

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**DESARROLLO DE UN EXTRACTO DE TARA  
(*CAESALPINIA SPINOSA*) Y ESTUDIO DE SU EFECTO  
SOBRE EL CONTENIDO DE NEO-CONTAMINANTES,  
CALIDAD Y PERFIL SENSORIAL DE PAN TIPO  
HALLULLA**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Ciencias de los Alimentos y Memoria para optar  
al Título de Ingeniero en Alimentos por:**

**ILSE ELIZABETH SAAVEDRA GATICA**

**Director de Tesis: M.S.c. Andrea Bunger Timmermann**

**Santiago – CHILE**

**Noviembre 2016**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

## ILSE ELIZABETH SAAVEDRA GATICA

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias de los Alimentos y Título de Ingeniero en Alimentos, en el examen público rendido el día

---

Director de Tesis:

M.S.c. Andrea Bunger Timmermann \_\_\_\_\_

Co-director de Tesis:

Dr. Franco Pedreschi Plasencia \_\_\_\_\_

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Paz Robert Canales \_\_\_\_\_

Dra. Alicia Rodríguez Melis \_\_\_\_\_

Dr.-Ing. Kong S. Ah-Hen \_\_\_\_\_

LA PRESENTE MEMORIA ES PARTE DEL  
PROYECTO FONDECYT 1150146 TITULADO  
“Mitigation of Neo-formed Contaminants in Chilean  
Starchy Foods and its Effect on the Consumer  
Acceptance”

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Luis e Ilse y a mis hermanos, Luis Fernando y Cristian, por permitir enfocarme por completo en mis estudios, por su apoyo incondicional y por siempre creer en mí. En especial, a mi madre, por su cariño, amor y comprensión en todo momento.

A mi amiga Katherine, por su compañía en casi toda mi formación académica, desde enseñanza básica hasta la Universidad, por su apoyo emocional y preocupación constante.

A mis compañeros de generación, por siempre estar presentes de alguna u otra forma, marcando con buenos momentos esta etapa que concluye. Sobre todo, a mis amigas, María Jesús y Natalia, por brindarme su compañía y apoyo, no sólo en los estudios, sino en todo ámbito a lo largo de estos años. Gracias por permitirme crecer como profesional y como persona.

A mis directores de tesis, Andrea Bungler y Franco Pedreschi, por su profesionalismo, dedicación y guía en todo este proceso.

A Juan Pablo y Alicia por su buena disposición y compañía en toda la etapa experimental del proyecto.

Finalmente, a los panelistas sensoriales, por su participación desinteresada, y al proyecto Fondecyt N° 1150146, por el financiamiento otorgado.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Productos horneados: Pan.....	2
2.2 Neo – contaminantes.....	3
2.3 Exposición de neo – contaminantes en la dieta.....	3
2.4 Toxicología y peligro potencial.....	5
2.5 Mecanismos de formación de neo – contaminantes.....	7
2.6 Tecnologías de mitigación de neo – contaminantes.....	10
2.7 Antecedentes de la tara: Fuente natural de antioxidantes.....	13
3. HIPOTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos Específicos.....	16
5. MATERIALES Y EQUIPOS.....	17
5.1 Materiales.....	17
5.1.1 Materias primas.....	17
5.1.2 Reactivos químicos.....	17
5.1.3 Insumos.....	18
5.2 Equipos e instrumentos.....	18

6.	METODOLOGÍA.....	20
6.1	Caracterización química de vainas de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	20
6.1.1	Materia prima. ....	20
6.1.2	Obtención del polvo de tara. ....	20
6.1.3	Caracterización química del polvo de tara. ....	21
6.2	Obtención y caracterización química de un extracto de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	22
6.2.1	Extracción polifenoles. ....	22
6.2.2	Selección del extracto. ....	23
6.2.3	Caracterización química.....	23
6.3	Elaboración de pan tipo hallulla. ....	24
6.4	Determinación de neo-contaminantes en pan tipo hallulla.....	25
6.4.1	Determinación del contenido de acrilamida.....	25
6.4.2	Determinación del contenido de furano.....	27
6.5	Conformación de un panel sensorial entrenado. ....	29
6.5.1	Reclutamiento y selección de jueces. ....	29
6.5.2	Entrenamiento de jueces.....	29
6.5.3	Validación del panel sensorial.....	32
6.6	Evaluación sensorial con panel entrenado. ....	33
6.7	Análisis estadísticos.....	33
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	34
7.1	Caracterización química de vainas de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	34
7.2	Obtención y caracterización química de un extracto de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	38

7.2.1	Obtención y selección de un extracto de polifenoles.....	38
7.2.2	Caracterización química.....	39
7.3	Determinación de neo-contaminantes en pan tipo hallulla.....	43
7.3.1	Determinación del contenido de acrilamida.....	43
7.3.2	Determinación del contenido de furano.....	48
7.4	Conformación de un panel sensorial entrenado. ....	52
7.4.1	Entrenamiento de jueces.....	52
7.4.2	Validación del panel sensorial.....	55
7.5	Evaluación sensorial.....	57
7.5.1	Análisis descriptivo.....	57
7.5.2	Calidad sensorial.....	61
8.	CONCLUSIONES.....	63
9.	BIBLIOGRAFIA.....	65
10.	ANEXOS.....	76
	Anexo 1: Mercado de alimentos procesados en Chile .....	76
	Anexo 2: Niveles de acrilamida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) monitoreados desde 2007 a 2010 y valores indicativos (aplicables desde 2011) para la ocurrencia de acrilamida en diferentes alimentos. ....	76
	Anexo 3: Exposición dietaria estimada de acrilamida ( $\mu\text{g kg}_{\text{pc}}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) en diferentes grupos de población del mundo.....	77
	Anexo 4: Comparación de niveles de furano ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en alimentos de diferentes zonas geográficas.....	77
	Anexo 5: Exposición dietaria de furano ( $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) por sector de edad en diferentes zonas geográficas del mundo.....	78

Anexo 6: Método extracción triple de polifenoles de vainas de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ) para caracterización química de la materia prima.....	79
Anexo 7: Métodos de obtención de extractos de polifenoles de vainas de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	80
Anexo 8: Proceso elaboración de pan tipo hallulla.....	81
Anexo 9: Ficha de descripción de productos para sesión 1 entrenamiento de panel sensorial.....	82
Anexo 10: Ficha de perfil descriptivo específico para pan tipo hallulla.....	83
Anexo 11: Tabla de valoración de calidad para pan tipo hallulla con escala Karlsruhe.....	84
Anexo 12: Folio color corteza para entrenamiento panel sensorial.....	85
Anexo 13: Folio color violeta grisáceo para entrenamiento panel sensorial..	85
Anexo 14: Características principales de pan tipo hallulla obtenidas de la primera sesión de entrenamiento del panel sensorial.....	86
Anexo 15: Nivel de discriminación de los jueces individuales del panel sensorial, mediante análisis de varianza ANOVA simple.....	86
Anexo 16: Desviaciones estándar de las parcialidades individuales por muestra (SD) y del error (Se), en evaluación del desempeño de cada juez .	87

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones experimentales para la obtención de los 5 extractos de vainas de tara. ....	23
Tabla 2: Formulación de pan tipo hallulla. ....	24
Tabla 3: Condiciones experimentales de pan tipo hallulla para determinación de contenido de acrilamida. ....	26
Tabla 4: Condiciones del equipo GC – MS para cuantificación de acrilamida. .	27
Tabla 5: Condiciones experimentales de pan tipo hallulla para determinación de contenido de furano. ....	28
Tabla 6: Condiciones del equipo GC – MS para cuantificación de furano. ....	29
Tabla 7: Muestras evaluadas en la primera sesión de entrenamiento del panel sensorial. ....	30
Tabla 8: Muestras evaluadas desde la segunda sesión de entrenamiento del panel sensorial.....	31
Tabla 9: Muestras evaluadas en sesiones de validación del panel sensorial. ..	32
Tabla 10: Características dimensionales de vainas rojas y amarillas de tara. ..	34
Tabla 11: Características químicas de vainas rojas y amarillas de tara.....	35
Tabla 12: Influencia de la relación materia prima – solvente y método de secado, en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos, respectivamente. ....	38
Tabla 13: Caracterización química del extracto de vainas de tara.....	39

Tabla 14: Caracterización de la fracción fenólica del extracto de polifenoles de vainas de tara, expresados como mg EAG por g de extracto. ....	41
Tabla 15: Contenido de acrilamida en pan tipo hallulla bajo condiciones experimentales.....	43
Tabla 16: Contenido de furano en pan tipo hallulla bajo condiciones experimentales.....	49
Tabla 17: Análisis de varianza ANOVA de 2 vías del test de calidad de las muestras de pan tipo hallulla evaluadas en cada sesión de entrenamiento. ....	53
Tabla 18: Resultados del análisis de varianza ANOVA de 2 vías del perfil descriptivo de las muestras de pan tipo hallulla evaluadas en cada sesión de entrenamiento. ....	53
Tabla 19: Parámetros de rendimiento global, mediante análisis de varianza ANOVA multifactorial del panel completo. ....	56
Tabla 20: Resumen de los resultados de ANOVA de 3 vías del análisis descriptivo de pan tipo hallulla con distinta concentración de extracto de tara. ....	57
Tabla 21: Resultado de prueba de múltiples rangos de Tukey para el descriptor color violeta grisáceo de pan tipo hallulla con distintos niveles de extracto de tara.....	59
Tabla 22: Resultados de ANOVA de 3 vías del test de calidad de pan tipo hallulla con distinta concentración de extracto de tara.....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vías de formación de acrilamida en alimentos. (A) Vía principal de formación de acrilamida. (B) Vía menor de formación de acrilamida.....	8
Figura 2: Diferentes vías de formación de furano. ....	10
Figura 3: Árbol (a), fruto verde (b), fruto maduro (c) y semillas maduras (d) de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	13
Figura 4: Estructura química supuesta de taninos de tara.....	14
Figura 5: Imágenes de vainas sanas (a), vainas sin semillas (b) y polvo de vainas de tara (c), clasificadas por color rojo (') y amarillo ("). ....	21
Figura 6: Cromatograma por HPLC – PAD de los compuestos fenólicos del extracto de vainas de tara.....	42
Figura 7: Reducción porcentual del contenido de acrilamida en pan tipo hallulla adicionado con extracto de tara, respecto al control (sin extracto). ....	45
Figura 8: Reducción porcentual del contenido de furano en pan tipo hallulla adicionado con extracto de tara, respecto al control (sin extracto). ....	50
Figura 9: Perfil sensorial de pan tipo hallulla con distinta concentración de extracto de tara. ....	58
Figura 10: Imágenes de corteza y miga de pan tipo hallulla con distintos niveles de extracto de vainas de tara.....	60

## RESUMEN

Neo-contaminantes como acrilamida y furano se han detectado en alimentos amiláceos altamente consumidos en Chile, como el pan. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de un extracto de antioxidantes de tara sobre la formación de acrilamida y furano en pan tipo hallulla, sin afectar negativamente sus atributos sensoriales. Vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) fueron caracterizadas químicamente y sometidas a un proceso de extracción sólido – líquido (1:60 p/v) a 60 °C, con agua como solvente, para la obtención de sus compuestos fenólicos. El extracto fue añadido en concentraciones de hasta 3000 mg/kg en pan tipo hallulla, para la cuantificación de sus niveles de acrilamida y furano por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC – MS), y evaluación de su calidad y perfil sensorial mediante un panel de 11 jueces previamente entrenado y validado. Se obtuvo un extracto de vainas de tara con 617,84 mg equivalentes de ácido tánico (EAT) por g (b.h.), determinado por el método Folin Ciocalteu, y capacidad antioxidante EC<sub>50</sub> de 1,72 µg/mL extracto, mediante el método radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). El nivel de acrilamida y furano en pan tipo hallulla, horneado a 200 °C por 20 minutos, fue de 82,62 ± 4,87 y 1,94 ± 0,01 µg/kg, respectivamente. El extracto de vainas de tara redujo significativamente (p<0,05) los niveles de acrilamida, en >97,12%, y hasta 44,66% de furano, en pan tipo hallulla con la adición de 1500 y 2000 mg/kg de extracto, respectivamente; sin afectar significativamente (p>0,05) su calidad y perfil sensorial, excepto por la generación de un color violeta grisáceo dependiente de la concentración de extracto añadido. Por lo tanto, el extracto de vainas de tara no sólo podría mitigar eficazmente la formación de acrilamida y furano, sino también, mantener inalterada la calidad del pan tipo hallulla y la mayoría de sus atributos sensoriales.

## ABSTRACT

### **Development of tara (*Caesalpinia spinosa*) extract and study of its effect on the neo-formed contaminants content, sensory quality and profile of “hallulla” bread**

Neo-formed contaminants such as acrylamide and furan have been detected in starchy foods highly consumed in Chile, such as bread. The objective of this research was to evaluate the effect of a tara antioxidant extract on the formation of acrylamide and furan in “hallulla-type” bread, without affecting negatively its sensory attributes. Tara pods (*Caesalpinia spinosa*) were characterized chemically and submitted to a process of solid - liquid extraction (1:60 w/v) at 60 °C, with water as solvent, to obtain the phenolic compounds. The extract was added up to 3000 mg/kg in hallulla bread, for quantifying acrylamide and furan levels by gas chromatography and mass spectrometry (GC - MS), and evaluation of its sensory quality and profile, by a panel formed by 11 assessors previously trained and validated. Tara pods extract contained 617,84 mg tannic acid equivalents (EAT) for g (w.b.) determined by Folin Ciocalteu method, and antioxidant capacity  $EC_{50}$  of 1,72 mg/mL extract, obtained by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method (DPPH). Acrylamide and furan levels in hallulla bread, baked at 200 °C for 20 minutes, were  $82,62 \pm 4,87$  and  $1,94 \pm 0,01$  mg/kg, respectively. Tara pods extract significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in >97,12% acrylamide and 44,66% furan levels in hallulla bread with the addition of 1500 and 2000 mg/kg extract, respectively; without significantly affecting ( $p > 0.05$ ) its sensory quality and profile, except for the generation of a grayish violet color in the bread dough, depending on the quantity of extract added. Therefore, tara pods extract could not only effectively mitigate the formation of acrylamide and furan, but also maintain sensory quality in hallulla bread and most of its sensory attributes.

## 1. INTRODUCCIÓN

El procesamiento de alimentos por altas temperaturas es un método de conservación que, además de garantizar la inocuidad microbiológica, permite el desarrollo del aroma, sabor y color característicos de los productos procesados térmicamente. Sin embargo, también se generan contaminantes con potenciales efectos nocivos para la salud, entre ellos, la acrilamida y el furano, principalmente como subproductos de la reacción de Maillard en alimentos amiláceos (Crew & Castle, 2007; Halford et al., 2012; Mariotti et al., 2013a; Xu et al., 2014).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado la acrilamida como carcinógeno del Grupo 2A, y al furano, como un posible carcinógeno para los humanos (Grupo 2B) (Crew & Castle, 2007; Pedreschi et al., 2014; Mariotti et al., 2013a; Xu et al., 2014). Ambos contaminantes se han detectado en diferentes niveles en una amplia variedad de alimentos, muchos de los cuales son de consumo habitual como el pan, alimentos fritos y el café (Constantinou & Koutsidis, 2016; Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a; Ou et al., 2010; Xu et al., 2014). El pan, es una de las principales fuentes de exposición dietaria a estos contaminantes (Xu et al., 2014). Por otro lado, Chile es el segundo consumidor per cápita de pan a nivel mundial, siendo el pan tipo hallulla y marraqueta los más demandados (Fundación Chile, 2010; ODEPA, 2014; USDA, 2013).

Se han desarrollado una amplia gama de tecnologías para la mitigación de estos contaminantes en alimentos; sin embargo, han afectado sus propiedades sensoriales (Anese & Suman, 2013; Crew & Castle, 2007). Por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición de un extracto de polifenoles obtenidos de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*), como una tecnología de mitigación de la formación de acrilamida y furano en pan tipo hallulla, sin afectar negativamente su calidad y perfil sensorial.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Productos horneados: Pan.**

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) en su Artículo 356, pan sin otra denominación, se entiende como el producto de la cocción de la masa resultante de una mezcla de harina de trigo, levadura de panificación, agua potable y sal comestible, con o sin adición de mejoradores de panificación y/o enriquecedores, tales como: leche, azúcares, materias grasas u otros autorizados por dicho Reglamento. De los tipos de pan, la hallulla, definido por la Real Academia Española (2014), es un “pan que se cuece en rescoldo o en ladrillos o piedras calientes”, mencionando también que es un pan de forma circular de masa relativamente delgada, mientras que la marraqueta es un “conjunto de panes pequeños que se cuecen en una sola pieza y que pueden separarse con facilidad”.

En el mercado de los alimentos procesados en Chile, el que alcanza un volumen de ventas cercano a los US\$11 billones anuales; las categorías de panadería y productos horneados, representaron el 36% de las ventas totales de alimentos procesados durante el año 2012 (Anexo 1) (Fundación Chile, 2013; USDA, 2013). Respecto del consumo de pan, Chile lidera el consumo per cápita en Latinoamérica con alrededor de 98 kilogramos anuales, y es el segundo mayor consumidor de pan en el mundo, después de Alemania con 106 kilogramos per cápita. Del pan total comercializado, la hallulla y la marraqueta concentran el 88% de los ingresos por venta (Fundación Chile, 2010), siendo este último el más demandado (ODEPA, 2014). Además, casi el 59% de la población consume pan al menos 3 veces por semana, formando parte importante de la dieta de los chilenos, principalmente en aquellos sectores de menores ingresos (ODEPA, 2014), e implica un gasto cercano al 3% del ingreso familiar, en comparación al 1% en los países desarrollados (USDA, 2013).

## **2.2 Neo – contaminantes.**

La acrilamida (2-propenamida, CAS No. 79-06-01) es un sólido cristalino incoloro e inodoro. Es un importante producto químico industrial, que ha sido ampliamente utilizado como agente de floculación en el tratamiento del agua, como ingrediente en varias formulaciones cosméticas y como reactivo químico en la investigación de biología molecular (Pedreschi et al., 2014; Xu et al., 2014). La acrilamida se detectó por primera vez en alimentos en el año 2002, desde entonces, se han llevado a cabo una serie de estudios sobre su análisis, ocurrencia, formación, toxicidad, evaluación y mitigación de riesgos (Xu et al., 2014).

El furano ( $C_4H_4O$ ) es un compuesto orgánico de bajo peso molecular (68 g/mol); es un éter cíclico con carácter aromático, con alta volatilidad (punto de ebullición: 31 °C) y lipófilo, utilizado en diversas industrias químicas (Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a). En 1979 se publicaron los primeros informes indicando la presencia de furano en una serie de alimentos, con los niveles más altos en el café; pero es en los años noventa cuando causa real preocupación al ser considerado como un posible carcinógeno para los humanos (2B) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a).

## **2.3 Exposición de neo – contaminantes en la dieta.**

La acrilamida no se encuentra en alimentos crudos ni cocidos, ya que su formación ocurre durante el procesamiento a altas temperaturas, tales como freír, asar y hornear alimentos ricos en carbohidratos, puesto que es un subproducto de la reacción de Maillard, ocurrida entre los azúcares reductores y el aminoácido asparagina, en condiciones de baja humedad (Halford et al., 2012; Xu et al., 2014).

En abril de 2002, la Administración Nacional Sueca de Alimentos y la Universidad de Estocolmo informaron la presencia de acrilamida en muchos alimentos de consumo habitual, tales como pan, alimentos fritos y café, representado un problema para la salud pública (Constantinou & Koutsidis, 2016; Ou et al., 2010; Xu et al., 2014). Se ha determinado que aproximadamente el 40% de todos los alimentos contienen acrilamida, existiendo una amplia variación en los niveles presentes (Anexo 2) (Pedreschi et al., 2014). Sin embargo, la cantidad de ingesta en la dieta está influenciada por el nivel de acrilamida y la cantidad en que se consume el alimento, por lo que aquellos con menores contenidos de acrilamida pueden ser una importante fuente por ser de consumo frecuente o consumidos en alta cantidad en nuestra dieta diaria (Halford et al., 2012; Xu et al., 2014). En Estados Unidos, la mayoría de la acrilamida en la dieta proviene de papas fritas, pan, cereales, bizcochos, galletas, pasteles fritos y otros aperitivos salados (Xu et al., 2014). En los países europeos, más de la mitad de la exposición dietaria proviene del consumo de pan, tostadas, café y papas fritas (Xu et al., 2014). La ingesta media ajustada de acrilamida en toda Europa varió de 13 a 47  $\mu\text{g}/\text{día}$  en hombres y de 12 a 39  $\mu\text{g}/\text{día}$  en mujeres (Pedreschi et al., 2014). En 2002, un panel de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que el público en general se ha expuesto a 0,3-0,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por día a través de la ingesta de alimentos, siendo la exposición de los niños 2-3 veces mayor que la de los adultos en cuanto a la cantidad consumida por kilogramo de peso corporal (Anexo 3). Según estimaciones preliminares de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, la exposición dietaria a acrilamida es de 0,43 y 1,06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal por día para adultos y niños, respectivamente (Xu et al., 2014).

La presencia de furano es común en alimentos procesados a altas temperaturas (0 – 6000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), sobre todo en productos envasados herméticamente, como

los alimentos para bebés. Debido a su bajo punto de ebullición, el furano formado durante los procesos térmicos se vaporiza fácilmente y ocupa el espacio de cabeza de los alimentos enlatados. Pese a su alta volatilidad, también se ha encontrado en alimentos de baja humedad cocinados en recipientes cerrados, como papas fritas, galletas saladas, pan crujiente y pan tostado (Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a).

Desde el año 2004, tanto la FDA como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) han monitoreado continuamente los niveles de furano en una amplia gama de alimentos. Los alimentos se han dividido en cuatro categorías según su contenido de furano: el café instantáneo y tostado, alimentos envasados en recipientes sellados (alimento para bebés, alimentos enlatados, jugos de frutas y mermeladas), alimentos amiláceos de baja humedad (cereales para el desayuno, pan, galletas y *snacks*) y otros (cerveza, sopas, salsa de soya y productos lácteos) (Anexo 4). La presencia de furano varía desde niveles no detectables hasta aproximadamente 6000 µg/kg en una amplia variedad de alimentos, siendo los granos tostados de café los que han alcanzado mayores concentraciones de furano (hasta 6407 µg/kg). Según estimación realizada por la EFSA (2004), la exposición dietaria a furano es de 33,5 µg/día para adultos (15-75 años) y 1,1 µg/día en niños (4-6 años); la que se debe principalmente al consumo de café (95%) y de cereales para el desayuno, respectivamente. Para una mejor estimación, la EFSA (2011) ha informado la exposición dietaria considerando el peso medio de cada sector de edad, siendo de 0,29 – 1,17 y 0,27 – 1,1 µg/kg de peso corporal por día para adultos e infantes (3 – 12 meses) de la Unión Europea, respectivamente (Anexo 5) (Anese & Suman, 2013; Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a).

#### **2.4 Toxicología y peligro potencial.**

La acrilamida ha sido reconocida como una posible causante de diversos efectos tóxicos para los seres humanos y animales, incluyendo genotoxicidad y

carcinogenicidad; debido a esto, fue clasificada como un carcinógeno del Grupo 2A por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en 1994, y como un carcinógeno categoría 2 y mutágeno categoría 2 por la Unión Europea (2002). Además, fue puesto en la lista de sustancias “extremadamente preocupantes” por la Agencia Europea de Productos Químicos en 2010. Pese a esto, la relación de la acrilamida procedente de la dieta y el cáncer humano aún es objeto de debate (Marconi et al, 2010; Pedreschi et al., 2014; Xu et al., 2014).

Bioensayos positivos de carcinogenicidad en animales de experimentación han establecido que la acrilamida es un carcinógeno multiorgánico en ratas, al igual que su metabolito oxidado, la glicidamida. Sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico, no hay ninguna relación convincente entre el desarrollo de cáncer con su exposición. En cuanto a su neurotoxicidad, se ha comprobado que es neurotóxico en los seres humanos debido a múltiples exposiciones, produciendo síntomas cada vez más severos a mayor exposición, incluyendo disfunción cerebelosa, seguida de neuropatía. Sin embargo, los niveles de exposición estimados a partir de fuentes alimentarias no están asociados con efectos neurotóxicos en los seres humanos; pero son necesarios más estudios de exposiciones crónicas de bajo nivel de acrilamida para determinar sus efectos acumulativos sobre el sistema nervioso. Además, en animales de laboratorio se ha reportado toxicidad reproductiva y de desarrollo; sin embargo, no hay información de estos efectos en seres humanos (Xu et al., 2014).

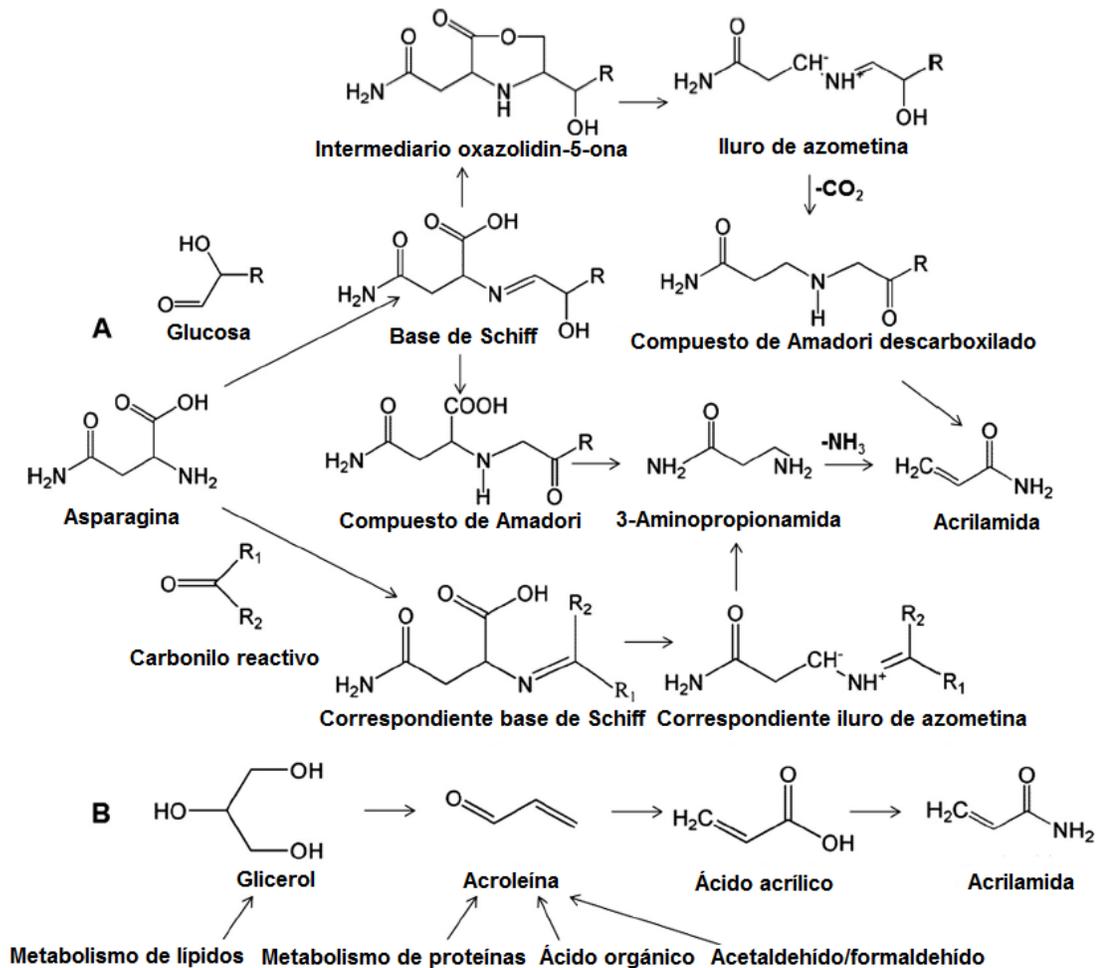
Por otro lado, el furano, ha sido clasificado como "posiblemente cancerígeno para los seres humanos" (Grupo 2B) por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (1995). En el año 2004, la EFSA publicó una evaluación de riesgo de toxicidad de furano, concluyendo que este es claramente cancerígeno en ratas y ratones, lo que se debe probablemente, a un mecanismo genotóxico; por lo que los niveles actuales de exposición humana a

este contaminante podrían indicar un riesgo para la salud (Anese & Suman, 2013; Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a).

El efecto toxicológico crítico del furano es su carcinogenicidad, siendo el hígado el principal órgano diana de la toxicidad producida por furano en ratas y ratones (Mariotti et al., 2013a). Pruebas realizadas en el marco del Programa de Toxicología Nacional de Estados Unidos (NTP), ha demostrado un aumento dependiente de la dosis de furano en adenomas hepatocelulares y carcinomas en ambos sexos de ratas y ratones. Si bien varios estudios confirman la toxicidad del furano, los mecanismos de inducción de tumores en animales de laboratorios no se han dilucidado, y aún no hay informes sobre estudios epidemiológicos que muestren posibles asociaciones entre la exposición a furano y el cáncer humano (Anese & Suman, 2013; Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a).

## **2.5 Mecanismos de formación de neo – contaminantes.**

Actualmente, se han descrito al menos una vía principal y una vía menor para la formación de acrilamida en alimentos. La vía más importante se conoce como la ruta asparagina a través de la reacción de Maillard, en la que el aminoácido asparagina se convierte en acrilamida por descarboxilación térmica y desaminación, para lo cual es necesaria la presencia de un compuesto carboxílico, como un azúcar reductor. La reacción entre la asparagina y un azúcar reductor produce N-glucosilasparagina, que conduce directamente a acrilamida y una imina después de la descomposición. Además, descarboxilasas presentes en las materias primas podrían generar la amina biogénica 3-aminopropionamida (3-APA) a partir de asparagina, que desamina térmicamente a acrilamida; proceso que continúa sin implicar la reducción de los hidratos de carbono. Las principales etapas y compuestos intermediarios de la principal vía de formación de acrilamida se muestran en la Fig. 1A (Xu et al., 2014).



**Figura 1:** Vías de formación de acrilamida en alimentos. (A) Vía principal de formación de acrilamida. (B) Vía menor de formación de acrilamida (Xu et al., 2014).

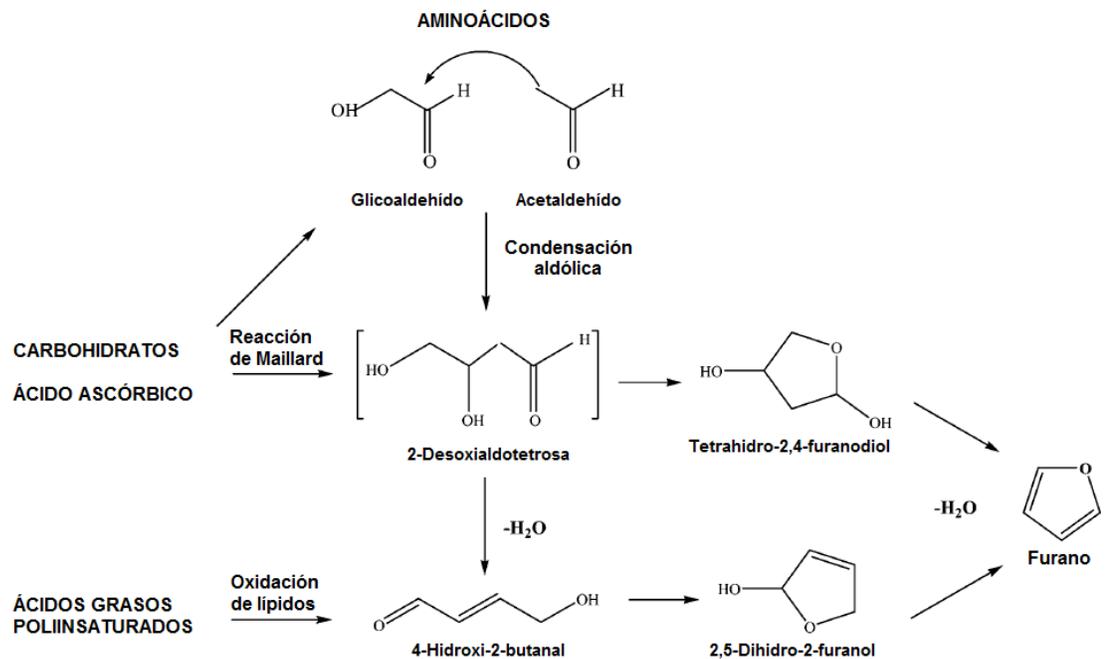
Según varios estudios, la formación de acrilamida a través de la reacción de Maillard no es la única vía que ocurre en los alimentos, sino que también existe una vía menor a través de compuestos de tres unidades de carbono, el ácido acrílico, producido a partir de lípidos a temperaturas elevadas. Además, la acrilamida se puede formar a partir de acroleína, producida por reconfiguración en condiciones adecuadas de pequeñas moléculas como acetaldehídos o formaldehídos, producidos de monosacáridos calentados. Vías del metabolismo

de proteínas y descarboxilación de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico) también pueden formar acroleína y ácido acrílico, y por consiguiente, acrilamida. Sin embargo, la cantidad de acrilamida formada por esas vías podría ser marginal, ya que los compuestos carbonilos como los azúcares reductores, son más activos con la asparagina. Los pasos importantes y productos intermedios de la ruta de menor formación de acrilamida se muestran en la Fig. 1B (Xu et al., 2014).

Respecto al furano y sus derivados, diversos estudios han demostrado que existen varias vías de formación en alimentos, las que podrían ocurrir mediante degradación térmica/reacción de Maillard de azúcares reductores, con presencia o ausencia de aminoácidos; degradación térmica de ciertos aminoácidos, oxidación térmica de ácido ascórbico, ácidos grasos poliinsaturados y por oxidación térmica de carotenoides (Anese & Suman, 2013; Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a). Sin embargo, aún no hay resultados concluyentes respecto al principal mecanismo y precursores de la formación de furano en diferentes tipos de alimentos procesados a altas temperaturas, puesto que la mayoría de los estudios se realizan bajo sistemas modelo (Crew & Castle, 2007). Se ha demostrado que algunos factores, tales como la temperatura de calentamiento, el pH y contenido de humedad tienen un efecto considerable en la generación de furano, ya que la mayoría de los posibles mecanismos dependen de ellos. En la Fig. 2 se resumen las vías generales que conducen a la formación de furano (Mariotti et al., 2013a).

Los azúcares reductores bajo la reacción de Maillard, en presencia o ausencia de aminoácidos, generan furano, para lo cual se han sugerido dos vías principales; la degradación de azúcar manteniendo el esqueleto de carbono intacto, y la recombinación de algunos fragmentos que pueden originarse de azúcares y aminoácidos específicos (Mariotti et al., 2013a). Por otro lado, el ácido ascórbico ha sido propuesto como uno de los principales precursores de

furano, en condiciones no – oxidativas, ya que en condiciones oxidativas, mediante el ácido dehidroascórbico, su formación sólo podría ocurrir a bajos niveles, es más, su calentamiento en ausencia de agua puede generar un hemiacetal cíclico que previene la formación de furano (Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a). Además, se ha detectado la formación de furano durante la oxidación de lípidos poliinsaturados, por lo que se ha sugerido su formación debido al mecanismo de auto-oxidación de radicales libres, aumentando el rendimiento a mayor grado de insaturación (Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a).



**Figura 2:** Diferentes vías de formación de furano (Mariotti et al., 2013a).

## 2.6 Tecnologías de mitigación de neo – contaminantes.

Debido a que los neo – contaminantes, en parte, son productos de la reacción de Maillard, la que es esencial para el color, sabor, aroma y textura de los alimentos, se busca su reducción pero manteniendo la calidad del producto (Xu

et al., 2014). Se han desarrollado una amplia gama de tecnologías para su mitigación en los alimentos procesados térmicamente, basados en los cambios de los parámetros de los procesos o mediante la reducción de los niveles de los precursores en las materias primas (Anese & Suman, 2013; Crew & Castle, 2007; Mariotti et al., 2013a). Para esto último, en el caso del furano, es necesaria mayor información del comportamiento durante el procesamiento de alimentos reales, además, tiene una amplia variedad de precursores (Anese & Suman, 2013; Crew & Castle, 2007). Por esto, investigaciones actuales no han tenido éxito en la identificación de soluciones prácticas y eficaces para la disminución del contenido de furano en alimentos procesados (Anese & Suman, 2013; Mariotti et al., 2013a). Sin embargo, una medida de mitigación podría ser mediante su volatilidad, para esto, la EFSA ha evaluado el efecto de la manipulación y el recalentamiento de alimentos como el café, comida para bebés, pan y sopas, logrando su reducción por simple calentamiento y agitación en un recipiente abierto (Mariotti et al., 2013a).

En cambio, se han sugerido diversas formas eficaces para la reducción de la acrilamida en los alimentos; sin embargo, el uso de tecnologías combinadas sería el enfoque más eficaz, ya que la calidad organoléptica de los alimentos no se vería afectada (Constantinou & Koutsidis, 2016; Pedreschi et al., 2014). Una forma de mitigación es mediante la reducción de sus precursores, la asparagina y azúcares reductores. Esto se puede realizar mediante modificación genética de las materias primas, mediante pre tratamientos con asparaginasa o por conversión de asparagina en ácido aspártico (Halford et al., 2012; Pedreschi et al., 2014; Xu et al., 2014). En productos a base de cereales, sustituyendo la fructosa por sacarosa, además, la fermentación disminuye la ocurrencia del precursor asparagina. En papas fritas, por reducción del contenido de azúcar de las materias primas mediante escaldado a baja temperatura y largo período de tiempo (70 °C, 15 min) previo al procesamiento térmico (Pedreschi et al., 2014).

La formación de acrilamida en los alimentos puede estar influenciada por varios factores durante el procesamiento, por lo que se ha logrado su mitigación con la disminución de la temperatura o tiempo de fritura de papas en condiciones de vacío (hasta en un 90%) (Halford et al., 2012; Pedreschi et al., 2014; Xu et al., 2014); al disminuir el contenido inicial de agua en alimentos ricos en grasas, ya que la humedad del producto afecta la reacción de Maillard al controlar la movilidad de los reactivos (Halford et al., 2012; Xu et al., 2014); con la disminución del pH por inmersión de los productos alimenticios en soluciones de ácidos orgánicos (ácido acético o ácido cítrico) debido a la protonación del grupo  $\text{NH}_2$  de la asparagina a su forma no reactiva,  $\text{NH}_3^+$ ; o por adición de aminoácidos distintos a asparagina (glutamina, alanina, lisina, glicina o cisteína), probablemente por la promoción de reacciones competitivas y/o por la unión covalente a la acrilamida formada (Halford et al., 2012; Pedreschi et al., 2014; Xu et al., 2014).

Por otro lado, la adición de antioxidantes podría disminuir significativamente el contenido de acrilamida mediante su capacidad para reaccionar con precursores, con intermediarios de la reacción o con la propia acrilamida (Constantinou & Koutsidis, 2016; Xu et al., 2014). Sin embargo, diversos estudios han indicado que el uso de antioxidantes fenólicos puros o extractos antioxidantes tendrían un efecto ambiguo (Constantinou & Koutsidis, 2016), ya que se ha informado su mitigación por adición de antioxidantes presentes en hojas de bambú, compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen, ácidos ferúlico, protocatéquico, cafeico y gálico en papas fritas, extracto de romero en bollos de trigo y también por adición de extracto de té verde en pan crujiente. En cambio, la adición de extractos de arándano no causó ningún efecto en papas fritas, e incluso se ha estimulado la formación de acrilamida con la adición de antioxidantes fenólicos de orégano y extractos de aceite de oliva virgen en papas fritas. Por lo tanto, el efecto de los antioxidantes está determinado por su naturaleza, concentración y capacidad antioxidante, así

como la matriz de reacción y los parámetros experimentales, logrando reducir o promover la formación de acrilamida (Constantinou & Koutsidis, 2016; Liu et al., 2015).

## 2.7 Antecedentes de la tara: Fuente natural de antioxidantes.

La tara (*Caesalpinia spinosa*) es un árbol leguminoso perteneciente a la familia Caesalpinaceae (Dostert et al, 2009). Es una especie nativa de América del Sur y se distribuye entre los 4° y 32° latitud Sur, abarcando diversas zonas áridas desde Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, hasta la zona centro – norte de Chile. Sus frutos son vainas rojas, amarillas o pálidas de 8-10 cm de longitud, que contienen de 4 a 7 semillas redondeadas de color pardo negruzco cuando están maduras (Chambi et al, 2013; de la Cruz et al, 2004). En la Figura 3, se presentan fotografías del árbol, fruto verde, fruto maduro y semillas maduras de tara.

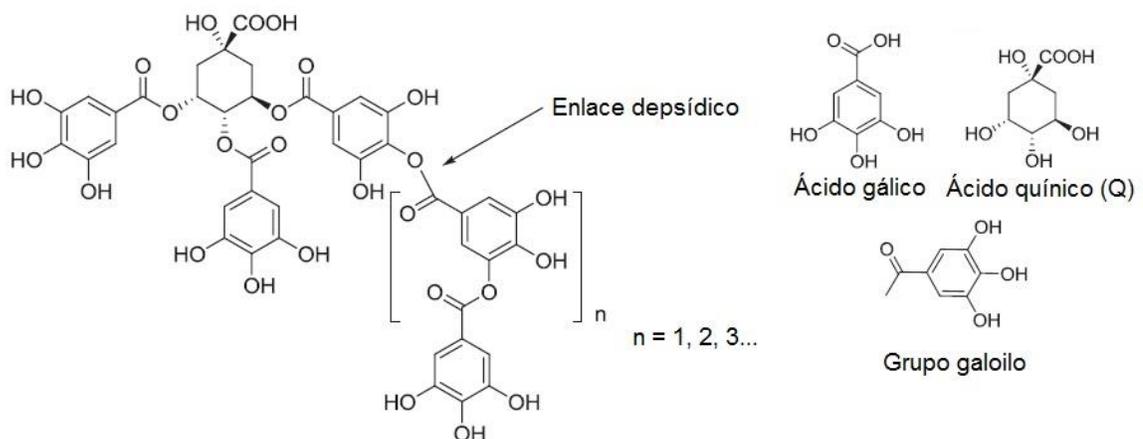


**Figura 3:** Árbol (a), fruto verde (b), fruto maduro (c) y semillas maduras (d) de *Caesalpinia spinosa*.

Las vainas de tara (sin semillas) representan aproximadamente el 65% del peso del fruto y es la que posee la mayor concentración de taninos, entre un 40 y 60% (Aouf et al, 2014; de la Cruz et al, 2004). Estos taninos, tienen propiedades astringentes y capacidad de clarificar, por lo que son usados en las industrias de alimentos y bebidas como del vino, té, café, cacao, entre otros; y

ampliamente en la industria de la curtiduría (Aouf et al, 2014). Además, por hidrólisis alcalina de las vainas se obtiene casi un 25% de ácido gálico, el que es utilizado en la industria farmacéutica (Aouf et al, 2014; Melo, 2013). Los taninos también poseen una amplia gama de actividades biológicas, entre ellas como antioxidante, antibacteriano, antiviral, antianalgésico, etc. (Aouf et al, 2014; de la Cruz et al, 2007). Estos, son taninos hidrolizables, los que son considerados como los más potentes antioxidantes de origen vegetal, ya que pueden neutralizar radicales libres, evitando el daño oxidativo de membranas celulares y de ADN; además evitan su generación al ser capaces de complejar metales reactivos (Chambi et al, 2013).

Las vainas de tara poseen taninos hidrolizables simples; galotaninos, cuyos principales componentes se basan en una estructura gálica de ácido quínico (presentada en la Figura 4), encontrándose una serie de oligómeros de ácido poligálico unidos por un enlace éster a un grupo hidroxilo del ácido quínico. Su hidrólisis completa produce ácido quínico y ácidos gálicos (Chambi et al, 2013; Aouf et al, 2014). Además, se han encontrado otras cadenas poligálicas vinculadas a una o dos unidades repetidas tales como ácido cafeico y ácido quínico metilado, gálico metilado y cafeico metilado; encontradas en muy pequeñas cantidades (Aouf et al, 2014).



**Figura 4:** Estructura química supuesta de taninos de tara (Aouf et al., 2014).

Por lo tanto, las vainas de tara se presentan como una fuente natural de antioxidantes, cuyo uso como aditivo podría tener un efecto positivo en la mitigación de neo – contaminantes, como la acrilamida y el furano, durante el procesamiento a altas temperaturas de alimentos ricos en almidón, tales como el pan, el que al ser consumido en alta cantidad y frecuentemente, es considerado una importante fuente de exposición dietaria de neo – contaminantes, pudiendo representar un problema para la salud pública. Sin embargo, es fundamental que el uso de tecnologías de mitigación no afecte negativamente las propiedades organolépticas del producto, manteniendo sus perfiles y calidad sensorial; especialmente en productos tan importantes en la dieta, como es el caso del pan, sobre todo para la población chilena.

### **3. HIPOTESIS**

Es posible mitigar la formación de acrilamida y furano en pan tipo hallulla mediante la adición de un extracto fenólico de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*), sin afectar negativamente sus propiedades sensoriales.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de un extracto de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) sobre la formación de acrilamida y furano en pan tipo hallulla, sin afectar negativamente su calidad y perfil sensorial.

#### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Caracterizar químicamente vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*).
2. Obtener y caracterizar químicamente un extracto de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*).
3. Determinar el efecto de la adición de compuestos fenólicos de un extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*) en la formación de acrilamida y furano en pan tipo hallulla.
4. Seleccionar, entrenar y validar un panel sensorial para la determinación de calidad y perfil sensorial de pan tipo hallulla.
5. Determinar mediante un panel sensorial, el efecto de la adición de compuestos fenólicos de un extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*) en la calidad y perfil sensorial del pan tipo hallulla.

## **5. MATERIALES Y EQUIPOS**

### **5.1 Materiales.**

#### **5.1.1 Materias primas.**

- Vainas de tara.
- Harina sin polvos de hornear, marca Selecta.
- Manteca panadera emulsionada combinada, marca Crucina.
- Sal fina, marca Lobos.
- Levadura seca instantánea, marca Lefersa.
- Leche en polvo semidescremada instantánea, marca Calo.
- Azúcar blanca granulada, marca lansa

#### **5.1.2 Reactivos químicos.**

- Acetonitrilo calidad para cromatografía líquida, Merck.
- Ácido gálico 97,5 – 105,5%, Sigma – Aldrich.
- Ácido tánico ACS, Sigma – Adrich.
- Acrilamida 99.9% calidad especial para electroforesis para biología molecular, Merck.
- Acrilamida d-3, Sigma – Aldrich.
- Agua ultrapura (Milli Q).
- Carbonato de sodio anhidro p.a., Merck.
- Cloruro de sodio, Merck.
- DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Sigma – Aldrich.
- Furano D4, Dr. Ehrenstorfer GmbH.
- Furano Dr. Ehrenstorfer GmbH
- Metanol grado analítico, Merck.
- n-Hexano calidad para cromatografía líquida, Merck.
- Reactivo de fenol Folin – Ciocalteu, Merck.
- Trolox, Merck.

### 5.1.3 Insumos.

- Catridge LiCholult RP- 18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) 500 mg 3 mL Standard Merck.
- Filtros de jeringa 0.2  $\mu\text{m}$ , Merck
- Jeringas de plástico desechable de 3 mL con aguja, NIPRO
- Material de vidrio (balón esmerilado, matraz aforado, tubos de ensayo, matraz Erlenmeyer, pipetas, vasos precipitados)
- Molde de acero inoxidable de 7 centímetros de diámetro
- Viales 2 y 5 mL.

### 5.2 Equipos e instrumentos.

- Agitador magnético con placa calefactora ARE, VELP Scientifica.
- Agitador Reax top, Heidolph.
- Balanza analítica GR-200, A&D Company.
- Balanza granataria NX4100, AND.
- Baño termostático con agitador BS-21, Jeio Tech.
- Batidora eléctrica 5K45SS, KitchenAid.
- Centrifuga MIKRO 220R, Hettich.
- Columna Agilent DB-FFAP 122-3232 de 30 m x 0.25 mm ID, 25 micras.
- Columna Agilent HP-Plot Q, 15 m, 0,32 mm ID, 20 micras.
- Columna LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR NH<sub>2</sub> (5  $\mu\text{m}$ ), Merck.
- Equipo Agilent 7890A GC System con Agilent 597C XL EI/CI MSD
- Espectrofotómetro UV-1601, Rayleigh.
- Estufa de aire forzado FD-115, Binder.
- Fermentador 83 LI, Cooking Technology.
- Horno eléctrico por convección 43 DX UMI, Garbino.
- Laminadora eléctrica 1001, Malta.
- Máquina moladora Mixer HR1362/06 600W, Philips.

- Micropipetas Biohit.
- Refrigerador FTC 90E, VELP Scientifica.
- Rotavapor Hei-VAP Advantage, Heidolph.
- Sistema de Cromatografía Líquida HPLC DIONEX modelo ULTIMATE 3000 con Bomba Gradiente Cuaternaria LPG-3400SD, Autosampler con compartimiento para columna ACC-3000, detector de arreglo de diodos modelo DAD-3000 y detector de índice de refracción modelo RefractoMax 521, Thermo Fischer Scientific.
- Sistema de vacío wr 2c nt + ak + ek, Vacuubrand.
- Tamices de ensayo estándar U.S.A., W.S. Tyler
- Ultrasonido 970493-966, VWR.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Caracterización química de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*).**

#### **6.1.1 Materia prima.**

Se utilizaron vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) cosechadas en marzo de 2015 del Parque Urbano Natural de La Ligua, proporcionadas por la Sra. Danila Lazo de la Corporación Nacional Forestal (CONAF) de la comuna de La Ligua, Región de Valparaíso, Chile.

#### **6.1.2 Obtención del polvo de tara.**

Las vainas de tara se recibieron secas y se les realizó un proceso previo a la obtención del polvo (Fernández, 2008), que consistió en una limpieza manual de impurezas presentes, una preclasificación separando las vainas sanas de las defectuosas (presencia de hongos, quemadas, picadas, etc.), separación de vainas de coloración roja y amarilla, caracterización morfológica (largo y ancho) de una muestra de 50 vainas sanas, separación manual de las semillas contenidas en el interior por rompimiento de las vainas, molienda de las vainas mediante una maquina moledora Mixer hasta la obtención de un polvo fino, tamizado para la obtención de partículas de tamaño menor o igual a 0,65 mm y finalmente, el polvo de vainas de tara se almacenó en bolsas de polietileno selladas, a temperatura ambiente, en lugar seco y sin luz.

En la Figura 5, se presentan fotografías de vainas enteras, vainas sin semillas y polvo tamizado de vainas de tara, clasificadas por color.



**Figura 5:** Imágenes de vainas sanas (a), vainas sin semillas (b) y polvo de vainas de tara (c), clasificadas por color rojo (') y amarillo ('').

### 6.1.3 Caracterización química del polvo de tara.

Los polvos de vainas rojas y de vainas amarillas de tara, se caracterizaron químicamente mediante los siguientes análisis:

- A. Análisis químico proximal: Contenido de humedad según NCh 841 Of. 78, materia grasa total (extracto etéreo), proteínas (método Kjeldhal), cenizas y contenido de fibra cruda según Manual de Métodos de Análisis Físico – Químico de Alimentos, Aguas y Suelos del Instituto de Salud Pública (ISP, 1998); realizados por el Laboratorio de Alimentos de DICTUC S.A.
- B. Contenido de azúcares reductores se realizó según el método descrito por Varela et al. (2003), con algunas modificaciones. Se extrajeron los azúcares con agua ultrapura (Milli Q) a 40 °C con agitación suave por 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue filtrado para obtener 300 µL de extracto filtrado, a los que se les añadió 700 µL de acetonitrilo, para su análisis en equipo HPLC con detector IR. Los resultados se expresaron como g de glucosa y fructosa por 100 g de materia prima (b.h.).

- C. Contenido de polifenoles totales: Se determinó por medio del método Folin Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), previa extracción triple a 60 °C por 35 minutos, en relación 1:60 (p/v) con agua como solvente, según el método descrito por Bravo (2010), con algunas modificaciones (Anexo 6). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido tánico (EAT) y ácido gálico (EAG) por gramo de materia prima (b.h.).
- D. Capacidad antioxidante: Se determinó por el método radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Brand et al., 1995), previa extracción triple a 60 °C por 35 minutos, en relación 1:60 (p/v) con agua como solvente, según el método descrito por Bravo (2010), con algunas modificaciones (Anexo 6). Los resultados fueron expresados como EC<sub>50</sub> o Concentración Eficiente (µg extracto por mL que decolora el 50% de la solución metanólica de DPPH), mediante la construcción de una curva de cinética para cada muestra.

## **6.2 Obtención y caracterización química de un extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*).**

### **6.2.1 Extracción polifenoles.**

Según los resultados anteriores, se seleccionaron las vainas rojas para la obtención de un extracto de tara, según el método descrito por Bravo (2010), con algunas modificaciones (Anexo 7). El polvo de vaina se sometió a una extracción 1:10, 1:30 y 1:60 (p/v) con agua como solvente, a 60 °C con agitación constante por 35 min. Luego de una centrifugación y obtención del sobrenadante, los tres extractos líquidos obtenidos se secaron a 40 °C y 100 mbar. El extracto 1:60 (p/v), además fue secado a 60 °C (100 mbar) y mediante liofilización (previa concentración a 40 °C y 100 mbar, hasta el 20% de su volumen).

En la Tabla 1, se presentan las condiciones experimentales para la obtención de los 5 extractos de vaina de tara.

**Tabla 1:** Condiciones experimentales para la obtención de los 5 extractos de vainas de tara.

	Relación materia prima – solvente	Método de Secado
Extracto 1	1:10	40 °C y 100 mbar
Extracto 2	1:30	40 °C y 100 mbar
Extracto 3	1:60	40 °C y 100 mbar
Extracto 4	1:60	60 °C y 100 mbar
Extracto 5	1:60	Concentración a 40 °C (100 mbar) y liofilización

### 6.2.2 Selección del extracto.

Se seleccionó la relación materia prima – solvente y el método de secado para la obtención del extracto final, según el contenido de polifenoles totales determinado por el método Folin Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), y la capacidad antioxidante determinada por método radicar DPPH (Brand et al., 1995), respectivamente.

### 6.2.3 Caracterización química.

El extracto final seleccionado, se caracterizó químicamente mediante los siguientes análisis (en triplicado):

- A. Contenido de humedad se determinó según la NCh 841 Of. 78.
- B. Contenido de azúcares reductores se realizó según el método descrito por Varela et al. (2003), con algunas modificaciones. El extracto se disolvió en agua ultrapura (Milli Q), en relación 1:30 p/v, y se pasó por un filtro de 0,2 µm. Se añadió 700 µL de acetonitrilo a 300 µL de filtrado, para su análisis en equipo HPLC con detector IR. Los resultados se expresaron como g de glucosa y fructosa por 100 g de extracto.
- C. Contenido de polifenoles totales: Se determinó por medio del método Folin Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Los resultados se expresaron como mg

equivalentes de ácido tánico (EAT) y de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto (b.h.).

- D. Capacidad antioxidante: Se determinó por el método radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acuerdo a Brand et al. (1995). Los resultados se expresaron como EC<sub>50</sub> o Concentración Eficiente (µg extracto por mL que decolora el 50% de la solución metanólica de DPPH) mediante la construcción de una curva de cinética para cada muestra.
- E. Caracterización de la fracción fenólica: Perfiles fenólicos fueron determinados por el Laboratorio de Biotecnología de UNALM (Lima, Perú) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Arreglo de Fotodiodo (HPLC – PAD), de acuerdo con el procedimiento descrito por Chirinos et al. (2008) en que los compuestos fenólicos se identifican y cuantifican mediante la comparación de su tiempo de retención y datos espectrales UV visible con estándares inyectados previamente conocidos.

### 6.3 Elaboración de pan tipo hallulla.

Se realizó de acuerdo a la fórmula optimizada en el estudio de Plaza (2015) con algunas modificaciones. La formulación utilizada se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Formulación de pan tipo hallulla. Modificado de Plaza (2015).

Ingredientes	Cantidad (g)
Harina	100
Agua tibia (30 °C)	50
Manteca	5
Sal	2
Levadura instantánea	2
Leche en polvo semidescremada	0,6
Azúcar	0,5

Para la elaboración del pan tipo hallulla (Anexo 8) se elaboraron lotes en base a 500 g harina, obteniendo 24 panes en 2 bandejas. La masa se formó en dos

etapas, un amasado inicial de la mezcla de harina, azúcar y sal añadida con levadura y leche en polvo previamente disueltas en agua (30 °C), al igual que el extracto de tara cuando fue necesario (disueltos por separado); y un amasado final luego de la adición de la manteca previamente fundida en estufa a 50 °C. Una vez formada la masa, se obtuvieron piezas circulares de tamaño regular de 6 mm de espesor y 7 cm de diámetro, al utilizar una laminadora eléctrica y un molde de acero inoxidable, en las etapas de laminado y formado, respectivamente. Durante el formado, las unidades fueron perforadas 3 veces con un tenedor, y llevadas al fermentador a 30 °C por 30 minutos y al horno eléctrico a 200 °C por 20 minutos. Finalmente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y fueron envasadas en bolsas herméticas luego de 5 minutos, para cuantificación de neo-contaminantes, y una vez frías para evaluación sensorial, realizada después de 24 horas a temperatura ambiente. Para cuantificación de neo-contaminantes las muestras se almacenaron a -18 °C por 3 días.

#### **6.4 Determinación de neo-contaminantes en pan tipo hallulla.**

La determinación del contenido de acrilamida y furano se realizó en triplicado, por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC – MS), para pan con distintas concentraciones de extracto de tara.

##### **6.4.1 Determinación del contenido de acrilamida.**

La determinación del contenido de acrilamida se realizó según el método desarrollado por Ciesarová et al. (2006) con algunas modificaciones.

##### **A. Condiciones experimentales.**

Las cantidades del extracto de tara añadido al pan tipo hallulla se establecieron previamente según estudios similares (Li et al., 2012; Zhang & Zhang, 2007) y mediante pruebas experimentales, para la cuantificación de su contenido de

acrilamida. Las condiciones experimentales de las muestras evaluadas se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Condiciones experimentales de pan tipo hallulla para determinación de contenido de acrilamida.

Proceso de fermentado		Proceso de horneado		Concentración extracto de tara (mg/kg)*
T. (°C)	t. (min.)	T. (°C)	t. (min.)	
30	30	200	20	0
30	30	200	20	500
30	30	200	20	600
30	30	200	20	750
30	30	200	20	1000
30	30	200	20	1500

\*Concentración de extracto de tara (mg/kg) añadida en base al contenido de harina del pan tipo hallulla (metodología de elaboración del pan en 6.3).

### **B. Extracción de acrilamida en pan.**

La extracción de acrilamida de la matriz alimenticia se realizó mediante agitación y tratamiento de ultrasonido de 2 g de muestra homogenizada con trituradora; añadida con 10 mL de metanol y 40 µL de estándar interno de acrilamida d-3 (20 mg/L). Fue necesaria su centrifugación para la obtención del sobrenadante, el que fue filtrado mediante un cartridge de fase reversa C18 bajo condición de vacío. Se añadió n-hexano al filtrado, para la eliminación de la materia grasa presente, mediante separación de fases. La fase metanólica fue obtenida y secada a 40 °C bajo vacío, para eliminación del solvente. Finalmente, fue reconstituido con 1 mL de metanol y filtrado (0,2 µm); obteniendo un extracto libre de interferentes en viales de 2 mL, para su inyección en el equipo GC – MS.

### C. Condiciones del equipo GC – MS para medición de acrilamida.

Las muestras fueron analizadas por método GC – MS – ionización química (CH<sub>4</sub>) en modo SIM negativo. En la Tabla 4, se presentan las condiciones utilizadas en el equipo para la medición de acrilamida.

**Tabla 4:** Condiciones del equipo GC – MS para cuantificación de acrilamida.

Parámetro	Condición
Columna	DB-FFAP; 30 m x 250 µm x 0.25 µm
Volumen de inyección	2 µL
Rampa de temperatura del horno	60 °C por 1 min, 10 °C/min hasta 190 °C y 50 °C/min hasta 240°C
Flujo columna	0,8 mL/min helio, 200 °C
Temperatura de la fuente (MS)	250 °C
Temperatura del cuádruplo (MS)	150 °C
Temperatura de interfase	250 °C

Para la cuantificación, se obtuvieron las razones de las áreas entre los picos de las respuestas a m/z 70 (unidades con que se identifica la acrilamida) y m/z 73 (unidades con que se identifica la acrilamida deuterada d-3).

#### 6.4.2 Determinación del contenido de furano.

La determinación del contenido de furano se realizó según el método desarrollado por Zoller et al. (2007), con algunas modificaciones.

##### A. Condiciones experimentales.

Las cantidades del extracto de tara añadido al pan tipo hallulla fueron determinadas previamente mediante pruebas experimentales, para la cuantificación de su contenido de furano. Las condiciones experimentales de las muestras evaluadas se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Condiciones experimentales de pan tipo hallulla para determinación de contenido de furano.

Proceso de fermentado		Proceso de horneado		Concentración extracto de tara (mg/kg)*
T. (°C)	t. (min.)	T. (°C)	t. (min.)	
30	30	200	20	0
30	30	200	20	500
30	30	200	20	750
30	30	200	20	1500
30	30	200	20	2000
30	30	200	20	3000

\*Concentración de extracto de tara (mg/kg) añadida en base al contenido de harina del pan tipo hallulla (metodología de elaboración del pan en 6.3).

### **B. Extracción de furano en pan.**

La extracción de furano de la matriz alimenticia se realizó mediante adición de 5,5 mL de NaCl 5M a viales con 0,5 g de muestra homogenizada con trituradora, obteniendo 7 viales por muestras, a los que se les añadió una solución de estándar interno de furano d4 (1,5 µg/mL) y 0, 0, 0, 100, 100, 200, 400 µL de solución de furano (1,5 µg/mL), para cuantificar el contenido de furano mediante una curva de adición estándar. Cada vial se sometió a un agitador por 30 segundos para asegurar la homogenización.

### **C. Condiciones del equipo GC – MS para medición de furano.**

Las muestras fueron analizadas por método GC – MS – ionización electrónica SIM. En la Tabla 6, se presentan las condiciones utilizadas en el equipo para la medición de furano.

**Tabla 6:** Condiciones del equipo GC – MS para cuantificación de furano.

Parámetro	Condición
Columna	HP-Plot Q; 15 m x 0.32 mm ID x 0.2 µm
Volumen de inyección	1000 µL
Rampa de temperatura del horno	50 °C por 1 min y 10 °C/min hasta 160 °C
Flujo columna	1,7 mL/min helio, 200 °C
Temperatura de la fuente	230 °C

## **6.5 Conformación de un panel sensorial entrenado.**

El entrenamiento y validación del panel sensorial se realizó en el Laboratorio de Evaluación Sensorial del Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química de la Universidad de Chile, el que está diseñado de acuerdo a las indicaciones de la norma ISO 8586:2012.

### **6.5.1 Reclutamiento y selección de jueces.**

Se reclutaron 14 jueces dentro de los estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Universidad de Chile, que consumen pan habitualmente, que hayan aprobado la asignatura de Evaluación Sensorial impartida en dicha Universidad, y con disponibilidad e interés en participar en el panel. No se realizaron test adicionales para su selección.

### **6.5.2 Entrenamiento de jueces.**

El entrenamiento consistió en una sesión inicial para la generación de descriptores y 5 sesiones de evaluación de muestras elaboradas en base a la metodología descrita en 6.3.

#### **A. Generación de descriptores.**

En la primera sesión de entrenamiento se realizó una inducción teórica, respecto a las características típicas y principales defectos del pan tipo hallulla; y una evaluación descriptiva de apariencia, aroma, sabor y textura (Anexo 9) de

cuatro panes distintos, presentados en la Tabla 7. Finalmente, se realizó una discusión abierta, en mesa redonda, para determinar los descriptores más importantes y unificar el vocabulario utilizado.

**Tabla 7:** Muestras evaluadas en la primera sesión de entrenamiento del panel sensorial.

Muestras evaluadas	
A	Hallullas especiales de supermercado Lider Recoleta
B	Hallullas panadería de barrio (comuna Recoleta)
C	Hallullas elaboradas en laboratorio*
D	Hallullas añejadas (24 h) panadería de barrio (comuna Recoleta)

\*Muestras elaboradas según la metodología descrita en el punto 6.3, con 15 minutos de horneado.

Con los resultados obtenidos en la primera sesión y al incluir las características típicas del pan adicionado con el extracto de tara; coloración violeta grisácea dada en la corteza y miga del pan, se obtuvo el Test de perfil descriptivo y la Tabla de valoración de calidad con escala Karlsruhe específicos para pan tipo hallulla (Anexo 10 y 11), al modificar los presentados por Plaza (2015). Se evaluaron los descriptores seleccionados mediante una escala lineal no estructurada de 10 cm, y la calidad del pan mediante 9 puntos correspondientes a tres grados de calidad: grado 1 indica características típicas (7,0 – 9,0), grado 2 un deterioro tolerable (4,0 – 6,9) y grado 3 indica un deterioro indeseable (1,0 – 3,9), donde 4,0 es el límite de comestibilidad y 5,5 el de comerciabilidad del producto.

Se presentaron patrones como referencia para la evaluación descriptiva de los atributos de apariencia y textura. Para el descriptor “color corteza” (Anexo 12) y “color violeta/grisáceo” (Anexo 13), escalas de coloración con muestras elaboradas a distintos tiempos de horneado y diferentes concentraciones de extracto de tara, respectivamente. En este último caso, se añadió una imagen

de pan de vino tinto como límite de mayor intensidad de la escala. Para los descriptores “dureza al tacto” y “elasticidad de miga”, una esponja de poliuretano fue el límite inferior de dureza (blando) y el superior de elasticidad de miga (muy elástico), y una muestra de pan horneada por 40 minutos, fue utilizada como el límite de mayor dureza (duro) y menor elasticidad de miga (poco elástico), en la escala no estructurada.

### **B. Entrenamiento con atributos claves.**

A partir de la segunda sesión, la modalidad de entrenamiento consistió en una evaluación individual con el Test de perfil descriptivo y la Tabla de valoración de calidad con escala Karlsruhe, específicos para pan tipo hallulla, en mesa redonda, y una posterior discusión grupal. El detalle de las muestras evaluadas se encuentra en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Muestras evaluadas desde la segunda sesión de entrenamiento del panel sensorial.

Sesión	Parámetro de variación	Muestras evaluadas
2	Tiempo de horneado	1. 10 min horneado 2. 15 min horneado 3. 30 min horneado
3	Tiempo de fermentado	1. 10 min fermentado 2. 30 min fermentado
4	Adición de extracto de tara	1. 0 mg/kg extracto de tara 2. 500 mg/kg extracto de tara
5	Concentración de extracto de tara	1. 0 mg/kg extracto de tara 2. 300 mg/kg extracto de tara 3. 1000 mg/kg extracto de tara
6	Concentración de extracto de tara y tiempo de horneado	1. 0 mg/kg extracto de tara y 30 min horneado 2. 500 mg/kg extracto de tara y 20 min horneado

Los resultados de cada sesión, previo análisis estadístico (metodología en 6.7), fueron entregados a los jueces individualmente como retroalimentación de su desempeño, con el fin de crear compromiso, mejorar y normalizar su poder discriminativo.

### 6.5.3 Validación del panel sensorial.

Se validó el panel sensorial bajo las directrices de la Norma ISO 11132-2012: “Análisis sensorial. Metodología. Directrices para monitorear el desempeño de un panel sensorial cuantitativo”, la cual proporciona criterios para la evaluación del rendimiento de un panel descriptivo cuantitativo y de cada miembro.

Se evaluaron durante tres sesiones, 3 muestras de pan tipo hallulla con atributos significativamente diferentes entre sí (ISO 11132, 2012), las que se detallan en la Tabla 9.

**Tabla 9:** Muestras evaluadas en las sesiones de validación del panel sensorial.

Parámetros de variación	Muestras		
	1	2	3
Tiempo de horneado (min.)	10	20	30
Concentración extracto de tara (mg/kg)*	200	1000	0

\*Concentración de extracto de tara (mg/kg) añadida en base al contenido de harina del pan tipo hallulla.

La variación del tiempo de horneado y concentración de extracto añadido, permitió obtener muestras significativamente diferentes en apariencia, sabor, aroma y textura; por lo que se evaluaron los descriptores de color corteza, color violeta/grisáceo, aroma tostado, dureza en boca y sabor tostado.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico (metodología en 6.7), a partir del cual se evaluó el desempeño o rendimiento según parcialidad individual, consistencia, repetibilidad y capacidad de discriminación de cada juez individual; y discriminación de atributos claves, homogeneidad, acuerdo entre jueces, consistencia y repetibilidad del panel,

según la Norma ISO 11132:2012. Los jueces que no tuvieron un rendimiento adecuado y perjudicaron el rendimiento global del panel, fueron eliminados por carencia de habilidades.

#### **6.6 Evaluación sensorial con panel entrenado.**

Se evaluó el efecto de la adición del extracto de tara en el perfil y calidad sensorial del pan tipo hallulla mediante la evaluación de una muestra sin adición de extracto (control) y muestras con 600, 750, 1000 y 1500 mg/kg de extracto de tara, con el panel previamente entrenado y validado, durante tres sesiones, mediante el uso del Test de perfil descriptivo con escala lineal no estructurada y la Tabla de valoración de calidad con escala de 9 puntos (Karlsruhe), específicos para pan tipo hallulla adicionada con el extracto de tara (Anexo 10 y 11), en mesa redonda con separaciones individuales.

#### **6.7 Análisis estadísticos.**

Los datos cuantitativos representan valores medios de tres o más repeticiones con desviación estándar respectiva. Análisis de varianza ANOVA simple y/o múltiple seguido de una prueba de Tukey fueron realizados con el programa StatGraphics Centurion XVI.I (StatPoint Technologies, 2007). Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1 Caracterización química de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*).

Los frutos de tara cambian de color de verde a rojo anaranjado según su madurez (Melo et al., 2013). Sin embargo, las vainas maduras pueden presentar coloración roja o amarillo pálido (Chambi et al., 2013). Esta diferencia de color fue utilizada para la separación de las vainas, evidenciándose una mayor proporción de vainas de coloración roja, cercana al 70%. En la Tabla 10 se presentan los resultados de la caracterización morfológica (largo y ancho) de ambas vainas.

**Tabla 10:** Características dimensionales de vainas rojas y amarillas de tara.

Parámetro	Vainas rojas	Vainas amarillas
Largo (cm)	7,45 ± 0,70 <sup>a</sup>	8,05 ± 0,65 <sup>b</sup>
Ancho (cm)	1,97 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,17 <sup>b</sup>

Datos correspondientes al promedio y desviación estándar (n=50). Superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) por comparación múltiple de Tukey.

Las características morfológicas de la materia prima están de acuerdo a lo descrito en literatura, correspondiendo a vainas encorvadas y explanadas, de coloración rojo anaranjado y amarillo pálido (Díaz, 2010; Chambi et al., 2013; de la Cruz, 2004; Garro Gálvez et al., 1997). Si bien, su tamaño varía de acuerdo al clima en el que se desarrolla la planta, sus dimensiones se encuentran dentro del rango informado por Díaz (2010) y de la Cruz (2004), de 8 a 10 cm de largo y 1,5 a 2,5 cm de ancho; exceptuando la longitud de las vainas rojas, la que es similar a la determinada por Fernández (2008), de  $7,7 \pm 1,0$  cm, para vainas recolectadas en Chile. Sin embargo, sus dimensiones, largo y ancho, fueron significativamente menores a las de las vainas de coloración amarilla ( $p \leq 0,05$ ).

La materia prima también se caracterizó químicamente, cuyos resultados se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11:** Características químicas de vainas rojas y amarillas de tara.

	Vainas rojas	Vainas amarillas
Humedad (%)	7,93 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,93 ± 0,12 <sup>a</sup>
Cenizas (%)	3,23 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,06 <sup>a</sup>
Proteínas (%)	2,90 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,06 <sup>a</sup>
Grasa total (%)	0,40 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>b</sup>
ENN (%)	81,93 ± 0,31 <sup>a</sup>	81,50 ± 0,17 <sup>a</sup>
Fibra cruda (%)	3,60 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,67 ± 0,06 <sup>a</sup>
Azúcares reductores		
Fructosa (%)	7,90 ± 0,38 <sup>a</sup>	8,92 ± 0,07 <sup>b</sup>
Glucosa (%)	1,13 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,07 <sup>a</sup>
Polifenoles totales		
mg EAT/g (b.h.)	580,47 ± 23,54 <sup>a</sup>	565,45 ± 26,82 <sup>a</sup>
mg EAG/g (b.h.)	645,76 ± 40,34 <sup>a</sup>	637,83 ± 39,75 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH)		
EC <sub>50</sub> µg extracto/mL	1,86 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,10 <sup>a</sup>

Datos correspondientes al promedio y desviación estándar (n=3). Superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) por comparación múltiple de Tukey.

ENN: Extracto no nitrogenado, calculado por diferencia del análisis proximal (cenizas, proteínas, grasa total y fibra cruda).

La mayoría de los componentes y características químicas de las vainas no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). De los resultados obtenidos del análisis proximal, sólo el contenido de grasa total fue significativamente mayor en las de coloración amarilla respecto a las rojas ( $p \leq 0,05$ ). En ambas, se obtuvo una composición similar a la presentada por Fernández (2008), en cuanto al contenido de humedad (9,47%), cenizas (3,40%), proteínas (3,14%) y materia grasa (0,28%) de vainas cultivadas en la Región Metropolitana de Chile. Por otro lado, de la Cruz (2004) analizó el fruto completo, es decir, vainas y semillas, determinando un contenido de 11,7% humedad, 7,17% proteínas, 6,24% cenizas, 5,3% fibra bruta y 2,01% extracto etéreo; si bien son mayores a los determinados solamente en vainas, las diferencias se pueden atribuir a la composición de las semillas, principalmente al mayor contenido de humedad (12,01%), proteínas (19,62%) y extracto etéreo (5,20%), además de las condiciones de cultivo (de la Cruz, 2004).

Los azúcares libres son uno de los componentes más importante en los frutos, principalmente fructosa y glucosa (Ayaz et al., 2007). El contenido de ambos compuestos es de 10,10% y 9,03% en las vainas de coloración amarilla y roja, respectivamente. La diferencia entre ambas se debe a un nivel significativamente mayor de fructosa en las vainas amarillas, ya que su nivel de glucosa es similar a la presentada en las de coloración roja. Las vainas de algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.), leguminosa perteneciente a la subfamilia de Caesalpinioideae, al igual que la tara; posee altos niveles de azúcares solubles, entre 40% y 50%, principalmente debido a sacarosa, fructosa y glucosa, cuyos niveles determinados por Avallone et al. (1997) fueron de 34% de sacarosa, 6% de fructosa y 4% de glucosa; sin embargo, estos varían según la zona geográfica del cultivo (Ayaz et al., 2007).

Se realizó una triple extracción con agua (metodología descrita en 6.1.3) para la obtención de los polifenoles de ambas vainas, para su cuantificación y determinación de su capacidad antioxidante. El contenido de polifenoles totales es similar en las vainas de distinta coloración ( $p > 0,05$ ), obteniendo mayores valores al ser expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG). Estos son menores a los reportados por Aouf et al. (2014), los que determinaron casi un 70% de taninos en polvo de vainas de tara. Por otro lado, los resultados expresados como equivalentes de ácido tánico (EAT) están dentro del 40% a 60% de taninos hidrolizables indicado por Aguilar-Gálvez (2014) y de la Cruz (2004), y son similares a lo reportado Chambi et al. (2013), de 55,1% de EAG en vainas de tara, de los cuales el ~95% corresponde a ácido gálico libre y galotaninos.

Respecto a su capacidad antioxidante, fue determinada por el método DPPH y expresada como la concentración de extracto necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% ( $EC_{50}$ ) (Fernández, 2008). No existió una variación significativa en los valores  $EC_{50}$  respecto a la coloración de las

vainas estudiadas y está de acuerdo a lo reportado en literatura para extractos de tara (Doroteo et al., 2012; Fernández, 2008; Nuñez & Quispe, 2015; Silva, 2012). La capacidad antioxidante de ambas vainas es mayor a la reportada en otros frutos; Simirgiotis et al. (2009) reportaron una alta capacidad antioxidante en frutillas nativas rojas y blancas (*Fragaria chiloensis*) y en frutillas rojas comerciales (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler), sin embargo, los valores EC<sub>50</sub> para sus extractos metanólicos fueron significativamente mayores a los extractos de tara; de  $72,32 \pm 0,13$ ,  $86,16 \pm 1,20$  y  $60,16 \pm 1,53$  µg/mL, respectivamente. De igual forma, se han reportado valores EC<sub>50</sub> de 114 µg/mL para un extracto acuoso de cáscara del fruto peruano camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh), por Villanueva-Tiburcio et al. (2010), y de  $0,239 \pm 0,003$  para extractos metanólicos y  $0,586 \pm 0,023$  mg/ml para extractos acuosos del fruto noni (*Morinda citrifolia* Linn.), por Villacorta & Pérez (2011).

La capacidad antioxidante EC<sub>50</sub> también puede ser expresada como concentración de materia prima, la que es equivalente a 2,37 y 1,92 µg/mL de polvo de vaina roja y amarilla, respectivamente; lo que indica que es necesaria una concentración mayor de materia prima para generar la misma reducción en la concentración de DPPH que sus respectivos extractos, puesto que estos últimos poseen un mayor contenido porcentual de polifenoles y por ende, mayor capacidad antioxidante.

Finalmente, ya que no existieron diferencias significativas entre ambas vainas, excepto en un mayor contenido de grasas totales y fructosa en las vainas amarillas, además de una menor proporción de éstas en la materia prima utilizada, se seleccionaron las vainas de coloración roja para la obtención de un extracto de polifenoles de vainas de tara.

## 7.2 Obtención y caracterización química de un extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*).

### 7.2.1 Obtención y selección de un extracto de polifenoles.

En la Tabla 12 se presenta la concentración de polifenoles totales de tres extractos obtenidos a distinta relación materia prima – solvente; 1:10, 1:30 y 1:60 (p/v), con agua como solvente. Este último extracto fue secado a distintas temperaturas, a 40 y 60 °C en condiciones de vacío y mediante liofilización (previa concentración a 40 °C bajo vacío) (Anexo 7), para evaluar su efecto en la capacidad antioxidante, presentada también en la Tabla 12.

**Tabla 12:** Influencia de la relación materia prima – solvente y método de secado, en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos, respectivamente.

Método de secado	40 °C		
Relación sólido-líquido	1:10	1:30	1:60
Polifenoles totales			
mg EAT/g (b.h.)	481,58 ± 23,55 <sup>a</sup>	513,82 ± 49,65 <sup>a</sup>	619,41 ± 31,58 <sup>b</sup>
mg EAG/g (b.h.)	634,63 ± 26,46 <sup>a</sup>	669,64 ± 55,39 <sup>a</sup>	693,49 ± 54,52 <sup>a</sup>
Relación sólido-líquido	1:60		
Método de secado	40 °C	60 °C	40 °C-Liofilizado
Cap. antioxidante			
EC <sub>50</sub> µg extracto/mL	1,86 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,18 <sup>a</sup>

Los datos corresponden al promedio y desviación estándar (n=3). Superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas (p≤0,05) por comparación múltiple de Tukey.

Existió una variación en el contenido de polifenoles totales en los extractos obtenidos a distinta relación materia prima – solvente. Polifenoles totales, expresados como mg equivalentes de ácido tánico (EAT) y gálico (EAG) por g de extracto (b.h), tendieron a ser mayores al aumentar la cantidad de solvente utilizado. Sin embargo, sólo la concentración EAT del extracto obtenido en relación 1:60 (p/v), fue significativamente mayor respecto a los obtenidos en relación 1:30 y 1:10 (p/v); los que no son significativamente diferentes entre sí

( $p > 0,05$ ). Por otro lado, la capacidad antioxidante, determinada por el método DPPH, del extracto 1:60 (p/v), tendió a ser mayor en el extracto secado a 60 °C, al presentar el menor valor  $EC_{50}$ , probablemente debido a un menor tiempo de tratamiento térmico dado por una temperatura de secado mayor. Los otros dos extractos presentaron valores de  $EC_{50}$  similares pero levemente menor en el extracto liofilizado, el que fue sometido a 40 °C por menor tiempo ya que sólo fue concentrado hasta el 20% de su volumen y no hasta lograr sequedad. Sin embargo, estas diferencias, no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).

Finalmente, se seleccionó el extracto obtenido en relación materia prima – solvente 1:60 (p/v), ya que posee significativamente mayor contenido de EAT, y secado a 60 °C por medio de vacío, puesto que la mayor temperatura permite un secado más rápido sin afectar significativamente la capacidad antioxidante del extracto.

### 7.2.2 Caracterización química.

El extracto seleccionado se caracterizó químicamente, respecto a su contenido de humedad, azúcares reductores, polifenoles totales y capacidad antioxidante, los que se presentan en la Tabla 13.

**Tabla 13:** Caracterización química del extracto de polifenoles de vainas de tara.

Parámetros	
Humedad (%)	7,93 ± 0,12
Azúcares reductores	
Fructosa (%)	12,12 ± 0,12
Glucosa (%)	1,83 ± 0,02
Polifenoles totales	
mg EAT/g (b.h.)	617,84 ± 11,75
mg EAG/g (b.h.)	682,39 ± 24,02
Capacidad antioxidante	
$EC_{50}$ µg extracto/mL	1,72 ± 0,19

Los datos corresponden al promedio y desviación estándar (n=3).

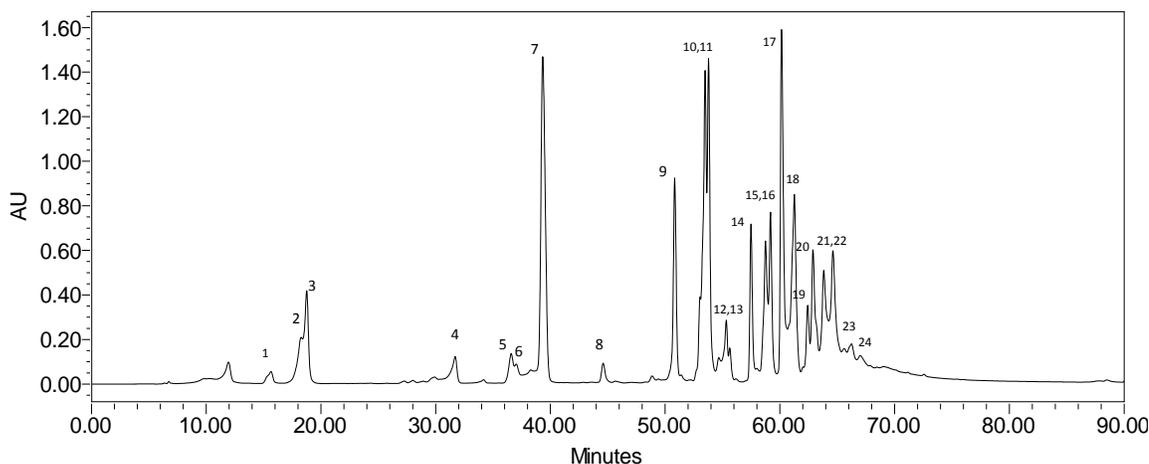
El contenido de azúcares reductores determinados en el extracto, glucosa y fructosa, son mayores a los presentes en la materia prima tal como era esperado, puesto que en el proceso de extracción sólo se obtienen los compuestos solubles en agua, obteniendo un extracto con una mayor concentración porcentual de éstos. Estos resultados son mayores a los reportados por Garro Gálvez et al. (1997), de 0,93% de glucosa y 1,62% de un compuesto desconocido identificado probablemente como fructosa, en un extracto de vainas de tara; sin embargo, la extracción pudo ser afectada por el menor nivel de solvente utilizado (1:4 versus 1:60 p/v).

El contenido de polifenoles totales del extracto es mayor que el de extractos acuosos de vainas de tara obtenidos por López et al. (2011) y Avilés et al. (2010), con 563,7 y 149 mg EAG/g, respectivamente. Respecto a su capacidad antioxidante, es mayor a la de extractos hidroalcohólicos de tara obtenidos por Nuñez y Quispe (2015) y Doroteo et al. (2012) con valores de  $EC_{50}$ , de 4,52 y 4,97  $\mu\text{g}$  extracto/mL, respectivamente. Según el contenido de polifenoles totales determinado en el extracto, su capacidad antioxidante corresponde a un valor de  $EC_{50}$  de  $1,19 \pm 0,13$   $\mu\text{g}$  EAG/mL, similar a la de extractos supercríticos de vainas de tara obtenidos por Silva (2012) y Fernández (2008), de 1,09 y 0,83  $\mu\text{g}$  EAG/mL, respectivamente. Dentro de la familia de las Fabaceae, Pérez et al. (2014) determinaron valores de  $EC_{50}$  de 19 – 22 y 11 – 15  $\mu\text{g}$  EAG/mL para extractos de vainas de algarrobo negro y blanco (*P. nigra* y *P. alba*), respectivamente, presentando una mayor capacidad antioxidante el extracto de vainas de tara.

En la Tabla 14 se presentan los perfiles fenólicos presentes en el extracto obtenido, detallando cada compuesto detectado por HPLC – PAD, incluyendo sus tiempos de retención (TR) y concentración expresada como mg EAG por g de extracto. El cromatograma por HPLC – PAD de los compuestos fenólicos, se presenta en la Figura 6.

**Tabla 14:** Caracterización de la fracción fenólica del extracto de polifenoles de vainas de tara, expresados como mg EAG por g de extracto (b.h.).

Pico (n°)	TR (min)	Compuesto tentativo	Concentración (mg EAG/g <sub>b.h.</sub> )
1	15,6	Ácido gálico	1,6
2	18,2	Derivado ác. hidroxibenzoico	8,7
3	18,7	Derivado ác. hidroxibenzoico	15,9
4	31,6	Derivado ác. hidroxibenzoico	4,6
5	36,5	Derivado ác. hidroxibenzoico	4,7
6	37,0	Derivado ác. hidroxibenzoico	1,8
7	39,3	Derivado ác. hidroxibenzoico	60,8
8	44,6	Derivado ác. hidroxibenzoico	2,7
9	50,8	Derivado ác. hidroxibenzoico	24,3
10	53,4	Derivado ác. hidroxibenzoico	42,7
11	53,7	Derivado ác. hidroxibenzoico	37,1
12	55,3	Derivado ác. hidroxibenzoico	9,2
13	55,6	Derivado ác. hidroxibenzoico	3,2
14	57,4	Derivado ác. hidroxibenzoico	15,1
15	58,7	Derivado ác. hidroxibenzoico	19,1
16	59,1	Derivado ác. hidroxibenzoico	18,8
17	60,1	Derivado ác. hidroxibenzoico	45,4
18	61,2	Derivado ác. hidroxibenzoico	36,1
19	62,4	Derivado ác. hidroxibenzoico	7,8
20	62,8	Derivado ác. hidroxibenzoico	20,0
21	63,8	Derivado ác. hidroxibenzoico	20,3
22	64,6	Derivado ác. hidroxibenzoico	26,1
23	66,2	Derivado ác. hidroxibenzoico	5,6
24	67,0	Derivado ác. hidroxibenzoico	2,3
Total compuestos fenólicos:			433,9



**Figura 6:** Cromatograma por HPLC – PAD de los compuestos fenólicos del extracto de vainas de tara.

Se detectaron 24 compuestos a 280 nm, correspondientes a derivados del ácido hidroxibenzoico, ya que comparten la misma forma y máxima longitud de onda del espectro UV, pero poseen diferentes tiempos de retención. El primer compuesto corresponde a ácido gálico, siendo el primero que eluye de la columna, lo que concuerda con cromatogramas de estudios similares (Dueñas et al., 2002; Dueñas et al., 2004; Papagiannopoulos et al., 2004). La composición fenólica determinada, es similar a la reportada por Fernández (2008) en un extracto supercrítico de vainas de tara, donde identificó 26 compuestos derivados de ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico), siendo el ácido gálico el de menor tiempo de retención.

Se cuantificó un total de 433,9 mg EAG/g mediante HPLC, a partir de los 24 compuestos identificados; el que es significativamente inferior al contenido de polifenoles determinado por el método Folin-Ciocalteu, de 682,39 mg EAG/g. Esta diferencia de magnitud se ha presentado en estudios anteriores, Fernández (2008) obtuvo un contenido de 11000 mg EAG/kg por espectrofotometría y 109,43 mg de derivados de ácido gálico por kg mediante HPLC, en un extracto supercrítico de vainas de tara; lo mismo ocurre en un

extracto de vainas de algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) obtenido por Papagiannopoulos et al. (2004), cuyo contenido fue de 8310 mg EAG/kg por espectrofotometría versus 448,2 mg EAG/kg por HPLC. Esto se debe principalmente a que la cuantificación espectrofotométrica es propensa a la sub o sobreestimación por reacciones cruzadas, mientras que por HPLC, se puede no contabilizar aquellos compuestos que estén presentes bajo el límite de cuantificación (Papagiannopoulos et al., 2004).

### 7.3 Determinación de neo-contaminantes en pan tipo hallulla.

#### 7.3.1 Determinación del contenido de acrilamida

En la Tabla 15 se presentan los resultados del contenido de acrilamida en pan tipo hallulla, adicionado con distintos niveles de extracto de vainas de tara.

**Tabla 15:** Contenido de acrilamida en pan tipo hallulla bajo condiciones experimentales.

Concentración de extracto de vainas de tara (mg/kg)	Contenido de Acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
0	$82,62 \pm 4,87^a$
500	$64,74 \pm 2,75^b$
600	$56,41 \pm 2,53^c$
750	$41,22 \pm 4,66^d$
1000	$27,54 \pm 2,93^e$
1500	<LOD <sup>f</sup>

Datos correspondientes al promedio y desviación estándar (n=3). Superíndices distintos indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) por comparación múltiple de Tukey.

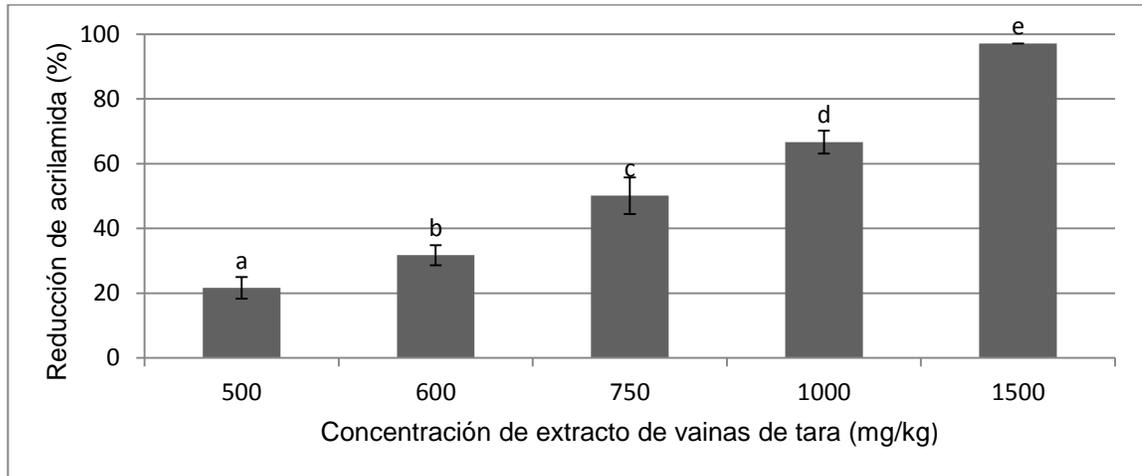
LOD: Límite de detección.

El contenido de acrilamida del pan control, es decir, del pan tipo hallulla sin adición de extracto, es menor al nivel indicativo de acrilamida en pan de molde emitido por la Comisión Europea en 2011, de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , pero es levemente superior a los niveles presentados por EFSA (2012), de 30 – 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en panes de molde. Plaza (2015) reportó un contenido superior de acrilamida en pan tipo hallulla, de  $108 \pm 6 \mu\text{g}/\text{kg}$ , de los cuales, más de un 99% estaba presente en la

corteza, lo mismo fue reportado por Surdyk et al. (2004), en panes a base de harina de trigo, probablemente por los mayores niveles de temperatura alcanzados en la corteza, entre 170 – 200 °C en las etapas finales del proceso de horneado, adquiriendo su coloración dorada – tostada debido principalmente a la reacción de Maillard, en cambio, el interior del pan (miga) sólo alcanzaría 100 °C (Gündüz & Cengiz, 2014; Plaza, 2015).

El contenido de acrilamida varía en los diferentes tipos de panes según la concentración de sus precursores en las materias primas y los parámetros del proceso (Gündüz & Cengiz, 2014; Mustafa, 2008). Este tipo de pan posee un bajo nivel respecto a otros alimentos como bizcochos (250 µg/kg), cereales para el desayuno (400 µg/kg), café tostado (450 µg/kg), galletas (500 µg/kg), pan crujiente (500 µg/kg), café instantáneo (900 µg/kg) y papas fritas tipo chips (1000 µg/kg) (EFSA, 2012; Halford et al., 2012; Pedreschi et al., 2014). Sin embargo, el pan es una de las principales fuentes de exposición dietaria de acrilamida, tanto en los países europeos como en Estados Unidos, al ser consumido frecuentemente y/o en alta cantidad (Halford et al., 2012; Pedreschi et al., 2014; Xu et al., 2014).

La adición del extracto de vainas de tara al pan tipo hallulla, en todas las concentraciones evaluadas, provocó diferencias significativas en el contenido de acrilamida ( $p \leq 0,05$ ), respecto al pan control (sin adición de extracto); las que se presentan como reducción porcentual en la Figura 7.



Barras de error correspondientes a la desviación estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) a través de la comparación múltiple de Tukey.

**Figura 7:** Reducción porcentual del contenido de acrilamida en pan tipo hallulla adicionado con extracto de tara, respecto al control (sin extracto).

La adición del extracto de vainas de tara en diferentes niveles (de 500 a 1500 mg/kg, es decir, entre 0,05 y 0,15%) reduce significativamente el contenido de acrilamida en el pan tipo hallulla ( $p \leq 0,05$ ), en una relación no lineal dependiente de la dosis, produciendo una mayor mitigación de acrilamida a concentraciones más altas de extracto añadido. Este efecto ha sido reportado previamente en otros modelos de alimentos a bajas concentraciones de polifenoles; en galletas, por adición de 0,25 a 4,0% de extractos acuosos de canela, clavo de olor, comino y cúrcuma, por Zhu et al. (2011), y de 0,005 a 0,02% de un extracto de hojas de bambú, por Li et al. (2012). En palitos de pan frito, por adición de 0,0002 a 0,1% de antioxidantes de hojas de bambú y de 0,0002 a 0,01% de un extracto de té verde, por Zhang & Zhang (2007). En bastones y chips de papas fritas, por Zhang et al. (2007), utilizando extractos de hojas de bambú; al igual que Cheng et al. (2009) en un modelo de reacción de Maillard, por adición de naringenina. Por lo tanto, el efecto de la adición de antioxidantes en el contenido de acrilamida no sólo está determinada por el tipo sino también por su concentración (Zhang & Jin, 2016).

La adición de 750 mg/kg de extracto al pan tipo hallulla, provocó una reducción del 50,11% y se logró una mitigación de más del 97,12% de su contenido de acrilamida, llegando a niveles bajo el límite de detección (LOD = 2,38 µg/kg), al adicionar 1500 mg/kg de extracto. Se ha informado la reducción significativa de la formación de acrilamida en estudios similares, Hedegaard et al. (2008) reportaron una reducción de un 62% de acrilamida en bollos trigo, procesados a 225 °C por 20 min, al añadir un 10 g/kg de extracto de romero (~40 mg EAG), mientras que Zhang & Zhang (2007), informaron una reducción de acrilamida de un 82,9% y de 72,5% al adicionar una concentración de 10 g/kg de antioxidantes de hojas de bambú y 1 g/kg de un extracto de té verde (~98% flavonoides), respectivamente, en palitos de pan fritos a 180 °C. Li et al. (2012) evaluaron el efecto de 200 mg/kg de antioxidantes de hojas de bambú (25,51% flavonoides y 8,25% ácidos de polifenoles), 100 mg/kg de polifenoles de té (~98% flavonoides) y 100 mg/kg de vitamina E (98% α-tocoferol), añadidos individualmente en galletas procesadas a 190 °C por 7 minutos, lograron una inhibición del 63,9, 71,2 y 43,0%, respectivamente. Zhu et al. (2011) evaluaron el efecto de 20 g/kg de proantocianidinas (>85%) de semillas de uva en un sistema modelo a base de almidón, tratado a 190 °C por 20 minutos logrando un 62,2% de reducción. Sin embargo, Açar & Gökmen (2009) informaron que un extracto de semilla de uva no tuvo efecto significativo sobre la formación de acrilamida en un sistema modelo semejante a corteza de pan.

Debido a la diversidad de estructuras y grupos funcionales en diferentes antioxidantes y la complejidad de las matrices alimentarias, los compuestos fenólicos pueden participar en varias etapas durante el proceso de reacción de Maillard, y ejercer efectos múltiples al mismo tiempo (Jin et al., 2013; Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016). La reducción significativa del contenido de acrilamida se puede atribuir a su capacidad para reaccionar con precursores, compuestos intermediarios de la reacción o con la misma acrilamida (Jin et al., 2013; Xu et al., 2014; Zhang & Jin, 2016).

Los grupos carbonilos reactivos serían los principales sitios claves en la que los antioxidantes han influido en la formación de acrilamida (Liu et al., 2015). Se ha reportado que varios de ellos, especialmente algunos flavonoides, pueden actuar como agentes de captura de compuestos carbonilos y dicarbonilos reactivos, los que son necesarios para la conversión de asparagina en acrilamida; mediante la formación de enlaces covalentes en las posiciones C6 y C8 del anillo A (Jin et al., 2013; Kotsiou et al., 2010; Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016). Totlani & Peterson (2005) informaron que la epicatequina sería capaz de reaccionar directamente con fragmentos de azúcar o con precursores transitorios claves para la reacción de Maillard, como glioxal, metilglioxal, acetol, entre otros; mediante reacciones de sustitución aromática electrofílica, inhibiendo la formación de acrilamida (Constantinou & Koutsidis, 2016; Jin et al., 2013; Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016). De igual forma, naringenina se une a 3-oxopropanamida; un intermediario de la reacción de Maillard derivado de asparagina, según lo informado por Cheng et al. (2009); alterando la ruta de reacción, reduciendo el contenido de acrilamida (Jin et al., 2013; Kotsiou et al., 2010; Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016).

Por otro lado, algunos antioxidantes fenólicos, como los taninos, pueden formar complejos con aminoácidos, causando la precipitación de asparagina, impidiendo su conversión en acrilamida (Jin et al., 2013; Zhang & Jin, 2016). Proantocianidinas; taninos condensados, podrían reducir el contenido de acrilamida mediante este mecanismo, según Zhu et al. (2009). Finalmente, la acrilamida formada, posee un doble enlace vinílico deficiente de electrones, con el cual algunos antioxidantes pueden reaccionar por adición Michael, logrando su eliminación (Jin et al., 2013; Zhang & Jin, 2016).

Los grupos funcionales terminales de la cadena lateral, hidroxilo y aldehídos, serían clave en la capacidad de los compuestos fenólicos para interrumpir o mejorar ciertas etapas en la ruta de formación de acrilamida (Kotsiou et al.,

2010; Zhang & Jin, 2016). Se ha reconocido que los derivados hidroxifenólicos poseen propiedades antioxidantes, que actúan como donadores de hidrógeno en la interacción quinina-amina entre fenoles y 3-aminopropionamida (3-APA, intermediario clave), bloqueando la vía de producción de acrilamida (Kotsiou et al., 2010; Zhang & Jin, 2016). Estructuras o-dihidroxifenólicas, muy ligada a la capacidad antioxidante, serían eficaces en la mitigación de acrilamida (Constantinou & Koutsidis, 2016; Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016). Además, el anillo A se considera más reactivo que el anillo B, debido a la activación orto-para resultante de un grupo hidroxilo en benceno (Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016). En cambio, los grupos aldehídos en la cadena lateral de compuestos fenólicos, podrían reaccionar con asparagina, favoreciendo la formación de acrilamida (Kotsiou et al., 2010; Jin et al., 2013; Zhang & Jin, 2016).

Por lo tanto, los efectos de los polifenoles sobre la formación de acrilamida están relacionadas con su estructura, concentración y capacidad antioxidante, así como las condiciones de reacción (Constantinou & Koutsidis, 2016; Jin et al., 2013; Kahkeshani et al., 2015; Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016).

### **7.3.2 Determinación del contenido de furano**

En la Tabla 16 se presentan los resultados del contenido de furano en pan tipo hallulla, adicionado con distintos niveles de extracto de polifenoles de vainas de tara.

El contenido de furano en el pan tipo hallulla sin adición de extracto (pan control), está de acuerdo a lo reportado en estudios similares. Mariotti et al. (2013b) informaron niveles de furano de 1,7 a 4,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para pan comercializado en Chile, similar al reportado por Kim et al. (2009), de 1,5 y 2,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para pan comercializado en Corea. Zoller et al. (2007) informaron niveles menores a 5, menores a 7 y de 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para pan blanco, pan integral y pan crujiente tipo baguette, respectivamente; el que está concentrado en la corteza

del pan, con niveles 3 a 20 veces mayores que en su interior. Por otro lado, Crew (2009), en un estudio realizado para la EFSA, reportó un contenido de furano no superior a 3 µg/kg para pan blanco, el que aumentaba a 200 – 400 µg/kg luego de ser tostado usando técnicas domesticas convencionales. Por lo tanto, el contenido de furano podría ser afectado por las condiciones de preparación, además, dependería del tipo de pan, composición de sus materias primas y de su forma, específicamente su relación superficie/volumen (Crew, 2009; EFSA, 2011; Zoller et al., 2007).

**Tabla 16:** Contenido de furano en pan tipo hallulla bajo condiciones experimentales.

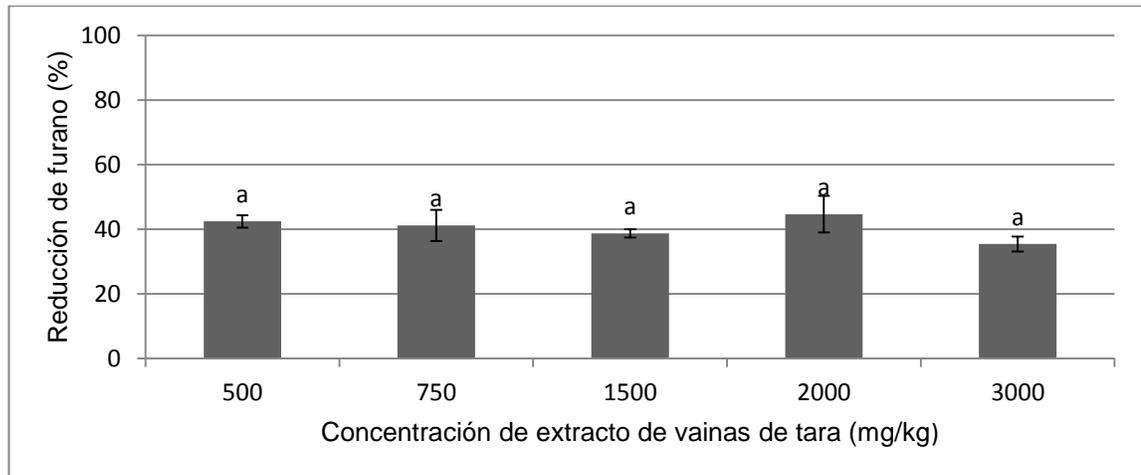
Concentración de extracto de vainas de tara (mg/kg)	Contenido de Furano (µg/kg)
0	1,94 ± 0,01 <sup>b</sup>
500	1,12 ± 0,04 <sup>a</sup>
750	1,14 ± 0,09 <sup>a</sup>
1500	1,19 ± 0,03 <sup>a</sup>
2000	1,07 ± 0,11 <sup>a</sup>
3000	1,25 ± 0,04 <sup>a</sup>

Datos correspondientes al promedio y desviación estándar de 3 determinaciones (n=3). Superíndices distintos indican diferencias significativas (p≤0,05) por comparación múltiple de Tukey

El pan tipo hallulla sin adición de extracto posee un nivel de furano bajo respecto a otros alimentos amiláceos de baja humedad comercializados en Chile, como cereales para el desayuno (22,2 µg/kg), galletas (91 µg/kg) y papas fritas tipo chips (259 µg/kg), según lo informado por Mariotti et al. (2013b). Su contenido es menor al reportado por la EFSA (2011) para productos a base de cereales, de 15-18 µg/kg, y menor a otras categorías de alimentos, como enlatados, de 32 µg/kg en alimentos para bebés, y café, de 45 µg/kg en café preparado a 3660 µg/kg en granos tostados de café. El café es el principal contribuyente a la exposición de furano en adultos y adolescentes, en un 88% y 33%, respectivamente; mientras que los productos a base de cereales,

incluyendo el pan, son uno de los principales contribuyentes a la exposición en adolescentes (10%) y niños (7,7%) (EFSA, 2011). Sin embargo, considerando que Chile es el segundo mayor consumidor de pan a nivel mundial (ODEPA, 2014), la exposición dietaria debido a su consumo podría ser considerable.

La adición del extracto de vainas de tara al pan tipo hallulla, reduce significativamente el contenido de furano respecto al pan control ( $p \leq 0,05$ ), en las condiciones experimentales evaluadas; las que se presentan como reducción porcentual en la Figura 8.



Barras de error correspondientes a la desviación estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) a través de la comparación múltiple de Tukey.

**Figura 8:** Reducción porcentual del contenido de furano en pan tipo hallulla adicionado con extracto de tara, respecto al control (sin extracto).

La adición del extracto de vainas de tara reduce el contenido de furano independientemente de la concentración añadida, es decir, la mitigación producida no fue mayor al aumentar la dosis, ya que no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los niveles evaluados (de 500 a 3000 mg/kg). Esto se puede deber a su gran número de precursores (Anese & Suman, 2013; Kim et al., 2015; Zheng et al., 2015), por lo que los antioxidantes del extracto podrían

interactuar más eficazmente con sólo algunos de ellos, pudiendo existir ciertas reacciones de formación que no se ven afectadas.

La información sobre el efecto de aditivos en la formación de furano en alimentos es bastante limitada, ya que la mayor parte de las investigaciones disponibles son a partir de sistemas modelo. Se ha evaluado el rol de antioxidantes en modelos de ácidos grasos poliinsaturados; sin embargo, en modelos de reacción de Maillard se han reportado sólo algunos estudios recientes (Anese & Suman, 2013). La adición del extracto de vainas de tara logró una reducción del contenido de furano entre 35% y 45% en pan tipo hallulla, en las concentraciones evaluadas. Estudios recientes han reportado resultados similares, Kim et al. (2015) informaron una reducción de hasta 33% y 44% en un modelo de reacción de Maillard ribosa – alanina, por adición de antioxidantes BHT y BHA, respectivamente; mientras que Zheng et al. (2015) informaron mayores reducciones en un modelo de café instantáneo, donde la reacción de Maillard podría ser el principal mecanismo de formación de furano; luego de la adición de epicatequina (65,3%), galato de epigallocatequina (60,0%), catequina (44,7%), ácido clorogénico (67,0%), ácido ferúlico (57,6%), trolox (50,1%), ácido cafeico (48,2%), BHT (49,3 %) y  $\alpha$ -tocoferol (39,3%), además, la formación de derivados de furano, como furfural y 5-metilfurfural fue suprimida o disminuida significativamente por la mayoría de ellos, exceptuando los antioxidantes trolox, BHT y  $\alpha$ -tocoferol. La adición de antioxidantes ha afectado la formación de productos de la reacción de Maillard en estudios previos, Oral et al. (2014) reportaron una disminución significativa del contenido de furfural, acetilfurano y 5-metil-2-furanocarboxaldehído, en un modelo glucosa – glicina, a partir de la adición de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido elágico, epicatequina y oleuropeína. De igual forma, epicatequina y galato de epigallocatequina pueden bloquear la formación de furfural, 2-acetilfurano, 5-metilfurfural, 2-furanona y alcohol furfurílico en un modelo glucosa-glicina,

según lo reportado por Schamberger & Labuza (2007) y Totlani & Peterson (2007).

La reducción significativa del contenido de furano en pan tipo hallulla, se puede deber a la capacidad de algunos compuestos fenólicos para disminuir la formación de productos de reacción de Maillard, lo que se ha explicado por su interacción con precursores o intermediarios de la reacción (Anese & Suman, 2013; Oral et al., 2014). Flavonoides como epicatequina, pueden actuar como agentes de atrapamiento de compuestos dicarbonilos, pudiendo atrapar productos intermediarios de Maillard así como fragmentos de azúcar (Totlani & Peterson, 2007; Zheng et al., 2015). Ácidos hidroxicinámicos, como el ácido clorogénico y ácido cafeico, también podrían actuar de manera eficaz para reducir furano por interacción con precursores dicarbonilo (Zheng et al., 2015). Por otro lado, antioxidantes podrían inhibir la formación de furano debido a que son eliminadores de radicales libres producidos durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, que están vinculados con su formación, en sistemas modelo (Anese & Suman, 2013; Kim et al., 2015; Zheng et al., 2015). Sin embargo, furano también puede formarse por descomposición de ácido ascórbico y por degradación térmica de hidratos de carbono y aminoácidos, por lo que su reducción, además del tipo de antioxidante, depende de la composición del sistema y las condiciones de proceso (Anese & Suman, 2013; Kim et al., 2015, Zheng et al., 2015).

## **7.4 Conformación de un panel sensorial entrenado.**

### **7.4.1 Entrenamiento de jueces.**

Se entrenó un total de 14 jueces para la evaluación de pan tipo hallulla, durante 6 sesiones. Los resultados obtenidos en cada sesión de entrenamiento para el test de calidad y el perfil descriptivo se muestran en las Tablas 17 y 18, respectivamente, donde se resaltan en rojo los atributos que presentaron

diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Sin embargo, se exceptúan los resultados de la primera sesión (Anexo 14), los que fueron utilizados para la obtención del Test de perfil descriptivo y la Tabla de valoración de calidad Karlsruhe, específicos para pan tipo hallulla (Anexos 10 y 11).

**Tabla 17:** Análisis de varianza ANOVA de 2 vías del test de calidad de las muestras de pan tipo hallulla evaluadas en cada sesión de entrenamiento.

P-valor por descriptor		Sesiones				
		2	3	4	5	6
Muestras	Color	0,0001	1,0000	0,0186	0,0491	0,2079
	Apariencia/forma	0,0020	0,0273	0,0475	0,0007	0,1110
	Aroma	0,0565	0,9560	0,7929	0,0632	0,5131
	Sabor	0,0083	0,5570	0,4874	0,0958	0,3356
	Textura	0,0000	0,2170	0,0695	0,1127	0,0000
Jueces	Color	0,3280	0,1237	0,1124	0,0958	0,1775
	Apariencia/forma	0,0547	0,2564	0,1087	0,0711	0,2200
	Aroma	0,0016	0,9080	0,0965	0,1173	0,5442
	Sabor	0,0076	0,9440	0,0776	0,3377	0,9515
	Textura	0,0001	0,7300	0,3086	0,0732	0,0889

En rojo: Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

En la sesión 2, los jueces lograron identificar las diferencias significativas en todo el perfil descriptivo y la mayoría de los atributos de calidad de las muestras, por lo que la variación del tiempo de horneado fue un parámetro apropiado para el inicio del entrenamiento. Sin embargo, existieron diferencias significativas entre jueces ( $p \leq 0,05$ ) en ambas evaluaciones, por lo que en las siguientes sesiones se dio mayor énfasis al uso correcto de los patrones entregados (color, dureza y elasticidad) y al ajuste de la evaluación de cada juez respecto al resto del panel.

**Tabla 18:** Resultados del análisis de varianza ANOVA de 2 vías del perfil descriptivo de las muestras de pan tipo hallulla evaluadas en cada sesión de entrenamiento.

P-valor por descriptor	Sesiones					
	2	3	4	5	6	
Muestras	Color corteza	0,0000	0,0538	0,1294	0,0154	0,0005
	Color violeta/grisáceo	-	-	0,0000	0,0000	0,0000
	Aroma fermentado	0,0004	0,0537	0,0527	0,7977	0,0011
	Aroma tostado	0,0000	0,5270	0,8450	0,3580	0,0009
	Dureza (tacto)	0,0000	0,0053	0,9767	0,1600	0,0000
	Elasticidad miga	0,0000	0,0175	0,8037	0,2465	0,0000
	Dureza (boca)	0,0000	0,0028	0,5023	0,1321	0,0000
	Sabor fermentado	0,0017	0,0262	0,2632	0,6781	0,1387
	Sabor tostado	0,0020	0,1852	0,6517	0,7876	0,0000
Jueces	Color corteza	0,0205	0,0001	0,3486	0,0000	0,7185
	Color violeta/grisáceo	-	-	0,3519	0,0073	0,4921
	Aroma fermentado	0,3906	0,0113	0,1189	0,2497	0,0544
	Aroma tostado	0,1350	0,0059	0,0609	0,0016	0,1681
	Dureza (tacto)	0,0012	0,1434	0,0009	0,1440	0,6707
	Elasticidad miga	0,0189	0,0144	0,0003	0,0048	0,1248
	Dureza (boca)	0,0744	0,0348	0,0159	0,0019	0,0708
	Sabor fermentado	0,0084	0,0005	0,0001	0,0000	0,8756
	Sabor tostado	0,0390	0,0000	0,0033	0,0003	0,3860

En rojo: Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Color violeta grisáceo evaluado desde la sesión 4.

En las siguientes sesiones, los jueces en general no fueron capaces de identificar diferencias significativas entre muestras en todos o la mayoría de los atributos evaluados, debido a que los parámetros de variación, tiempo de fermentación y adición de extracto de tara, no generaron mayores diferencias entre las muestras. La adición del extracto sólo generó un color violeta grisáceo en la corteza y en la miga del pan, diferencia significativa identificada por los jueces en las sesiones 4 y 5. Pese a esto, a partir de la tercera sesión, los jueces no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los atributos del test de calidad, lo que indica que el panel es capaz de clasificar el

pan tipo hallulla según los distintos grados de calidad descritos por la tabla de Karlsruhe.

Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas entre jueces en la evaluación del perfil sensorial, se logró en la sexta sesión, donde identificaron diferencias significativas entre muestras en todos los descriptores, excepto aroma a fermentado, gracias a la variación de dos parámetros, adición de extracto y tiempo de horneado. Por lo tanto, esto sugiere que el panel logró ser entrenado y podía someterse a su validación.

#### **7.4.2 Validación del panel sensorial.**

Se validó el desempeño del panel sensorial bajo las directrices de la Norma ISO 11132:2012, para los atributos claves del perfil sensorial; correspondientes a color corteza, color violeta grisáceo, aroma tostado, dureza en boca y sabor tostado, a partir de la evaluación de tres muestras significativamente diferentes entre sí, durante tres sesiones (metodología descrita en 6.5.3).

Previo a la evaluación del desempeño del panel, se eliminaron tres jueces ya que no lograron un buen rendimiento individual, al presentar una menor capacidad de discriminación de atributos claves (Anexo 15), además de menor repetibilidad y consistencia en su evaluación (Anexo 16).

En la Tabla 19 se presentan los parámetros de rendimiento global, obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA multifactorial de los resultados del panel de 11 jueces.

**Tabla 19:** Parámetros de rendimiento global, mediante análisis de varianza ANOVA multifactorial del panel completo.

Fuente de variación	Atributos claves				
	Color corteza	Color violeta grisáceo	Aroma tostado	Dureza (boca)	Sabor tostado
P-Muestras	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
P-Jueces	0,1092	0,0801	0,0562	0,0631	0,0893
P-Interacción	0,0577	0,0641	0,1501	0,0516	0,3373
Si	0,24	0,18	0,16	0,29	0,08
Se	0,51	0,38	0,44	0,60	0,39
Sa	0,06	0,05	0,07	0,09	0,05

Sa, Se y Si: Desviaciones estándar de los jueces, del error y de la interacción muestras-jueces, respectivamente. En rojo: Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

El panel conformado por 11 jueces fue capaz de discriminar todos los atributos claves ya que logró determinar las diferencias significativas entre muestras ( $p \leq 0,05$ ) en cada uno de ellos. Por otro lado, la evaluación de los jueces está de acuerdo al resto del panel al poseer desviaciones estándar (Sa) prácticamente nulas y al no existir diferencias significativas entre jueces ( $p > 0,05$ ) en todos los atributos claves. Además, el panel es homogéneo puesto que la interacción muestras-jueces no es significativa ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los atributos claves, lo que además indica una alta consistencia en su evaluación, y presenta un alto grado de homogeneidad ya que sus desviaciones estándar (Si) son cercanas a cero. Finalmente, el panel posee buena repetibilidad o baja variabilidad en la evaluación entre repeticiones de la misma muestra, al poseer un valor Se cercano a cero.

Por lo tanto, el panel sensorial presentó un buen rendimiento global ya que fue capaz de discriminar todos los atributos claves, es un panel homogéneo, existe acuerdo entre jueces, los que evalúan de forma consistente y con buena repetibilidad.

## 7.5 Evaluación sensorial.

Se evaluó el efecto de la adición de extracto de tara en el perfil y calidad sensorial de pan tipo hallulla, mediante la evaluación de pan con 0, 600, 750, 1000 y 1500 mg/kg de extracto de tara, con panel entrenado de 11 jueces, durante tres sesiones.

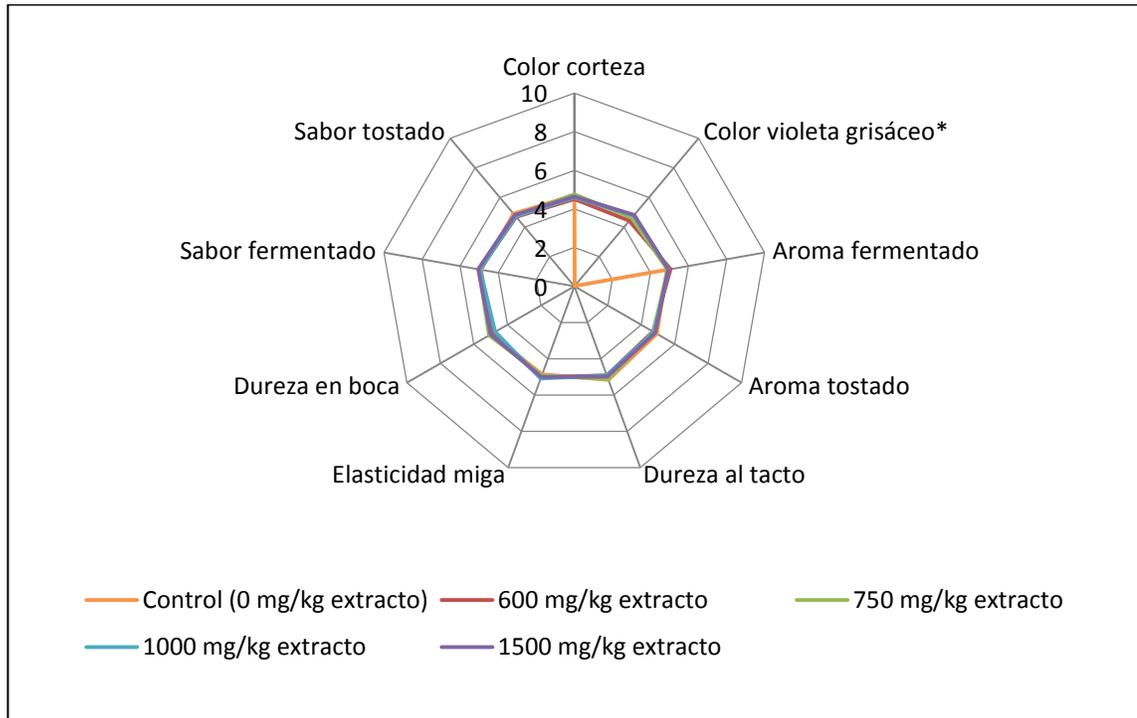
### 7.5.1 Análisis descriptivo.

En la Tabla 20 se presentan los resultados del análisis ANOVA multifactorial de la evaluación del perfil sensorial de pan tipo hallulla, adicionado con distintos niveles de extracto de vainas de tara, mediante evaluación con panel entrenado. El perfil sensorial de cada muestra evaluada se presenta en la Figura 9.

**Tabla 20:** Resumen de los resultados de ANOVA de 3 vías del análisis descriptivo de pan tipo hallulla con distinta concentración de extracto de tara.

Descriptores	Fuente de variación		
	P – Muestras	P – Jueces	P – Sesiones
Color corteza	0,4378	0,0685	0,1552
Color violeta grisáceo	0,0000	0,3152	0,9875
Aroma fermentado	0,4492	0,0519	0,5699
Aroma tostado	0,1413	0,0848	0,2158
Dureza al tacto	0,0955	0,2051	0,5776
Elasticidad de miga	0,2050	0,0665	0,4225
Dureza en boca	0,0565	0,1348	0,6500
Sabor fermentado	0,5429	0,0519	0,1577
Sabor tostado	0,1692	0,0595	0,0641

En rojo: Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).



\* Diferencias significativas entre muestras ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 9:** Perfil sensorial de pan tipo hallulla con distinta concentración de extracto de tara.

La adición de extracto de tara no afecta significativamente el perfil sensorial de pan tipo hallulla, en los niveles evaluados, ya que no existieron diferencias significativas entre muestras ( $p > 0,05$ ) en la mayoría de los atributos, excepto en el color violeta grisáceo ( $p \leq 0,05$ ). Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas entre jueces y sesiones ( $p > 0,05$ ) en todos los descriptores evaluados, indica que el panel fue correctamente entrenado y validado, y por ende, sus resultados son válidos.

Se identificaron las diferencias en el color violeta grisáceo entre muestras mediante una prueba de múltiples rangos de Tukey, cuyos resultados se presentan en la Tabla 21.

**Tabla 21:** Resultado de prueba de múltiples rangos de Tukey para el descriptor color violeta grisáceo de pan tipo hallulla con distintos niveles de extracto de tara.

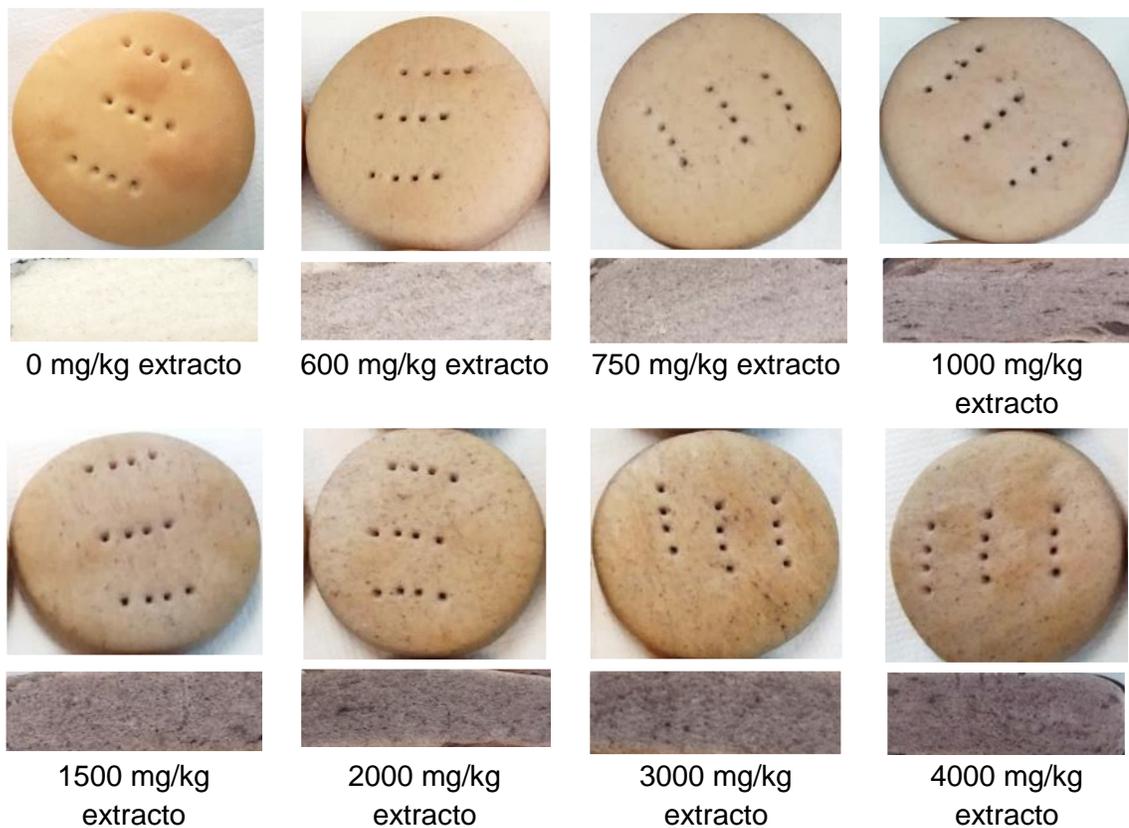
Concentración de extracto de vainas de tara (mg/kg)	Intensidad color violeta grisáceo
0 (Control)	0,0 <sup>a</sup>
600	4,4 <sup>b</sup>
750	4,6 <sup>b,c</sup>
1000	4,8 <sup>c</sup>
1500	4,8 <sup>c</sup>

Superíndices distintos indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) por comparación múltiple de Tukey. Intensidad color violeta grisáceo en escala de 0 a 10.

La adición del extracto de vainas de tara en pan tipo hallulla genera un color violeta grisáceo que no está presente en el pan control (0 mg/kg extracto), cuya intensidad aumenta en una relación dependiente de la concentración, aumentando significativamente de 0 a 600 y de 600 a 1000 mg/kg de extracto; sin embargo, de 1000 a 1500 mg/kg, su intensidad se mantiene. Esto se comprobó con la elaboración posterior, de muestras de pan tipo hallulla con hasta 4000 mg/kg de extracto, manteniendo la intensidad del color violeta grisáceo. En la Figura 10, se presentan fotografías de pan tipo hallulla (corteza y miga) con distintos niveles de extracto de vainas de tara.

El cambio de color en las matrices alimentarias debido a la adición de antioxidantes, se ha reportado en estudios anteriores. Li et al. (2012) informaron una variación significativa en el color de galletas al añadir antioxidantes de hojas de bambú, polifenoles de té, eritorbato de sodio y TBHQ, al igual que Danza et al. (2014) al añadir harina de pimiento amarillo a pan de trigo, y Zhu et al. (2016) con la adición de polifenoles de té negro en pan chino al vapor, obteniendo una corteza y miga más oscura sin afectar el resto de los parámetros, los que probablemente dependen en mayor medida de la calidad de las materias primas y las condiciones experimentales. Resultados similares fueron informados por Culetu et al. (2016), polifenoles de té en pan produjeron

muestras significativamente más oscuras en la corteza y miga en función de la concentración añadida, lo que fue atribuido a la oxidación del fenol causada por las altas temperaturas usadas durante la fabricación del pan, además de una mayor intensidad de color rojo, atribuido a la coloración de los polifenoles presentes. De igual forma, Lim et al. (2011) reportaron un cambio significativo en la coloración de la miga de pan de trigo al adicionar cúrcuma en polvo, siendo más oscura, roja y amarilla, lo que fue atribuido a sus pigmentos fenólicos, sometidos a reacciones de oxidación y caramelización con la participación de azúcares, durante la cocción del pan.



**Figura 10:** Imágenes de corteza y miga de pan tipo hallulla con distintos niveles de extracto de vainas de tara.

### 7.5.2 Calidad sensorial.

En la Tabla 22 se presentan los resultados de la calidad sensorial de pan tipo hallulla, adicionado con distintos niveles de extracto de vainas de tara, mediante evaluación con panel entrenado.

**Tabla 22:** Resultados de ANOVA de 3 vías del test de calidad de pan tipo hallulla con distinta concentración de extracto de tara.

Concentración extracto (mg/kg)	Atributos evaluados en escala de 9 puntos					Grado de Calidad
	Color	Apariencia/ Forma	Aroma	Sabor	Textura	
0 (Control)	8,4*	8,7	8,6	8,4*	8,5	1
600	8,3*	8,6	8,4	8,5	8,4	1
750	8,4	8,9	8,6	8,3*	8,5	1
1000	8,2*	8,7	8,5	8,4	8,4	1
1500	8,4*	8,8	8,7	8,4*	8,5	1
P-Muestras	0,3501	0,0976	0,0728	0,8274	0,7727	
P-Jueces	0,0745	0,1535	0,2863	0,0676	0,0636	
P-Sesiones	0,8253	0,7127	0,8843	0,9390	0,7214	

\*Atributos limitantes en el grado de calidad de las muestras.

La adición de extracto de tara no afecta la calidad sensorial del pan tipo hallulla en los niveles evaluados, ya que no existieron diferencias significativas entre muestras ( $p > 0,05$ ) en ninguno de sus atributos, con puntuaciones entre 8 y 9 en la escala de 9 puntos, es decir, las muestras son de “muy buena” calidad, con las características típicas del pan tipo hallulla y por ende, perteneciendo todas ellas a la clasificación grado 1 de calidad. Estos resultados, al igual que en la evaluación del perfil sensorial, se consideran válidos al no existir diferencias significativas entre jueces ni entre sesiones ( $p > 0,05$ ), lo que además sugiere un adecuado entrenamiento del panel.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos de la evaluación del perfil sensorial, el que no fue afectado por la adición del extracto, excepto por la coloración violeta grisácea. Sin embargo, esto no afectó negativamente la

calidad del color del pan ya que fue incluido en Tabla de valoración de calidad Karlsruhe (Anexo 11), como una característica típica que podía o no estar presente, debido a que no es un indicador deterioro sino que es una característica particular que incluso podría implicar una funcionalidad del pan, según apreciaciones de los mismos jueces durante su entrenamiento.

Por lo tanto, el extracto de vainas de tara no sólo podría mitigar eficazmente la formación de acrilamida y furano, sino también, mantener la calidad y la mayoría de los atributos sensoriales del pan tipo hallulla. Resultados similares se han obtenido en estudios previos, se ha reportado una reducción significativa de acrilamida en galletas por adición de antioxidantes de hojas de bambú y vitamina E, sin provocar diferencias significativas en color, textura y sabor ( $p>0,05$ ), según lo informado por Li et al. (2012), de igual forma antioxidantes de hojas de bambú no afectaron significativamente ( $p>0,05$ ) la frescura y sabor de bastones y chips de papas fritas, disminuyendo significativamente su contenido de acrilamida, según lo reportado Zhang et al. (2007). Sin embargo, en la mayoría de los estudios anteriores, la mitigación de acrilamida y furano ha afectado negativamente las características organolépticas de la matriz alimentaria, por la estrecha relación entre su formación y el desarrollo de las propiedades sensoriales deseadas en alimentos procesados (Anese & Suman, 2013; Li et al., 2012).

## 8. CONCLUSIONES

- Se caracterizaron químicamente vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) amarillas y rojas, y se seleccionaron estas últimas para la obtención de un extracto de polifenoles, por su menor contenido de grasas totales y fructosa, además de estar presentes en una mayor proporción en la materia prima.
- Se seleccionó el extracto obtenido en relación materia prima – solvente 1:60 (p/v), ya que posee mayor contenido de polifenoles totales (EAT) que los obtenidos a 1:10 y 1:30 (p/v), y secado a 60 °C por medio de vacío, puesto que permite un secado más rápido, sin afectar significativamente su capacidad antioxidante, respecto a los obtenidos a 40 °C y mediante liofilización.
- Se caracterizó el extracto de vainas de tara, cuyo contenido de polifenoles totales fue de 617,84 mg EAT/g (b.h.) por el método Folin Ciocalteu, y capacidad antioxidante EC<sub>50</sub> de 1,72 µg extracto/mL, por el método DPPH.
- Se determinó el contenido de acrilamida y furano en pan tipo hallulla, de 82,62 y 1,94 µg/kg, respectivamente.
- Se determinó una disminución del contenido de acrilamida dependiente de la concentración de extracto añadido (0 a 1500 mg/kg) al pan tipo hallulla, logrando >97,12% de reducción con 1500 mg/kg de extracto de vainas de tara.
- Se determinó una reducción significativa de hasta 44,66% de furano en pan tipo hallulla con la adición de hasta 3000 mg/kg de extracto de vainas de tara; sin embargo, esta no varía significativamente con la concentración añadida.
- Se reclutó y entrenó un panel sensorial de 14 jueces, durante 6 sesiones, respecto a los descriptores más importantes del perfil sensorial del pan tipo hallulla y sus atributos de calidad, incluyendo las características dadas por la adición del extracto de vainas de tara.

- Se validó el rendimiento del panel sensorial bajo las directrices de la Norma ISO 11132:2012 para los descriptores más importantes del perfil sensorial de pan tipo hallulla, previa eliminación de 3 jueces por menor desempeño.
- Se determinó, mediante un panel de 11 jueces, la calidad sensorial del pan tipo hallulla con adición de hasta 1500 mg/kg de extracto de vainas de tara, la que no fue afectada significativamente ( $p > 0,05$ ), al igual que su perfil sensorial, excepto por la generación de un color violeta grisáceo dependiente de la concentración de extracto añadido.
- Por lo tanto, el extracto de vainas de tara no sólo podría mitigar eficazmente la formación de acrilamida y furano, sino también, mantener inalterada la calidad del pan tipo hallulla y la mayoría de sus atributos sensoriales.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Açar, Ö.Ç. & Gökmen, V. (2009). Investigation of acrylamide formation on bakery products using a crust-like model. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 1521-1525.

Aguilar-Gálvez, A., Noratto, G., Chambi, F., Debaste, F. & Campos, D. (2014). Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chemistry*, 156, 301-304.

Anese, M. & Suman, M. (2013). Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Food Research International*, 51, 257–264.

Aouf, C., Benyahya, S., Esnouf, A., Caillol, S., Boutevin, B., & Fulcrand, H. (2014). Tara tannins as phenolic precursors of thermosetting epoxy resins. *European Polymer Journal*, 55, 186-198.

Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M. & Monzani, A. (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 166-172.

Avilés, R., Carrión, J., Huamán, J., Bravo, M., Rivera, D., Rojas, N. & Santiago, J. (2010). Actividad antioxidante, polifenoles totales y contenido de taninos de extractos de tara, *Caesalpinia spinosa*. *Revista Peruana Química e Ingeniería Química*, 13(2), 05-11. [Texto en Español].

Ayaz, F.A., Torun, H., Ayaz, S., Correia, P.J., Alaiz, M., Sanz, C., Grúz, J. & Strnad, M. (2007). Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30, 1040-1055.

Benzie, I. & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power; the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70 – 76.

Brand, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25 – 30.

Bravo, N. Estudio de la extracción de taninos a partir de la tara (*Caesalpinia Spinosa* (Molina) Kuntze) aplicando los métodos Taguchi y superficie de respuesta. (Tesis postgrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. [Texto en Español].

Chambi, F., Chirinos, R., Pedreschi, R., Betalleluz-Pallardel, I., Debaste, F. & Campos, D. (2013). Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*, 47, 168-175.

Cheng, K.W., Zeng, X., Tang, Y.S., Wu, J.J., Liu, Z., Sze, K.H., Chu, I.K., Chen, F. & Wang, M. (2009). Inhibitory mechanism of naringenin against carcinogenic acrylamide formation and nonenzymatic browning in Maillard model reactions. *Chemical Research in Toxicology*, 22(8), 1483-1489.

Chirinos, R., Campos, D., Costa, N., Arbizu, C., Pedreschi, R. & Larondelle, Y. (2008). Phenolic profiles of Andean mashua (*Tropaeolum tuberosum*) tubers: identification and evaluation of their antioxidant capacity contribution. *Food Chemistry*, 1285-1298.

Ciesarova, Z.; Kiss, E. & Boegl, P. (2006). Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 141-146.

Constantinou, C., & Koutsidis, G. (2016). Investigations on the effect of antioxidant type and concentration and model system matrix on acrylamide formation in model Maillard reaction systems. *Food Chemistry*, 197, 769-775.

Crews, C. (2009). Consumer exposure to furan from heat-processed food and kitchen air. *EFSA Journal*, 6(9), 1-65.

Crews, C., & Castle, L. (2007). Review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods. *Food Science & Technology*, 18, 365-372.

Culetu, A., Fernández-Gómez, B., Ullate, M., Del Castillo, M.D., & Andlauer, W. (2016). Effect of theanine and polyphenols enriched fractions from decaffeinated tea dust on the formation of Maillard reaction products and sensory attributes of breads. *Food Chemistry*, 197, 14-23.

Danza, A., Mastromatteo, M., Cozzolino, F., Lecce, L., Lampignano, V., Laverse, J., & Del Nobile, M.A. (2014). Processing and characterization of durum wheat bread enriched with antioxidant from yellow pepper flour. *LWT – Food Science and Technology*, 59, 479-485.

De la Cruz, H., Vilcapoma, G. & Zevallos, P. (2007). Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 284-294.

De la Cruz, P. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la tara (*Caesalpinia spinosa* *Caesalpinia tinctoria*). *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG*, 7(14), 64-73. [Texto en Español].

De la Cruz, P. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la tara (*Caesalpinia spinosa* *Caesalpinia tinctoria*). *Revista del Instituto de Investigación de FIGMMG*, 7(14), 64-73. [Texto en Español].

Díaz, P. (2010). Forestación piloto con la tara en la microcuenca de San Juan (Alto Jequetepeque) Cajamarca. (Tesis pregrado). Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú. [Texto en Español].

Doroteo, V.H, Terry, C., Díaz, C., Vaisberg, A. & Rojas, R. (2012). Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticlagenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(4), 254-263. [Texto en Español].

Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M. & Weigend, M. (2009). Factsheet: Datos botánicos de Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Documento D38/08-11. Primera edición. Lima- Perú. [Texto en Español].

Dueñas, M., Estrella, I. & Hernández, T. (2004). Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *European Food Research Technology*, 219, 116-123.

Dueñas, M., Hernández, T. & Estrella, I. (2002). Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *European Food Research Technology*, 215, 478-483.

EFSA. (2011). Update on furan levels in food from monitoring years 2004-2010 and exposure assessment. *EFSA Journal*, 9(9), 2347.

EFSA. (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal*, 10(10), 2938-2976.

Fernández, A. (2008). Estudio de las propiedades antioxidante de un extracto supercrítico de la vaina de la tara (*Caesalpinia spinosa*) para su uso potencial como aditivo alimentario. (Tesis pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile. [Texto en Español].

Fundación Chile. (2010). Competitividad Panadera. [en línea] <[http://fechipan.cl/pdf/estudio\\_Diagnostico\\_Competitividad.pdf](http://fechipan.cl/pdf/estudio_Diagnostico_Competitividad.pdf)> [Consulta septiembre 2015]. [Texto en Español].

Fundación Chile. (2013). Chile saludable, volumen 2, Oportunidades y desafíos de innovación. [en línea] <<http://www.revolucionsaludable.cl/wp-content/uploads/2014/10/ESTUDIO-CHILE-SALUDABLE-VOLUMEN-II1.pdf>> [Consulta septiembre 2015]. [Texto en Español].

Garro Gálvez, J.M., Riedl, B. & Conner, A.H. (1997). Analytical Studies on Tara Tannins. *Holzforschung*, 51(3), 235-243.

Gündüz, C.P.B., & Cengiz, M.F. (2014). Acrylamide Contents of Commonly Consumed Bread Types in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 18(4), 833-841.

Halford, N., Curtis, T., Muttucumaru, N., Postles, J., Elmore, J., & Mottram, D. (2012). The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2841-2851.

Hedegaard, R. V., Granby, K., Frandsen, H., Thygesen, J., & Skibsted, L. H. (2008). Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *European Food Research and Technology*, 227, 519-525.

ISO 11132:2012 (ISO). Sensory analysis – Methodology Guidelines for monitoring the performance of a quantitative sensory panel.

ISO 8586:2012(E). Sensory analysis – General Guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors.

ISP (1998). Manual de Métodos de Análisis Físico – Químico de Alimentos, Aguas y Suelos. Santiago, Chile.

Jin, C., Wu, X. & Zhang, Y. (2013). Relationship between antioxidants and acrylamide formation: a review. *Food Research International*, 51, 611-620.

Kahkeshani, N., Saeidnia, S. & Abdollahi, M. (2015). Role of antioxidants and phytochemicals on acrylamide mitigation from food and reducing its toxicity. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3169-3186.

Kim, J.S., Her, J.Y. & Lee, K.G. (2015). Formation and reduction of carcinogenic furan in various model systems containing food additives. *Food Chemistry*, 189, 108-113.

Kim, T. K., Y. K. Lee, et al. (2009). "Furan in commercially processed foods: four-year field monitoring and risk assessment study in Korea." *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 72(21-22): 1304-1310.

Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., Kukurová, K. & Ciesarová, Z. (2010). Impact of oregano and virgin olive oil phenolic compounds on acrylamide content in a model system and fresh potatoes. *Food Chemistry*, 123, 1149-1155.

Li, D., Chen, Y., Zhang, Y., Lu, B., Jin, C., Wu, X., et al. (2012). Study on mitigation of acrylamide formation in cookies by 5 antioxidants. *Journal of Food Science*, 77, 1144-1149.

Lim, H.S., Park, S.H., Ghafoor, K., Hwang, S.Y. & Park, J. (2011). Quality and antioxidant properties of bread containing turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivated in South Korea. *Food Chemistry*, 124, 1577-1582.

Liu, Y., Wang, P., Chen, F., Yuan, Y., Zhu, Y., Yan, H. & Hu, X. (2015). Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food Chemistry*, 186, 46-53.

López, A., Oré, R., Miranda, C., Trabucco, J., Orihuela, D., Linares, J., Villafani, Y., Ríos, S. & Siles, M. (2011). Capacidad antioxidante de poblaciones

silvestres de “tara” (*Caesalpinia spinosa*) de las localidades de Picoy y Santa Fe (Provincia de Tarma, departamento de Junín). *Scientia Agropecuaria*, 2, 25-29. [Texto en Español].

Marconi, O, Bravi, E., Perretti, G., Martini, R., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2010). Acrylamide risk in food products: The shortbread case study. *Anal. Methods*, 2, 1686–1691.

Mariotti, M., Granby, K., Rozowski, J., & Pedreschi F. (2013). Furan: a critical heat induced dietary contaminant. *Food Funct.*, 4, 1001-1015.

Mariotti, M.S., Toledo, C., Hevia, K., Gómez, J.P., Fromberg, A., Granby, K., Rosowskic, J., Castillo, O. & Pedreschi, F. (2013b). Are Chileans exposed to dietary furan?. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 30(10), 1715-1721.

Melo, M., Glorio, P. & Tarazona, G. (2013). Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 79(3), 218-128.

Melo, M., Glorio, P. & Tarazona, G. (2013). Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(3), 218-128. [Texto en Español].

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

Mustafa, A. (2008). *Acrylamide in Bread: Precursors, Formation and Reduction*. (Doctoral thesis), Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

NCh 841 of 78. Alimentos – Determinación de humedad. [Texto en Español].

Nuñez, W. & Quispe, R. (2015). Evaluación antioxidante y antienzimática in vitro y antiinflamatoria in vivo del extracto hidroalcohólico de la *Caesalpinia spinosa*

“tara”. (Tesis pregrado). Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú. [Texto en Español].

ODEPA. (2014). Evolución del Consumo aparente de los principales Alimentos en Chile: 2003-2013. [en línea] <[http://www.odepa.cl/wp-content/files\\_mf/1410803066EVOLUCI%C3%93NDELCONSUMOAPARENTEALIMENTOSENCHILE20032013.pdf](http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1410803066EVOLUCI%C3%93NDELCONSUMOAPARENTEALIMENTOSENCHILE20032013.pdf)> [Consulta septiembre 2015]. [Texto en Español].

Oral, R.A., Dogan, M. & Sarioglu, K. (2014). Effects of certain polyphenols and extracts on furans and acrylamide formation in model system, and total furans during storage. *Food Chemistry*, 142, 423–429.

Ou, S., Shi, J., Huang, C., Zhang, G., Teng, J., Jiang, Y., & Yang, B. (2010). Effect of antioxidants on elimination and formation of acrylamide in model reaction systems. *Journal of Hazardous Materials*, 182, 863-868.

Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B. & Galensa, R. (2004). Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MS<sup>n</sup>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3784-3791.

Pedreschi, F., Mariotti, M. S. & Granby, K. (2014). Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 9-20.

Pérez, M.J., Cuello, A.M., Zampini, I., Ordoñez, R., Alberto, M.R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G. & Isla, M.I. (2014). Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. *Food Research International*, 64, 762-771.

Plaza, C. (2015). Reducción del contenido de Acrilamida en pan tipo Hallulla mediante la incorporación de Asparaginasa. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile. [Texto en Español].

Real Academia Española, Asociación de Academias de la Lengua Española. Diccionario de la lengua española, 23ª ed. Madrid, Espasa, 2014.

RSA. (Actualizado 2013). Reglamento Sanitario de los Alimentos. [en línea] <[http://web.minsal.cl/sites/default/files/2013RSADECRETO\\_977\\_96\\_actualizado2013.pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/2013RSADECRETO_977_96_actualizado2013.pdf)> [Consulta septiembre 2015]. [Texto en Español].

Schamberger, G.P. & Labuza, T.P. (2007). Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk. *LWT – Food Science and Technology*, 40(8), 1410-1417.

Silva, P. (2012). Optimización del proceso de extracción supercrítica de los polifenoles de la vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*). (Tesis pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile. [Texto en Español].

Simirgiotis, M.J, Theoduloz, C., Caligari, P.D.S., Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. *Food Chemistry*, 113, 377-385.

Singleton, V. & Rossi, J. (1965). Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Surdyk, N., Rosén, J., Andersson, R., & Åman, P. (2004). Effects of Asparagine, Fructose, and Baking Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2047-2051.

Totlani, V. M., & Peterson, D. G. (2007). Influence of Epicatechin reactions on the mechanisms of Maillard product formation in low moisture model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 414-420.

Totlani, V.M., & Peterson, D.G. (2005). Reactivity of epicatechin in aqueous glucoseglycine Maillard model system: Quenching of C2, C3 and C4 sugar fragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4130-4135.

USDA. (2013). Chile's Food Processing Sector. Gain report number CI1318.

Varela, C., Agosin, E., Baez, M., Klapa, M. & Stephanopoulos, G. (2003). Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 547-555.

Villacorta, G. & Pérez, A. 2011. Actividad Antioxidante "in Vitro" de las hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn. mediante el método de secuestro de radicales libres 1,1-difenil-2- picrilhidrazilo (DPPH). (Tesis pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú. [Texto en Español].

Villanueva, J.A., Condezo-Hoyos, L.A. & Ramírez, E. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh), *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(Supl. 1), 151-160.

Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., & Shi, J. (2014). Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 1-12.

Zhang, Y. & Jin, C. (2016). Chapter 17 – Relationship between Antioxidants and Acrylamide Formation. V. Gökmen (Ed.), *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects* (pp. 325-353). Academic Press.

Zhang, Y. & Zhang, Y. (2007). Study on reduction of acrylamide in fried bread sticks by addition of antioxidant of bamboo leaves and extract of green tea. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(Suppl.1), 131-136.

Zhang, Y., Chen, J., Zhang, X.L., Wu, X.Q. & Zhang Y. (2007). Addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) effectively reduces acrylamide formation in potato crisps and French fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 523-528

Zheng, L.W., Chung, H. & Kim, H.S. (2015). Effects of dicarbonyl trapping agents, antioxidants, and reducing agents on the formation of furan and other volatile components in canned-coffee model systems. *Food Research International*, 75, 328-336.

Zhu, F., Cai, Y. Z., Ke, J., & Corke, H. (2009). Evaluation of the effect of plant extracts and phenolic compounds on reduction of acrylamide in an asparagine/glucose model system by RP-HPLC-DAD. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1674-1681.

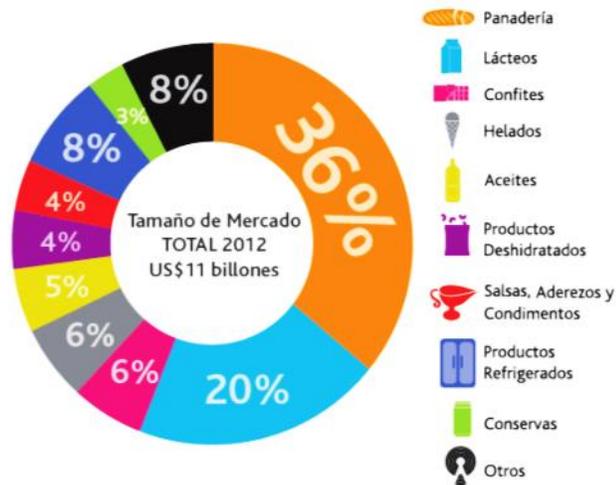
Zhu, F., Cai, Y. Z., Ke, J., & Corke, H. (2011). Dietary plant materials reduce acrylamide formation in cookie and starch-based model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2477-2483.

Zhu, F., Sakulnak, R. & Wang, S. (2016). Effect of black tea on antioxidant, textural, and sensory properties of Chinese steamed bread. *Food Chemistry*, 194, 1217-1223.

Zoller, O., Sager, F. & Reinhard, H. (2007). Furan in food: Headspace method and product survey. *Food Additives and Contaminants*, 24, 91-107.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1: Mercado de alimentos procesados en Chile (Fundación Chile, 2013)



### Anexo 2: Niveles de acrilamida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) monitoreados desde 2007 a 2010 y valores indicativos (aplicables desde 2011) para la ocurrencia de acrilamida en diferentes alimentos (EFSA, 2012).

Alimento	Valor indicativo	Niveles de acrilamida			
		2007	2008	2009	2010
Galletas	500	237	168	172	178
Pan de jengibre		387	355	359	415
Galletas infantiles	250	174	94	88	86
Obleas	500	230	256	206	389
Pan crujiente		232	228	208	249
Pan suave	150	75	53	46	30
Cereales para el desayuno	400	149	155	139	138
Alimentos para bebés a base de cereales	100	69	31	41	31
Café instantáneo	900	229	298	551	1123
Café tostado	450	256	197	235	256
Substituto de café		890	1033	1594	1350
Chips de papas fritas	1000	551	580	639	675
Bastones de papas fritas	600	356	277	342	338

**Anexo 3: Exposición dietaria estimada de acrilamida ( $\mu\text{g kg}_{\text{pc}}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) en diferentes grupos de población del mundo (Pedreschi et al., 2014).**

Grupo de población	Niños	Adultos
Bélgica	–	0,36 – 0,39
Brasil	0,04 (11 – 17 años)	–
Dinamarca	0,39 (4 – 14 años)	0,21
Finlandia	1,01 (3 años)	0,41 (25 – 44 años)
Francia	0,69 (3 – 17 años)	0,43
Alemania	–	0,31 – 0,34
Irlanda	–	0,59
Noruega	–	0,48
España	0,534 (11 – 14 años)	0,55 – 0,57
Reino unido	–	0,61
Estados Unidos	–	0,40

**Anexo 4: Comparación de niveles de furano ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en alimentos de diferentes zonas geográficas (Mariotti et al., 2013a).**

Muestra	EFSA 2004	EFSA 2011	Corea	Taiwán
Café instantáneo (líquido)	0.0-9.0	0.0-7.0	3.5	58.0
Café tostado molido (líquido)	27.0-30.0	39.0-42.0	48.5	70.3
Alimentos de fruta para bebés	2.5-5.0	2.5-5.3	–	14.1
Alimentos de vegetales para bebés	39.0-40.0	48.0-49.0	22.5	58.5
Alimentos de carne y vegetales para bebés	39.0-40.0	40	–	124.1
Fruta enlatada	2.0-5.0	2.0-6.4	1.3-4.0	3.4-15.2
Carne enlatada	17.0-19.0	13.0-17.0	9.2-63.3	76.2
Pescado enlatado	17.0-18.0	17	13.65-60.62	4.2-75.2
Vegetales enlatados	7.9-9.0	6.9-9.6	2.9-44.1	33.9-99.5
Jugo de fruta	2.5-5.0	2.2-4.6	1.7-5.7	2.8-46.7
Cereales para el desayuno	15.0-18.0	15.0-18.0	–	12.7-65.3
Pan	–	–	1.9	–
Galletas	–	–	7.6	–
Aperitivos y papas fritas	10	9.6-10	6.8	–
Cerveza	3.3-5.2	3.3-5.2	2.3-4.8	3.0
sopas	23.0-24.0	23.0-24.0	17.6-18.5	–
Salsa de soya	23.0-24.0	27	16.3	712
Productos lácteos	5.0-6.0	5.0-5.6	3.8	2.4-28.7

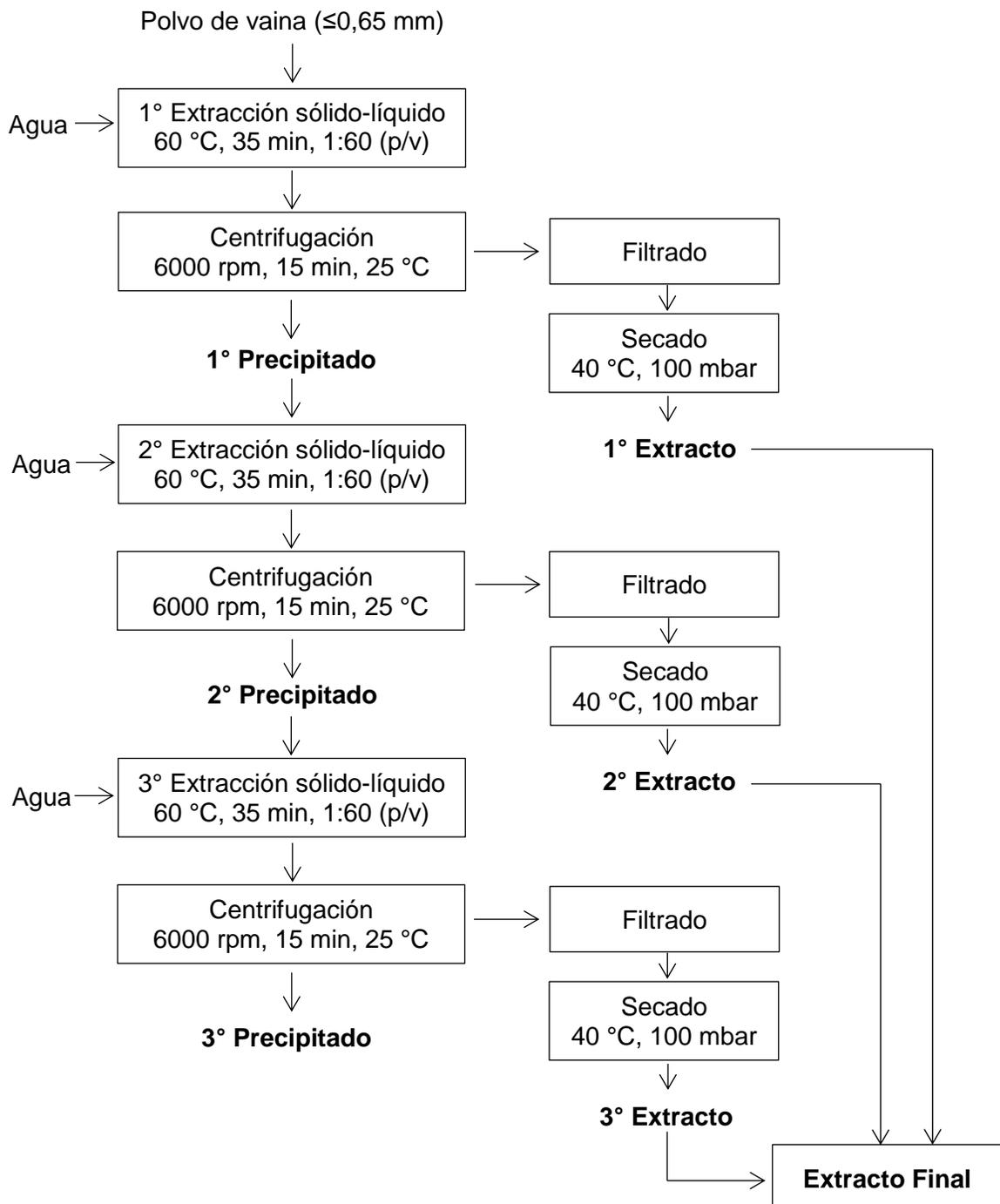
<sup>a</sup> ng ml<sup>-1</sup> para muestras líquidas.

**Anexo 5: Exposición dietaria de furano ( $\mu\text{g kg}_{\text{pc}}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) por sector de edad en diferentes zonas geográficas del mundo (Mariotti et al., 2013a).**

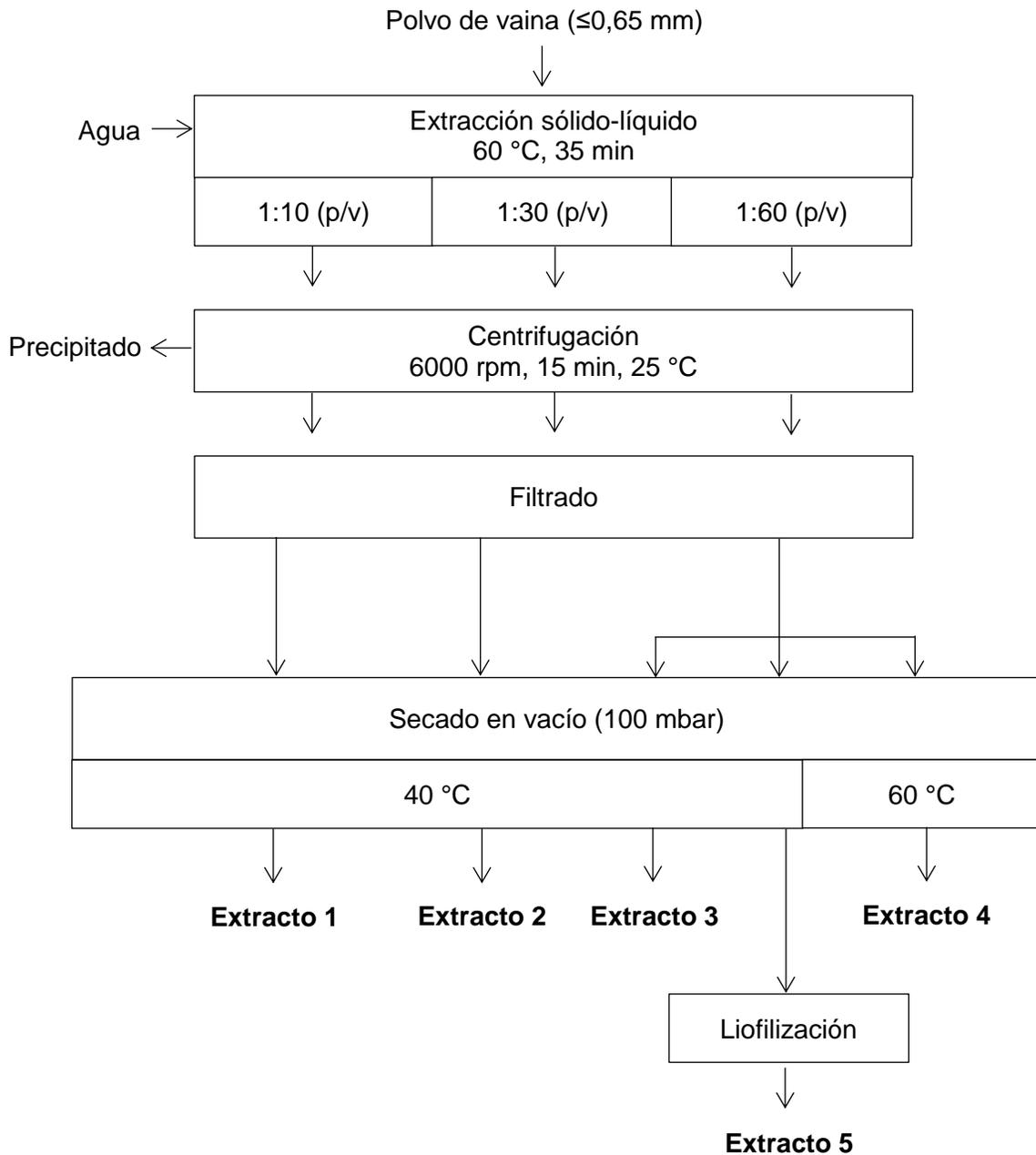
Región geográfica	País	Infantes	Adultos
Europa	Alemania	0.500 (6 meses)	–
	Finlandia	0.100-2.100	–
	España	0.140 (6 meses)	0.380 (Mujeres) <sup>b</sup> 0.250 (Hombres) <sup>b</sup>
	UE (2011)	0.270-1.010 (3-12 meses)	0.290-1.170
América del Norte	USA (2004)	0.410 (0-12 meses)	0.250-0.230
	Canadá	1.120 (1-4 años)	0.37
América del Sur	Brasil	0.460 (0-12 meses)	–
Asia	Corea	0.017 (6 meses)	0.011
	Taiwán	0.470 (6 meses)	0.177 (Mujeres) <sup>b</sup> 0.299 (Hombres) <sup>b</sup>

<sup>b</sup>Valores de exposición corresponden solamente al consumo de café.

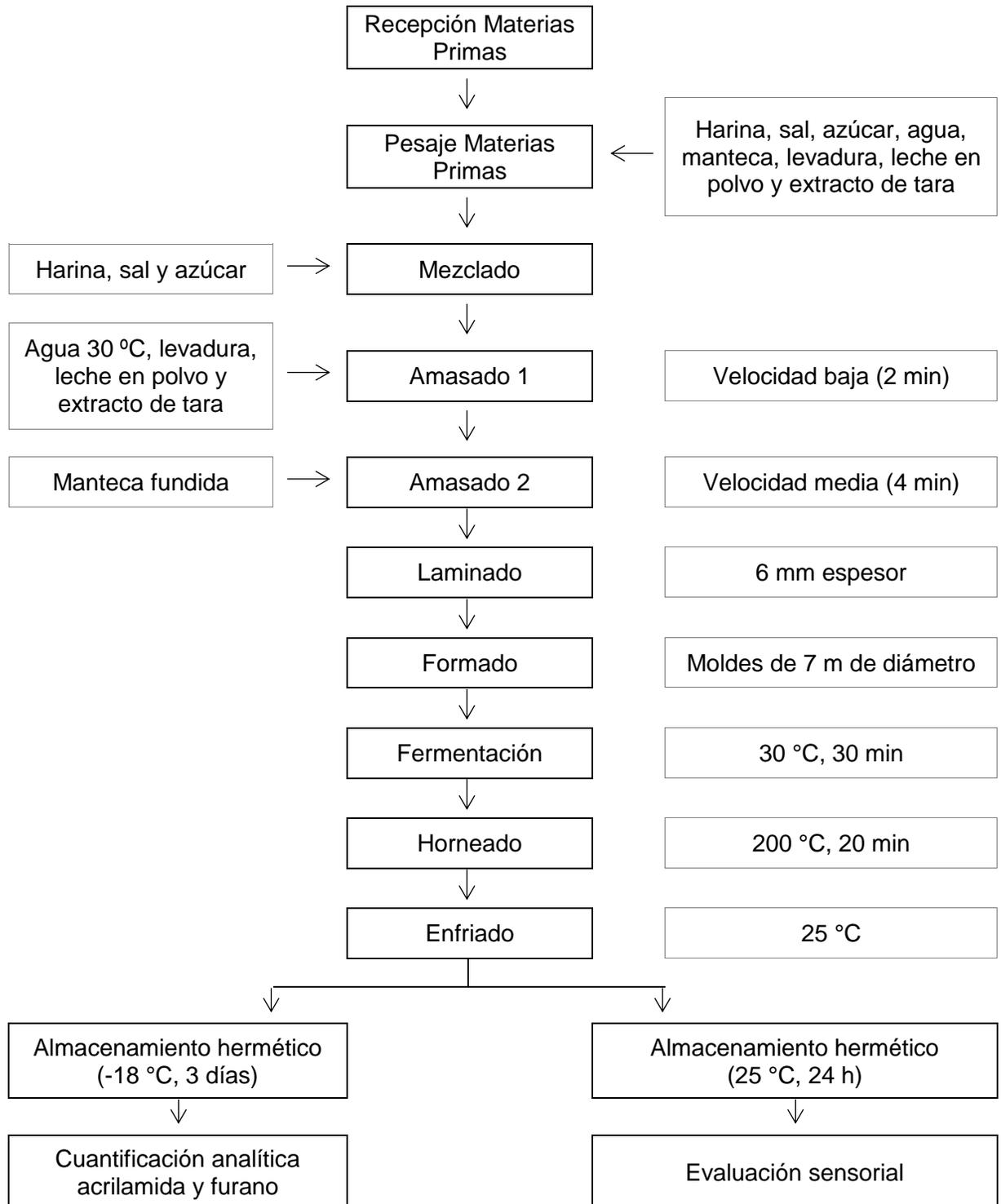
**Anexo 6: Método extracción triple de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) para caracterización química de la materia prima. Modificado de Bravo (2010).**



**Anexo 7: Métodos de obtención de extractos de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*). Modificado de Bravo (2010).**



**Anexo 8: Proceso elaboración de pan tipo hallulla. Modificado de Plaza (2015).**



**Anexo 9: Ficha de descripción de productos para sesión 1 entrenamiento de panel sensorial. Modificado de Plaza (2015).**

**FICHA DESCRIPCIÓN PRODUCTOS**

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Set: \_\_\_\_\_

Por favor describa lo más detalladamente que pueda cada una de las características del alimento. NO USE PALABRAS como “agradable”, “desagradable”, “bueno” o “malo”.

ATRIBUTO	PRODUCTO	DESCRIPCIÓN
Apariencia	A	
	B	
	C	
	D	
Aroma	A	
	B	
	C	
	D	
Sabor	A	
	B	
	C	
	D	
Textura	A	
	B	
	C	
	D	

**Anexo 10: Ficha de perfil descriptivo específico para pan tipo hallulla.  
Modificado de Plaza (2015).**

**ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE PAN TIPO HALLULLA**

Nombre:..... Muestras:..... Fecha:.....

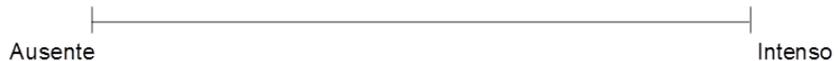
Evalúe las muestras que se presentan en todos los atributos descritos. Apóyese en la **definición** que aparece en esta ficha, y en **las referencias** que aparecen en la hoja de instrucciones.

**APARIENCIA**

**Color corteza:** Grado de intensidad del color de la corteza

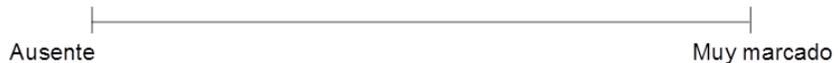


**Color violeta/grisáceo:** Color típico de un pan adicionado con extracto de tara.



**AROMA:** Acerque la muestra a la nariz para percibir su aroma

**Fermentado:** Aroma característico de un pan con un tiempo de fermentación larga en el proceso tecnológico.



**Tostado/Quemado:** Aroma característico que se produce durante el horneado.



**TEXTURA**

**Al tacto:** Coloque el pan entre los dedos y evalúe:

**Dureza:** Resistencia del pan a la presión ejercida con los dedos



**Elasticidad miga:** Capacidad del pan para volver a la posición inicial después de la compresión



**Sensación en boca:** Coloque el pan entre los dientes incisivos, masque completamente, y evalúe:

**Dureza:** Fuerza requerida para morder a través de la muestra.



**SABOR:** Evalúe la intensidad de los componentes del sabor durante la etapa de masticación

**Fermentación/Levadura:** Característico de un pan con un tiempo de fermentación larga en el proceso tecnológico.



**Tostado/Quemado:** Sabor que se produce durante el horneado.

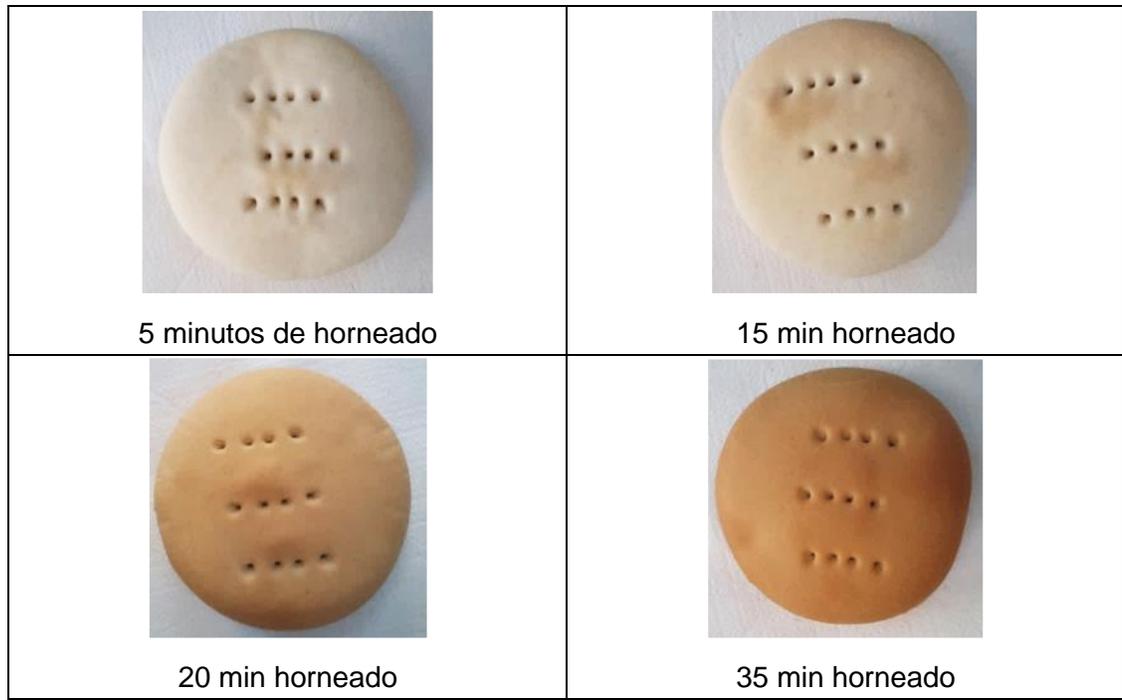


## Anexo 11: Tabla de valoración de calidad para pan tipo hallulla con escala Karlsruhe. Modificado de Plaza (2015).

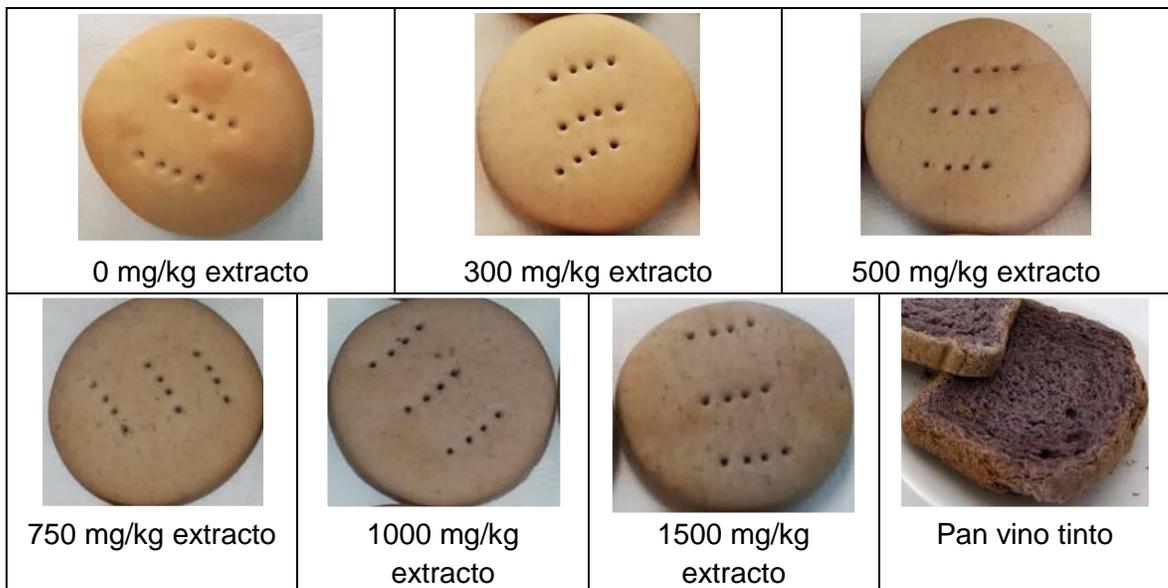
**Tabla de valoración de calidad pan tipo hallulla con escala de Karlsruhe**

Características	Calidad Grado 1: Características Típicas					Calidad Grado 2: Deterioro Tolerable					Calidad Grado 3: Deterioro Indeseable		
	Excelente	Muy Buena	Buena	Satisfactoria	Regular	Suficiente	Defectuosa	Mala	Muy Mala				
<b>Color</b>	9 Dorado, natural, típico, tostado, excepcional, uniforme, homogéneo. Violeta/grisáceo con puntos característicos	8 Natural, típico, uniforme, levemente tostada, levemente pálida.	7 Natural, típico, algo pálido u oscuro, aún uniforme y homogéneo.	6 Ligeramente alterado por ej. Algo claro o algo oscuro, algo desuniforme, poco homogéneo.	5 Alterado, algo descompensado, muy claro, muy oscuro. Desuniforme no homogéneo.	4 Muy descompensado. Presencia de manchas.	3 Demasiado demasiado pálida, o con apariencia cruda o quemado. Color atípico.	2 Color totalmente atípico.	1 Inaceptable, totalmente alterada, atípica.				
<b>Apariencia/ Forma</b>	Completamente bien conservada, lisa, plana, redonda, bien cocida, sin arrugas.	Muy bien conservada, algunas unidades ligeramente modificada, aún redondas, sin arrugas y lisa.	Corneza aun conservada, sin grietas, aún redonda, con algo de arrugas o abultado o englobado.	Poco lisa, ligeramente modificada, algunas grietas suaves en la superficie. Forma algo modificada, ovalada no redonda, con arrugas o abultado o englobado.	Presencia de grietas visibles, forma modificada, aplastada, asimétrica, muy abultado o arrugada.	Hundida, agrietada, forma muy modificada. Muchas grietas.	Intensamente hundida, y/o asimétrica, con aberturas.	Muy alterada, apretada, rota, con deformaciones.	Completamente alterada.				
<b>Aroma</b>	Muy característico a pan, muy típico, natural, intenso, equilibrado. Aromático. Muy fresco.	Característico, típico y natural, algo leve de olor a levadura.	Característico, típico y natural. Leve olor a levadura, poco intenso.	Algo plano, no redondeado, no característico, algo intenso a levadura, leve a materia grasa.	Muy plano, alterado, intenso a levadura, a materia grasa. Algo crudo. Algo intenso a tostado.	Alterado, muy intenso a levadura, intenso a materia grasa. Muy tostado, aún aceptable.	Claramente alterado, atípico, algo ácido.	Alterado, rancio, olor a masa cruda.	Totamente deteriorado.				
<b>Sabor</b>	Específico, muy característico y natural. Muy equilibrado. Muy fresco. Típico.	Característico, típico y natural, con sabor tostado. Fresco. Típico.	Característico, aún equilibrado. Algo suave. Algo salado o leve falta de sal. Aún típico y natural con menos sabor a tostado.	Ligeramente plano, no redondeado. Aún aceptable. No tan típico. Algo salado, con leve sabor a tostado, leve sabor a materia grasa o levadura.	Plano, no redondeado, aún aceptable. Dulce o salado, o sabor a materia grasa.	No típico, insípido, amargo, claramente dañado con intenso sabor a materia grasa. Algo ácido, aún aceptable.	Alterado, completamente atípico. Amargo, mohoso.	Alterado, rancio, muy amargo.	Extraño, fermentado. Claramente deteriorado.				
<b>Textura</b>	Corneza de dureza y grosor característico. Miga suave y blanda. Característica.	Buena, típica, corneza ni blanda ni dura, delgada. Miga suave y blanda, típica característica.	Normal, típica, corneza levemente blanda o dura y algo gruesa. Miga menos suave y menos blanda o levemente áspera y/o seca, algo elástica.	Ligeramente alterada. Corneza algo blanda y delgada o algo dura y gruesa. Miga algo áspera.	Desuniforme, corneza dura y muy gruesa o blanda y áspera y/o elástica, textura seca.	Muy desuniforme, corneza dura y demasiado gruesa o blanda y demasiado delgada. Miga muy áspera, seca, muy elástica.	Claramente alterada, corneza muy dura y excesivamente gruesa. Miga excesivamente áspera o muy seca.	Modificada excesivamente dura, muy elástica o muy húmeda.	Completamente alterada, inaceptable.				

**Anexo 12: Folio color corteza para entrenamiento del panel sensorial.**



**Anexo 13: Folio color violeta grisáceo para entrenamiento del panel sensorial.**



**Anexo 14: Características principales de pan tipo hallulla obtenidas de la primera sesión de entrenamiento del panel sensorial.**

Atributo	Características principales
Apariencia	Corteza dorada, leve tostada. Superficie lisa, plana. Miga color blanco crema.
Aroma	Característico, materia grasa, tostado y levadura/fermentado.
Sabor	Tostado y fermentado. Levemente ácido.
Textura	Corteza firme y blanda. Miga suave, blanda, elástica.

**Anexo 15: Nivel de discriminación de los jueces individuales del panel sensorial, mediante análisis de varianza ANOVA simple.**

Juez	Atributos claves				
	Color corteza	Color violeta grisáceo	Aroma tostado	Dureza (boca)	Sabor tostado
1	0,0000	0,0000	0,0018	0,0000	0,0006
3	0,0001	0,0000	0,0003	0,0006	0,0009
4	0,0016	0,0002	0,0035	0,0021	0,0000
6	0,0056	0,0000	0,0053	0,0247	0,0025
7	0,0180	0,0001	0,0112	0,0003	0,0057
8	0,0040	0,0000	0,0008	0,0010	0,0035
9	0,0003	0,0000	0,0139	0,0001	0,0003
10	0,0001	0,0001	0,0001	0,0003	0,0065
11	0,0076	0,0000	0,0011	0,0005	0,0043
12	0,0226	0,0000	0,0016	0,0024	0,0383
13	0,0039	0,0000	0,0290	0,0011	0,0001
2	0,0007	0,0000	0,0340	0,0056	0,1441
5	0,0000	0,0002	0,2815	0,0003	0,3466
14	0,0048	0,0000	0,0003	0,0001	0,0000

Resultados de jueces 2, 5 y 14, eliminados del análisis del resto del panel por menor desempeño. En rojo: Diferencias significativas entre muestras ( $p \leq 0,05$ ), indican buena capacidad de discriminación de atributos claves.

**Anexo 16: Desviaciones estándar de las parcialidades individuales por muestra (SD) y del error (Se), en evaluación del desempeño de cada juez.**

Juez	Atributos claves									
	Color corteza		Color violeta grisáceo		Aroma tostado		Dureza (boca)		Sabor tostado	
	SD	Se	SD	Se	SD	Se	SD	Se	SD	Se
1	0,27	0,34	0,08	0,36	0,17	0,46	0,48	0,21	0,08	0,34
3	0,24	0,27	0,29	0,34	0,02	0,29	0,33	0,43	0,22	0,40
4	0,20	0,44	0,28	0,60	0,17	0,46	0,16	0,69	0,20	0,20
6	0,42	0,68	0,17	0,28	0,10	0,52	0,38	1,29	0,04	0,40
7	0,34	0,54	0,22	0,49	0,10	0,53	0,24	0,46	0,10	0,52
8	0,54	0,80	0,20	0,34	0,09	0,33	0,33	0,46	0,31	0,32
9	0,45	0,48	0,16	0,17	0,06	0,58	0,46	0,45	0,48	0,40
10	0,09	0,28	0,27	0,55	0,40	0,32	0,18	0,47	0,20	0,41
11	0,35	0,62	0,29	0,30	0,40	0,48	0,54	0,32	0,19	0,37
12	0,45	0,66	0,16	0,14	0,53	0,30	0,23	0,73	0,23	0,57
13	0,40	0,25	0,57	0,20	0,45	0,41	0,89	0,26	0,15	0,25
2	0,64	0,61	0,92	0,52	0,35	0,96	0,94	1,33	0,53	1,64
5	1,33	0,25	0,64	0,66	0,91	0,28	1,95	1,02	0,85	0,38
14	0,39	0,65	0,34	0,24	1,35	0,63	0,92	0,55	1,29	0,36

\*Resultados de jueces 2, 5 y 14, eliminados del análisis del resto del panel por menor desempeño. En rojo: indicadores de mal desempeño. Se: inversamente proporcional a la repetibilidad de un juez. SD: inversamente proporcional a la consistencia de un juez.