

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE POLIFENOLES Y FORMACIÓN DE
HIDROXIMETILFURFURAL EN EXTRACTOS DE VAINAS DE TARA
(*Caesalpinia spinosa*) SOMETIDOS A TRATAMIENTOS TÉRMICOS**

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

FLORENCIA SOLEDAD MORALES PERALTA

Director de Tesis: Nalda Romero Palacios

Co-director de Tesis: Rommy Zúñiga Pardo

Co-director de Tesis: M^a Salomé Mariotti Celis

Santiago - Chile

Enero 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

FLORENCIA SOLEDAD MORALES PERALTA

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

Director de Tesis:

Dra. Nalda Romero Palacios

Co-director de Tesis:

Dr. Rommy Zúñiga Pardo

Co-director de Tesis:

Dra. M^a Salomé Mariotti Celis

Comisión evaluadora de Tesis:

Dr. Roberto Lemus Mondaca

Dr. Ricardo Villalobos Carvajal

Dr. Claudio Olea Azar

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”

Resumen

El objetivo de este estudio consistió, en una primera etapa, en evaluar el proceso de extracción sólido-líquido de vainas de tara, en términos de obtener un extracto con mayor contenido de polifenoles totales (PFT), menor cantidad de azúcares reductores (AR) y mayor capacidad antioxidantes (CaOX). La extracción de componentes solubles, se realizó desde vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*), una especie nativa del Perú, ampliamente distribuida en América Latina. Las vainas de tara fueron recolectadas en la comuna de la Ligua, ubicada en la región de Valparaíso, Chile. El proceso de extracción sólido-líquido se realizó, bajo dos temperaturas (25 y 35 °C), utilizando soluciones hidroalcohólicas, con agua acidificada-etanol como disolvente a diferentes concentraciones (10% y 40% v/v de etanol). A modo de control, se empleó acetona al 60% y agua acidificada para evaluar el efecto del co-solvente en la lixiviación de los compuestos de interés en el extracto. El extracto obtenido fue caracterizado químicamente según su contenido de PFT, CaOX, AR y HMF. Para determinar el contenido de polifenoles se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, en donde se obtuvo 594 (mg EAG/g tara bs); la cuantificación de AR se realizó mediante el uso de HPLC acoplado a un detector IR, en donde se obtuvo un contenido de 1,68 de fructosa y 0,22 de glucosa en (mg/g sólido tara); HMF se determinó mediante el método HPLC acoplado a un detector DAD, en donde no se detectó en esta primera instancia por la condición de temperatura en la que se realizó la extracción; la CaOX se determinó mediante el método radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y mediante el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), alcanzando 8735 (uMET/g tara bs) y 4062 (uMET/g tara bs), respectivamente. En la segunda etapa, el extracto se sometió a degradación térmica a cuatro temperaturas: 60, 90, 120, 150 °C, por un tiempo máximo de 30 min. Luego, se evaluó el comportamiento en la degradación/formación de PFT, AR, HMF, CaOX de cada cinética. Se evidenció la resistencia térmica de los PFT y de su CaOX, en donde la formación de HMF fue baja, lo que permite concluir que el extracto de vaina de tara puede ser una alternativa para la obtención de extractos de alto valor agregado, cuya demanda actual es creciente por su utilidad como suplemento alimenticio, su aplicación farmacéutica y como sustituto de antioxidantes sintéticos empleados en la industria de alimentos.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
2.1 Tara	6
2.2 Neo-contaminantes	8
2.3 Tecnologías de mitigación	15
2.4 Cinéticas de degradación	16
3. Hipótesis.....	20
4. Objetivos.....	20
4.1 Objetivo General	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5. Metodología	21
5.1 Materia prima	21
5.2 Obtención del polvo de tara.....	21
5.3 Preparación de las soluciones hidroalcohólicas.....	21
5.4 Análisis fisicoquímicos al extracto de tara	23
5.4.1 Determinación de polifenoles totales: método de Folin–Ciocalteu	23
5.4.2 Determinación de azúcares reductores.....	24
5.4.3. Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF)	24
5.4.4 Determinación de capacidad antioxidante mediante metodología DPPH	24
5.4.5 Determinación de capacidad antioxidante mediante metodología ORAC	25
5.4.6. Condiciones experimentales y análisis estadístico de los resultados.....	25
5.4.7. Estudio cinético de degradación	28
6. Resultados y Discusión.....	29
6.1 Determinación de polifenoles totales (PFT)	29
6.2 Determinación de azúcares reductores (AR) (fructosa-glucosa).....	32
6.3 Determinación de hidroximetilfurfural (HMF).....	36
6.4 Determinación de capacidad antioxidante (CaOX)	38
6.4.1 Metodología DPPH	38

6.4.2 Metodología ORAC	45
6.5 Estudio cinético de degradación de componentes	47
6.5.1 Determinación de PFT a la cinética de degradación térmica	47
6.5.2 Determinación de AR (fructosa-glucosa) durante la cinética de degradación térmica	50
6.5.3 Determinación de HMF a los puntos de la cinética de degradación térmica	54
6.5.4 Determinación de CaOX durante la cinética de degradación térmica.....	57
6.5.4.1 Determinación de CaOX por metodología DPPH	58
6.5.4.2 Determinación de CaOX por metodología ORAC.....	60
7. Conclusión	64
8. Bibliografía	67
9. Anexos	76

Índice de Figuras

Figura 1: Árbol (a), fruto verde (b) y fruto maduro (c) de <i>Caesalpinia spinosa</i>	7
Figura 2: Esquema de la formación de HMF a través de la reacción de Maillard y la deshidratación catalizada por ácido (basada en Perez Locas y Yaylayan, 2008 y Hodge, 1953).	10
Figura 3: Mecanismo de formación de HMF (Jaramillo <i>et al.</i> , 2013).....	10
Figura 4: Metabolismo del 5-hidroximetilfurfural (EFSA, 2005a).....	14
Figura 5: Desarrollo de metodología de extracción para obtener y caracterizar polifenoles desde vainas de tara.	27
Figura 6: Extracción de polifenoles totales en distintas soluciones hidroalcohólicas a distintas temperaturas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).	30
Figura 7: Lixiviación de fructosa en extractos de vaina de tara para distintas condiciones de temperatura y relaciones de soluciones hidroalcohólicas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).	33
Figura 8: Lixiviación de glucosa en extractos de vaina de tara para distintas condiciones de temperatura y relaciones de soluciones hidroalcohólicas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).	34
Figura 9: Cromatograma de HPLC-IR correspondiente a calibración estándar HMF a 284 nm (a), detección HMF en extracto de vainas de tara (b).....	37
Figura 10: Capacidad antioxidante (DPPH) en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).....	39
Figura 11: Capacidad antioxidante (IC_{50}) en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas. *Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B:	

indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).....	40
Figura 12: Correlación para capacidad antioxidante entre valores de IC ₅₀ y DPPH en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas.....	42
Figura 13: Correlación para capacidad antioxidante (DPPH) y PFT en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas.....	43
Figura 14: Correlación para capacidad antioxidante (IC ₅₀) y PFT en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas.....	44
Figura 15: Capacidad antioxidante (ORAC) en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas. *Letras A y B indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al tipo de extracción. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).....	46
Figura 16: Cinética de degradación térmica de polifenoles totales en un extracto de vainas de tara.	48
Figura 17: Cinética de degradación térmica de fructosa en un extracto de vainas de tara. .	51
Figura 18: Cinética de degradación térmica de glucosa en un extracto de vainas de tara....	52
Figura 19: Cinética de generación de HMF en extracto de vaina de tara sometido a tratamiento térmico.	55
Figura 20: Capacidad antioxidante (DPPH) en extracto de vaina de tara sometido a tratamiento térmico.	59
Figura 21: Capacidad antioxidante (ORAC) en extracto de vaina de tara sometido a tratamiento térmico.	61

Índice de Tablas

Tabla 1: Contenido de HMF en diversos alimentos y bebidas (Capuano <i>et al.</i> , 2011).....	4
Tabla 2: Reacciones de pérdida de calidad que siguen cinéticas de orden cero y primer orden. Fuente: (Casp y Abril, 2003).....	17
Tabla 3: Condiciones experimentales para la obtención del extracto de vainas de tara.	22

1. Introducción

Los alimentos son productos biológicos de enorme complejidad dada su composición y estructura, lo que los hace susceptibles a cambios (deseados y no deseados) durante diversos procesos industriales. Uno de los factores extrínsecos que modifican el valor nutritivo de un alimento, es el tipo de procesamiento o tratamiento térmico al que se le somete. El tratamiento térmico es una operación de proceso fundamental en la mayoría de los sectores de la industria alimentaria, tanto para productos que necesitan ser sometidos a altas temperaturas que lo requieren para su conservación, como para aquellos para aportarles las características sensoriales asociadas a los mismos.

El efecto del calor, como uno de los primeros sistemas de conservación de alimentos, contempla la denaturación de proteínas, lo que produce una inactivación enzimática y, por lo tanto, la inactivación y eliminación de ciertos microorganismos. Las técnicas que utilizan el calor para la conservación de los alimentos son el escaldado, la pasteurización y la esterilización. Todas estas técnicas son ampliamente utilizadas en la industria, pero suelen provocar en el alimento una desvalorización desde el punto de vista nutricional. Es por esto, que el control de las temperaturas es crucial en cada técnica.

El escaldado es un método que se suele aplicar a frutas y/o verduras antes de someterlas a otros procesos de conservación como el enlatado, el congelado, entre otros. Se emplea agua o vapor durante pocos minutos a una temperatura de 95-100 °C. La pasteurización produce una destrucción de los microorganismos patógenos presentes en un alimento. Generalmente se hace de dos formas diferentes: Se usan temperaturas bajas (60-65 °C) durante bastante tiempo (3-4 horas) o bien se usan altas temperaturas (75-90 °C) durante poco tiempo (2-5 minutos). Por su parte, la esterilización se emplea para conservar el alimento durante períodos más prolongados. Se realiza con alimentos previamente introducidos en recipientes cerrados, que se calientan en una autoclave a temperaturas superiores a los 100 °C o se somete al alimento a temperaturas de 120 °C de calor húmedo y a grandes presiones. Suele disminuir la calidad del alimento en cuanto a sabor, olor y apariencia (propiedades sensoriales). En el caso de alimentos líquidos, se utiliza un

procedimiento especial de esterilización, denominado UHT que consiste en aplicar temperaturas de 135-150 °C durante 4-15 segundos (Aguilar, 2012).

Los cambios que suceden en el interior del alimento son muy complejos, debido a que se llevan a cabo un conjunto de reacciones bioquímicas, que afectan a ciertos componentes de los alimentos. Las reacciones bioquímicas se manifiestan especialmente durante los procesos de almacenamiento de los alimentos. Su efecto puede afectar de forma notable la composición del alimento: enranciamiento, pardeamiento, entre otros. Las más comunes son el pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard, la cual conlleva una serie de reacciones complejas entre azúcares y compuestos nitrogenados (proteínas), las cuales generan pigmentos marrones. En algunos casos se producen de manera tecnológica (fritos y tostados), pero en otras es espontáneo. El calor y la deshidratación lo favorecen.

La caramelización se presenta cuando los azúcares son calentados por encima de su temperatura de fusión (fructosa 103 °C, glucosa 146 °C, por ejemplo). Se produce en ausencia de oxígeno y grupos amino, a baja actividad de agua (a_w) y a pH tanto ácidos como básicos. En ella, los monosacáridos forman enoles como paso inicial de la reacción (Badui, 2006). Las pentosas generan 2-furaldehído como principal producto de degradación, mientras que las hexosas producen 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF) y otros compuestos como 2-hidroxiacetilfurano e isomaltol. La fragmentación de estos productos primarios da lugar a la formación de compuestos como ácido fórmico, acetal, diacetilo, ácido acético, etc. Algunos de estos productos poseen intenso olor y pueden conferir fuertes aromas deseables o indeseables a los alimentos (Fennema, 1993).

La reacción de Maillard es un conjunto de reacciones químicas en cadena que dan lugar a la formación de pigmentos pardos con modificaciones del olor, color y sabor en diversos alimentos. Se desarrolla a a_w intermedias y amplio rango de pH, necesitando un aporte de calor moderado (Badui, 2006). Para que tal reacción se lleve a cabo, se requiere un azúcar reductor (cetosa o aldosa) y un grupo amino libre, proveniente de un aminoácido o de una proteína. Esta reacción, designa un grupo muy complejo de transformaciones que traen consigo la producción de múltiples compuestos. Entre ellos pueden citarse las melanoidinas coloreadas, que van desde amarillo claro hasta café oscuro e incluso negro, y afectan también el sabor, el aroma y el valor nutritivo de los productos involucrados; además, dan lugar a la formación de compuestos mutagénicos o potencialmente

carcinogénicos, como la acrilamida. Otra característica de algunos compuestos generados por el oscurecimiento enzimático de Maillard es la habilidad antioxidante, principalmente de las melanoidinas, que actúan básicamente como quelantes y eliminadores de oxígeno radicales peróxidos e hidroxilos.

El color característico de la costra de los alimentos horneados se debe a esta reacción, al igual que el de los diversos postres a base de leche. La misma coloración; sin embargo, resulta indeseable en otros productos, como en las leches evaporadas y azucaradas, y en algunos jugos concentrados. Por ejemplo, en el caso de las papas fritas, la generación excesiva de este tipo de reacciones da lugar a sabores amargos y colores muy intensos, que hacen el alimento poco atractivo para el consumidor, con las consecuentes pérdidas para todos los involucrados en su industrialización. Para controlarlo se emplea la determinación de azúcares reductores libres, los cuales han sido confirmados como una fuente de oscurecimiento (Badui *et al*, 2006).

La reacción entre azúcares y aminoácidos en los procesos térmicos de los alimentos provoca la formación de HMF, que también se puede formar a través de la deshidratación ácida de los carbohidratos. Galletas (0,5-74,5 mg/kg), panes (hasta 410 mg/kg), café (300–1900 mg/kg), frutos secos (hasta 2200 mg/kg) y alimentos que contienen caramelo (110–9500 mg/kg) son las fuentes más importantes de HMF. La ingesta diaria promedio de HMF se estima en 1.6-150 mg/persona (0.03–2.5 mg/kg de peso corporal) (Zhao, 2017).

Se ha informado que el HMF posee efectos biológicos favorables, incluido el estrés antioxidante en humanos, el efecto antihipóxico, la actividad antioxidante *in vitro*, inhibición de enfermedades y la lisis de los glóbulos rojos. Sin embargo, el HMF se puede convertir en el genotóxico 5-sulfoximetilfurfural (SMF) por efecto de la sulfotransferasa, que es una enzima distribuida en casi todos los órganos de animales y humanos, especialmente en el hígado, riñón y colon. En niños, se ha encontrado que el HMF se metaboliza en SMF, que es altamente electrofílico y puede reaccionar con el ADN y otras macromoléculas. Sus efectos mutagénicos han sido confirmados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Por lo tanto, el efecto adverso del alto contenido de HMF en los alimentos se convirtió en una preocupación pública (Zhao, 2017).

Este componente se encuentra ampliamente distribuido en la dieta occidental y se ha identificado en una gran variedad de alimentos procesados (Arribas, 2009). El HMF y la ACR, son considerados los neo-contaminantes químicos más importantes en productos de panadería, galletería, café, alimentos para bebé, pan y snacks (Mariotti, 2014). En la Tabla 1 se detallan las concentraciones de HMF encontradas en diferentes alimentos.

Matriz	HMF (mg/kg) *mg/L	Matriz	HMF (mg/kg) *mg/L
Café	100-1900	Galletas	0,5-74,5
Café instantáneo	400-4100	Pan (blanco)	3,4-68,8
Descafeinado	430-494	Pan (tostado)	11,8-87,7
Achicoria	200-22500	Pan (<i>snacks</i>)	2,2-10,0
Malta	100-6300	Cereales de desayuno	6,9-240,5
Cebada	100-1200	<i>Whisky</i>	1,4-13,1 *
Miel	10,4-58,8	Brandy	1,5-4,8 *
Cerveza	3,0-9,2 *	Ron	1,7 *
Mermelada	5,5-37,7	Alimentos infantiles a base de leche	0,18-0,25
Zumo de frutas	2,0-22,0	Alimentos infantiles a base de cereales	0,57-18
Vino tinto	1,0-1,3 *	Fruta desecada	25-2900
Vinagre de malta	1,6-7,3 *	Almendra tostada	9,000
Vinagre de jerez	13,8-34,8*	Avellana tostada	2,2-66,5
Vinagre balsámico	316-35251*	Productos a base de caramelo	110-9500

Tabla 1: Contenido de HMF en diversos alimentos y bebidas (Capuano *et al.*, 2011).

El pardeamiento desarrollado en la reacción de Maillard, afecta el sabor, aspecto y valor nutritivo de los alimentos. Los productos de la reacción de Maillard, como melanoidinas y otros intermediarios como el HMF, se consideran como parámetros de calidad para los alimentos procesados, especialmente aquellos que tienen una alta concentración de precursores, es decir, azúcares reductores y grupos aminos (Gögüs *et al.*, 1998). El HMF suele estar ausente en los alimentos frescos o no tratados (Askar, 1984), pero su concentración aumenta como resultado de los procesos de calentamiento (Bath y Singh 1999; Fallico *et al.* 2004). Además del factor de la temperatura, también influyen las propiedades fisicoquímicas como pH, acidez total y contenido de minerales (Anam y Dart,

1995), junto con la humedad o estrés fotoquímico al que se someta el producto (Spano *et al.*, 2006).

Según la norma turca, el límite máximo de HMF como parámetro de calidad es de 25 mg/kg (TS 3792, 1983). En Holanda, la agencia de alimentos no permite que la miel contenga más de 40 ppm de 5-HMF (Anon, 2004). El límite de los estándares de la Unión Europea sobre el nivel de 5-HMF en jugos y concentrados de frutas no puede ser superior a 20 ppm.

Se han desarrollado variadas tecnologías para la mitigación de estos contaminantes en alimentos, entre éstas, el uso de extractos polifenólicos. Los taninos hidrolizables son considerados como uno de los antioxidantes más potentes de fuentes vegetales. Éstos forman complejos con metales reactivos, evitando la generación de radicales libres que da como resultado el daño oxidativo de las membranas celulares y el ADN (Khan *et al.*, 2000). Los taninos hidrolizables, además, limpian los radicales libres dentro del cuerpo al neutralizarlos antes de que ocurra el daño celular (Hagerman, 1998). Por lo tanto, la actividad antimutagénica y anticancerígena *in vitro* del ácido tánico se ha informado previamente (Gülç, en *et al.*, 2010).

Las vainas de tara son una buena fuente de ácido tánico y gálico. Propiedades astringentes, antiinflamatorias, antifúngicas, antibacterianas, antisépticas, antidiarreicas se han atribuido a los taninos de tara (Bussmann y Sharon, 2006; De la Cruz *et al.*, 2007). Las vainas de tara contienen galotaninos (Anexo N°1), los cuales se componen principalmente de ésteres de poligaloilo de ácido quínico. La hidrólisis completa, que implica la ruptura de los enlaces éster y de separación, produce ácidos quínico y gálico. Los taninos presentes en otros miembros del grupo de taninos hidrolizables contienen una hexosa galoyilada o halagilada (Garro *et al.*, 1997). Por medio de una hidrólisis parcial o completa, es posible obtener el ácido gálico o los taninos restantes a partir de los taninos de tara. Tanto el ácido gálico como los taninos restantes presentan una mayor capacidad antioxidante que los taninos originales (Salminen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007), debido a la exposición de los grupos hidroxilo del ácido gálico liberado después de la hidrólisis.

El objetivo de esta investigación fue realizar una extracción sólido-líquido en diferentes condiciones de proceso para obtener un extracto de tara con el mayor contenido de polifenoles totales (PFT) y el menor contenido de azúcares reductores (AR), para una

posterior evaluación del efecto del tratamiento térmico a altas temperaturas sobre la degradación de los PFT del extracto escogido.

2. Antecedentes

2.1 Tara

La tara (*Caesalpinia spinosa*) es una especie nativa del Perú, ampliamente distribuida en América Latina. Se distribuye entre los 4° y 32° latitud Sur, abarcando diversas zonas áridas, en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia hasta el norte de Chile (AGROGESTION, 2007). En Chile su rango de dispersión se extiende desde la provincia de Arica (I Región) hasta el sur de la IV Región (Rodríguez *et al.*, 1984). La tara se encuentra en estado silvestre y posee un gran potencial médico, alimenticio e industrial, siendo de gran utilidad para la producción de hidrocoloides o gomas, taninos y ácido gálico, entre otros (De La Cruz Lapa, 2004). Sus frutos son vainas rojas, amarillas o anaranjadas que contienen semillas redondeadas pardas cuando están maduras (Figura 1). Las vainas representan aproximadamente el 65% del peso del fruto, y son las que poseen la mayor concentración de taninos. Estos taninos, tienen propiedades astringentes y capacidad de clarificar, por lo que son usados en las industrias de alimentos y bebidas como el vino, té, café, cacao, entre otros. Además, son ampliamente utilizados en la industria de la curtiduría (Aouf *et al.*, 2014).



Figura 1: Árbol (a), fruto verde (b) y fruto maduro (c) de *Caesalpinia spinosa*.

Las vainas de tara contienen un alto porcentaje de taninos (entre 40% y 60%) que son del tipo hidrolizable, los cuales están compuestos por una molécula glucídica, sobre la cual se fijan diferentes cuerpos fenólicos (Ribereau-Gayon *et al.*, 1980). Los taninos hidrolizables son sintetizados por una amplia variedad de plantas y pueden presentarse en madera, corteza, hojas y frutas (Mueller-Harvey, 2001). Son fácilmente hidrolizados por ácidos (o enzimas) en un azúcar o polihidroalcohol relacionado y en un ácido carboxílico fenólico. Dependiendo de la naturaleza del ácido carboxílico fenólico, los taninos hidrolizables usualmente se subdividen en galotaninos y elagitaninos. La hidrólisis de los galotaninos produce ácido gálico, mientras que la de los elagitaninos produce ácido hexahidroxidifénico, el cual se aísla normalmente como su dilactona estable, el ácido elágico.

Por hidrólisis alcalina de las vainas se obtiene casi un 25% de ácido gálico, el que es utilizado en la industria farmacéutica (Aouf *et al.*, 2014; Melo, 2013). El alto porcentaje de taninos hidrolizables de la tara genera que el ácido gálico sea el principal constituyente en condiciones de hidrólisis ácida (Mancero 2008). Los taninos también poseen una amplia gama de actividades biológicas, entre ellas como antioxidante, antibacteriano, antiviral, antianalgésico, etc. (Aouf *et al.*, 2014; de La Cruz *et al.*, 2007). Estos taninos son considerados como potentes antioxidantes de origen vegetal, ya que pueden neutralizar

radicales libres, evitando el daño oxidativo de membranas celulares y de ADN; además, evitan su generación al ser capaces de complejar metales reactivos (Chambi *et al.*, 2013).

Los polifenoles derivados de plantas son de gran interés para la industria farmacéutica y la industria alimentaria, ya que se pueden utilizar como suplementos alimenticios y/o como conservantes de alimentos. En investigaciones anteriores, se estudió el efecto de un extracto polifenólico de vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*) en la mitigación de la acrilamida (ACR) y de hidroximetilfurfural (HMF) en pan tipo "hallulla" sin que se modificaran sus atributos sensoriales. Se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de polifenoles (0–3000 mg/kg) sobre la formación de neocontaminantes durante la cocción de "hallulla" y su impacto en los atributos sensoriales. Se mitigó la AA en aproximadamente un 90% utilizando 1500 mg/kg de extracto añadido a las piezas de pan. Estos resultados resaltan el potencial uso de polifenoles a partir de extractos de vainas de tara para reducir la exposición de los consumidores a los neocontaminantes dietéticos.

2.2 Neo-contaminantes

El uso de tratamientos térmicos sobre los alimentos tiene como efecto no deseado la formación de componentes con efectos nocivos para la salud, entre ellos, la acrilamida (ACR), furano e hidroximetilfurfural (HMF), principalmente generados como productos intermedios de la reacción de Maillard.

La reacción de Maillard es responsable no sólo de la generación de olores y sabores deseables en los alimentos; sino también, es la vía mayormente aceptada para la formación de ACR, un compuesto neurotóxico generado a temperaturas superiores a 120 °C por la reacción de azúcares reductores con el aminoácido asparagina. La dependencia de la temperatura en la formación de acrilamida a partir de asparagina indica que ésta se ve favorecida por encima de 100 °C (Becalski *et al.*, 2003). Otros aminoácidos que producen bajas cantidades de ACR son alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, metionina, treonina y valina C (Stadler *et al.*, 2002). La asparagina puede descomponerse térmicamente por desaminación y descarboxilación pero cuando una fuente de carbonilo está presente, el rendimiento de ACR a partir de asparagina es mucho más alto, lo que explica la alta concentración de ACR detectada en los alimentos ricos en azúcares

reductores y asparagina libre, tales como papas fritas y productos de panadería (Yaylayan *et al.*, 2003).

La ACR ha sido catalogada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como un compuesto probablemente cancerígeno en humanos, como un carcinógeno del Grupo 2A, por tanto, deben regularse sus niveles en las fuentes conocidas como vías de entrada en el organismo. En el caso del furano, éste se ha considerado como un posible carcinógeno para los humanos (2B) (Crew y Castle, 2007; Pedreschi *et al.*, 2014; Mariotti *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). Ambos contaminantes se han detectado en diferentes niveles en una amplia variedad de alimentos, muchos de los cuales son de consumo habitual como el pan, alimentos fritos y el café (Constantinou y Koutsidis, 2016; Crew y Castle, 2007; Mariotti *et al.*, 2013; Ou *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014).

El HMF y la ACR, son considerados los más importantes contaminantes químicos de neoformación en productos de panadería y galletería, además del café y el cacao, debido a su alto potencial toxicológico y a su concentración elevada en estos alimentos. El HMF está ampliamente distribuido en la dieta occidental y se ha identificado en una gran variedad de alimentos procesados (Arribas y Morales, 2009). El HMF es un aldehído cíclico formado tanto a través de la reacción de Maillard como de la deshidratación de los azúcares (caramelización) (Figura 2). Contiene un grupo funcional aldehído altamente reactivo. La reacción entre azúcares y aminoácidos en los procesos térmicos de los alimentos provoca la formación de HMF, que también se puede formar a través de la deshidratación ácida de los carbohidratos (Zhao, 2017). El HMF se forma por la acción del calor sobre la glucosa y especialmente sobre la fructosa (Figura 3). El proceso involucra la pérdida de dos moléculas de agua desde la fructosa y por tanto un nuevo ordenamiento de ésta (Cornejo 1993, citado por Soto, 2008). La forma general de la reacción de deshidratación de las hexosas presenta dos vías principales para la deshidratación de hexosas: la vía cíclica (Amarasekara, *et al.*, 2008) y la acíclica (Kabyemela *et al.*, 1997).

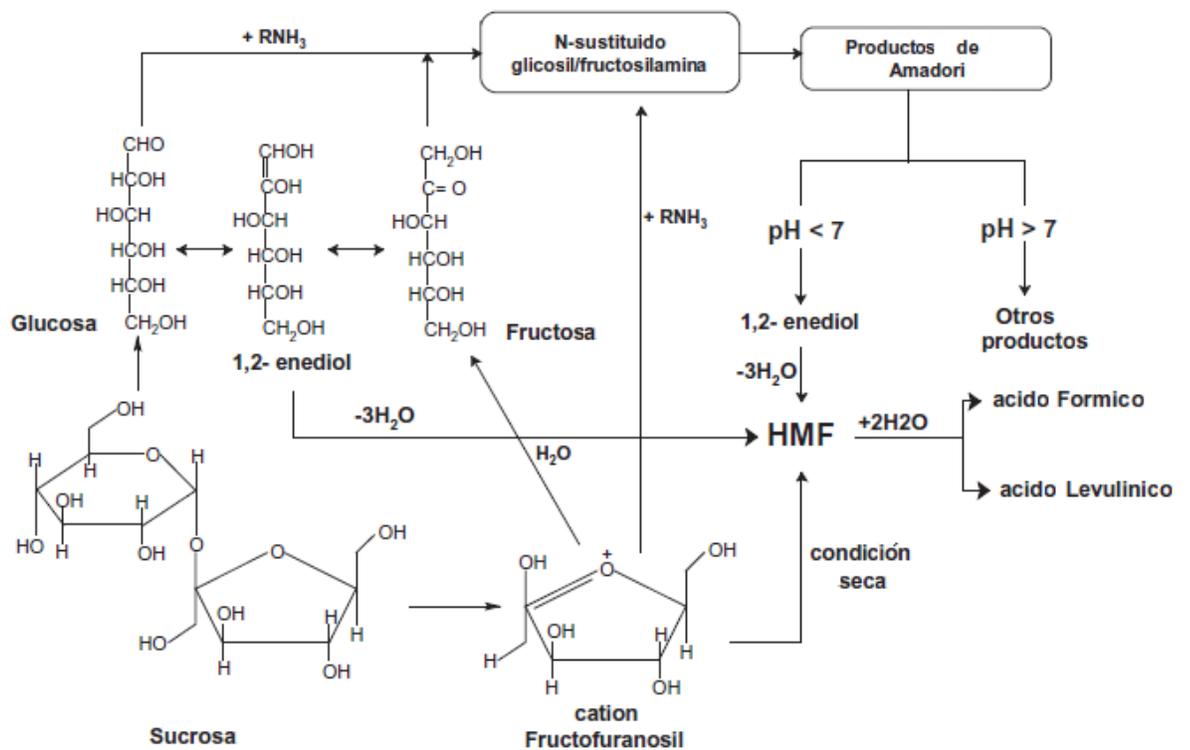


Figura 2: Esquema de la formación de HMF a través de la reacción de Maillard y la deshidratación catalizada por ácido (basada en Perez Locas y Yaylayan, 2008 y Hodge, 1953).

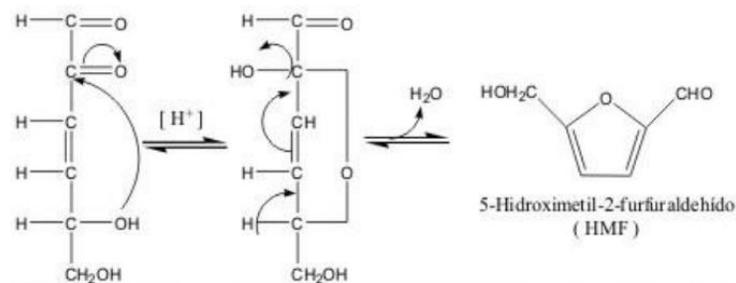


Figura 3: Mecanismo de formación de HMF (Jaramillo *et al.*, 2013).

Dentro de los factores que influyen en la velocidad de formación del HMF, la temperatura es el factor crítico (White 1980; Bosch 1986; Lee 1988; Ibarz 1989; Benavent 1989;

Ventura 1990). Independiente del mecanismo por el cual transcurre la reacción (cíclica o acíclica), la evidencia indica que, al iniciar la reacción desde glucosa, la etapa limitante de la velocidad es la isomerización (a fructosa o enediol, según sea el mecanismo considerado). Al iniciar la reacción desde fructosa, la etapa limitante es la primera deshidratación de la fructosa. Esto es de suma importancia para comprender y plantear cinéticas y predecir el comportamiento de la reacción al estudiar o analizar variables como concentraciones iniciales y temperaturas (Villanueva, 2017). Otros factores que repercuten en menor grado son: acidez del medio, humedad, presencia de algunos minerales (K, Ca, Mg) y contenido de aminoácidos (alanina, ácido aspártico, entre otros).

El tratamiento térmico, así como el almacenamiento de los alimentos producen una serie de reacciones que conducen a compuestos que pueden afectar la salud. A pesar de ser el HMF una sustancia conocida en la industria alimentaria y química desde hace décadas, la relación entre HMF, sus metabolitos y la salud no se ha estudiado en detalle hasta el año 2006 (Glatt y Sommer, 2006). La toxicidad aguda por vía oral del HMF como compuesto puro es relativamente baja, siendo la dosis letal (DL_{50}) de 2,5 g/kg de peso corporal en ratas (U.S. EPA, 1992). El Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos llevó a cabo un estudio durante dos años encontrando que el HMF aumentaba la incidencia de adenomas hepatocelulares en ratones hembra de la línea B6C3F1. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia científica de carcinogenicidad en ratas de la línea F344/N (NTP, 2008). Más tarde, el HMF ha demostrado ser un carcinógeno débil en ratones debido al aumento significativo del número de pequeños adenomas intestinales (Svendsen *et al.*, 2009).

En el año 2005, el comité científico de la EFSA estimó una ingesta diaria de HMF de 1,6 mg/persona (EFSA, 2005a). Este valor es muy superior al valor de 0,54 mg/persona/día calculado a partir de una amplia base de datos sobre estudios crónicos y subcrónicos realizados con animales (JECFA, 1996). Esto sugiere que los riesgos asociados a la exposición del HMF podrían ser aún mayores para los humanos que los descritos para los roedores (Monien *et al.*, 2009), aumentando las incertidumbres sobre si la exposición a HMF podría suponer un riesgo real para la salud (Gökmen y Morales, 2012).

Estudios demuestran que el HMF se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal de los roedores y se elimina con la misma rapidez de todos los tejidos, sin evidencia de una acumulación significativa. Sin embargo, su absorción puede estar influenciada por otros constituyentes de la dieta como es el contenido de fibra, el cual parece reducir el transporte y la absorción de HMF en las líneas celulares Caco-2 (Delgado-Andrade *et al.*, 2008). El HMF es metabolizado para finalmente ser eliminado en la orina (~ 90%) y las heces (~ 10%). Además, se ha desarrollado un método para cuantificar los aductos de HMF a partir de aldehídos unidos como bases de Schiff al nitrógeno terminal de la hemoglobina. Dichos aductos pueden ser utilizados como biomarcadores de exposición (Davies *et al.*, 2009).

La Figura 4 muestra las vías de biotransformación del HMF siendo la ruta principal la oxidación del HMF al ácido 5-hidroximetil-2-furanoico (HMFA) y la posterior formación del conjugado de glicina, N-(5-hidroximetil-2-furoil)-glicina (HMFG). El HMFA y el HMFG son los principales metabolitos del HMF excretados en la orina. Tanto en ratas como en humanos, la relación HMFA/HMFG disminuye a medida que aumenta la ingesta de HMF, lo que sugiere que la disponibilidad de glicina libre puede limitar la tasa de conjugación, y como resultado se produce la excreción de ácido furoico libre (FA) o de ácido 2,5 furandicarboxílico (FDCA) a través de una segunda ruta. Los ácidos HMFA, HMFG, y FDCA se han identificado en la orina de roedores y en la de los humanos, demostrando que estos ácidos se derivan del HMF de los alimentos. Una ruta menor en la eliminación del HMF sería la oxidación completa de HMF a CO₂ a través de la apertura del anillo, formándose primero el ácido α -cetoglutarico. Esta vía se ha descrito en la literatura para roedores, pero aún no se ha confirmado en humanos (Nomeir *et al.*, 1992).

Existen evidencias del efecto potencialmente nocivo del HMF basadas en ensayos *in vitro* y en experimentos realizados en animales de laboratorio. Sin embargo, cuando los estudios se extrapolan a los humanos, los resultados no son del todo concluyentes, siendo objeto de estudio en la actualidad. El SMF induce efectos genotóxicos y mutagénicos en bacterias y líneas celulares de mamíferos (Surh y col., 1994; Glatt y col., 2006). La interacción de este intermedio reactivo con nucleófilos celulares (ADN, ARN y proteínas) puede provocar daños estructurales en estas macromoléculas. En roedores, el HMF se ha identificado como

iniciador y promotor del cáncer de colon, de procesos nefrotóxicos o de aberraciones cromosómicas (Zhang *et al.*, 1993; Bakhiya *et al.*, 2009).

El HMF se puede convertir en el genotóxico 5-sulfoximetilfurfural (SMF) por la sulfotransferasa (SULT), (Glatt y Sommer, 2006; Surh y Tannenbaum, 1994); que es una enzima distribuida en casi todos los órganos de animales y humanos, especialmente en el hígado, riñón y colon. En niños, se ha encontrado que el HMF se metaboliza eficazmente en SMF, que es altamente electrofílico y puede reaccionar con el ADN y otras macromoléculas. Sus efectos mutagénicos han sido confirmados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Por lo tanto, el efecto adverso del alto contenido de HMF en los alimentos se convirtió en una preocupación pública (Zhao *et al.*, 2017).

Aunque el SMF es muy inestable, se ha detectado recientemente en la sangre de los ratones tratados con HMF, lo que indica su metabolización *in vivo* a SMF. Además, las SULT se manifiestan más extensamente en los tejidos extrahepáticos de los humanos que en el de los roedores siendo su actividad mayor. Esto sugiere que los riesgos asociados a la exposición del HMF podrían ser aún mayores para los humanos que los descritos para los roedores (Monien *et al.*, 2009), aumentando las incertidumbres sobre si la exposición a HMF podría suponer un riesgo real para la salud (Gökmen y Morales, 2012).

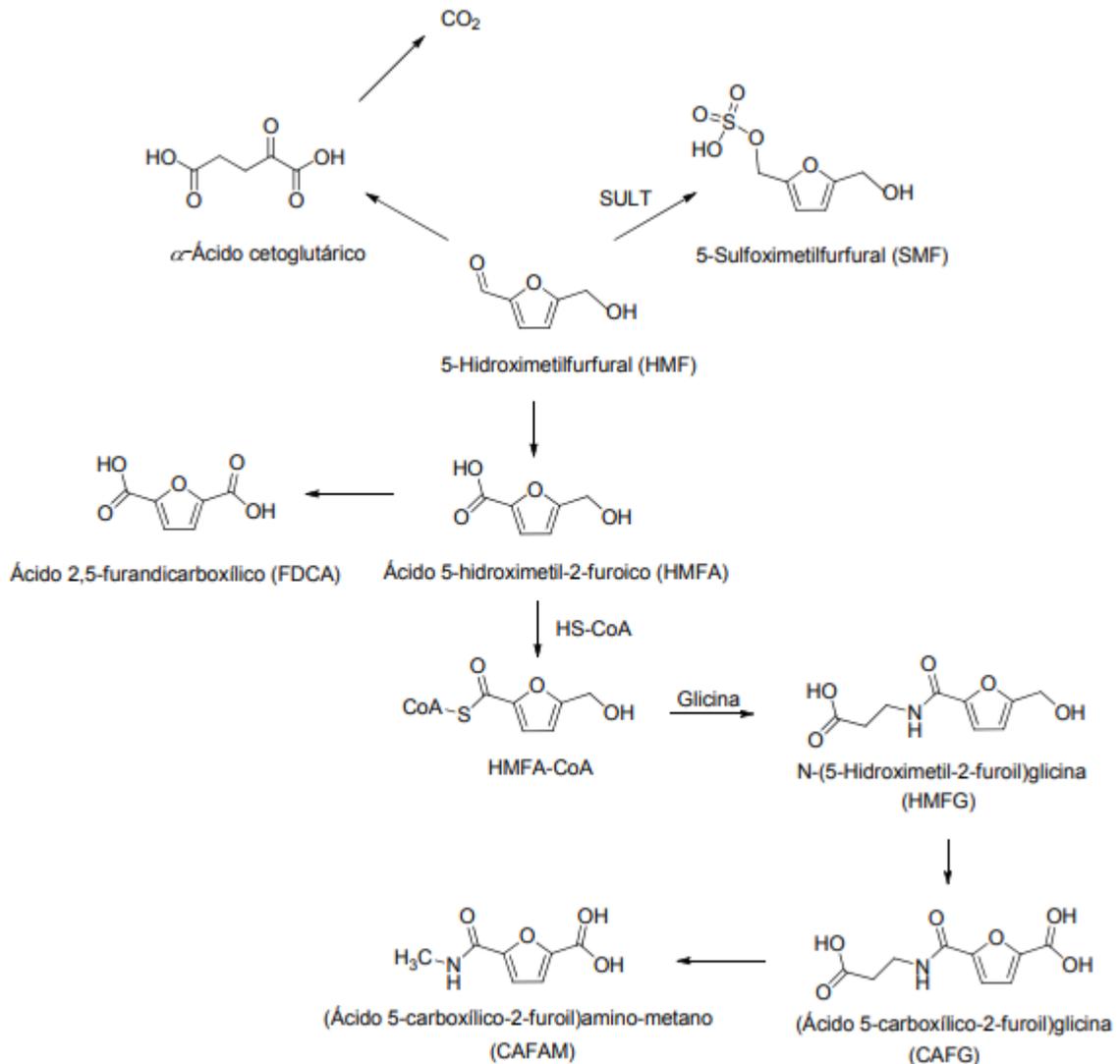


Figura 4: Metabolismo del 5-hidroximetilfurfural (EFSA, 2005a)

Aunque el HMF no se encuentra presente en productos frescos o no procesados térmicamente, se acumula rápidamente durante el calentamiento y el almacenamiento de alimentos ricos en hidratos de carbono, y en algunos casos puede exceder el valor de 1 g/kg, como ocurre en frutos secos y productos a base de caramelo. El HMF está ampliamente reconocido como un índice válido para estimar el deterioro generado en el alimento como resultado de un calentamiento excesivo o durante condiciones inadecuadas

de almacenamiento. De la misma manera, se ha utilizado como marcador para controlar el procesado térmico de algunos productos elaborados a base de cereales como pasta, galletas, pan, cereales de desayuno y pan tostado.

Debido a que los neocontaminantes, en parte, son productos de la reacción de Maillard, la que es esencial para el color, sabor, aroma y textura de los alimentos, se busca su reducción, pero manteniendo la calidad del producto (Xu *et al.*, 2014).

2.3 Tecnologías de mitigación

Se han desarrollado una amplia gama de tecnologías para la mitigación de contaminantes en los alimentos procesados térmicamente, basados en los cambios de los parámetros de los procesos o mediante la reducción de los niveles de los precursores en las materias primas (Anese & Suman, 2013; Crew y Castle, 2007; Mariotti *et al.*, 2013).

El HMF se genera debido a la aplicación de tratamientos térmicos, y se encuentra en alimentos procesados; es por esto que se genera la necesidad de desarrollar estrategias para reducir su formación durante el procesamiento. Para esto, es importante considerar los posibles mecanismos y los factores que influyen en la formación de HMF, los cuales son: contenido de azúcares, de aminoácidos, temperatura aplicada y tiempo de exposición (Gökmen y Morales, 2012).

Los azúcares (hexosas) y los aminoácidos son los principales precursores de la formación de HMF. Los alimentos ricos en hidratos de carbono son, por lo tanto, los productos donde se encontrarán los mayores niveles de HMF. Limitando el contenido de azúcares reductores se reducirá a su vez su formación. En ciertos casos es posible variar algunos componentes antes del tratamiento térmico, generalmente, si se aumenta el pH de la masa en productos de panadería, los niveles de HMF disminuyen (Gökmen *et al.*, 2007).

La reacción de Maillard y la caramelización se ven favorecidas en gran medida por la relación temperatura/tiempo y las condiciones del medio de reacción. De esta manera, disminuyendo la temperatura durante el procesamiento y/o almacenamiento se consigue disminuir la formación de HMF de una manera sencilla. En general, el aumento del tiempo

de almacenamiento también aumenta la cantidad de HMF formado. Condiciones de baja y moderada humedad se asocian a un aumento en la formación de HMF, debido a que la reacción de Maillard se ve acelerada por la deshidratación del azúcar. En condiciones extremas de procesado se ha observado un descenso del HMF en galletas debido a la degradación de éste a productos secundarios, la mayor parte volátiles (Ameur *et al.*, 2006). Sin embargo, estas condiciones afectarán de forma drástica la calidad del producto, pudiendo llegar a generarse otros compuestos indeseados como la ACR. Se han sugerido diversas formas eficaces para la reducción de la ACR en los alimentos; sin embargo, el uso de tecnologías combinadas sería el enfoque más eficaz, ya que la calidad organoléptica de los alimentos no se vería afectada (Constantinou y Koutsidis, 2016; Pedreschi *et al.*, 2014). Por otro lado, la adición de antioxidantes podría disminuir significativamente el contenido de neocontaminantes mediante su capacidad para reaccionar con precursores o intermediarios de la reacción (Constantinou y Koutsidis, 2016; Xu *et al.*, 2014). Sin embargo, diversos estudios han indicado que el uso de antioxidantes fenólicos puros o extractos antioxidantes tendrían un efecto ambiguo sobre los neocontaminantes (Constantinou y Koutsidis, 2016), ya que se ha informado su mitigación por adición de antioxidantes presentes en hojas de bambú, compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen, ácidos ferúlico, protocatéquico, cafeico y gálico en papas fritas, extracto de romero en bollos de trigo y también por adición de extracto de té verde en pan. El efecto de los antioxidantes está determinado por su naturaleza, concentración y capacidad antioxidante, así como la matriz de reacción y los parámetros experimentales, logrando reducir o promover la formación de neocontaminantes (Constantinou y Koutsidis, 2016; Liu *et al.*, 2015).

2.4 Cinéticas de degradación

La predicción de la estabilidad térmica de determinados compuestos termolábiles de los alimentos es de gran utilidad para la industria, y para ello se requiere establecer su cinética de degradación térmica. En los estudios cinéticos se emplean técnicas de análisis térmico, ensayo mecánico, entre otras; en donde en el análisis se evalúa una propiedad física de una sustancia, o de sus productos de reacción en función de la temperatura (Ramírez, 2009).

El tratamiento térmico es uno de los métodos de conservación de alimentos más utilizados (Lund, 1975). Sin embargo, el calentamiento excesivo produce pérdidas considerables en calidad y particularmente en las propiedades organolépticas de los alimentos (Hayakawa y Timbers, 1977). La evaluación cinética de degradación térmica es esencial para diseñar nuevos procesos productivos asumiendo la producción de productos inocuos y manteniendo estándares de calidad (Lund, 1975; Teixeira *et al.*, 1969). Muchos productos que contienen polifenoles o adicionan polifenoles a su formulación son tratados térmicamente previos a su consumo, por lo que es de suma importancia estudiar la cinética de degradación de los mismos para evidenciar su resistencia a las altas temperaturas, con el objetivo de diseñar procesos que minimicen o eviten su degradación. Es necesario conocer las diferentes reacciones que causan degradación de los alimentos para desarrollar procedimientos específicos para su vida útil, (Casp y Abril, 2003). Menciona el mismo autor que la mayor parte de los datos de vida útil de sistemas biológicos tales como alimentos para el cambio de una característica de calidad, basados en alguna reacción química o crecimiento bacteriano, siguen un modelo de orden cero o primer orden, dependiendo de la reacción involucrada (Tabla 2). Indica (Potter y Hotchkiss, 1999), que durante el proceso de horneado las velocidades de las reacciones y el orden en el que ocurren dependen en gran medida de la velocidad de la transmisión del calor.

Orden de reacción	Ejemplos
Orden Cero	Calidad global de alimentos congelados Pardeamiento no enzimático
Primer Orden	Pérdida de vitaminas Muerte/desarrollo microbiano Pérdida de color por oxidación Pérdida de textura en tratamientos térmicos

Tabla 2: Reacciones de pérdida de calidad que siguen cinéticas de orden cero y primer orden. Fuente: (Casp y Abril, 2003).

La reacción de orden cero, menciona Casp y Abril (2003), que una disminución lineal del atributo implica que su variación con respecto al tiempo es constante, y que, por lo tanto, la pérdida de dicho atributo no depende de su concentración. La relación lineal entre atributo y tiempo se obtiene cuando la reacción es de orden cero y según (Morales, 2006), cuando la desaparición del reactante no depende de su concentración la reacción es de orden cero. Según Casp y Abril (2003), en una reacción de primer orden el atributo de calidad disminuye de forma exponencial, durante el periodo de almacenamiento y procesamiento. En este caso el ritmo de pérdidas del atributo de calidad depende de la cantidad que queda del mismo, y esto implica que a medida que el tiempo avanza y el atributo de calidad disminuye la velocidad de reacción es cada vez menor. Por su parte Morales (2006), indica que cuando la velocidad de reacción depende de la concentración del reactante ésta es de primer orden. Según Van Boekel y Martinus, (2009) las reacciones de segundo orden ($n = 2$), no son tan frecuente en los sistemas alimentarios, debido a la naturaleza bimolecular de las reacciones.

Dada la complejidad de la acción de los tratamientos térmicos sobre los alimentos, es necesaria su optimización de forma que se obtengan en cada caso los resultados buscados. Aunque en la mayoría de los casos, el principal objetivo de aplicar temperatura en los alimentos, sea la destrucción de los microorganismos, no hay que olvidar que a la vez ocurrirán otros procesos, unos deseables (destrucción enzimática, ablandamiento de los tejidos, mejora de la digestibilidad, entre otros.), que pese a ello se deberán controlar para que no se produzcan efectos excesivos, y otros menos deseables, pero inevitables en algún grado (destrucción de nutrientes, pérdida de cualidades organolépticas: color, aroma, etc.). Un tratamiento térmico debe ajustarse de forma que se consigan los resultados deseables y se minimicen los indeseables (Carrera, 2013)

El estudio de la cinética de degradación da una idea del comportamiento del proceso. La observación de la respuesta del sistema versus la temperatura, tiempo, y otras variables de proceso permite relacionarlas con determinadas ecuaciones predictivas. Ello permite determinar puntos de control en el proceso, ya que ofrece un panorama de las variables que afectan directamente el proceso (Paredes, 2009).

A partir de lo descrito anteriormente, se realizó una extracción de polifenoles desde vainas de tara bajo dos temperaturas de trabajo (20 y 35 °C) y se utilizaron soluciones hidroalcohólicas, con agua acidificada-etanol como disolvente (10% y 40% v/v). La porción de sólidos se extrajo de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) como fuente de compuestos fenólicos, las que fueron caracterizadas químicamente al igual que el extracto obtenido, a través, del contenido de polifenoles totales (PFT), capacidad antioxidante (CaOX) y contenido de azúcares reductores (AR). Posteriormente, se realizó un estudio cinético a cuatro temperaturas (60, 90, 120, 150 °C) el cual permitió determinar el efecto de la temperatura sobre el contenido de PFT, y CaOX del extracto. Así como también, fueron evaluadas las cinéticas de formación de HMF.

3. Hipótesis

Mediante el estudio de la cinética de degradación es posible determinar la resistencia térmica de los polifenoles contenidos en un extracto de tara y, además, cuantificar la formación de HMF, para evaluar su uso como potencial aditivo alimentario.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Realizar un estudio cinético del efecto de la temperatura sobre el contenido de polifenoles totales, la capacidad antioxidante y formación de HMF de un extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*).

4.2 Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar químicamente un extracto de vainas de Tara (*Caesalpinia spinosa*).
- Estudiar el efecto de las condiciones de extracción (temperatura (25 y 35 °C) y concentración de co-solvente (10:90 y 40:60 proporción de etanol:agua acidificada) sobre el contenido de polifenoles totales (PFT), capacidad antioxidante (CaOX), contenido de azúcares reductores (AR) y HMF en extractos de tara.
- Evaluar el proceso de extracción, con el fin de obtener el mejor extracto en base al mayor contenido de PFT y el mínimo contenido de AR.
- Realizar un estudio cinético de degradación de PFT, CaOX y formación de HMF del extracto de tara sometido a tratamiento térmico.

5. Metodología

5.1 Materia prima

La materia prima utilizada fueron vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) cosechadas en marzo del 2017 en el Parque Urbano Natural, las cuales fueron proporcionadas por la Corporación Nacional Forestal (CONAF) de la comuna de La Ligua, Región de Valparaíso, Chile.

5.2 Obtención del polvo de tara

Las vainas de tara se recibieron secas y se les realizó un proceso de limpieza manual (Fernández, 2008) realizando preclasificación para separación de vainas defectuosas (presencia de impurezas, hongos, manchas, entre otros) y separación de vainas por coloración amarillas y rojas. En base a un estudio previo, sólo se utilizaron las vainas rojas por presentar un mayor contenido de polifenoles y una elevada capacidad antioxidante (Pedreschi *et al.*, 2018). Posteriormente, se extrajeron manualmente las semillas de las vainas, y las vainas pasaron a molienda en maquina moledora (Oster, modelo BCM400, China) hasta la obtención de un polvo fino, el cual fue tamizado (W.S Tyler, modelo Standard Test Sieve, U.S.A) para obtener partículas de tamaño homogéneo (tamaño partícula ≤ 0.65 mm). El polvo de tara obtenido se almacenó en bolsas de polietileno selladas, mantenidas a temperatura ambiente, en lugar seco y desprovisto de luz.

5.3 Preparación de las soluciones hidroalcohólicas

El polvo de tara fue sometido a extracción sólido-líquido según metodología modificada de Pedreschi *et al.* (2018). La extracción se llevó a cabo con soluciones hidroalcohólicas etanol-agua acidificada en proporciones de 10:90 y 40:60, las que actúan como disolvente, a distintas condiciones de temperatura (Tabla 3).

Corrida	Temperatura (°C)	Etanol:agua acidificada (v/v)
1	25	10:90
2	35	10:90
3	25	40:60
4	35	40:60
5	25	Agua acidificada
6	35	Agua acidificada

Tabla 3: Condiciones experimentales para la obtención del extracto de vainas de tara.

Las temperaturas de extracción de PFT fue de 25 y 35 °C, debido a las modificaciones realizadas al procedimiento de Pedreschi *et al.* (2018). Se extiende el tiempo de extracción y se utiliza como co-solvente una mezcla de extracto hidroalcohólico (etanol-agua), el cual permitirá que aumente la solubilidad del material orgánico debido a su menor polaridad.

Cada corrida de las condiciones experimentales fue preparada en triplicado, depositando 5 g de polvo de vaina de tara en un frasco ámbar (Isolab, Germany) con 50 mL de solución. El agua acidificada se preparó previamente utilizando ácido cítrico y citrato de sodio diluido en agua destilada, estabilizando la solución con hidróxido de sodio hasta lograr un pH de 3,5. Posteriormente, se adicionó la cantidad de etanol puro (Emsure, Germany) y agua acidificada según la concentración indicada en cada corrida. A modo de control, se realizó una corrida de agua acidificada para cada temperatura de estudio; y una solución con solvente acetona (Heyn, Chile) al 60%. En base a estudios previos, se ha demostrado que el solvente más efectivo para la extracción de polifenoles es la acetona (Kuzma, 2014). Los disolventes polares se utilizan frecuentemente para la recuperación de polifenoles de una matriz vegetal. Los más comunes son los disolventes orgánicos, como el metanol, la acetona, el etanol y el acetato de etilo. Esto se debe a que, a mayor peso molecular del solvente, la polaridad permite que las sustancias de peso molecular similar puedan ser extraídas fácilmente. Junto con ello, se obtienen mayores contenidos fenólicos y actividad antioxidante utilizando disolventes orgánicos acuosos que los respectivos disolventes

orgánicos absolutos. Los investigadores sugieren que esto se debe a la polaridad, ya que, al aumentar la proporción de agua polar al disolvente, la polaridad de la mezcla también aumenta. También se sugiere que los disolventes orgánicos acuosos son capaces de extraer la polaridad alta y baja (Sultana et al. 2009, Uma et al. 2010).

Es importante mencionar que la acetona no es de grado alimentario, por lo que no se puede utilizar como solvente para la extracción, sino que sólo a modo referencial. La extracción de compuestos presentes en la vaina se realizó mediante extracción sólido-líquido utilizando un baño de agua termorregulado (Modelo WNB 7 – 45, Memmert, Alemania). La extracción se realizó mediante inmersión de las soluciones, los frascos se mantuvieron en agitación con una frecuencia de entre 130-160 oscilaciones/min, por un tiempo de 12 h a temperatura constante (Anexo N°2). Luego las muestras fueron filtradas utilizando papel filtro N°1 (Mackerey - Nagel, Alemania), bajo condiciones de vacío (Rocker 400, Taiwan), permitiendo separar las partículas de mayor tamaño. Para lograr una separación de las partículas más pequeñas, se realizó una centrifugación (Modelo Q-sep 3000, Restek, EE.U.U.), utilizando tubos tipo Falcon de 50 mL en condiciones de 5000 rpm durante 15 min a una temperatura de 25 °C, permitiendo obtener un pellet y un sobrenadante. El pellet fue descartado y el sobrenadante fue almacenado para posteriormente realizar los análisis fisicoquímicos al extracto. La metodología se detalla en la Figura 5.

5.4 Análisis fisicoquímicos al extracto de tara

5.4.1 Determinación de polifenoles totales: método de Folin–Ciocalteu

Para la determinación del contenido total de polifenoles (PFT), se realizó una curva de calibración, utilizando ácido gálico (Anexo N°3), y luego se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) (Anexo N°4). La metodología aplicada se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el

medio ácido), es de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se determina para evaluar el contenido de polifenoles. Esta determinación se efectuó en triplicado por cada corrida de estudio.

5.4.2 Determinación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores del extracto de tara se cuantificó de acuerdo con la metodología descrita por Mariotti *et al.* (2018) (Anexo N°5). Para realizar el análisis, el extracto fue cuantificado por cromatografía líquida de alto rendimiento, utilizando un equipo HPLC acoplado a un detector IR (Thermoscientific, modelo Ultimate3000, E.E.U.U.). Para la medición se realizaron diluciones del extracto. Al obtener los resultados, se expresaron como miligramos de glucosa y fructosa por gramos de materia prima (b.s). Además, como información adicional, se obtuvo a través de los gráficos arrojados por el equipo, el tiempo de retención y área bajo la curva de los componentes encontrados.

5.4.3. Determinación de hidroximetilfurfural (HMF)

El contenido de hidroximetilfurfural (HMF) en los extractos, se realizó extrayendo 1 mL con jeringa de cada solución, la cual se depositó en un tubo Falcon y se le adicionó 0,5 mL de carrez I (Merck, Germany) (15 g de $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O$ en 100 mL de agua), se agitó. Luego, se adicionó 0,5 mL de carrez II (Merck, Germany) (30 g de $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ en 100 mL de agua) y se agitó nuevamente en vórtex. Posteriormente, los tubos se sometieron a centrifugación por 15 minutos a 6000 rpm. Finalmente, se extrajo el sobrenadante de cada tubo y se filtró mediante un minifiltro (Agela Technology, E.E.U.U.) de 0,22 μm , para luego ser depositado en un vial de 2 mL (Agela Technology, E.E.U.U.). Finalmente, las muestras fueron inyectadas en el HPLC-DAD.

5.4.4 Determinación de capacidad antioxidante mediante metodología DPPH

Para lograr la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el método radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este método del radical DPPH (Anexo N°7), se realizó de acuerdo con lo mencionado por Brand *et al.* (1995). Para obtener los resultados de IC_{50} (μg de muestra que decolora el 50% de la solución metanólica de DPPH), se realizaron gráficos

identificando la variable independiente como porcentaje de inhibición y la variable dependiente como concentración de la muestra. Posteriormente con los gráficos obtenidos (Anexo N°8), se obtuvo una regresión lineal mediante la ecuación de la recta de cada condición, determinando los valores de m y n, logrando calcular el valor de IC₅₀. El valor de IC₅₀, es la cantidad de antioxidante necesario para disminuir en un 50% la cantidad inicial de radical DPPH, siendo expresados como moles de antioxidante/moles de DPPH.

5.4.5 Determinación de capacidad antioxidante mediante metodología ORAC

Se efectuó la determinación de la capacidad antioxidante por el método Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC). Este método (Anexo N°9), se realizó de acuerdo con lo mencionado por Wang (2002). El método ORAC consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radical peróxido (ROO·). El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo, la proteína usada es la fluoresceína. El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, el AAPH, para generar el radical peroxil ROO·. Un mol de AAPH, pierde un mol de nitrógeno, para generar dos moles de radical AAPH a una velocidad constante. En presencia de un antioxidante RRO· capta, preferiblemente, un átomo de hidrógeno del antioxidante estable. Como consecuencia, la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína por acción del radical peroxil es disminuida o inhibida.

5.4.6. Condiciones experimentales y análisis estadístico de los resultados

El presente estudio se realizó utilizando las condiciones detalladas en la Tabla 3, realizando cada corrida en triplicado, bajo dos condiciones de temperatura (25 y 35 °C) y empleando soluciones hidroalcohólicas en distintas relaciones con el agua acidificada (10:90 y 40:60), para lograr extraer la porción de sólidos solubles desde vainas de tara como fuente de compuestos fenólicos. El extracto obtenido fue caracterizado químicamente determinando PFT, CaOX y AR. Los ensayos fueron realizados en triplicado, calculando los valores promedio y su desviación estándar utilizando el software Microsoft Office Excel 2013. Los valores fueron representados a través de gráficos de barra, permitiendo realizar las

comparaciones respectivas según cada efecto. Sin embargo, para identificar las diferencias significativas, se aplicó un análisis estadístico permitiendo determinar los efectos significativos para cada proceso. El análisis estadístico del experimento (ANOVA multifactorial), examina el efecto de dos factores (factor A: nivel de extracción que ocurre utilizando como solvente etanol, factor B: nivel de extracción que ocurre aplicando temperatura) sobre la efectividad en la extracción de polifenoles y azúcares reductores, y su efecto sobre la capacidad antioxidante. Según los factores presentes al realizar el modelo estadístico, se ajustaron las variables de respuesta (considerando un intervalo de confianza de 95%), siendo los resultados representados con letras en el gráfico de barras, para detallar la significancia. Al determinar los factores que son significativos, se expresan las condiciones de temperatura y solución hidroalcohólica, considerando las mejores condiciones del proceso de extracción.

Diagrama de Metodologías aplicadas

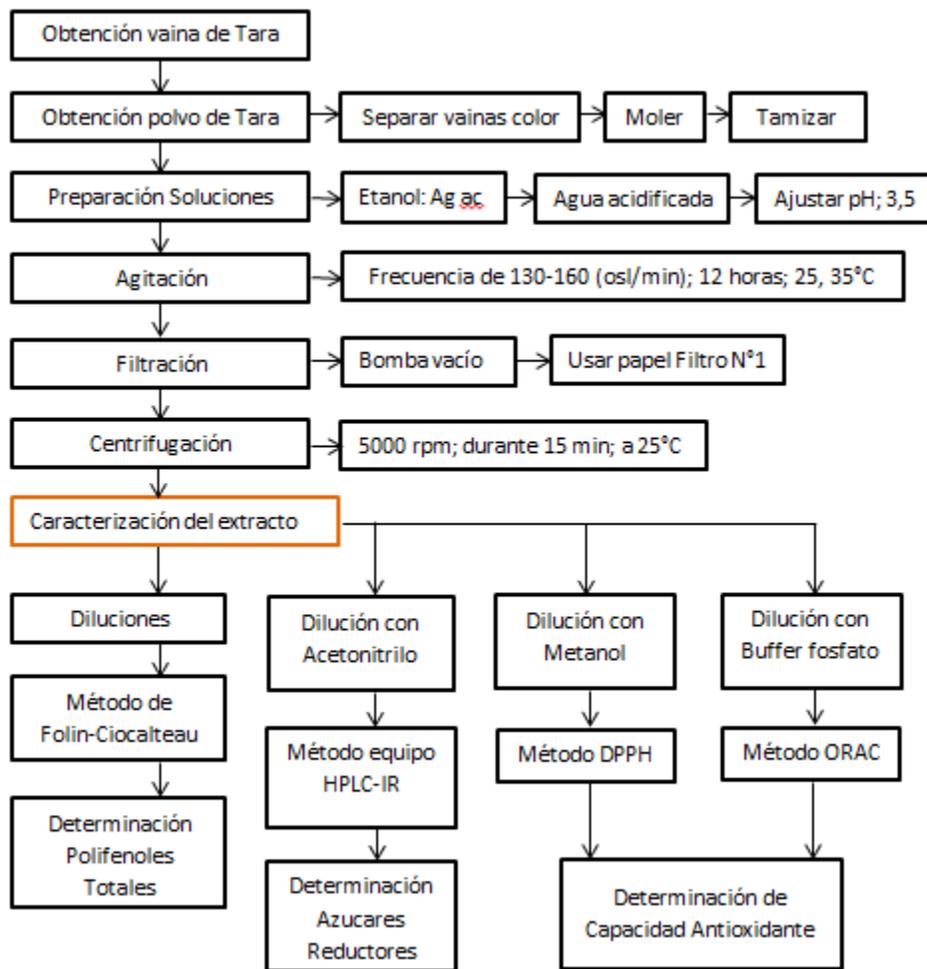


Figura 5: Desarrollo de metodología de extracción para obtener y caracterizar polifenoles desde vainas de tara.

5.4.7. Estudio cinético de degradación

El extracto de tara seleccionado, (40:60, 35 °C) fue sometido a un estudio cinético a cuatro temperaturas de trabajo: 60, 90, 120, 150 °C, en donde los tiempos de exposición a dichas temperaturas fueron de: 0, 3, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Estas temperaturas y tiempos de exposición fueron determinados considerando las condiciones a los que son expuestos alimentos horneados y fritos, con el fin de evaluar la resistencia térmica del extracto en alimentos en los que se genera el neo-contaminante en estudio.

El tratamiento térmico se realizó depositando 7 mL del extracto en tubos de vidrio con tapa rosca de 10 mL. Se dispuso tres tubos por cada condición de estudio en una gradilla metálica, la cual se sometió a altas temperaturas en un baño de aceite (Modelo WNB 7-45, Memmert, Alemania). Cada tubo se expuso a las temperaturas antes mencionadas y al retirarlas del baño, se traspasaron a un baño de hielo para detener posibles reacciones, para luego cubrirlos con papel aluminio con el fin de protegerlos de la luz. Posteriormente a cada punto de la cinética, se le evaluó el contenido de PFT, AR, CaOX y HMF según las metodologías antes mencionadas.

Los ensayos fueron realizados en triplicado, calculando los valores promedio y su desviación estándar utilizando el software Microsoft Office Excel 2013. Los valores fueron representados a través de gráficos de línea, permitiendo realizar las comparaciones respectivas según el tiempo transcurrido. Sin embargo, para identificar las diferencias significativas, se aplicó un análisis estadístico permitiendo determinar los efectos significativos para cada proceso. El análisis estadístico del experimento (ANOVA multifactorial), examina el efecto de dos factores (factor A: nivel de degradación que ocurre aplicando temperatura, factor B: nivel de degradación que ocurre en el tiempo) sobre el contenido de PTF, AR, CaOX y HMF. Según los factores presentes al realizar el modelo estadístico, se ajustaron las variables de respuesta (considerando un intervalo de confianza de 95%), siendo los resultados detallados en la discusión según lo obtenido en tabla ANOVA multifactorial y prueba de rangos múltiples. Al determinar los factores que fueron significativos para las variables de temperatura y tiempo de exposición en el proceso de degradación.

6. Resultados y Discusión

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de la extracción de PFT, AR, HMF, CaOX desde extractos hidralcohólicos de vainas de Tara (*Caesalpinia spinosa*). Posteriormente se realizó degradación cinética del extracto de tara seleccionado, (40:60, 35 °C), el cual fue sometido a cuatro temperaturas de degradación: 60, 90, 120, 150 °C, en donde los tiempos de exposición a dichas temperaturas fueron de: 0, 3, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Luego se evaluó PFT, AR, HMF, CaOX de cada cinética.

6.1 Determinación de polifenoles totales (PFT)

Para cuantificar el contenido de polifenoles presentes en los extractos de vainas de tara, las muestras se diluyeron y se sometieron a ensayos de Folin-Ciocalteu, midiendo absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. En este caso, la cuantificación espectrofotométrica contempla todos los fenoles solubles en agua acidificada que son extraídos con etanol como solvente, considerando los polifenoles de alto y bajo peso molecular (Fernández, 2008). Los valores de absorbancia obtenidos fueron introducidos en la curva de calibración (Anexo N°3), para calcular el contenido de polifenoles totales expresados en equivalentes de ácido gálico por gramo seco de muestra inicial (EAG/g sólido tara).

Los resultados de PFT mediante la extracción sólido-líquido, en diferentes soluciones etanólicas a distintas condiciones de temperatura, se presentan en la Figura 6, donde los valores de cada corrida del diseño experimental, realizados en triplicado, fueron promediados. Al obtener los resultados se observan variaciones en la extracción, representando una mayor extracción en condiciones con soluciones etanólicas de relación 40:60. Esto se debe a que el etanol es capaz de formar interacciones de puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo con los fenoles, lo que indica que puede mejorar la extracción de compuestos fenólicos, siendo seleccionado como co-solvente, es decir, puede interactuar

fuertemente con los solutos de interés en orden de facilitar su extracción (Murga *et al.*, 2000).

Los extractos hidroalcohólicos con mayor contenido de etanol presentan una mayor extracción de PFT, alcanzando un promedio equivalente a 594 (mg EAG/g tara bs) para los extractos hidroalcohólicos de 40:60 en condiciones de 35 °C. En cambio, los extractos con agua acidificada son los que presentan los contenidos más bajos de PFT, con un valor promedio equivalente a 431 (mg EAG/g tara bs) en el extracto de agua acidificada en condiciones de 25 °C. A modo de control se realizó la extracción utilizando una solución de acetona al 60% a 20 °C, siendo uno de los solventes anteriormente estudiados con mayor eficiencia, logrando una extracción máxima de polifenoles equivalente a 940 (mg EAG/g tara bs) (Figura 6).

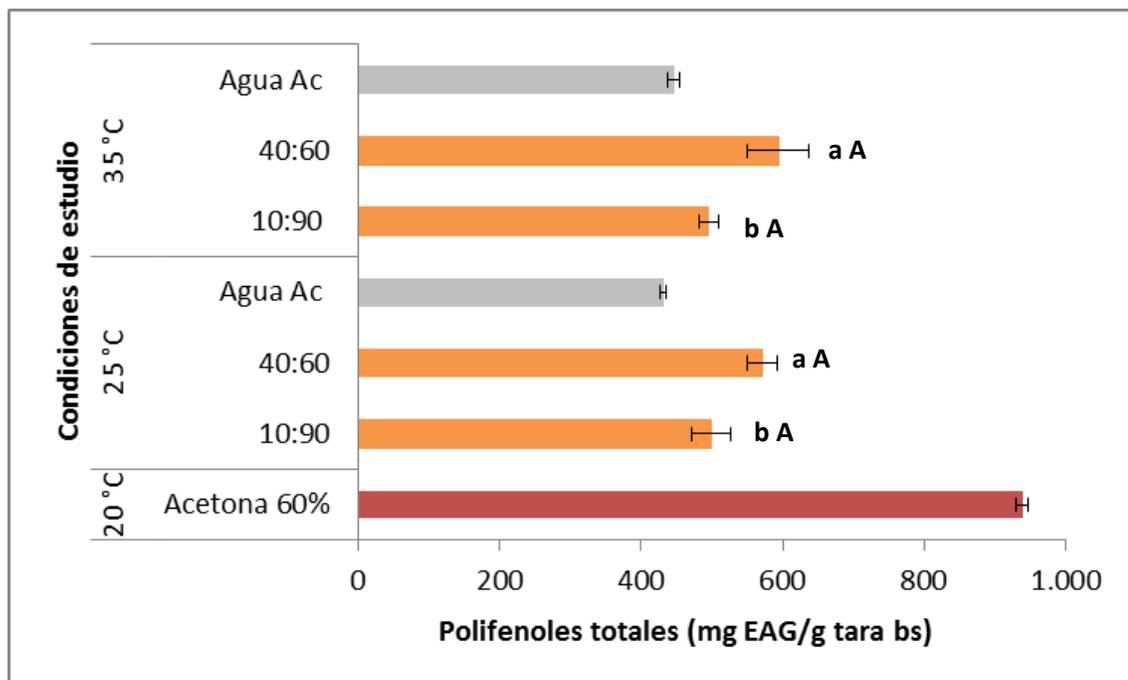


Figura 6: Extracción de polifenoles totales en distintas soluciones hidroalcohólicas a distintas temperaturas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).

Para lograr un análisis más específico, se realizó un análisis estadístico multifactorial, considerando la solución hidroalcohólica y temperatura de extracción para cada solución, permitiendo así determinar el grado de significancia. Para el caso de PFT, según los resultados obtenidos al realizar ANOVA multifactorial, se determinan diferencias mínimas significativas para la solución 40:60 (etanol:agua acidificada) con un nivel de 95,0% de confianza. Según la Figura N°6, se aprecia una mayor extracción de PFT a 35 °C, respecto a los extraídos a 25 °C, sin embargo, según los resultados presentados en la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo 12), no existe un grado de significancia en relación a la variable temperatura.

El extracto con mayor cantidad de PFT fue en condiciones de 35 °C, utilizando una solución hidroalcohólica en proporción 40:60, donde se obtuvo 594 (mg EAG/g tara bs) equivalente a 59,37 (g EAG/100 g sólido tara). Estos resultados son similares a otros estudios donde se realizó hidrólisis parcial de los taninos hidrolizables de la tara. El contenido de ácido gálico libre y de galotaninas en las vainas de tara fue de 1,7 y 50,4 (g de EAG/100 g sólidos), respectivamente (Chambi *et al.*, 2013). Estos valores están de acuerdo con el contenido de ácido gálico y galotaninos en vainas de tara de 2.6 y 53.1 (g de EAG/100 g), reportado previamente por Garro *et al.* (1997). Barthomeuf *et al.* (1994) informaron un contenido de taninos de tara de 56 (g/100 g). Según este estudio, los PFT en las vainas de tara correspondieron a 55.1 (g de EAG/100 g). La suma de galotaninos y ácido gálico correspondió a 52.1 (g de EAE/100 g). Adicionalmente, Bravo (2010) obtuvo en la extracción, un total de 473,4 (mg EAG/g extracto bh). Por su parte, López *et al.* (2011) informaron un contenido de 563,7 (mg EAG/g).

En estudios anteriores, al cuantificar PFT en extractos acuosos que contienen polvo de vaina de tara, éstos presentaron valores altos de polifenoles siendo el mayor valor igual a 149 (mg EAG/g de muestra) y la semilla un valor bajo igual a 5 (mg EAG/g de muestra) (Avilés *et al.*, 2010). Como punto de comparación, uno de los frutos con mayor contenido de antioxidantes es el arándano (*Vaccinium sp.*), que posee un contenido de PFT en un

rango de 11.539 y 20.742 (mg EAG/mg bs) y una capacidad antioxidante IC_{50} de 0,229 a 1,178 (mg/g) para el ensayo DPPH (Saral *et al.*, 2015).

Esto es coherente con un estudio (Campos *et al.*, 2016), en donde se detalla el contenido de PFT, de taninos hidrolizables y la CaOX de vainas de tara extraídos en distintos medios (agua, metanol 80%, etanol 80% y acetona 80%), a distintos pH (2,08; 3,06 y 5,05). Se evidencia que, tanto para PFT como para taninos hidrolizados y CaOX, el pH de extracción óptimo es 3,06 y los medios óptimos son agua y etanol 80%. Para el extracto en agua se obtuvo para PFT 431,5 (mg GAE/g bs); contenido de taninos hidrolizables 485 (mg GAE/g bs), CaOX de 10020 (μ MET/g bs). Para el extracto de etanol 80% se obtuvo para PFT 445,1 (mg GAE/ g bs); contenido de taninos hidrolizables 355,2 (mg GAE/g bs), CaOX de 11808 (μ MET/g bs). Esto sustenta que la mezcla de etanol y agua acidificada a pH 4,2 es un buen solvente para extraer PFT.

Es importante mencionar, que los compuestos polifenólicos se pueden dividir en polifenoles extraíbles (PE), aquellos que se solubilizan en los disolventes acuoso-orgánicos y polifenoles no extraíbles (PNE), siendo los que quedan retenidos en el residuo resultante tras la extracción acuoso-orgánica. Los compuestos extraíbles poseen pesos moleculares bajos o medios (de monómeros a decámeros) mientras que los no extraíbles son compuestos con un peso molecular elevado (5000 unidades o mayores), polifenoles de bajo peso molecular unidos a los componentes de la matriz de la fibra dietética o a proteínas que se encuentran en los residuos de dicha extracción acuoso-orgánica o polifenoles que pueden quedar atrapados en la matriz vegetal, siendo inaccesible a los disolventes (Arranz, 2010).

6.2 Determinación de azúcares reductores (AR) (fructosa-glucosa)

Para determinar el contenido de azúcares reductores, se utilizó un equipo HPLC acoplado a un detector IR, permitiendo realizar un análisis cromatográfico, aplicando la metodología mencionada anteriormente.

Al cuantificar los azúcares reductores liberados mediante lixiviación, se observan variaciones dependiendo de las condiciones de temperatura y solución trabajadas (Figura 7 y 8). Los resultados de fructosa y glucosa obtenidos fueron expresados en miligramos por

gramo de muestra seca. La mayor y menor cantidad de azúcar lixiviado se presentó en los controles, siendo la menor cantidad de fructosa lixiviada de 1,63 (mg/g sólido tara) en condiciones de 25 °C en solución de agua acidificada, con un máximo lixiviado de 2,1 (mg/g sólido tara) con acetona al 60% en condiciones de temperatura igual a 20 °C. De la misma forma, los resultados presentes en la lixiviación de glucosa, el menor valor corresponde a 0,14 (mg/g sólido tara) en condiciones de agua acidificada a 25 °C, con un máximo igual a 0,39 (mg/g sólido tara) de glucosa lixiviada en condiciones de 20 °C con acetona al 60%. Los valores de fructosa y glucosa al aumentar la temperatura de 25 a 35 °C, son similares. Al comparar los resultados, la cantidad de fructosa es mayor que la cantidad de glucosa lixiviada, como se observa en las Figuras 7 y 8.

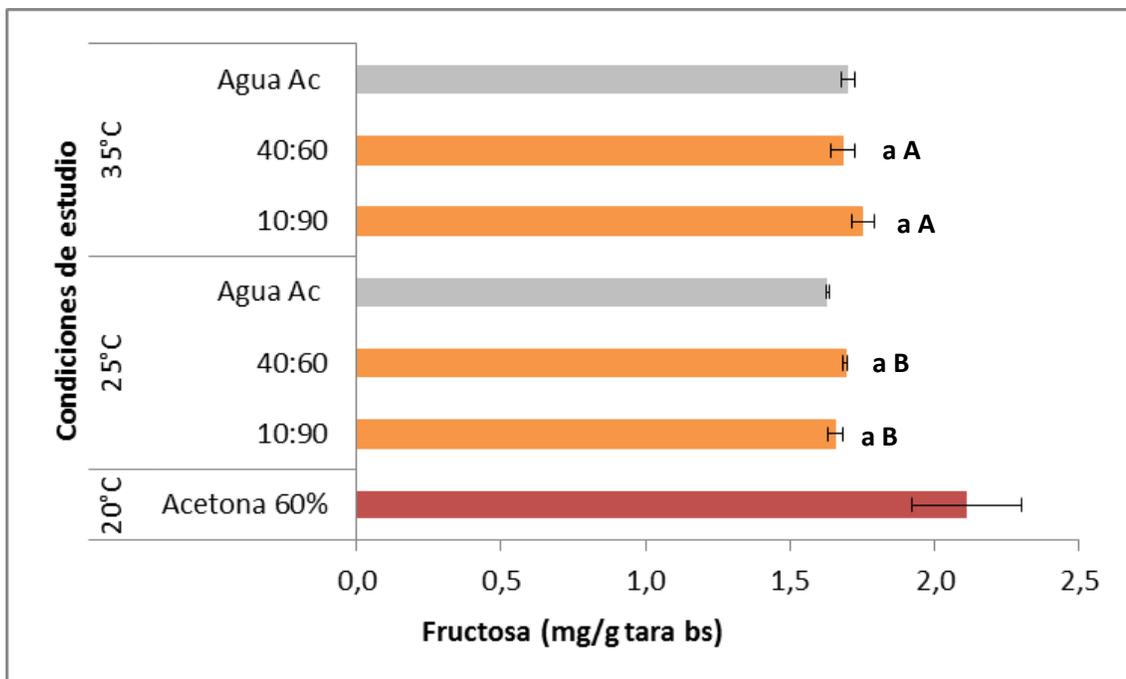


Figura 7: Lixiviación de fructosa en extractos de vaina de tara para distintas condiciones de temperatura y relaciones de soluciones hidroalcohólicas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).

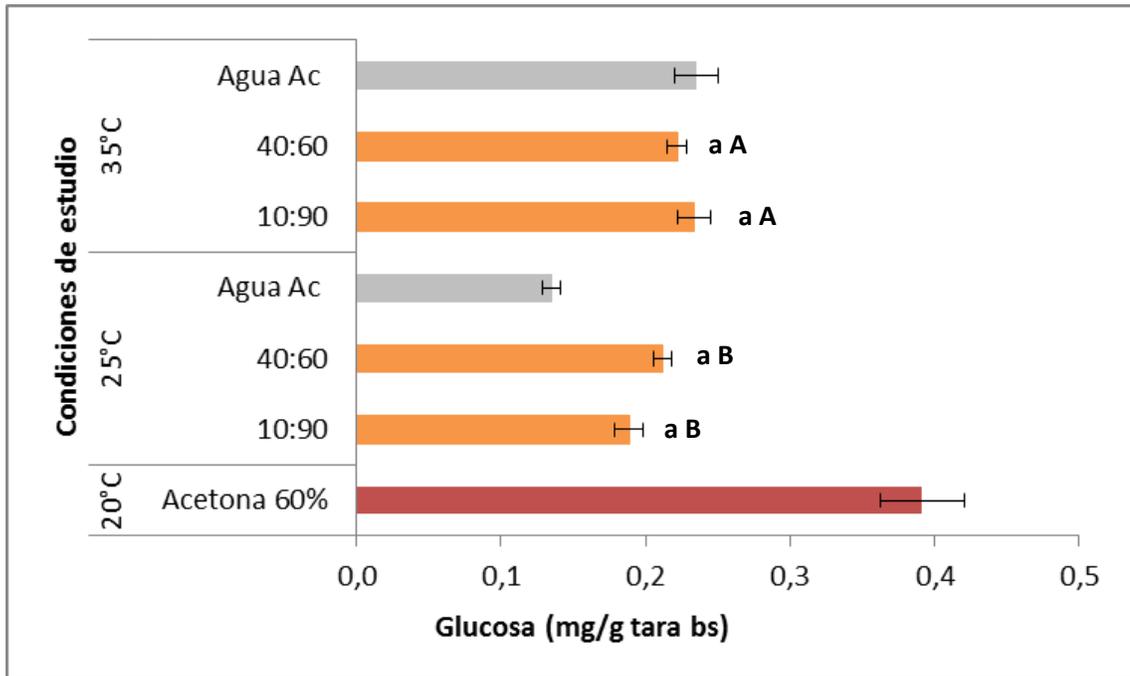


Figura 8: Lixiviación de glucosa en extractos de vaina de tara para distintas condiciones de temperatura y relaciones de soluciones hidroalcohólicas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).

Para realizar un análisis más detallado de los resultados, se aplicó una prueba estadística, tanto para fructosa como glucosa, determinando el grado de significancia mediante análisis ANOVA multifactorial. Existen variaciones dependiendo de las condiciones de temperatura y soluciones aplicadas, donde el menor valor en relación a la cantidad de fructosa lixiviada fue el obtenido en condiciones de 25 °C correspondiente al extracto hidroalcohólico 10:90, siendo equivalente a 1,66 (mg/g tara bs); mientras que en condiciones de 35 °C el menor valor fue obtenido con el extracto hidroalcohólico 40:60, el cual es equivalente a 1,68 (mg/g tara bs). Al realizar el análisis estadístico, evaluando la cantidad de fructosa obtenida según las condiciones de temperaturas aplicadas (25 y 35 °C). se aprecia un promedio de las medias menor para los extractos expuestos a una temperatura de 25 °C en comparación a los extractos expuestos a 35 °C. Según los resultados obtenidos en la Tabla

ANOVA multifactorial (Anexo 12), se presenta un grado de significancia en relación a la variable temperatura. Según el análisis estadístico, se evidencia un grado de significancia donde el promedio de las medias para el extracto 40:60 es menor en cantidad de fructosa respecto a la solución hidroalcohólica de 10:90, considerando la variable solución.

Es importante mencionar que dentro de los azúcares reductores, el contenido de fructosa es predominante en los extractos tanto de 10:90 como de 40:60, (relación 1:6, glucosa:fructosa), por lo que es relevante que para la fructosa, el extracto 40:60, que es el extracto que posee mayor contenido de PFT, tenga uno de los más bajo contenidos de dicho azúcar.

Esta proporción de azúcares concuerda con estudios previos, en donde en vainas de tara rojas, el porcentaje de fructosa y glucosa es de 7,9% y 1,2% respectivamente; y en vainas de tara amarillas el porcentaje de fructosa y glucosa es 8,9% y 1,2% respectivamente (Saavedra, 2016). Tanto la fructosa como la glucosa, deben estar al mínimo de concentración en el extracto polifenólico, ya que los azúcares reductores son precursores reactivos de los productos de la reacción de Maillard (Mariotti-Celis *et al.*, 2013).

Posteriormente, se determinó la cantidad de glucosa lixiviada desde las vainas de tara, donde el menor valor fue obtenido en el extracto hidroalcohólico 10:90 en condiciones de 25 °C siendo equivalente a 0,19 (mg/g tara bs), mientras que, en relación a la cantidad de glucosa lixiviada en condiciones de 35 °C, el extracto hidroalcohólico 40:60, presentó un valor equivalente a 0,22 (mg/g tara bs).

Entre los posibles factores que podría afectar el proceso de lixiviación de azúcares reductores, es la disponibilidad de los componentes en la matriz vegetal. Los azúcares reductores tanto fructosa como glucosa, se encuentran distribuidos en una capa externa de la membrana vegetal, siendo un factor que podría facilitar la extracción de los azúcares (Fuster *et al.*, 2005).

Al realizar el análisis estadístico ajustando las variables de respuesta, considerando los promedios de las medias en relación con la variable temperatura, se observa un menor promedio de glucosa lixiviada para los extractos expuestos a una temperatura de 25 °C. Según los resultados obtenidos en la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo 12), los resultados

presentan un grado de significancia en relación con la variable temperatura. De igual forma, para la variable solución, se evidencia un menor promedio de las medias para el extracto de solución hidroalcohólica 10:90 en comparación al extracto 40:60.

La equivalencia de los resultados obtenidos en porcentaje de azúcares reductores en los extractos (Anexo N°6) son 0,16% (g fructosa/100 g tara bs) la menor cantidad de fructosa lixiviada y 0,014% para la lixiviación de glucosa en condiciones de 25 °C en solución de agua acidificada. El máximo lixiviado de fructosa alcanza 0,21% y el máximo de 0,039% de glucosa lixiviada en condiciones de 20 °C con acetona al 60%. Estos datos mantienen la tendencia durante el estudio respecto a la relación de azúcares reductores, siendo mayor la cantidad de fructosa presente en todos los extractos. Respecto a otros estudios, estos resultados son menores a los reportados por Garro Gálvez *et al.* (1997), de 0,93% de glucosa y 1,62% de un compuesto desconocido identificado probablemente como fructosa, en un extracto de vainas de tara. Los resultados también difieren también del estudio de Pedreschi *et al.* (2018), en donde en una caracterización química de extractos de vaina de tara, se obtuvo 12% de fructosa y un contenido de 1,8% de glucosa. Esta diferencia se debe principalmente al proceso de extracción de los azúcares, debido a que, en los estudios mencionados, se empleó agua como solvente en la proporción de 1:4 y 1:60 p/v respectivamente, por lo que la cantidad de compuestos solubles en agua difiere, obteniendo un extracto con una mayor concentración porcentual de éstos.

Debido a que los azúcares reductores presentes en la tara actúan como precursores en la formación de neocontaminantes, es deseable tener la menor concentración posible de éstos al momento de someter al producto a altas temperaturas.

6.3 Determinación de hidroximetilfurfural (HMF)

La determinación de HMF fue evaluada en cada uno de los extractos; sin embargo, en ninguno de los casos se detectó el neocontaminante, debido a que el componente HMF se forma en alimentos procesados a temperaturas mayores que las aplicadas en esta etapa (25 °C y 35 °C). La longitud de onda a la que se determina el HMF es de 284 nm; los peak iniciales que se observan en la Figura 9 pertenecen a pruebas de calibración (a); los peak

de la porción (b), son los peak pertenecientes a los componentes presentes en la muestra de solución hidroalcohólica.

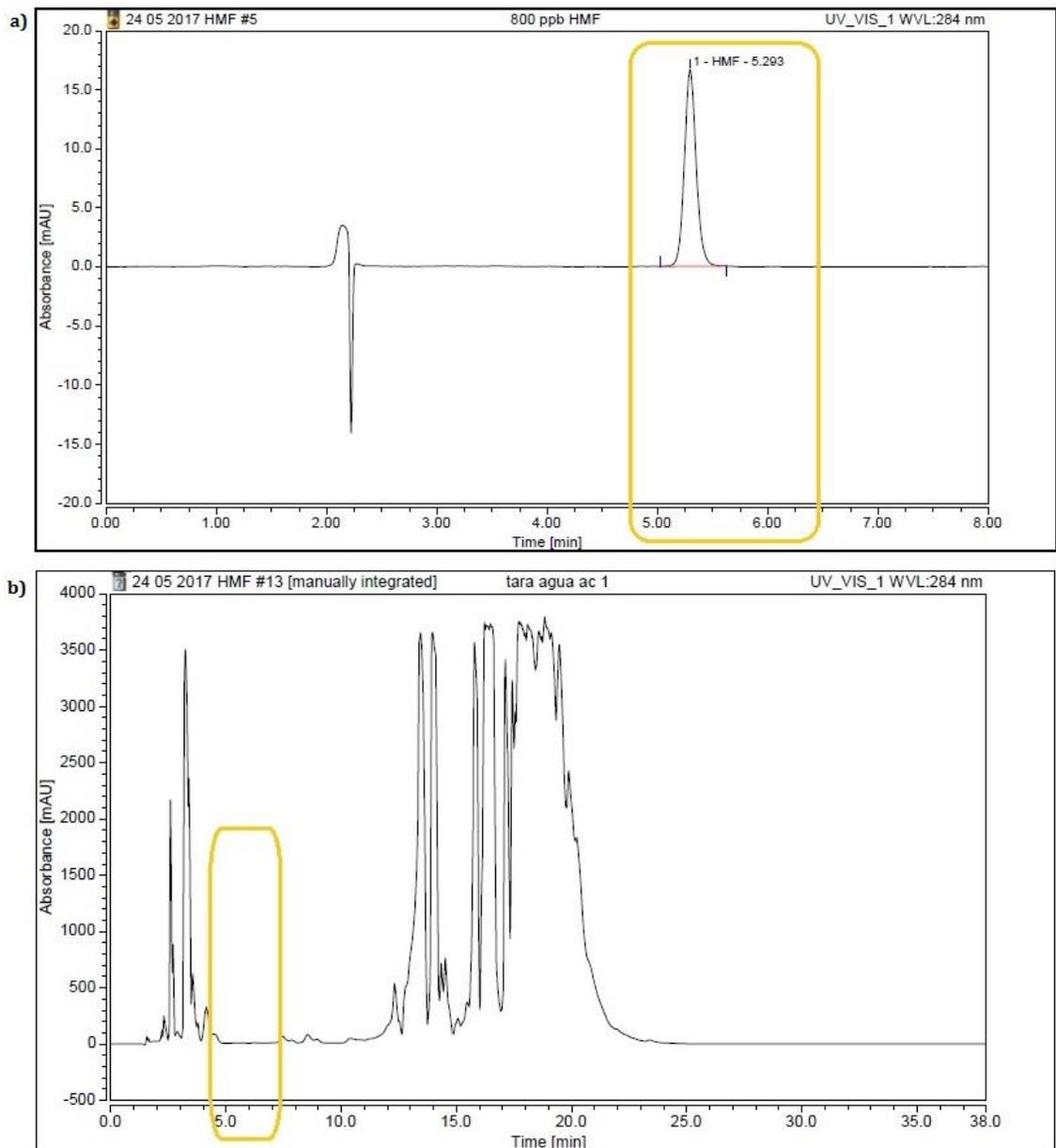


Figura 9: Cromatograma de HPLC-DAD correspondiente a calibración estándar HMF a 284 nm (a), detección HMF en extracto de vainas de tara (b).

En la Figura 9, se muestra en el cromatograma (a) la detección del estándar de HMF en un tiempo de retención de 5,293 minutos. En el cromatograma (b) se evidencia en el extracto de vaina de tara que en el tiempo de retención de 5 minutos no hay presencia del peak, demostrando la ausencia de HMF en la muestra.

El objetivo principal de la primera etapa de este estudio, fue evaluar las condiciones de estudio en donde se obtenga el extracto de tara con mayor contenido de polifenoles totales (PFT) y menor contenido de azúcares reductores (AR), para poder evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre el extracto y la formación de HMF.

6.4 Determinación de capacidad antioxidante (CaOX)

La CaOX de los extractos de tara, se determinó por los métodos DPPH y ORAC.

6.4.1 Metodología DPPH

La metodología de DPPH, desarrollada por Brand-Williams *et al.* (1995), evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. De esta forma es posible cuantificar la capacidad atrapadora de radicales libres, que poseen distintas sustancias, mediante la determinación del grado de decoloración que dicho compuesto provoca en una solución metanólica de DPPH (Viturro *et al.*, 1999). En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el extracto antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante. La determinación de la CaOX de compuestos extraídos bajo diferentes condiciones de estudio (solución hidroalcohólica y temperatura), se muestra en la Figura 10, en donde los valores de DPPH fueron expresados como micro mol equivalente Trolox por gramo de tara en base seca (uMET/g tara bs).

Se observa que la mayor extracción de compuestos con CaOX, es en el extracto de tara con condiciones de solución de agua acidificada, seguida de la solución de 10:90, a temperatura de extracción de 25 °C, cuyos valores son 10682 ($\mu\text{MET/g tara bs}$) y 9066 ($\mu\text{MET/g tara bs}$) respectivamente. En condiciones de 35 °C, el mayor valor promedio del extracto hidroalcohólico es 40:60, equivalente a 8735 ($\mu\text{MET/g tara bs}$). A modo de control, se realizó una extracción utilizando como solución acetona al 60% a 20 °C, logrando una capacidad antioxidante equivalente a 6066 ($\mu\text{MET/g tara bs}$).

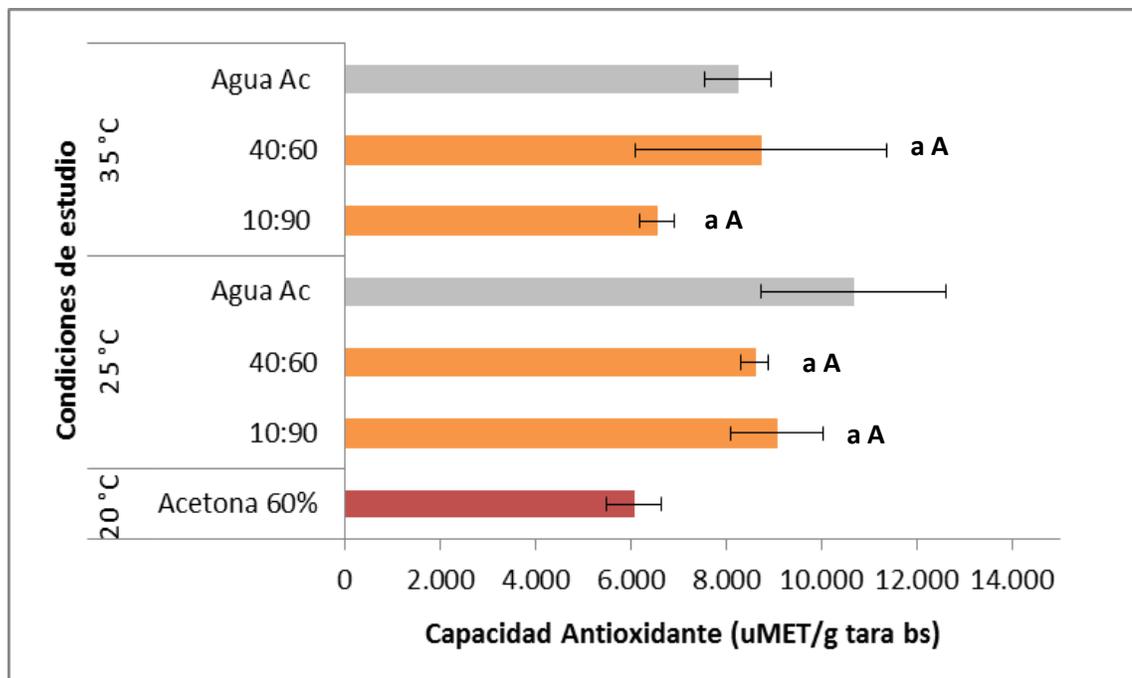


Figura 10: Capacidad antioxidante (DPPH) en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas. * Letras a y b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar)

Al realizar un análisis estadístico evaluando la CAOx, se evidencian, según los resultados obtenidos del ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que no existe un grado de significancia para ninguna de las variables (solución ni temperatura), existiendo una mayor CaOX a

temperatura de 25 °C, en comparación a los extractos expuestos a temperaturas de 35 °C, y mayor CaOX en la solución de 40:60.

En la Figura 11 se muestran los valores de IC₅₀, en donde el cálculo correspondiente al valor de IC₅₀, se realizó mediante un análisis de regresión de los porcentajes de inhibición con la concentración necesaria de los extractos para inhibir el 50% del radical DPPH. De la misma forma, se observa que la mayor extracción de compuestos con CaOX es en condiciones de solución de agua acidificada, seguida de la solución de 10:90, a temperatura de extracción de 25 °C, cuyo valor es de 0,07 (mg/mL) y 0,09 (mg/mL).

En condiciones de 35 °C, el mayor valor promedio del extracto hidroalcohólico en proporción 40:60, es de 0,09 (mg/mL). Por su parte, en el extracto control de acetona al 60% a 20 °C, alcanzando una CaOX equivalente a 0,13 (mg/mL).

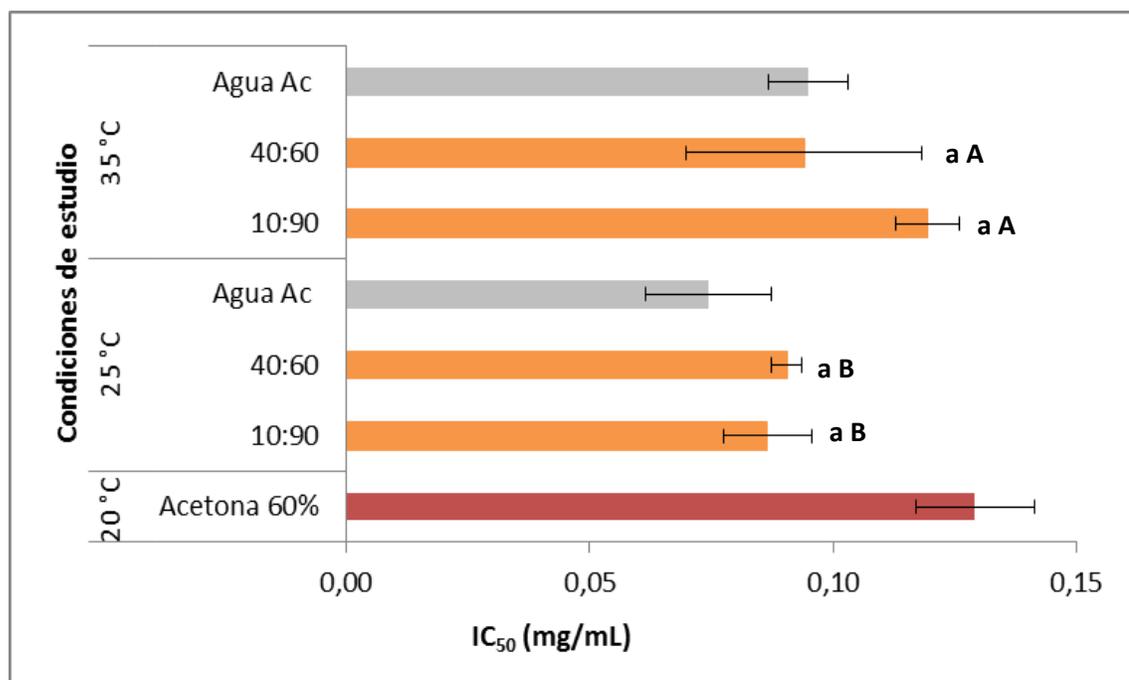


Figura 11: Capacidad antioxidante (IC₅₀) en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas. *Letras a y b indican diferencias significativas (p<0,05) de acuerdo a la variable solución. **A y B: indican diferencias significativas de acuerdo a la variable temperatura. Las barras corresponden al valor promedio (± desviación estándar).

Al realizar un análisis estadístico evaluando la CaOX, se evidencian, según los resultados obtenidos en el ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que existe un grado de significancia para la variable temperatura, existiendo una mayor CaOX a temperatura de 25 °C, en comparación a los extractos expuestos a temperaturas de 35 °C.

La actividad antioxidante, también puede ser expresada como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (IC₅₀) (Puengphian y Sirichote, 2008). La equivalencia en IC₅₀ para la condición de extractos de 40:60 a 35 °C, es de 0,094 (mg/mL) (Anexo N°8). Respecto a otros estudios, estos resultados evidencian que los extractos de vainas de tara tienen una alta CaOX. En extractos acuosos de vainas de tara rojas y amarillas, se determinó un IC₅₀ de 1,24 y 1,37 (mg/mL), para la cantidad de fenoles y flavonoides de las vainas de tara de las localidades de Picoy y Santa Fe respectivamente (López et al., 2011). Se reportó por Villanueva-Tiburcio et al. (2010), un contenido de 0,24 (mg/mL) para extractos metanólicos y 0,59 (mg/mL) para extractos acuosos del fruto noni (*Morinda citrifolia* Linn.), por Villacorta y Pérez (2011).

En un estudio en donde se realizó medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal, la actividad antioxidante de la especie vegetal con mayor contenido de PTF y CaOX, es *D. molliculum*, donde alcanza valores de 125,8 (mg EAG/g extracto seco) de fenoles totales y un IC₅₀ de 221,3 (µg/mL). Como punto de comparación, uno de los frutos con mayor contenido de antioxidantes es el arándano (*Vaccinium* sp.), que posee un contenido de PTF en un rango de 11.539 y 20.742 (mg EAG/mg bs) y una capacidad antioxidante IC₅₀ de 0,229 a 1,178 (mg/g) para el ensayo DPPH (SaraI et al., 2015).

Con los valores obtenidos de PTF, CaOX e IC₅₀, se realizaron gráficos de correlación. Según los resultados obtenidos, al correlacionar los componentes, existe un coeficiente de correlación alto ($R^2= 0,99$), presentando una correlación inversamente proporcional para la capacidad antioxidante (IC₅₀ y DPPH). En la Figura 12, se puede apreciar el comportamiento de los diferentes extractos, evidenciándose una tendencia de tipo exponencial negativa, donde un menor valor de IC₅₀, implica una mayor CaOX. En este caso, es necesaria una menor concentración de extracto de polifenoles para lograr neutralizar en un 50% los radicales libres del DPPH, para una mayor capacidad antioxidante.

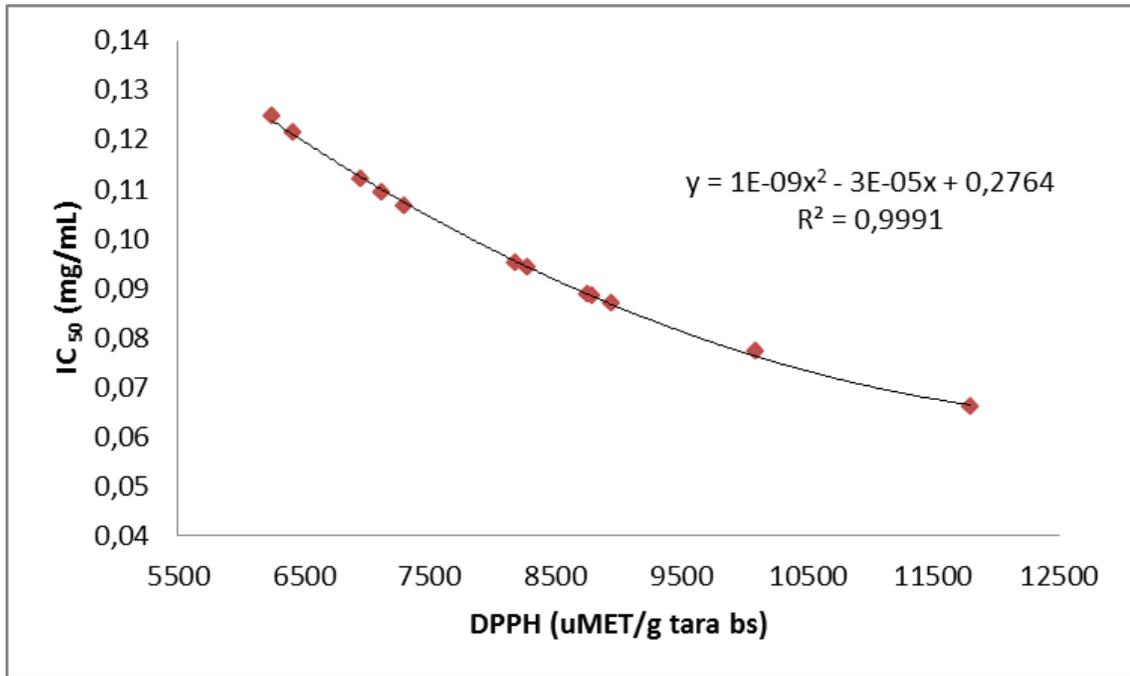


Figura 12: Correlación para capacidad antioxidante entre valores de IC₅₀ y DPPH en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas.

Por su parte, en la Figura 13 y 14, no se observa una correlación entre el contenido de PFT y su CaOX, es decir, que la CaOX no está directamente relacionado con la cantidad de polifenoles de cada extracto, considerando las condiciones de extracción del presente estudio. Al correlacionar el contenido de PTF con el valor de DPPH y de IC₅₀, se observa que los compuestos polifenólicos poseen un bajo coeficiente de correlación siendo igual a R²= 0,4 y R²= 0,3, respectivamente. En este caso, el bajo nivel de correlación se presenta ya que al cuantificar PFT, el contenido total se expresa como equivalentes de ácido gálico, desconociendo la totalidad de polifenoles comprendidos en la composición de la tara, y en consecuencia desconociendo los niveles de CaOX de cada polifenol en particular. Además, el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para donar hidrógeno lo cual depende estrechamente del número de grupos hidroxilos y de la estructura química del compuesto (Silva, 2012). Según estudios previos, las vainas de tara contienen un mayor porcentaje de taninos hidrolizables (galotaninos) en rango de 40% a 60% (Muñoz et al, 2007).

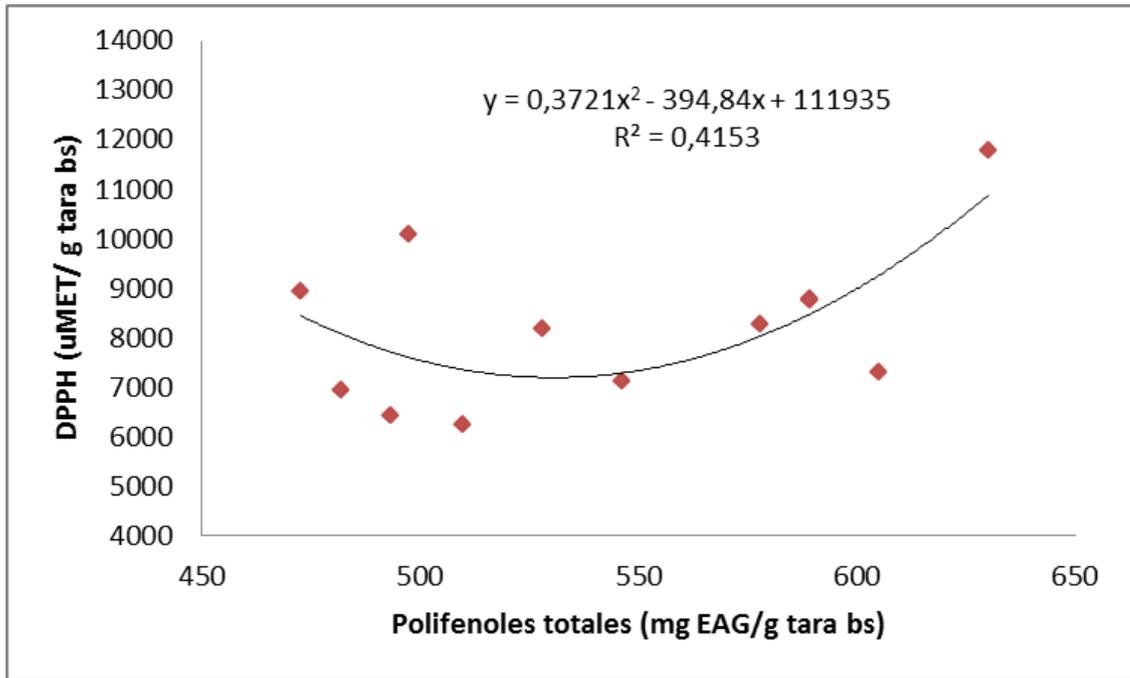


Figura 13: Correlación para capacidad antioxidante (DPPH) y PFT en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas.

En estudios anteriores realizados en vinos al correlacionar la CaOX (DPPH) con las familias de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, se observó que la familia posee un moderado coeficiente de correlación, correspondiente a flavonoles el cual fue de $r=0,489$ seguido por los flavanoles con $r=0,236$. En cambio, los resultados encontrados por Fernández et al. (2004) muestran que los flavonoles no presentan una relación significativa con la actividad antioxidante de los vinos; no así los flavanoles (Hernández, 2012).

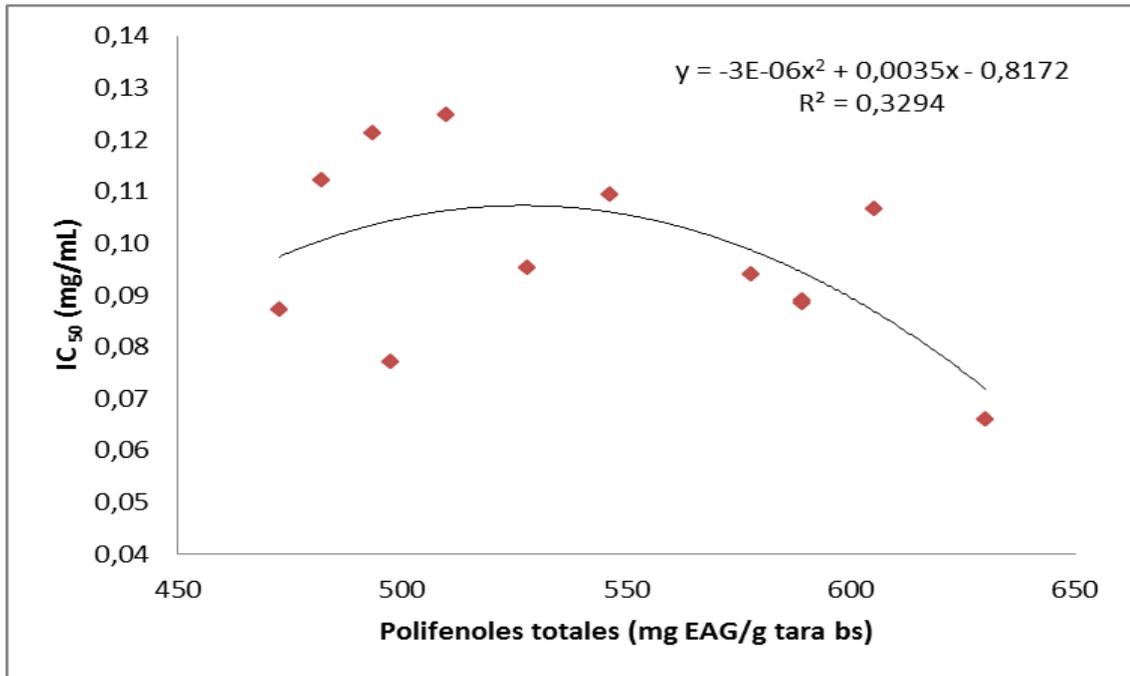


Figura 14: Correlación para capacidad antioxidante (IC₅₀) y PFT en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas.

Es por las razones antes mencionadas, que se utilizó el extracto de tara sometido a 35 °C con una proporción de solución hidroalcohólica de 40:60, ya que el extracto sometido a dichas condiciones presenta un mayor contenido de PFT, menor contenido de fructosa, que es el azúcar predominante en el fruto y, además, presenta una elevada CaOX.

Estudios en el aspecto de la composición química de la tara realizados por Cruz Lapa (2004), denotan el contenido de taninos en el fruto de la tara, el cual es de 62% en la cascara del fruto. Es indudable la importancia que los taninos vegetales poseen, en donde su mayor aplicación es por la capacidad de precipitar proteínas, lo que le otorga la astringencia (Rodríguez, 2010). Ello implica que la solución 40:60 al permitir extraer mayor contenido de PFT de la vaina, existe la posibilidad que los taninos provenientes de la tara precipiten aminoácidos, lo que evitaría que dicho compuesto proteico pueda ser partícipe de alguna reacción de Maillard en caso de exponer el extracto a altas temperaturas.

Además, la proporción de 40:60 (etanol:agua acidificada), presenta mayor proporción de etanol que la solución de 10:90, lo que según detalla un estudio previo, en el cual se evidencia que el etanol presenta un alto rendimiento de recuperación (61%) para la extracción de taninos respecto al peso inicial de la muestra de polvo de tara (Edwin, 2012). Se menciona, además, que el aumento del contenido de agua de los disolventes puede favorecer la extracción de taninos, pero también a la vez producirse degradación hidrolítica (Cadahia, 1995). La idoneidad de las mezclas etanol-agua como disolventes en la extracción de taninos varía probablemente con la especie y el tejido vegetal de que se trate (Hagerman, 1987), pero, en el caso de la tara dicha proporción mantiene el mayor rendimiento de extracción de PFT y azúcares reductores. Junto con ello, en medicina tradicional se reporta que las plantas deben macerarse en soluciones hidroetanólicas a concentraciones de etanol de 30% (Hoffmann 1996), o 70% (Sosa 1997), debido a su baja toxicidad para consumo humano, considerándose como un procedimiento de extracción seguro y eficiente (Xavier *et al.* 2015).

6.4.2 Metodología ORAC

Los resultados de CaOX valorada por diferentes métodos no siempre coinciden, de hecho, existen dificultades para comparar resultados, incluso entre métodos basados en el mismo mecanismo redox, según ha sido descrito por numerosos autores, lo cual conlleva a obtener resultados variables entre publicaciones (Stratil *et al.*, 2007). Es por ello que actualmente se recomienda que los estudios de valoración de la CaOX de alimentos se lleven a cabo utilizando más de una técnica analítica. Según Ciz y Cizova (2010), es muy difícil evaluar la actividad antioxidante de un producto sobre la base de un único método que proporcionará información básica sobre las propiedades antioxidantes; una combinación de métodos describe las propiedades antioxidantes de la muestra en más detalle.

Es por ello, que además de determinar CaOX por el método DPPH, se realizó el método ORAC a las muestras cuyas condiciones se replicarán para realizar el tratamiento térmico posterior. En dicho análisis (Figura 15) se observa que el promedio para los extractos 40:60 obtenidos a 35 °C, es de 4062 (μ MET/g tara bs), mientras que para los extractos de acetona al 60 °C, el valor promedio alcanza 4613 (μ MET/g tara bs).

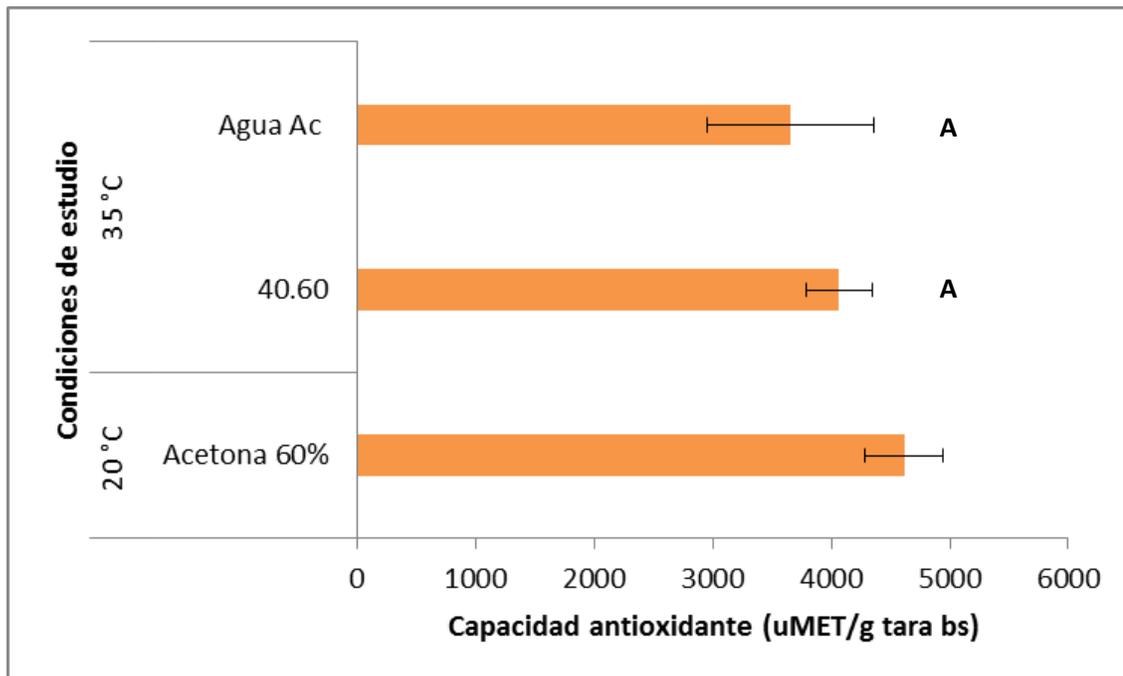


Figura 15: Capacidad antioxidante (ORAC) en extractos de vaina de tara a distintas condiciones de temperatura y concentraciones de soluciones hidroalcohólicas. *Letras A y B indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al tipo de extracción. Las barras corresponden al valor promedio (\pm desviación estándar).

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis ANOVA simple, evaluando las condiciones de CaOX según el tipo de extracto. En el gráfico de medias obtenido, se observa que los extractos de 40:60 presentan una mayor CaOX, pero el p-valor indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad antioxidante de los extractos. Se obtuvo para la solución de 40:60 sometida a 35 °C, una CaOX promedio de 4062 ($\mu\text{MET/g tara bs}$). Estos resultados demuestran la alta CaOX del extracto de vaina de tara, ya que según un estudio de Avello *et al.* (2005), cuantificó la actividad antioxidante de infusiones de *Ugni molinae turcz* ("murtilla"), el cual arrojó un valor ORAC de 533 ($\mu\text{MET/g}$ de hojas secas). En un estudio donde se empleó el residuo de semillas de uvas para cuantificar CaOX de las semillas de uva Chardonnay, Merlot y Muscadine, se obtuvieron valores de 638, 345 y 311 ($\mu\text{MET/g bs}$), respectivamente (Yilmaz *et al.*, 2006). Esto evidencia que la CaOX de la tara es considerablemente mayor a otras matrices vegetales.

6.5 Estudio cinético de degradación de componentes

A continuación, se presentan y discuten los resultados del estudio cinético realizado al extracto de tara seleccionado,

6.5.1 Determinación de PFT durante la cinética de degradación térmica

Se determinaron los PFT en todos los puntos de la cinética, utilizando la técnica espectrofotométrica de Folin Ciocalteu. Según se observa en la Figura 16, a mayor temperatura de exposición del extracto, mayor es la reducción en el contenido de PFT respecto al punto inicial. La tendencia para las condiciones expuestas a 120 y 150 °C, presentan un descenso de PTF en los primeros 15 minutos, desde 566 (mg EAG/g tara bs), a 561 (mg EAG/g tara bs) al tiempo 0, hasta 473 (mg EAG/g tara bs), a 463 (mg EAG/g tara bs), respectivamente; luego de los 15 min, no se visualizan mayores cambios en los PFT. Mientras que para los extractos sometidos a 60 y 90 °C, éstos presentan un comportamiento lineal en todo el tiempo de exposición, en donde para estas temperaturas no hubo disminución de los PFT, solo se aprecia variabilidad analítica. A pesar de que las tendencias de las curvas de 60 y 90 °C son similares, el descenso de PFT es de un 3% más en el extracto sometido a 90 °C a los 30 minutos de exposición.

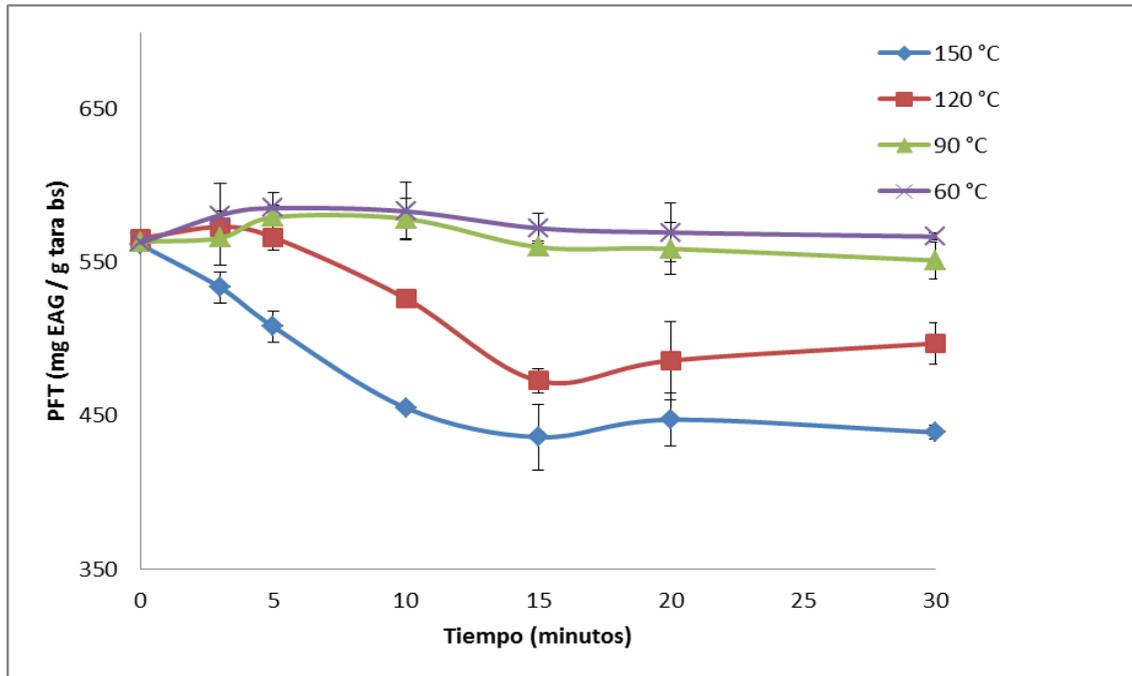


Figura 16: Cinética de degradación térmica de polifenoles totales en un extracto de vainas de tara.

Al realizar un análisis estadístico evaluando el contenido de PFT, se evidencian, según los resultados presentados por la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que existe un grado de significancia tanto para la variable temperatura como para la variable tiempo. Para determinar cuáles medias fueron significativamente diferentes de las otras, se muestra la Pruebas de Múltiples Rangos (Anexo N°12), en donde para la variable temperatura existen diferencias significativas entre la solución expuesta a 150 °C, 120 °C y 60 - 90 °C en conjunto, pero no así, para la solución expuesta a 60 y 90 °C, en donde no hay diferencias significativas entre sí. Para la variable tiempo, existe significancia entre los grupos de los tiempos de exposición 0-10 y 15-30 min, tal como se aprecia en la Figura 15, en donde los primeros 10 minutos para las temperaturas de 60 y 90 °C, y en el caso del extracto sometido a 120 °C, los primeros 10 minutos muestran un incremento aparente del contenido de PFT (4%, 3% y 0,1% respectivamente); y a partir del minuto 15, hay un descenso del contenido de PFT en el extracto. Tal como indica Redovniković et al. (2009), las condiciones de proceso influyen en el contenido de moléculas antioxidantes. Este

fenómeno se debe principalmente a procesos oxidativos cuando se incrementa la temperatura hasta valores muy elevados (Alean et al., 2016; Schinella et al., 2010).

Es importante mencionar que la técnica de Folin Ciocalteu identifica la cantidad total de fenoles dentro del extracto, sin discriminar que la variación del color (de amarillo a azul), puede tener lugar con cualquier grupo hidroxilo oxidable (Sánchez y Panigua, 2008). En un estudio sobre los compuestos bioactivos y la CaOX de *Physalis peruviana* para la obtención de puré, existe un comportamiento similar de los compuestos fenólicos totales, existiendo un incremento aparente del contenido de compuestos fenólicos en 22% b.s; sin embargo, al ser evaluados los resultados en base húmeda, ocurrió una pérdida de 6% (Málaga et al., 2013). En un estudio donde se evaluó el contenido de PFT durante el tostado del cacao (*Theobroma cacao*) criollo de Amazonas, los polifenoles totales se redujeron significativamente en función de la temperatura y el tiempo (Fernández, 2018).

Esos resultados difieren cuando el proceso térmico es distinto; en un estudio donde se evaluó el efecto de la temperatura de secado sobre los compuestos fenólicos y la CaOX en el residuo de la producción del jugo de mandarina, se observó que, al aumentar la temperatura, el contenido de fenoles totales aumentó hasta en un 20% (Esparza et al., 2016). En el mismo estudio, se observó un comportamiento similar con los flavonoides totales y los taninos condensados. Cuando la temperatura de secado se incrementó el contenido de ambos compuestos aumentaron, los flavonoides se incrementaron de 2,54 a 3,21 (mg/100 g), mientras que los taninos lo hicieron de 0,43 a 1,23 (mg/100 g).

Esta técnica es comúnmente utilizada en la industria alimentaria por su simplicidad, disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado. Prior *et al.* (2005) puso de manifiesto que el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con una serie de compuestos químicos que no son compuestos fenólicos (interferencias) tales como el ácido ascórbico (ASA), azúcares (fructosa y sacarosa) o aminas aromáticas, por lo que sería interesante contar con otros reactivos que interaccionasen de forma más selectiva con los polifenoles.

6.5.2 Determinación de AR (fructosa-glucosa) durante la cinética de degradación térmica

Se evaluó el contenido de glucosa y fructosa en cada punto de la cinética, mediante análisis por HPLC con detector IR. En la Figura 17, se observa el comportamiento de los extractos según su composición de fructosa en el transcurso del tiempo. Tanto para la cinética de 60 °C como para la de 90 °C se observa una leve disminución del contenido de fructosa en el extracto al transcurrir el tiempo, alcanzando 0,150 (mg fructosa/g tara bs), y 0,161 (mg fructosa/g tara bs) a los 30 minutos, lo que es una reducción equivalente del 7% y 14% respectivamente para las cinéticas de 60 °C y 90 °C respecto al tiempo 0. Para el caso de la cinética de 120 °C, se evidenció un alza de 4,0% en el contenido de fructosa, alcanzando 0,181 (mg fructosa/g tara bs). En la cinética de 150 °C se observa un incremento en la fructosa durante los 30 minutos de exposición, en donde aumentó 1,8% respecto al tiempo 0, alcanzando 0,178 (mg fructosa/g tara bs). A pesar de ello, se evidencia que al minuto 20 comienza una disminución del contenido de fructosa, por lo que se deduce que dicha reducción se podría deber a la formación de HMF.

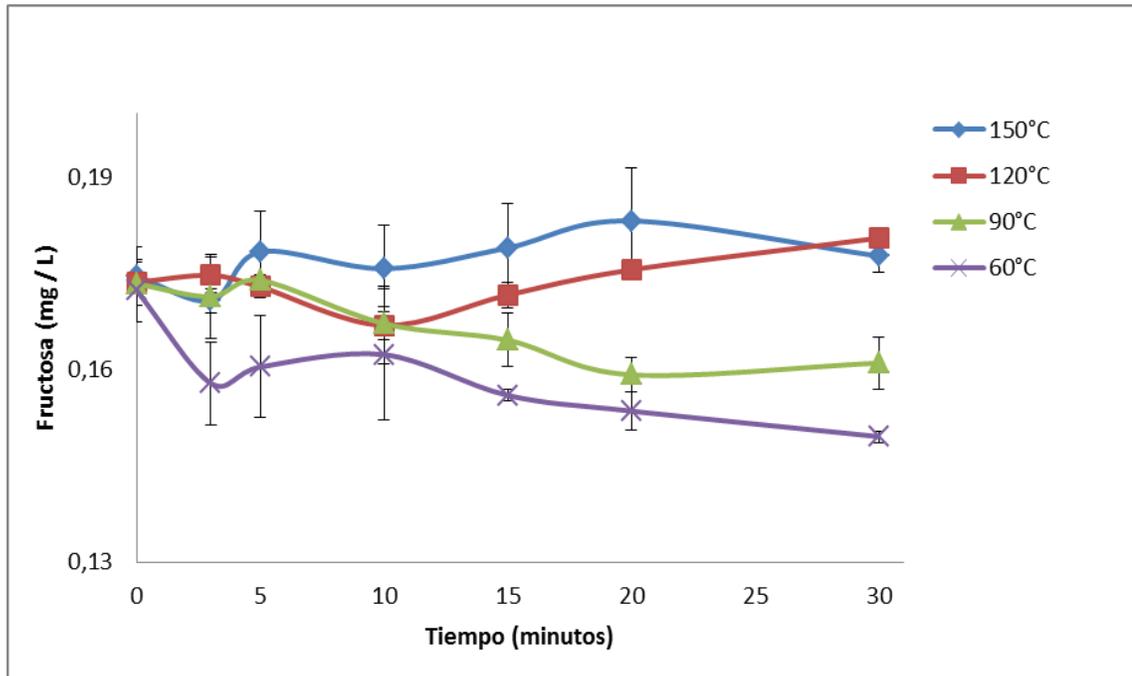


Figura 17: Cinética de degradación térmica de fructosa en un extracto de vainas de tara.

Al realizar un análisis estadístico evaluando las variables de respuesta para el contenido de fructosa, se evidencia, según los resultados presentados por la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que existe un grado de significancia tanto para la variable temperatura como para la variable tiempo. Para determinar la significancia de las medias, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos (Anexo N°12), en donde para la variable temperatura existen diferencias significativas entre todas las temperaturas de exposición. Para la variable tiempo, existe significancia entre los grupos de los tiempos de exposición 0-5, 3-20 y 30 min, tal como se aprecia en la Figura 17, en donde hay un punto de inflexión al minuto 5, en donde las cinéticas ascienden o descienden para 120 °C - 150 °C y 60 °C -90 °C respectivamente; y en el minuto 30 en particular se evidencia que el extracto expuesto a 150 °C presenta una disminución del contenido de fructosa.

Por su parte, en la Figura 18, se muestra el comportamiento de los extractos según la cantidad de glucosa. Se observa que tanto la cinética de 150 °C, como la de 120 °C tienen un comportamiento similar, en donde aumenta su contenido de glucosa en un 157% y 139%

respectivamente, alcanzando 0,085 (mg glucosa/g tara bs), y 0,071 (mg glucosa/g tara bs). En el caso del extracto expuesto a 60 °C y 90 °C, se observa una disminución en el contenido de glucosa lixiviada, disminuyendo un 38% y 39% respecto al tiempo 0.

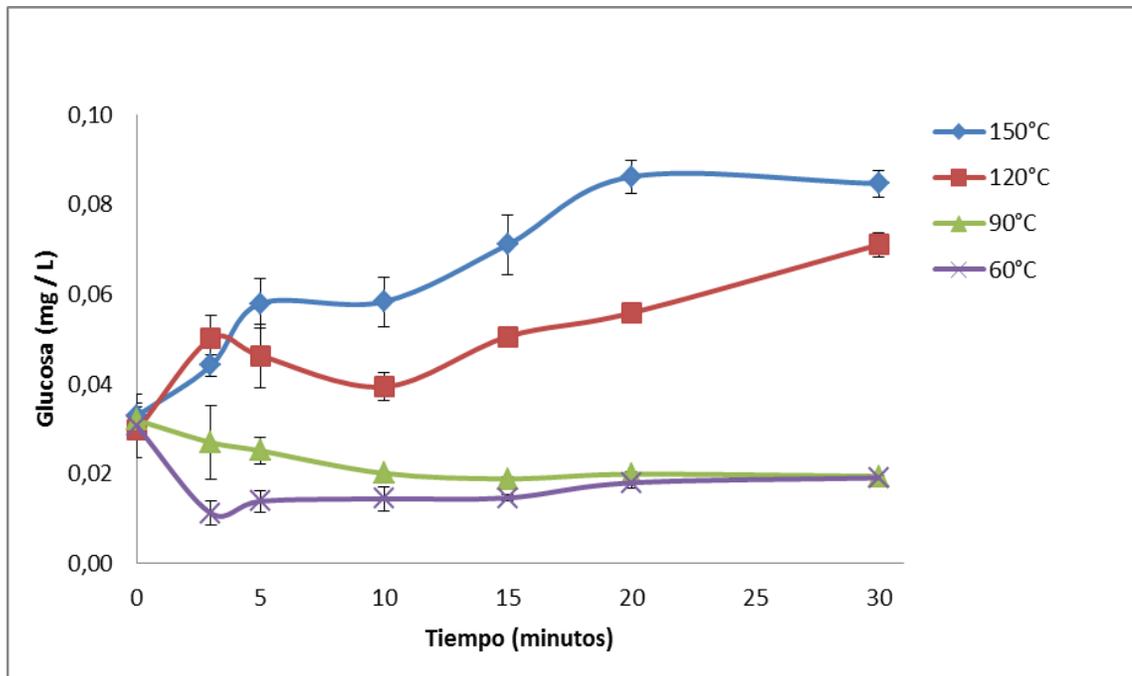


Figura 18: Cinética de degradación térmica de glucosa en un extracto de vainas de tara.

Tanto para el contenido de fructosa y glucosa posterior al tratamiento térmico se evidencia un comportamiento de alza aparente en las cinéticas expuestas a mayor temperatura (120 °C y 150 °C), mientras que para las temperaturas de exposición más bajas (60 °C y 90 °C), hay una disminución en la cantidad de azúcar lixiviada.

Al realizar un análisis estadístico evaluando las variables de respuesta para el contenido de glucosa lixiviada, se evidencia, según los resultados presentados por la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que existe un grado de significancia tanto para la variable temperatura como para la variable tiempo. Para determinar la significancia de las medias, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos (Anexo N°12), en donde para la variable temperatura existen diferencias significativas entre todas las temperaturas de exposición. Para la variable tiempo, existe significancia entre los grupos de los tiempos de exposición 0,

5, 3-10 y 15-30 min, tal como se aprecia en la Figura 18, en donde hay un punto de inflexión al minuto 3 y 5, en donde las cinéticas ascienden o descienden para 120 °C - 150 °C y 60 °C - 90 °C respectivamente; hasta el minuto 10 hay un comportamiento más bien lineal, al minuto 15 se observa aumento del azúcar reductor y a partir del minuto 20 nuevamente se evidencia comportamiento lineal, y en particular para el extracto expuesto a 150 °C presenta una baja del contenido de glucosa.

Tanto en los resultados para fructosa como glucosa, se evidencia que el tratamiento térmico provocó diferencias significativas entre las curvas. Garza et al. (1996) han estudiado la evolución de la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa en zumo de manzana (11 °Brix) durante su tratamiento térmico a altas temperaturas (80-98 °C), encontrando que el contenido de sacarosa disminuye de forma continua a medida que aumenta el tiempo y la temperatura de tratamiento, mientras que la glucosa y la fructosa no presentan una tendencia definida. En un estudio previo, se realizó el análisis químico a la cáscara de la tara, en donde señala que el 84% de la vaina son carbohidratos (Cruz Lapa, 2004). Durante el tratamiento con calor los azúcares presentes como sacarosa pueden hidrolizarse en fructuosa y glucosa, siendo estos monosacáridos azúcares reductores que pueden participar en las reacciones de caramelización y de Maillard en presencia de aminoácidos (Lee et al., 1988; Nagy et al., 1990; Ibarz et al., 1999).

Los taninos de la tara son hidrolizables, en donde su unidad estructural básica es un poliol, normalmente D-glucosa, cuyos grupos hidroxilos están esterificados por ácidos polifenolcarboxílicos, tales como el ácido gálico o sus análogos. A su vez estos ácidos pueden unirse oxidativamente, mediante uniones C-C y/o C-O, a otras unidades galoilo produciéndose una amplia variedad de estructuras monoméricas y oligoméricas (Cadahia, 1995). Los taninos son compuestos fácilmente hidrolizables, debido a su estructura de ésteres. Mediante calentamiento en medio ácido o básico se produce la ruptura completa de los enlaces éster, con liberación del poliol y de los ácidos gálico, elágico u otros, integrantes de la molécula (Porter, 1989). En algunos casos, se ha evidenciado que los enlaces 0-1-éster en dímeros del tipo dehidrodigaloilovaloneoil han podido ser hidrolizados selectivamente por calentamiento en agua a 60 °C durante 2-3 días (Hatano, et al., 1986). De la misma manera se ha evidenciado hidrólisis selectiva del enlace éster 4,6-HHDP a partir del tanino estenofinina A (catequin 8-C-f3-D-bis- (2,3:4,6-(S)-HHDP-

glucopiranosido) por tratamiento con agua a 20 °C durante 24 horas, consiguiendo la escisión hidrolítica del enlace 0-1-galoilo con ácido trifluoroacético (Okuda, *et al.*, 1992). Esto podría incidir en el contenido de azúcares detectado, produciéndose un incremento aparente de azúcares reductores, considerando que, a mayor temperatura, mayor es la hidrólisis selectiva de los compuestos.

Junto con ello es importante mencionar, que la determinación de carbohidratos por HPLC acoplado a un detector de índice de refracción, a pesar de su especificidad, tiene la desventaja de ser muy poco sensible, esto limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura. No se puede utilizar con programación de solventes porque el cambio de la composición de la fase móvil se acompaña del cambio de su índice de refracción, como consecuencia no se estabiliza la línea base (Quattrocchi *et al.*, 1992).

6.5.3 Determinación de HMF durante los puntos de la cinética de degradación térmica

Los puntos de la cinética de formación de HMF se determinaron mediante análisis por HPLC con detector DAD (Figura 19). Se aprecia que el comportamiento del extracto expuesto a 60 °C y 90 °C presenta una leve alza en el tiempo, alcanzando al minuto 30 de exposición, 0,101 (mg HMF/g tara bs) y 0,106 (mg HMF/g tara bs), respectivamente. Para el caso del extracto expuesto a 120 °C y 150°C no se evidencia un cambio durante los primeros 10 minutos de exposición, para luego incrementar su generación. En el caso del extracto expuesto a 120 °C alcanza 0,132 (mg HMF/g tara bs), mientras que el extracto expuesto a 150 °C alcanza a los 30 minutos 0,451 (mg HMF/g tara bs).

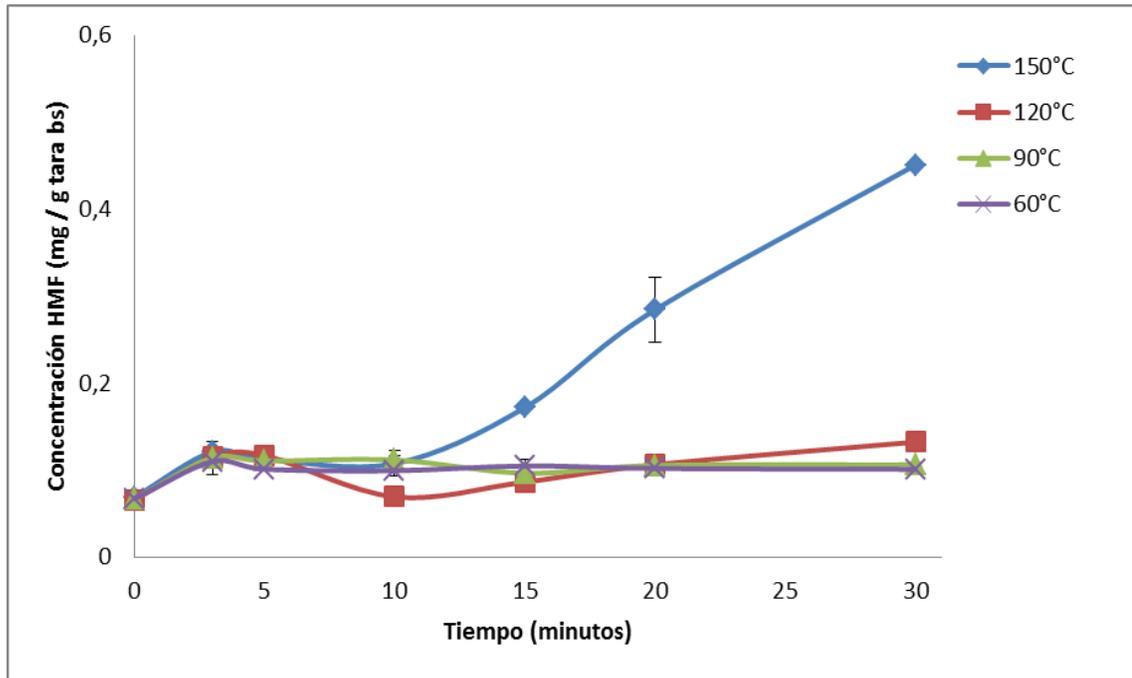


Figura 19: Cinética de generación de HMF en extracto de vaina de tara sometido a tratamiento térmico.

Al realizar un análisis estadístico para el contenido de HMF generado, se evidencia, según los resultados presentados por la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que existe un grado de significancia para ambas variables (temperatura y tiempo). Para determinar la significancia de las medias, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos (Anexo N°12J), en donde para la variable temperatura existen diferencias significativas entre 150 °C y las otras temperaturas de exposición (60 °C, 90 °C y 120 °C). Para la variable tiempo, existe significancia entre los grupos de los tiempos de exposición 0, 10, 3-15, 20 y 30 min, tal como se aprecia en la Figura 19, en donde se evidencia un periodo de inducción hasta el minuto 10, para luego incrementar exponencialmente, en el extracto expuesto a 150 °C. Esto tiene lógica, ya que dicho extracto presenta disminución en los azúcares reductores en los mismos periodos de tiempo en donde se observa la mayor generación del neocontaminante.

Estudios evidencian que el porcentaje de proteínas en vainas de tara, determinado mediante el método Kjeldahl, alcanza un 2.0%. (Siccha, 1994), otra fuente (Alanuca, 2017) menciona que la vaina de tara posee 3,5% de proteína. Este porcentaje es relevante, ya que

en este caso es esta porción proteica que interacciona con los azúcares reductores para la generación de neocontaminantes. Es importante mencionar que el tiempo de inducción está sujeto a la metodología desarrollada, en donde se utilizaron pequeños tubos de vidrio para acelerar la transferencia de calor en el extracto. Las principales sustancias químicas que se desarrollan en los procesos de pardeamiento no enzimático son el furfural y el HMF. Este último es importante porque indica el grado de calentamiento al que han sido sometidos los productos durante su procesado (Resnik y Chirife, 1979). Además, es considerado como un indicador de la intensidad del tratamiento térmico a que han sido sometidos los productos (Toribio y Lozano, 1987; Aleixandre y Serrano, 1989).

En la bibliografía existen numerosos trabajos en los que se evalúa el HMF como indicador del pardeamiento no enzimático en diversos zumos y puré de frutas tratados en diferentes condiciones de temperaturas y contenido en sólidos solubles. En la mayor parte de los alimentos la cinética del pardeamiento no enzimático presenta un periodo de “inducción” durante el cual se forman y acumulan compuestos intermedios, carbonilos, cuya posterior polimerización provocará la formación de pigmentos (Pastoriza, 2013). Ibarz *et al.* (1989) al estudiar cinéticas de formación de hidroximetilfurfural (HMF) en concentrado de zumo de pera almacenada entre 25 °C y 50 °C de temperatura, destaca que el factor temperatura es preponderante en los procesos de ocurrencia del pardeamiento no enzimático, dado que logran probar que, a lo largo de todo el proceso de almacenamiento, las concentraciones de glucosa y fructosa, no sufren variación apreciable y que además la concentración de HMF es despreciable. Remacha *et al.* (1992) muestra cinéticas de orden cero, en donde éstas son mayores a medida que aumenta la temperatura, concordante con la teoría fundamental de pardeamiento no enzimático, que al definir “la reacción de pardeamiento no enzimático como la de Maillard se favorece a temperaturas más altas siendo además más rápidos”, respalda los resultados reportados por estos investigadores. Ibarz *et al.* (1993) reportan que al someter jugo clarificado de melocotón de 64,5 °Brix, en diluciones de 15°, 30°, 45° y 55° Brix a temperaturas de 100, 102, 104, 106 y 108 °C, la variación de las constantes cinéticas de pardeamiento con la temperatura se ajustan al modelo exponencial tipo Arrhenius.

Garza *et al.* (1996) refiere que al estudiar el pardeamiento no enzimático de zumo de manzana de 11 °Brix, mediante la evolución de parámetros colorimétricos (absorbancia

relativa a 420 nm, diferencia de color (ΔE) e índice de pardeamiento), la formación de HMF y la evolución de la concentración de azúcares (fructosa y sacarosa) en el zumo, observaron que resulta difícil aseverar si es el modelo cinético de orden cero o de primer orden, el que expresa adecuadamente la cinética de la variación del color, manifiestan además, que las constantes cinéticas de pardeamiento, así como la evolución de los azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) y del HMF, aumentan con la temperatura de tratamiento.

En lo referente a la evolución de azúcares y HMF, Garza *et al.* (1996), manifiestan no haber observado una tendencia clara en la evolución de hexosas, pudiendo ser debido a que las hexosas desaparecen del medio de reacción a través de las reacciones de Maillard, caramelización y formación de HMF, pero aparecen en el zumo debido a la hidrólisis de la sacarosa; sin embargo, la sacarosa desaparece del medio de reacción, siendo más pronunciada esta desaparición a medida que aumenta la temperatura de tratamiento, y al referirse a la evolución específica de HMF, afirman que la aparición de HMF es constante y mucho más pronunciada cuando las temperaturas de tratamiento son más elevadas.

Es importante mencionar que el mayor contenido de HMF generado (0,451 mg HMF/g tara bs), es bajo respecto al contenido de HMF presente en muchos alimentos, encontrando concentraciones particularmente altas (hasta 9,5 g/kg) en vinos dulces y vinagre balsámico (Bachmann *et al.*, 1997; Hussoy *et al.*, 2008). Sin embargo, el café es la mayor fuente de exposición en muchas personas debido a las grandes cantidades consumidas de este alimento (Murkovic and Pichler, 2006). La ingesta diaria estimada de HMF oscila entre los 30-150 mg/persona (Ulbricht *et al.*, 1984; Janzowski *et al.*, 2000; Rufián- Henares and de la Cueva, 2008).

6.5.4 Determinación de CaOX durante la cinética de degradación térmica

La CaOX para los extractos sometidos a degradación térmica se determinó por los métodos DPPH y ORAC.

6.5.4.1 Determinación de CaOX por metodología DPPH

La cinética del cambio en la CaOX se muestra en la Figura 20. En ésta se observa que la CaOX aumenta en todas las condiciones de temperaturas. En la cinética de 60 °C y 90 °C hay un incremento en la CaOX de 33% 38% respectivamente, alcanzando 8568 ($\mu\text{MET/g tara bs}$) y 9016 ($\mu\text{MET/g tara bs}$) a los 30 minutos. Para la cinética de 120 °C y 150 °C, también evidencia incremento en la CaOX; pero alcanzando mayores valores, siendo de 10526 ($\mu\text{MET/g tara bs}$) y 10811 ($\mu\text{MET/g tara bs}$), equivalente a un aumento porcentual de 70% y 73% respectivamente, transcurridos los 30 minutos de exposición.

Al realizar un análisis estadístico para el contenido de CaOX (DPPH) generado al aumentar tiempo y temperatura, se evidencia, según los resultados presentados por la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que existe un grado de significancia para ambas variables (temperatura y tiempo). Para determinar la significancia de las medias, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos (Anexo N°12)], en donde para la variable temperatura existen diferencias significativas entre todas las temperaturas de estudio (60 °C, 90 °C, 120 °C y 150 °C). Para la variable tiempo, existe significancia entre los grupos de los tiempos de exposición 0-10 y 15-30 min, tal como se aprecia en la Figura 20, en donde en dichos intervalos hay un punto de inflexión en el aumento de la CaOX del extracto.

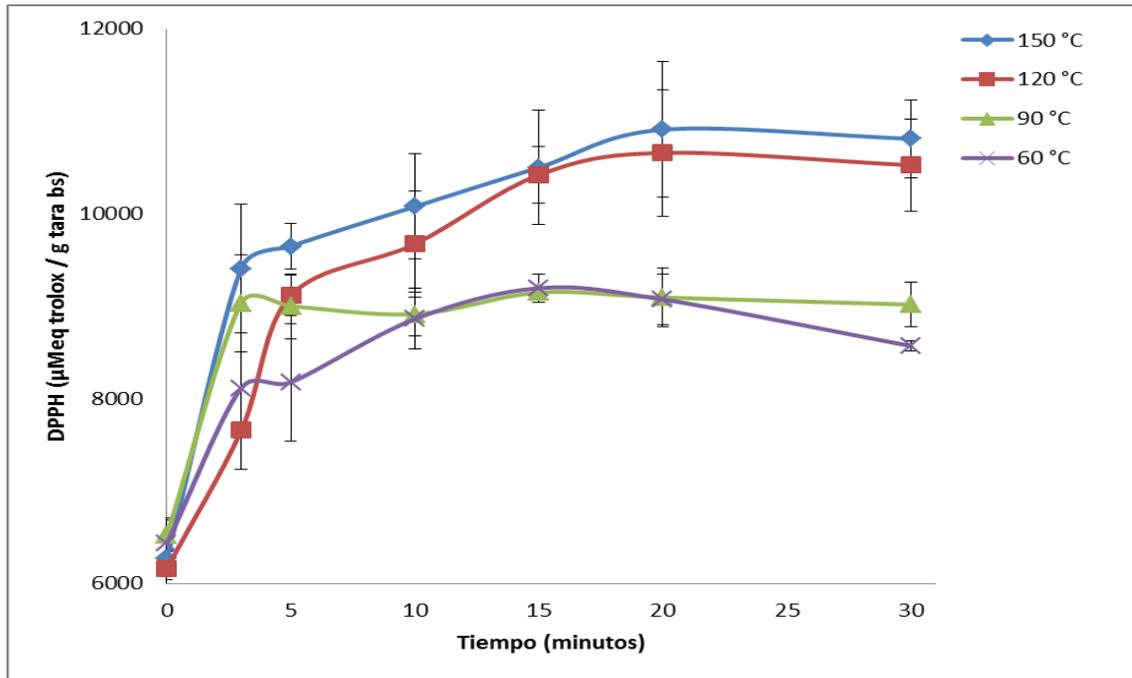


Figura 20: Capacidad antioxidante (DPPH) en extracto de vaina de tara sometido a tratamiento térmico.

Otro estudio presenta un comportamiento similar, en donde se evaluó el efecto de la temperatura sobre los compuestos fenólicos y la CaOX en el residuo de la producción del jugo de mandarina. Se observó que, al aumentar la temperatura la CaOX (método DPPH) de la muestra liofilizada fue de un 56%, 34% y 13% mayor en las muestras secadas a 60, 90 y 120 °C, respectivamente. Dicho comportamiento es similar al observado en el efecto de la temperatura de secado sobre el contenido de fenoles, flavonoides y taninos. En otras palabras, cuando la temperatura de secado se incrementa, la CaOX DPPH también se incrementa. Este mismo comportamiento se observó en la CaOX TEAC-ABTS, cuando la temperatura de secado se incrementó, la CaOX se incrementa de 310 hasta 575 (mg ET/100 g), el incremento fue de hasta un 41% (Esparza *et al.*, 2016).

Esta alza en la CaOX, puede deberse a las consecuencias de la reacción de Maillard, y como una de las características positivas más conocidas de dicha reacción, es su acción antioxidante, ya que algunos de los compuestos generados tienen dichas propiedades. En los últimos años se ha incrementado el estudio de las diferentes propiedades funcionales

de las melanoidinas. Su actividad antioxidante resulta especialmente interesante ya que se forman de manera natural en el alimento durante su procesado o su almacenamiento (Bendinghaus y Ockerman, 1995). Los productos de la reacción de Maillard, generan compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, cafeico, cumárico y ferúlico), melanoidinas, y algunos de los componentes volátiles (Vignoli *et al.*, 2011), que influyen directamente en la capacidad antioxidante. Según, Contreras-Calderón *et al.* (2016) existe una relación directa entre la tasa de pardeamiento no enzimático y la CaOX.

Las melanoidinas pueden llevar ligados compuestos de bajo peso molecular, unidos a su esqueleto de manera no covalente y que normalmente ocupan el centro de la estructura melanoidínica (Cammerer *et al.*, 2002; Delgado-Andrade *et al.*, 2005). En un estudio (Rufián-Henares and Morales, 2007) donde se pretendía conocer la actividad antioxidante de las distintas fracciones de las melanoidinas usando diferentes sistemas modelo azúcar-aminoácido, se observó que los compuestos de bajo peso molecular unidos a las melanoidinas tenían una actividad antioxidante mayor que las propias melanoidinas. Así ensayos de ABTS y DPPH de este estudio muestran que la actividad antioxidante de los compuestos unidos a las melanoidinas es mayor que la de las propias melanoidinas. El mecanismo de la actividad antioxidante de estas melanoidinas no se conoce muy bien, pero se cree que se basa en la habilidad para atrapar las especies electrofílicas cargadas positivamente, en la eliminación de los radicales de oxígeno y/o la quelación de metales para formar complejos inactivos (Delgado-Andrade *et al.*, 2005).

6.5.4.2 Determinación de CaOX por metodología ORAC

La cinética para CaOX mediante metodología ORAC se muestra en la Figura 21. En ésta se observa que la tendencia para todas las temperaturas, es una disminución de la CaOX a medida que pasa el tiempo, disminuyendo en un 14%, 12% 10% y 16% para 60, 90, 120 y 150 °C, respectivamente.

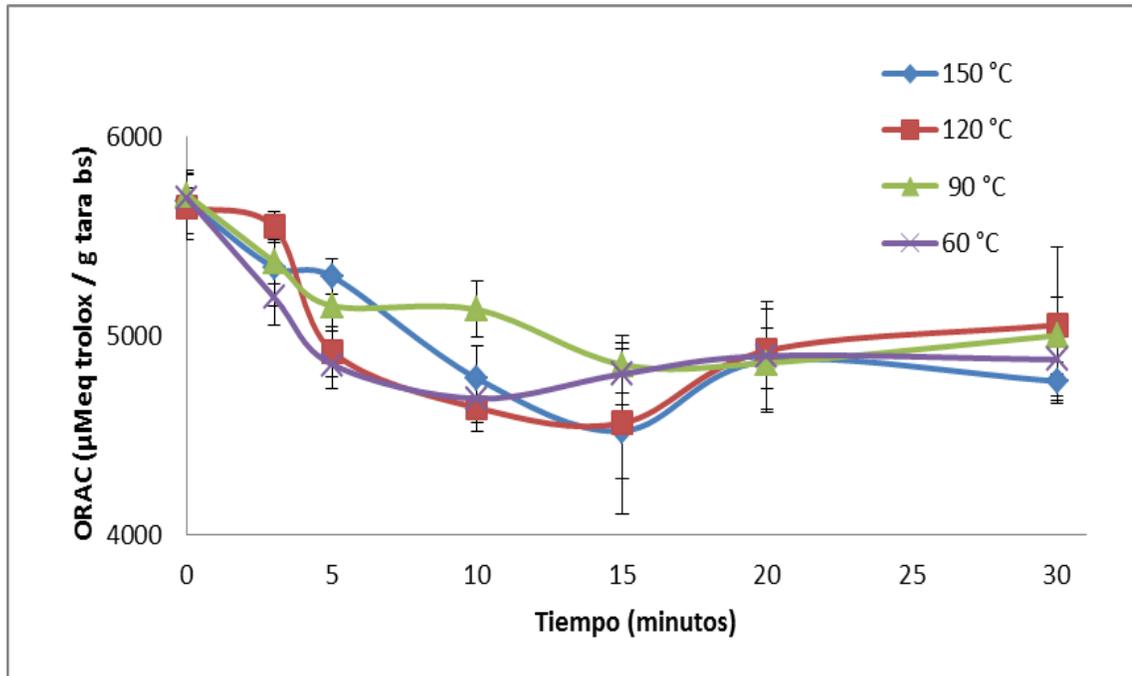


Figura 21: Capacidad antioxidante (ORAC) en extracto de vaina de tara sometido a tratamiento térmico.

Al realizar un análisis estadístico para la CaOX (ORAC) al aumentar tiempo y temperatura, se evidencia, según los resultados presentados por la Tabla ANOVA multifactorial (Anexo N°12), que existe un grado de significancia solo para la variable tiempo. Para determinar la significancia de las medias, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos (Anexo N°12), en donde para la variable tiempo, existe significancia entre los grupos de los tiempos de exposición 0-5, 15 y 10-30 min, tal como se aprecia en la Figura 21.

Frutos como el agraz, los arándanos y el mortiño poseen los valores más altos de ORAC-H reportados (Al-Duais *et al.*, 2009). En otro estudio, se evaluaron el efecto antioxidante de un extracto de hojas de *Caesalpinia decapetala* en el almacenamiento de emulsiones. Se realizó un extracto hidroalcohólico de dicha planta, en donde se obtuvo un contenido de PFT de 31,6 (mg EAG/g bs) y una CaOX de 700 ($\mu\text{mol Trolox/g bs}$) para ORAC y 300 ($\mu\text{mol Trolox/g bs}$) para DPPH (Galletto *et al.*, 2017). De acuerdo con otros investigadores, una potente protección antioxidante presenta valores superiores a 5000 ($\mu\text{mol Trolox/100 g}$ de muestra) y se recomienda una ingesta diaria de productos que contengan una cantidad de

3000-5000 ORAC-H/día (Rojano *et al.*, 2012). Esto evidencia que a pesar de la degradación térmica a la que fue sometido el extracto de vaina de tara, su CaOX es muy elevada.

Es importante mencionar que la diferencia entre los resultados obtenidos por CaOX DPPH y ORAC radica en los mecanismos de reacción. La CaOX en alimentos se evalúa comúnmente en sistema de ensayos *in vitro* (Cao *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 2007) mediante el seguimiento de la reacción entre los oxidantes. Estos métodos, se clasifican ampliamente en dos grupos según el mecanismo de reacción: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de electrones (ET) (Huang *et al.*, 2005). El ensayo ORAC representa el método HAT, ya que emplea un esquema de reacción competitiva entre antioxidantes y una sonda de fluorescencia (fluoresceína) para el radical peroxilo AAPH (Cao *et al.*, 1993). El descenso de fluoresceína debido al ataque de los radicales y la protección por los antioxidantes da como resultado una curva. El área bajo la curva otorga una línea de calibración que sirve para evaluar la CaOX en términos de equivalentes de trolox. DPPH por su parte, es un método basado en ET, debido a que la CaOX se obtiene midiendo el cambio de color del radical. En este caso, el propio DPPH reacciona como un radical y una sonda. El antioxidante en solución atenúa el color del DPPH al donar un átomo de hidrógeno/electrón al electrón no apareado del DPPH, lo que provoca que el púrpura del DPPH torne a amarillo pálido, lo que se monitorea en un espectrofotómetro UV/Vis simple a 517 nm (Molay *et al.*, 2010).

Comparativamente los métodos espectrofotométricos (DPPH) basados en la absorbancia a 517 nm, pueden presentar interferencias debidas a compuestos coloreados presentes en los alimentos. Algunos de los compuestos generados en la reacción de Maillard tienen propiedades antioxidantes. La actividad antioxidante de las melanoidinas resulta especialmente interesante, ya que se observó que los compuestos de bajo peso molecular unidos a las melanoidinas tenían una actividad antioxidante mayor que las propias melanoidinas (Rufián-Henares and Morales, 2007). Este es un factor importante a considerar cuando se analiza la CaOX. Los métodos fluorimétricos (ORAC) no presentan este problema (Villaño *et al.*, 2004). Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2006), han estudiado que ciertos compuestos no antioxidantes presentes en alimentos vegetales, como algunos aminoácidos y ácidos urónicos, pueden actuar como interferencias, proporcionando resultados sobreestimados, por lo que su contenido debería ser evaluado antes de aplicar

estos métodos. Uno de los inconvenientes de la metodología ORAC, es que está influenciada tanto por la reactividad del antioxidante y/o por el número de radicales que cada molécula sonda puede atrapar, por lo que los resultados pueden depender de la molécula sonda empleada.

Debido a que la prueba ORAC se basa en la reacción de transferencia de un átomo de hidrogeno en el que el antioxidante y el sustrato compite por los radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de compuestos azoicos (Huang *et al*, 2005). En particular, dependiendo de la sonda seleccionada, es posible obtener un índice ORAC más relacionado con la reactividad (tasa de la reacción entre antioxidantes con radicales peroxilo) o la estequiometría de la reacción (número de radicales peroxilo atrapado por molécula antioxidante (Poblete *et al*, 2009). Es por esto que se recomienda determinar la CaOX del extracto por el método ORAC-PGR (rojo de pirogalo) por espectrofotometría para evaluar la reactividad de los antioxidantes presentes en el extracto de vaina de tara.

Con esto culminan los análisis de estudio cinético realizado al extracto hidroalcohólico de vaina de tara. A continuación, se presentan las conclusiones del presente trabajo.

7. Conclusión

En la primera etapa del presente estudio, fue posible realizar la extracción de PFT mediante un proceso de lixiviación desde vainas de tara, evaluando el efecto del contenido de etanol y temperatura de extracción con soluciones hidroalcohólicas utilizadas como disolvente. En este caso a mayor cantidad de etanol presente en el solvente, existe una mayor capacidad de extracción de los PFT. El extracto de 40:60 en condiciones de 35 °C alcanzó un promedio equivalente a 594 (mg EAG/g tara bs).

Según los resultados obtenidos en la lixiviación de azúcares reductores, se evidenció que existe una mayor lixiviación de fructosa y glucosa al aumentar la temperatura. Sin embargo, es importante mencionar que dentro de los azúcares reductores, el contenido de fructosa es predominante en los extractos tanto de 10:90 como de 40:60, (relación 1:6, glucosa:fructosa), por lo que es relevante que para la fructosa, el extracto 40:60 que es el extracto que posee mayor contenido de PFT, tenga uno de los más bajo contenidos de dicho azúcar.

Al determinar la capacidad antioxidante (DPPH), el extracto con mayor CaOX fue el extracto de 10:90 sometido a 25 °C, mientras que para los valores de IC₅₀, la CaOX más baja se presentó en el extracto de agua acidificada expuesto a 25 °C, alcanzando un valor de 0,074 (mg/mL), seguido del extracto de 10:90, en donde se obtuvo 0,087 (mg/mL). Se evidenció que no existe correlación entre los PFT y la CaOX (DPPH) y el valor de IC₅₀. La falta de correlación se debe a la variedad de polifenoles contenidos en los extractos de vaina de tara, y la diferencia que existe entre la CaOX de cada uno de los compuestos contenidos en el extracto. Es por las razones antes mencionadas, que se utilizó el extracto de tara sometido a 35 °C con una proporción de solución hidroalcohólica de 40:60, ya que el extracto sometido a dichas condiciones presenta un mayor contenido de PFT, menor contenido de fructosa, que es el azúcar predominante en el fruto y, además, presenta una elevada CaOX. Para complementar la determinación de CaOX del extracto escogido (40:60, extraído a 35 °C), se evaluó además la CaOX a través del método ORAC. Esto evidencia que la CaOX de la tara es considerablemente mayor a otras matrices vegetales. De todas formas, en este caso se recomienda realizar un perfil cromatográfico completo del contenido de polifenoles en la vaina de tara, para poder abordar la CaOX por cada compuesto de interés.

De la degradación térmica del extracto seleccionado, se evidencia que a mayor temperatura de exposición del extracto, mayor es la reducción en el contenido de PFT. Para el caso de las condiciones expuestas a 120 y 150 °C, presentan un descenso de PTF en los primeros 15 minutos, desde 566 (mg EAG/g tara bs), a 561 (mg EAG/g tara bs) al tiempo 0, hasta 473 (mg EAG/g tara bs), a 463 (mg EAG/g tara bs), respectivamente; luego de los 15 min, no se visualizan mayores cambios en los PFT.

Respecto al contenido de AR en cada punto de la cinética, se evidencia un comportamiento de alza aparente en las cinéticas expuestas a mayor temperatura (120 °C y 150 °C), mientras que para las temperaturas de exposición más bajas (60 °C y 90 °C), hay una disminución en la cantidad de azúcar. Esto podría deberse a que las altas temperaturas provocan la hidrolización de azúcares, y/o también la hidrólisis de taninos, los cuales en la ruptura pueden aportar un polirol. De ser así, incidiría en el contenido de azúcares detectado, produciéndose un incremento aparente de azúcares reductores, considerando que a mayor temperatura, mayor es la hidrólisis selectiva de los compuestos.

En la determinación de HMF, se aprecia que el comportamiento del extracto expuesto a 60 °C y 90 °C presenta una leve alza en el tiempo. Para las cinéticas expuestas a 120 °C y 150 °C no se evidencia un cambio durante los primeros 10 minutos de exposición, pero posterior a ello, incrementa su formación. Esto se sustenta, en que el extracto presenta disminución en la curva de AR en los mismos periodos de tiempo en donde se observa la mayor generación del neocontaminante.

En lo que respecta a CaOX, la cinética para DPPH evidencia que aumenta en todas las condiciones de temperaturas, siendo mayor la CaOX del extracto a medida que mayor es la temperatura de exposición. Esta alza en la CaOX, puede deberse a las consecuencias de la reacción de Maillard, ya que algunos de los compuestos generados por esta reacción tienen CaOX. En la cinética de ORAC, se evidencia un comportamiento diferente, ya que la tendencia para todas las temperaturas es una disminución de la CaOX a medida que transcurre el tiempo. Este comportamiento es similar en otros estudios, pero a pesar del descenso en la CaOX debido a la degradación térmica, el extracto de vaina de tara presenta una CaOX muy elevada. Se recomienda determinar la CaOX del extracto por el método

ORAC-PGR (rojo de pirogalol) por espectrofotometría para evaluar la reactividad de los antioxidantes presentes en el extracto de vaina de tara.

Por último se recomienda realizar un estudio de la resistencia térmica de los PFT, la cual puede ser evaluando su estabilidad en el tiempo, o velocidad de degradación considerando el cálculo de algún parámetro termodinámico. Para concluir, se puede decir que en este estudio fue posible evaluar el efecto de la concentración de etanol y temperatura de extracción para soluciones hidroalcohólicas utilizadas como disolvente en el proceso de lixiviación de polifenoles desde vainas de tara y evaluar la degradación térmica y cómo influye ésta en su composición fenólica y CaOX.

Finalizado este estudio se puede decir, que la transformación de los taninos de la tara en compuestos fenólicos antioxidantes de bajo peso molecular puede ser una alternativa para la obtención de extractos de alto valor agregado cuya demanda actual es creciente por su utilidad como suplemento alimenticio, su aplicación farmacéutica y como sustituto de antioxidantes sintéticos empleados en la industria de alimentos.

8. Bibliografía

- AECOSAM. Agencia Española de Consumo, Aseguración Alimentaria y Nutrición. Acrilamida. (2017). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Aguilar J. (2012). Métodos de conservación de alimentos. ISBN 978-607-733-6., Vol I. N°1,61-71.
- Alanuca W. (2017). Diagnóstico del potencial agroindustrial de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en Cotopaxi. Tesis de Pregrado. Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga. Ecuador.
- Alvarez C., Lock de Ugaz O. Taninos. (Junio 1992). Revisa de Química. Vol VI. N°1,47-63.
- Arribas G. (2013). Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Avalo B., Pérez S., Tovar M. (2009). Caracterización preliminar del proceso de concentración del jugo natural de naranja en un evaporador de tres efectos. INCI v.34 no.11, Caracas.
- Avello M., Pastene E. (2005). Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae turcz* ("murtilla"). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Vol 4. N°2,33-39.
- Badui S. (2006). Química de los Alimentos. ISBN 970-26-0670-5., Vol I. N°4, 59-69.
- Bravo, N. Estudio de la extracción de taninos a partir de la tara (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze) aplicando los métodos Taguchi y Superficie de Respuesta. Tesis postgrado. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Cadahia E. (1995). Estudio de la composición tánica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. España

- Candelaria A. (2013). Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC-IR. Tesis pregrado. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

- Campos D. (2016). (Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de tara (*Caesalpinia spinosa*) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales. Informe Técnico. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. Perú.

- Casp A., Abril J. (2003). Proceso de conservación de alimentos. Libro de Tecnología de Alimentos. (2ª Edición):57-59.

- Cespedes, A., Muñoz, G. (2013). Influencia de la temperatura, solvente y tipo de vaina en la extracción de taninos de *Caesalpinia spinosa* (Tara) por percolación y relación con su actividad antioxidante. Tesis de pregrado. Universidad Católica de Santa María, Arequipa. Perú.

- Cruces E., Rojas-Lillo Y., Ramirez-Kushel E., Atala E. (2016). Comparison of different techniques for the preservation and extraction of phlorotannins in the kelp *Lessonia spicata* (Phaeophyceae): assays of DPPH, ORAC-PGR, and ORAC-FL as testing methods. J Appl Phycol. 28:573-580.

- Gallego G., Skowrya M., Gordon M., Mohd N., Almajano M. (2017). Effect of leaves of *Caesalpinia decapetala* on oxidative stability of oil in water emulsions. Journal MDPI. Antioxidants 2017, 6, 19.

- Gutierrez D., Ortiz C., Mendoza A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. México.

- Chambi, F., Chirini, 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.

- Chambi, F. (2009). Actividad antirradical de taninos hidrolizados de tara (*Caesalpinia spinosa*) y su eficacia antioxidante en aceite de soya. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Perú.

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

- De la Cruz Lapa P. Aprovechamiento integral y racional de la tara (*Caesalpinia spinosa*- *Caesalpinia tinctoria*). Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Echeverri M., Jaramillo L., Quiroz J. (2014). Acrilamida: Formación y mitigación en procesamiento industrial de alimentos. Trabajo de pregrado. Corporación universitaria Lasallista.

- Edwin D. (2012). Extracción de taninos (Ácido gálico) a partir de polvo de vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*). Tesis de pregrado. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. Perú.

- Esparza F., Miranda R. Guzmán S. (2016). Efecto de la temperatura sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en el residuo de la producción de jugo de mandarina (*Citrus reticulata* Satsuma). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol 1, No. 1: 843-850.

- Fernández A. (2008). Estudio de las propiedades antioxidantes de un extracto supercrítico de la vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*) para su uso potencia como aditivo alimentario. Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago. Chile.

- Fernández E. (2018). Degradación de polifenoles del cacao (*Theobroma cacao L.*), criollo de Amazonas durante el tostado. Tesis Pregrado. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas. Perú.

- Fuster M., Esko J. (2005). The sweet and sour of cáncer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature reviews cancer*, 5(7):526-542.

- Gallego M., Gordon M., Segovia F., Almajano M.P. (2016). Gelatine-based antioxidant packaging containing *Caesalpinia decapetala* and Tara as a coating for ground beef patties. *Journal of antioxidants*, 5, 10: 1-15.

- Gallego M., Rodríguez T., Rodríguez I., Almajano M. Analytical (2016). Characterization of Polyphenols from Tara and *Caesalpinia decapetala* as Stabilizers of O/W Emulsions. *Journal of Food Science*, Vol 81, Nr.11.

- Garcia J., De la Rosa L., Herrera B., González A., López J., González G., Ruiz S., Alvarez E. (2011). Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua*, Vol V, No 2, 2011.

- Garro J., Riedl B., Conner A. (1997). Analytical studies on tara tannins. *Holzforchung*, 51(3), 235-243.

- Giannakourou, M.C; Taoukis, P.S. (2003). Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variage storage conditions. *Food Chemistry* 83, 33-41.

- Gutiérrez J. (2000). *Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos*. Madrid, España. Ediciones Díaz de Santos. S.A; 335-346.

- Herrera, E., Stave, S. Ecuación de Arrhenius: Aplicación de la Ecuación de Arrhenius utilizada para la determinación de la vida de los alimentos. Facultad de Química y Farmacia, Programa Farmacia Universidad del Atlántico, Barranquilla.

- Ibarz A., Casero T., Miguelsanz R., Pagan J. (1989). Cinéticas de formación de hidroximetilfurfural en concentrado de zumo de pera almacenado a diferentes temperaturas. Departamento de Tecnología de Alimentos (ETSI). Agrónomos de Lérida. *Revista Alimentaria* 199: 81-84.

- Illanes C. (2014). Efecto de la lixiviación de azúcares reductores sobre la formación de furano en papas fritas. (Tesis Pregrado). Universidad de Chile, Santiago. Chile.

- Jaramillo C., Borbor A., García A., Góngora J. (2013). Informe de Bioquímica-Ingeniería Agropecuaria. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Santo Domingo, Ecuador.

- Kratchanova M., Denev P., Ciz M., Lojek A., Mihailov A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica*. Vol 57, No. 2/2010; 229-234.

- Kuzma P., Druzynska B., Obiedzinski M. (2014). Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinum crispum*). *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 13(2), 145-154.

- López A., Oré R., Miranda C., Trabucco J., Orihuela D., Linares J., Villafani Y., Rios 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.

- Málaga R., Guevara A., Araujo M. (2013). Efecto del procesamiento de puré de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*), sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante. *Rev. Soc. Quim*, vol.79, no 2. Lima, Perú.

- Manayay D., Ibarz A. (2010). Modelamiento de la cinética de reacciones del pardeamiento no enzimático y el comportamiento reológico, en el proceso térmico de jugos y pulpas de fruta. *Scientia Agropecuaria* 1, 155-168.

- Mei-Ling C., Deng-Jye Y., Shih-Chuan, L. (2011). Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract citrus (*Citrus sinensis (L.) Osbeck*) peel. *International Journal of Food Science & Technology*, 46:1179-1185.

- Molay R., Motoki K., Theertham R., Tsutomu O., Yutaka O., Lakh J. (2010). ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 61(2): 109-124.

- Muñoz C. (2015). Mitigación de la formación de acrilamida en hojuelas de papa mediante el uso de fritura al vacío. Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago. Chile.

- Mustafa, K; Mustafa. E; Mustafa, K; Mehmet, A. (2003). Comparison of Different Extraction and Detection Methods for Sugar Using Amino-Bonded Phase HPLC. *Jornal of Chromatographic Science*, Vol. 41.

- NCh 841 of 78. Alimentos – Determinación de humedad.

- Nuñez W., Quispe R., Ramos N., Castro A., Godillo G. (2016). Actividad antioxidante y antienzimática *in vitro* y antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidrolcohólico de *Caesalpinia spinosa* “Tara”. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Ciencia e Investigación*; 19(1): 35-42.

- Ormaza A., Díaz F., Rojano B. (2018). Efecto del añejamiento del café (*Coffea arabica* L. var. *Castillo*) sobre la composición de fenoles totales, flavonoides, ácido clorogénico y la actividad antioxidante. *Inf. Tecnol. Vol 29, no.3. La Serena, Colombia*.

- Paladino S. (2008). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* l.). Tesis de postgrado. Facultad de Ciencias agrarias. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.

- Paredes C. (2009). Desarrollo de bastones horneados a partir de papas de la variedades Michuñe Negra y Michuñe Roja originarias de la provincia de Chiloé. Tesis de Pregrado. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Chile.

- Pastoriza S. (2013). Efecto de la ingesta de compuestos avanzados de a reacción de Maillard sobre el metabolismo gastrointestinal. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Granada. España.

- Pérez F. (2014). Estudio de la capacidad antioxidante de derivados de hidroxycumarina en sistemas homogéneos y en modelos de membrana lipídica. Tesis de postgrado. Universidad de Chile, Santiago. Chile.

- Ramírez C. (2009). Estudio experimental de la desactivación de l enzima peroxidasa durante el proceso de escaldado de papa (*Solanum*

tuberosum) y el almacenamiento a -18 °C. (Tesis pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia. Chile

- Rivero A., Betancourt J. (2006). Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. [Artículo on line]. Disponible en: http://publications.iupac.org/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-3.pdf.
- 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 del pan tipo hallulla. Tesis de postgrado. Universidad de Chile, Santiago. Chile.
- Siccha A. (1994). Hidrocoloides de tres especies de *Caesalpinia*. Su análisis químico. Revista de Química. Vol. VIII. No.2, 153-161.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. American journal of enology and Viticulture 16, 144-158.
- Sotelo L., Alvis A., Arrázola G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao L.*), determinación de su capacidad antioxidante. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. Vol 9, No 1, 124-134.
- Soto C. (2015). Determinación de la capacidad antioxidante de las espigas de la planta de chíá. Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago. Chile.
- Teran R. (2015). Efecto de la hidrólisis de galotaninos de tara (*Caesalpinia spinosa*) sobre la capacidad antioxidante *in vitro* y estabilidad del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*). Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Abancay. Perú.
- Turturica M., Stanciuc N., Bahrim G., Rapeanu G. (2016). Effect of thermal treatment on phenolic compounds from plum (*prunus domestica*) extracts – A kinetic study. Journal of Food Engineering 171, 200-207.

- Urreal D., Eim V., Roselló C., Simal S. (2012). Modelos cinéticos de degradación de carotenoides, polifenoles y actividad antioxidante durante el secado convectivo de zanahoria (*Daucus carota* V.Nantesa).

- Villacorta G., Pérez A. (2011). Actividad Antioxidante “in vitro” de las hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn, mediante el método de secuestro de radicales libres 1.1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). (Tesis pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquito. Perú.

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

- Villanueva N. (2017). Obtención de 5-Hidroximetilfurfural a partir de glucosa proveniente de licores de corteza de Pino y Eucalipto, utilizando catalizadores sólidos en medio acuoso. (Tesis Postgrado). Universidad de Concepción, Concepción. Chile.

- Viturro C., Molina A., Schmeda-Hirschmann G. (1996). Free radical scavengers from *Mustia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolus* (Aiaceae). Short Communication, Phytotherapy Research 13, 422-424.

- Yavari F. (2017). Efecto de la temperature en la cinética de degradación del ácido ascórbico en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). Tesis pregrado. Universidad Nacional José María Arguedas, Andhualayas-Apurimac. Perú.

- Yilmaz Y., Toledo R.T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyhenos. Jornal of Food Composition and Analysis, 19: 41-48.

- Zhao Q., Zou Y., Huang C., Lan P., Zheng J., Ou S. (2017) Formation of a Hydroxymetilfurfural-Cysteine Adduct and Its Absorption and Cytotoxicity in Caco-2 Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65, 9902-9908.

- Zubeldia L., Gomar J. (2007). Acrilamida en patatas fritas y productos de aperitivo elaborados en la Comunidad Valenciana. Gac Sanit vol.21 No4, Barcelona.
- Zulueta A., Esteve M. J., Frígola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry, 114(1), 310- 316
- Zulueta A., Esteve M. J., Frásquet I., Frígola A. (2007). Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. Food Chemistry, 103(4), 1365-1374.

9. Anexos

Anexo N° 1

Contenido de galotaninos en las vainas de tara comparadas con otras importantes fuentes (Chambi *et al.*, 2013).

Especie	Parte de la planta	Contenido de Galotaninos	Referencias
<i>Galla chinensis</i>	Cecidias	61,6 g GAE/100 g	Tian <i>et al.</i> (2009)
<i>Caesalpinia spinosa</i>	vainas	55,1 g GAE/100 g	Experimental
<i>Hacer saccharum</i>	hojas	3,48 g /100 g	Inoue and Hagerman (1988)
<i>Liquidambar stiraciflua</i>	hojas	1,5 g /100 g	Inoue and Hagerman (1988)
<i>Betuna pubescens</i>	hojas	6,0 g /100 g	Salminen (2003)
<i>Terminalia chebula</i>	fruto	40 g /100 g	Lokeswari and Jaya Raju (2007)
<i>Quercus persica</i>	hojas	4,6 g /100 g	Yousef Elahi and Rouzbehan (2008)
<i>Quercus infectoria</i>	hojas	8,7 g /100 g	Yousef Elahi and Rouzbehan (2008)
<i>Quercus libani</i>	hojas	6,2 g /100 g	Yousef Elahi and Rouzbehan (2008)

Anexo N°2

Estudio Cinético

Se realizaron extracciones consecutivas con el fin de determinar el tiempo de extracción que se emplearía en las extracciones posteriores. El estudio se realizó con un tiempo máximo de 12 horas, donde se determinó que a las 8 horas fue el período de máxima extracción.

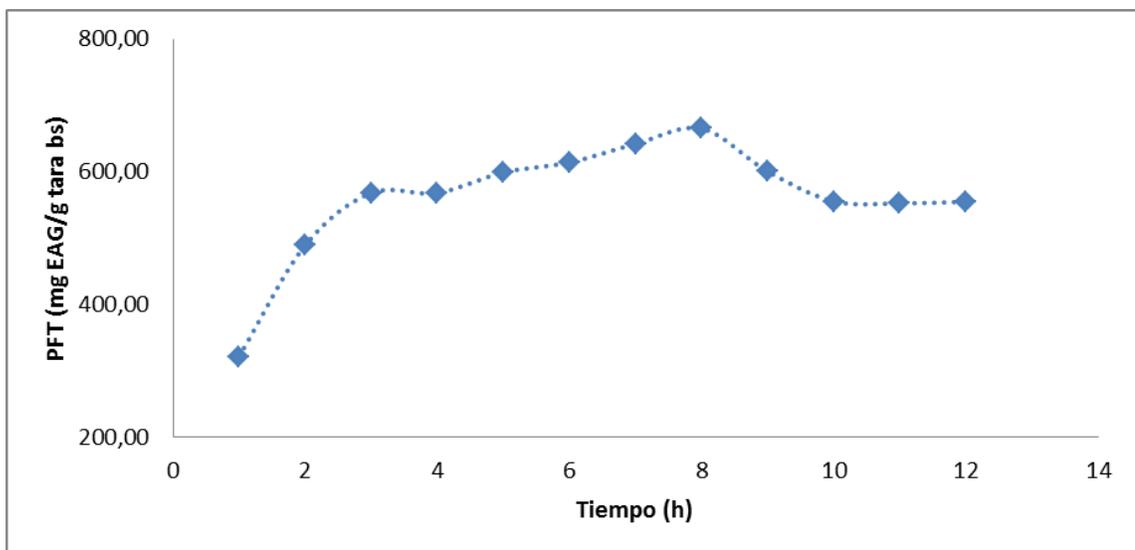


Figura N° 21: Curva de absorción para el estudio cinético durante 12 horas

Anexo N° 3

Curva de calibración de ácido gálico

Para realizar la curva de calibración, se utilizaron 10 concentraciones conocidas de ácido gálico, a los que se les midió absorbancia en triplicado. Los datos de absorbancia obtenidos permitieron obtener la ecuación de la recta que se muestra a continuación, la que posteriormente fue utilizada para determinar las concentraciones de polifenoles presentes en cada solución de éste estudio.

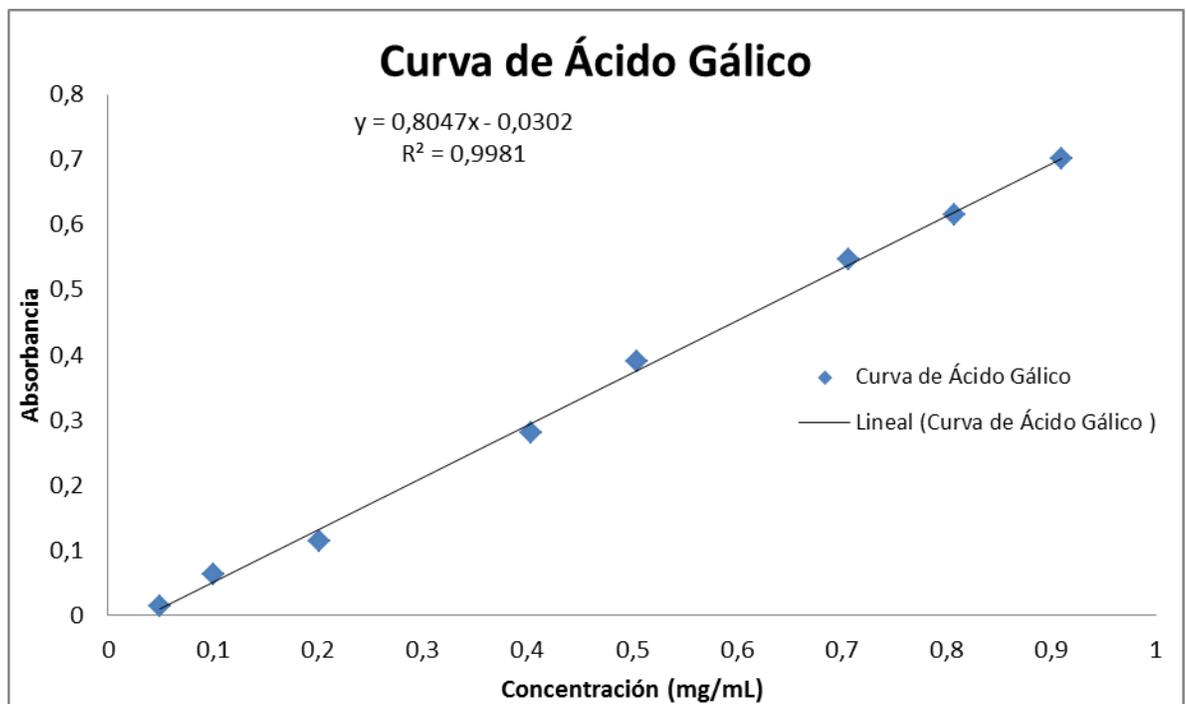


Figura N° 22: Curva de calibración de ácido gálico para determinar concentración de polifenoles en extractos.

Anexo N°4

Metodología de Folin – Ciocalteu

Para la determinación de polifenoles totales (PFT), se aplicó la metodología de Folin-Ciocalteu, preparando soluciones en matraces ámbar de 10 mL. Inicialmente se adiciona 0,1 mL de muestra del extracto previamente diluido, 4,9 mL de agua destilada (Agua prodisa, Chile) y 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania), para posteriormente dejar la muestra en reposo durante 3 minutos. Luego se adicionaron 1,7 mL de Carbonato de Sodio (Merck, Alemania), y se finaliza aforando los matraces con agua destilada, dejando nuevamente en reposo durante 30 minutos. En forma paralela se prepara un blanco, agregando los mismos reactivos, pero sin la adición de la muestra. Por último, se utiliza el espectrofotómetro (Shimadzu, modelo Uvmini-1240, U.S.A) para medir la absorbancia con una longitud de onda correspondiente a 765 nm. El extracto es depositado en cubetas de polietileno, las que son útiles en mediciones de 400-800 nm. Al obtener los resultados de absorbancia para cada extracto, se utilizó la curva de calibración para calcular el contenido de polifenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de materia prima (b.s).

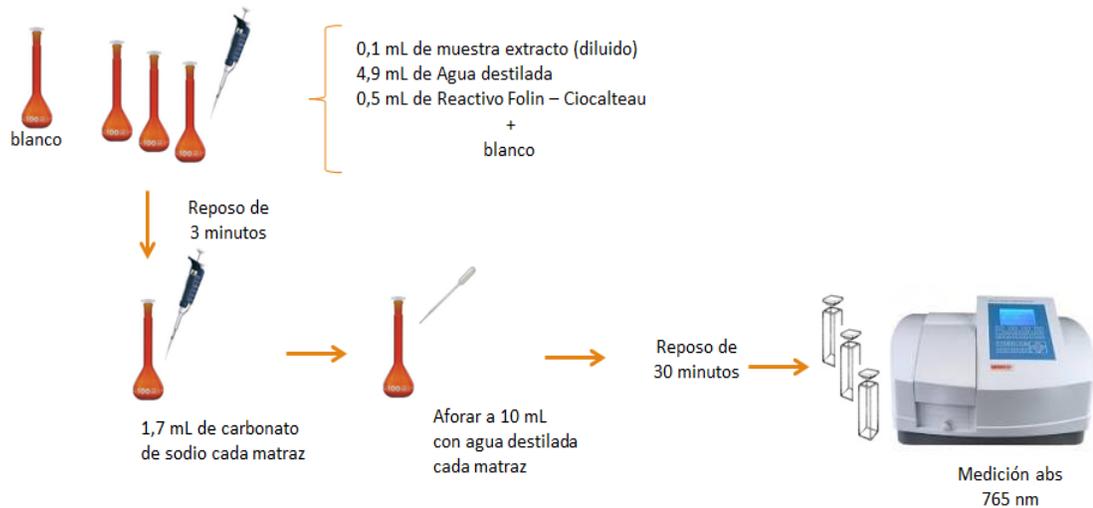


Figura N° 23: Metodología de Folin-Ciocalteu para determinar los polifenoles de cada extracto.

Anexo N°5

Metodología para la determinación de azúcares reductores

Para cuantificar los azúcares reductores de los extractos, se transportó cada solución en tubos falcón. Con jeringa se extrajo 600 μL de cada solución, a la cual se le adicionó 1400 μL de acetonitrilo (Merck, EE.UU). Posteriormente, cada solución se filtró mediante un minifiltro (Agela tecnoly, EE.UU) de 0,22 μm , para luego ser depositada en un vial de 2 mL (Agela tecnoly, EE.UU). Finalmente, las muestras fueron inyectadas en el HPLC-IR, como se muestra en la figura N°24.

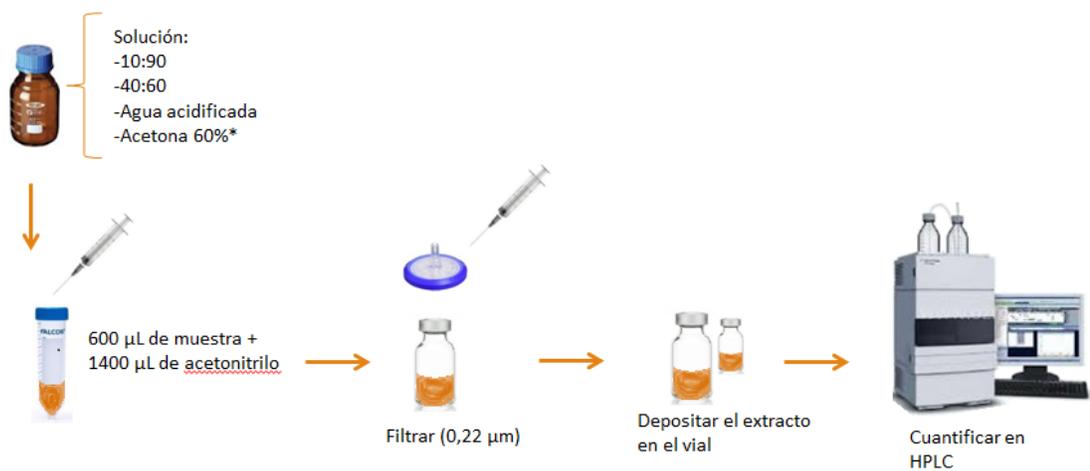


Figura N°24: Procedimiento para determinar azúcares reductores de cada extracto en HPLC-IR.

Anexo N°6

Contenido de azúcares reductores (fructosa-glucosa) en extractos de vaina de tara para distintas condiciones de temperatura y relaciones de soluciones hidroalcohólicas.

Solución	T (°C)	% F g / 100 g tara	% G g / 100 g tara
10.90	25	0,151	0,017
40.60	25	0,154	0,019
Agua Acid	25	0,149	0,012
10.90	35	0,160	0,021
40.60	35	0,154	0,020
Agua Acid	35	0,155	0,021
Acetona 60%	20	0,193	0,036

Anexo N°7

Metodología DPPH

a) Preparación de solución metanólica de DPPH:

Se pesan 19 mg de DPPH (Merck, Germany) en un matraz volumétrico de 500 mL, el cual se afora con metanol y se cubre con papel aluminio para protegerlo de la luz. Esta solución debe prepararse en el momento, pudiendo utilizarse sólo si su absorbancia es mayor a 0,5.

b) Diluciones de muestras:

Se preparan tres diluciones metanólicas de cada muestra (extracto de polifenoles) a distintas concentraciones, en un matraz volumétrico de 5 mL, el cual se afora con metanol. En éste estudio la cantidad de extracto se agregó según la concentración inicial de cada solución.

c) Aplicación metodología DPPH:

En un tubo de ensayo se añade una alícuota de 0,1 mL de la dilución del extracto correspondiente, y luego se adicionan 3,9 mL de la solución metanólica de DPPH.

Paralelamente se realiza la preparación de los siguientes controles:

-Blanco: en un tubo de ensayo, se agrega una alícuota de 3,9 mL de metanol (Merck, Germany).

-Control negativo: en un tubo de ensayo, se agregan 3,9 mL de la solución metanólica de DPPH más 0,1 mL de metanol.

Posteriormente se agita cada uno de los tubos (tanto de las muestras como los controles) y se dejan por 30 minutos en condiciones desprovistas de luz a la espera de que se produzca la reacción.

Para obtener los resultados, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm, como se observa en la siguiente figura N°25.

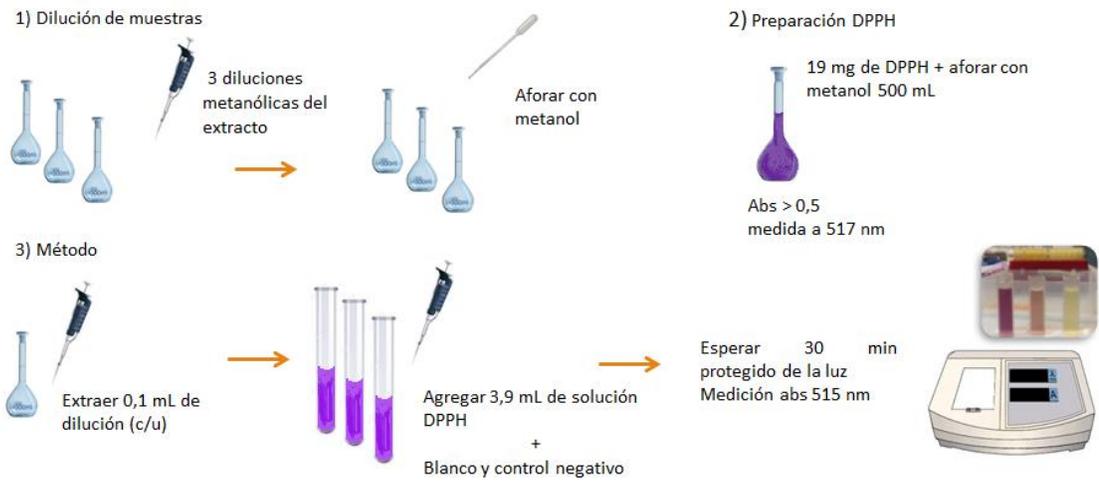


Figura N°25: Metodología DPPH utilizada para determinar la capacidad antioxidante de cada extracto de vaina de tara.

Anexo N°8

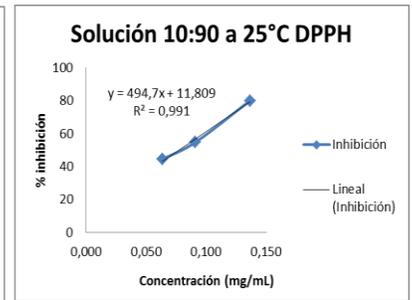
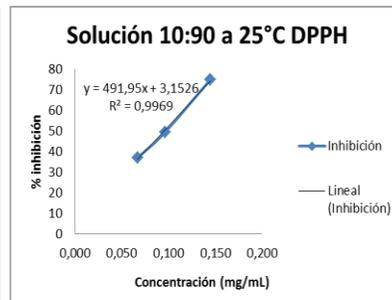
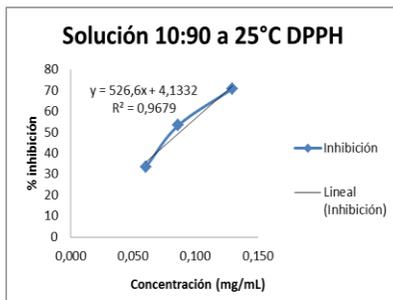
Capacidad antioxidante expresada como IC₅₀ (mg/mL) en extractos de vaina de tara para distintas condiciones de temperatura y relaciones de soluciones hidroalcohólicas.

Solución	T (°C)	IC ₅₀ mg / mL
10.90	25	0,087
40.60	25	0,091
Agua Acid	25	0,074
10.90	35	0,119
40.60	35	0,094
Agua Acid	35	0,095
Acetona 60%	20	0,129

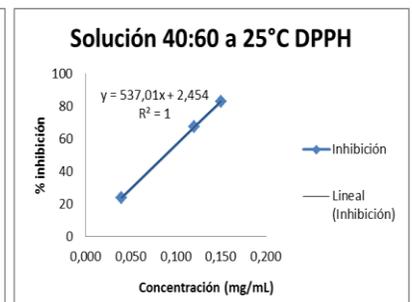
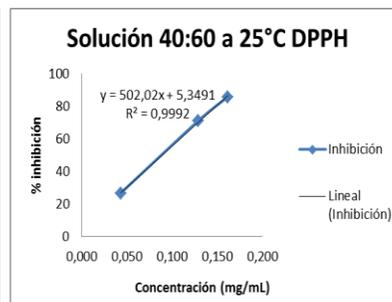
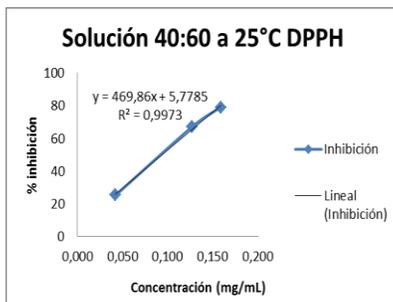
Anexo N°9

Gráficos de porcentaje de inhibición para la determinación de capacidad antioxidante mediante metodología DPPH

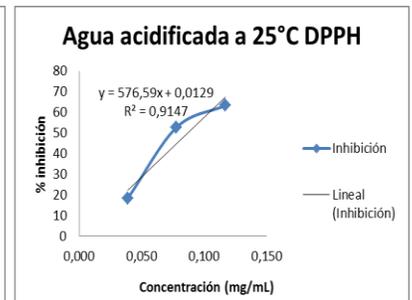
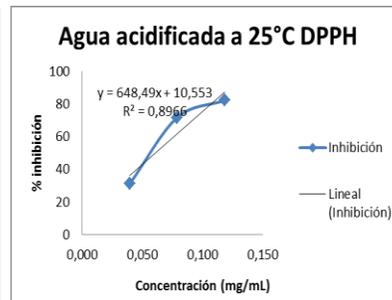
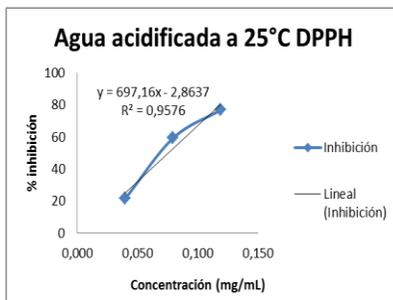
a) Soluciones de 10:90 expuestas a 25 °C



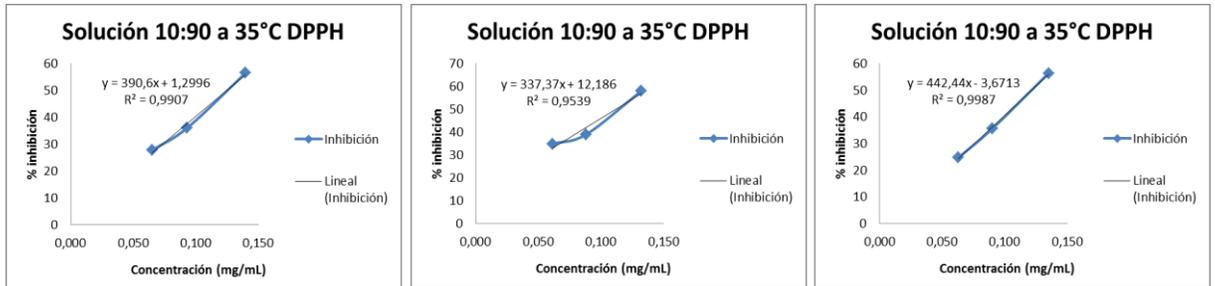
b) Soluciones de 40:60 expuestas a 25 °C



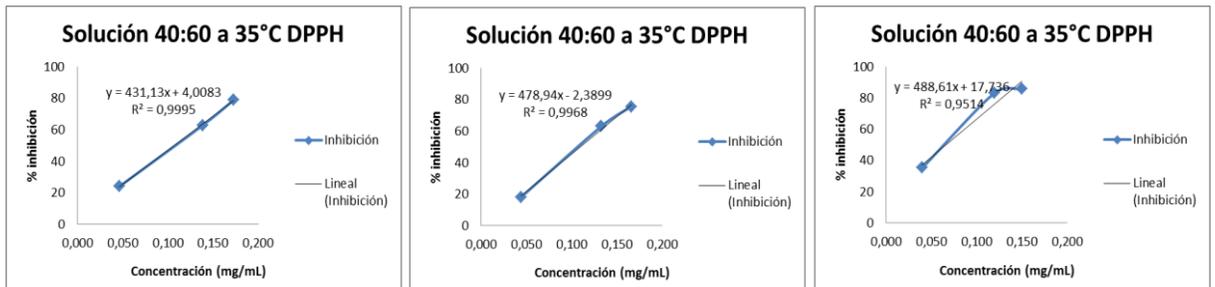
c) Soluciones de agua acidificada expuestas a 25 °C



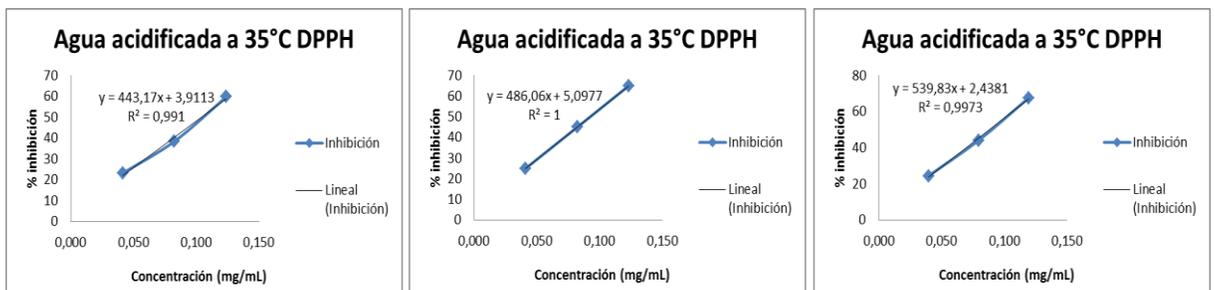
d) Soluciones de 10:90 expuestas a 35 °C



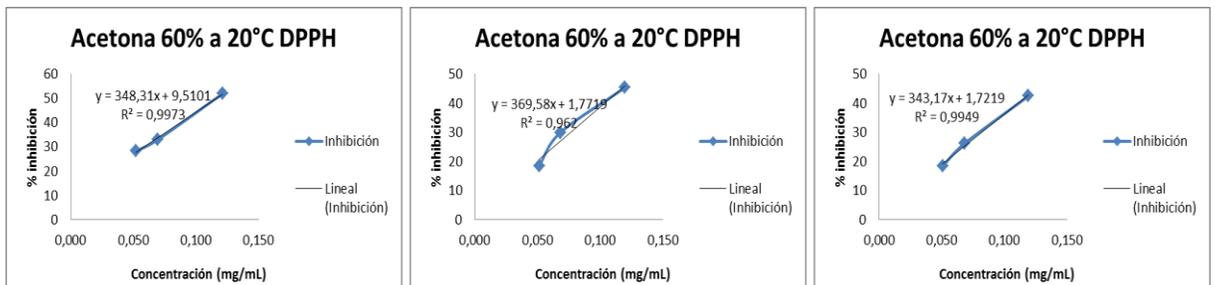
e) Soluciones de 40:60 expuestas a 35 °C



f) Soluciones de agua acidificada expuestas a 35 °C



g) Soluciones de acetona al 60% expuestas a 20 °C



Anexo N°10

Metodología ORAC

a) Preparación de solución Buffer Fosfato:

Se pesan 8,06 g de Cloruro de sodio (Merck, Germany), 0,22 g de Cloruro de potasio (Merck, Germany), 1,15 g de Disodio hidrogeno fosfato (Merck, Germany) y 0,20 g de Dihidrógeno fosfato de potasio (Merck, Germany) para un litro de agua miliq, se ajusta pH de esta solución a 7,4 con hidróxido de sodio 10%. Este buffer se mantiene en baño de agua caliente (37 °C) para disolver los otros reactivos.

b) Preparación de soluciones:

- **Solución de fluoresceína:** para el stock semanal, pesar exactamente 25 mg de fluoresceína en un matraz aforado de 50 mL enrazar y disolver con buffer fosfato. Mantener el matraz protegido de la luz.

Para el stock diario, tomar una alícuota de 50 µL en un matraz de 10 mL, disolver y enrazar con buffer fosfato, realizar una segunda dilución de 1 mL en 50 mL y aforar con buffer fosfato.

- **Solución de trolox:** para el stock semanal, pesar 25 mg de trolox en un matraz aforado de 50 mL; homogenizar y aforar con buffer fosfato. Mantener el matraz protegido de la luz.

Para el stock diario, realizar la curva de calibración estándar trolox de la siguiente forma:

Punto	Alícuota (mL)	Vol matraz (mL)	Concentración µM	Solución
1	0,5 (Solución stock)	10	100	1
2	5 (sol 1)	10	50	2
3	5 (sol 2)	10	25	3
4	5 (sol 3)	10	12,5	4

- **Solución de radical AAPH:** pesar 230 mg de radical en un frasco de vidrio ámbar y adicionar 5 mL de buffer fosfato, homogenizar. Debe mantenerse una relación peso/volumen de 46 mg/mL, considerando que se utiliza 25 μ L por pocillo de la placa.

c) Preparación de las muestras:

Se homogeniza cada muestra, de la cual se toma una alícuota de 0,5 mL del extracto, el cual se diluye en un matraz de 5 mL protegido de la luz y se afora con buffer fosfato. De éste último se extrae una alícuota de 0,5 mL y se lleva a un matraz (protegido de la luz) de 25 mL y se afora con buffer. Finalmente se extrae de este último, una alícuota de 200 μ L y se dispone en un matraz ámbar de 10 mL, el cual se afora con buffer fosfato. Este procedimiento se realiza en triplicado.

d) Aplicación metodología ORAC:

Para la preparación de pocillos para la lectura, todos los reactivos tienen que estar tibios (37 °C aprox) antes de llenar la placa (84 pocillos)

- Se llena 300 μ L de agua en todos los bordes de la placa marca NUNC.
- En los primeros cuatro pocillos se llenan los puntos de la curva (25 μ L). Cada punto se repite cuatro veces para el lado empezando de la concentración de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M y 12 μ M.
- Luego se sigue con la muestras (25 μ L), 6 veces por cada muestra para el lado.
- Luego se agrega 25 μ L de buffer en las dos últimas líneas de la placa F2 a F11 y de G2 a G11.
- Luego se agrega a todo la placa excepto a la que tiene agua, 150 μ L de fluoresceína para muestras, curva trolox y buffer fosfato.
- El equipo automáticamente le agrega el radical que es el AAPH (25 μ L).
- Insertar la placa en el equipo para proceder con la lectura.

Se midió la fluorescencia en un lector de microplacas marca Biotek (FLx800) (Bio-Tek Instruments) con filtro de excitación 485/20 nm y de emisión 528/ 20 nm. Los datos son

procesados por el programa Gen 5 versión 2.09, según se observa en la siguiente figura N°26.

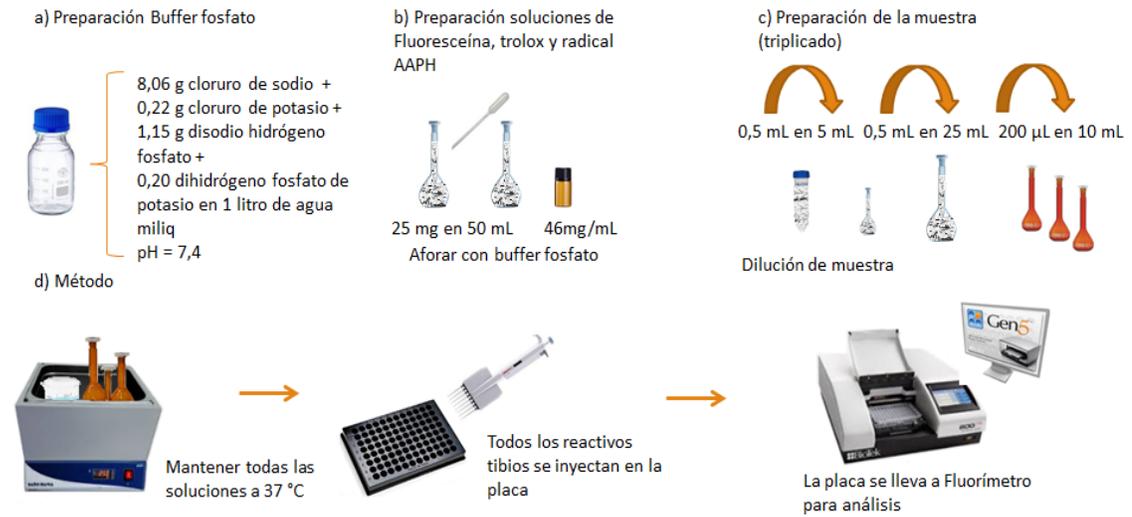


Figura N°26: Metodología ORAC utilizada para determinar la capacidad antioxidante de cada extracto de vaina de tara

Anexo N°11

Metodología HMF

Para cuantificar hidroximetilfurfural en los extractos, con jeringa se extrajo 1 mL de cada solución en donde se depositó en un tubo Falcon y se le adicionó 0,5 mL de carrez I (Merck, Germany) (15g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ en 100 ml de agua) y se agitó; luego, se adicionó 0,5 mL de carrez II (Merck, Germany) (30g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en 100 ml de agua) y se agitó nuevamente en vórtex. Posteriormente, los tubos se sometieron a centrifugación por 15 minutos a 6000 rpm. Finalmente, se tomó el sobrenadante de cada tubo y se filtró mediante un minifiltro (Agela tecnoly, EE.UU) de 0,22 μm , para luego ser depositada en un vial de 2 mL (Agela technology, EE.UU). Finalmente, las muestras fueron inyectadas en el HPLC-DAD, como se muestra en la figura N°27.



Figura N°27: Procedimiento para determinar hidroximetilfurfural (HMF) de cada extracto en HPLC-DAD.

Anexo N° 12

Resultados estadísticos para la selección de extracto de vaina, Tabla ANOVA Multifactorial

a) Polifenoles totales

Análisis de Varianza para PFT - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Solucion	22025,6	1	22025,6	27,00	0,0008
B:Temperatura	234,713	1	234,713	0,29	0,6062
INTERACCIONES					
AB	513,16	1	513,16	0,63	0,4505
RESIDUOS	6525,06	8	815,633		
TOTAL (CORREGIDO)	29298,6	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

b) Fructosa

Análisis de Varianza para Fructosa - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Solucion	0,000990083	1	0,000990083	0,96	0,3548
B:Temperatura	0,00567675	1	0,00567675	5,53	0,0466
INTERACCIONES					
AB	0,00816408	1	0,00816408	7,95	0,0225
RESIDUOS	0,00821133	8	0,00102642		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0230423	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

c) Glucosa

Análisis de Varianza para Glucosa - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Solucion	0,000108	1	0,000108	1,41	0,2693
B:Temperatura	0,00224133	1	0,00224133	29,23	0,0006
INTERACCIONES					
AB	0,000901333	1	0,000901333	11,76	0,0090

RESIDUOS	0,000613333	8	0,0000766667		
TOTAL (CORREGIDO)	0,003864	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

d) DPPH

Análisis de Varianza para DPPH (uMET/ g tara bs) - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Solución	2,26858E6	1	2,26858E6	1,11	0,3222
B:Temperatura	4,32429E6	1	4,32429E6	2,12	0,1833
INTERACCIONES					
AB	5,3036E6	1	5,3036E6	2,60	0,1453
RESIDUOS	1,62993E7	8	2,03741E6		
TOTAL (CORREGIDO)	2,81958E7	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

e) IC₅₀

Análisis de Varianza para IC₅₀ - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Solución	0,00033075	1	0,00033075	1,83	0,2131
B:Temperatura	0,000990083	1	0,000990083	5,48	0,0474
INTERACCIONES					
AB	0,000660083	1	0,000660083	3,65	0,0924
RESIDUOS	0,001446	8	0,00018075		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00342692	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo N° 13

Resultados estadísticos para la degradación térmica del extracto de vaina, Tabla ANOVA Multifactorial

a) Polifenoles totales

Análisis de Varianza para PFT - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	94808,5	3	31602,8	55,09	0,0000
B:Tiempo	47720,4	6	7953,4	13,86	0,0000
INTERACCIONES					
AB	37602,6	18	2089,03	3,64	0,0001
RESIDUOS	32126,0	56	573,678		
TOTAL (CORREGIDO)	212257,	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para PFT por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
150	21	488,443	5,22666	X
120	21	533,843	5,22666	X
90	21	565,283	5,22666	X
60	21	574,356	5,22666	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
60 - 90		9,07281	14,8072
60 - 120	*	40,513	14,8072
60 - 150	*	85,9131	14,8072
90 - 120	*	31,4402	14,8072
90 - 150	*	76,8403	14,8072
120 - 150	*	45,4001	14,8072

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para PFT por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
15	12	510,281	6,91423	X
30	12	513,595	6,91423	X
20	12	515,381	6,91423	X
10	12	557,72	6,91423	X
5	12	559,74	6,91423	X
0	12	563,313	6,91423	X
3	12	563,338	6,91423	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3		-0,0249167	19,5881
0 - 5		3,57333	19,5881
0 - 10		5,593	19,5881
0 - 15	*	53,0322	19,5881
0 - 20	*	47,9319	19,5881
0 - 30	*	49,7174	19,5881
3 - 5		3,59825	19,5881
3 - 10		5,61792	19,5881
3 - 15	*	53,0571	19,5881
3 - 20	*	47,9568	19,5881
3 - 30	*	49,7423	19,5881
5 - 10		2,01967	19,5881
5 - 15	*	49,4588	19,5881
5 - 20	*	44,3586	19,5881
5 - 30	*	46,1441	19,5881
10 - 15	*	47,4392	19,5881
10 - 20	*	42,3389	19,5881
10 - 30	*	44,1244	19,5881
15 - 20		-5,10025	19,5881
15 - 30		-3,31475	19,5881
20 - 30		1,7855	19,5881

* indica una diferencia significativa.

b) Fructosa

Análisis de Varianza para Fructosa - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	0,00403754	3	0,00134585	58,61	0,0000
B:Tiempo	0,000386823	6	0,0000644706	2,81	0,0185
INTERACCIONES					
AB	0,00177972	18	0,0000988734	4,31	0,0000
RESIDUOS	0,00128597	56	0,0000229638		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00749006	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Fructosa por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
60	21	0,158838	0,00104571	X
90	21	0,167219	0,00104571	X
120	21	0,173662	0,00104571	X
150	21	0,177014	0,00104571	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
60 - 90	*	-0,00838095	0,00296252
60 - 120	*	-0,0148238	0,00296252
60 - 150	*	-0,0181762	0,00296252
90 - 120	*	-0,00644286	0,00296252
90 - 150	*	-0,00979524	0,00296252
120 - 150	*	-0,00335238	0,00296252

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Fructosa por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30	12	0,167192	0,00138335	X
15	12	0,167775	0,00138335	XX
20	12	0,167858	0,00138335	XX
10	12	0,168017	0,00138335	XX

3	12	0,168633	0,00138335	XX
5	12	0,171375	0,00138335	XX
0	12	0,173433	0,00138335	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	0,0048	0,00391905
0 - 5		0,00205833	0,00391905
0 - 10	*	0,00541667	0,00391905
0 - 15	*	0,00565833	0,00391905
0 - 20	*	0,005575	0,00391905
0 - 30	*	0,00624167	0,00391905
3 - 5		-0,00274167	0,00391905
3 - 10		0,000616667	0,00391905
3 - 15		0,000858333	0,00391905
3 - 20		0,000775	0,00391905
3 - 30		0,00144167	0,00391905
5 - 10		0,00335833	0,00391905
5 - 15		0,0036	0,00391905
5 - 20		0,00351667	0,00391905
5 - 30	*	0,00418333	0,00391905
10 - 15		0,000241667	0,00391905
10 - 20		0,000158333	0,00391905
10 - 30		0,000825	0,00391905
15 - 20		- 0,000083333 3	0,00391905
15 - 30		0,000583333	0,00391905
20 - 30		0,000666667	0,00391905

* indica una diferencia significativa.

c) Glucosa

Análisis de Varianza para Glucosa - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	0,0282402	3	0,00941339	650,57	0,0000
B:Tiempo	0,00310046	6	0,000516743	35,71	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00821403	18	0,000456335	31,54	0,0000
RESIDUOS	0,000810293	56	0,0000144695		
TOTAL (CORREGIDO)	0,040365	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Glucosa por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
60	21	0,017457 1	0,000830075	X
90	21	0,023247 6	0,000830075	X
120	21	0,049004 8	0,000830075	X
150	21	0,062166 7	0,000830075	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
60 - 90	*	-0,00579048	0,00235162
60 - 120	*	-0,0315476	0,00235162
60 - 150	*	-0,0447095	0,00235162
90 - 120	*	-0,0257571	0,00235162
90 - 150	*	-0,038919	0,00235162
120 - 150	*	-0,0131619	0,00235162

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Glucosa por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	12	0,031341 7	0,00109809	X
10	12	0,0331	0,00109809	XX
3	12	0,033108 3	0,00109809	XX
5	12	0,03585	0,00109809	XX
15	12	0,038808 3	0,00109809	X
20	12	0,045	0,00109809	X
30	12	0,048575	0,00109809	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3		-0,00176667	0,0031109
0 - 5	*	-0,00450833	0,0031109
0 - 10		-0,00175833	0,0031109

0 - 15	*	-0,00746667	0,0031109
0 - 20	*	-0,0136583	0,0031109
0 - 30	*	-0,0172333	0,0031109
3 - 5		-0,00274167	0,0031109
3 - 10		0,000008333 33	0,0031109
3 - 15	*	-0,0057	0,0031109
3 - 20	*	-0,0118917	0,0031109
3 - 30	*	-0,0154667	0,0031109
5 - 10		0,00275	0,0031109
5 - 15		-0,00295833	0,0031109
5 - 20	*	-0,00915	0,0031109
5 - 30	*	-0,012725	0,0031109
10 - 15	*	-0,00570833	0,0031109
10 - 20	*	-0,0119	0,0031109
10 - 30	*	-0,015475	0,0031109
15 - 20	*	-0,00619167	0,0031109
15 - 30	*	-0,00976667	0,0031109
20 - 30	*	-0,003575	0,0031109

* indica una diferencia significativa.

d) HMF

Análisis de Varianza para HMF - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	0,124187	3	0,0413957	215,40	0,0000
B:Tiempo	0,123939	6	0,0206564	107,49	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,2242	18	0,0124556	64,81	0,0000
RESIDUOS	0,010762	56	0,000192179		
TOTAL (CORREGIDO)	0,483088	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para HMF por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
60	21	0,097847 6	0,0030251 3	X
120	21	0,098814	0,0030251	X

		3	3	
90	21	0,101557	0,0030251 3	X
150	21	0,188148	0,0030251 3	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
60 - 90		-0,00370952	0,0085702 4
60 - 120		-0,00096666 7	0,0085702 4
60 - 150	*	-0,0903	0,0085702 4
90 - 120		0,00274286	0,0085702 4
90 - 150	*	-0,0865905	0,0085702 4
120 - 150	*	-0,0893333	0,0085702 4

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para HMF por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	12	0,067125	0,00400187	X
10	12	0,096891 7	0,00400187	X
5	12	0,110283	0,00400187	X
15	12	0,114883	0,00400187	X
3	12	0,11505	0,00400187	X
20	12	0,149408	0,00400187	X
30	12	0,1975	0,00400187	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	-0,047925	0,0113374
0 - 5	*	-0,0431583	0,0113374
0 - 10	*	-0,0297667	0,0113374
0 - 15	*	-0,0477583	0,0113374
0 - 20	*	-0,0822833	0,0113374
0 - 30	*	-0,130375	0,0113374
3 - 5		0,00476667	0,0113374
3 - 10	*	0,0181583	0,0113374

3 - 15		0,000166667	0,0113374
3 - 20	*	-0,0343583	0,0113374
3 - 30	*	-0,08245	0,0113374
5 - 10	*	0,0133917	0,0113374
5 - 15		-0,0046	0,0113374
5 - 20	*	-0,039125	0,0113374
5 - 30	*	-0,0872167	0,0113374
10 - 15	*	-0,0179917	0,0113374
10 - 20	*	-0,0525167	0,0113374
10 - 30	*	-0,100608	0,0113374
15 - 20	*	-0,034525	0,0113374
15 - 30	*	-0,0826167	0,0113374
20 - 30	*	-0,0480917	0,0113374

* indica una diferencia significativa.

e) DPPH

Análisis de Varianza para DPPH - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	2,08841E7	3	6,96138E6	36,48	0,0000
B:Tiempo	1,13429E8	6	1,89048E7	99,07	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,64738E7	18	915212,	4,80	0,0000
RESIDUOS	1,06856E7	56	190815,		
TOTAL (CORREGIDO)	1,61472E8	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para DPPH por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
60	21	8344,77	95,3227	X
90	21	8673,8	95,3227	X
120	21	9171,76	95,3227	X
150	21	9659,46	95,3227	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
60 - 90	*	-329,027	270,051
60 - 120	*	-826,994	270,051

60 - 150	*	-1314,69	270,051
90 - 120	*	-497,967	270,051
90 - 150	*	-985,662	270,051
120 - 150	*	-487,695	270,051

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para DPPH por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	12	6345,03	126,1	X
3	12	8550,83	126,1	X
5	12	8983,54	126,1	X
10	12	9380,26	126,1	X
30	12	9729,89	126,1	XX
15	12	9814,59	126,1	X
20	12	9932,98	126,1	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	-2205,8	357,243
0 - 5	*	-2638,51	357,243
0 - 10	*	-3035,24	357,243
0 - 15	*	-3469,56	357,243
0 - 20	*	-3587,95	357,243
0 - 30	*	-3384,86	357,243
3 - 5	*	-432,704	357,243
3 - 10	*	-829,432	357,243
3 - 15	*	-1263,76	357,243
3 - 20	*	-1382,15	357,243
3 - 30	*	-1179,06	357,243
5 - 10	*	-396,728	357,243
5 - 15	*	-831,054	357,243
5 - 20	*	-949,445	357,243
5 - 30	*	-746,354	357,243
10 - 15	*	-434,326	357,243
10 - 20	*	-552,717	357,243
10 - 30		-349,626	357,243
15 - 20		-118,391	357,243
15 - 30		84,6997	357,243
20 - 30		203,091	357,243

* indica una diferencia significativa.

f) ORAC

Análisis de Varianza para ORAC - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFEKTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	276137,	3	92045,6	2,65	0,0572
B:Tiempo	8,68677E6	6	1,44779E6	41,76	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,15129E6	18	63960,4	1,84	0,0420
RESIDUOS	1,94152E6	56	34669,9		
TOTAL (CORREGIDO)	1,20557E7	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ORAC por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
60	21	5003,5	40,6319	X
150	21	5040,52	40,6319	X
120	21	5044,03	40,6319	XX
90	21	5156,58	40,6319	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
60 - 90	*	-153,081	115,111
60 - 120		-40,526	115,111
60 - 150		-37,0202	115,111
90 - 120		112,555	115,111
90 - 150	*	116,061	115,111
120 - 150		3,50576	115,111

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para ORAC por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
15	12	4688,67	53,7509	X

10	12	4811,99	53,7509	XX
20	12	4892,7	53,7509	X
30	12	4928,99	53,7509	XX
5	12	5059,05	53,7509	X
3	12	5365,26	53,7509	X
0	12	5681,43	53,7509	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 3	*	316,167	152,277
0 - 5	*	622,376	152,277
0 - 10	*	869,441	152,277
0 - 15	*	992,755	152,277
0 - 20	*	788,73	152,277
0 - 30	*	752,44	152,277
3 - 5	*	306,209	152,277
3 - 10	*	553,274	152,277
3 - 15	*	676,589	152,277
3 - 20	*	472,564	152,277
3 - 30	*	436,274	152,277
5 - 10	*	247,065	152,277
5 - 15	*	370,38	152,277
5 - 20	*	166,355	152,277
5 - 30		130,065	152,277
10 - 15		123,315	152,277
10 - 20		-80,7101	152,277
10 - 30		-117,0	152,277
15 - 20	*	-204,025	152,277
15 - 30	*	-240,315	152,277
20 - 30		-36,2901	152,277

* indica una diferencia significativa.