



**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química**  
**Ingeniería en Alimentos**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Andrea Bunger T.

Departamento de Ciencia de los  
Alimentos y Tecnología Química  
Universidad de Chile

**DIRECTORES DE MEMORIA**

Andrea Bunger T.

Departamento de Ciencia de los  
Alimentos y Tecnología Química  
Universidad de Chile

Franco Pedreschi P.

Departamento de Ingeniería  
Química y Bioprocesos  
Pontificia Universidad Católica de  
Chile.

**OPTIMIZACIÓN Y ESTUDIO DEL EFECTO DE POLIFENOLES  
EXTRAIDOS DE VAINAS ROJAS DE TARA (*Caesalpinia spinosa*) Y  
CONCENTRACIÓN DE SAL EN EL CONTENIDO DE NEO-  
CONTAMINANTES, CALIDAD Y PERFIL SENSORIAL EN  
GALLETAS SALADAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**JOANS ANDRE MATUS CALDERÓN**

Santiago - Chile

Octubre 2017

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**

Dedico este espacio para agradecer a todos quienes contribuyeron a la realización de esta memoria de título y la finalización de los estudios de pregrado. En primer lugar, a toda mi familia, que si no fuera por su apoyo y dedicación todo sería más difícil. Madre y padre, Miriam y Andrés; mis hermanos Pablo y Francisca. Mis abuelas Yolanda y Amelia, mi abuelo Guillermo, tíos, primos y amigos que siempre han estado presentes con su apoyo.

A Andrea Bunger, Directora de Tesis y Profesora Patrocinante, por su guía en el proceso, aporte de conocimientos, experiencia y por su confianza y buena disposición. El trabajo en conjunto en esta tesis, como ayudante y en los entrenamientos de paneles ha contribuido significativamente a mi formación profesional. Al profesor Franco Pedreschi, por permitirme aportar en este importante proyecto y la confianza de usar sus instalaciones, por su apoyo y profesionalismo en el desarrollo de la memoria.

A Juan Pablo Gómez, por su constante colaboración en los análisis, por sus consejos y buena compañía en el desarrollo de esta tesis. A Ilse Saavedra por todo el apoyo en el inicio de esta tesis, en el desarrollo de la carrera y por su amistad, como la de todos los amigos que hice en el transcurso de la carrera, amistad que ha sido muy importante en mi formación humana. A Danica Jiménez, por todo el apoyo y amor que me ha dado en estos últimos años, volviendo todo el trabajo más fácil, por ser amiga y pareja excepcional.

Muchas gracias a todos los panelistas quienes dedicaron con muy buena voluntad parte de su tiempo para el desarrollo del trabajo con gran compromiso, dedicación y paciencia.

Finalmente, expreso mis agradecimientos a FONDECYT, quien hace posible esta memoria mediante el proyecto 1150146 titulado “Mitigation of Neo-formed Contaminants in Chilean Starchy Foods and its Effect on the Consumer Acceptance”.

# ÍNDICE

Resumen .....	i
Abstract .....	iii
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes Bibliográficos .....	2
2.1. Productos Horneados: Galletas .....	2
2.2. Reacción de Maillard (RM) .....	3
2.3. Neo-contaminantes.....	5
2.3.1. Acrilamida .....	6
2.3.2. 5-Hidroxiacetilfurfural .....	6
2.4. Mecanismos de Formación.....	7
2.4.1. Acrilamida .....	7
2.4.2. 5-Hidroxiacetilfurfural .....	9
2.5. Métodos de Mitigación de Neo-contaminantes (NCs).....	11
2.5.1. Presencia de Sal .....	11
2.5.2. Extractos Antioxidantes.....	15
2.6. Tara (Caesalpinia spinosa).....	16
3. Objetivos .....	18
3.1. Objetivo General.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4. Hipótesis.....	18
5. Metodología.....	19
5.1. Obtención del Extracto Fenólico .....	19
5.2. Caracterización Química del Extracto.....	20

5.2.1. DPPH .....	20
5.2.2. Polifenoles Totales .....	20
5.3. Elaboración de Galletas Saladas Horneadas .....	21
5.3.1. Diagrama de Bloques.....	22
5.3.2. Descripción del Diagrama de Bloques .....	23
5.4. Medición del Contenido de Neo-contaminantes .....	24
5.4.1. Acrilamida .....	24
5.4.2. 5-Hidroxiacetilfurfural .....	25
5.5. Evaluación Sensorial .....	26
5.5.1. Selección de Jueces .....	26
5.5.2. Entrenamiento .....	27
5.5.3. Introducción y Generación de Descriptores .....	27
5.5.4. Entrenamiento con Atributos Clave .....	28
5.5.5. Análisis Estadísticos.....	28
5.5.6. Validación.....	29
5.5.7. Evaluación de Muestras .....	30
5.6. Diseño Experimental – Método de Superficie Respuesta.....	30
5.6.1. Determinación de Límites del Diseño.....	31
5.6.2. Optimización del Diseño.....	32
6. Resultados y Discusiones .....	33
6.1. Caracterización del Extracto Antioxidante de Tara .....	33
6.2. Evaluación Sensorial .....	34
6.2.1. Generación de Descriptores.....	34
6.2.2. Entrenamiento del Panel .....	35
6.2.3. Validación.....	37

6.2.4. Perfil Descriptivo .....	39
6.2.5. Test de Calidad .....	41
6.3. Análisis del Diseño Experimental.....	42
6.4. Optimización Conjunta.....	44
6.5. Mitigación del contenido de HMF.....	47
7. Conclusiones.....	48
8. Bibliografía .....	49
9. Anexos .....	54
9.1. Anexo 1: Ficha de evaluación para perfil descriptivo.....	54
9.2. Anexo 2: Tabla y ficha de evaluación para test de calidad de Karlsruhe. ....	55
9.3. Anexo 3: Curva de decoloración de DPPH.....	57
9.4. Anexo 4: Curva de calibración para polifenoles totales. ....	57
9.5. Anexo 5: Resultados ANOVA multifactorial de tres vías para validación....	58
9.6. Anexo 6: Resultados ANOVA de una vía para validación de desempeño de jueces .....	60
9.7. Anexo 7: Resultados ANOVA multifactorial de dos vías para perfil descriptivo .....	62
9.8. Anexo 8: Resultados ANOVA multifactorial de dos vías para test de calidad .....	63
9.9. Anexo 9: Escalas de colores de referencia para evaluación sensorial. ....	64
9.10. Anexo 10: Datos de factores y respuestas para diseño experimental. ....	65
9.11. Anexo 11: Resumen de análisis de diseño experimental MSR.....	65
9.12. Anexo 12: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para HMF .....	66
9.13. Anexo 13: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para Forma/Apariencia .....	66

9.14. Anexo 14: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para Aroma .....	67
9.15. Anexo 15: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para Textura.....	68
9.16. Anexo 16: Resumen de análisis para optimización conjunta .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Algunos compuestos generados en la RM asociados al “flavor” (van Boekel, 2006).....	4
Tabla 2. Formulación de Galletas Saladas Horneadas. *Sal corresponde a una variable en el diseño experimental, por lo que varía en el rango expuesto.....	21
Tabla 3. Condiciones del equipo GC-MS para cuantificación de AA.....	24
Tabla 4. Condiciones del equipo HPLC-DAD para cuantificación de 5-HMF. ....	25
Tabla 5. Condiciones de muestras evaluadas en entrenamiento de atributos clave. ....	28
Tabla 6. Indicadores evaluados de acuerdo a la norma ISO 11132:2012.....	29
Tabla 7. Condiciones experimentales de las galletas saladas para validación del panel sensorial. ....	30
Tabla 8. Puntos a utilizar en el desarrollo del diseño experimental.....	32
Tabla 9. Resultados de la caracterización del extracto antioxidante de tara.....	33
Tabla 10. Descriptores más relevantes para galletas saladas horneadas. ....	34
Tabla 11. Resultados de entrenamiento de panel sensorial de galletas saladas. .	36
Tabla 12. Resultados de validación para perfil descriptivo en atributos clave.....	37
Tabla 13. Resultados de ANOVA de una vía para el desempeño de jueces. ....	38
Tabla 14. Resultados del perfil descriptivo para cada muestra, promedio de 9 jueces. ....	40
Tabla 15. Resultados del Test de Calidad para cada muestra, promedio de lo evaluado por cada juez. ....	41
Tabla 16. Valores óptimos de los factores con interacciones significativas y sus respuestas, ecuaciones y valores de $R^2$ .....	44
Tabla 17. Valores óptimos de las respuestas y factores mediante optimización conjunta.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista general de la RM, mostrando como productos finales los compuestos relacionados con aroma y sabor (modificado de van Boekel, 2006). .....	5
Figura 2. Vías de formación de AA. (A) Vía mayoritaria (B) Vía minoritaria. ....	8
Figura 3. Vías de formación de 5-HMF (Capuano & Fogliano, 2011).....	10
Figura 4. Vía de pirolisis de la sacarosa mediante la influencia de sodio (modificado de Perez Locas & Yaylayan 2008). .....	13
Figura 5. Formación de AA por pirolisis de la mezcla glucosa-asparagina. La reacción procede principalmente por la vía II, disminuyendo la formación de acrilamida, pero formando hidroximetilfurfural y furfural en presencia de cationes (Gökmen & Senyuva, 2007). .....	14
Figura 6. Fruto y arbusto de tara. ....	17
Figura 7. Principales taninos presentes en las vainas de tara. ....	17
Figura 8. Diagrama de obtención de extracto fenólico a partir de vainas rojas de tara. ....	19
Figura 9. Diagrama de elaboración de galletas horneadas saladas.....	22
Figura 10. Representación de los puntos para realización del diseño experimental por el Método de Superficie de Respuesta (MSR). ....	31
Figura 11. Gráfico radial de perfil descriptivo para muestras evaluadas. (*) Señala descriptores con diferencias significativas. ....	39
Figura 12. Muestras analizadas en diseño experimental. Se señalan las condiciones experimentales como ppm de extracto de tara y g de sal/100 g de harina respectivamente. ....	42
Figura 13. Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para concentración de AA. ....	43
Figura 14. Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para calidad de color. ....	43
Figura 15. Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para calidad de sabor. ....	43
Figura 16. Concentración de 5-HMF para las muestras analizadas.....	47

## RESUMEN

Chile es un gran consumidor de productos amiláceos horneados, en los que se han encontrado neo-contaminantes (NCs) como acrilamida (AA) y 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) producto de la reacción de Maillard (RM), responsable también del desarrollo de atributos sensoriales. Varios de estos productos contienen sal de mesa (NaCl) para realzar el sabor y dar estabilidad a las masas. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la adición de un extracto de polifenoles de tara y de la sal de mesa en la mitigación de estos NCs en galletas saladas horneadas manteniendo la calidad sensorial. Se utilizaron vainas de tara roja (*Caesalpinia spinosa*) previamente molidas y tamizadas sometidas a un proceso de extracción sólido-líquido (1:60 p/v) a 60 °C utilizando como solvente agua destilada para la obtención de sus compuestos fenólicos. Se realizó un diseño experimental mediante el método de superficie respuesta (MSR) compuesto central 2<sup>2</sup>+estrella, con 3 puntos centrales, con una concentración de extracto de tara de 0 a 3000 ppm y de sal de 0 a 2 g/100 g de harina como factores del diseño. La cuantificación de AA se realizó por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS) y la de 5-HMF mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). La calidad sensorial y perfil descriptivo se midió mediante un panel previamente entrenado compuesto por 9 jueces. El extracto de tara obtenido contó con un contenido de polifenoles totales de 663,14 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto (b.h.) determinado por el método de Folin-Ciocalteu. La capacidad antioxidante IC<sub>50</sub> obtenida correspondió a 8,01 µg/mL de extracto, mediante el método de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). En el test de calidad sensorial, todas las muestras evaluadas obtuvieron una calidad Grado 1, con diferencias significativas en el atributo sabor. En el perfil descriptivo, las muestras presentaron diferencias significativas en color violeta-grisáceo (dado por el extracto fenólico), en sabor salado y en crujencia. Del diseño experimental, se obtuvo un buen ajuste para las respuestas contenido de acrilamida, calidad de color y calidad de sabor. Mediante una optimización conjunta entre ellos se obtuvieron los valores óptimos para la concentración de extracto de tara (903 ppm) y para el contenido de sal (2 g/100 g de harina), minimizando el contenido de

AA y maximizando la respuesta sensorial. Para las otras respuestas la influencia de los factores no fue significativa.

Si bien la mitigación de 5-HMF no se ajustó a un modelo en el diseño experimental, sí presentó el comportamiento esperado con respecto a la bibliografía, siendo menores las concentraciones de 5-HMF a menor contenido de sal y mayor contenido de extracto de tara, obteniendo una reducción de aproximadamente un 32% en el punto óptimo.

## ABSTRACT

### **Optimization and Study of Red Tara Pods Extract (*Caesalpinia Spinosa*) and Salt Concentration in Content of Neo-Contaminants, Quality and Sensory Profile in Baked Salty Cookies**

Chile is a major consumer of baked starch products, in which neo-contaminants (NCs) such as acrylamide (AA) and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) have been found, product of the Maillard reaction (MR), also responsible for the development of sensory attributes. Several of these products contain table salt (NaCl) to enhance flavor and give stability to the doughs. The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of an extract of tara polyphenols and table salt in the mitigation of these neo-contaminants in baked salty cookies maintaining the sensory quality. Red tara pods (*Caesalpinia spinosa*), previously milled and sieved, were subjected to a solid-liquid extraction process (1:60 w/v) at 60 °C using distilled water as solvent to obtain their phenolic compounds. Response Surface Methodology (RSM) was applied using a central composite design  $2^2$  + star with 3 central points, with concentration of tara extract (0 to 3000 ppm) and salt (0 to 2 g/100 g of flour) as design factors. AA quantification was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and 5-HMF by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). Sensory quality and a descriptive profile were obtained by a previously trained panel of 9 assessors. Total polyphenol content of the tara extract was 663.14 mg of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract (wet basis) determined by the Folin-Ciocalteu method. The  $IC_{50}$  antioxidant capacity corresponded to 8.01  $\mu\text{g/mL}$  extract, using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical method. All the samples evaluated obtained a Grade 1 sensory quality, with significant differences only in the taste attribute. In the descriptive profile, the samples showed significant differences in violet-gray color (obtained by the addition of tara extract), in salty taste and in crunchiness. According to the experimental design, a good fit was obtained for the responses acrylamide content, color quality and taste quality. The optimum values for the concentration of tara extract (903 ppm) and for the salt content (2 g/100 g of flour) were obtained by

minimizing the AA content and maximizing the sensory response. For the other responses, the influence of the factors was not significant.

Although the 5-HMF mitigation did not fit to a model in the experimental design, it did present the expected behavior indicated in the literature, with lower 5-HMF concentrations at lower salt content and higher tara extract content, obtaining a reduction of approximately 32% at the optimum point.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos horneados tienen una gran participación en el mercado de alimentos de Chile, dentro de ellos se encuentran las galletas, situando al país entre los principales consumidores en Latinoamérica (González, 2015). El desarrollo de las características sensoriales en estos productos se debe principalmente a la reacción de Maillard (RM), en la que interaccionan grupos amino de compuestos proteicos y carbonilos presentes en azúcares reductores (Yaylayan, 1997). Sin embargo, en esta reacción se forman otros compuestos secundarios llamado neo-contaminantes (NCs), los que se han clasificado como carcinogénicos y con acción genotóxica (Xu et al., 2014; Van Der Fels-Klerx et al., 2014).

Debido a la gran frecuencia de consumo de los productos en los que en su elaboración está presente la RM, se han estudiado distintos métodos de mitigación de la formación de NCs. Uno de ellos consiste en la adición de extractos antioxidantes, los que interaccionan con intermediarios clave en la formación de estos contaminantes, evitando su formación (Zhu et al. 2011; Li et al., 2012)

Adicionalmente se ha observado que la concentración de sal influye en la formación de estos NCs. Su adición disminuye la formación de acrilamida, impidiendo la formación de una base de Schiff que luego pasa a formar acrilamida. En cambio, la adición de sal actúa deshidratando intermediarios claves en la formación de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), fomentando su formación, por lo que a menores cantidades de sal disminuye la concentración de 5-HMF (Gökmen and Şenyuva, 2008; Fiore et al., 2012).

El objetivo de esta investigación consiste en evaluar la influencia del contenido de polifenoles en un extracto obtenido de Tara (*Caesalpinia spinosa*) y la concentración de sal en galletas saladas horneadas, en la mitigación de los neo-contaminantes acrilamida (AA) e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), sin disminuir la calidad sensorial de estas.

## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

### **2.1. Productos Horneados: Galletas**

Las galletas se encuentran en la categoría de “Alimentos farináceos” descritos en el título XV del Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) y en su Párrafo III “Del pan y los productos de pastelería y repostería”, Artículo 358, se describen las especificaciones que deben cumplir las masas horneadas, adicionadas o no de especias y otros ingredientes o aditivos permitidos. Estas especificaciones son: (a) el aspecto de la masa será homogéneo, adecuado para dar la característica típica del producto; (b) acidez no superior al 0,25% expresada en ácido sulfúrico (RSA, 2015).

Los consumidores chilenos figuran entre los mayores compradores de calorías al día en el mundo, según un estudio que analizó el comportamiento de consumo de alimentos envasados y bebidas sin alcohol, en 54 países, siete de ellos latinoamericanos, durante 2014 (González, 2015).

Los productos de panadería, entre ellos las galletas, corresponden a una de las tres principales fuentes de las 1.796 calorías que consumen los chilenos, de acuerdo a un estudio de mercado elaborado por “Euromonitor”. Además de ser una de las principales fuentes de obtención de proteínas (González, 2015).

El consumo de galletas en Chile se ha incrementado en los últimos años debido a la entrada de actores internacionales e incluso marcas privadas que ofrecen una alta calidad y sabor a precios convenientes, de acuerdo a estudios de “Euromonitor” International (González, 2015).

Este mercado ha crecido un 59% en los últimos cinco años (con datos hasta el año 2013), siendo las galletas saladas las que presentaron mayor aumento, con un 63,8% más; mientras que la venta de las dulces subió 57,9%. Así, considerando el total de estos productos, los chilenos invierten US\$525,8 millones, es decir, US\$29,9 per cápita, posicionándose como el tercer país que más gasta en este producto, después de Argentina y Brasil (SOFOFA, 2014).

## 2.2. Reacción de Maillard

Esta reacción está principalmente relacionada al tratamiento térmico de alimentos y se clasifica como un pardeamiento no enzimático. Los productos secundarios obtenidos en ésta incluyen compuestos de bajo peso molecular, los que contribuyen a los sabores y aromas característicos de los productos, algunos de estos compuestos se presentan en la Tabla 1. Adicionalmente se forman productos poliméricos, los que están relacionados al color y textura. En cuanto a los productos secundarios de la reacción, las melanoidinas, formadas en las etapas finales de la RM, han sido de interés en los últimos años. Numerosas investigaciones han reportado su posible actividad antioxidante, antihipertensiva, prebiótica y antimicrobiana que estos compuestos han evidenciado en sistemas modelos (Patrignani et al., 2016).

El término RM se utiliza para referirse a cualquier interacción entre un grupo amino y un grupo carbonilo perteneciente principalmente a un azúcar reductor, los que en su fase inicial producen dos intermediarios, producto de Amadori y de Heyn. La cascada de complejas reacciones que sigue a la formación de los intermediarios iniciales significa que ésta no sigue conforme a lo que se entiende como una reacción química clásica, sino que esta involucra una serie de reacciones consecutivas y paralelas, muchas de las cuales son fundamentalmente transformaciones de compuestos orgánicos, tales como oxidaciones, reducciones y condensaciones aldólicas (Yaylayan, 1997).

Sin embargo, esta reacción se puede resumir en tres etapas. La etapa inicial comienza con una condensación entre el grupo amino y el azúcar reductor, llevando a la formación de n-glicosilamina en el caso de las aldosas las que se reordenan en un producto de Amadori (o de Heyns si es que el azúcar reductor es una cetosa). La etapa intermedia se inicia con el producto de Amadori/Heyns, llevando a productos de la fragmentación del azúcar y la liberación del grupo amino. La etapa final conduce a todo tipo de reacciones de deshidratación, fragmentación, ciclación y polimerización en las que el grupo amino vuelve a participar (van Boekel, 2006).

Especialmente en la formación del “flavor” (combinación de sabores y aromas), la llamada degradación de Strecker es la de mayor importancia, los aminoácidos son degradados por dicarbonilos formados con anterioridad, llevando a una desaminación y descarboxilación del aminoácido. También es importante mencionar que la degradación de los azúcares en presencia de grupos amino (caramelización) origina productos similares, pero en la RM, el grupo amino actúa como un catalizador, por lo tanto, la RM se produce más rápido y se producen mayores cantidades de productos intermediarios muy reactivos. Las distintas posibles rutas de la reacción que ocurrirán, dependen principalmente de la temperatura, pH y la naturaleza de los reactantes (tipo de azúcar, tipo de aminoácido o proteína) (van Boekel, 2006), tal como se observa en la Figura 1.

Tabla 1 Algunos compuestos generados en la RM asociados al “flavor” (van Boekel, 2006).

<b>Tipo de Compuesto</b>	<b>"Flavor"/Aroma asociado</b>	<b>Ejemplos en Alimentos</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Pirazinas</b>	Cocinado, asado, tostado, cereales horneados	Alimentos procesados térmicamente	
<b>Alquilpirazinas</b>	A nuez, asado	Café	
<b>Alquilpiridinas</b>	Verde, amargo, astringente, quemado	Café, cebada, malta	Generalmente se considera poco agradable
<b>Acilpiridinas</b>	Similar a galleta	Cereales	
<b>Pirroles</b>	Similar a cereal	Cereales, café	
<b>Furanos, furanonas, piranonas</b>	Dulce, quemado, pungente, caramelo	Alimentos procesados térmicamente	
<b>Oxazoles</b>	Verde, a nuez, dulce	Cacao, café, carne	
<b>Tiofenoles</b>	Carne	Carne	Típico para carnes cocinadas, formado por ribosa y cisteína

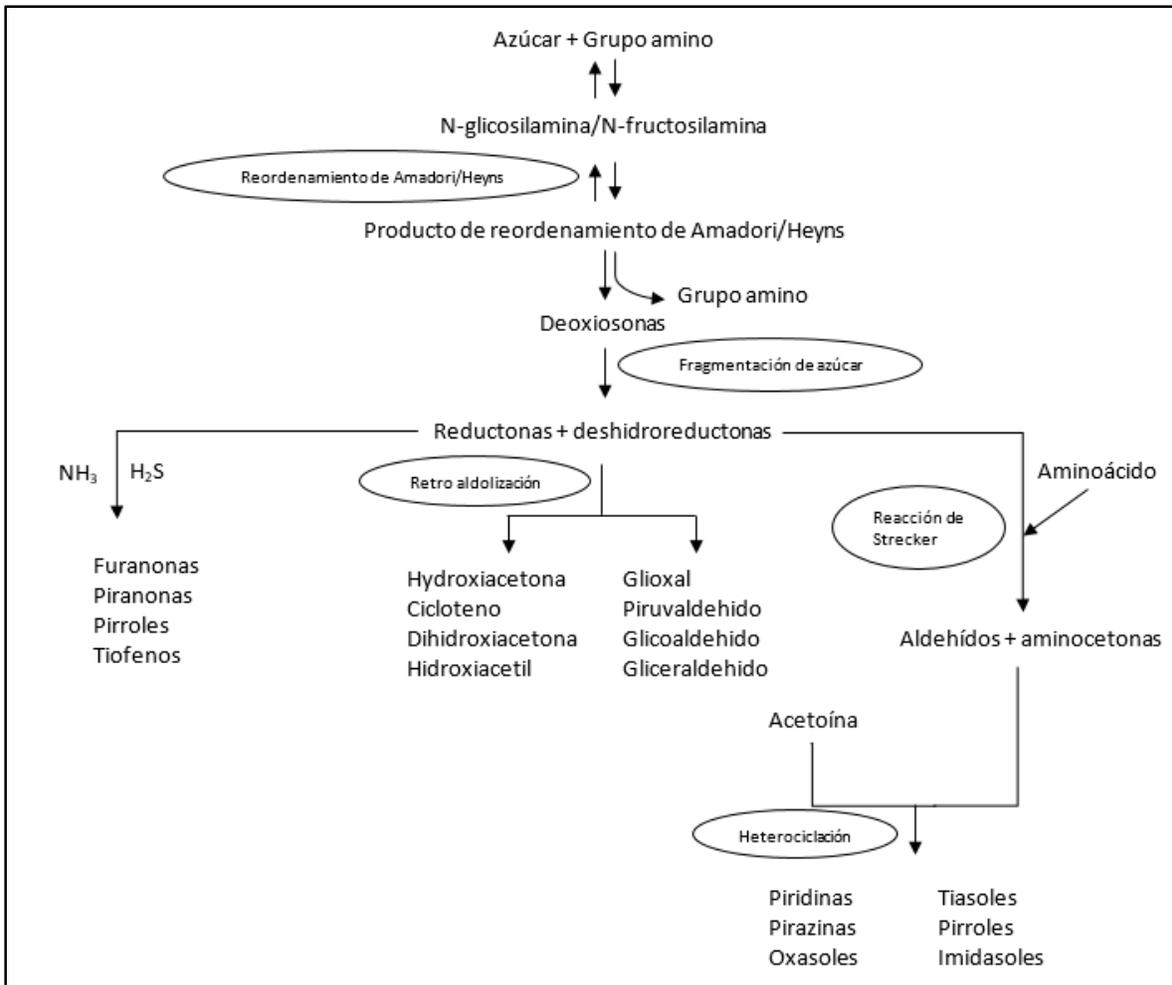


Figura 1. Vista general de la RM, mostrando como productos finales los compuestos relacionados con aroma y sabor (modificado de van Boekel, 2006).

### 2.3. Neo-contaminantes

La formación de neo-contaminantes se relaciona principalmente a la RM. Esta es una reacción de pardeamiento no enzimático que ocurre entre el grupo amino de los aminoácidos y el grupo carbonilo, mayormente de los azúcares. Los productos de esta reacción se relacionan no solo a neo-contaminantes, sino que influyen en el desarrollo del sabor, textura y color de los alimentos (Patrignani et al., 2016). Es por esto que es importante estudiar cuáles son los principales neo-contaminantes y sus vías de formación, con el fin de mitigarlos sin alterar las características sensoriales de los productos involucrados.

### **2.3.1. Acrilamida**

La acrilamida (AA) está presente en muchos alimentos de consumo diario, como pan, frituras y café; exceptuando alimentos crudos y hervidos, por lo tanto, la formación de acrilamida se asocia al procesamiento de alimentos a altas temperaturas como la fritura, asado y horneado de alimentos ricos en carbohidratos, mediante la RM, la que involucra azúcares y el aminoácido asparagina, bajo condiciones de baja humedad (Xu et al., 2014).

Debido a su genotoxicidad y carcinogenicidad, la acrilamida ha sido clasificada como carcinógeno de Grupo 2 por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) y carcinógeno Categoría 2 por la Unión Europea, lo que ha causado preocupación a nivel mundial respecto al tema. Se ha puesto en la lista de sustancias “Extremadamente preocupantes” por la Agencia Química Europea en 2010. Dados estos antecedentes, la industria alimentaria se enfrenta al desafío de modificar los procesos para cambiar los parámetros sin comprometer la calidad de sus productos, lo que depende de una mejor comprensión de la formación de acrilamida y tecnologías de mitigación, como también de su toxicología (Xu et al., 2014).

### **2.3.2. 5-Hidroximetilfurfural**

El 5-Hidroximetilfurfural ( $\text{HO}\backslash\text{CH}_2\backslash\text{C}_4\text{H}_2\text{O}\backslash\text{CHO}$ ) (5-HMF) es un derivado del furano y constituyente del color caramelo en alimentos tratados a altas temperaturas. 5-HMF se forma por deshidratación directa de fructosa y glucosa (caramelización) o vía RM y por descomposición térmica de sacarosa a muy altas temperaturas (Van Der Fels-Klerx et al., 2014).

El 5-HMF es genotóxico bajo ciertas condiciones experimentales y en algunos casos tiene potencial carcinogénico. Este compuesto ha mostrado actividad carcinogénica en roedores y actividad mutagénica en bacterias como *Salmonella typhimurium* en presencia de sulfotransferasas las que pueden convertir el 5-HMF en sulfoximetilfurfural (SMF) una forma de mayor actividad mutagénica. A la fecha no se ha esclarecido si HMF es un riesgo para la salud de los humanos (Van Der Fels-Klerx et al., 2014).

El HMF está presente en una amplia variedad de alimentos tratados térmicamente como productos en base a cereales, café, malta y cerveza. En galletas comercializadas en España, el contenido de 5-HMF se ha reportado en rangos entre 3,1 mg/kg a 182,5 mg/kg, con un promedio de 14,4 mg/kg, mientras que en Francia las galletas poseen concentraciones entre 0,5 a 74,5 mg/kg (Van Der Fels-Klerx et al., 2014).

## **2.4. Mecanismos de Formación**

La formación de AA y 5-HMF depende del tipo y concentración de azúcares, aminoácidos, temperatura, tiempo, agentes leudantes, que corresponden a los factores más importantes, adicionalmente se pueden mencionar el pH, actividad de agua, contenido de vitamina E, entre otros (Nguyen et al., 2016). A continuación, se detallan las vías más comunes para la formación de estos NCs.

### **2.4.1. Acrilamida**

Se ha estudiado una ruta principal y una menor de formación de AA. Algunos precursores críticos y directos en la formación de acrilamida incluyen el 3-aminopropionamida (3-APA), base de Schiff descarboxilada, producto de Amadori descarboxilado, ácido acrílico y acroleína (Xu et al., 2014).

Como vía principal, es conocida la ruta de asparagina vía RM. En esta ruta de n-glucósidos, la asparagina es convertida a acrilamida a través de una descarboxilación térmica y desaminación, que necesariamente necesita la presencia de un compuesto carboxílico (como un azúcar reductor). En esta vía la reacción entre asparagina y el azúcar reductor produce una base de Schiff descarboxilada, n-glicosilasparagina, lo que lleva directamente a la formación de AA y una imina después de la descomposición. Adicionalmente, la descarboxilasa presente en los materiales crudos puede generar amina 3-APA biogénica a partir de asparagina, la que luego es térmicamente desaminada a acrilamida. Este proceso ocurre sin involucrar carbohidratos reductores (Xu et al., 2014).

La degradación de Strecker de aminoácidos (asparagina y metionina) en presencia de productos reactivos di-carbonilos a aldehídos, la ruta de aldehídos de Strecker,

ha sido propuesta como una vía alternativa de formación de acrilamida vía RM (Xu et al., 2014).

Varios estudios indican que la antes mencionada vía de formación de acrilamida a través de la RM no es la única en alimentos. Es bien sabido que los lípidos están involucrados en la formación de acrilamida mediante compuestos de tres carbonos (ácido acrílico) producidos a partir de lípidos a elevadas temperaturas. Adicionalmente, moléculas pequeñas (como acetaldehído, formaldehído) producida al calentar monosacáridos forman acroleína bajo las condiciones adecuadas para luego formar acrilamida (Xu et al., 2014).

Además, vías del metabolismo de proteínas y la descarboxilación de ácidos orgánicos (láctico, cítrico y málico) también generan acroleína y ácido acrílico, lo que da como resultado la formación de acrilamida. Sin embargo, la acrilamida formada por esta vía es marginal debido a que los compuestos con grupos carbonilos como los azúcares reductores son más activos con asparagina (Xu et al., 2014). En la Figura 2 se observan las reacciones antes descritas:

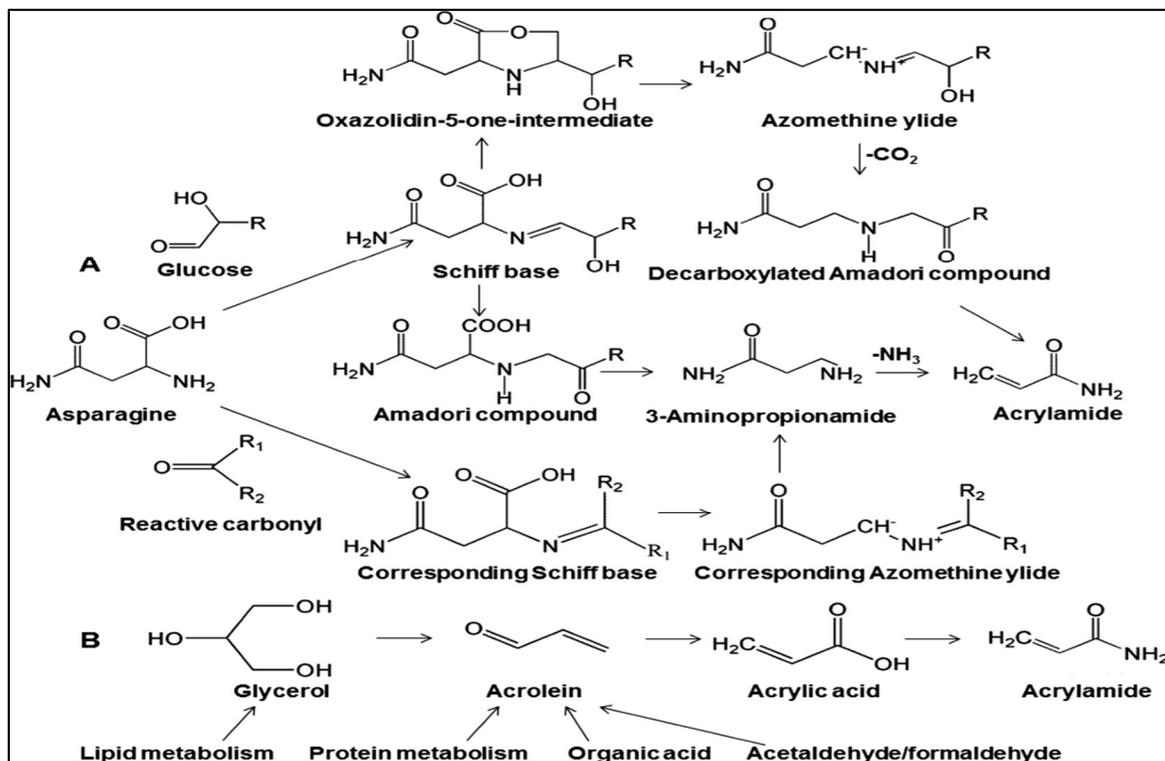


Figura 2. Vías de formación de AA. (A) Vía mayoritaria (B) Vía minoritaria.

### **2.4.2. 5-Hidroximetilfurfural**

La formación de 5-HMF está asociada a múltiples rutas involucrando diferentes precursores e intermediarios. Carbohidratos, aminoácidos y sus mezclas; vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides se indican como precursores. El 5-HMF puede ser formado como un intermediario en la RM, la que ocurre cuando los carbohidratos son calentados en presencia de aminoácidos y proteínas, o alternativamente, por deshidratación térmica de un azúcar bajo condiciones ácidas. La formación de 5-HMF en alimentos es afectada por el tipo de azúcar, pH, actividad de agua y presencia de cationes divalentes (Anese & Suman, 2013).

El 5-HMF puede ser formado por la caramelización de azúcares como consecuencia de tratamientos térmicos y por catálisis ácida. La sacarosa puede ser descompuesta dando a lugar glucosa libre y un intermediario reactivo, catión fructofuranosil. Este catión puede rápidamente convertirse a 5-HMF a temperaturas sobre 250 °C y bajo condiciones de pirolisis seca. Estudios han indicado que la formación de 5-HMF a partir de fructosa debe pasar por la generación de fructofuranosil como primer paso. La glucosa y fructosa también pueden generar 5-HMF a través de la formación de un intermediario dicarbonilo, 3-desoxiglucosona (3-DG), en la reacción de Maillard y caramelización. 3-DG se forma a partir de la fructosa sin la intervención grupos aminos, mientras que su formación a partir de la glucosa necesita un grupo amino (Nguyen et al., 2016).

En las distintas vías de formación, la 3-deoxiosona es un intermediario clave. Esta deriva de una enolización 1,2 y deshidratación de glucosa o fructosa. La consecuente deshidratación o ciclación de la 3-deoxiosona produce 5-hidroximetilfurfural. En la Figura 3 se observa el mecanismo descrito.

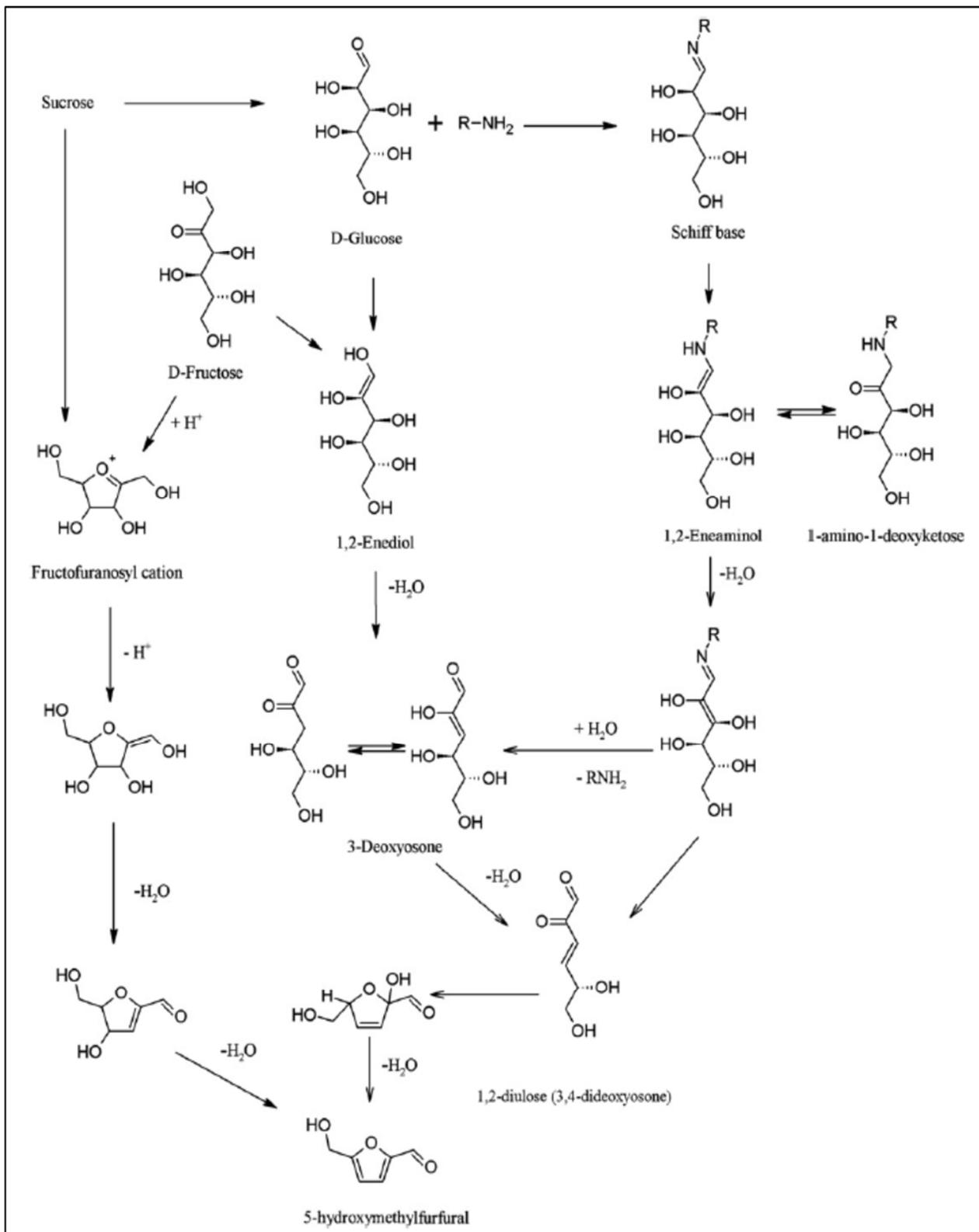


Figura 3. Vías de formación de 5-HMF (Capuano & Fogliano, 2011).

## **2.5. Métodos de Mitigación de Neo-contaminantes**

Para poder mitigar la formación de NCs es relevante considerar la formulación del alimento y las posibles intervenciones en el proceso y post-proceso. Estas vías de mitigación pueden ser consideradas como dos tecnologías conceptualmente diferentes: (a) intervención preventiva, que apunta a mantener la producción de contaminantes lo más baja posible durante el proceso de calentamiento. Esto lleva a la creación de condiciones de reacción menos favorables, actuando en los precursores de las vías de formación; (b) eliminar los NCs, apuntando a quitarlos del alimento o descomponerlos una vez formados, posterior al tratamiento térmico (Anese & Suman, 2013).

Como la formulación contribuye sustancialmente a la formación de contaminantes, en principio, su cambio puede considerarse como una estrategia preventiva. Un cambio en la formulación puede lograrse por (a) removiendo los precursores altamente reactivos y/o sustituyéndolos con otros menos propensos a formar los contaminantes; (b) añadir ingredientes que inhiban las reacciones de formación de NCs o que compitan con sus precursores. Como sea, esta clasificación no puede considerarse como definitiva. De hecho, un mismo ingrediente puede tanto prevenir como favorecer la formación de contaminantes, dependiendo de la composición del sistema y las condiciones de proceso (Anese & Suman, 2013).

### **2.5.1. Presencia de Sal**

En la RM, la presencia de reactantes como el cloruro de sodio puede influenciar en algunas vías mediante la deshidratación de varios intermediarios claves en la formación de NCs (Fiore et al., 2012).

Yasuhara et al. (2003) discutieron la oxidación o degradación térmica de lípidos en alimentos fritos como una posible ruta que contribuye a la formación de AA mediante el ácido acrílico como intermediario. Lindsay & Jang (2005) testearon esta hipótesis acelerando la oxidación durante el proceso de fritura añadiendo cloruro férrico a la superficie de papas laminadas antes de freírlas. A pesar de que los cationes de metales de transición como el hierro son bien conocidos por acelerar la oxidación lipídica vía catálisis de la descomposición de hidroperóxidos, el tratamiento de las

láminas de papas con  $\text{Fe}^{3+}$  redujo la formación de acrilamida significativamente. Ellos notaron que la introducción de  $\text{Ca}^{2+}$  un catión de estado de no transición, también redujo la formación de AA, suponiendo asociaciones iónicas involucrando iones y grupos con carga en la asparagina e intermediarios relacionados podrían estar implicados (Gökmen & Senyuva, 2007).

Gökmen & Senyuva (2007) demostraron que la adición de cationes polivalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  previene la formación de acrilamida en un sistema modelo de asparagina-glucosa, pero al mismo tiempo la formación de HMF y furfurales incrementó significativamente. Levine et al. (2009) hallaron en un sistema modelo de masa que la concentración de acrilamida decrecía a medida que incrementaba la concentración de cloruro de sodio. Carle et al. (2008) evidenciaron que el cloruro de sodio juega un rol dual en la formación de acrilamida: a concentraciones de NaCl de 1 a 2% la formación de AA decreció significativamente; al contrario, incrementar la concentración de sal a más del 2% llevó a un incremento del contenido de acrilamida.

Gökmen & Şenyuva (2008) encontraron en un sistema modelo líquido constituido por 10  $\mu\text{mol/L}$  de asparagina y glucosa que la concentración final de acrilamida fue mayor en el control, declinando a concentraciones de NaCl desde 0,5 a 5  $\mu\text{mol/L}$ , y decreció significativamente para concentraciones de 5 a 20  $\mu\text{mol/L}$ . Por otra parte, la formación de 5-HMF está más claramente relacionada a la concentración de NaCl: los cationes monovalentes favorecen la deshidratación de intermediarios claves, conllevando un incremento de la formación de 5-HMF. Esta hipótesis está ampliamente demostrada en preparaciones comerciales de dextrosa y en un sistema modelo para galletas en presencia de 0,45 y 0,7% de NaCl, respectivamente (Fiore et al., 2012).

El mecanismo que lleva a la conversión de sacarosa a 5-HMF a través del catión fructofuranosil a altas temperaturas han sido previamente descritos (Perez & Laylayan, 2008). Ambos, glucosa y el catión fructofuranosil pueden generar 5-HMF mediante la eliminación de 2 y 3 moles de agua respectivamente.

Cuando se incrementó la concentración de ciertos cationes, la reacción se dirigió principalmente hacia la deshidratación de glucosa que condujo a 5-HMF como uno de los productos finales característicos, pasando también por intermediarios cíclicos. Se ha demostrado que la deshidratación de las hexosas es catalizada por ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, sales y ácidos de Lewis (Gökmen & Senyuva, 2007). La Figura 4 presentada más adelante esquematiza lo antes señalado.

Los estudios mecánicos han propuesto que los glicoconjugados, como los N-glicósidos y compuestos relacionados formados en la fase temprana de la RM son los intermedios clave que conducen a la acrilamida. Basándose en estos estudios, el primer paso en la producción de acrilamida es la formación de la base de Schiff entre el grupo carbonilo y el grupo  $\alpha$ -amino de la asparagina por medio de la deshidratación del compuesto N-glicosil, como se puede observar en la Figura 5. En investigaciones anteriores se ha mostrado un claro impacto de los cationes sobre la formación de acrilamida. El efecto de los cationes fue hacia el impedimento de la base de Schiff de la asparagina y una consecuente disminución en la formación de acrilamida (Gökmen & Senyuva, 2007).

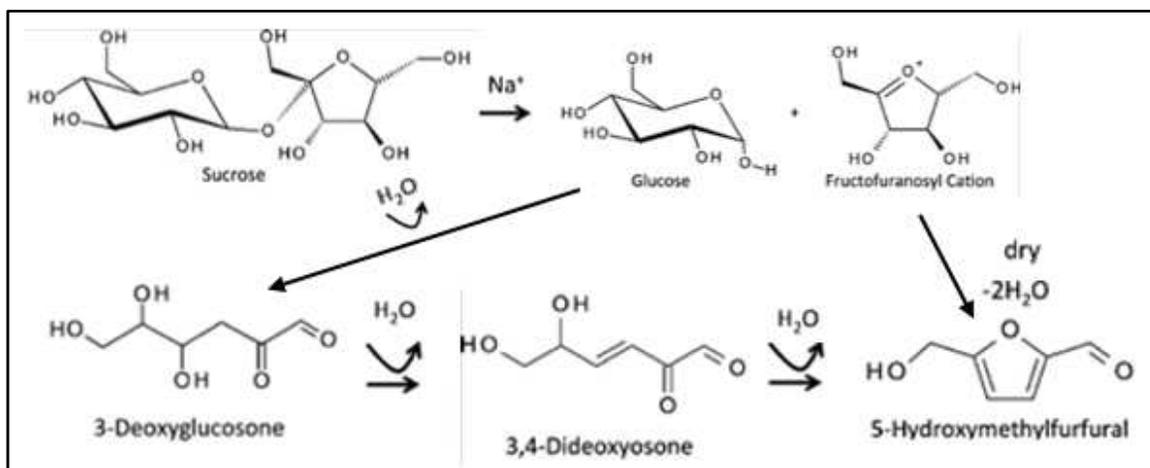


Figura 4. Vía de pirolisis de la sacarosa mediante la influencia de sodio (modificado de Perez Locas & Yaylayan 2008).

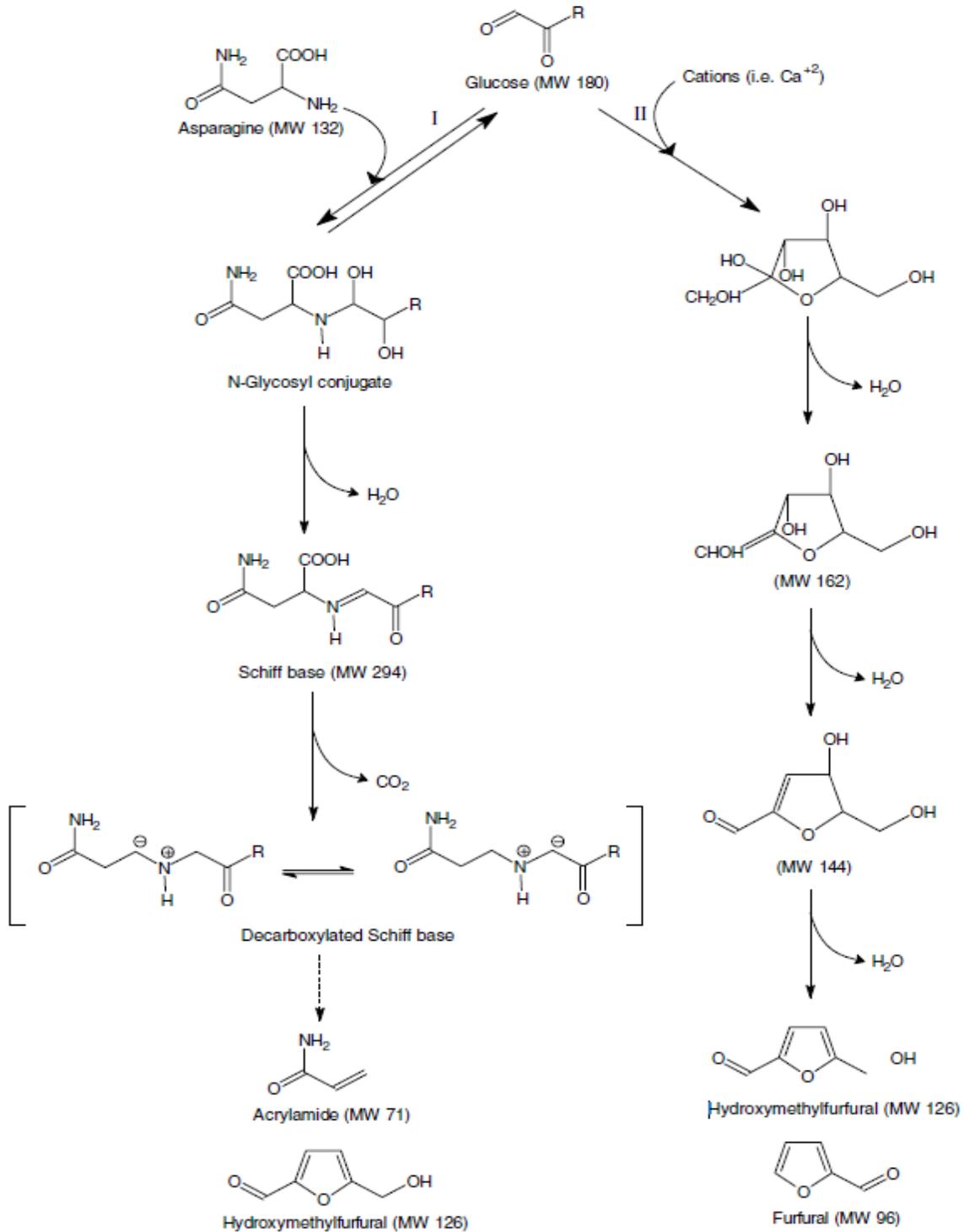


Figura 5. Formación de AA por pirolisis de la mezcla glucosa-asparagina. La reacción procede principalmente por la vía II, disminuyendo la formación de acrilamida, pero formando hidroximetilfurfural y furfural en presencia de cationes (Gökmen & Senyuva, 2007).

### **2.5.2. Extractos Antioxidantes**

Los diversos efectos de los polifenoles sobre la formación de NCs están relacionados con su estructura, concentración, capacidad antioxidante y condiciones de reacción (Constantinou & Koutsidis, 2016; Jin et al., 2013; Kahkeshani et al., 2015; Liu et al., 2015; 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 AA (Kotsiou et al., 2010; Zhang & Jin, 2016)

Se han reportado varios métodos en que antioxidantes intervienen en la formación de NCs. En el caso de AA, algunos flavonoides actúan formando enlaces covalentes con compuestos carbonilos y dicarbonilos reactivos, los que son intermediarios en la conversión de asparagina en acrilamida (Jin et al., 2013; Kotsiou et al., 2010; Liu et al., 2015; Zhang & Jin, 2016).

Los antioxidantes fenólicos como los taninos, pueden formar complejos con aminoácidos, precipitándolos e impidiendo su interacción para formar acrilamida. (Jin et al., 2013; Zhang & Jin, 2016). Otros antioxidantes reaccionan con el doble enlace vinílico carente de electrones presente en la molécula de acrilamida, eliminándola.

En el caso del 5-HMF, la mayor cantidad de información relacionada a su mitigación se centra en estrategias preventivas como el cambio en formulación, procesos a menor temperatura y remoción post proceso, principalmente mediante el uso de vacío (Capoano & Fogliano, 2011; Anese & Suman, 2013). De acuerdo a lo señalado en el punto 2.4.2., la formación de HMF se produce por intermediarios carbonilos y dicarbonilos formados en la degradación de azúcares, compuestos que reaccionan con flavonoides, tal como se menciona en párrafos anteriores.

## **2.6. Tara (*Caesalpinia spinosa*)**

La tara (*Caesalpinia spinosa*) es una leguminosa nativa de Suramérica. Pertenece a la Familia Caesalpiníaceae y se conoce comúnmente como tara o taya. Se encuentra distribuido desde Venezuela hasta Chile y Bolivia (Cabello, 2009).

De acuerdo a sus características botánicas se describe la tara como un arbusto de dos a tres metros de altura de tronco corto, cilíndrico, a veces tortuoso con ramas delgadas pobladas iniciándose casi desde la base, dando la impresión de varios tallos, la parte apical es irregular, con ramitas terminales. Su fruto son legumbres rojizas, oblongas, ligeramente comprimidas de 6-11 cm de longitud, indehiscentes de color rosado, con el mesocarpio arenoso, esponjoso, y 9-12 semillas de unos 1 x 0,5 x 0,3 cm, de color marrón pardo con la superficie lustrosa dura, y con uno de los dos lados más grande (Cabello, 2009). En la Figura 6 se observa el arbusto y las vainas de la planta.

Las vainas de tara (sin semillas) representan aproximadamente el 65% (p/p) del fruto. Las vainas molidas concentran un alto contenido de taninos (~40-60% (p/p)). Éstas son buena fuente de ácido tánico, galotánico y gálico. Los taninos de tara son utilizados en la manufactura de muebles de cuero, plásticos y adhesivos, como aclarador de vinos, sustituto de malta y como fuente para obtener antioxidantes (ácido gálico) (Chambi et al., 2013).

Sus frutos, las vainas, tienen amplia aplicación medicinal, la población la usa contra la amigdalitis bajo la forma de gárgaras, contra la fiebre, la gripe, como abortivo, para evitar la caída del cabello, para la tinción de fibras, entre otros usos (Cabello, 2009).

Siendo una planta de larga vida útil, con pocas exigencias de suelo, se le considera un cultivo con alto potencial para la reforestación y su producción en zonas marginales (Cabello, 2009).

Sus vainas contienen taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; asimismo se han aislado galato de etilo y

cuatro galatos del ácido quínico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-di-O-galoilquínico y de 3,4,5tri-O-galoilquínico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico (Cabello, 2009). Su estructura principal se puede observar en la Figura 7.



Figura 6. Fruto y arbusto de tara.

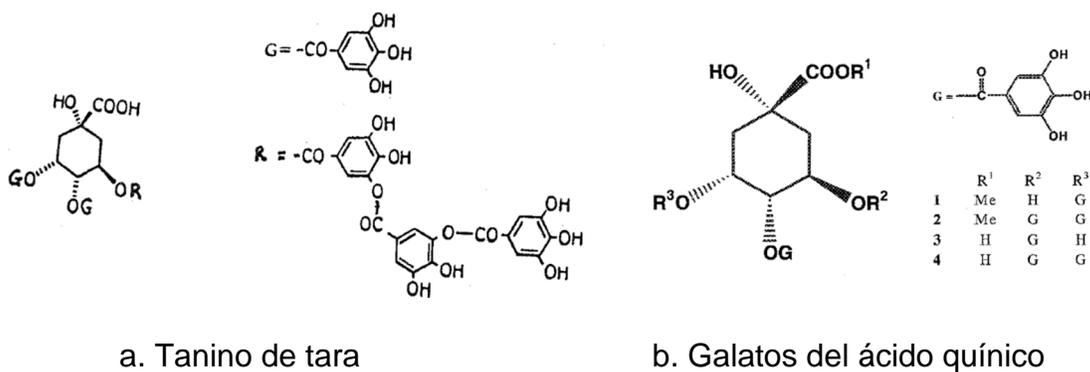


Figura 7. Principales taninos presentes en las vainas de tara.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto de un extracto polifenólico obtenido de vainas rojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) y de la concentración de sal (NaCl) en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural en galletas saladas horneadas, sin alterar sus características sensoriales atractivas al consumidor de manera significativa.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Obtener un extracto polifenólico a partir de vainas rojas de tara (*Caesalpinia spinosa*).
- Caracterizar químicamente el extracto fenólico.
- Determinar el efecto de la adición del extracto fenólico de tara y sal en el contenido de neo-contaminantes de las galletas saladas horneadas.
- Seleccionar, entrenar y validar un panel sensorial para la determinación de la calidad y perfil sensorial de galletas saladas horneadas.
- Determinar mediante un panel sensorial el efecto de la adición del extracto fenólico de tara en las principales características sensoriales y calidad de galletas saladas horneadas.
- Optimizar por método de superficie de respuesta, la concentración de extracto fenólico en galletas y contenido de sal que otorgue la mejor respuesta sensorial en las galletas y la menor presencia de neo-contaminantes.

### **4. HIPÓTESIS**

La adición de extracto fenólico de vainas rojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) y la concentración de sal de mesa (NaCl) disminuye la formación de acrilamida y 5-hidroximetilfurfural en galletas saladas horneadas, sin alterar sus características sensoriales originales de manera significativa.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Obtención del Extracto Fenólico

Para la obtención del extracto se utilizó el método descrito por Bravo (2010) con algunas modificaciones basadas en la memoria de Saavedra (2016). El diagrama de la extracción se observa a continuación en la Figura 8.

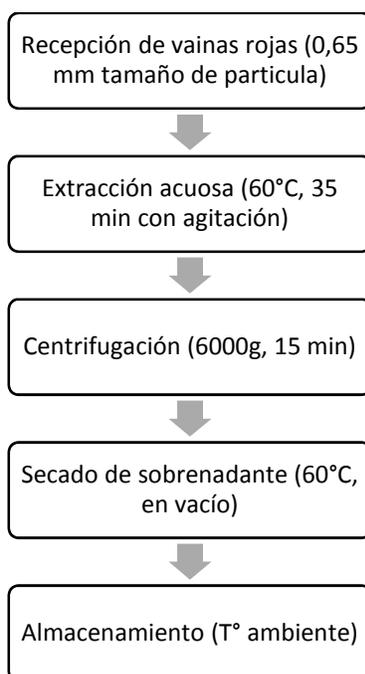


Figura 8. Diagrama de obtención de extracto fenólico a partir de vainas rojas de tara.

El método consiste en una extracción con agua a 60 °C con agitación por 35 minutos de las vainas rojas molidas y tamizadas. Centrifugación a 6000g por 15 minutos a 25 °C, se obtiene el sobrenadante el cual se seca con rotavapor a 60 °C aplicando vacío. El extracto seco se almacenó a temperatura ambiente, protegido de la luz en una caja de poliestireno expandido.

## **5.2. Caracterización Química del Extracto**

### **5.2.1. DPPH**

La capacidad antioxidante del extracto de tara se midió por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Brand-Williams et al., 1995).

Este método consiste en la cuantificación de la reducción del radical DPPH por el extracto antioxidante, medida por el cambio de color de púrpura a amarillo pálido por la reducción de DPPH a DPPHH.

Se preparó 5 distintas diluciones metanólicas del extracto de tara, reaccionando cada una con el radical DPPH por 30 minutos. La medición del cambio de color se hizo con un espectrofotómetro a 517 nm. Como blanco para cada muestra se utilizó la muestra respectiva con metanol, para así medir solo el comportamiento del radical DPPH.

Con cada uno de los puntos más un control (DPPH sin muestra) se construyó una curva de % de decoloración versus concentración, con eso se obtuvo el valor  $IC_{50}$ , correspondiente a los  $\mu\text{g}$  de extracto/ml que reducen en un 50% al radical DPPH.

### **5.2.2. Polifenoles Totales**

Para la determinación de polifenoles totales del extracto de tara se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, en el que un reactivo del mismo nombre se hace reaccionar con el extracto en un medio básico (mediante la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%) provocando un cambio de color amarillo a azul debido a la reducción del reactivo de Folin, el que se mide en espectrofotómetro a 765 nm.

La determinación se realizó previa construcción de una curva de calibración utilizando ácido gálico, consecuentemente, el resultado obtenido se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto en base húmeda (mg EAG/g).

### 5.3. Elaboración de Galletas Saladas Horneadas

Las galletas se elaboraron en base a la formulación propuesta por (Aziha & Komathi, 2009) con algunas modificaciones. Los ingredientes se describen para una preparación a partir de 100 g de harina (considerando que tiene una humedad del 14%). El detalle de la formulación se encuentra en la Tabla 2.

Debido a que uno de los factores a analizar es el contenido de sal en las galletas, el contenido de sodio debió estar dentro de los límites descritos en la ley de etiquetado de alimentos, para que el producto final no sea descrito como “Alto en Sodio”.

En la formulación utilizada, el contenido de sodio es de 786 mg por cada 100 g para el límite superior del diseño experimental, lo que está dentro de lo estipulado en la nueva ley de etiquetado de los alimentos de Chile y no se clasifican como “Alto en Sodio”, hasta el año 2018 (Ley N°20.606, 2015).

Tabla 2. Formulación de Galletas Saladas Horneadas. \*Sal corresponde a una variable en el diseño experimental, por lo que varía en el rango expuesto.

Ingrediente	Cantidad (g)
Harina	100
Sal	0 – 2*
Manteca	7
Levadura	3,5
Agua	45

### 5.3.1. Diagrama de Bloques

En la Figura 9 se detalla el diagrama de elaboración de galletas saladas horneadas.



Figura 9. Diagrama de elaboración de galletas horneadas saladas.

### 5.3.2. Descripción del Diagrama de Bloques

- **Recepción de Materias Primas:** Las materias primas se obtuvieron de una tienda comercial, asegurando que todas estas estén en perfecto estado. Se utilizó harina marca Selecta sin polvos de hornear, sal marca Lobos, levadura marca Lefersa y manteca marca Crucina.
- **Mezclado:** Se adiciona a la mezcladora la harina, la sal y la manteca. La levadura se adiciona junto con el agua formando una suspensión y se vierte al resto de los ingredientes. El proceso de mezclado se realiza hasta obtener una masa homogénea.
- **Fermentado:** Se deja reposar la masa cubierta con film plástico a 25 °C aproximadamente, durante 3 horas, con el fin de que esta desarrolle los sabores y textura características del producto final.
- **Laminado:** Se realiza mediante el uso de una máquina laminadora hasta un grosor de 3 mm aproximadamente.
- **Formado:** Mediante el uso de un sacabocados se da forma a las galletas en forma de círculos de 30 mm de diámetro.
- **Horneado:** Se realiza en un horno de convección forzada, a 180 °C por 25 minutos.
- **Enfriado:** Se dejarán las galletas en el horno apagado, con el fin de que estas lleguen a una temperatura de equilibrio con el ambiente.
- **Almacenamiento:** Las galletas ya elaboradas se almacenan en bolsas de cierre hermético de polietileno de baja densidad. Las galletas para análisis de neo-contaminantes se mantienen congeladas a aproximadamente -20°C, las destinadas a evaluación sensorial se almacenan a temperatura ambiente, por no más de 1 día hasta el momento de la evaluación.

## 5.4. Medición del Contenido de Neo-contaminantes

### 5.4.1. Acrilamida

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

Este método consiste en la extracción de la acrilamida presente en el alimento utilizando metanol como solvente (10 mL), además de la adición de acrilamida deuterada d-3 (20 mg/L) como estándar interno (40 µL) a 2 g de muestra. Esta se somete a ultrasonido a 60 °C por 20 minutos y una posterior centrifugación por 10 minutos a -4 °C para la obtención del sobrenadante.

El sobrenadante se filtra utilizando un catridge de fase reversa C18 con el fin de eliminar interferentes apolares, en condiciones de vacío. Posteriormente se agregan 10 mL de n-hexano a la fase metanólica obtenida, la que se somete a ultrasonido por 10 minutos para la eliminación de interferentes como materia grasa. Luego esta mezcla se centrifuga a -10 °C por 10 minutos para separar la fase metanólica del n-hexano. Se obtiene la fase metanólica la que se pasa por un filtro de nylon de 0,22 µm y se lleva a viales de 2 mL para su posterior inyección a un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS). Las condiciones del cromatógrafo se señalan en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones del equipo GC-MS para cuantificación de AA.

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

#### 5.4.2. 5-Hidroximetilfurfural

La cuantificación se realizó mediante el método descrito por Toker et., al (2013) consistente en la extracción acuosa de 1 g de muestra en 20 mL de agua destilada. La eliminación de interferentes se logró utilizando 1,5 mL de reactivo de Carrez I ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) y 1,5 mL de reactivo de Carrez II ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) agitando mediante vortex en cada adición, para luego centrifugar por 15 minutos. Se obtiene el sobrenadante y se pasa por un filtro de nylon de 0,22  $\mu m$  a viales de 2 mL para su posterior inyección.

El kit de reactivos de Carrez elimina interferentes mediante la precipitación por adsorción de diversas sustancias de peso molecular elevado (proteínas), elimina turbideces y destruye emulsiones.

La medición del analito se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Las condiciones del cromatógrafo se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones del equipo HPLC-DAD para cuantificación de 5-HMF.

<i>Parámetro</i>	<i>Condición</i>
<i>Fase móvil</i>	Ácido acético al 1%/acetoniitrilo (proporción 95/5%)
<i>Flujo fase móvil</i>	1 mL/min
<i>Longitud de onda del detector</i>	284 nm
<i>Volumen de inyección</i>	20 $\mu L$
<i>Columna</i>	Acclaim <sup>TM</sup> 120 C18 5 $\mu m$ 120 Å 4.6x150 mm

## **5.5. Evaluación Sensorial**

Para la evaluación sensorial de las galletas saladas se seleccionó y entrenó un panel de jueces. Las evaluaciones correspondieron a un test descriptivo utilizando escala lineal no estructurada de 10 cm y test de calidad de Karlsruhe de 9 puntos (Anexos 1 y 2).

El entrenamiento se realizó según la norma ISO 8586:2012 para el test descriptivo y en conjunto a esto se desarrolló el test de calidad de Karlsruhe con escala de 9 puntos, unificando y consensuando criterios con respecto a las características del producto. El monitoreo del desempeño del panel sensorial se realizó en base a la norma 11132:2012.

Tanto el entrenamiento, validación y análisis de muestras se realizó en el Laboratorio de Evaluación Sensorial ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, diseñado de acuerdo a la norma ISO 8589:2007.

### **5.5.1. Selección de Jueces**

Los jueces que participaron del panel pertenecen a la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Universidad de Chile y como requisito para participar debían tener aprobada la asignatura de Evaluación Sensorial junto con la disposición de asistir a todas las sesiones. Se consideró que por sus conocimientos previos ya estaban facultados para participar del panel y no se realizaron test adicionales para su selección.

### **5.5.2. Entrenamiento**

### **5.5.3. Introducción y Generación de Descriptores**

El entrenamiento se inició con una sesión de introducción, donde se expuso mediante una presentación en PowerPoint los objetivos de la memoria y específicamente del panel sensorial, junto con algunas características y defectos generales del producto a evaluar. Luego de la introducción, se presentaron tres galletas saladas distintas para la generación de descriptores:

- A. Galletas Crackelet (Costa), elaboradas por Empresas Carozzi.
- B. Galletas Cricket (Kryzpo), elaboradas por Tres Montes Luchetti.
- C. Galletas Saladas elaboradas en laboratorio según la metodología detallada en el punto anterior.

Cada muestra se presentó codificada con una letra al azar y fueron evaluadas una por una por los jueces, los que completaron una ficha describiendo de manera detallada los atributos de color, forma/apariencia, aroma, sabor y textura. Luego se procedió a una discusión en mesa redonda para seleccionar los descriptores más relevantes.

Con estos resultados se procedió a elaborar la ficha para el perfil descriptivo con escala no estructurada de 10 cm. (Anexo 1) con todos sus atributos y descriptores y la Tabla de Calidad para Galletas Saladas Horneadas de Karlsruhe (Anexo 2), basándose en una Tabla General para alimentos obtenida del curso de Evaluación Sensorial dictado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Estas dos fichas se utilizaron a lo largo de todo el proceso de evaluación sensorial.

La adición del extracto vegetal generó un color característico en las galletas, cuyo descriptor se nombró como “color violeta/grisáceo” basándose en lo desarrollado por Saavedra (2016) y que fue incorporado en la ficha de perfil descriptivo en las sesiones de entrenamiento y en la evaluación de muestras.

#### 5.5.4. Entrenamiento con Atributos Clave

A partir de la segunda sesión se presentaron muestras de galletas elaboradas en laboratorio de acuerdo a la metodología descrita anteriormente, variando distintos atributos clave, con una posterior discusión grupal de lo evaluado. En la Tabla 5. se observan las distintas muestras evaluadas en cada sesión.

Tabla 5. Condiciones de muestras evaluadas en entrenamiento de atributos clave.

Sesión	Parámetro de Variación	Muestras Evaluadas
1	Tiempo de Horneo	A. 15 minutos B. 25 minutos C. 45 minutos
2	Contenido de Sal	A. 0 g sal B. 1 g sal/100 g harina C. 2 g sal/100 g harina
3	Contenido de Extracto de Tara	A. 500 ppm B. 1500 ppm C. 3000 ppm
4	Contenido de Extracto de Tara y de Sal	A. 500 ppm, 2 g sal B. 1500 ppm, 1 g sal C. 0 ppm, 0 g sal
5	Contenido de Extracto de Tara y de Sal	A. 500 ppm, 2 g sal B. 1500 ppm, 0 g sal C. 3000 ppm, 1 g sal

Al comienzo de cada sesión se entregó una retroalimentación a cada panelista sobre su rendimiento, con el fin de unificar criterios y eliminar diferencias significativas entre jueces.

#### 5.5.5. Análisis Estadísticos

El rendimiento de los jueces en cada sesión junto con la determinación de si los atributos claves fueron identificados se analizó mediante ANOVA multifactorial de 2 vías, con un nivel de confianza del 95%. Para llevar a cabo los análisis se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI.I, fabricado por StatPoints Technologies, 2007.

### 5.5.6. Validación

Luego del entrenamiento, el panel sensorial fue validado 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, lo que incluye capacidad para detectar, identificar y medir descriptores, uso adecuado del test y repetitividad de los resultados.

La norma recomienda utilizar un pequeño set de muestras, para las cuales existan atributos que se sabe presentan diferencias. Estos atributos luego son utilizados como atributos claves para evaluar el desempeño del panel y de los jueces. Los indicadores evaluados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Indicadores evaluados de acuerdo a la norma ISO 11132:2012

Evaluación de Desempeño	Indicadores de Desempeño	Requisitos
General del panel	Discriminación	$\rho_{\text{muestra}} \leq 0,05$
	Homogeneidad	$\rho_{\text{interacción muestras-jueces}} \geq 0,05$
	Reproducibilidad	$\rho_{\text{sesiones}} \geq 0,05$ $\rho_{\text{interacción muestras-sesiones}} \geq 0,05$ $\rho_{\text{interacción jueces-sesiones}} \geq 0,05$
Por cada juez	Discriminación	$\rho_{\text{atributos clave}} \leq 0,05$

Los atributos claves a evaluar en la validación del panel fueron “color violeta-grisáceo” y “sabor salado”, ya que estos se pudieron diferenciar con mayor facilidad durante el entrenamiento y son los más relevantes, ya que, tienen directa relación con lo que se analizó posteriormente en el diseño experimental.

Se utilizaron 3 muestras elaboradas en distintas condiciones, las que fueron evaluadas en triplicado por los jueces con codificación distinta (3 sesiones durante un día con un intervalo de mínimo 15 minutos entre cada sesión). Las condiciones experimentales de cada una de las muestras de galletas se señalan en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones experimentales de las galletas saladas para validación del panel sensorial.

	Concentración de extracto de tara (ppm)	Concentración de sal (g sal/100 g harina)
Muestra 1	500	0
Muestra 2	1500	2
Muestra 3	3000	1

### 5.5.7. Evaluación de Muestras

Con el panel entrenado se procedió a evaluar 11 muestras con el fin de realizar una optimización de concentración de extracto de tara y nivel de sal, versus la respuesta sensorial y de concentración de neo-contaminantes en las galletas, lo que se detalla en el punto siguiente.

Las muestras se presentaron a los jueces al azar, evaluando de 3 a 4 muestras por sesión.

### 5.6. Diseño Experimental – Método de Superficie Respuesta

El Método de Superficie Respuesta (MSR) se basa en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas, a través de las cuales es posible modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es determinada por varias variables, siendo el objetivo de la misma optimizar esta respuesta, al determinar las condiciones óptimas de operación. Esta metodología tiene la particularidad de determinar la influencia e importancia de los parámetros estudiados y las interacciones entre estos, con un mínimo de ensayos (Montgomery, 1986).

Se usó un diseño rotacional central compuesto ( $2^2$ +estrella) con tres puntos centrales. Los factores a optimizar corresponden a la concentración de antioxidante utilizada y el contenido de sal de mesa (NaCl) en las galletas. Como respuestas se utilizaron los parámetros sensoriales de calidad y el contenido de neo-contaminantes (acrilamida e hidroximetilfurfural), para realizar una optimización conjunta maximizando la calidad sensorial y minimizando el contenido de neo-

contaminantes. Los análisis se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion XV.I.

### 5.6.1. Determinación de Límites del Diseño

Para determinar los límites del diseño se realizaron ensayos previos con respecto al extracto fenólico de tara, llegando a una concentración máxima de 3000 ppm. Concentraciones superiores del extracto no permiten una correcta disolución de este en el agua utilizada para elaborar las galletas. El límite inferior corresponde a la ausencia del extracto, en una concentración de 0 ppm.

Para el contenido de la sal, se estableció el límite máximo de acuerdo a la Ley N°20.606, 2015, de etiquetado de alimentos. Se estableció un valor de 2 g/100 g de harina, lo que permite obtener un producto cercano al límite para no clasificarse como “Alto en Sodio” hasta el año 2018. El límite inferior corresponde a ausencia de sal, en una concentración de 0 g/100 g de harina.

El diseño experimental consta de 11 puntos, para obtenerlos se ingresan los límites -1 y 1 para cada factor y para luego obtener los puntos que abarquen todo el diseño, como se observa en la Figura 10.

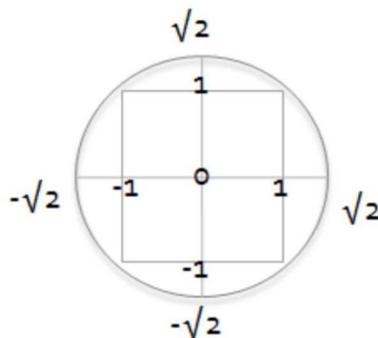


Figura 10. Representación de los puntos para realización del diseño experimental por el Método de Superficie de Respuesta (MSR).

Los puntos a utilizar en el diseño experimental, de acuerdo a los rangos señalados, se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Puntos a utilizar en el desarrollo del diseño experimental.

<b>Muestra</b>	<b>Extracto de Tara</b>	<b>Sal</b>
	ppm	g/100 g harina
<b>1</b>	1500	1
<b>2</b>	1500	1
<b>3</b>	1500	1
<b>4</b>	1500	2
<b>5</b>	2560	1,7
<b>6</b>	0	1
<b>7</b>	440	1,7
<b>8</b>	3000	1
<b>9</b>	2560	0,3
<b>10</b>	1500	0
<b>11</b>	440	0,3

### **5.6.2. Optimización del Diseño**

En el análisis del diseño experimental, se consideraron todas las respuestas con un buen ajuste en el modelo considerado por el programa estadístico (de acuerdo a su valor de  $R^2$ ) y en las que los factores tengan una influencia significativa.

Con estas aquellas respuestas que cumplan lo descrito anteriormente se realizó una optimización conjunta, obteniendo valores de las respuestas que optimicen a cada una de ellas de manera global.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Caracterización del Extracto Antioxidante de Tara

Se caracterizó el extracto obteniendo su rendimiento de acuerdo a los gramos de extracto obtenidos por gramos de vaina de tara utilizados. Adicionalmente se realizó la caracterización química del extracto obteniendo su actividad antioxidante IC<sub>50</sub> mediante una curva de decoloración según el método DPPH (Anexo 3) y polifenoles totales de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (Anexo 4), cuyos resultados se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la caracterización del extracto antioxidante de tara.

	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>EC<sub>50</sub> (µg/mL)</i>	<i>mg EAG/mL</i>
<i>Extracto de Tara</i>	42,8	8,01	663,1 ± 3,3

\*Rendimiento corresponde a la cantidad de extracto obtenido de vainas secas tamizadas de Tara. EC<sub>50</sub> corresponde a la cantidad de extracto necesaria para reducir en un 50% al radical DPPH. Capacidad antioxidante expresada como equivalentes de ácido gálico (EAG) expresada como promedio ± desviación estándar.

Con respecto al rendimiento obtenido, se encuentra dentro de lo descrito en bibliografía, donde se describe que las vainas molidas concentran contenido de taninos entre un 40-60% (p/p) (Chambi et al., 2013).

En cuanto a la caracterización química, Avilés et al. (2010) informaron valores para un macerado acuoso de vainas en polvo de IC<sub>50</sub> de 10,1 µg/mL y un contenido de polifenoles totales de 149 mg EAG/g para el mismo extracto. Extractos hidroalcohólicos de tara obtenidos por Nuñez y Quispe (2015) y Doroteo et al. (2012) presentaron valores de IC<sub>50</sub> de 4,52 y 4,97 µg/mL, respectivamente.

Adicionalmente, Bravo (2010), quien utilizó el mismo método ocupado en esta memoria para la extracción obtuvo un total de 473,4 mg EAG/g. López et al. (2011) informaron un contenido de 563,7 mg EAG/g.

Como punto de comparación, uno de los frutos con mayor contenido de antioxidantes es el arándano (*Vaccinium sp.*), que posee un contenido de polifenoles totales en un rango de 11.539 y 20.742 mg EAG/mg b.s. y una capacidad antioxidante IC<sub>50</sub> de 0,229 a 1,178 mg/g para el ensayo DPPH (Saral et al., 2015).

Con estos datos, la actividad antioxidante del extracto utilizado es algo elevado, pero aun dentro de lo esperado, siendo menor que lo informado por Avilés et al. (2010). El contenido de polifenoles totales es mayor que lo informado en la literatura, es por esto que se considera que el extracto obtenido está en condiciones de ser utilizado.

## 6.2. Evaluación Sensorial

### 6.2.1. Generación de Descriptores

Se evaluaron productos similares a galletas saladas del mercado para proceder a la generación de descriptores, mediante una discusión en mesa redonda con los panelistas.

En la Tabla 10 se resumen los descriptores más relevantes de acuerdo a cada atributo.

Tabla 10. Descriptores más relevantes para galletas saladas horneadas.

Atributo	Características más relevantes
Color	Color tostado, no excesivo.
Forma/Apariencia	Superficie con algunas burbujas, forma definida. Presencia de agujeros característicos.
Aroma	Aroma característico, equilibrado entre tostado y fermentado.
Sabor	Sabor salado equilibrado. Sabor equilibrado, característico a masa fermentada y tostado.
Textura	Aireada, algo quebradiza, seca. Crujencia característica.

### **6.2.2. Entrenamiento del Panel**

Una vez obtenidos los descriptores y elaboradas las fichas de calidad y test descriptivo junto con la tabla de calidad de Karlsruhe se procedió al entrenamiento del panel en 5 sesiones hasta que el criterio de los jueces se unificara y no presentaran diferencias significativas entre ellos. Cabe recordar que el entrenamiento se centra en el perfil descriptivo, guiándose por la norma ISO 8586:2012 y se incluye el test de calidad con el fin de familiarizar a los panelistas con éste y corregir desviaciones.

Los resultados de ANOVA multifactorial para muestras y jueces se muestra en la Tabla 11.

El entrenamiento concluyó cuando los panelistas fueron capaces de evidenciar las muestras diferentes sin presentar diferencias entre ellos. Posteriormente se procedió a la validación del panel sensorial.

Tabla 11. Resultados de entrenamiento de panel sensorial de galletas saladas.

	Parámetro de Variación	Muestras Evaluadas	Atributos	p muestra	p jueces
Sesión 1	Tiempo de Horneo	A. 15 minutos B. 25 minutos C. 45 minutos	Color externo	0,0000	0,0536
			Aroma Fermentado/Levadura	0,0091	0,3669
			Aroma Tostado	0,0028	0,4122
			Crujencia	0,1948	0,1920
			Dureza	0,3383	0,0043
			Sabor Fermentado/Levadura	0,0020	0,0556
			Sabor Tostado	0,0000	0,3575
Sesión 2	Contenido de Sal	A. 0 g sal B. 1 g sal/100 g harina C. 2 g sal/100 g harina	Color externo	0,0000	0,2330
			Aroma Fermentado/Levadura	0,9851	0,0056
			Aroma Tostado	0,0001	0,0317
			Crujencia	0,0042	0,0011
			Dureza	0,0053	0,0139
			Sabor Fermentado/Levadura	0,6104	0,0808
			Sabor Tostado	0,0000	0,0017
Sabor Salado	0,0000	0,0107			
Sesión 3	Contenido de Extracto de Tara	A. 500 ppm B. 1500 ppm C. 3000 ppm	Color Violeta Grisáceo	0,0000	0,7755
			Aroma Fermentado/Levadura	0,4037	0,0219
			Aroma Tostado	0,5552	0,0010
			Crujencia	0,0835	0,0014
			Dureza	0,0166	0,2440
			Sabor Fermentado/Levadura	0,8736	0,0664
			Sabor Tostado	0,3342	0,0006
Sabor Salado	0,522	0,0014			
Sesión 4	Contenido de Extracto de Tara y Sal	A. 500 ppm, 2 g sal B. 1500 ppm, 1 g sal C. 0 ppm, 0 g sal	Color externo	0,0511	0,3114
			Color Violeta Grisáceo	0,0000	0,1261
			Aroma Fermentado/Levadura	0,3625	0,0016
			Aroma Tostado	0,8666	0,0001
			Crujencia	0,0927	0,0031
			Dureza	0,2467	0,0106
			Sabor Fermentado/Levadura	0,7867	0,0257
			Sabor Tostado	0,0192	0,0001
Sabor Salado	0,0000	0,0000			
Sesión 5	Contenido de Extracto de Tara y Sal	A. 500 ppm, 2 g sal B. 1500 ppm, 0 g sal C. 3000 ppm, 1 g sal	Color externo	0,096	0,1951
			Color Violeta Grisáceo	0,0000	0,1411
			Aroma Fermentado/Levadura	0,2465	0,1985
			Aroma Tostado	0,8572	0,4594
			Crujencia	0,4844	0,8233
			Dureza	0,2248	0,3961
			Sabor Fermentado/Levadura	0,9737	0,1950
			Sabor Tostado	0,5208	0,5062
Sabor Salado	0,0000	0,4842			

\*Se destacan en rojo resultados con diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

### 6.2.3. Validación

La validación del panel se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la norma ISO 11132-2012. Los descriptores claves, aquellos con diferencias significativas entre muestras, correspondieron al “color violeta-grisáceo” y “sabor salado”. Con estos descriptores se evaluó el desempeño general del panel y el desempeño de cada juez por separado, según se señala en la sección de Metodología.

Luego de un análisis preliminar de los datos, se eliminaron 3 jueces de 12 jueces, ya que diferían significativamente en su evaluación. Se llegó a un total de 9 jueces, dentro de lo que la norma estipula, y las evaluaciones de éstos fueron las utilizadas para los análisis posteriores.

En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos al realizar una ANOVA multifactorial de tres vías entre jueces, muestras y sesiones.

Tabla 12. Resultados de validación para perfil descriptivo en atributos clave.

Factores	Diferencias Significativas ( $p \leq 0,05$ )	
	Color Violeta-Grisáceo	Sabor Salado
<b>Muestras</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
<b>Jueces</b>	0,5382	0,4622
<b>Sesiones</b>	0,9350	0,7563
<b>INTERACCIONES</b>		
<b>Muestras-Jueces</b>	0,4506	0,1100
<b>Muestras-Sesiones</b>	0,1212	0,7858
<b>Sesiones-Jueces</b>	0,9890	0,9492

\*Se destacan en rojo resultados con diferencias significativas.

Los resultados detallados para los descriptores clave y para los que no presentaron diferencias significativas se encuentran en Anexo 5.

De acuerdo a los resultados, los descriptores clave presentan diferencias significativas con respecto a las muestras por lo que el panel es capaz de discriminar entre éstas. Además, es un panel homogéneo, pues no presenta diferencias significativas en las interacciones entre jueces y sesiones. Finalmente, es un panel

reproducible puesto que no existen diferencias significativas entre sesiones e interacción muestras-sesiones y jueces-sesiones.

Por otra parte, para evaluar el desempeño de los jueces se realizó un análisis ANOVA de una vía a cada juez. Los resultados se presentan en la Tabla 13.

En color rojo se presentan los resultados que tienen diferencias significativas con un nivel de significancia del 5%.

Tabla 13. Resultados de ANOVA de una vía para el desempeño de jueces.

Jueces	Diferencias Significativas ( $p \leq 0,05$ )	
	Color Violeta-Grisáceo	Sabor Salado
2	SI	SI
4	SI	SI
6	SI	SI
7	SI	SI
8	SI	SI
9	SI	SI
10	SI	SI
11	SI	SI
12	SI	SI

SI: presenta diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

De acuerdo con los datos obtenidos en la tabla anterior, se concluye que todos los jueces fueron capaces de discriminar correctamente las diferencias para cada descriptor clave.

### 6.2.4. Perfil Descriptivo

Con el panel debidamente entrenado y validado se procedió a evaluar las muestras establecidas en el diseño experimental.

Los resultados obtenidos en el perfil descriptivo, utilizando una escala lineal no estructurada se grafican en la Figura 11. El detalle de los resultados se encuentra en la Tabla 14.

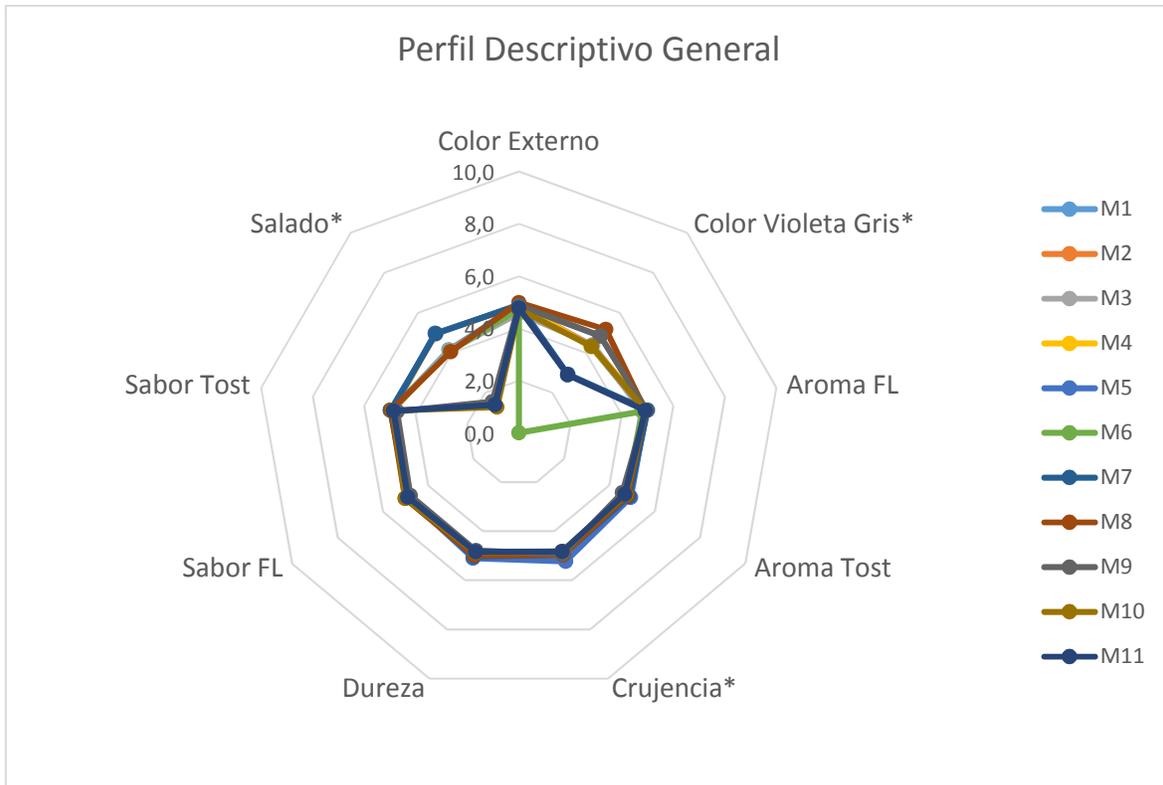


Figura 11. Gráfico radial de perfil descriptivo para muestras evaluadas. (\*) Señala descriptores con diferencias significativas.

Tabla 14. Resultados del perfil descriptivo para cada muestra, promedio de 9 jueces.

Extracto de Tara (ppm)	Sal (g/100g harina)	Color Externo	Color Violeta Gris*	Aroma F/L	Aroma Tostado	Crujencia*	Dureza	Sabor F/L	Sabor Tostado	Salado*
1500	1	4,9	4,3 <sup>a</sup>	4,9	4,7	4,9 <sup>a,b</sup>	4,8	4,8	4,9	4,2 <sup>a</sup>
1500	1	4,9	4,4 <sup>a</sup>	4,9	4,9	5,0 <sup>a,b</sup>	4,9	4,9	4,9	4,1 <sup>a</sup>
1500	1	4,6	4,4 <sup>a</sup>	4,8	4,8	5,0 <sup>a,b</sup>	4,9	4,8	4,9	4,1 <sup>a</sup>
1500	2	4,9	4,3 <sup>a</sup>	5,0	4,9	5,0 <sup>a,b</sup>	5,0	4,9	4,9	5,0 <sup>b</sup>
2560	1,7	4,9	4,8 <sup>b</sup>	5,0	4,9	5,2 <sup>a</sup>	5,1	4,9	4,9	5,0 <sup>b</sup>
0	1	4,7	0,0 <sup>d</sup>	4,8	4,7	4,9 <sup>a,b</sup>	4,9	4,9	5,0	4,1 <sup>a</sup>
440	1,7	4,9	2,9 <sup>c</sup>	5,0	4,9	5,0 <sup>a,b</sup>	5,0	4,9	5,0	4,9 <sup>b</sup>
3000	1	5,0	5,2 <sup>e</sup>	4,9	4,8	5,0 <sup>a,b</sup>	5,0	5,0	5,0	4,1 <sup>a</sup>
2560	0,3	4,9	4,9 <sup>b</sup>	4,9	4,6	4,9 <sup>a,b</sup>	4,8	4,8	4,7	1,6 <sup>c</sup>
1500	0	4,7	4,3 <sup>a</sup>	4,9	4,7	4,8 <sup>b</sup>	4,9	5,0	4,9	1,3 <sup>c</sup>
440	0,3	4,8	2,9 <sup>c</sup>	4,9	4,7	4,8 <sup>b</sup>	4,8	4,9	4,9	1,4 <sup>c</sup>

(\*) Datos que no comparten el mismo superíndice por columna presentan diferencias significativas entre ellos. Valores representan el promedio de 9 jueces.

Se observa que las principales diferencias corresponden a los descriptores que dependen de los factores que son variables en el diseño experimental: “color violeta/grisáceo” y “salado”. Por lo tanto, los rangos de concentraciones para cada uno de los factores son suficientes para generar diferencias significativas a nivel sensorial.

Otro de los descriptores que presentó diferencias significativas corresponde a la “Crujencia”. Su diferencia pudo ocasionarse debido al lapso de tiempo transcurrido entre la elaboración y la evaluación. Como la diferencia existe, pero es muy baja, su existencia puede deberse a razones ajenas a lo contemplado en el diseño experimental.

### 6.2.5. Test de Calidad

En conjunto con la evaluación del perfil descriptivo se realizó el Test de Calidad de Karlsruhe con una escala de 9 puntos.

Los resultados obtenidos se presentan la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados del Test de Calidad para cada muestra, promedio de lo evaluado por cada juez.

Extracto de Tara (ppm)	Sal (g/100g harina)	Color	Forma Apariencia	Aroma	Sabor*	Textura	Calidad Total	Grado
1500	1	8,4	8,1	8,8	7,9 <sup>a,b,c</sup>	8,4	7,9	1
1500	1	8,4	8,1	8,7	7,9 <sup>a,b,c</sup>	8,8	7,9	1
1500	1	8,6	8,0	8,4	8,2 <sup>c</sup>	8,4	8,0	1
1500	2	8,3	8,1	8,6	8,6 <sup>c</sup>	8,4	8,1	1
2560	1,7	8,1	8,1	8,2	8,6 <sup>c</sup>	8,7	8,1	1
0	1	8,4	8,2	8,2	8,1 <sup>b,c</sup>	8,7	8,1	1
440	1,7	8,3	8,1	8,3	8,4 <sup>c</sup>	8,7	8,1	1
3000	1	8,2	8,2	8,4	8,1 <sup>b,c</sup>	8,4	8,1	1
2560	0,3	8,3	8,0	8,3	7,4 <sup>a,b</sup>	8,7	7,4	1
1500	0	8,2	8,1	8,1	7,4 <sup>a,b</sup>	8,6	7,4	1
440	0,3	8,0	8,1	8,4	7,3 <sup>a</sup>	8,4	7,3	1

**(\*) Datos que no comparten el mismo superíndice por columna presentan diferencias significativas entre ellos.**

**(\*) En amarillo: atributo con menor valor para cada muestra, indica el grado de calidad. Valores representan el promedio de 9 jueces.**

Se puede observar que las muestras presentaron diferencias significativas solo en el atributo sabor lo que se explica principalmente por la variación en el contenido de sal, existiendo muestras con contenido de sal nulo lo que disminuye su calidad. Sin embargo, la diferencia en el nivel de sal no altera en gran medida la calidad general, ya que todas las muestras se ubican en el Grado 1.

En cuanto a la concentración de extracto de tara que corresponde a otro de los factores del diseño experimental, y que su efecto principal se evidencia en el color de las muestras, no presentó diferencias significativas en la calidad del producto. Esto es un buen indicador para un uso futuro de este extracto como producto

funcional, ya que su adición no afecta de manera significativa la calidad sensorial del producto final.

En la Figura 12, se observan cada una de las muestras evaluadas.

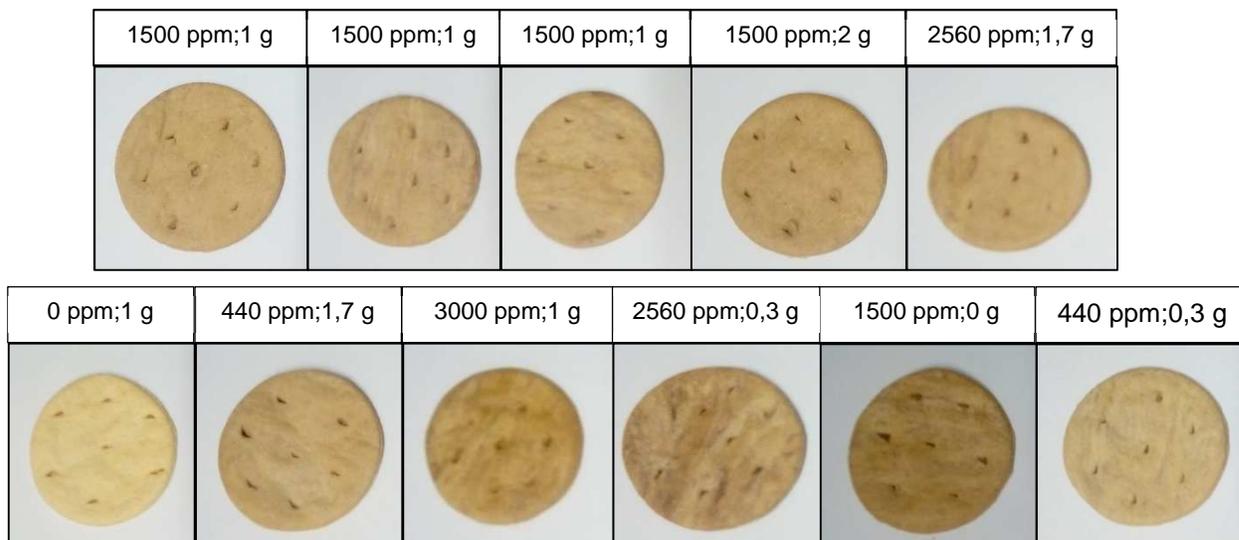


Figura 12. Muestras analizadas en diseño experimental. Se señalan las condiciones experimentales como ppm de extracto de tara y g de sal/100 g de harina respectivamente.

### 6.3. Análisis del Diseño Experimental

Se realizó un diseño experimental mediante el método de superficie respuesta (MSR) compuesto central  $2^2$ +estrella, con 3 puntos centrales.

Los resultados se analizaron mediante el método de superficie respuesta (MSR) según lo explicado en la metodología y se obtuvieron los diagramas de Pareto y superficie estimada de respuesta para cada una de las respuestas (contenido de neo-contaminantes y descriptores sensoriales). Los diagramas de Pareto y gráficos de superficie que presentan un ajuste satisfactorio fueron el contenido de acrilamida, calidad de color y calidad de sabor, y se presentan en las Figuras 13 a la 18. Las respuestas que no presentaron interacciones significativas se tratarán más adelante y sus diagramas se encuentran en Anexos 12 al 15.

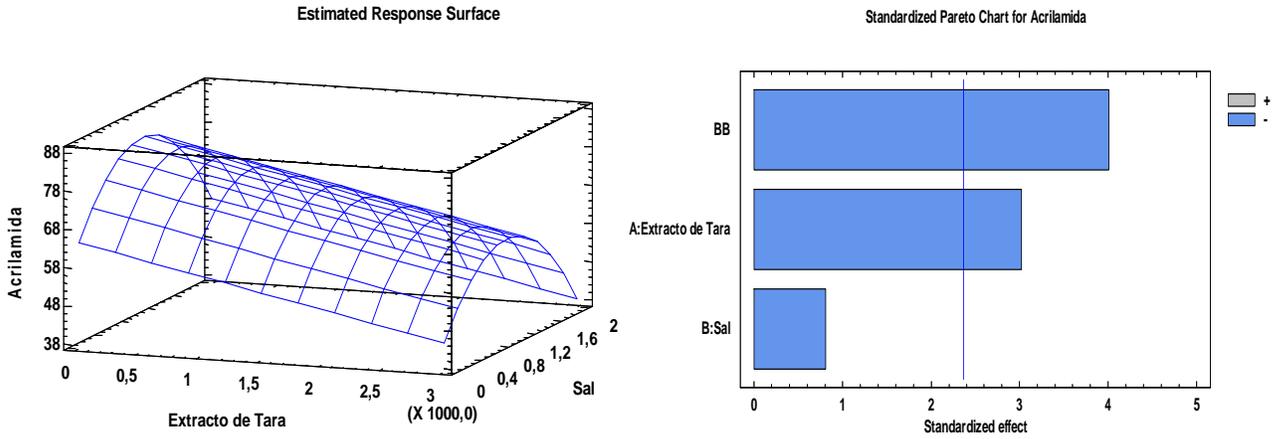


Figura 13. Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para concentración de AA.

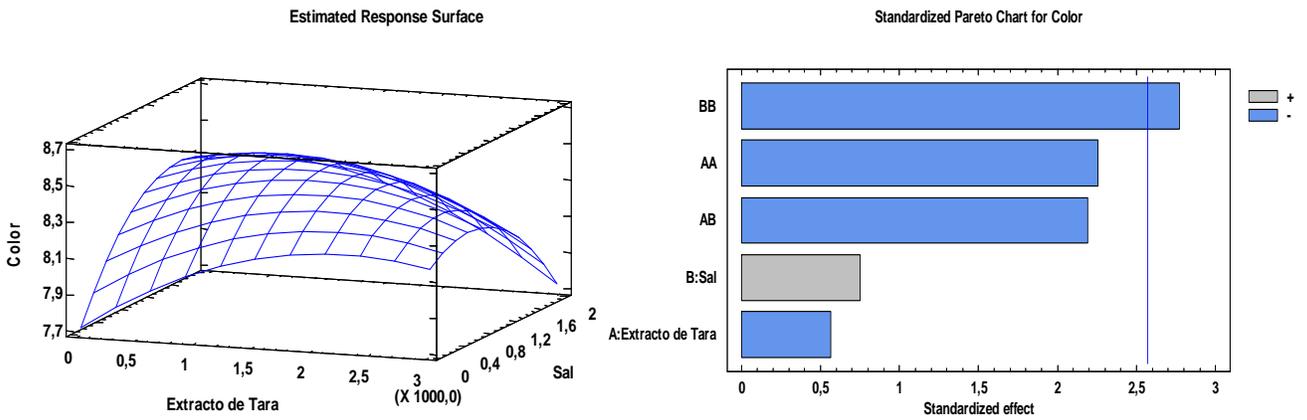


Figura 14. Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para calidad de color.

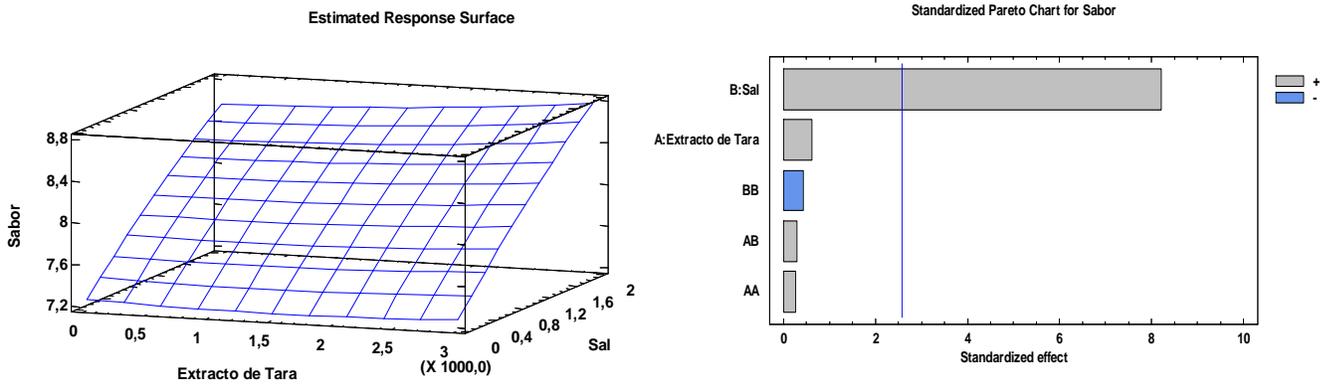


Figura 15. Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para calidad de sabor.

De los diagramas se observa una interacción negativa del contenido de sal y extracto de tara en el contenido de acrilamida, presentando un menor contenido del neo-contaminante al aumentar los valores de los factores.

En cuanto a la respuesta sensorial, el atributo calidad de color muestra una interacción negativa con respecto al contenido de sal y calidad de sabor presenta una interacción positiva con el mismo factor.

De acuerdo a los coeficientes de determinación  $R^2$ , las respuestas contenido de acrilamida, calidad de color y calidad de sabor presentan un buen ajuste. Para cada una de estas respuestas se obtuvo una ecuación que modela su comportamiento con respecto a los factores.

Los valores óptimos de cada factor, que minimizan el contenido de acrilamida y maximizan la calidad de color y la calidad de sabor, las ecuaciones y valores de  $R^2$  se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores óptimos de los factores con interacciones significativas y sus respuestas, ecuaciones y valores de  $R^2$ .

	<b>Extracto de Tara (ppm)</b>	<b>Sal (g/100 g harina)</b>	<b>Valor optimo</b>	<b>Optimización</b>	<b><math>R^2</math></b>
<b>Acrilamida</b>	2999	1,99	39 ppb	Mínimiza	78,66
<b>Sabor</b>	2999	1,99	8,8	Maximiza	93,18
<b>Color</b>	1251	1,1563	8,5	Maximiza	75,77

#### **6.4. Optimización Conjunta**

Mediante una optimización conjunta entre los factores con un buen ajuste e interacciones significativas con los factores, se obtuvieron los valores óptimos para la concentración de extracto de tara y para el contenido de sal, minimizando el contenido de acrilamida y maximizando la respuesta sensorial en calidad de color y calidad de sabor. Para las otras respuestas la influencia de los factores no fue

significativa y no se consideraron en esta optimización. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17. Valores óptimos de las respuestas y factores mediante optimización conjunta.

	Valor Óptimo
<b>Respuesta</b>	
<b>Acrilamida (ppb)</b>	53
<b>Color (Calidad 1-9)</b>	8,3
<b>Sabor (Calidad 1-9)</b>	8,6
<b>Factor</b>	
<b>Extracto de Tara (ppm)</b>	903
<b>Sal (g/100 g harina)</b>	1,99

De acuerdo a los valores óptimos se logró una mitigación del contenido de acrilamida del 39,8%, maximizando la calidad sensorial. Considerando solo la mitigación total de acrilamida, sin tomar en cuenta la calidad sensorial, se logró una mitigación máxima del 44,3%.

De acuerdo a un estudio llevado a cabo por Van Der Fels-Klerx et al. (2014) en galletas saladas se obtuvieron valores de acrilamida de 76  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en horneado a 180  $^{\circ}\text{C}$  y 142  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 190  $^{\circ}\text{C}$ , ambos por 15 min. En cuanto a la concentración de HMF ésta se encontró en un rango de 2700 y 17.500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en las mismas condiciones. En este estudio se observó el comportamiento descrito en la información bibliográfica, disminuyendo el contenido de HMF al disminuir el contenido de sal mientras que el contenido de acrilamida disminuyó al aumentar el contenido de sal. Adicionalmente observaron una dependencia del contenido de neo-contaminantes con la temperatura de horneado. En el caso de HMF su concentración fue directamente proporcional con respecto a la temperatura, mientras que para AA ellos observaron una disminución con respecto al contenido de sal sólo hasta una temperatura de 190  $^{\circ}\text{C}$ , a temperaturas mayores (200  $^{\circ}\text{C}$ ) no se observó una mitigación considerable.

La concentración promedio de acrilamida en productos similares comercializados en estados de la Unión Europea en el año 2010 fue de 333  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con un máximo

de 1337  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Van Der Fels-Klerx et al., 2014). El valor indicativo de acrilamida en galletas corresponde a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , recomendado por la Comisión Europea en 2011 (Pedreschi et al., 2013). Para HMF se han reportado concentraciones en un rango de 3.100 a 182.500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con un promedio de 14.400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Rufián-Henares & De la Cueva, 2008), mientras que en Francia la concentración en galletas se encuentra en un rango entre 500 a 74.500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Ait-Ameur, Trystram, & Birlouez-Aragon, 2007).

De acuerdo a esta información, las concentraciones de neo-contaminantes obtenidas para las muestras sin extracto de tara se encuentran dentro de un rango esperado y similares a lo desarrollado por Van Der Fels-Klerx et al. (2014) (AA=88  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; HMF=6140  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Es necesario recalcar que el contenido de neo-contaminantes varía mucho con respecto al tipo de materias primas, modo de elaboración y condiciones de proceso tales como tiempo y temperatura.

Adicionalmente, la adición de extracto antioxidante de tara resultó influir de manera significativa en la formación de acrilamida. Estudios posteriores han evidenciado resultados similares que refuerzan lo ya obtenido. 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 de acrilamida. Li et al. (2012) evaluaron la mitigación de acrilamida en galletas procesadas a 190°C por 7 minutos, utilizando 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%  $\alpha$ -tocoferol), lograron una inhibición del 63,9, 71,2 y 43%, para cada uno de los casos respectivos.

## 6.5. Mitigación del contenido de HMF

Para el contenido de 5-hidroximetilfurfural, no se observa interacción con ninguno de los dos factores, sin embargo, se observa una mitigación del contenido de HMF a menor cantidad de sal y mayor contenido de extracto de tara, solo que su comportamiento no ajusta bien a un modelo, dado su valor  $R^2$  (Anexo 10). A pesar de que el ajuste no fue bueno, si presentó el comportamiento esperado con respecto a la bibliografía, siendo menores las concentraciones de HMF a menor contenido de sal y mayor contenido de extracto de tara, reduciendo en hasta un 79% el contenido de 5-HMF. En el punto más cercano al óptimo obtenido en la sección 6.4 (440 ppm y 1,7 g sal/100 g harina) se observa una reducción del contenido de HMF de aproximadamente 32%.

Este comportamiento concuerda con lo descrito por Van Der Fels-Klerx et al. (2014), observándose una disminución del contenido de 5-HMF a menores concentraciones de sal. Se observa también la influencia del extracto antioxidante en la mitigación de este NC. La reducción del contenido para todas las muestras analizadas se observa en la Figura 19.

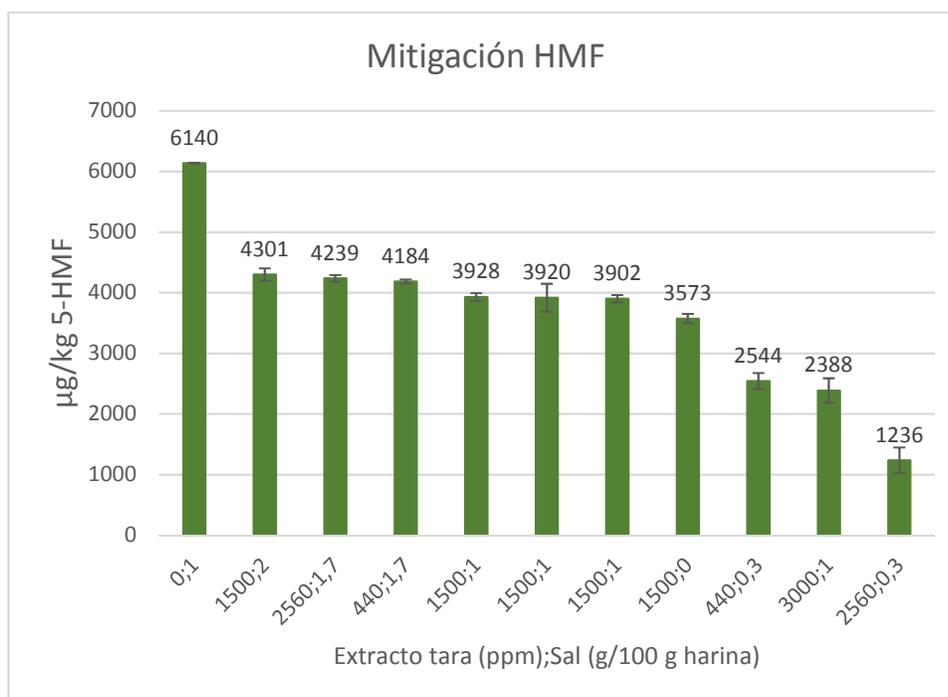


Figura 16. Concentración de 5-HMF para las muestras analizadas.

## 7. CONCLUSIONES

- Se realizó la extracción acuosa de antioxidantes de vainas rojas de tara, obteniendo un rendimiento del 42,8% con una capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales, acorde a lo descrito en la literatura.
- Se realizó el entrenamiento de un panel sensorial y posterior validación para test descriptivo según la norma ISO 8586:2012, contando con 9 jueces validados para la evaluación de muestras.
- El panel determinó la calidad sensorial de las muestras de galletas saladas, obteniendo diferencias significativas sólo en “calidad de sabor”, determinado principalmente por la variación en el contenido de sal, obteniendo una calidad sensorial Grado 1 para todas las muestras evaluadas.
- Se realizó un perfil descriptivo de las muestras, obteniendo diferencias significativas en “color violeta/grisáceo” y “sabor salado”, determinadas por la variación de los factores del diseño experimental.
- Se realizó una optimización mediante el método de superficie de respuesta, en la que se obtuvo un buen ajuste para las respuestas del contenido de acrilamida, calidad de sabor y calidad de color. En la optimización conjunta se obtuvo un contenido óptimo de extracto antioxidante de 903 ppm y de contenido de sal de 1,99 g/100 g de harina.
- La concentración mínima de acrilamida en el punto óptimo fue de 53 ppb, obteniendo una máxima mitigación del 39,8%. La calidad óptima obtenida para calidad de color y calidad de sabor fue de 8,6 y 8,3 respectivamente en escala de 9 puntos, correspondiendo a calidad muy buena.
- La influencia de los factores del diseño experimental no fue significativa en la mitigación de 5-HMF, sin embargo, se observó una reducción máxima de su contenido de un 79,9% y un 32% de reducción en el punto óptimo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Ait-Ameur, L., Trystram, G., & Birlouez-Aragon, I. (2007). Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the baking process: Validation of an extraction method. *Food Chemistry*, 98, 790–796.

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

Aziah, N.; Komathi, C. (2009). Acceptability attributes of crackers made from different types of composite flour. *International Food Research Journal*, 16, 479-482.

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

Bravo, N. (2010). 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.

Cabello I. (2009). Tara, *Caesalpinia spinosa* Kuntze, Monografía.

Capuano, E. & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology* 44, 793-810

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

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.

Claus, A., Mongili, M., Weisz, G., Schieber, A., Carle, R. (2008). Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of Cereal Science*, 47, 546–554.

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.

Fiore A., Troise A., Mogol B., Roullier V., Gourdon A., Jian S, Hamzalıođlu B., Gökmen V., Fogliano V. (2012). Controlling the Maillard Reaction by Reactant Encapsulation: Sodium Chloride in Cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (43), 10808-10814

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

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.

Gökmen, V. Şenyuva, H. (2007). Effects of some cations on the formation of acrylamide and furfurals in glucose–asparagine model system. *Eur. Food Res. Technol*, 225, 815–820.

González, C. (2015). Chile ocupa el cuarto lugar en ranking internacional de consumo de calorías. *Diario La Tercera*, Santiago, Chile. [En línea] <<http://www.latercera.com/noticia/tendencias/2015/02/659-616905-9-chile-ocupa-el-cuarto-lugar-en-ranking-internacional-de-consumo-de-calorias.shtml>> [Consultado: 28 de mayo de 2016]

H.J. Van Der Fels-Klerx, E. Capuano, H.T. Nguyen, B. Ataç Mogol, T. Kocadađlı, N. Göncüođlu Taş, A. Hamzalıođlu, M.A.J.S. Van Boekel, V. Gökmen. (2014) Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature–time profile effects and kinetics. *Food Research International*, 57, 210–217

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.

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.

Levine, R. A., Ryan, S. M. (2009). Determining the effect of calcium cations on acrylamide formation in cooked wheat products using a model system. *J. Agric. Food Chem*, 57, 6823–6829.

Ley N° 20.606. CHILE. (2015). *Composición Nutricional de los Alimentos y su Publicidad*. Ministerio de Salud, Santiago, Chile.

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.

Lindsay R., Jang S. (2005). Model systems for evaluating factors affecting acrylamide formation in deep fried foods. *Chemistry and safety of acrylamide in food*. 329–341

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.

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

Montgomery, D. (1986) *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons USA. Cap 16, 403-467.

Nguyen H., Van der Fels-Klerx H., Peters R., Van Boekel M. (2016). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: Part I: Effects of sugar type. *Food Chemistry*, 192, 575–585.

Núñez 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.

Patrignani, M. Rinaldi, G. Lupano C. (2016). In vivo effects of Maillard reaction products derived from biscuits. *Food Chemistry*, 196, 204-210.

Perez Locas, C. Yaylayan, V. A. (2008). Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *J. Agric. Food Chem*, 56, 6717–6723.

R. Avilés, J. Carrión, J. Huamán, M. Bravo, D. Rivera, N. Rojas, J. Santiago. (2010) Actividad antioxidante, polifenoles totales y contenido de taninos de extractos de tara, *Caesalpinia spinosa*. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* 13(2), 05-11.

Reglamento Sanitario de los Alimentos. (2015). Título XV “Alimentos Farináceos”. Ministerio de Salud. República de Chile.

Rufián-Henares, J. A., & De la Cueva, S. P. (2008). Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Additives and Contaminants A*, 25(11), 1306–1312.

Saral Ö., Ölmez Z., Şahin H. (2015). Comparison of Antioxidant Properties of Wild Blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L. and *Vaccinium myrtillus* L.) with Cultivated Blueberry Varieties (*Vaccinium corymbosum* L.) in Artvin Region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 3(1), 40-44.

Saavedra I. (2016). 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 de Postgrado). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

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

SOFOFA. (2014). Gasto Per Cápita en Galletas es el Tercero Más Alto de Latinoamérica. [En línea] <<http://web.sofofa.cl/noticia/gasto-per-capita-en-galletas-es-el-tercero-mas-alto-de-latinoamerica/>> [Consultado: 28 de mayo de 2016]

Toker, S.; M. Dogan, M.; Erzos, N.; Yilmaz, M. (2013). Optimization of the content of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) formed in some molasses types: HPLC-DAD analysis to determine effect of different storage time and temperature levels. *Industrial Crops and Products*, 50, 137– 144.

Van Boekel M. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24, 230– 233.

Van Der Fels-Klerx, H.J. Capuano, E. Nguyen, H.T., Ataç Mogol, B., Kocadağlı, T., Göncüoğlu T., N., Hamzalıoğlu, A.; Van Boekel V., Gökmen, M.A.J.S. (2014). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature–time profile effects and kinetics. *Food Research International*, 57, 210-217.

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.

Yaylayan V. (1997) Classification of the Maillard Reaction: A conceptual Approach. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 13-18.

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*, 325-353

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.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1: Ficha de evaluación para perfil descriptivo.

#### ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE GALLETAS SALADAS

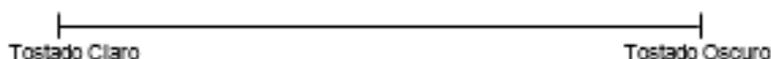
Nombre:

Fecha:

Evalúe cada muestra para todos los atributos mencionados, basándose en la definición de cada uno de ellos.

#### APARIENCIA

Color externo: Grado de intensidad del color externo.

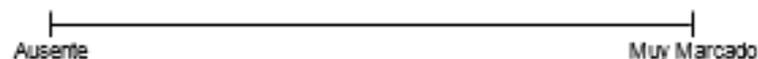


Color Violeta/Grisáceo: Grado de intensidad del color externo de tonalidad "Violeta/Grisáceo". Característico de producto horneado con adición de extracto de tara.



#### AROMA

Fermentado/Levadura: Acerque la muestra a la nariz para percibir el aroma. Aroma característico del proceso de fermentación de la masa.



Tostado: Acerque la muestra a la nariz para percibir el aroma. Aroma característico que se produce durante el horneado.



#### TEXTURA

Crujencia: Coloque la galleta entre los dientes incisivos y muérdala, el primer sonido corresponde a la ~~crujencia~~ ~~crujencia~~.



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



#### SABOR

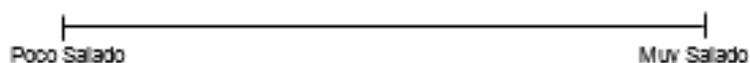
Fermentado/Levadura: Sabor característico de producto que pasa por un proceso de fermentación.



Tostado: Sabor característico adquirido en el proceso de horneado.



Intensidad de Gusto Salado: Sabor aportado por el contenido de sal en la galleta.



**9.2. Anexo 2: Tabla y ficha de evaluación para test de calidad de Karlsruhe.**

**Test de Karlsruhe**  
**Calidad de Galletas Saladas**

**Nombre:**

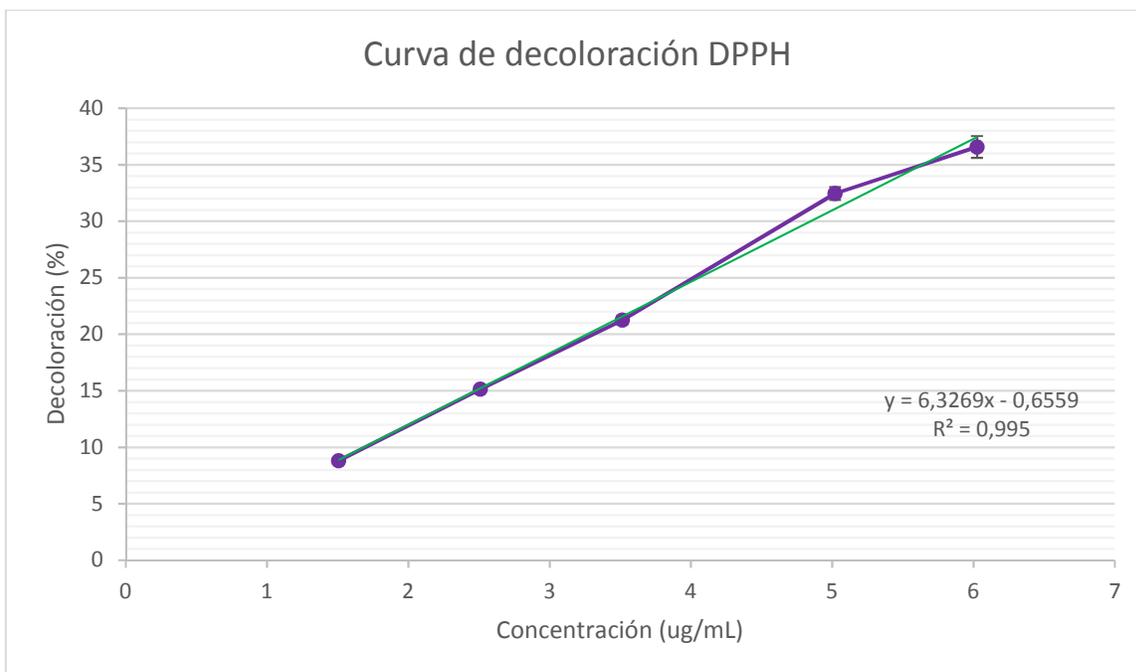
**Fecha:**

Muestra	Característica	Puntaje	Observaciones
	Color		
	Forma/Apariencia		
	Aroma		
	Sabor		
	Textura		
Muestra	Característica	Puntaje	Observaciones
	Color		
	Forma/Apariencia		
	Aroma		
	Sabor		
	Textura		
Muestra	Característica	Puntaje	Observaciones
	Color		
	Forma/Apariencia		
	Aroma		
	Sabor		
	Textura		

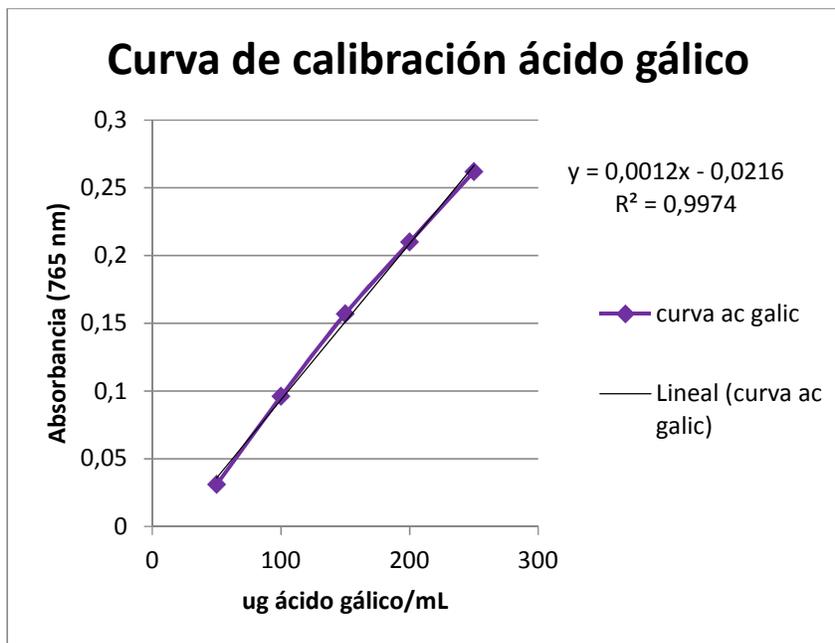
**TABLA PARA VALORACIÓN DE CALIDAD DE GALLETAS SALADAS DE KARLSRUHE**

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 Tostado característico, uniforme, homogéneo.	8 Uniforme, típico, levemente tostada.	7 Típico, tostado algo pálido u oscuro, aun uniforme y homogéneo.	6 Ligeramente alterado. Ej: algo claro o algo oscuro, algo desuniforme, aun característico.	5 Alterado, algo descompensado, tostado muy claro o muy oscuro. Desuniforme, no homogéneo.	4 Muy descompensado, presencia de manchas no características.	3 Demasiado quemada o demasiado pálida (con apariencia cruda). Color atípico.	2 Color totalmente atípico. Presenta signos de descomposición.	1 Inaceptable, totalmente alterada, atípica, en estado de descomposición.
<b>Apariencia/Forma</b>	Completamente bien conservada. Lisa, plana, redonda, bien homeada.	Muy bien conservada, algunas unidades ligeramente modificadas, aun redonda.	Algo abultadas, superficie poco lisa, aun redonda.	Superficie ligeramente modificada. Forma algo modificada, ovalada, no redonda, abultada o englobada en la superficie.	Forma asimétrica, abultada o arrugada en su superficie. Presencia de grietas o defectos similares.	Forma muy modificada, poco característica, volumen heterogéneo.	Desagradable, volumen muy heterogéneo. Forma muy asimétrica.	Muy alterada, rota, con deformaciones.	Completamente alterada.
<b>Olor</b>	Muy característico, equilibrado, intenso.	Característico, típico, algo leve de olor a levadura, poco intenso.	Característico, típico, leve olor a levadura, poco intenso.	Poco equilibrado, algo plano, aun característico, más intenso a levadura o a harina.	Aroma plano, poco equilibrado, intenso a levadura o a harina, leve a materia grasa.	Alterado, algo intenso a levadura o a masa, algo intenso a materia grasa, aun aceptable.	Claramente alterado, atípico, aroma algo ácido, materia grasa en mal estado.	No característico, alterado, algo ácido.	Deteriorado, aroma a descompuesto.
<b>Sabor</b>	Muy característico. Muy equilibrado, típico.	Característico, con sabor a tostado, equilibrado.	Característico, aun equilibrado. Algo salado o leve falta de sal. Aun típico con leve sabor a tostado.	Algo plano, poco equilibrado, aun característico y aceptable. Algo salado o leve falta de sal. Leve sabor a tostado.	Plano, no redondeado, aun aceptable, con algo de sabor a materia grasa. Exceso de tostado.	Poco característico, insípido, sabor a materia grasa, algo dañado. Exceso de fermentado.	Alterado, no característico desagradable, ácido, muy tostado o algo crudo, Mohoso.	Alterado, característico desagradable. Materia grasa rancia. Sabor descompuesto.	Extraño, desagradable, fermentado. Deteriorado.
<b>Textura</b>	Muy característica, crujiente, dureza característica.	Característica, menos crujiente, dureza adecuada. Típica.	Normal, típica, levemente blanda o dura, algo menos crujiente. Aun característica.	Ligeramente alterada. Algo blanda o algo dura. Aun crujiente. Algo seca.	Alterada, algo dura, con algo de sequedad. Textura seca.	Claramente alterada. Muy dura, con algo de sequedad.	Alterada, muy dura, con algo de sequedad o masa cruda húmeda, algo chidosa.	Desagradable, modificada, excesivamente dura o muy chidosa.	Completamente alterada. Inaceptable.

### 9.3. Anexo 3: Curva de decoloración de DPPH



### 9.4. Anexo 4: Curva de calibración para polifenoles totales.



Curva de calibración ácido gálico

ug/mL	50	100	150	200	250
A	0,031	0,096	0,157	0,21	0,262

## 9.5. Anexo 5: Resultados ANOVA multifactorial de tres vías para validación.

**Analysis of Variance for Color Violeta Gris - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,273333	8	0,0341667	0,89	0,5382
B:Muestra	94,2452	2	47,1226	1223,38	0,0000
C:Sesion	0,00518519	2	0,00259259	0,07	0,9350
INTERACTIONS					
AB	0,637037	16	0,0398148	1,03	0,4506
AC	0,203704	16	0,0127315	0,33	0,9890
BC	0,305185	4	0,0762963	1,98	0,1212
RESIDUAL	1,23259	32	0,0385185		
TOTAL (CORRECTED)	96,9022	80			

**Analysis of Variance for Salado - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,197778	8	0,0247222	0,99	0,4622
B:Muestra	196,49	2	98,2448	3933,43	0,0000
C:Sesion	0,0140741	2	0,00703704	0,28	0,7563
INTERACTIONS					
AB	0,661481	16	0,0413426	1,66	0,1100
AC	0,183704	16	0,0114815	0,46	0,9492
BC	0,042963	4	0,0107407	0,43	0,7858
RESIDUAL	0,799259	32	0,0249769		
TOTAL (CORRECTED)	198,389	80			

**Analysis of Variance for Color Externo - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,183951	8	0,0229938	1,21	0,3225
B:Muestra	0,0565432	2	0,0282716	1,49	0,2401
C:Sesion	0,120247	2	0,0601235	3,17	0,0553
INTERACTIONS					
AB	0,330123	16	0,0206327	1,09	0,4034
AC	0,22642	16	0,0141512	0,75	0,7278
BC	0,200494	4	0,0501235	2,65	0,0514
RESIDUAL	0,606173	32	0,0189429		
TOTAL (CORRECTED)	1,72395	80			

**Analysis of Variance for Aroma FL - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,308889	8	0,0386111	1,97	0,0836
B:Muestra	0,000740741	2	0,00037037	0,02	0,9813
C:Sesion	0,00962963	2	0,00481481	0,25	0,7839
INTERACTIONS					
AB	0,419259	16	0,0262037	1,33	0,2364
AC	0,39037	16	0,0243981	1,24	0,2909
BC	0,0585185	4	0,0146296	0,75	0,5684
RESIDUAL	0,628148	32	0,0196296		
TOTAL (CORRECTED)	1,81556	80			

**Analysis of Variance for Aroma Tost - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,144444	8	0,0180556	1,04	0,4296

B:Muestra	0,00962963	2	0,00481481	0,28	0,7602
C:Sesion	0,000740741	2	0,00037037	0,02	0,9790
INTERACTIONS					
AB	0,201481	16	0,0125926	0,72	0,7507
AC	0,163704	16	0,0102315	0,59	0,8698
BC	0,118519	4	0,0296296	1,70	0,1738
RESIDUAL	0,557037	32	0,0174074		
TOTAL (CORRECTED)	1,19556	80			

**Analysis of Variance for Crujencia - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,0866667	8	0,0108333	0,76	0,6398
B:Muestra	0,0585185	2	0,0292593	2,05	0,1451
C:Sesion	0,0155556	2	0,00777778	0,55	0,5849
INTERACTIONS					
AB	0,357037	16	0,0223148	1,56	0,1371
AC	0,166667	16	0,0104167	0,73	0,7439
BC	0,0481481	4	0,012037	0,84	0,5077
RESIDUAL	0,456296	32	0,0142593		
TOTAL (CORRECTED)	1,18889	80			

**Analysis of Variance for Dureza - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,216543	8	0,0270679	1,40	0,2350
B:Muestra	0,00765432	2	0,00382716	0,20	0,8216
C:Sesion	0,0106173	2	0,00530864	0,27	0,7619
INTERACTIONS					
AB	0,15679	16	0,00979938	0,51	0,9250
AC	0,233827	16	0,0146142	0,75	0,7201
BC	0,0493827	4	0,0123457	0,64	0,6394
RESIDUAL	0,619506	32	0,0193596		
TOTAL (CORRECTED)	1,29432	80			

**Analysis of Variance for Sabor FL - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,100247	8	0,0125309	0,71	0,6784
B:Muestra	0,0609877	2	0,0304938	1,73	0,1926
C:Sesion	0,0195062	2	0,00975309	0,55	0,5796
INTERACTIONS					
AB	0,23679	16	0,0147994	0,84	0,6333
AC	0,204938	16	0,0128086	0,73	0,7456
BC	0,0864198	4	0,0216049	1,23	0,3181
RESIDUAL	0,562469	32	0,0175772		
TOTAL (CORRECTED)	1,27136	80			

**Analysis of Variance for Sabor Tost - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	0,177284	8	0,0221605	1,31	0,2752
B:Muestra	0,0520988	2	0,0260494	1,54	0,2306
C:Sesion	0,0187654	2	0,00938272	0,55	0,5803
INTERACTIONS					
AB	0,294568	16	0,0184105	1,09	0,4060
AC	0,147901	16	0,00924383	0,55	0,9004
BC	0,0708642	4	0,017716	1,05	0,3995

RESIDUAL	0,542469	32	0,0169522		
TOTAL (CORRECTED)	1,30395	80			

## 9.6. Anexo 6: Resultados ANOVA de una vía para validación de desempeño de jueces

### Juez 2

ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10,7089	2	5,35444	71,93	0,0001
Within groups	0,446667	6	0,0744444		
Total (Corr.)	11,1556	8			

ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	23,6022	2	11,8011	2655,25	0,0000
Within groups	0,0266667	6	0,00444444		
Total (Corr.)	23,6289	8			

### Juez 4

ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7,71556	2	3,85778	267,08	0,0000
Within groups	0,0866667	6	0,0144444		
Total (Corr.)	7,80222	8			

ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	26,9422	2	13,4711	404,13	0,0000
Within groups	0,2	6	0,0333333		
Total (Corr.)	27,1422	8			

### Juez 6

ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11,06	2	5,53	87,32	0,0000
Within groups	0,38	6	0,0633333		
Total (Corr.)	11,44	8			

ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	20,5156	2	10,2578	839,27	0,0000
Within groups	0,0733333	6	0,0122222		
Total (Corr.)	20,5889	8			

### Juez 7

ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	12,3356	2	6,16778	277,55	0,0000
Within groups	0,133333	6	0,0222222		
Total (Corr.)	12,4689	8			

ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	21,98	2	10,99	659,40	0,0000
Within groups	0,1	6	0,0166667		
Total (Corr.)	22,08	8			

## Juez 8

### ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9,84667	2	4,92333	138,47	0,0000
Within groups	0,213333	6	0,0355556		
Total (Corr.)	10,06	8			

### ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	19,8022	2	9,90111	742,58	0,0000
Within groups	0,08	6	0,0133333		
Total (Corr.)	19,8822	8			

## Juez 9

### ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11,8689	2	5,93444	232,22	0,0000
Within groups	0,153333	6	0,0255556		
Total (Corr.)	12,0222	8			

### ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	22,9622	2	11,4811	607,82	0,0000
Within groups	0,113333	6	0,0188889		
Total (Corr.)	23,0756	8			

## Juez 10

### ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9,12889	2	4,56444	373,45	0,0000
Within groups	0,0733333	6	0,0122222		
Total (Corr.)	9,20222	8			

### ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	18,6822	2	9,34111	600,50	0,0000
Within groups	0,0933333	6	0,0155556		
Total (Corr.)	18,7756	8			

## Juez 11

### ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11,4022	2	5,70111	190,04	0,0000
Within groups	0,18	6	0,03		
Total (Corr.)	11,5822	8			

### ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	21,1822	2	10,5911	317,73	0,0000
Within groups	0,2	6	0,0333333		
Total (Corr.)	21,3822	8			

## Juez 12

### ANOVA Table for Color Violeta Gris by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10,8156	2	5,40778	405,58	0,0000
Within groups	0,08	6	0,0133333		
Total (Corr.)	10,8956	8			

#### ANOVA Table for Salado by Muestra

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	21,4822	2	10,7411	420,30	0,0000
Within groups	0,153333	6	0,0255556		
Total (Corr.)	21,6356	8			

## 9.7. Anexo 7: Resultados ANOVA multifactorial de dos vías para perfil descriptivo

#### Analysis of Variance for Color Violeta Gris - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	193,797	10	19,3797	696,40	0,0000
B:Juez	0,242626	8	0,0303283	1,09	0,3789
RESIDUAL	2,22626	80	0,0278283		
TOTAL (CORRECTED)	196,266	98			

#### Analysis of Variance for Crujencia - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	1,09859	10	0,109859	2,24	0,0235
B:Juez	0,587273	8	0,0734091	1,49	0,1725
RESIDUAL	3,93051	80	0,0491313		
TOTAL (CORRECTED)	5,61636	98			

#### Analysis of Variance for Salado - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	189,602	10	18,9602	467,72	0,0000
B:Juez	0,508081	8	0,0635101	1,57	0,1481
RESIDUAL	3,24303	80	0,0405379		
TOTAL (CORRECTED)	193,354	98			

#### Analysis of Variance for Color Externo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	1,12949	10	0,112949	1,32	0,2333
B:Juez	0,686263	8	0,0857828	1,00	0,4398
RESIDUAL	6,83596	80	0,0854495		
TOTAL (CORRECTED)	8,65172	98			

#### Analysis of Variance for Aroma FL - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	0,407677	10	0,0407677	0,84	0,5927
B:Juez	0,530909	8	0,0663636	1,37	0,2242
RESIDUAL	3,88687	80	0,0485859		
TOTAL (CORRECTED)	4,82545	98			

#### Analysis of Variance for Aroma Tost - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					

A:Muestra	1,06889	10	0,106889	1,05	0,4140
B:Juez	0,443838	8	0,0554798	0,54	0,8209
RESIDUAL	8,17838	80	0,10223		
TOTAL (CORRECTED)	9,69111	98			

#### Analysis of Variance for Dureza - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	0,86303	10	0,086303	1,50	0,1543
B:Juez	0,15899	8	0,0198737	0,35	0,9452
RESIDUAL	4,59879	80	0,0574848		
TOTAL (CORRECTED)	5,62081	98			

#### Analysis of Variance for Sabor FL - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	0,431313	10	0,0431313	0,94	0,5034
B:Juez	0,584444	8	0,0730556	1,59	0,1412
RESIDUAL	3,67778	80	0,0459722		
TOTAL (CORRECTED)	4,69354	98			

#### Analysis of Variance for Sabor Tost - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Muestra	0,452121	10	0,0452121	0,88	0,5523
B:Juez	0,702626	8	0,0878283	1,72	0,1074
RESIDUAL	4,09515	80	0,0511894		
TOTAL (CORRECTED)	5,2499	98			

## 9.8. Anexo 8: Resultados ANOVA multifactorial de dos vías para test de calidad

#### Analysis of Variance for Color - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	2,74747	8	0,343434	1,70	0,1106
B:Muestra	2,40404	10	0,240404	1,19	0,3092
RESIDUAL	16,1414	80	0,201768		
TOTAL (CORRECTED)	21,2929	98			

#### Analysis of Variance for Forma Apariencia - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	1,23232	8	0,15404	1,52	0,1630
B:Muestra	0,444444	10	0,0444444	0,44	0,9229
RESIDUAL	8,10101	80	0,101263		
TOTAL (CORRECTED)	9,77778	98			

#### Analysis of Variance for Aroma - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	2,92929	8	0,366162	1,36	0,2262
B:Muestra	3,57576	10	0,357576	1,33	0,2293
RESIDUAL	21,5152	80	0,268939		
TOTAL (CORRECTED)	28,0202	98			

**Analysis of Variance for Sabor - Type III Sums of Squares**

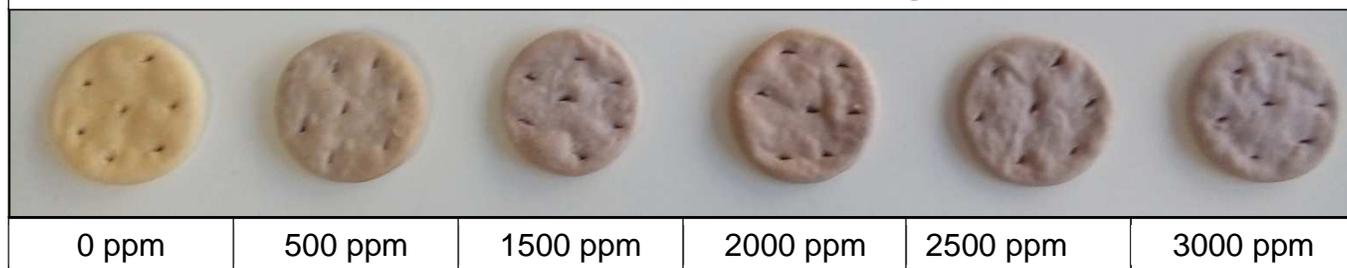
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	2,18182	8	0,272727	1,36	0,2268
B:Muestra	17,7778	10	1,77778	8,87	0,0000
RESIDUAL	16,0404	80	0,200505		
TOTAL (CORRECTED)	36,0	98			

**Analysis of Variance for Textura - Type III Sums of Squares**

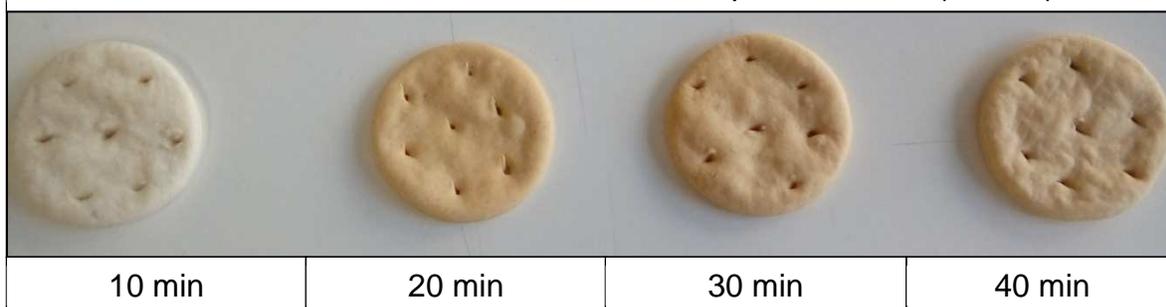
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Juez	2,50505	8	0,313131	1,23	0,2932
B:Muestra	1,43434	10	0,143434	0,56	0,8392
RESIDUAL	20,3838	80	0,254798		
TOTAL (CORRECTED)	24,3232	98			

**9.9. Anexo 9: Escalas de colores de referencia para evaluación sensorial.**

Escala de concentración de extracto de tara en galletas saladas



Escala de color tostado de acuerdo al tiempo de cocción (180 °C)



### 9.10. Anexo 10: Datos de factores y respuestas para diseño experimental.

M	Tara	Sal	HMF	Acrilamida	Color	Forma/Apariencia	Aroma	Sabor	Textura
	ppm	g/100 g harina	ppb (ug/kg)	ppb (ug/kg)	(1-9)	(1-9)	(1-9)	(1-9)	(1-9)
1	1500	1	3902	70	8,4	8,1	8,8	7,9	8,4
2	1500	1	3928	67	8,4	8,1	8,7	7,9	8,8
3	1500	1	3920	68	8,6	8,0	8,4	8,2	8,4
4	1500	2	4301	49	8,3	8,1	8,6	8,6	8,4
5	2560	1,7	4239	50	8,1	8,1	8,2	8,6	8,7
6	0	1	6140	88	8,4	8,2	8,2	8,1	8,7
7	440	1,7	4184	71	8,3	8,1	8,3	8,4	8,7
8	3000	1	2388	76	8,2	8,2	8,4	8,1	8,4
9	2560	0,3	1236	53	8,3	8,0	8,3	7,4	8,7
10	1500	0	3573	57	8,2	8,1	8,1	7,4	8,6
11	440	0,3	2544	72	8,0	8,1	8,4	7,3	8,4

### 9.11. Anexo 11: Resumen de análisis de diseño experimental MSR

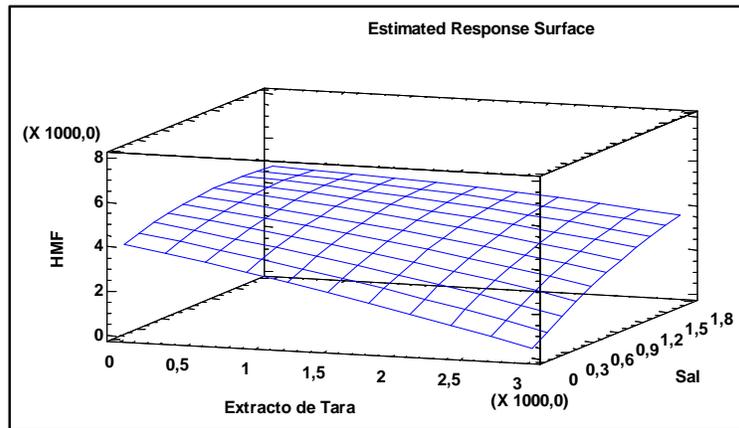
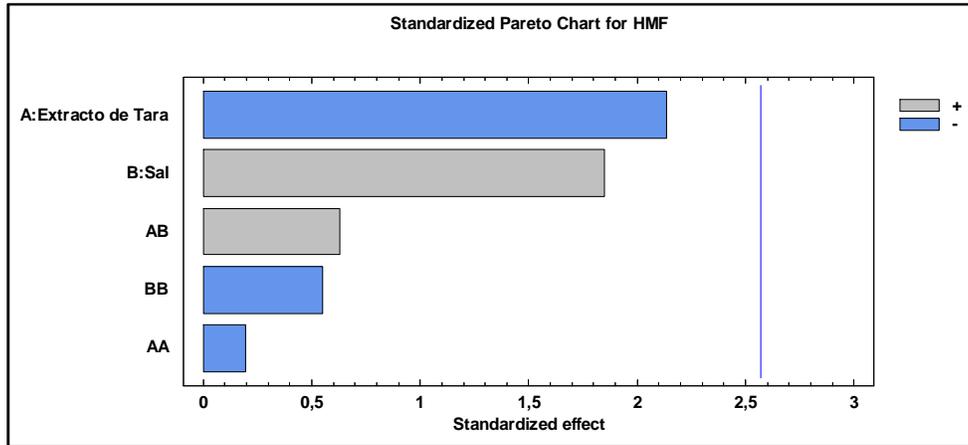
Model	HMF	Acrilamida	Color	Forma Apariencia	Aroma	Sabor	Textura
Transformation	none	none	none	none	none	none	none
Model d.f.	5	3	5	5	5	5	5
P-value	0,2798	0,0095	0,1182	0,5177	0,4292	0,0061	0,9782
Error d.f.	5	7	5	5	5	5	5
Std. error	1085,35	6,66843	0,114195	0,0639009	0,209721	0,172013	0,216656
R-squared	63,45	78,66	75,77	48,96	54,18	93,18	11,59
Adj. R-squared	26,90	69,52	51,54	0,00	8,37	86,36	0,00

$$\text{Acrilamida} = 64,2561 - 0,00671822 * \text{Extracto de Tara} + 41,0829 * \text{Sal} - 21,9088 * \text{Sal}^2$$

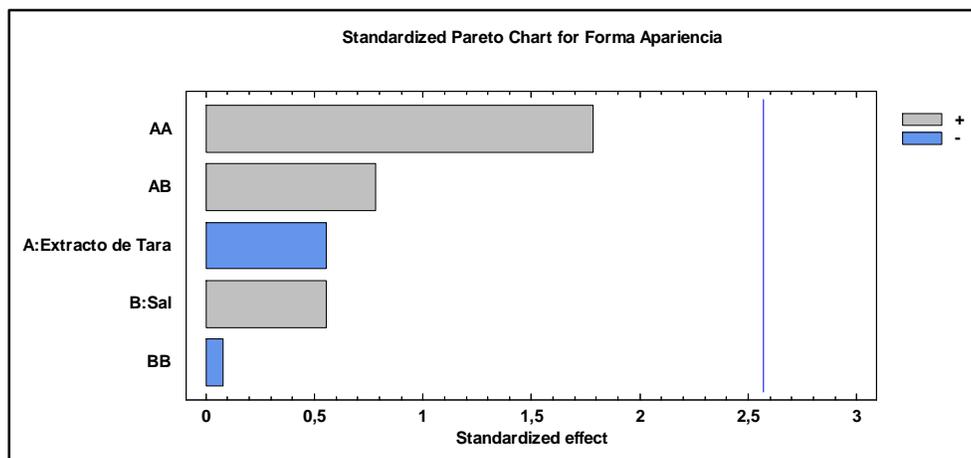
$$\begin{aligned} \text{Sabor} = & 7,25748 - 0,0000483776 * \text{Extracto de Tara} + 0,790772 * \text{Sal} + 1,66874E - 8 * \text{Extracto de Tara}^2 \\ & + 0,0000336927 * \text{Extracto de Tara} * \text{Sal} - 0,0637756 * \text{Sal}^2 \end{aligned}$$

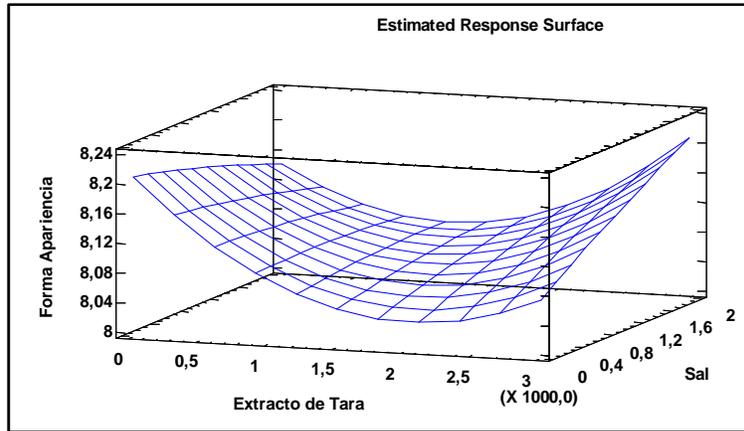
$$\begin{aligned} \text{Color} = & 7,71416 + 0,000436151 * \text{Extracto de Tara} + 0,840024 * \text{Sal} - 9,64161E - 8 * \text{Extracto de Tara}^2 \\ & - 0,000168464 * \text{Extracto de Tara} * \text{Sal} - 0,272109 * \text{Sal}^2 \end{aligned}$$

**9.12. Anexo 12: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para HMF**

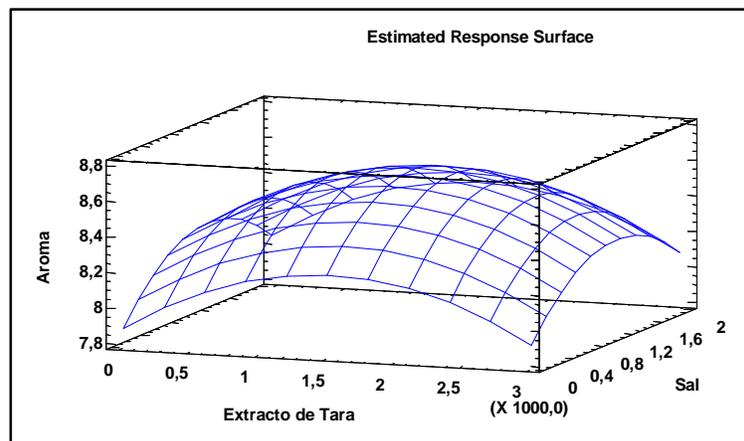
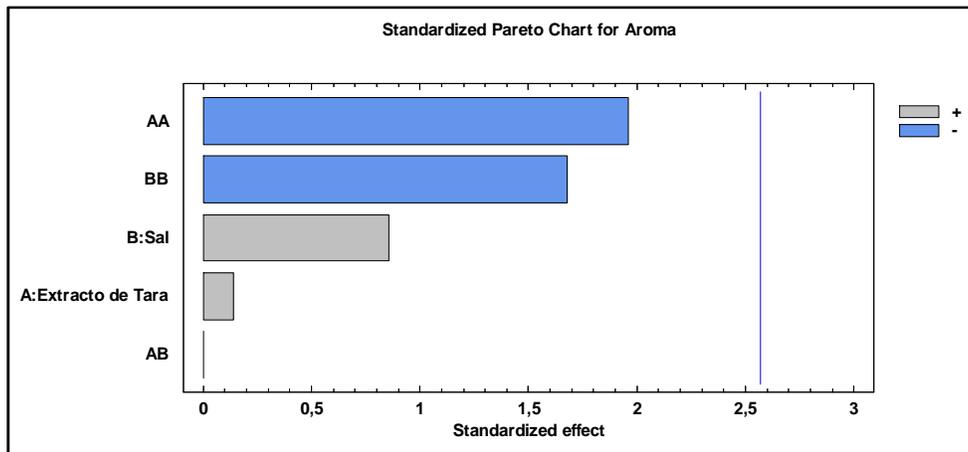


**9.13. Anexo 13: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para Forma/Apariencia**

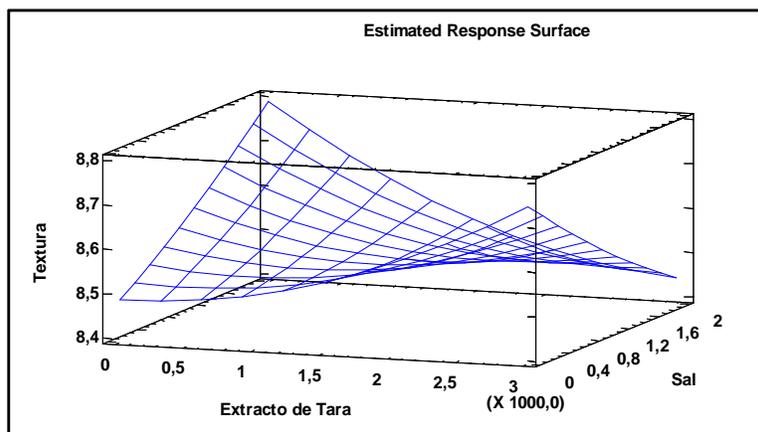
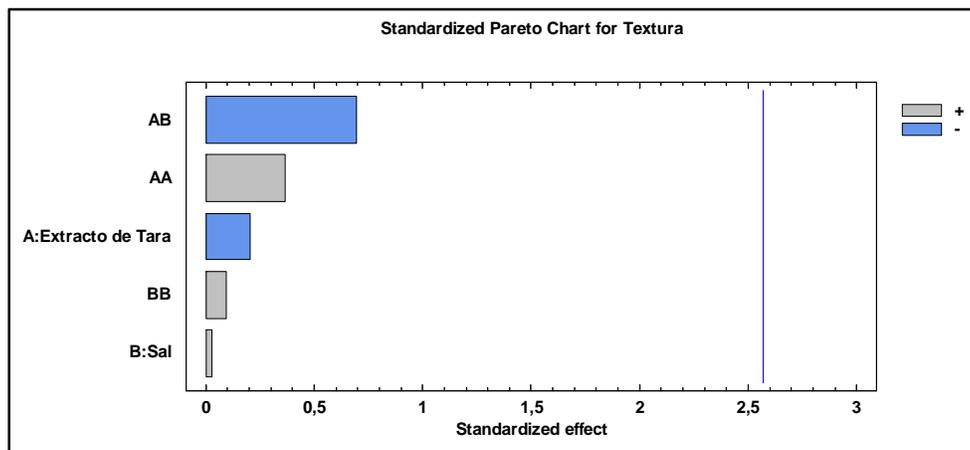




**9.14. Anexo 14: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para Aroma**



## 9.15. Anexo 15: Diagrama de Pareto y superficie estimada de respuesta para Textura



## 9.16. Anexo 16: Resumen de análisis para optimización conjunta

Response Values at Optimum

Response	Optimized	Prediction	Lower 95,0% Limit	Upper 95,0% Limit	Desirability
HMF	no	4577,1	2079,47	7074,74	0,318698
Acrilamida	yes	53,1861	40,546	65,8263	0,892663
Color	yes	8,32075	8,05796	8,58354	0,534582
Forma Apariencia	no	8,0825	7,93545	8,22956	0,412523
Aroma	no	8,36647	7,88385	8,84908	0,380664
Sabor	yes	8,609	8,21316	9,00484	0,975172
Textura	no	8,63209	8,13352	9,13067	0,580227

Optimized desirability = 0,774927