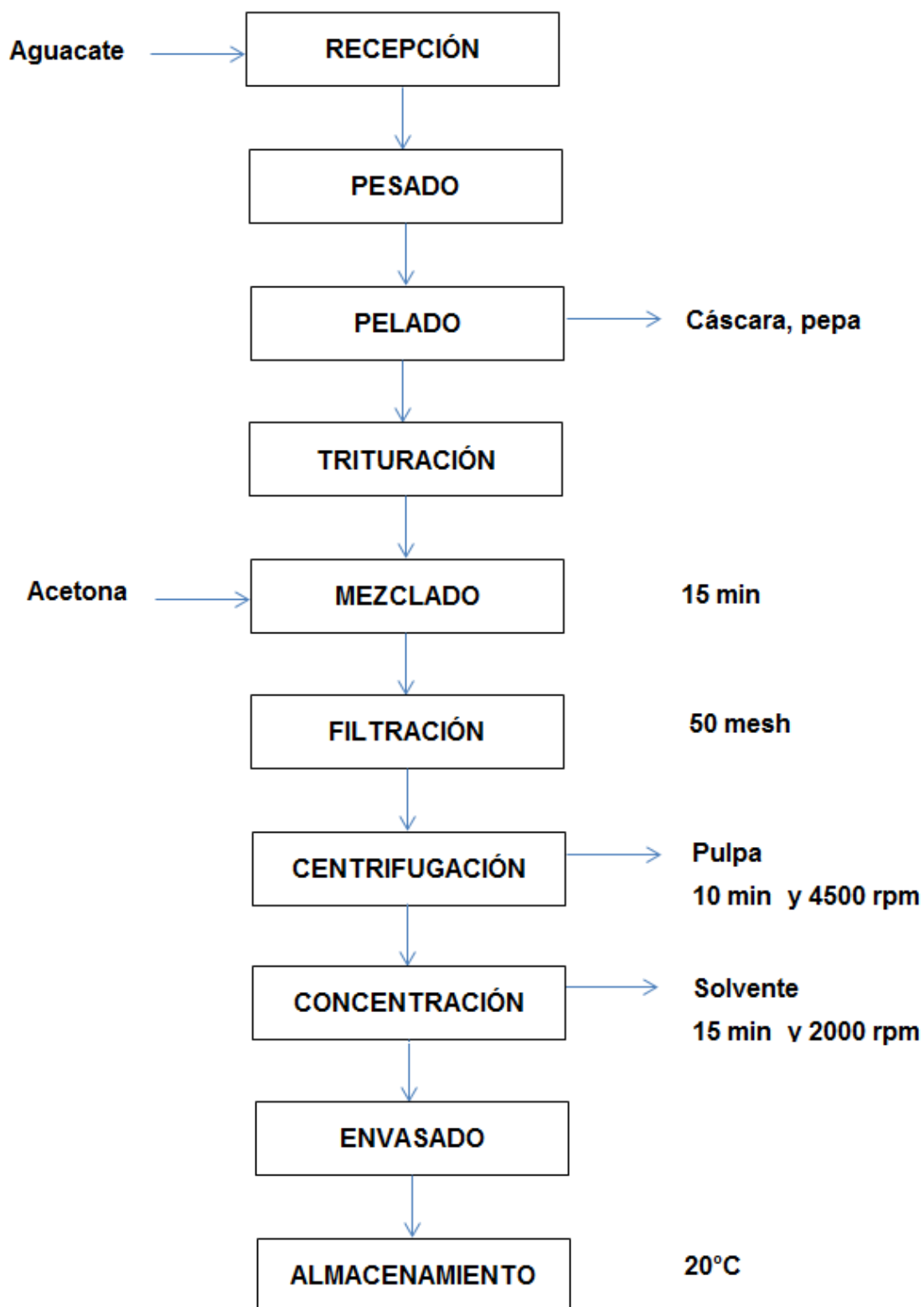
DIAGRAMAS DE FLUJO

Anexo F-1. Diagrama de flujo para la extracción de antioxidantes de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)



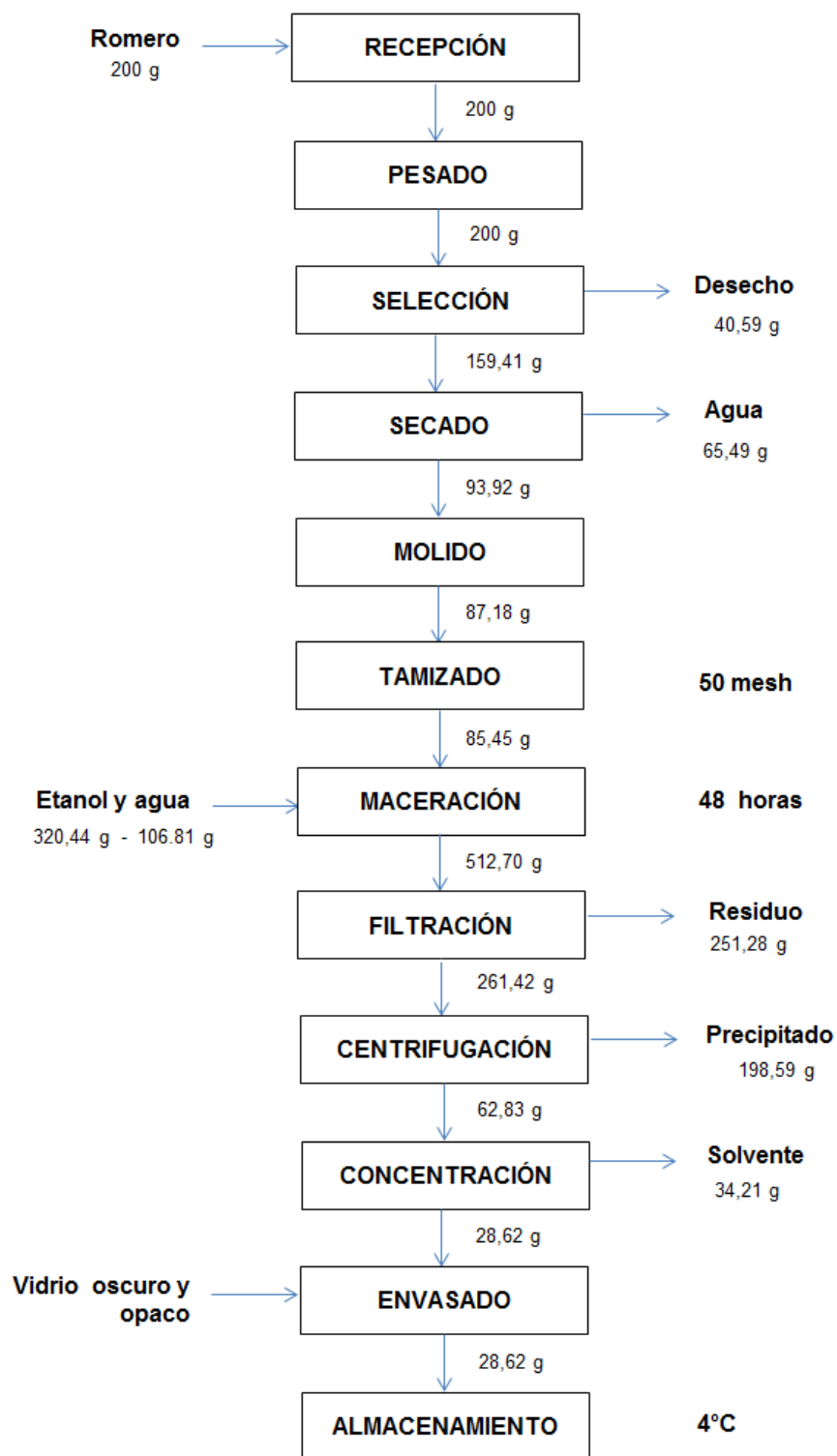
Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Anexo F-2. Diagrama de flujo para la extracción de aceite de aguacate



Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Anexo F-3. Balance de materiales del mejor tratamiento (1:5 romero:solvente, 75 % etanol: 25 % agua y 48 horas de maceración) para la extracción de antioxidantes de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)



Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANEXO G

ANÁLISIS ECONÓMICO

Tabla G-1: Materiales directos e indirectos

MATERIALES	CANTIDAD (Kg)	VALOR UNITARIO (\$)/Kg	VALOR TOTAL
Romero (Kg)	0,20	1,00	0,20
Etanol (g)	0,32	2,20	0,70
Envases, 30 ml	2,00	0,33	0,66
Total			1,56

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla G-2: Equipos y utensilios

EQUIPOS	COSTO (\$)	HORAS UTILIZADAS	VIDA ÚTIL (AÑOS)	COSTO ANUAL (\$)	COSTO DÍA (\$)	COSTO HORA (\$)	TOTAL (\$)
Balanza analítica	300,00	2	10	30,00	0,12	0,02	0,030
Balanza mecánica	60,00	1	5	12,00	0,05	0,01	0,006
Túnel de secado	350,00	13	10	35,00	0,14	0,02	0,228
Rotavapor	600,00	2	5	120,00	0,48	0,06	0,120
Centrífuga	296,00	1	5	59,20	0,24	0,03	0,03
Recipientes para maceración	240,00	48	5	48,00	0,19	0,02	1,15
Utensilios varios	90,00	4	5	18,00	0,07	0,01	0,04
Total							1,60

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla G-3: Suministros

SERVICIOS	CONSUMO	C. UNITARIO (\$)	TOTAL (\$)
Energía (Kw/H)	6,00	0,09	0,54
Agua (m3)	2,00	0,24	0,48
Total			1,02

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla G-4: Personal

PERSONAL	SUELDO (\$)	C. DÍA (\$)	C. HORA (\$)	HORAS UTILIZADAS	TOTAL (\$)
1	318,00	15,90	1,99	8	15,90

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

Tabla G-5: Inversión estimada para la obtención del extracto

Costo Total	20,09
Costo Unitario (ml)	0,72
Precio de Venta (ml)	0,93
Utilidad por ml	0,22
Utilidad total	7,10

Elaborado por: Nelly Patricia González, 2013.

ANEXO H

FOTOGRAFÍAS

Materia Prima

Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)



Preparación de la materia prima

Secado



Molido



Tamizado



Extracción de antioxidantes por maceración



Filtración



Centrifugación



Concentración



Determinación del contenido fenólico



Extracción del aceite de aguacate



Destilación de la acetona



Determinación del índice de peróxidos

