

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO OPTIMIZADO DE POLIFENOLES DE VAINAS DE TARA (CAESALPINIA SPINOSA) POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y SU APLICACIÓN EN UN PRODUCTO HORNEADO CON EL FIN DE MITIGAR EL CONTENIDO DE NEO-CONTAMINANTES

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

JESSAMI SANDY MARÍN TRONCOSO

Director de Tesis: Andrea Bunger Timmermann

Codirector: Franco Pedreschi Plasencia

Santiago – Chile

Marzo 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

JESSAMI SANDY MARÍN TRONCOSO

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

Director de Tesis:

M.Sc. Andrea Bunger Timmermann _____

Co-director de Tesis:

Dr. Franco Pedreschi Plasencia _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Roberto Lemus Mondaca _____

Dr. Mario Perez Won _____

Dra. Vilbett Briones Labarca _____

DEDICATORIA

*A mi tata y mi tía Yorka
Que a pesar de que ya no se encuentren en este mundo
Sé que siempre estuvieron orgullosos de mi*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios, quien me dio la fortaleza para seguir adelante en cada momento difícil que enfrenté durante la carrera. A mis padres, quienes me apoyaron incondicionalmente y estuvieron para mí en cada instante que los necesité, gracias por darme la vida y por amarme infinitamente, tal como yo los amo a ustedes. A mi abuela, por su amor infinito desde que era pequeña, sé que ahora no estas tan consciente de mi logro, pero puedo seguir sintiendo su amor y apoyo siempre.

A Matías, quien fue mi compañero durante 6 años, fuiste mi gran apoyo, refugio y ayuda durante el desarrollo de esta tesis, jamás voy a olvidar los momentos que pasamos juntos y todo lo feliz que me hiciste.

A mis amigos de carrera que aguantaron mis bromas y pesadeces: Carito, Mauri, Tatan, Tammy, Mane, Naty, Ali, Catita, Meli y Piola, quienes estuvieron a la par conmigo en cada momento de la carrera, ayudándonos y apoyándonos mutuamente. ¡Los quiero muchísimo!

A mis amigos de universidad: Gaby, quien me ayudó en los análisis de ORAC, muchas gracias por eso y más; Manuel, quien ha sido un apoyo para mi siendo mi roomie en el último tiempo; Camilo, quien siempre resuelve mis dudas más difíciles, gracias por todo; Magdita, Chang, Vicky, Francia y Feña, por los momentos vividos trabajando para difundir la ciencia en la facultad.

En estos momentos no recuerdo nombres exactos, pero quiero agradecer a cada persona que pasó por mi vida durante estos largos años de universidad: profesores, tíos de la biblioteca, funcionarios, compañeros de carrera, compañeros del Centro de Estudiante, compañeros del Plan Colegio, compañeros de la Secretaría de Extensión, compañeros de las diferentes carreras de la universidad que conocí en los monitores, y Gonzalo Muñoz y mis excompañeros de practica en Carozzi; atesoro cada vivencia y me quedo con las mejores experiencias de las etapas que viví como universitaria.

Agradezco también a mi profesora guía, Andrea Bungler, quien ha sido mi apoyo y ayuda desde que tome la unidad de investigación; gracias por la paciencia y por las

oportunidades que me ha dado. Así también, quisiera agradecer a todos quienes fueron parte de esta tesis: Raúl y profesora Teresa de la Universidad de la Serena, Greys y profesora Paula García de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Juan Pablo y profesor Franco Pedreschi de la Pontificia Universidad Católica, y a Gaby y profesora María Carolina de la Facultad de Cs Químicas de la Universidad de Chile.

Quiero agradecer también a las personas que me han acompañado en este último periodo, mis compañeros de trabajo en el CeTA: Fran, Diandra, Manuel, Mane, Débora, Feña, y especialmente Gonzalo, quien ha sido mi pilar en el último tiempo, creyendo en mí y alentándome en los malos momentos.

Finalmente, pero no menos importante, y a pesar de que es tonto y que nunca leerá esto, quisiera agradecer a mi gatita Kitty que estuvo conmigo en esas noches eternas en el comedor de mi casa; el solo hecho de sentirla en mis piernas o verla dormir me alentaba a seguir adelante; gracias por todo el amor que siempre me has entregado.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 Producto Horneado: Queque.....	16
2.2 Neo contaminantes	17
2.2.1 Efecto de neo contaminantes en la dieta.....	18
2.2.2 Toxicología y peligro potencial	20
2.2.3 Mecanismos de formación de neo contaminantes	21
2.2.4 Tecnologías de mitigación de neo-contaminantes	25
2.3 Tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>)	26
2.3.1 Taninos	27
2.4 Altas presiones hidrostáticas (APH).....	28
3. HIPOTESIS	31
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo General.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. MATERIALES Y EQUIPOS.....	32
5.1 Materiales.....	32
5.1.1 Materias Primas	32
5.1.2 Reactivos químicos	32
5.1.3 Insumos	33
5.1.4 Equipos e instrumentos	34
6. METODOLOGÍA	36
6.1 Extracción de polifenoles por altas presiones hidrostáticas	36
6.1.1 Obtención del polvo de vainas de tara.....	36
6.1.2 Diseño experimental	37
6.1.3 Obtención del extracto polifenólico.....	38
6.2 Caracterización química del extracto polifenólico	38
6.2.1 Rendimiento de extracción.....	38
6.2.2 Polifenoles totales: Folin – Ciocalteu.....	39
6.2.3 Capacidad antioxidante: DPPH	39
6.2.4 Capacidad antioxidante: FRAP	40

6.2.5	Capacidad antioxidante: ORAC – FL	41
6.2.6	Taninos hidrolizables.....	41
6.2.7	Taninos condensados	41
6.3	Optimización del extracto polifenólico	42
6.4	Comparación del extracto óptimo con extracto sólido – líquido	42
6.5	Elaboración de producto horneado: queque.....	43
6.6	Determinación de neo - contaminantes en queque	44
6.6.1	Determinación del contenido de acrilamida	44
6.6.2	Determinación del contenido de hidroximetilfurfural	45
6.7	Evaluación sensorial del producto horneado.....	45
6.7.1	Test de consumidores	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	48
7.1	Caracterización química del extracto de vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>).....	48
7.1.1	Optimización del extracto de vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>)	55
7.2	Comparación de los métodos de extracción por altas presiones y por extracción sólido - líquido	57
7.3	Determinación de neocontaminantes en queque.....	60
7.3.1	Determinación del contenido de hidroximetilfurfural	60
7.3.2	Determinación del contenido de acrilamida	62
7.4	Evaluación Sensorial.....	64
7.4.1	Evaluación de las muestras	64
7.4.2	Comparación con queque tradicional.....	70
8.	Conclusiones	75
9.	Bibliografía.....	77
10.	Anexos	90
	Anexo 1. Mercado de alimentos procesados en Chile (Fundación Chile, 2013).	90
	Anexo 2. Niveles de acrilamida (mg / kg) a en diferentes productos alimenticios (EFSA, 2009).	90
	Anexo 3. Contenido de HMF de productos alimenticios seleccionados (Capuano & Fogliano, 2011).....	91
	Anexo 4. Distribución documentada de <i>Caesalpinia spinosa</i> , (Orwa et al., 2009).....	92
	Anexo 5. Relación química de galatoninos y elagitaninos (Hagerman, 1998).....	92
	Anexo 6. Diseño experimental Box-Behnken con cuatro variables independientes para la extracción de polifenoles en vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>).....	93
	Anexo 7. Medición de polifenoles totales: método Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965) y curva de calibración de ácido gálico utilizada.	94

Anexo 8. Medición de la capacidad antioxidante: método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) descrito por Brand-Williams <i>et al.</i> (1995).....	96
Anexo 9. Medición de la capacidad antioxidante: método del Poder Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP) descrito por Benzie & Strain (1996) y curva de calibración TROLOX utilizada.	98
Anexo 10. Medición de ORAC – FL: método de la degradación oxidativa de la fluoresceína descrito por Maturana (2019), curva de calibración TROLOX utilizada y curva de decaimiento ORAC – FL.	100
Anexo 11. Medición de la concentración de taninos hidrolizables Descrito por A.O.A.C (Edición 14 -1984).....	103
Anexo 12. Medición de la concentración de taninos condensados. Método gravimétrico Stiasny. Descrito por Aguilar <i>et al.</i> (2012).	105
Anexo 13. Metodología extracción por solvente de polifenoles de vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>). Modificado de Bravo (2010).	107
Anexo 14. Proceso de elaboración de queque. Modificado de Segundo <i>et al.</i> (2017) & Kim – Hwan (2012).	108
Anexo 15. Determinación de acrilamida en un producto horneado: método modificado de Ciesarová <i>et al.</i> (2006) y condiciones del equipo de cuantificación.	109
Anexo 16. Determinación de hidroximetilfurfural en un producto horneado: método descrito por Toker <i>et al.</i> (2013) y condiciones del equipo de cuantificación.	112
Anexo 17. (a) Kit para evaluación sensorial entregado a cada familia con la cantidad de muestras correspondientes, junto con agua purificada necesaria y consentimiento informado. (b) Disposición de los elementos que cada consumidor necesitó para llevar a cabo la evaluación.....	114
Anexo 18. Estudio con consumidores realizado “en casa” de cada encuestado.....	115
Anexo 19. Formulario on-line utilizado para llevar a cabo la evaluación sensorial individual.	116
Anexo 20. Resultados de la caracterización de la extracción de polifenoles de vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>) por altas presiones hidrostáticas.	117
Anexo 21. Análisis estadístico para las respuestas no ajustadas del modelo de extracción de polifenoles de vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>) por altas presiones hidrostáticas. .	118
Anexo 22. Diagramas de Pareto para las respuestas ajustadas: (a) rendimiento, (b) polifenoles totales, (c) ORAC-FL y (d) taninos hidrolizables.....	119
Anexo 23. Tabla de contenido de taninos condensados para vainas de tara (<i>Caesalpinia Spinosa</i>) (Kardel <i>et al.</i> , 2013).....	120
Anexo 25. Cambio del color de la miga de las muestras de queque de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara frente a un queque tradicional.....	122
Anexo 26. Gráfico de intención de compra para las muestras de queque de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.....	123
Anexo 27. Análisis estadístico para aceptabilidad de las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.	123

Anexo 28. Análisis estadístico para la preferencia entre las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.	124
Anexo 29. Razones de preferencia para las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.	125
Anexo 30. Respuestas de sabor distinto o sensación diferente en la boca frente al queque preferido por los consumidores.	127
Anexo 31. Análisis estadístico para la preferencia entre la muestra preferida por los consumidores y un queque tradicional.	128
Anexo 32. Razones de preferencia para la muestra elegida por los consumidores y un queque tradicional.	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables independiente y niveles del diseño experimental Box-Behnken para la extracción de polifenoles de polvo de vainas de tara.....	37
Tabla 2. Formulación para elaboración de queque.....	43
Tabla 3. Formulación para elaboración de queque con diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara.....	44
Tabla 4. Especificaciones para el cuestionario desarrollado en el estudio de consumidores para dos muestras de queque de concentración 250 y 500 mg tara/kg de producto.....	47
Tabla 5. Resultados del análisis estadístico para las respuestas ajustadas del modelo de extracción de polifenoles de vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>) por altas presiones hidrostáticas.....	49
Tabla 6. Deseabilidad obtenida y valores optimizados para cada variable independiente que determina el proceso de extracción.....	55
Tabla 7. Valores optimizados para cada variable respuesta y su validación.....	56
Tabla 8. Comparación entre extracto altas presiones hidrostáticas y extracto sólido – líquido para las respuestas seleccionadas para la optimización del diseño experimental.....	58
Tabla 9. Contenido de HMF en queque frente a diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>)	60
Tabla 10. Principales razones de preferencia entre las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg.....	69
Tabla 11. Respuestas de sabor diferente con respecto a un queque tradicional en el queque preferido por los consumidores.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías para la formación de AA en los alimentos. (A) Vía principal de formación de AA. (B) Vía menor de formación de AA.....	22
Figura 2. Esquema de reacción propuesto para la formación de 5-HMF.....	24
Figura 3. Micrografías electrónicas de hojas de té verde. A: hojas sin tratar; B: hojas después de la extracción a altas presiones hidrostáticas (presión de 400 MPa durante 15 minutos).....	30
Figura 4. Estado de las vainas de tara en proceso de trituración: (A) Fruto de la tara completa, (B) Vainas de tara trituradas manualmente + cutter y (C) Polvo de vainas de tara triturado en molino de cuchillas.....	36
Figura 5. Reacción entre molécula de DPPH• y un antioxidante.....	40
Figura 6. Reacción de reducción del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina al complejo ferroso-tripiridil-triazina.....	40
Figura 7. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para el rendimiento de extracción.....	51
Figura 8. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para el contenido de polifenoles totales.....	51
Figura 9. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para taninos hidrolizables.....	52
Figura 10. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para la capacidad antioxidante: ORAC-FL.....	53
Figura 11. Gráfica de superficie de respuesta para el análisis de la deseabilidad de presión frente al porcentaje de etanol en la optimización conjunta del diseño experimental.....	57
Figura 12. Mitigación del contenido de HMF en corteza de queque a diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara con respecto a un queque control.....	62

Figura 13. Precipitación de sacarosa en muestra para la medición de acrilamida.....	63
Figura 14. Gráfico para los atributos de aceptabilidad de las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg extracto de vainas de tara.....	64
Figura 15. Gráfico de justo agrado del a) color de la miga, b) dureza y c) esponjosidad de las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg.....	66
Figura 16. Gráfico de preferencia entre las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg.....	68
Figura 17. Gráfico de intención de compra del queque preferido por los evaluadores frente a un queque tradicional.....	72
Figura 18. Gráfico de preferencia entre la muestra de queque preferido por los evaluadores y un queque tradicional.....	73

RESUMEN

Los alimentos tratados térmicamente son ampliamente consumidos, como los productos de panadería, entre ellos las galletas saladas, galletas dulces y queques. Algunas formas de procesamiento, junto con la composición de los alimentos, conducen a la formación de neo-contaminantes tales como acrilamida e hidroximetilfurfural. Se ha informado el uso de extractos polifenólicos para la mitigación de estos compuestos. Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta investigación es caracterizar un extracto obtenido a partir de las vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) mediante altas presiones hidrostáticas y estudiar su incorporación a un producto horneado (queque) para mitigar el contenido de neocontaminantes manteniendo su calidad sensorial. La extracción de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) se caracterizó químicamente mediante un diseño experimental Box-Behnken con 27 corridas experimentales, utilizando altas presiones hidrostáticas como tecnología de extracción con cuatro variables independientes: presión (MPa), tiempo (minutos), porcentaje de etanol y proporción masa tara/volumen solvente, obteniendo las mejores condiciones de extracción midiendo como respuestas polifenoles totales, capacidad antioxidante (FRAP, DPPH y ORAC), concentración de taninos y rendimiento. El extracto optimizado fue añadido en concentraciones de 250 hasta 2500 mg/kg en queques, para la cuantificación de sus niveles de acrilamida e hidroximetilfurfural por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC– MS) y HPLC-DAD, respectivamente, y la determinación de características sensoriales con 102 consumidores. Se obtuvo un extracto de vainas de tara optimizado, donde la presión y el porcentaje de solvente fueron significativos, y sus valores óptimos fueron 349,97 MPa y 57,83%, respectivamente, mientras que las respuestas ajustadas maximizadas ($p > 0,05$) fueron: rendimiento ($80,77 \pm 0,38\%$), contenido de polifenoles totales ($765,26 \pm 15,03$ mg EAG/g), ORAC – FL ($6656,39 \pm 209,17$ μ mol Eq Trolox/g) y taninos hidrolizables ($47,19 \pm 0,78\%$), alcanzando mayores resultados en comparación con la técnica de extracción convencional. Por otro lado, el extracto de vainas de tara redujo significativamente ($p < 0,05$) los niveles de hidroximetilfurfural, en 41% en queque horneado a 190°C por 30 minutos, con la adición 500 mg/kg de extracto. Esta última concentración se evaluó sensorialmente junto con la muestra de 250 mg/kg, obteniéndose buena aceptabilidad y una alta intención de compra al conocer las propiedades saludables del queque con adición de extracto de vainas de tara.

ABSTRACT

Obtención de un extracto optimizado de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) por altas presiones hidrostáticas y su aplicación en un producto horneado con el fin de mitigar el contenido de neo-contaminantes

Heat-treated foods are widely consumed, such as bakery products, including crackers, cookies and cakes. Some forms of processing, together with the composition of the food, lead to the formation of neo-formed compounds such as acrylamide and hydroxymethylfurfural. The use of polyphenolic extracts for the mitigation of these compounds has been reported. Due to the above, the objective of this research was to characterize an extract obtained from the pods of tara (*Caesalpinia spinosa*) by means of high hydraulic pressures and to study incorporating it into a baked product (cake) to reduce the content of neocontaminants while maintaining its quality sensory. The extraction of polyphenols from tara pods (*Caesalpinia spinosa*) was chemically characterized by means of a Box-Behnken experimental design with 27 experimental runs, using high hydrostatic pressures as extraction technology with four independent variables: pressure (MPa), time (minutes), ethanol percentage and tare mass/solvent volume ratio, obtaining the best extraction conditions by measuring total polyphenol responses, antioxidant capacity (FRAP, DPPH and ORAC), tannin concentration and yield. The optimized extract was added at concentrations of 250 to 2500 mg/kg in cakes, for the quantification of its levels of acrylamide and hydroxymethylfurfural by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) and HPLC-DAD, respectively, and for the determination of sensory characteristics with 102 consumers. An optimized tara pod extract was obtained, where the pressure and the percentage of solvent were significant, and their optimal values were 349.97 MPa and 57.83%, respectively, while the fitted responses maximized ($p > 0.05$) were: yield ($80.77 \pm 0.38\%$), content of total polyphenols (765.26 ± 15.03 mg EAG/g), ORAC – FL (6656.39 ± 209.17 $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$) and hydrolyzable tannins ($47.19 \pm 0.78\%$), achieving better results compared to the conventional extraction technique. On the other hand, the tara pod extract significantly reduced ($p < 0.05$) the levels of hydroxymethylfurfural, by 41% in cake baked at 190°C for 30 minutes, with the addition of 500 mg/kg of extract. This last concentration was evaluated sensorially together with the 250 mg/kg sample, obtaining good acceptability and a high purchase intention when knowing the healthy properties of the cake with the addition of tara pod extract.

1. INTRODUCCIÓN

La alta presión hidrostática (APH) es una técnica emergente de procesamiento de alimentos no térmica, que se ha mostrado muy prometedora en la industria de alimentos y farmacéutica. Su elevada presión aplicada (entre 100 y 1000 MPa) es capaz de inactivar microorganismos y extender la vida útil de los productos (Maroun *et al.*, 2018). Además, esta técnica se utiliza para extraer compuestos bioactivos de materiales vegetales, y en comparación con otras tecnologías convencionales, la APH evita la degradación térmica y la pérdida de bioactividad de los polifenoles extraídos al realizarse a temperatura ambiente (Huang *et al.*, 2013). Una materia prima vegetal ampliamente distribuida por América del Sur es la tara (*Caesalpinia spinosa*), la cual es un árbol leguminoso nativo de Perú, cuyas vainas concentran un alto contenido de taninos (entre 40 y 60%) y sus extractos poseen propiedades antitumorales, antimicrobianas y antioxidantes (Chambi *et al.*, 2014; Aguilar-Gálvez *et al.*, 2013; Skowyra *et al.*, 2013).

El uso de antioxidantes naturales se ha propuesto como una posible estrategia para mitigar la formación de compuestos neo-formados y, en algunos casos, la presencia de polifenoles podría influir en el desarrollo general de la reacción de Maillard (Pedreschi *et al.*, 2018). Los neocontaminantes han recibido mucho interés como consecuencia de sus posibles efectos toxicológicos, mutagénicos y carcinogénicos (Masatcioglu *et al.*, 2015; Capuano & Fogliano, 2011). En particular, la acrilamida e hidroximetilfurfural pueden considerarse como los contaminantes más importantes que se producen en productos de pastelería y panadería. Estos compuestos pueden generarse durante los procesos de calentamiento, dando pie al desarrollo de la reacción de Maillard, la cual es la responsable de la formación del sabor y color deseable de este tipo de alimentos (Van Der Fels-Klerx *et al.*, 2014). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es caracterizar un extracto hidrolizado de Tara (*Caesalpinia spinosa*) obtenido mediante altas presiones hidrostáticas y estudiar su incorporación a un producto horneado (queque) con el fin de mitigar el contenido de neocontaminantes, manteniendo su calidad sensorial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Producto Horneado: Queque

Los productos de panadería, como galletas saladas, galletas dulces y queques, constituyen uno de los alimentos más consumidos en el mundo (Zhang *et al.*, 2012). Debido a los cambios en el comportamiento del consumidor y los hábitos alimenticios, los alimentos preparados listos para el consumo tienen una importancia cada vez mayor (Kim *et al.*, 2012). Entre ellos, los queques son especialmente populares y están asociados en la mente del consumidor como un delicioso producto.

Los pasteles son uno de los productos de panadería leudados al aire (Arora *et al.*, 2017), en donde sus principales ingredientes utilizados en la preparación de bizcochos son harina de trigo, huevo y azúcar (Zhang *et al.*, 2012). En el Reglamento Sanitario de los Alimentos los queques están descritos en la categoría de “Alimentos farináceos” en el título XV, específicamente en el Párrafo III “Del pan y los productos de pastelería y repostería”. En el artículo 358, se describen las especificaciones que deben cumplir las masas horneadas elaboradas en base a harinas y adiccionados o no de especias y otros ingredientes o aditivos permitidos; las cuales son: a) el aspecto de la masa será homogéneo, adecuado para dar la característica típica del producto; b) acidez no superior al 0,25% expresada en ácido sulfúrico.

La masa de un bizcocho es una emulsión compleja que consta de una fase discontinua de burbujas de aire y una fase continua de huevo, azúcar, agua y grasa, en donde se dispersan las partículas de harina. Durante el mezclado se incorpora aire en la masa, las burbujas ocluidas formadas se estabilizan por la acción de las proteínas presentes en la clara del huevo. Por otro lado, la emulsificación de los pequeños glóbulos de grasa la llevan a cabo las lipoproteínas del huevo, quienes reorganizan rápidamente la interfaz aceite-agua, formando un film alrededor de las burbujas de aire (Rodríguez, 2014).

Según cifras de Euromonitor Internacional, el mercado de los alimentos procesados en Chile alcanza un volumen de ventas cercano a los US\$11 billones anuales. Dentro de esta industria, las categorías de panadería y productos horneados - como galletas y queques - representaron el 36% de las ventas de alimentos procesados durante el año 2013 (Anexo 1) (Fundación Chile, 2013). Así también, un estudio de mercado sobre alimentos de panadería y galletería posiciona a Chile como el país con mayores gastos en estos productos durante los años 2016 al 2019 (Alonso, 2020). El 99% de la población reportó consumo de estos alimentos, con una mediana global de 77 g/día. Los azúcares de golosinas y otros alimentos dulces (caramelos, masticables, masas dulces como queques y tortas, snacks dulces, helados), fueron proporcionalmente los que más aportaron dentro de este grupo (88%) (ENCA, 2010). Además, en una encuesta realizada por Saluzzi (2017), se obtuvo que un 26,3% de los encuestados prefería consumir este tipo de productos. Los queques se consumen tanto como colaciones entre las comidas, alimentos complementarios para niños o como elemento de refrigerio en reuniones sociales, por lo tanto, se puede concluir que este tipo de alimento es del agrado en cualquier rango de edad (Akhtar *et al.*, 2006).

2.2 Neo contaminantes

Los procesos térmicos se utilizan con frecuencia en la fabricación de alimentos para obtener productos seguros con una vida útil prolongada y tienen un fuerte impacto en la calidad final de los alimentos (Capuano & Fogliano, 2011). Algunas formas de procesamiento de alimentos, junto con la composición de los alimentos, facilitan el desarrollo de la reacción de Maillard (MR) (Delgado *et al.*, 2010). La principal preocupación que surge del tratamiento térmico proviene de la formación de compuestos que no están presentes de forma natural en los alimentos, pero que pueden acumularse durante el calentamiento; estos compuestos son conocidos como contaminantes neo-formados (NFC). Recientemente, dos NFC han recibido mucho interés como consecuencia de sus posibles efectos toxicológicos junto con su gran presencia en los alimentos: Acrilamida (AA) e Hidroximetilfurfural (HMF) (Masatcioglu *et al.*, 2015).

Acrilamida

La AA ($\text{CH}_2 = \text{CH-CO-NH}_2$; 2-propenamida) es un sólido cristalino incoloro e inodoro de bajo peso molecular (Pedreschi *et al.*, 2013), se ha utilizado ampliamente como agente floculante en el tratamiento del agua, como ingrediente en varias formulaciones cosméticas y como reactivo químico en la investigación en biología molecular (Xu *et al.*, 2014). La AA se detectó en ciertos alimentos ricos en carbohidratos tratados con calor como consecuencia de la reacción de Maillard (Mogol & Gökmen, 2014). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó la AA como "potencialmente carcinogénica para los humanos" (Keramat *et al.*, 2011), por sus propiedades genotóxicas y carcinogénicas y, en dosis altas, también propiedades neurotóxicas. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) informó que la AA se puede encontrar en muchos alimentos procesados térmicamente, incluidos productos a base de cereales, como galletas, cereales para el desayuno y pan (Van Der Fels-Klerx *et al.*, 2014).

Hidroximetilfurfural

El 5-hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldehído, HMF) es un aldehído heterocíclico de seis carbonos, que contiene grupos funcionales tanto de aldehído como de alcohol (hidroximetilo) (Kowalski *et al.*, 2013). Es un compuesto furánico que se forma como un intermedio en la reacción de Maillard (MR), y de la deshidratación directa de azúcares en condiciones ácidas (caramelización) durante los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos (Fogliano, 2014). Aunque HMF está casi ausente en alimentos frescos y no tratados, su concentración tiende a aumentar durante el calentamiento (Teixidó *et al.*, 2011), por lo que es una herramienta útil como un marcador de calidad para un amplio rango de frutas procesadas, café, miel y leche. Además, es utilizado para monitorear el proceso térmico aplicado a productos procesados a base de cereales, como el secado de pastas, horneado de pan, tostado de pan como también extrusión de cereales para bebés y cereales de desayuno (Capuano & Fogliano, 2011).

2.2.1 Efecto de neo contaminantes en la dieta

La presencia de acrilamida (AA) en los alimentos representa un problema particular de salud pública, ya que prácticamente todas las personas están expuestas en cierta medida

a través de su dieta (Xu *et al.*, 2014). Se encuentra que aproximadamente el 40% de todos los alimentos contienen AA, y hay una gran variación en los niveles de AA en los alimentos; en algunos alimentos, como café y pan de jengibre, la concentración de AA es mayor en comparación con la que se encuentra en las papas fritas (EFSA, 2012; Pedreschi *et al.*, 2013). Los niveles más altos de AA se han encontrado en papas fritas, pan y productos de panadería y café. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de AA en ciertos alimentos, tales como avellanas, almendras, aceitunas, entre otros (Anexo 2). Se ha informado de una gran variabilidad en el nivel de AA entre diferentes productos de cada categoría de alimentos, así como entre diferentes marcas del mismo producto (Capuano & Fogliano, 2011). La cantidad de ingesta dietética de AA se ve influida no solo por el nivel de AA en un alimento, sino también por la cantidad que se consume (Xu *et al.*, 2014). La diferencia en la concentración de precursores en las materias primas (asparagina libre y azúcares reductores), y la diferencia en la composición de los alimentos y en las condiciones del proceso aplicadas, puede explicar fácilmente la variabilidad observada (Capuano & Fogliano, 2011). Se sabe que la ingesta media ajustada de AA en toda Europa varió de 13 a 47 μg / día en hombres y de 12 a 39 μg / día en mujeres, respectivamente, y sobre la base de la cantidad consumida por kilogramo de peso corporal, los niños pueden estar en mayor riesgo que los adultos (Xu *et al.*, 2014). Los productos de panadería pueden contribuir al 20-60% de las ingestas medias totales de AA (Mesías & Morales, 2015).

La cantidad de HMF presente en los alimentos está directamente relacionada con la carga de calor aplicada durante el procesamiento de productos ricos en carbohidratos. Otra fuente de formación de HMF está representada por los ingredientes utilizados en la formulación, como soluciones de caramelo o miel. Las concentraciones de HMF en los alimentos pueden variar en gran medida a más de 1 g / kg en ciertos productos. Las concentraciones en algunos alimentos como frutas secas, caramelo y vinagre son extremadamente altas. En el Anexo 3 se presenta un resumen de los niveles de HMF en algunos alimentos. HMF también se puede encontrar en productos de panadería, malta, café y jugos de frutas, siendo el pan y el café los contribuyentes más importantes al consumo dietético de HMF. Las estimaciones anteriores para la ingesta de HMF variaron de 30 a 150 mg por persona (Capuano & Fogliano, 2011).

2.2.2 Toxicología y peligro potencial

La AA ha sido caracterizada como compuesto genotóxico con actividades mutagénicas y carcinógenas en múltiples órganos en animales, ya que causa mutaciones genéticas y cambios en los cromosomas, y también se ha descrito toxicidad reproductiva (Morales & Mesías, 2015). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1994) clasificó al AA como carcinógeno del Grupo 2A, y también fue clasificado como carcinógeno de Categoría 2 y mutágeno de Categoría 2 por la Unión Europea (CE, 2002). Fue incluida en la lista de sustancias de "gran preocupación" por la Agencia Europea de Química en 2010. Mientras que, en el año 2017, la Comisión Europea estableció las medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de AA en los alimentos, aplicables en el Reglamento (UE) 2017/2158.

AA es un carbonilo α , β -insaturado con reactividad electrofílica que puede interactuar con nucleófilos por la adición de Michael. Debido a que es un electrófilo, podría interactuar potencialmente con grupos nucleófilos biológicos de aminas, carboxilatos, aril y alquil hidroxilos, imidazoles y tioles. Sin embargo, debido a que el azufre posee una mayor actividad nucleofílica, la AA interactúa preferentemente con grupos tiol, tales como residuos de cisteína, que pueden desempeñar un papel significativo en los eventos biológicos subyacentes que resultan potencialmente tóxicos (Shipp *et al.*, 2006). Estudios han sido resumidos en varias revisiones extensas. Hasta el momento, los estudios epidemiológicos no sugieren una clara asociación del cáncer con la exposición alimentaria o laboral a AA (Xu *et al.*, 2014). Sin embargo, en el año 2014, la EFSA confirmó que la ingesta alimentaria de AA puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer (Morales & Mesías, 2015).

El 5-HMF es un producto heterocíclico considerado como un contaminante alimentario ubicuo, ya que se genera naturalmente en alimentos procesados térmicamente mediante reacciones de pardeamiento no enzimáticas (caramelización y la reacción de Maillard) (Pastoriza de la Cueva *et al.*, 2017). HMF tiene dos formas posibles de desarrollar efectos toxicológicos en los seres humanos. En dosis muy altas, HMF es citotóxico, causando irritación en las membranas mucosas de los ojos, tracto respiratorio superior, piel, etc. En dosis relevantes para la nutrición humana, que van de 2-30 mg por persona/día, se

concluyó que HMF no constituye un riesgo para la salud. Sin embargo, investigaciones señalan que HMF exhibe una potencial actividad genotóxica, mutagénica (Pastoriza de la Cueva *et al.*, 2017), después de la activación metabólica a 5-sulfooxymethylfurfural (SMF), induciendo cáncer de colon-recto, hepático y de piel (Teixidó *et al.*, 2011). HMF se puede convertir a SMF por medio de sulfotransferasas (SULT), que podría ser el vínculo entre HMF y la carcinogénesis: SMF es una especie química altamente electrófila que puede reaccionar con el ADN, produciendo diferentes aductos de ADN. Por lo tanto, algunos estudios indican que HMF y SMF pueden actuar como un iniciador del cáncer de colon en ratas, y la inducción de adenomas hepatocelulares en el modelo murino (Pastoriza de la Cueva *et al.*, 2017).

2.2.3 Mecanismos de formación de neo contaminantes

Se han descrito dos vías para la formación de AA en alimentos, una vía principal y una vía menor.

La principal vía para la formación de AA en los alimentos se conoce como la ruta de asparagina a través de la reacción de Maillard. En esta ruta de N-glucósidos, la asparagina se convierte en AA a través de descarboxilación térmica y desaminación, que necesariamente necesita la presencia de un compuesto de carboxilo, como un azúcar reductor. En esta ruta, la reacción entre la asparagina y un azúcar reductor produce una base de Schiff descarboxilada, N-glicosilaparadina, que conduce directamente a AA y a una imina después de la descomposición. Además, las descarboxilasas presentes en las materias primas podrían generar la amina biogénica 3-aminopropionamida (3-APA) a partir de asparagina, que luego se deamina térmicamente en AA; este proceso continúa sin involucrar la reducción de carbohidratos (Xu *et al.*, 2014). Las etapas más importantes y los intermedios de la vía principal de formación de AA se muestran en la Figura 1A.

Diversos estudios indican que la vía antes mencionada de formación de AA no es la única en los alimentos. AA se forma a partir de lípidos a través de compuestos de tres carbonos (ácido acrílico) producidos a partir de lípidos a temperaturas elevadas. Además, pequeñas moléculas (tales como acetaldehído, formaldehído) producidas al calentar monosacáridos, forman acroleína en condiciones adecuadas y luego forman AA. Además, las vías de

metabolización de las proteínas y la descarboxilación del ácido orgánico (ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico) también generan acroleína y ácido acrílico, dando como resultado la formación de AA. Sin embargo, la AA formada por esta vía puede ser marginal, debido a que los compuestos de carbonilo, como los azúcares reductores, son más activos que la asparagina (Xu *et al.*, 2014). Los pasos importantes e intermedios de esta vía de formación menor de AA se muestran en la Figura 1B.

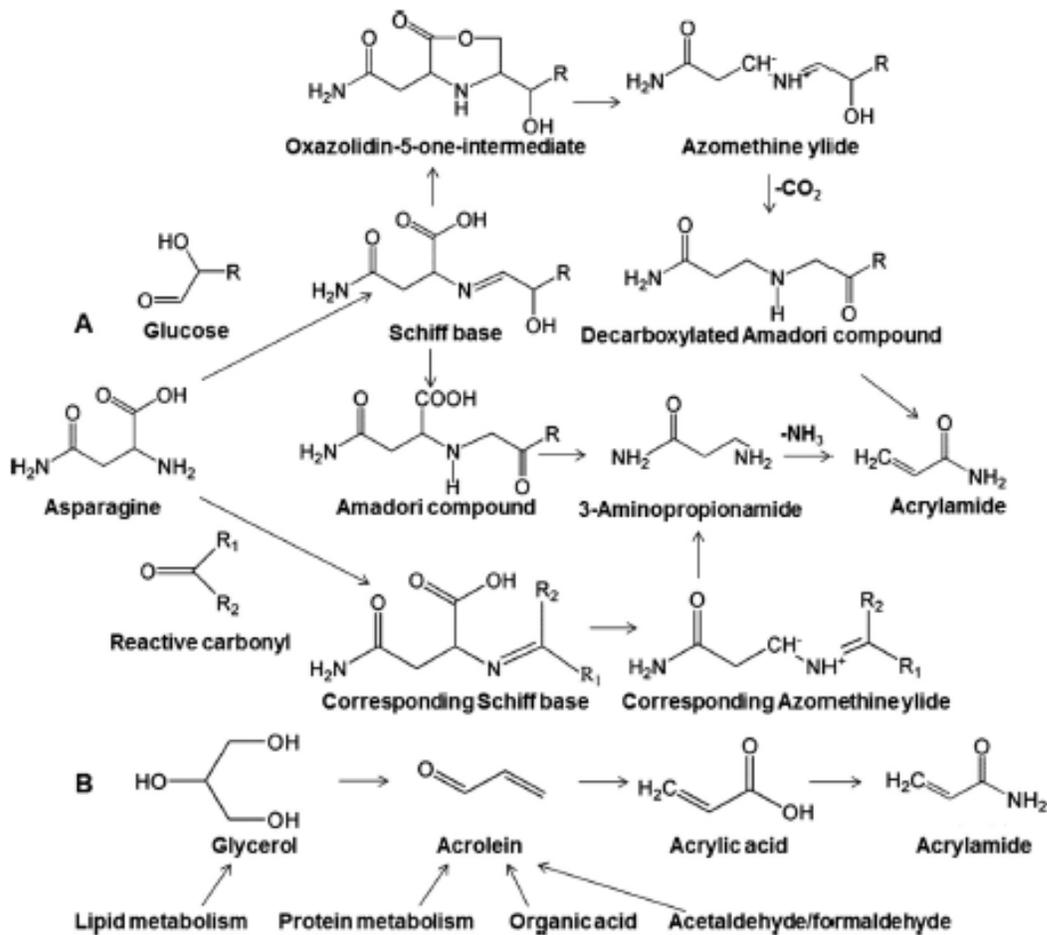


Figura 1. Vías para la formación de AA en los alimentos. (A) Vía principal de formación de AA. (B) Vía menor de formación de AA.

Existen dos vías principales de formación de HMF en los alimentos, las cuales son deshidratación de azúcares en condiciones ácidas (caramelización) y la reacción de Maillard, durante el tratamiento térmico aplicado a alimentos.

HMF es un intermediario en la reacción de Maillard, que se produce cuando se reducen los restos de hexosa se calientan en presencia de aminoácidos o proteínas. En el primer paso de esta compleja cadena de reacciones, se forma un producto estable de Amadori (1-amino-desoxicetosa). La reacción se detiene en este paso si las condiciones de reacción no son apropiadas o la entrada de calor no es lo suficientemente severa. Sin embargo, si las condiciones térmicas son apropiadas, los compuestos incoloros de Amadori se degradarán a los productos de reacción de Maillard, que participan en la generación de aroma, color y formación de melanoidinas (Gökmen & Morales, 2014). Por otro lado, la desoxioosona es conocida como un intermediario clave en la formación de HMF, la cual deriva de la enolización 1,2 y la deshidratación de glucosa o fructosa. Posteriormente, la deshidratación y ciclación de 3-desoxioosona produce 5-HMF (Capuano & Fogliano, 2011). HMF también se forma a partir de la deshidratación del azúcar en condiciones ácidas. La caramelización requiere una mayor energía de activación y, posteriormente, temperaturas más altas que la reacción de Maillard (Gökmen & Morales, 2014). En condiciones secas y pirolíticas, se ha propuesto una ruta alternativa a la formación de HMF a partir de fructosa y sacarosa. Implica la formación de un catión de fructofuranosilo altamente reactivo que puede convertirse efectiva y directamente a HMF. Además de la temperatura, la tasa de formación de HMF en los alimentos depende del tipo de azúcar, del pH, de la actividad del agua y la concentración de cationes divalentes de los medios (Capuano & Fogliano, 2011). La Figura 2 representa las vías principales para la formación de HMF en los alimentos.

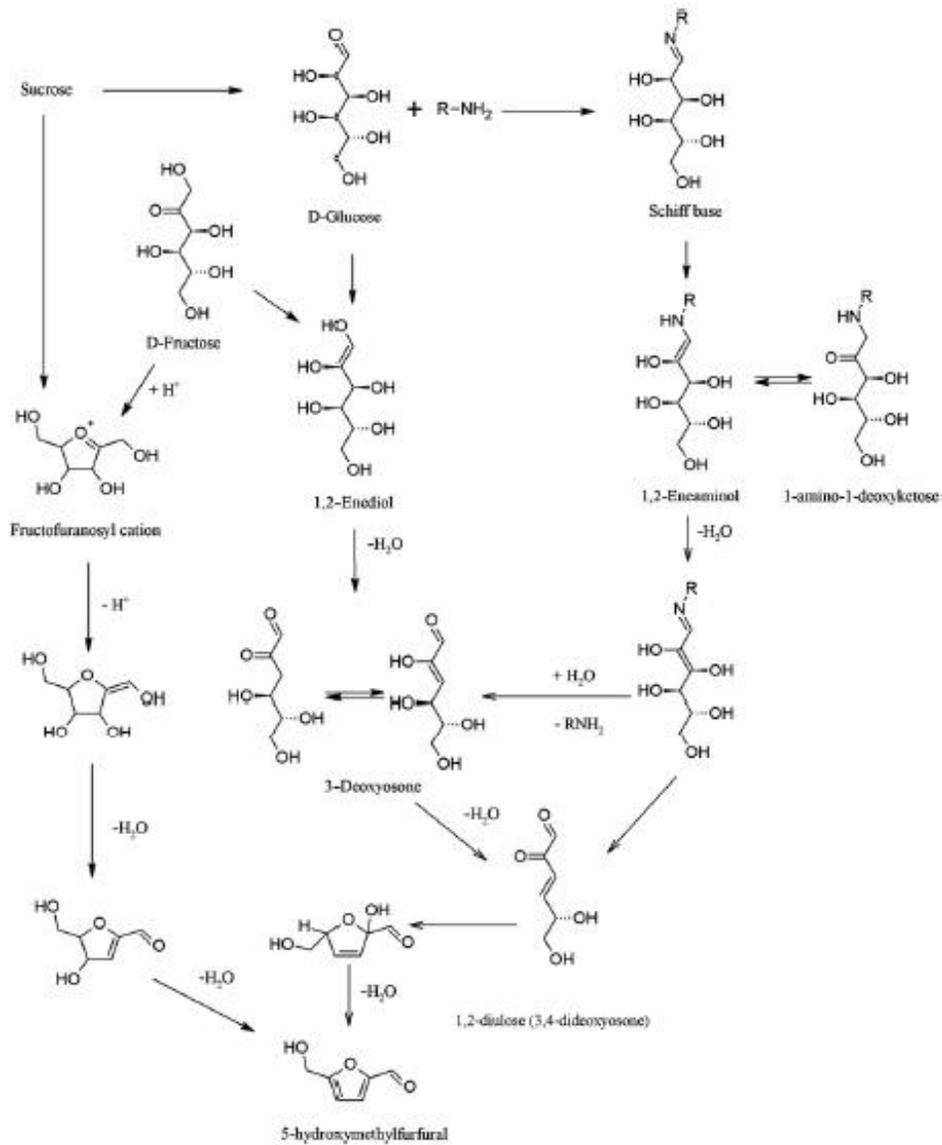


Figura 2. Esquema de reacción propuesto para la formación de 5-HMF.

2.2.4 Tecnologías de mitigación de neo-contaminantes

La formación de AA se ve afectada por la concentración de precursores, el pH, el contenido de agua y la actividad, el estado físico de los alimentos y la temperatura y el tiempo del proceso. Las estrategias de mitigación proponen modificar las formulaciones del producto o las condiciones de procesamiento. Entre éstas, el uso de asparaginasa, la eliminación de azúcares reductores, la sustitución del bicarbonato de amonio por agentes de fermentación alternativos, la adición de aminoácidos o hidrolizados de proteínas, la adición de calcio y la reducción de la temperatura de cocción son las aplicaciones más destacadas de los productos de panadería (Mogol & Gökmen, 2014).

El uso de antioxidantes se ha propuesto como una estrategia para mitigar la formación de AA. El efecto polifenólico sobre la formación de AA depende de la estructura química, concentración, capacidad antioxidante y las condiciones de reacción. Pedreschi *et al.* (2018) estudiaron la adición del extracto de vaina de tara al pan hallulla. Sus resultados indicaron que cuanto mayor sea la concentración del extracto adicionado, mayor será la reducción en la formación de AA en hallullas después de la cocción, lo cual podría atribuirse a la capacidad de los polifenoles de tara de reaccionar con los precursores de AA, los compuestos intermedios de la reacción o con AA directamente (Pedreschi *et al.*, 2018). Del mismo modo, Zhang *et al.* (2007) utilizaron extractos antioxidantes de hojas de bambú y de té verde en sistemas modelo para modelar la reacción de Maillard. Sus resultados sugieren que la formación de AA no solo está condicionada por el tipo de antioxidante sino también por la concentración (Zhang & Jin, 2013; Zhang *et al.*, 2007).

Hasta ahora no hay estrategias de mitigación disponibles específicamente dirigidas a reducir el contenido de HMF en los alimentos. El objetivo es desafiante, debido a la naturaleza de sus precursores y vías de formación. Como la formación de HMF está relacionada a la formación del color y sabor de los alimentos calentados, es muy difícil mitigar su formación sin comprometer la aceptabilidad sensorial de los alimentos. HMF se forma a través de la reacción de Maillard y la caramelización, que en su mayoría contribuyen al color deseado, el sabor y el aroma de los alimentos calientes. Desafortunadamente, la formación de HMF sigue las mismas vías que conducen a compuestos marrones y de sabor. Capuano *et al.* (2008 y 2009) reportaron una alta

correlación entre el contenido de HMF y el desarrollo de pardeamiento, de manera que el modelamiento del perfil de tiempo-temperatura reduzca los tiempos de calentamiento y/o temperaturas, provocando una mayor probabilidad que se reduzca la concentración de HMF en el mismo tiempo. Lo mismo ocurre cuando se aplican estrategias de mitigación basadas en cambios en las recetas, por ejemplo, reemplazando azúcares reductores con azúcares no reductores o polialcoholes. El efecto del pH de la masa sobre la formación de HMF también se ha informado (Capuano & Fogliano, 2011). Generalmente, el aumento del pH de la masa da como resultado un nivel disminuido de HMF en productos de panadería (Gökmen & Senyuva, 2007a).

El mismo estudio realizado por Pedreschi *et al.* (2018) para AA, informó que la formación de HMF en hallullas disminuyó a medida que se incrementó el extracto de concentración de polifenol añadido.

2.3 Tara (*Caesalpinia spinosa*)

Tara (*Caesalpinia spinosa*) es un árbol leguminoso que pertenece a la familia *Caesalpinaceae*. Es una especie nativa de América del Sur, la cual está ampliamente distribuida entre 4° y 32° latitud sur, cubriendo desde la región de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, hasta el norte de Chile; desde la provincia de Arica (I Región) hasta el sur de la IV Región (Anexo 4). Tara es un árbol pequeño de 2 a 3 m de altura. Sus flores son de color amarillo rojizo y están dispuestas en grupos de 8 a 15 cm de longitud. Sus frutos son vainas anaranjadas, alargadas, planas, oblongas, de 8 a 10 cm de largo y aproximadamente 2 cm de ancho, que contienen de 4 a 7 semillas redondeadas (De La Cruz, 2004).

El fruto de la tara se compone principalmente de semillas y vainas, las semillas representan un 32-38% (p/p) de la fruta, mientras que las vainas (sin semillas) representan aproximadamente el 65% (p/p) (Aouf *et al.*, 2014). Las vainas concentran un alto contenido de tanino (~40-60% (p/p)), por lo que son una buena fuente para producir ácido tánico, galotánico y gálico. Las vainas de tara sin semillas se muelen y se utilizan como materia prima para la extracción de estos compuestos, los cuales tienen aplicaciones en cosméticos, medicina, en industria farmacéutica y en alimentos (De la Cruz, 2004).

Además, se ha informado que sus extractos tienen actividades antimicrobianas y antitumorales (Chanwitheesuk *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2006).

2.3.1 Taninos

El árbol Tara se consideraba tradicionalmente la segunda materia prima de taninos después de *Schinopsis balansae* (Sánchez *et al.*, 2011). Los taninos se encuentran en una variedad de plantas que se utilizan como alimentos y forraje, incluyendo granos (sorgo, frijoles secos, arvejas y otras leguminosas), frutas (manzanas, bananas, moras, uvas, duraznos, peras y ciruelas), fruitivos (té, café, cacao), vinos (tintos), entre otros (Marcano & Masahisa, 2002; Aouf *et al.*, 2014). Así también es usado ampliamente en la industria de la curtiduría, por sus propiedades astringentes y su color muy claro (Aouf *et al.*, 2014).

Los taninos vegetales son productos naturales de peso molecular relativamente alto, que tienen la capacidad de formar complejos con carbohidratos y proteínas. Se clasifican como taninos condensados e hidrolizables (Garro Gálvez *et al.*, 1997).

Los taninos hidrolizables contienen un núcleo central de alcohol polihídrico como la glucosa, y los grupos hidroxilo, que están esterificados parcial o totalmente por ácido gálico (galotaninos) o ácido hexahidroxidifénico (elagitaninos) (Terán-Hilares *et al.*, 2017). Los taninos hidrolizables se hidrolizan fácilmente por ácidos, álcalis o enzimas (tanases) en un azúcar o un alcohol polihídrico (poliol) relacionado y un ácido carboxílico fenólico (Hagerman, 1998). Dependiendo de la naturaleza del ácido carboxílico fenólico, los taninos hidrolizables se subdividen en galotaninos y elagitaninos. La hidrólisis de los galotaninos produce ácido gálico, mientras que la hidrólisis de los elagitaninos produce ácido hexahidroxidifénico que se aísla como ácido elágico (Hagerman, 1998) (Anexo 5).

Los taninos condensados, también llamados proantocianidinas, son poliflavonoides que consisten en cadenas de unidades de flavan-3-ol. La clase más común de proantocianidinas son las procianidinas, las que consisten de cadenas de catequina y/o epicatequina unidas por enlaces 4→6 o 4→8. Por el contrario de los taninos hidrolizables, los taninos condensados sufren una polimerización a la forma amorfa de flobafenos o taninos rojos, bajo la acción de ácidos (Garro Gálvez *et al.*, 1997).

Aunque la composición de vaina de tara todavía no se ha establecido claramente, sus propiedades beneficiosas se han atribuido principalmente a la presencia de taninos hidrolizables. Entre ellos, el ácido tánico que forma 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). Además, limpia los radicales libres dentro del cuerpo al neutralizarlos antes de que ocurra daño celular (Hagerman, 1998).

2.4 Altas presiones hidrostáticas (APH)

La tecnología de alta presión se estudió por primera vez en 1914 como una tecnología no térmica emergente que puede alcanzar el mismo nivel de inocuidad alimentaria que la pasteurización del calor, y puede satisfacer los requisitos del consumidor para un sabor más fresco y alimentos mínimamente procesados. La aplicación de alta presión puede inactivar patógenos y enzimas, y modificar estructuras con poco o ningún efecto sobre los aspectos nutricionales y de calidad sensorial de los alimentos (Rastogi *et al.*, 2007). Este tipo de tratamiento utiliza una presión hidráulica súper alta isostática fría que varía de 100 a 800 MPa o más (Centro de Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. [USFDAC], 2011); las presiones utilizadas son casi diez veces mayores que en los océanos más profundos de la Tierra (Rastogi, 2013). El trabajo de compresión realizado durante el tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) aumentará la temperatura del biomaterial de empaque a través del calentamiento adiabático aproximadamente 3 °C por 100 MPa, dependiendo de la composición del biomaterial (US FDA, 2000). El biomaterial se enfría a su temperatura original durante la descompresión, no pierde ni gana calor de las paredes del recipiente a presión durante el tiempo de mantenimiento a presión (US FDA, 2000).

El tratamiento de alta presión se basa en dos principios fundamentales: el principio Le Chatelier, que propone que la presión favorece todas las reacciones estructurales y los cambios que implican una disminución del volumen; y el principio isostático, que propone que la distribución de presión es proporcional en todas las partes de un producto alimenticio, independientemente de su forma y tamaño (Fragoso *et al.*, 2011; Barba *et al.*, 2012).

Esta tecnología también puede utilizarse eficazmente para extraer ingredientes activos de materiales vegetales. Esto puede ser muy útil para obtener estos compuestos fácilmente y usarlos para desarrollar productos alimenticios más saludables para los consumidores. Las altas presiones ya se han utilizado con éxito para extraer diversos compuestos funcionales como: el licopeno de la pasta de tomate; antocianinas de la piel de la uva; pectina de cáscara de naranja; ginsenósidos de *Panax ginseng*; y polifenoles de la hoja de té verde (Huang *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la aplicación de APH mejora eficazmente la baja tasa de extracción, mejora la calidad y la concentración de componentes activos obtenidos al comparar con técnicas de extracción tradicionales. APH puede aumentar la velocidad de transferencia de masa cambiando el gradiente de concentración y la difusividad, causando daño a la membrana de la célula vegetal y aumentando su permeabilidad, mejorando la penetración del solvente de extracción en las células. Esto se traduce en un menor tiempo de procesamiento, reducción en los costos, mejora en la seguridad del procesamiento y logro de mayores rendimientos compuestos (Xi *et al.*, 2011a). Estudios revelan que el uso de altas presiones aumenta el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en matrices alimentarias. Ferrari *et al.* (2010) informaron que la aplicación a un nivel de presión de 400 MPa aumenta el contenido total de polifenoles en jugo de granada; una tendencia similar ocurrió en purés de fresa tratados a 600 MPa, que aumentó significativamente en comparación con respecto al puré sin procesar (Patras *et al.*, 2009). Así también, Varela *et al.* (2012) encontraron diferencias significativas en jugo de granada entre las capacidades antioxidantes obtenidas para la muestra de control y las muestras tratadas con alta presión hidrostática a 450 y 550 MPa.

La estructura celular vegetal, en casos normales, está ordenada, completa y compacta, con organelos intracelulares claros, como se muestra en la Figura 3A. La presión dentro de las células disminuye rápidamente desde la presión ultra alta preestablecida hasta la presión atmosférica, alterando los enlaces no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas que controlan la estructura polimérica. Esto hace que las células se expandan, y el fluido impacte fuertemente contra la pared celular, membrana celular, membrana plasmática, membrana nuclear, vacuola y

microtúbulos, lo que produce una deformación significativa y daño a la membrana, y un aumento posterior en la permeabilidad y disminución de la resistencia a la difusión y permeación (Figura 3B).

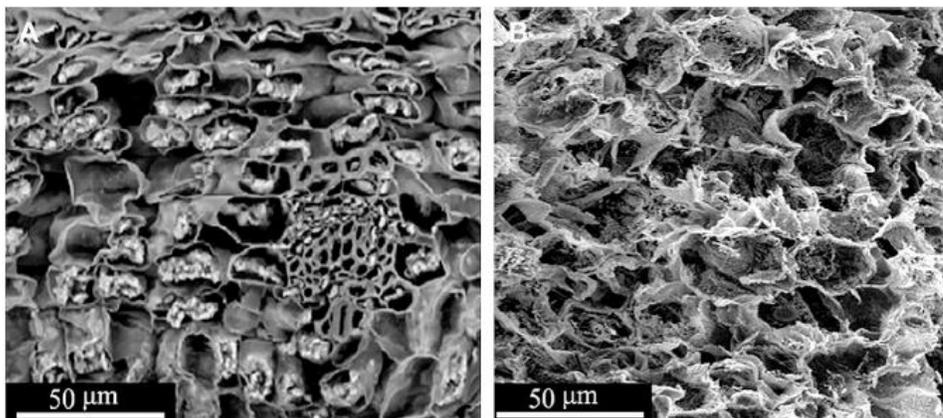


Figura 3. Micrografías electrónicas de hojas de té verde. A: hojas sin tratar; B: hojas después de la extracción a altas presiones hidrostáticas (presión de 400 MPa durante 15 minutos) (Xi *et al.*, 2011a)

3. HIPOTESIS

El extracto de polifenoles obtenido de Tara (*Caesalpinia spinosa*) mediante altas presiones hidrostáticas presenta mayores propiedades antioxidantes en comparación a un extracto obtenido convencionalmente, siendo capaz de mitigar el contenido de neocontaminantes en un producto horneado manteniendo su calidad sensorial.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar un extracto hidrolizado de Tara (*Caesalpinia spinosa*) obtenido mediante altas presiones hidrostáticas y estudiar su incorporación a un producto horneado (queque) con el fin de mitigar el contenido de neocontaminantes, manteniendo su calidad sensorial.

4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar y optimizar la extracción de compuestos fenólicos presentes en Tara (*Caesalpinia spinosa*) utilizando Altas Presiones Hidrostáticas.
2. Analizar el efecto del extracto sobre el contenido de neocontaminantes en el producto horneado (queque).
3. Determinar el efecto de la adición de compuestos fenólicos en la aceptabilidad sensorial del producto horneado (queque) mediante un estudio con consumidores.

5. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 Materiales

5.1.1 Materias Primas

Muestras de tara (*Caesalpinia Spinosa*)

Los frutos de la tara (*Caesalpinia spinosa*) fueron obtenidos mediante una donación hecha por la Corporación Nacional Forestal (Conaf) La Ligua; cosechados en mayo del 2018 en el Parque Urbano Natural de La Ligua, Región de Valparaíso.

Materias primas utilizadas en la preparación de producto horneado

Para la preparación de queque se utilizan ingredientes obtenidos de locales comerciales, las materias primas fueron: harina sin polvos de hornear marca Selecta, huevos de tamaño mediano marca Santa Clara, azúcar blanca granulada marca Iansa, polvos de hornear marca Royal y agua potable.

5.1.2 Reactivos químicos

Reactivos sólidos: carbonato de sodio anhidro p.a. (Merck S.A.), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma Aldrich), acetato de sodio trihidratado (Merck S.A.), cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a. (Merck S.A.), TPZ 2, 4, 6-tri (2-piridil)-1,3,5-triacina (Merck S.A.), TROLOX (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; Sigma Aldrich), permanganato de potasio (Merck S.A.), índigo carmín para análisis (Merck S.A.), fluoresceína (Sigma Aldrich), AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida); Sigma Aldrich), fosfato monoácido de sodio (Sigma Aldrich), fosfato diácido de sodio (Sigma Aldrich), ácido gálico 97,5 – 105,5%, (Sigma Aldrich), ferrocianuro potásico trihidratado (Merck S.A.) y sulfato de zinc heptahidratado (Merck S.A.).

Reactivos líquidos: etanol 96% (Merck S.A.), agua destilada (Heyn y Cía. Ltda.), reactivo de fenol de Folin – Ciocalteu (Merck S.A.), metanol grado analítico (Merck S.A.), metanol

grado HPLC (Merck S.A.), ácido acético glacial (100%) anhidro p.a. (Merck S.A.), agua ultra pura (Mili Q) (Merck S.A.), ácido clorhídrico fumante 37% p.a. (Merck S.A.), ácido sulfúrico 95-97% (Merck S.A.), formaldehído al 37% (Merck S.A.), acetonitrilo grado HPLC (Merck S.A.), n-hexano grado HPLC (Merck S.A.), acrilamida 99.9% calidad especial para electroforesis para biología molecular (Merck S.A.), acrilamida d-3 (Sigma Aldrich), ácido acético glacial (Merck S.A.) y acetonitrilo grado de gradiente para cromatografía líquida (Merck S.A.).

5.1.3 Insumos

Material de vidrio: probeta 100 mL, matraz aforado 10 mL, tubo de ensayo, vaso precipitado 500 mL, frasco de vidrio graduado con tapa (100 mL y 1 L), termómetro, pipeta graduada 5 mL, matraz de balón de base plana esmerilado 250 mL, matraz Kitasato, pipeta volumétrica (10 y 20 mL), matraz Erlenmeyer 250 mL, embudo de vidrio, matraz aforado 1 L, embudo Büchner, tubo Refrigerante Allihn, adaptador de vidrio para conectar matraz de balón con tubo refrigerante, Bureta 50 mL, placa de Petri y matraz aforado ámbar 10 mL.

Otros materiales: bolsas de polietileno de alta densidad, espátula metálica, micropipetas (0 – 20, 30, 100, 500, 1000 y 5000 μ L), cubeta de cuarzo para espectrofotómetro, pipeta pasteur, tubo falcon (15 y 50 mL), papel aluminio, guantes de látex, Barra agitadora magnética, gradilla, mortero, soporte universal, pinza de doble nuez, papel filtro Sartorius (Grado: 292), microplacas de poliestireno con 96 pocillos, tubos eppendorf ámbar 1 mL, micropipeta multicanal Rainin, pinzas de crisol, cartridge liCholult RP- 18 (40-63 μ m) 500 mg 3 mL Standard (Merck S.A.), filtros de jeringa 0.2 μ m (Merck S.A.), jeringas de plástico desechable de 3 mL con aguja (NIPRO), viales 2 mL, molde de acero inoxidable de 7 centímetros de diámetro y moldes para queques individuales.

5.1.4 Equipos e instrumentos

- Desecador
- Agitador magnético con placa calefactora ARE, VELP Scientifica.
- Agitador Reax top, Heidolph
- Balanza analítica GR-200, A&D Company
- Balanza granataria NX4100, AND
- Batidora eléctrica 5K45SS, KitchenAid
- Centrifuga MIKRO 220R, Hettich
- Columna Thermo, Acclaim™ 120, C18 5 µm, 120 Å 4.6x 150 mm
- Equipo Dionex Ultimate 3000 pump, UHPLC + Focused, Thermo.
- Espectrofotómetro UV-1601, Rayleigh
- Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 25
- Balanza analítica Radwag AS 220.R2 PLUS
- Sonicador Elmasonic P 60 H - Elma Schmidbauer GmbH
- Peachímetro Jenway 3510
- Placa calefactora agitadora Nuova SP18420-26
- Estufa de aire forzado FD-115, Binder
- Horno eléctrico por convección 43 DX UMI, Garbino
- Micropipetas Biohit Proline Plus
- Micropipeta AHN pipet4u® pro
- Refrigerador FTC 90E, VELP Scientifica
- Congelador Bosch GSV34V43/220/50
- Refrigerador FTC 90E Velp Scientifica
- Rotavapor Hei-VAP Advantage, Heidolph
- Sistema de Cromatografía Líquida HPLC DIONEX modelo ULTIMATE 3000 con bomba gradiente cuaternaria LPG-3400SD, autosampler con compartimento para columna ACC-3000, detector de arreglo de diodos modelo DAD-3000 y detector de índice de refracción modelo RefractoMax 521, Thermo Fischer Scientific
- Sistema de vacío wr 2c nt + ak + ek, Vacuubrand
- Tamiz de ensayo estándar U.S.A., W.S. Tyler (Opening 0,5 mm)
- Selladora de impulsos, Ritempo

- Cutter SK – 3, Sammic S.L
- Molino de cuchillas SK100/C rostfrei. Retsch
- Equipo de Altas Presiones Hidrostáticas (Averu Technologies Incorporated)
- Balanza de análisis de humedad MS-70. Arquimed
- Manto calefactor Fisatom Potencia 200 W
- Campana (Lab-Tec Ltda.)
- Multilector de microplacas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc.

6. METODOLOGÍA

6.1 Extracción de polifenoles por altas presiones hidrostáticas

6.1.1 Obtención del polvo de vainas de tara

Las vainas de tara fueron limpiadas y seleccionadas manualmente de acuerdo a la coloración de las vainas y a los defectos de calidad que pudiesen presentar (hongos, picaduras y quemaduras exteriores). Posteriormente, las vainas fueron separadas de las semillas, trituradas manualmente y a través de un cutter para disminuir su tamaño, luego molidas en un molino de cuchillas, y finalmente el polvo obtenido se tamizó y se reservó para la extracción con un tamaño de partícula de 0,5 mm. En la Figura 4, se aprecia el estado de las vainas de tara durante el proceso de trituración para la obtención del polvo.



Figura 4. Estado de las vainas de tara en proceso de trituración: (A) Fruto de la tara completa, (B) Vainas de tara trituradas manualmente + cutter y (C) Polvo de vainas de tara triturado en molino de cuchillas.

6.1.2 Diseño experimental

Para la extracción de taninos presentes en Tara (*Caesalpinia spinosa*) por altas presiones hidrostáticas se utilizó un diseño de experimental Box- Behnken. El diseño se compone de 27 experimentos (24 puntos y 3 puntos centrales). Las variables independientes fueron la presión utilizada en el equipo (MPa), el tiempo de extracción (minutos), el porcentaje de etanol como solvente y la proporción de la cantidad de tara y volumen de solvente. Las variables respuesta correspondieron al rendimiento de extracción, polifenoles totales, capacidad antioxidante: DPPH, FRAP y ORAC, taninos hidrolizables y taninos condensados. En el anexo 6 se puede apreciar el diseño experimental anteriormente descrito, además, en la tabla 1, se presentan los valores de los niveles para las variables independientes del diseño estadístico recién presentado.

Tabla 1. Variables independiente y niveles del diseño experimental Box-Behnken para la extracción de polifenoles de polvo de vainas de tara.

Variab Independientes	Parámetros	Niveles
Presión (Mpa)	150	-1
	250	0
	350	+1
Tiempo (min)	20	-1
	30	0
	40	+1
Solvente (%etanol, %v/v)	20	-1
	50	0
	80	+1
Masa de Vaina tara/volumen de solvente	1/10	-1
	1/20	0
	1/30	+1

6.1.3 Obtención del extracto polifenólico

Para la extracción, se prepararon las soluciones de acuerdo con el diseño experimental. El polvo de vaina de tara se disolvió en etanol (96%) y agua en las proporciones correspondientes, la solución resultante se envasó en una bolsa de polietileno de alta densidad, se cerró de forma hermética y finalmente fue introducida en el equipo de altas presiones; el equipo operó a 15 °C y tiene una capacidad de 2 litros. Las muestras presurizadas se almacenaron en un congelador a -20 °C. Para la obtención del extracto en polvo, se descongelaron las muestras y se eliminó la fibra remanente mediante una filtración al vacío y luego el resto de la solución se secó al vacío en un rotavapor a 45 °C. El extracto seco se molió para homogenizar su tamaño de partícula.

6.2 Caracterización química del extracto polifenólico

Se caracterizó químicamente cada corrida experimental en triplicado del extracto seco obtenido para las siete variables respuesta del diseño experimental. Para el análisis de los resultados, se aplicó la Prueba de la Falta de Ajuste en cada respuesta con el fin de determinar si el modelo es adecuado y puede describir los valores observados; para que los datos se ajusten al modelo, la falta de ajuste debe tener un valor-P mayor que 0,05 a un nivel de confianza del 95%, esto definirá que respuesta será parte de la optimización conjunta. Finalmente, se eliminaron los factores que no tienen un efecto significativo con el fin de obtener un coeficiente de determinación ajustado hasta que el modelo no pierda su capacidad predictiva.

6.2.1 Rendimiento de extracción

Para la determinación de rendimiento se debió tomar en cuenta el peso de las vainas de tara molidas y el peso final del extracto seco. El cálculo de rendimiento se realizó en duplicado y se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso final extracto seco}}{\text{Peso inicial vainas de tara}} \times 100$$

6.2.2 Polifenoles totales: Folin – Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza para la medición del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en el cambio de color que se produce por la reacción de los grupos hidroxilo libres con el reactivo de Folin-Ciocalteu en condiciones alcalinas utilizando carbonato de sodio (Na_2CO_3). Este compuesto permite la transferencia de electrones de los compuestos fenólicos a los complejos de ácido fosfomolibdico / fosfotúngstico, que están presentes en el reactivo de Folin añadido, dando lugar a una coloración azul susceptible que es determinada espectrofotométricamente a 765 nm (Galili y Hovav, 2014; Dai & Mumper, 2010) (Anexo 7).

6.2.3 Capacidad antioxidante: DPPH

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo ($\text{DPPH}\cdot$) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, el cual le otorga un color violeta caracterizado por una banda de absorción en solución metanólica a 517 nm (Deng *et al.*, 2011). Cuando la solución de $\text{DPPH}\cdot$ reacciona con el sustrato antioxidante, éste es capaz de donar un átomo de hidrógeno, produciéndose la forma reducida del DPPH junto con la pérdida de color, y por tanto la pérdida de absorbancia (Muñoz *et al.*, 2007) (Figura 5). De esta manera, la capacidad antioxidante que tienen las muestras se cuantifica midiendo el grado de decoloración que éstas provocan en una solución metanólica.

La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de $\text{DPPH}\cdot$ al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de decoloración contra la concentración del extracto. (Deng *et al.*, 2011) (Anexo 8).

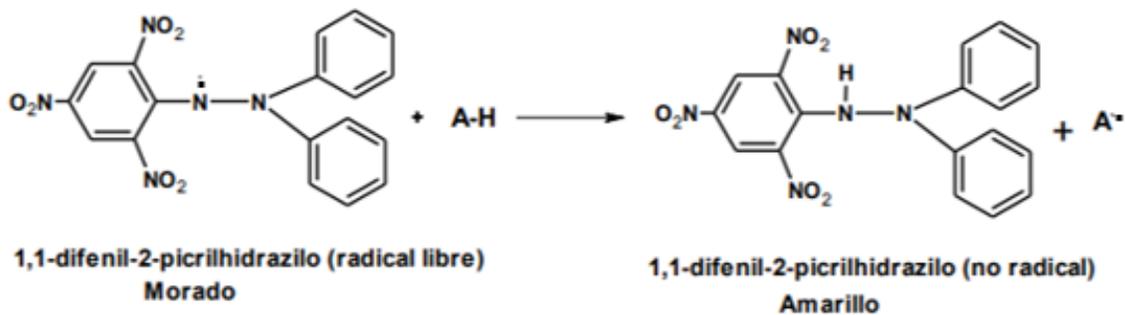


Figura 5. Reacción entre molécula de DPPH• y un antioxidante (Alam *et al.*, 2012)

6.2.4 Capacidad antioxidante: FRAP

Este método se basa en la reacción que mide la reducción del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico (Fe^{3+} - TPTZ) se reduce a ion ferroso (Fe^{2+} - TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm (Figura 6). Este ensayo considera la actividad antioxidante de una muestra como una medida de su capacidad reductora del Fe^{3+} , este cambio es controlado mediante la absorción medida a 593 nm en un espectrofotómetro (Benzie y Strain, 1996) (Anexo 9).

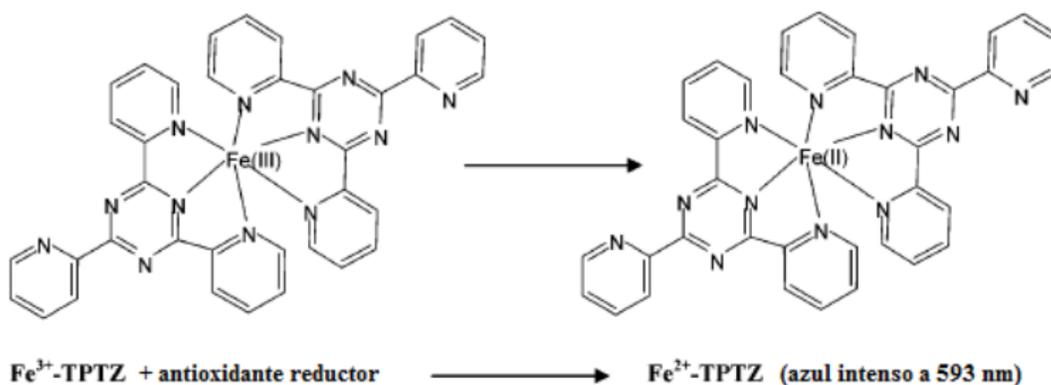


Figura 6. Reacción de reducción del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina al complejo ferroso-tripiridiltriiazina (Prior *et al.*, 2005)

6.2.5 Capacidad antioxidante: ORAC – FL

Este método mide la degradación oxidativa de la molécula de fluoresceína, después de interactuar con el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) generado térmicamente a partir de AAPH ((2,2'-Azo-bis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro) (Ou *et al.*, 2001). En presencia de un antioxidante, los $\text{ROO}\cdot$ captan preferiblemente un átomo de hidrógeno de éste, de forma que se disminuye dicha pérdida de fluorescencia. El método ORAC mide por tanto el retraso, en presencia de compuestos antioxidantes, de la disminución de la fluorescencia debida a la acción de radicales peroxilo, lo que permite cuantificar la capacidad antioxidante a través del área bajo la curva de la cinética de descenso de la fluoresceína en la muestra, en comparación con un blanco exento de sustancia antioxidante (Prior *et al.*, 2005) (Anexo 10).

6.2.6 Taninos hidrolizables

El método de cuantificación de taninos hidrolizables está basado en la oxidación de los taninos por acción de permanganato de potasio (KMnO_4), en presencia del añil sulfonado (índigo de carmín), sirviendo éste como indicador y como regulador de la reacción (Carretero, 2000). El color del punto final de la titulación se debe a la formación de un complejo entre los taninos y el permanganato de potasio. Un ejemplo es la reacción entre el ácido gálico y el permanganato de potasio que da como resultado la formación del complejo $\text{K}_4[\text{Mn}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, de color marrón rojizo. Del mismo modo, los otros taninos también forman complejos con permanganato de potasio. Esto finalmente da lugar a la formación de un color amarillo dorado (Mukherjee, 2019) (Anexo 11).

6.2.7 Taninos condensados

Para la cuantificación de taninos condensados se utilizó el método de Stiasny, el cual mide la cantidad de compuestos flavonoles presentes en una muestra (Rosales *et al.*, 2003), cuya reacción consiste en la interacción de los compuestos poliflavonoides o taninos condensados con formaldehído en medio ácido, esta reacción tiene como producto de condensación un sólido polimérico, siendo el valor de Stiasny directamente proporcional a la concentración de dichos compuestos en un extracto (Torres *et al.*, 2014) (Anexo 12).

6.3 Optimización del extracto polifenólico

Para la optimización de los resultados obtenidos en cada una de las respuestas, se ingresaron los datos al diseño experimental creado previamente en el programa estadístico StatGraphics Centurion XVI.I y se analizaron a través de la opción “*Procedimientos DOE heredados*” para la optimización de múltiples respuestas. Se analizó el diseño experimental considerando las respuestas que no presentaron falta de ajuste, donde se definió una función de deseabilidad para cada una de las variables respuesta y, a partir de sus medias geométricas obtener una deseabilidad global (Maran *et al.*, 2013). La función de deseabilidad se estima entre los valores 0 y 1, si la deseabilidad es cercana a 1 significa que la respuesta estimada alcanza su máximo valor deseable u óptimo, en cambio si la deseabilidad es cercana a 0, la respuesta toma un valor no deseado o no ideal (Raissi & Farsani, 2009). Se maximizó la optimización para cada respuesta escogida, con un nivel de impacto 3 de las respuestas sobre el modelo. La validación de las condiciones óptimas de las variables respuestas seleccionadas se llevó a cabo en quintuplicado mediante las metodologías correspondientes.

6.4 Comparación del extracto óptimo con extracto sólido – líquido

Para la determinación del extracto sólido – líquido previamente escogido por Pedreschi *et al.*, 2018, se utilizó la metodología descrita por Bravo (2010). Para la extracción de polifenoles de las vainas de tara se empleó una relación materia prima – solvente 1:60 (p/v), el extracto obtenido se secó a 60 °C en condiciones de vacío (Anexo 13). Estas condiciones permitieron un mayor contenido de polifenoles totales (mg EAG/g) y un secado más rápido sin afectar significativamente la capacidad antioxidante del extracto.

El extracto polifenólico obtenido por la extracción descrita y el extracto óptimo obtenido por altas presiones hidrostáticas se compararon con las mismas variables respuestas escogidas para la optimización del diseño experimental, mediante un análisis de varianza ANOVA simple.

6.5 Elaboración de producto horneado: queque

Se realizó de acuerdo con la fórmula propuesta por Wilderjans *et al.*, 2013 con modificaciones. A continuación, se presenta la formulación en base a la harina como ingrediente principal:

Tabla 2. Formulación para elaboración de queque.

Ingredientes	Cantidad (g)
Harina	100
Azúcar	70
Huevos	75
Agua	50
Polvos de hornear	5

Para el proceso de elaboración se consideró la metodología postulada por Segundo *et al.* (2017) y Kim – Hwan *et al.* (2012) modificada. La mezcla final se elaboró en dos pasos, primero se mezcló solamente los huevos y el azúcar en una batidora eléctrica (Kitchen Aid 5K45SS) por 3 minutos a velocidad 4, hasta lograr una espuma espesa. Por otro lado, la harina con el polvo de hornear pesados previamente se cernieron sobre la mezcla anterior, añadiéndose también la cantidad de agua correspondiente (Tabla 2); el extracto de tara se añadió según las proporciones correspondientes (Tabla 3). Se batió en conjunto por 6 minutos a velocidad 4 hasta homogenizar completamente. La mezcla final fue trasvasijada a moldes de silicona antiadherentes de tamaño regular de 3 cm de alto y 7 cm de diámetro, se añadió 120 g aproximadamente de mezcla en cada molde llenando las tres cuartas partes de éste. Los moldes se colocaron en una bandeja de aluminio en lugares predeterminados y se hornearon en un horno eléctrico a 190 °C por 30 minutos (Anexo 14). Finalmente, las muestras se dejaron enfriar completamente a temperatura ambiente para la medición inmediata de AA e HMF, y en el caso de la evaluación sensorial se envasó cada muestra en bolsas de papel y luego éstas en una caja de cartón para ser utilizadas al día siguiente.

6.6 Determinación de neo - contaminantes en queque

Se determinó el contenido de AA e HMF en queque a diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara, tal como lo indica la tabla 3; todas las muestras se elaboraron bajo las mismas condiciones. Las cantidades de extracto tara añadido se establecieron previamente según Li *et al.*, 2012 y mediante pruebas experimentales.

Tabla 3. Formulación para elaboración de queque con diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara.

Ingredientes (g)	Control	Muestra 1 (250 mg/kg) *	Muestra 2 (500 mg/kg) *	Muestra 3 (1000 mg/kg) *	Muestra 4 (1500 mg/kg) *	Muestra 5 (2000 mg/kg) *
Harina	100	100	100	100	100	100
Extracto tara	0	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2
Huevos	75	75	75	75	75	75
Azúcar	70	70	70	70	70	70
Agua	50	50	50	50	50	50
Polvos de hornear	5	5	5	5	5	5

*Concentración de extracto de vainas de tara (mg/kg) añadida en base al contenido de harina

6.6.1 Determinación del contenido de acrilamida

a) Preparación de la solución de trabajo estándar interno (SI)

Se disolvieron 400 µL de estándar interno (SI) de acrilamida d-3 en un matraz de 10 mL, aforándose con metanol grado HPLC. La solución fue almacenada en condiciones de refrigeración a 4°C para su uso frecuente y el estándar interno en congelación a -18°C. La solución de trabajo no tiene caducidad si se mantiene refrigerada.

b) Preparación de las muestras

Las pruebas de medición de AA se realizaron en triplicado, utilizando el método desarrollado por Ciesarová *et al.* (2006) con algunas modificaciones (Anexo 15).

6.6.2 Determinación del contenido de hidroximetilfurfural

a) Preparación de la solución de las soluciones Carrez I y II

Para la solución Carrez I se diluyeron 15 g de ferrocianuro potásico trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$) en 100 ml de agua de agua destilada. Por otro lado, la preparación de Carrez II consistió en la dilución de 30 g de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) en 100 ml de agua destilada. Ambas soluciones se almacenan en refrigeración a 4 °C.

b) Preparación de las muestras

Las pruebas se realizaron en triplicado, utilizando el método descrito por Toker *et al.*, 2013 con modificaciones (Anexo 16).

6.7 Evaluación sensorial del producto horneado

6.7.1 Test de consumidores

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la medición de neo - contaminantes, se llevó a cabo un estudio con consumidores con el objetivo de evaluar y comparar las dos formulaciones con la menor concentración (250 y 500 mg/kg de producto terminado) (Tabla 3), de tal manera que se pueda predecir el comportamiento de los consumidores frente al producto horneado elaborado con extracto polifenólico. El test de consumidores se realizó de acuerdo a la norma BS ISO 11136:2014 (The British Standards Institution, 2014).

a) Lugar de evaluación

Debido a la situación sanitaria actual del país, la evaluación se desarrolló en la modalidad “En casa” de cada uno de los evaluadores (Anexo 18). Las muestras fueron preparadas con todas las medidas sanitarias correspondientes, bajo las condiciones experimentales definidas. Luego del proceso de horneado las muestras frías se envasaron en forma individual en bolsas de papel con su respectivo código, finalmente ambas muestras se embalaron junto con una botella de agua natural sin gas para neutralizar (Anexo 17a).

b) Selección de consumidores

Se contactaron y reclutaron personalmente un total de 102 participantes (51 mujeres y 51 hombres), con rango de edad entre 15 años y 70 años. Para el estudio se requirió que fueran consumidores frecuentes de queque y que no fueran alérgicos al huevo ni intolerantes al gluten, que no tuvieran una condición vegana o que presentaran síntomas de resfrío.

c) Muestras

Cada consumidor recibió dos muestras de queque en formato individual, las cuales fueron evaluadas de forma monádica y presentadas en forma randomizada en una sola sesión. Al momento de evaluar, cada encuestado debió tener a su lado un dispositivo digital conectado a internet, un vaso con el agua proporcionada, junto con un platillo y un cuchillo (Anexo 17b). La evaluación se realizó durante el mismo día de la entrega de las muestras (Anexo 18).

d) Aplicación del test sensorial

La evaluación se realizó de manera on-line mediante un formulario de Google (Anexo 19) el cual consistió en el cuestionario descrito en la tabla 4.

e) Análisis estadístico

Los resultados se analizaron en Microsoft Excel mediante estadística descriptiva, las muestras se compararon mediante un ANOVA de dos vías (muestras y jueces), utilizando el programa estadístico StatGraphics Centurion XVI.I, y para Justo Agrado las muestras se compararon mediante cálculo de comparación de frecuencias por distribución normal.

Tabla 4. Especificaciones para el cuestionario desarrollado en el estudio de consumidores para dos muestras de queque de concentración 250 y 500 mg tara/kg de producto.

Cuestionario		Especificaciones
Preguntas generales	Presentación del producto	Esquema descriptivo de sus características
	Hábitos de consumo	Preguntas relacionadas orientadas al consumo de productos de pastelería
Evaluación de las muestras	Prueba de aceptabilidad	Escala hedónica de siete puntos, desde 1 “me disgusta mucho” a 7 “me gusta mucho” para los atributos de apariencia general, color de la miga, aroma, sabor general, textura y apreciación general
	Prueba de justo agrado (JAR)	El nivel 1 indica “Mucho menos de lo que me gusta”, el nivel medio es “Justo como me gusta”, y nivel 5 que indica “Mucho más que me gusta”, cuyos atributos analizados fueron color de la miga, dureza y esponjosidad.
	Intención de compra	Escala de cinco puntos, desde el nivel 1 “definitivamente no lo compraría” al 5 “definitivamente si lo compraría”.
	Preferencia	Escoger la muestra preferida, y sí corresponde, describir el sabor o sensación distinta que la muestra escogida dejaba en boca.
Comparación con queque tradicional (teórica)	Preferencia	Si tuviera que escoger entre el queque que usted prefirió y un queque individual tradicional ¿Cuál de los dos escogería?
	Intención de compra	Si un queque tradicional cuesta en promedio \$500 ¿Estaría usted dispuesto a comprar el queque que usted prefirió, considerando sus beneficios nutricionales, si éste vale \$600?

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Caracterización química del extracto de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*)

Se aplicó un diseño de Box-Behnken con cuatro variables independientes, el cual se analizó la relación entre las respuestas medidas y los efectos individuales y combinados de los factores, para así también encontrar las condiciones óptimas de extracción (Anexo 20). Los datos experimentales del diseño Box Behnken ajustados al modelo, la significancia estadística de los coeficientes de regresión, la interacción entre las diferentes variables independientes y su correspondiente efecto sobre las respuestas, fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA).

Se estudió el ajuste del modelo para cada una de las respuestas, en donde se obtuvo que los factores: rendimiento de extracción, polifenoles totales, ORAC-FL y taninos condensados se ajustaron a los datos, por lo tanto, el modelo puede describir adecuadamente la relación entre los factores independientes y estas variables, siendo estas respuestas consideradas en la optimización conjunta final. Por el contrario, las variables dependientes: taninos condensados, FRAP y DPPH presentaron valores-P inferiores a 0,05, indicando una falta de ajuste estadísticamente significativa, es decir, el modelo no se ajusta a los datos y no los representa adecuadamente, por lo tanto, estas respuestas no son consideradas en la optimización, ya que no tienen mayor influencia sobre el modelo (Anexo 21). Lo anterior se puede deber a que no se generó una distribución satisfactoria de los puntos experimentales sobre la región experimental, en un modelo es deseable que los valores de una respuesta se distribuyan de manera uniforme sobre la región experimental (Gutiérrez, 2012). Para el caso de las respuestas que presentaron falta de ajuste, es recomendable formular un segundo modelo donde se incluyan otros niveles de los factores independientes y así obtener una mayor variabilidad en la respuesta, o también para eliminar la falta de ajuste se requiere realizar repeticiones experimentales al menos en el centro del diseño (Gutiérrez, 2012).

Tabla 5. Resultados del análisis estadístico para las respuestas ajustadas del modelo de extracción de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) por altas presiones hidrostáticas.

	RENDIMIENTO	POLIFENOLES TOTALES	ORAC- FL	TANINOS HIDROLIZABLES
Factores significativos	<u>VALOR-P</u> Presión (A): 0,0087 %Etanol (C): 0,0037 CC: 0,0026; AB: 0,0252; DD: 0,0339	<u>VALOR-P</u> Presión (A): 0,0001 %Etanol (C): 0,0009 AA: 0,0030 CC: 0,0005	<u>VALOR-P</u> Presión (A): 0,0025 %Etanol (C): 0,0160 AA: 0,0199 BC: 0,0301	<u>VALOR-P</u> Presión (A): 0,0007 %Etanol (C): 0,0001 AD: 0,0429 CC: 0,0000
	<u>VALOR-F</u> Presión (A): 8,77 %Etanol (C): 11,29 CC: 12,38; AB: 6,02; DD: 5,32	<u>VALOR-F</u> Presión (A): 25,73 %Etanol (C): 16,10 AA: 12,00 CC: 18,50	<u>VALOR-F</u> Presión (A): 12,38 %Etanol (C): 7,06 AA: 6,52 BC: 5,54	<u>VALOR-F</u> Presión (A): 16,89 %Etanol (C): 25,32 AD: 4,79 CC: 29,15
R²	86,60%	89,80%	77,71%	89,60%
R²_{ajust}	79,50%	84,40%	67,81%	84,09%
Ecuación del modelo ajustado	Rendimiento = 59,3493 + 0,0733462 · A + 0,155834 · C - 0,0000584354 · A ² - 0,0010928 · AB + 0,000748155 · AD + 0,00298053 · B ² + 0,00446811 · BD - 0,00159676 · C ² - 0,00743746 · D ²	Polifenoles totales = 281,607 + 2,01342 · A + 6,21683 · B + 2,91869 · C - 0,00222041 · A ² - 0,0103339 · AB - 0,00623107 · AD - 0,0730169 · B ² - 0,0306309 · C ² + 0,0531711 · D ²	ORAC = -2052,36 + 27,5571 · A + 157,91 · B + 61,2017 · C - 0,0395882 · A ² - 2,00354 · B ² - 1,53861 · BC + 1,38723 · BD - 0,721307 · CD	Taninos hidrolizables = 28,0927 + 0,11233 · A - 0,630824 · B + 0,383356 · C - 0,0000929565 · A ² - 0,000265165 · AC - 0,00107696 · AD + 0,00859758 · B ² - 0,00302289 · C ² + 0,00505596 · D ²
Valor óptimo maximizado	79,35%	788,93 mg EAG/g b.s	7020,38 µmol Eq Trolox/g	50,55 % T.H
Valor óptimo de los factores	Presión: 350 MPa Tiempo: 20 minutos % Etanol: 48,81 % Masa tara/Volumen solvente: 1:23,6	Presión: 348,2 MPa Tiempo: 20 minutos % Etanol: 47,65% Masa tara/Volumen solvente: 1:30	Presión: 325,7 MPa Tiempo: 32,3 minutos % Etanol: 36,2 % Masa tara/Volumen solvente: 1:30	Presión: 349,9 MPa Tiempo: 20 minutos % Etanol: 45,98% Masa tara/Volumen solvente: 1:10

A: Presión; B: Tiempo; C: %Etanol; D: Masa tara/Volumen solvente

La significancia de los valores experimentales de las respuestas ajustadas se estudió a través del valor-P y el coeficiente de determinación (R^2) junto con su valor ajustado. Por otro lado, la relación matemática determinada por la ecuación de regresión describe el efecto de las variables independientes sobre estas respuestas. En la tabla 5, se pueden visualizar los valores resultantes de este análisis y sus valores óptimos para las respuestas que no presentan falta de ajuste.

Sí el modelo no explica un mínimo de 70% del comportamiento de la respuesta, no se recomienda utilizarla para fines de optimización porque su calidad de predicción es mala (Gutiérrez, 2012). Tomando en cuenta lo anterior, el modelo ajustado para cada una de estas respuestas logra explicar entre un 77,7 y un 89,8% la variabilidad de los datos en torno a la media de la gráfica de regresión, lo que significa que cada modelo presenta un buen ajuste de sus datos. En cuanto al coeficiente de determinación ajustado se obtuvo un valor entre un 67,81 y un 84,4%, el cual no difirió significativamente del coeficiente de determinación (R^2), por lo que las variables independientes consideradas en el modelo logran explicar los valores respuesta.

Para todas las respuestas ajustadas, la presión y la concentración de etanol fueron las únicas variables independientes que tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$), con un valor-F de 8,77 a 25,73 para la presión y un valor-F de 7,06 a 25,32 para el porcentaje de etanol. Así también el coeficiente de regresión cuadrático de la concentración de etanol contribuyó positivamente sobre el rendimiento, polifenoles totales y taninos hidrolizables (valor-F 12,38; 18,50 y 29,15, respectivamente), mientras que el coeficiente cuadrático de la presión ejerció un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante: ORAC-FL (valor-F de 12 y 6,52).

De acuerdo con el diagrama de Pareto, la presión y la concentración de etanol tuvieron una contribución positiva sobre las respuestas ajustadas, lo que indica que, una presión mayor y una alta concentración de etanol, favorece el rendimiento de extracción, la capacidad antioxidante del extracto, el contenido de polifenoles totales y taninos hidrolizables extraídos (Anexo 22). Este hecho puede observarse también los gráficos de superficie de respuesta de presión frente al porcentaje de etanol manteniendo constante el tiempo y la proporción masa tara/volumen solvente en sus valores óptimos obtenidos

para cada respuesta (Tabla 5). Estas gráficas muestran que tanto el rendimiento como el contenido de polifenoles totales y porcentaje de taninos hidrolizables tienden a incrementar su valor a medida que la presión aumenta hasta los 350 MPa, alcanzando su nivel máximo a una concentración de 50% de etanol, decayendo levemente a concentraciones mayores (Figura 7, 8 y 9).

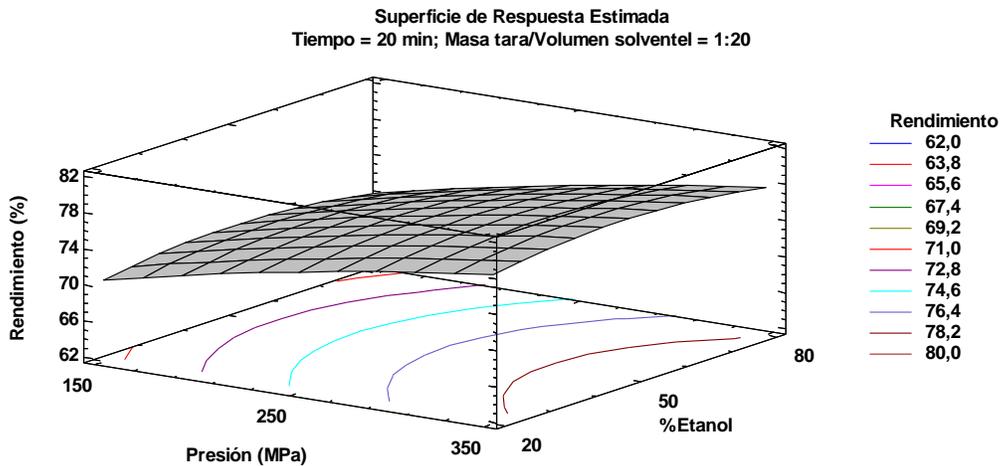


Figura 7. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para el rendimiento de extracción.

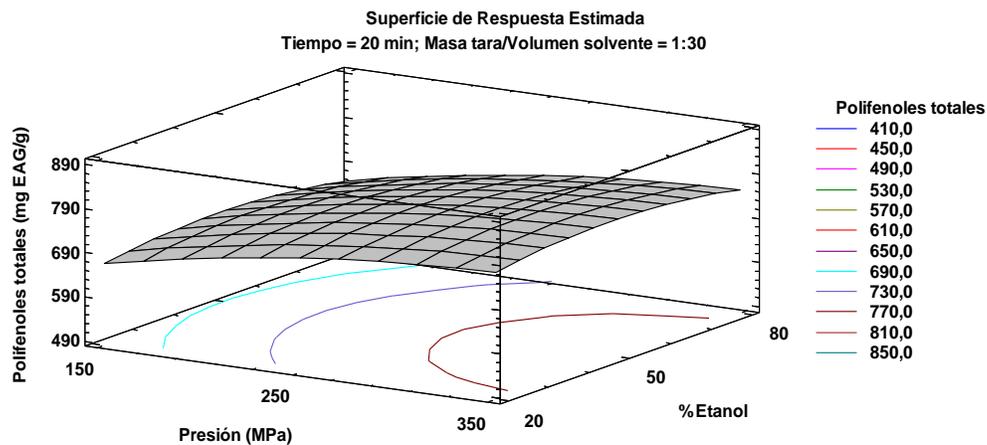


Figura 8. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para el contenido de polifenoles totales.

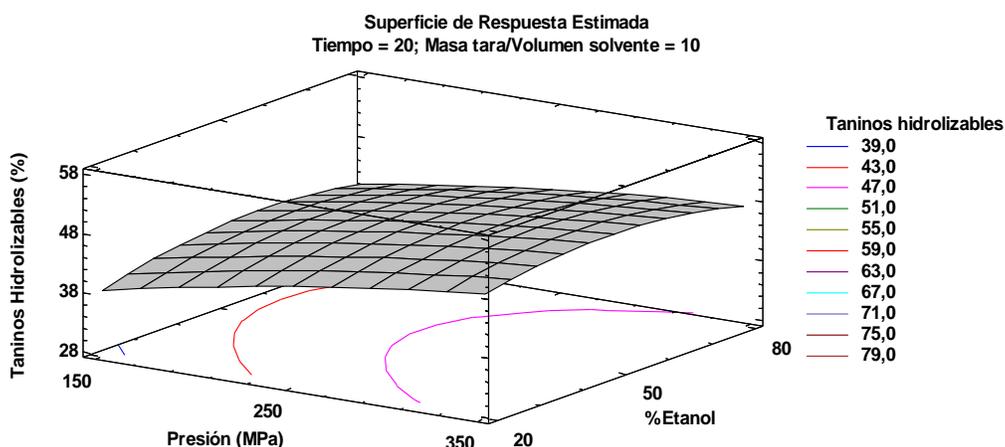


Figura 9. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para taninos hidrolizables.

La alta presión puede causar la desprotonación de grupos cargados y la destrucción de puentes salinos y enlaces hidrófobos en las membranas celulares, lo que resulta en cambios conformacionales y desnaturalización de proteínas, esto aumenta la velocidad de transferencia de masa y mejore la penetración del disolvente en el interior de las células, provocando una alta permeabilidad (Oey et al. 2008), este hecho hace que los compuestos fenólicos estén más disponibles para la extracción hasta el equilibrio, debido a los cambios estructurales que sufre la célula vegetal (Cascaes et al., 2021). Así también, las altas presiones tienen la capacidad de reducir el pH del solvente durante la extracción, provocando una mayor liberación de los grupos hidroxilos presentes en el ácido gálico. Esta reducción en el pH también podría mejorar la extracción de compuestos bioactivos porque la mayoría de los compuestos son más estables a un pH por debajo de cuatro (Corrales et al., 2008). Similares resultados se han reportado en hojas de *Mangifera indica* L. (Fernández et al., 2015) y pericarpio de *Dimocarpus longan* (Prasad et al., 2009).

Así también, una concentración media de etanol puede mejorar la polaridad del solvente y solubilizar más polifenoles como los compuestos polares y moderadamente polares (Sedraoui et al., 2020), estos factores influyen directamente en la eficiencia de extracción en términos de la calidad y rendimiento del extracto a obtener (Flores et al., 2016; Gironi

& Piemonte, 2011). Así también, la aplicación de alta presión hidrostática provoca un incremento de la fuerza del solvente y la solubilidad de los compuestos polares (Khan *et al.*, 2018), mientras que la disminución en la constante dieléctrica del agua causada por la alta presión también podría conducir a un aumento en la polaridad del medio (Prasad *et al.*, 2010), lo que podría contribuir también a un mayor rendimiento de extracción. Solventes con una polaridad intermedia suelen ser adecuados y eficientes para la extracción de compuestos polifenólicos, un ejemplo es la combinación de agua con solventes orgánicos como etanol que generan este tipo de polaridad (Da Fonseca *et al.*, 2014). Extracciones de polifenoles en hojas de té verde, y en semillas y cáscaras de mora (Jun *et al.*, 2009; Quirós, 2016), presentaron este mismo comportamiento con el mismo método de extracción. Autores reportan que el uso de etanol como solvente a una concentración al 50% da el mayor rendimiento de extracción de taninos de plantas a base de hierbas (Xuan Cuong *et al.*, 2019).

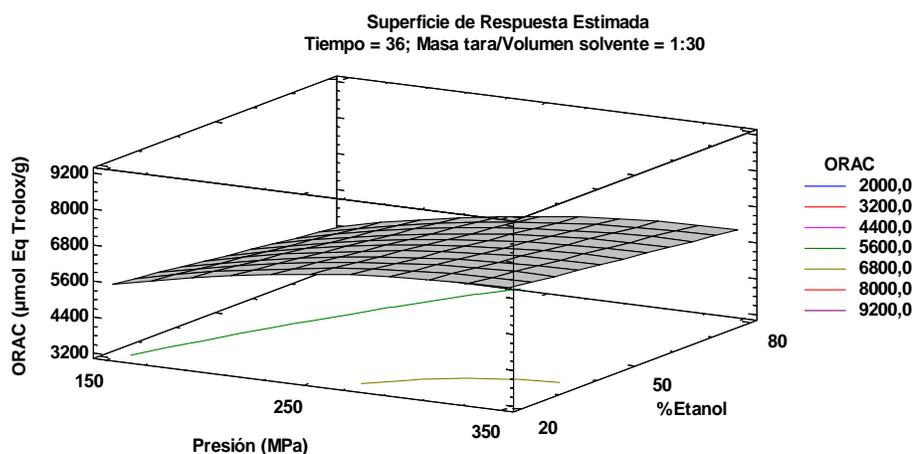


Figura 10. Gráfica de superficie de respuesta para las variables de presión y porcentaje de etanol para la capacidad antioxidante: ORAC-FL.

Por otro lado, la gráfica de superficie de respuesta para la capacidad antioxidante muestra que a medida que la presión aumenta, mayor es el valor de la actividad antioxidante, alcanzando su valor máximo a niveles más altos de concentración de etanol (Figura 10).

El aumento de la capacidad antioxidante condicionada por la presión se puede justificar por la teoría de Le Chatelier. El volumen del sistema tiende a disminuir durante el período de aumento de la presión, durante ese proceso, el solvente de extracción ingresa a las células para integrarse con los componentes bioactivos. El equilibrio de la concentración de solvente entre el interior y exterior de las células se establecería durante el período de mantenimiento de la presión. Cuando la alta presión se libera repentinamente, la pared celular se rompe y libera el citoplasma que contiene una alta concentración de material bioactivo, por lo tanto, un tiempo de extracción corto logra ser suficiente para recolectar una considerable concentración de extracto. Además, la solubilidad de estos compuestos aumenta a medida que la presión aumenta, según la teoría del comportamiento de fase (Briones *et al.*, 2014). El etanol posee una buena tasa de solubilidad que otros disolventes, especialmente cuando se mezcla con agua, permitiendo que la polaridad del solvente mejore, contribuyendo a un mayor grado de extracción de bio-compuestos (Sedraoui *et al.*, 2020). La solubilidad del soluto en el solvente puede estimarse aproximadamente por los grupos funcionales presentes en la estructura química del tanino. Es importante considerar que las vainas tara poseen una escasa cantidad de taninos condensados medibles, siendo su tanino principal de naturaleza hidrolizable (Kardel *et al.*, 2013) (Anexo 23). Los taninos hidrolizables se componen principalmente de ácido gálico, el cual posee una alta polaridad debido a que contiene como grupo funcional principal un ácido carboxílico, por lo que es más soluble en un solvente polar como el agua. El aumento de la actividad antioxidante se debe a la capacidad que tienen los grupos hidroxilo expuestos de donar iones de hidrógeno que estabilizan los radicales libres (Chambi *et al.*, 2013; Terán-Hilares *et al.*, 2018), reaccionando a través del enlace de hidrógeno tanto con agua como con etanol (Markom *et al.*, 2007). En estudios realizados por Prasad *et al.*, 2009, para la corilagina, un tipo de elagitanino, se aprecia que cuando la concentración de etanol aumentó de 25 a 50% se obtuvo un mayor contenido de corilagina, sin embargo, cuando se utilizó una concentración de etanol superior al 75%, el contenido de corilagina disminuyó. Asimismo, en trabajos realizados por Nguyen *et al.*, 2018, indicaron que al aumentar la concentración de etanol del 30% al 60%, la eficiencia de extracción se ha incrementado, pero cuando la concentración de etanol se incrementó de 60% a 96%, la eficiencia de extracción de taninos disminuyó.

Los resultados obtenidos en esta caracterización confirman que la técnica de altas presiones hidrostáticas permite obtener mejores índices de capacidad antioxidante, mayores rendimientos de extracción, que requieren un menor consumo de energía, con menos impurezas en el líquido de extracción, y sin efectos negativos sobre la actividad y estructura de los componentes bioactivos (Jun, 2013).

7.1.1 Optimización del extracto de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*)

Para obtener las mejores condiciones de extracción se analizó el diseño experimental a partir de las respuestas estudiadas anteriormente. Aquellas en que se lograron ajustar un modelo (rendimiento, polifenoles totales, ORAC-FL y taninos hidrolizables) se optimizaron conjuntamente mediante un análisis de respuesta múltiple utilizando la metodología de función deseada de Derringer & Suich (1980).

Se estableció un valor óptimo para los factores de este modelo con el fin de obtener el máximo contenido total de polifenoles, taninos hidrolizables, rendimiento y capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos. Estos resultados indican que la deseabilidad obtenida fue 0,957 (Tabla 6).

Tabla 6. Deseabilidad obtenida y valores optimizados para cada variable independiente que determina el proceso de extracción

Factores	Valor óptimo
Presión (150 – 250 – 350 MPa)	349,97
Tiempo (20 – 30 – 40 Minutos)	20
Porcentaje de etanol (20 – 50 – 80 %)	57,8
Masa tara/Volumen solvente (1:10 – 1:20 – 1:30)	1:15
<i>Deseabilidad</i>	<i>0,957</i>

Estos resultados se compararon con los valores predichos o estimados en la optimización del diseño experimental. A continuación, se observan los valores optimizados para cada una de las variables respuestas junto con su valor experimental para la verificación del modelo.

Tabla 7. Valores optimizados para cada variable respuesta y su validación.

	Valor óptimo estimado	Valor óptimo experimental*
Rendimiento (%)	78,25	80,77 ± 0,38
Polifenoles Totales (mg EAG/g)	785,15	765,26 ± 15,03
ORAC-FL (µmol Eq Trolox/g)	6788,37	6676,67 ± 209,17
Taninos Hidrolizables (%)	49,5	47,2 ± 0,8

(*) *n = 5 repeticiones*

En la tabla 7, los valores experimentales están estrechamente relacionados con los datos obtenidos en el análisis de optimización, lo que confirma que el modelo es el adecuado para optimizar los parámetros del proceso de extracción. Además, estos resultados indican la idoneidad del modelo cuadrático desarrollado, lo que indica que el diseño Box-Behnken puede utilizarse eficazmente como diseño de experimento sobre la extracción de compuestos bioactivos de vainas de tara mediante altas presiones hidrostáticas.

La deseabilidad obtenida aplicada a las condiciones experimentales de extracción se puede analizar a través del gráfico de superficie de respuesta. A continuación, se puede apreciar la gráfica para la presión frente al porcentaje de etanol; estos factores son considerados como variables que contribuyen significativamente en la optimización del diseño experimental.

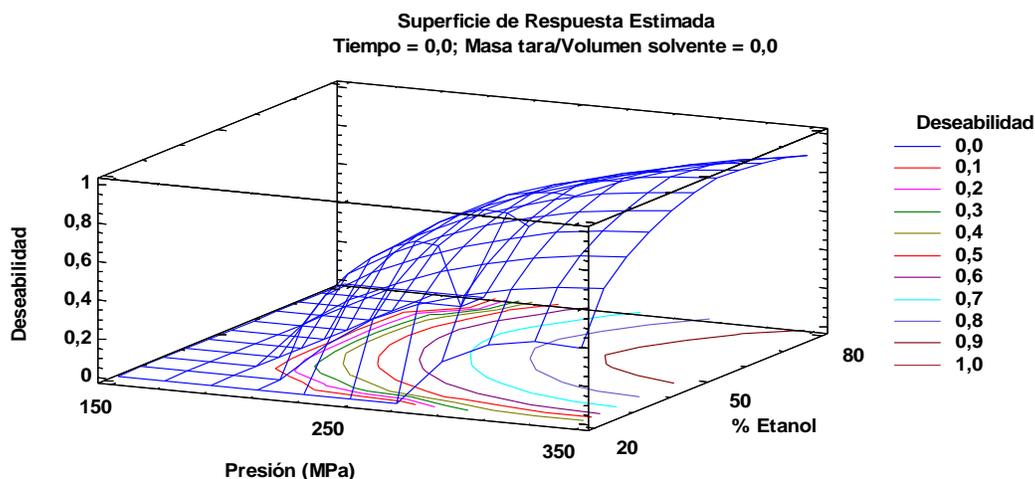


Figura 11. Gráfica de superficie de respuesta para el análisis de la deseabilidad de presión frente al porcentaje de etanol en la optimización conjunta del diseño experimental.

En la gráfica de superficie de respuesta de la Figura 11, se aprecia que el aumento de la deseabilidad se concentra en las mayores presiones del proceso, alcanzando su valor óptimo a los 350 MPa de presión y a un porcentaje de etanol superior al 50%, comportamiento que se presenta en casi todas las respuestas analizadas, por lo tanto, el programa selecciona esa concentración de solvente como el punto donde se optimiza en promedio todas sus respuestas.

7.2 Comparación de los métodos de extracción por altas presiones y por extracción sólido - líquido

Los resultados obtenidos tras la validación de la optimización del diseño experimental se compararon con el método de extracción sólido – líquido utilizado por Saavedra, 2016. Las mediciones de este extracto se llevaron a cabo en quintuplicado para el rendimiento de extracción, polifenoles totales, capacidad antioxidante (ORAC-FL) y taninos hidrolizables.

A continuación, se puede observar una tabla comparativa con los valores obtenidos en ambos métodos de extracción para las respuestas seleccionadas, junto con sus diferencias significativas obtenidas a partir del análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 8. Comparación entre extracto altas presiones hidrostáticas y extracto sólido – líquido para las respuestas seleccionadas para la optimización del diseño experimental.

	Extracto altas presiones hidrostáticas*	Extracto sólido – líquido*
Rendimiento (%)	80,77 ± 0,38 ^a	67,69 ± 0,45 ^b
Polifenoles Totales (mg EAG/g)	765,26 ± 15,03 ^a	666,62 ± 6,84 ^b
ORAC-FL (µmol Eq Trolox/g)	6656,39 ± 209,17 ^a	3496,78 ± 186,95 ^b
Taninos Hidrolizables (%)	47,19 ± 0,78 ^a	41,40 ± 0,35 ^b

(*) *n* = 5 repeticiones – *a* y *b* son superíndices que indica si hay diferencias significativas entre muestras (*p* < 0.05).

Debido a que la eficiencia de extracción está determinada por el tamaño de partícula (Santos *et al.*, 2012) y que el contenido de polifenoles en plantas depende de su madurez, sus condiciones ambientales y los tratamientos poscosecha (Jun *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2015), ambas extracciones se realizaron a partir del mismo polvo de vainas de tara de igual granulometría.

En la tabla 8, se aprecia que se obtuvieron mejores resultados en el extracto optimizado por altas presiones que el extracto sólido – líquido, y además presentan diferencias significativas (*p* < 0.05) entre ellas para cada una de las respuestas analizadas.

La utilización de altas presiones permite un mayor rendimiento de extracción obtenido en un corto periodo de tiempo debido a la alta velocidad de difusión del solvente, lo que hace que esta técnica sea mucho más eficiente que las técnicas convencionales (Khan *et al.*, 2018). Además, durante la extracción, la muestra se mantiene en una atmósfera inerte protegida de la luz, lo que mejora la estabilidad de los compuestos fenólicos sensibles a

la luz y al oxígeno (Xi *et al.*, 2011b). Autores han reportado que la extracción por altas presiones provoca un aumento de la cantidad de taninos extraídos en comparación con el método sólido – líquido (Martínez *et al.*, 2019).

La extracción asistida por alta presión hidrostática (APH) es un método que genera gran interés debido a que es una alternativa más efectiva que otros métodos de extracción convencionales. Dentro de sus principales ventajas, la alta presión permite acortar el tiempo de procesamiento, obtener mayores rendimientos de extracción, consumo reducido de solventes, menor cantidad de impurezas en el líquido de extracción y reducir la temperatura de operación, permitiendo la extracción de compuestos termolábiles, no afectado negativamente sobre la estructura de estos (Martínez *et al.*, 2019; Xi, 2015; Jun, 2013). Por otro lado, el alto costo del equipo que este tipo de técnica requiere para operar, es una de las desventajas que debe enfrentar el usuario, sin embargo, en el caso de la extracción de antioxidantes, la alta pureza del extracto y la eficiencia del proceso que brinda este método, suelen ser los factores más relevantes al momento de escoger este tipo de procedimiento (Khoddami *et al.*, 2013).

Finalmente, el método de extracción sólido – líquido se basa principalmente en el uso de agitación para aumentar la solubilidad de los materiales y la velocidad de transferencia de masa (Prasad *et al.*, 2009), junto con la aplicación de temperatura. El uso de altas temperaturas provoca un aumento de extracción, esto debido a que el coeficiente de transferencia aumenta en esas condiciones, mejora la solubilidad del soluto y su coeficiente de difusión, lo que promueve la extracción (Martínez *et al.*, 2019). Sin embargo, una temperatura excesiva puede conducir a una menor cantidad de taninos (Ramos *et al.*, 2013) y degradar algunos compuestos fenólicos sensibles al calor (Martínez *et al.*, 2019; Markom *et al.*, 2007). El tiempo también juega un rol importante, si bien el incremento de este parámetro provoca un mayor contenido de taninos extraídos, una extracción más prolongada no siempre mejora la eficiencia de la extracción, aumentando la posibilidad de oxidación de polifenoles (Martínez *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2012). Estos pueden ser algunos factores que determinen los bajos resultados obtenidos con respecto a la extracción por alta presión.

7.3 Determinación de neocontaminantes en queque

7.3.1 Determinación del contenido de hidroximetilfurfural

En la tabla 9 se muestran los resultados del contenido de hidroximetilfurfural (HMF) presente en corteza de queque en diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*).

Tabla 9. Contenido de HMF en corteza de queque frente a diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*).

Concentración de extracto de vainas de tara (mg/kg)	Contenido de HMF (mg/kg)
0 (CONTROL)	2,62 ± 0,08 ^a
250	1,67 ± 0,02 ^b
500	1,54 ± 0,03 ^c
750	1,47 ± 0,03 ^d
1000	1,23 ± 0,02 ^e
1500	1,09 ± 0,02 ^f
2000	0,99 ± 0,01 ^g
2500	0,87 ± 0,08 ^h

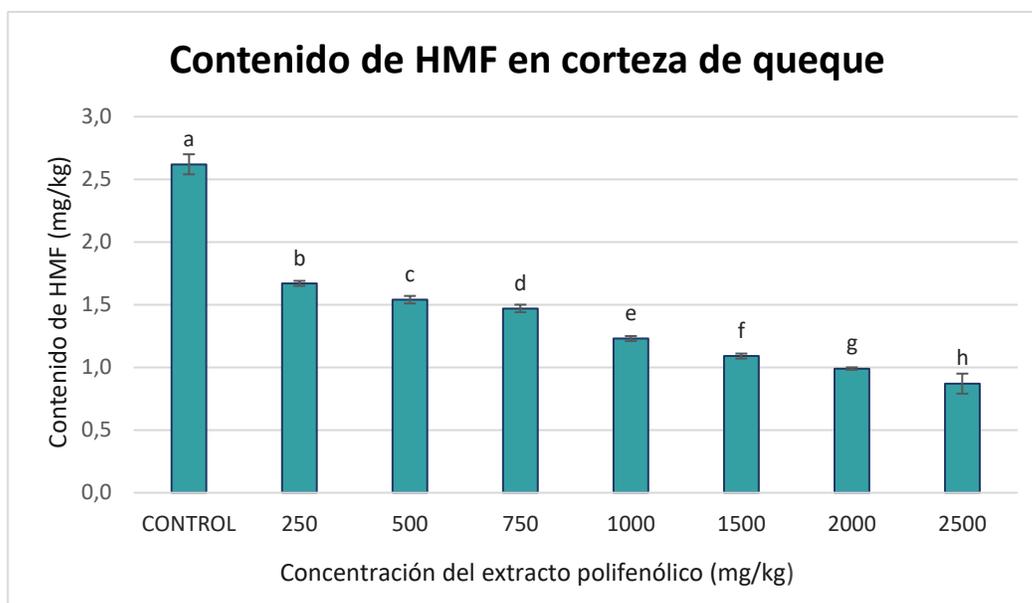
Superíndices distintos indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) – $n = 3$ repeticiones

El contenido de HMF presente en la corteza del queque control, sin adición de extracto de vainas de tara, se encuentra dentro del rango estimado (2,2 – 10,0 mg/kg) obtenido durante el monitoreo de procesos de calentamiento aplicado en productos de panadería (Capuano & Fogliano, 2011), sin embargo, el valor obtenido en el queque control se encuentra cerca del límite inferior de este rango. Dentro de los factores que pudieron influir en el desarrollo de HMF está la temperatura. La cantidad de HMF presente en los alimentos está directamente relacionada con la carga de calor aplicada durante el procesamiento de productos ricos en carbohidratos (Capuano & Fogliano, 2011), en el caso de los bizcochos o queques, se hornean convencionalmente a alta temperatura

(aproximadamente 200 °C), sin embargo, estos parámetros pueden ir variando de acuerdo con las condiciones de procesamiento; un aumento de la temperatura de cocción y la disminución del contenido de agua pueden favorecer la formación de HMF en bizcochos (Zhang *et al.*, 2012). Por otro lado, los azúcares reductores también pueden afectar en el contenido de HMF determinado, el cual podría estar muy influenciado por el grado de descomposición de la sacarosa durante el horneado. Zhang *et al.* (2012) concluyó que la adición de azúcares reductores promovió la formación de HMF en bizcochos y afectaron adversamente su estructura durante el horneado, en comparación con el bizcocho que poseía más sacarosa en su formulación; esto podría explicar el contenido de HMF obtenido en el queque control sin extracto de vainas de tara (Tabla 9).

La formación de HMF está influenciada por las concentraciones y el tipo de azúcar, favorecida por un pH más bajo y una menor actividad de agua (Ameur *et al.*, 2006; Gökmen *et al.*, 2007b). La caramelización causa la liberación de H⁺, por lo tanto, en medio ácido, el HMF se forma por la descomposición de hexosas y pentosas durante el calentamiento, después de una enolización lenta y una β -eliminación rápida de tres moléculas de agua (Zhang *et al.*, 2012) (Figura 2).

La adición del extracto de vainas de tara en diferentes niveles (250 a 2500 mg/kg) reduce significativamente ($p \leq 0,05$) el contenido de hidroximetilfurfural en corteza de queque con respecto al queque control, alcanzando un 41% de reducción a una concentración de 500 mg/kg de extracto, produciendo mayores niveles de mitigación de HMF a concentraciones más altas de extracto añadido. Este comportamiento ha sido reportado también en otras investigaciones relacionadas; en pan hallulla se logró mitigar un 36% de HMF cuando se agregaron 1500 mg/kg de extracto de vaina de tara, así también se ha demostrado que la adición de flavan-3-oles o quercetina reduce el contenido de HMF en ~50-86 % en papas fritas y pan (Qi *et al.*, 2018; Zhang & An, 2017).



Superíndices distintos indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Figura 12. Contenido de HMF en corteza de queque a diferentes concentraciones de extracto de vainas de tara con respecto a un queque control.

La reducción de HMF en los alimentos es un tema desafiante debido a la dificultad de encontrar formas efectivas aplicables a nivel industrial (Anese & Suman, 2013). Como la formación de HMF sigue las mismas vías que conducen a el desarrollo de los compuestos marrones y el sabor de los alimentos, por lo que es muy difícil mitigar su formación sin comprometer la aceptabilidad sensorial de los alimentos (Pedreschi *et al.*, 2018). Por otro lado, el mecanismo de mitigación de HMF por antioxidantes como flavan-3-ols (polímero de proantocianidinas) puede estar relacionado con su actividad de captura de carbonilo. Los átomos de carbono C-6 y C-8 de los flavan-3-oles son sitios nucleofílicos, que pueden formar aductos con compuestos de carbonilo α,β -insaturados (Lee *et al.*, 2019).

7.3.2 Determinación del contenido de acrilamida

Con respecto a la determinación de acrilamida, se puede observar en la figura 13 que tras la eliminación de los interferentes para la medición de acrilamida (Anexo 15) y posterior almacenamiento de la muestra a medir, la sacarosa precipitó por el cambio de temperatura, impidiendo la medición de acrilamida en el equipo de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS), pudiendo afectar así a la columna, debido a que

alcanza temperaturas cercanas a los 200 °C, provocando una caramelización en el *liner* del equipo. Todavía no se logran identificar con certeza las razones por que ocurrió esto, sin embargo, se puede inferir que para los alimentos con una gran cantidad de azúcar posiblemente la metodología utilizada no es la correcta, ya que no es capaz de eliminar la sacarosa remanente presente en el producto, por lo tanto, se sugiere rediseñar y validar una nueva metodología de medición de acrilamida para este tipo de productos, como la derivatización con bromo; otra propuesta puede ser la utilización de un equipo HPLC con espectrometría de masas (LC-MS), el cual no utiliza altas temperaturas que evapore la muestra y caramelicé la sacarosa.

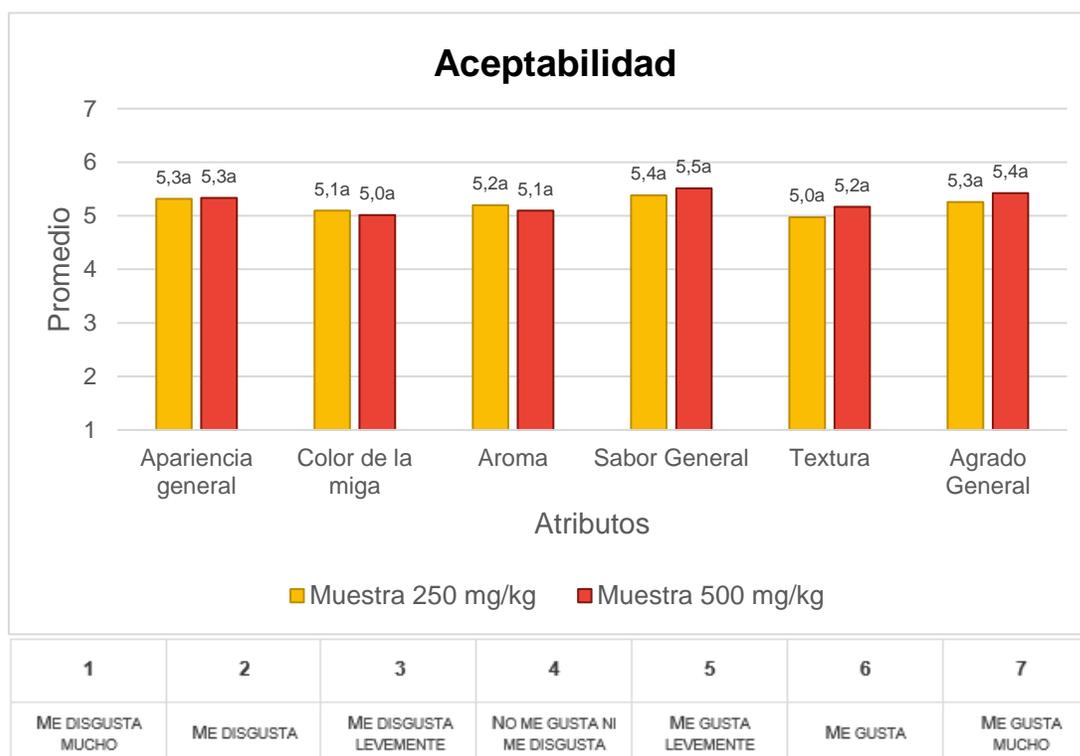


Figura 13. Precipitación de sacarosa en muestra para la medición de acrilamida

7.4 Evaluación Sensorial

La incorporación de extracto polifenólico de vainas de tara en queque se evaluó sensorialmente a través de un estudio con consumidores, donde se analizaron dos concentraciones de extracto: 250 y 500 mg/kg. La evaluación se realizó con un total de 102 evaluadores no entrenados con un rango de edad entre 15 y 70 años, los cuales consumían principalmente queque al menos 2 veces al mes o más, con la condición de que no fueran alérgicos al huevo ni intolerantes al gluten, que no tuvieran una condición vegana y/o que presentaran síntomas de resfrío. A través de una breve descripción del producto, los participantes fueron informados previamente acerca del producto a degustar y sus propiedades saludables. Los evaluadores firmaron un consentimiento informado antes de participar en el estudio.

7.4.1 Evaluación de las muestras

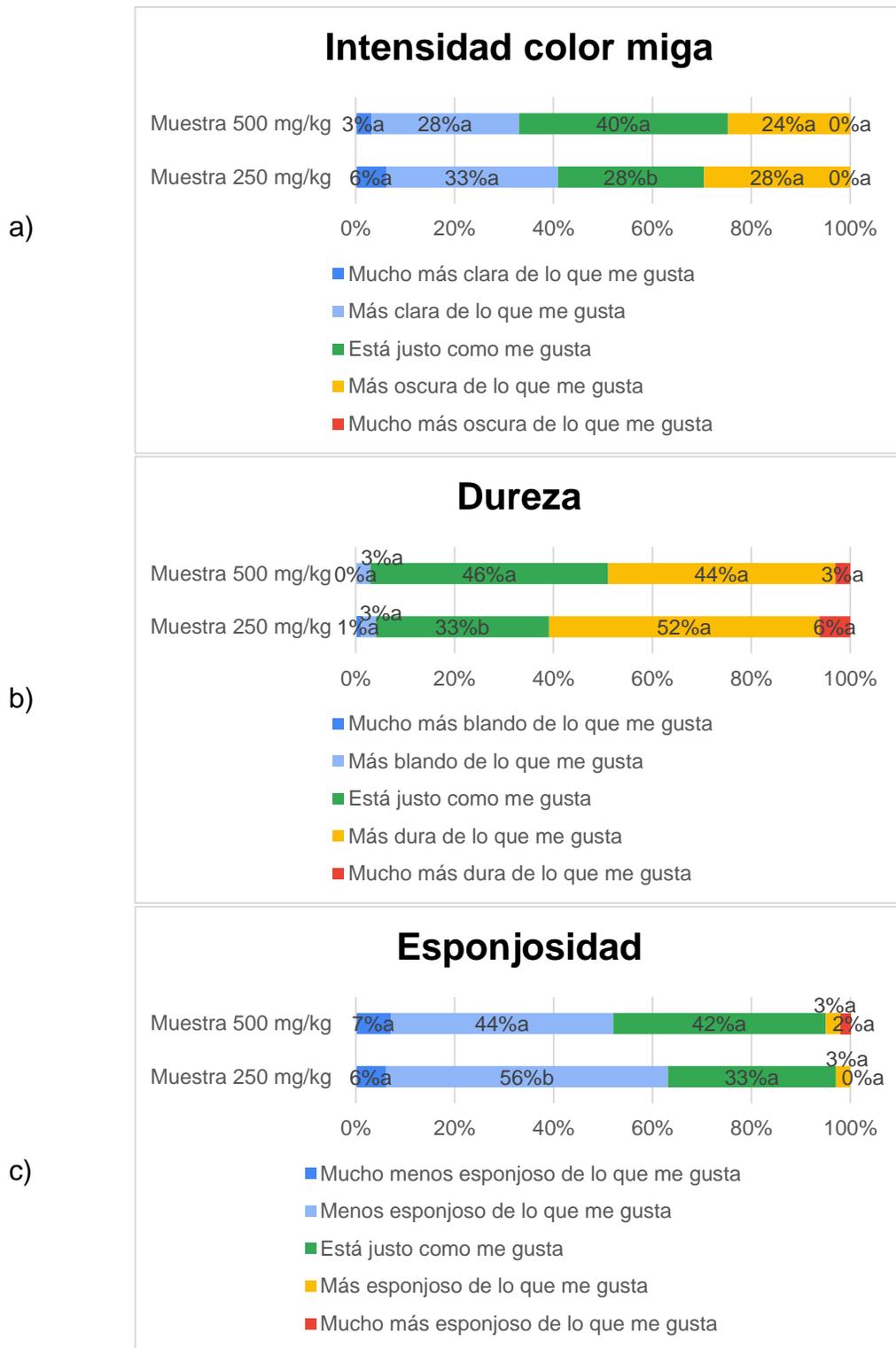


Superíndices distintos en un mismo atributo indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Figura 14. Gráfico para los atributos de aceptabilidad de las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg extracto de vainas de tara.

Al evaluar la aceptabilidad de las muestras por parte de los consumidores (Figura 14), se puede observar que no existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en ninguno de los atributos evaluados (Anexo 24). Los promedios bajo 5,5 (entre me gusta levemente y me gusta), demuestra que los queques elaborados con esas concentraciones de extracto de tara presentan características organolépticas que no son totalmente aceptadas por los consumidores. Estos resultados posiblemente se deben a que el comportamiento del consumidor al momento de evaluar pudo estar determinado por su experiencia previa con este tipo de productos, debido a que los queques son considerados uno de los productos horneados más conocidos y consumidos en el mundo (Carullo *et al.*, 2020).

Los atributos intensidad de color de miga, dureza y esponjosidad se midieron en escala de justo agrado (Figura 15). En la gráfica para la intensidad del color de la miga, se observa que para ambas muestras existe una alta dispersión de los datos hacia los extremos (Figura 15a), donde un 28% de los evaluadores encontró que la muestra 250 mg/kg estaba “justo como les gusta”, así mismo un 40% de ellos consideró lo mismo para la muestra de 500 mg/kg, obteniéndose un bajo justo agrado con diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$), por lo tanto, el color de la miga no es del agrado de los consumidores. Este resultado es bastante similar al obtenido en otros estudios sensoriales realizados en queques, donde al aumentar la concentración de extractos de hierba de limón, hoja de pino, planta clitoria y cáscara de granada en un producto horneado, se obtuvieron puntajes más bajos al evaluar el color de la miga (Lee *et al.*, 2015; Lee & Lee, 2013; Pasukamonset *et al.*, 2018; Topkaya & Isik, 2019). La diferencia en el color se debe a principalmente a que el extracto de vainas de tara posee un alto contenido de taninos, los cuales le confieren el color rosa-violeta-grisáceo a las muestras de queque (De La Cruz, 2004). Cuando el color de la miga del queque se intensifica pareciera agradar más al consumidor, este pensamiento puede tener relación con el color característico de un alimento elaborado a base de harina integral, lo cual lleva a suponer que la muestra evaluada puede ser más saludable que un queque tradicional (Anexo 25).



Superíndices distintos en un mismo atributo indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

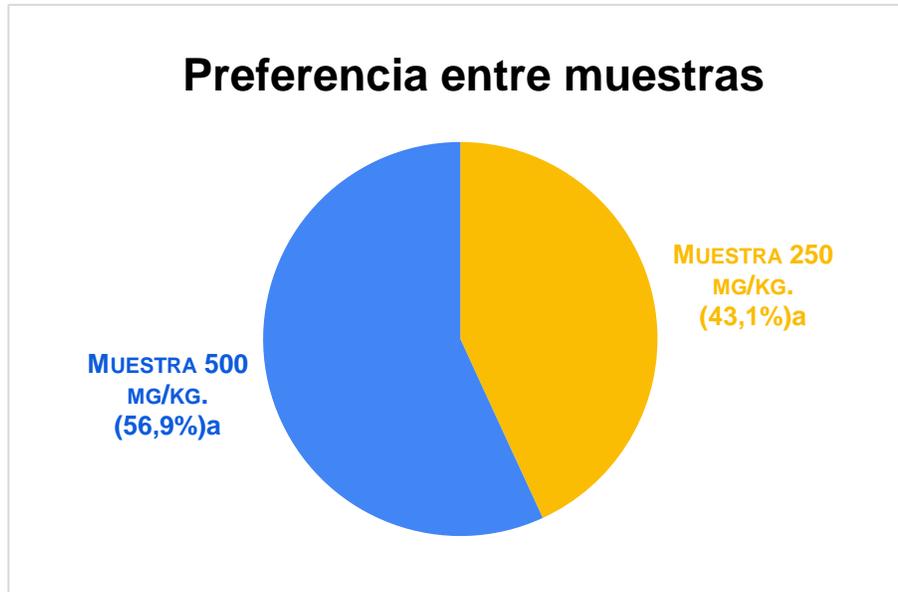
Figura 15. Gráfico de justo agrado del a) color de la miga, b) dureza y c) esponjosidad de las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg.

En cuanto a la dureza, se encontró que un 58% de los evaluadores consideró que la muestra 250 mg/kg estaba “más dura o mucho más dura de lo que les gusta”, así también un 47% de los consumidores señaló lo mismo para la muestra de 500 mg/kg (Figura 15b) sin diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$). La interacción de los enlaces de hidrógeno y la interacción hidrofóbica entre las moléculas de proteínas y los grupos fenólicos provoca cambios estructurales y conformacionales en la proteína en los alimentos, lo que puede causar una pérdida de flexibilidad en las muestras con extracto (Pasukamonset et al., 2018).

Por otro lado, para la esponjosidad, un 62% de los consumidores indicó que la muestra de 250 mg/kg de extracto estaba “menos esponjosa o mucho menos esponjosa de lo que les gusta”, y bajo el mismo criterio un 51% de los evaluadores para la muestra de 500 mg/kg de extracto (Figura 15c) obteniéndose diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$), lo que indica que los evaluadores consideraron que la muestra de concentración 250 mg/kg es menos esponjosa de lo que les gusta con respecto a la muestra de 500 mg/kg. Las propiedades de la masa son importantes para la creación de una estructura porosa y textura esponjosa en el queque, una viscosidad de la masa suficientemente alta es capaz de retener las burbujas de aire (Aranibar et al., 2019), sin que suban a la superficie y se pierdan durante el calentamiento inicial (Lu et al., 2010). La oclusión del aire y de la formación de espuma estable es proporcionada por el batido y por las proteínas presentes en la clara del huevo estabilizadas por la azúcar incorporada, donde posiblemente también exista una contribución por parte de lípidos polares propios del huevo y la harina. (Rodríguez, 2014). Sin embargo, el aceite o la grasa también cumplen un rol importante en las características de textura de un queque, la grasa actúa en la interfase de las burbujas, mejorando la estabilidad de la fase gaseosa e incrementando la viscosidad de la mezcla (Rodríguez, 2014). En una masa sin aceite, se produce una mayor difusión y pérdida de la fase gaseosa hacia la superficie, dando lugar a queques más compactos, influyendo también en la firmeza y elasticidad del producto final (Rodríguez, 2014). La falta de materia grasa en la formulación de los queques pudo haber contribuido en la obtención de valores no tan esperados para el justo agrado de la dureza y esponjosidad de los queques, sin embargo, es importante destacar que no se incorporó grasa en su formulación para no interferir en el mecanismo de formación de acrilamida mediante la vía

lipídica (Xu *et al.*, 2014), por lo que era esperable que estas características sensoriales se vieran afectadas.

Respecto a la intención de compra, para ambas muestras los evaluadores indicaron que “no saben si lo comprarían o no lo comprarían” (Anexo 26), sin diferencias significativas entre ellas ($p \leq 0,05$) (Anexo 27). Este resultado es poco alentador para una posible futura proyección de este producto, sin embargo, para mejorar las propiedades organolépticas del queque y que sea sensorialmente atractivo para los consumidores, se sugiere incorporar nuevos ingredientes como materia grasa o leche y/o modificar las condiciones de procesamiento y horneado; estos parámetros ejercen un efecto positivo sobre la calidad final del queque (Topkaya & Isik, 2019; Wilderjans, 2013). La apariencia y el color del alimento es uno de los primeros atributos que percibe el consumidor; convirtiéndose en un factor decisivo que determina la aceptabilidad del producto y que influye directamente en la intención de compra (Ureta *et al.*, 2014; Purlis, 2010). Esto también puede justificar los resultados obtenidos en aceptabilidad para la apariencia general y color de la miga.



a y b son superíndices que indica si hay diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$).

Figura 16. Gráfico de preferencia entre las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg.

Finalmente, en la preferencia se observó una tendencia favorable al queque con concentración de 500 mg/kg con un 57% de preferencias (Figura 16), pero sin significancia estadística ($p > 0,05$) (Anexo 28), por lo que realmente no se puede determinar con exactitud cuál de las dos muestras es la más preferida por los consumidores.

Tabla 10. Principales razones de preferencia entre las muestras de queque con concentraciones de 250 y 500 mg/kg.

RAZONES DE PREFERENCIA	Muestra 250 mg/kg N = 44 %	Muestra 500 mg/kg N = 58 %
AROMA		
Aroma/Más aroma/mejor aroma/aroma más agradable/buen aroma	31,8	20,7
SABOR		
Sabor/más rico el sabor/Buen sabor/Sabor agradable	38,6	27,6
Sabor más intenso/más sabor/mejor sabor/sabor más notorio	36,6	27,6
Más dulce	29,5	17,2
TEXTURA		
Mas esponjoso	45,5	31
Mas blando/menos dura/más blanda la corteza	38,6	27,6

En la tabla 10 se aprecian las principales razones de preferencia entre ambas muestras evaluadas, dentro de las cuales, el aroma, sabor y la textura obtuvieron la mayor cantidad de respuestas; el resto de las razones se pueden observar en el Anexo 29. Los porcentajes obtenidos en ambas muestras son bastante similares, donde se observa una alta dispersión de los resultados, ya que no presentan una tendencia clara de preferencia entre una muestra y otra para los atributos evaluados. Estas diferencias de criterios de

evaluación se pudieron deber a la diversidad inherente de los consumidores, probablemente a la diferencia de edad entre ellos. Debido a los resultados obtenidos, es necesario una reformulación con otros ingredientes claves para aumentar los puntajes de aceptabilidad, intensidad de compra y preferencia.

7.4.2 Comparación con queque tradicional

Esta parte de la encuesta se enfocó principalmente en el queque que escogieron los evaluadores como preferido, junto con sus propiedades saludables descritas y su comparación teórica con un queque tradicional individual que los consumidores tienen en su memoria sensorial.

Tabla 11. Respuestas de sabor diferente con respecto a un queque tradicional en el queque preferido por los consumidores.

Sabor con respecto a un queque tradicional	Queque con extracto (250 mg/kg) N=44 %	Queque con extracto (500 mg) N=58 %
No encontraron sabor diferente	38,6	34,5
Encontraron sabor diferente	61,4	65,5
Sabor diferente encontrado (alternativas fijas):		
Sabor difícil de describir	55,6	52,6
Sabor a tostado	14,8	21,1
Otros (especificar)	29,6	28,9
Desglose de otros (respuesta espontánea):		
Sabor a semilla/fruto seco/almendrado	0	7,9
Otras respuestas dispersas	29,6	21,1

Tomando en cuenta el queque preferido por cada evaluador, se formuló la siguiente pregunta: “¿Usted considera que el queque que usted prefirió posee un sabor distinto o deja una sensación distinta en la boca que un queque tradicional?”. Frente a esto, se

obtuvo que un 61,4% de los participantes respondieron que sí encontraron un sabor diferente en la muestra escogida en comparación con un queque tradicional.

Dentro de ellos, a partir de alternativas, los evaluadores manifestaron sus percepciones de sabor o sensación diferente, se observa en la tabla 11 que ambas opciones obtuvieron similares porcentajes de respuesta, siendo la opción más escogida un “sabor difícil de describir” con un 55,6% para el queque con 250 mg/kg de extracto y un 52,6% para el queque elaborado con 500 mg/kg de concentración. Por otro lado, dentro de otras opciones respondidas de manera espontánea, el “sabor semilla/fruto seco/sabor almendrado” obtuvo un 7,9% de las respuestas para el queque de 500 mg/kg (Anexo 30). La diferencia de sabor en ambos queques se debe principalmente a las características sensoriales que posee el extracto de vainas de tara. Los taninos presentes en el extracto constituyen la principal fracción fenólica de las vainas de tara, siendo responsables de la astringencia y el sabor amargo de los alimentos vegetales (Martínez *et al.*, 2000; Olivas-Aguirre *et al.*, 2015). En otras investigaciones relacionadas con la aplicación de antioxidantes, se encontró que la adición de harina de plátano maduro en queques y el polvo de *lemongrass* en muffins, generaban diferencias en el sabor al compararlo con una muestra control, obteniéndose así una disminución en la aceptabilidad y preferencia (Segundo *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2015).

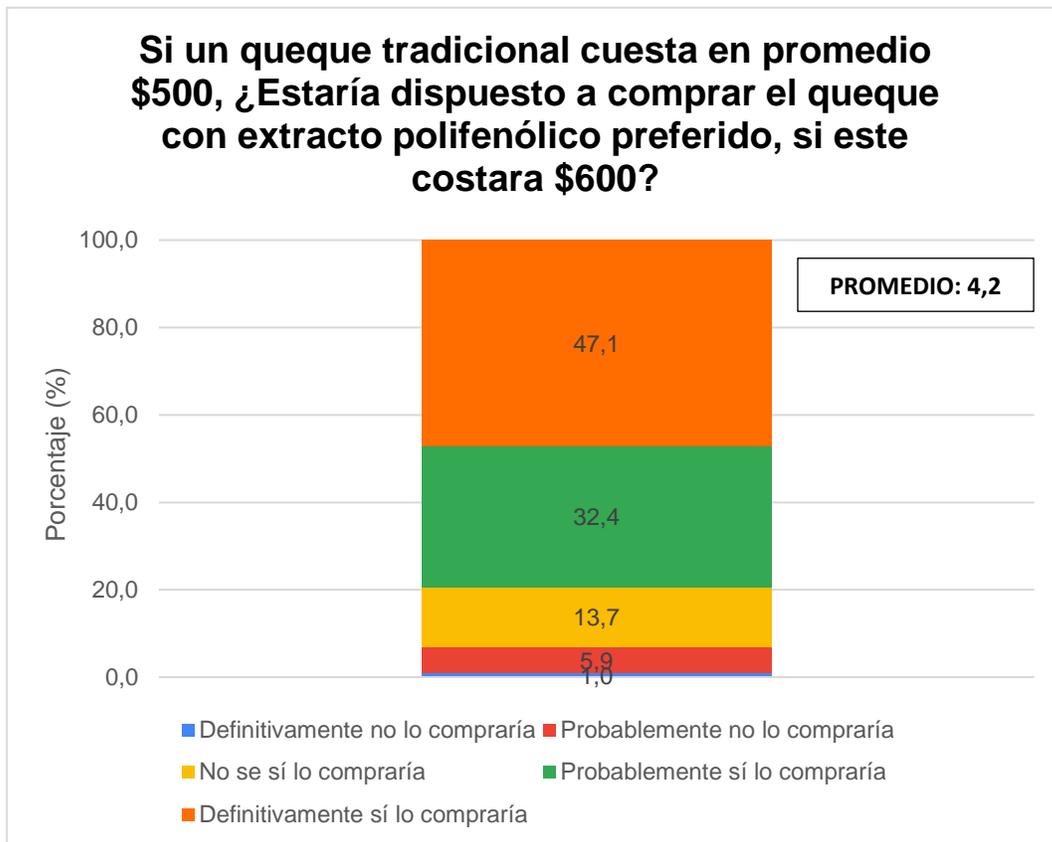
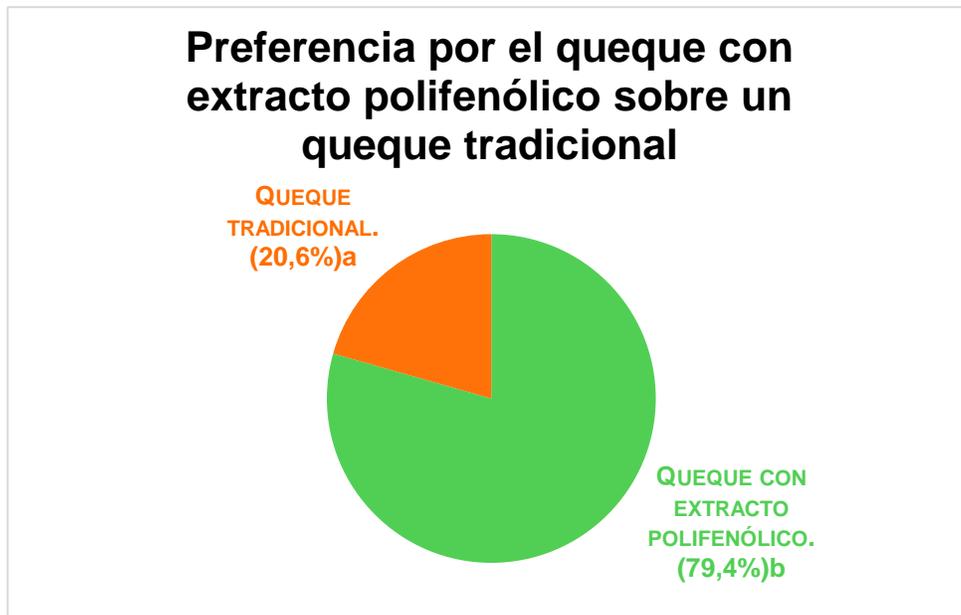


Figura 17. Gráfico de intención de compra del queque preferido por los evaluadores frente a un queque tradicional.

Así también, se realizó un análisis de intención de compra para evaluar que tan dispuesto estaría el consumidor a comprar el queque con extracto antioxidante si este tuviera un mayor precio que el otro tipo de queque. Se puede observar que un 47% de los consumidores respondieron que “Definitivamente sí comprarían” el queque escogido por ellos, obteniéndose un promedio de 4,2 (Figura 17), esta puntuación aumentó en comparación con los resultados obtenidos en la intención de compra evaluada monádicamente para cada queque al evaluarlo previamente (Anexo 26), donde se obtuvo un promedio de 3,5 y 3,6 para las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg, respectivamente, donde los evaluadores contestaron que “No sabían si lo comprarían o no”. La información del producto entregada previamente es clave para que el consumidor lleve a cabo una evaluación mucho más consciente frente a este tipo de alimento. En un

estudio en aceptabilidad en muffins enriquecidos con fibra realizado por Baixauli *et al.* (2008), obtuvo que la puntuación aumentó cuando se entregó información acerca de este producto a los evaluadores; esto concuerda con los resultados obtenidos, donde finalmente se concluye que la información brindada a los consumidores es un factor relevante en la evaluación, siendo también importante la actitud de los consumidores.



a y b son superíndices que indica si hay diferencias significativas entre muestras ($p < 0.001$).

Figura 18. Gráfico de preferencia entre la muestra de queque preferido por los evaluadores y un queque tradicional.

Por último, mediante un test de preferencia los participantes debían escoger entre ambas muestras, queque con extracto polifenólico o queque tradicional. En esta parte de la encuesta, la información de las propiedades saludables que poseía el queque con extracto cobró valor, ya que fue determinante para la respuesta de los evaluadores, obteniendo así un 79,4 % de las preferencias para el queque con extracto antioxidante frente a un 20,6% para el queque tradicional, con un nivel de significancia al 0,1% (Figura 18) (Anexo 31), donde la principal razón de preferencia fueron las propiedades saludables que el queque con extracto poseía, el cual obtuvo un 26,5 % de las justificaciones, con descripciones como: *beneficioso para la salud, más saludable, nutritivo y con propiedades antioxidantes.*

Por otro lado, el sabor también justificó esta preferencia, donde se mencionó que *el queque presentaba poca diferencia de sabor con el tradicional, era sabroso y de buen sabor* (Anexo 32). Claro está que el color de la superficie, la textura y el sabor, son las principales características que influyen en la preferencia del consumidor hacia los productos de panadería, sin embargo, en la elaboración de un alimento saludable, la información y la conciencia de salud de los consumidores juegan un papel clave al decidir por este tipo de productos, y muchas veces es necesario arriesgar atributos de sabor y textura por obtener un alimento que otorgue beneficios de salud y bienestar (Petisca *et al.*, 2014; Mrabet *et al.*, 2016).

8. CONCLUSIONES

En la caracterización de extracto de vainas de tara por altas presiones hidrostáticas se obtuvo que las respuestas: rendimiento de extracción, polifenoles totales, ORAC-FL y taninos hidrolizables no presentaron falta de ajuste (valor- $P < 0,05$), por lo tanto, el modelo se ajusta a los datos y logra explicar entre un 77,7 y un 89,8% la variabilidad de los datos en cada una de estas respuestas.

Las condiciones óptimas de extracción de taninos de vainas de tara por altas presiones hidrostáticas se obtuvieron a una presión de 349,97 MPa con una concentración de etanol al 57,8%, por otro lado, el tiempo y la proporción masa tara/volumen solvente no fueron variables significativas, sin embargo, el modelo arrojó 20 minutos con una proporción masa tara/volumen solvente de 1:15. El proceso de extracción podría ser optimizado con un mayor aumento de la presión del equipo, obteniéndose extractos en menor tiempo y con condiciones de extracción menos exigentes. Así también, la extracción de taninos en vainas de tara en condiciones óptimas se corroboró experimentalmente, obteniéndose respuestas muy similares al modelo teórico.

La recuperación de los compuestos fenólicos de las vainas de tara puede verse obstaculizada por su pared celular vegetal, por lo que la tecnología de altas presiones hidrostáticas ofrece un proceso de extracción libre de contaminantes alimentarios y ambientales, que permite aprovechar sus compuestos bioactivos funcionales asociados a la prevención de enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo.

La adición de extracto de vainas de tara logró mitigar el contenido de hidroximetilfurfural en queques a medida que la concentración de extracto fue en aumento, alcanzando un nivel de $1,67 \pm 0,02$ y $1,54 \pm 0,03$ mg/kg para las concentraciones de 250 y 500 mg/kg, respectivamente, en comparación con el queque control que obtuvo un nivel de $2,62 \pm 0,08$ mg/kg. Al comparar sensorialmente ambas muestras con extracto de vainas de tara no se obtuvieron diferencias significativas entre ellas ($p \leq 0,05$) para la aceptabilidad y preferencia, donde más del 60% de los consumidores consideró que ambas muestras poseían un sabor diferente, y al comparar cualquiera de los dos queques frente a un queque convencional, un 47% de los evaluadores respondieron que “definitivamente sí

comprarían” los queques con extracto de vainas de tara, alcanzando finalmente un 79,4% de las preferencias. Al momento de escoger, los consumidores priorizaron las propiedades antioxidantes de estas muestras, a pesar de que poseían mayor dureza y menor esponjosidad de lo que les gusta; la información entregada previamente a la evaluación fue determinante en la elección de este tipo de producto.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Galvez, A., Noratto, G., Chambi, F., Debaste, F. & Campos, D. (2013). Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolyzates as natural antibacterial compounds, *Food Chemistry* 156: 301-304.

Akhtar, M. S., Zulifqar, N., Ahmad, N., Bhatti, N., & Ali, A. (2006). Nutritive value of some bakery products from selected bakeries in Faisalabad. *Pakistan Journal of Food Science*, 16(1–4), 9–14.

Alam Md. N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*; 21: 143 - 152.

Ameur, L. A., Mathieu, O., Lalanne, V., Trystram, G., & Birlouez-Aragon, I. (2007). Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. *Food Chemistry*, 101; 1407–1416.

Anese, M. & Suman, M. (2013). Mitigation strategies of furan and 5- hydroxymethylfurfural in food. *Food Research International*, 51, 257-264. A.O.A.C. (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists.

AOAC. (1990). *Official método of análisis* (13th ed). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.

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

Arora, B., Kamal, S. & Sharma, V-P. (2017). Sensory, nutritional and quality attributes of sponge cake supplemented with mushroom (*Agaricus bisporus*) powder. *Nutrition & Food Science* 47 (4), 578-590.

Barba, F.J., Esteve, M.J. & Frigola, A. (2012). High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 307–322.

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

Briones, V., Plaza, M., Giovagnoli, C. & Jamett, F. (2014). High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT - Food Science and Technology* 60: 525-534.

Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Ait-Ameur, L., & Fogliano, V. (2008). Characterization of Maillard reaction in bread crisps. *European Food Research and Technology*, 228: 311-319.

Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Açar, Ö.Ç., Gökmen, V., et al. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42: 1295-1302.

Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 793-810.

Carretero, M.E. 2000. Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual del Medicamento*. 24(235): 633-636.

Cascaes, A., Hidalgo, D., Zarur, M., Rosenthal, A., Fortes, L. & Valeriano, R. (2021). Combination of enzyme-assisted extraction and high hydrostatic pressure for phenolic compounds recovery from grape pomace. *Journal of Food Engineering* 288: 110-128.

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

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D. & Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides Lamk*. *Food Chemistry* 100:1044–1048.

- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.
- Da Fonseca, A., Pasquel-Reátegui, J., Fernández, G. & Martínez, J. (2014). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus L.*) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International* 77 (3): 675-683.
- Dai, J. & Mumper, R. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties – Review. *Molecules* 15: 7313-7352.
- De la Cruz Lapa, P. (2014). Aprovechamiento integral y racional de la tara (*Caesalpinia spinosa* – *Caesalpinia tinctoria*). *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 7 (14), 64–73.
- Delgado, C., Seiquer, I., Haro, A., Castellano R. & Navarro, M.P. (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chemistry* 122, 145–153.
- Deng J., Cheng W., Yang G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH* assay. *Food Chemistry*; 125: 1430–1435.
- Deng, Y., Zhaob, Y., Padilla, O. & Yang, G. (2015). Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis L.*, *Industrial Crops and Products* 74: 803–809.
- Derringer, G, & Suich, R. (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology* 12(4): 214 – 219.
- EC (2002). Opinion of the scientific committee on food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. European Commission, Belgium.
- EFSA (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA J.* 10, 2938–2976.

ENCA (2010). Informe final "Encuesta Nacional de Consumo Alimentario". Universidad de Chile.

Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100, 245–253.

Fernández, M., Casas, L., Mantell, C. & Martínez. E. (2015). Use of high-pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29, 94-106.

Flores, H., Leon, C., Estarrón, M. & Orozco, I. (2016). Process optimization for the extraction of antioxidants from mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) by the response surface methodology (RSM) approach. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15 (3), 773-785.

Fogliano, V. (2014). Maillard reaction products: occurrence, mitigation strategies and their physiological relevance (Tesis Doctoral) Corvinus University of Budapest. Faculty of Food Science. Department of Food Chemistry and Nutrition. Budapest.

Fragoso, A.V., Paz, H.M., Chanes, J.W., Torres, J.A. (2011). Reaction kinetics at high pressure and temperature: effects on milk flavor volatiles and on chemical compounds with nutritional and safety importance in several foods. *Food Bioprocess Technology* 4: 986–995.

Fundación Chile. (2013). Chile saludable, Oportunidades y desafíos de innovación (Volumen 2). [En línea] <<https://fch.cl/wp-content/uploads/2015/01/ESTUDIO-CHILE-SALUDABLE-VOLUMEN-II.pdf>> [Consulta: 14 de marzo, 2018].

Galili S. y Hovav R., Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in dry seeds. *Polyphenols in Plants*, 1:305–323, 2014.

Garro Gálvez, J.M., Riedl, B. & Conner, A. H. (1997). Analytical Studies on Tara Tannins. *Holzforschung*, 51 (3): 235-43.

- Gironi, F., & Piemonte, V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design* 89, 857-862.
- Gökmen, V., & S, Senyuva, H. Z. (2007a). Effects of some cations on the formation of acrylamide and furfurals in glucose-asparagine model system. *European Food Research and Technology*, 225, 815-820.
- Gökmen, V., Açar, Ö.Ç., Köksel, H., & Acar, J. (2007b). Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chemistry*, 104; 1136 – 1142.
- Gökmen, V. & Morales, F.J. (2014). Processing Contaminants: Hydroxymethylfurfural. *Encyclopedia of Food Safety*, Volume 2.
- Gutierrez, H. (2012). Análisis y Diseño de Experimentos. Capítulo 12: Optimización de procesos con metodología de superficie de respuesta *en* A. Delgado (Ed.), *Análisis y Diseño de Experimentos* (Tercera ed., pp. 367-368). Editorial McGRAW-Hill.
- Hagerman, A. E. (1998). Tannin chemistry. [En línea] Retrieved from <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannins.pdf>> [Consulta: 16 de junio, 2020].
- Huang, H. W., Hsu, C. P., Yang, B. B. & Wang, C. Y. (2013). Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in Food Science & Technology* 33, 54-62.
- IARC (1994). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 60, 389.
- JECFA, 2011. Safety evaluation of certain contaminants in food. Acrylamide. In: 72nd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), FAO JECFA Monograph 8, p1–151.
- Jun, X., Deji, Sh., Shou, Z., Bingbing, L., Ye, L. & Rui, Z. (2009). Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics* 382, 139–143.

Jun, Xi. (2013). High-Pressure Processing as Emergent Technology for the Extraction of Bioactive Ingredients from Plant Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (8): 837-852.

Kardel, M., Taube, F., Schulz, H., Schütze, W. & Gierus, M. (2013). Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts – review and new aspects. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 86, 154 – 166.

Khan, N.S., Ahmad, A. & Hadi, S.M. (2000). Antioxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chemico-biological Interactions*. 125, 177–189.

Khan, SH., Aslam, R. & Makroo, H. (2018). High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *Journal of Food Process Engineering*; 12-96.

Keramat, J., LeBail, A., Prost, C. & Jafari, M. (2011). Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food Bioprocess Technology* 4: 530–543.

Khoddami, A., Wilkes, M. & Roberts, T. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds – Review. *Molecules*18: 2328-2375.

Kim, J-H., Lee, H-J., Lee, H-S., Lim E-J, Immd, J-Y & Suh, H-J. (2012). Physical and sensory characteristics of fibre-enriched sponge cakes made with *Opuntia humifusa*. *Food Science and Technology* 478-484.

Kondo, K., Takaishi, Y., Shibata, H. & Higuti, T. (2006). ILSMRs (intensifier of betalactam-susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) from Tara [*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze]. *Phytomedicine* 13:209–212.

Kowalski, S., Lukaszewicz, M., Chodak, A.D. & Zięć, G. (2013). 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) – Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, Vol. 63, No. 4, pp. 207-225.

Lee, C.-H., Chen, K.-T., Lin, J.-A., Chen, Y.-T., Chen, Y.-A., Wu, J.-T., Hsieh, C.-W. (2019). Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods, *Trends in Food Science & Technology*.

- Li, D., Chen, Y., Zhang, Y., Lu, B., Jin, C., Wu, X., et al. (2012). Study on mitigation of acrylamide formation in cookies by 5 antioxidants. *Journal of Food Science*, 77, 1144-1149.
- Maran, J., Manikandan, S., Priya, B. & Gurumoorthi, P. (2013). Box-Behnken design based multi-response analysis and optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from tea (*Camellia sinensis L.*) leaves *Journal of Food Science and Technology* 52, 92 – 104.
- Marcano, D. & Masahisa, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica*, segunda edición, Editorial Torino, Venezuela.
- Markom, M., Hasan, M., Daudb, W., Singh, H. & Jahim, J. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology* 52; 487–496.
- Maroun, R., Rajha, H., Darra, N., Kantar, S., Chacar, S., Debs, E., Vorobiev, E. & Louka, N. (2018). Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. En *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 265-293). Austria: Food Waste Recovery Group.
- Martínez, P., Merle, J., Labidi, J. & El - Bouhtoury, F. (2019). Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 206: 1138-1155.
- Masatcioglu, T.M., Perry, K.W. & Koksel, H. (2015). Effects of formulation and extrusion cooking conditions on furfural and hydroxymethylfurfural content. *Journal of Cereal Science* 65, 31-38.
- Mesías, M., & Morales, F. J. (2015). Acrylamide in bakery products. *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, 7, 131.
- Mogol, B. & Gökmen, V. (2014). Mitigation of acrylamide and hydroxymethylfurfural in biscuits using a combined partial conventional baking and vacuum post-baking process: Preliminary study at the lab scale. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 26, 265–270.

Mukherjee, P. (2019). Chapter 4: Qualitative Analysis for Evaluation of Herbal Drugs. *En Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs* (págs. 79-149), Kolkata, India: Elsevier.

Muñoz, A.M., Ramos Escudero, D. F., Alvarado Ortiz Ureta, C. y Castaneda, B., (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 73 (3): 142-149. ISSN 1810-634X.

Nguyen, T., Hoang, D., Nguyen, Q., Pham, T. & Nguyen, T. (2018). Study on extraction of tannins from the *Garcinia Mangostana* linn peel in vietnam. *Vietnam Journal of Science and Technology* 56 (4A); 113-120.

Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 320–328.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619-4626.

Pastoriza de la Cueva, S., Álvarez, J., Végvári, Á., Montilla-Gómez, J., Cruz-López, O., Delgado-Andrade, C., & Rufián-Henares, J. A. (2017). Relationship between 5-HMF intake and SMF formation in vivo: An animal and human study. *Molecular nutrition & food research*, 61(3).

Patras, A., Brunton, N. P., Da Pieve, S., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 308–313.

Pedreschi, F., Saavedra, I., Bungler, A., Zuñiga, R.N., Pedreschi, R., Chirinos, R., Campos, D., Mariotti, S. (2018). Tara pod (*Caesalpinia spinosa*) extract mitigates neocontaminant formation in Chilean bread preserving their sensory attributes, *LWT - Food Science and Technology*.

- Pedreschi, F., Salomé, M., Mariotti & Granby, K. (2013). Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 94: 9–20.
- Prasad, K., Yang, B., Zhao, M., Wei, X., Jiang, Y. & Chen, F. (2009) High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Separation and Purification Technology* 70, 41–45.
- Prasad, K., Yang, B., Zhao, M., Sun, J., Wei, X. & Jiang, Y. (2010). Effects of high pressure or ultrasonic treatment on extraction yield and antioxidant activity of pericarp tissues of longan fruit. *Journal of Food Biochemistry* 34: 838–855.
- Prior, R.L; Wu, X; Schaich, K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10, 4290 - 4302.
- Qi, Y., Zhang, H., Wu, G., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., et al. (2018). Reduction of 5-hydroxymethylfurfural formation by flavan-3-ols in Maillard reaction models and fried potato chips. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 98; 5294 - 5301.
- Quirós, A. (2016). Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora. Universidad De Costa Rica Facultad De Ciencias Agroalimentarias Escuela De Tecnología De Alimentos; San José, Costa Rica.
- Raissi, S & Farsani, R.E. (2009). Statistical process optimization through multiresponse surface methodology. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 51: 267-271.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 69-112.
- Rastogi, N. (2013). *Recent Developments in High Pressure Processing of Foods*. Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition. Springer New York Heidelberg Dordrecht London.

Rodríguez, J. (2014). Reformulación de productos horneados para disminuir el contenido en grasa y azúcar mediante sustitución con inulina. efectos sobre la estructura y propiedades físicas. (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica De Valencia. Departamento De Tecnología De Alimentos.

Rosales, M., González, R. (2003). Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques* 9(2): 41-49.

RSA (Reglamento Sanitario de los Alimentos). (2017). Decreto N° 997/96. Versión actualizada. Título XV “Alimentos Farináceos”. Ministerio de Salud. República de Chile.

Saluzzi, G (2017). Plan de negocios para una empresa panadera y pastelera en la ciudad de Iquique. (Tesis Pregrado). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Industrial.

Sánchez, J., Beltran, J. & Gragera, J. (2011). *Caesalpinia spinosa* and *Castanea sativa* tannins: a new source of biopolymers with adsorbent capacity. Preliminary assessment on cationic dye removal. *Industrial Crops and Products* 34: 1238–1240.

Santos, C., González, S., Dueñas, M. & González, Ana M. (2012). Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. *Methods in Molecular Biology*, 864: 427-64.

Sedraoui, S., Badr, A., Michel, M., Doyen, A., Tabka, Z. & Desjardins, Y. (2020). Optimization of the Ultrahigh-Pressure-Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Palm Dates (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Analytical Methods* 13, 1556–1569.

Segundo, C. Román, L., Lobo, M., Martínez, M. & Gómez, M. (2017). Ripe Banana Flour as a Source of Antioxidants in Layer and Sponge Cakes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(4):365-37.

Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J., Macdonald, N., Clewell, H., Allen, B. & Landingham, C.V. (2006). Acrylamide: Review of Toxicity Data and Dose-Response Analyses for Cancer and Noncancer Effects. *Critical Reviews in Toxicology*, 36: 481–608.

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

Skowrya, M., Falguera, V., Gallego, G., Peiró, S. & Almajano, M.P. (2013). Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94: 911–918.

Teixidó, E., Núñez, O., Santos, F.J. & Galceran, M.T. (2011). 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry* 126, 1902–190.

Terán-Hilares, R., Chirinos, R., Pedreschi, R. & Campos, D. (2018). Enhanced antioxidant properties of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins by thermal hydrolysis and its synergistic effects with a-tocopherol, ascorbyl palmitate, and citric acid on sachu inchi (*Plukenetia volubilis*) oil. *Journal of Food Process Engineering*, 41-12613.

The British Standards Institution (2014). *Sensory analysis, Methodology. General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area. ISO 11136:2014.*

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

Torres, R., Montero, G., Beleño, M.T., Toscano, L., Pérez, L.J & Romero, E.E. (2014). Evaluación de Taninos Condensados en Paja de Trigo y Corteza de Vara de Algodón del Valle de Mexicali. Instituto de Ciencias Agrícolas – UABC, Mexicali, Baja California, México.

US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (2000). *Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies– High Pressure Processing.*

Van Der Fels-Klerx, H. J., Capuano, E., Nguyen, H. T., Mogol, B. A., Kocadağlı, T., Taş, N. G., Hamzalıoğlu, A., Van Boekel, M.A.J.S. & Gökmen, V. (2014). Acrylamide and 5-

hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature–time profile effects and kinetics. *Food research international*, 57; 210-217.

Varela, E., Ochoa, A., Tabilo, G., Reyes, J., Pérez-Won, M., Briones, V. & Morales, J. (2012) Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 13; 13–22.

Wilderjans, E., Luyts, A., Brijs, K. & Delcour, J. (2013). Ingredient functionality in batter type cake making. *Trends in Food Science & Technology* 30, 6-15.

Xi, J., Shen, D., Li, Y., & Zhang, R. (2011a). Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves. *Food Control*, 22, 1473-1476.

Xi, J., Shen, D., Li, Y., & Zhang, R. (2011b). Ultrahigh pressure extraction as a tool to improve the antioxidant activities of green tea extracts. *Food Research International* 44: 2783–2787.

Xi, J. (2015). Ultrahigh Pressure Extraction of Bioactive Compounds from Plants-a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(6): 1097-1106.

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

Xuan Cuong, D., Xuan Hoan, N., Huu Dong, D., Minh Thuy, L., Van Thanh, N., Thai Ha, H., Thanh Tuyen, D. & Xuan Chinh, D. (2019). Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge. Cap: Tannins: Extraction from Plants.

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

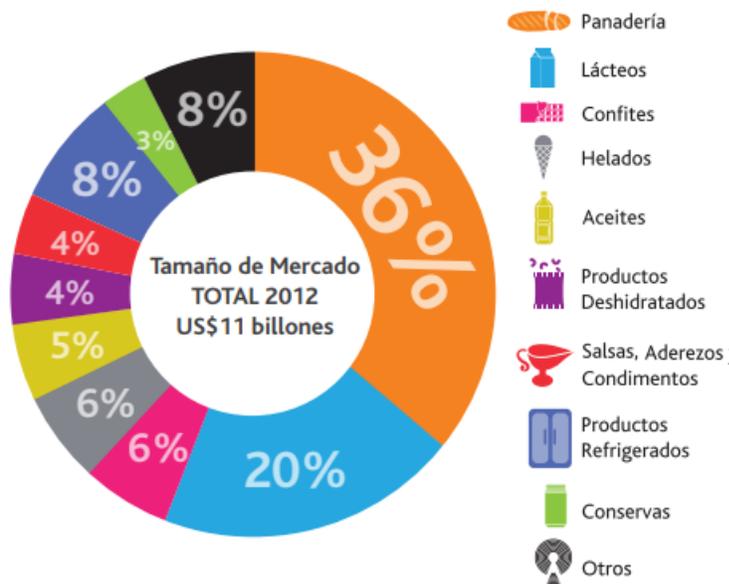
Zhang, Y., Song, Y., Hu, X-S., Liao, X-J., Ni, Y-Y. & Li, Q-H. (2012). Effects of sugars in batter formula and baking conditions on 5-hydroxymethylfurfural and furfural formation in sponge cake models. *Food Research International* 49: 439–445.

Zhang, Y., & Jin, C. (2013). Relationship between antioxidants and acrylamide formation. *Food Research International*, 51, 325–353.

Zhang, Y., & An, X. (2017). Inhibitory mechanism of quercetin against the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in buckwheat flour bread by ultra-performance liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry. *Food Research International* 95; 68 - 81.

10. ANEXOS

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



Anexo 2. Niveles de acrilamida (mg / kg) a en diferentes productos alimenticios (EFSA, 2009).

Food commodities	N ^b	Median	Mean	Maximum
Biscuits	227	169	317	4200
Bread	272	50	136	2430
Breakfast cereals	128	100	156	1600
Cereal-based baby foods	76	42	74	353
Coffee	208	188	253	1158
French fries	529	253	350	2668
Jarred baby foods	84	31	44	162
Other products	854	169	313	4700
Potato crisps	216	490	628	4180
Home cook potato products	121	150	319	2175

^a Values below LOD and values between LOD and LOQ were set to the LOD or the LOQ value, respectively.

^b Number of individual data analyzed for each food category.

Anexo 3. Contenido de HMF de productos alimenticios seleccionados (Capuano & Fogliano, 2011).

Food commodities	HMF content (mg/kg) ^a
Coffee	100–1900
Coffee (instant)	400–4100
Coffee (decaffeinated)	430–494
Chicory	200–22500
Malt	100–6300
Barley	100–1200
Honey	10.4–58.8
Beer	3.0–9.2 ^a
Jam	5.5–37.7
Fruit juices	2.0–22.0
Wine (red)	1.0–1.3 ^a
Cookies	0.5–74.5
Bread (white)	3.4–68.8
Bread (toast)	11.8–87.7
Bread (snacks)	2.2–10.0
Breakfast cereals	6.9–240.5
Baby food (milk-based)	0.18–0.25
Baby food (cereal-based)	0–57.18
Dried fruits	25–2900
Roasted almond	9
Vinegar (wine)	0–21.5 ^a
Vinegar balsamic	316.4–35,251.3 ^a

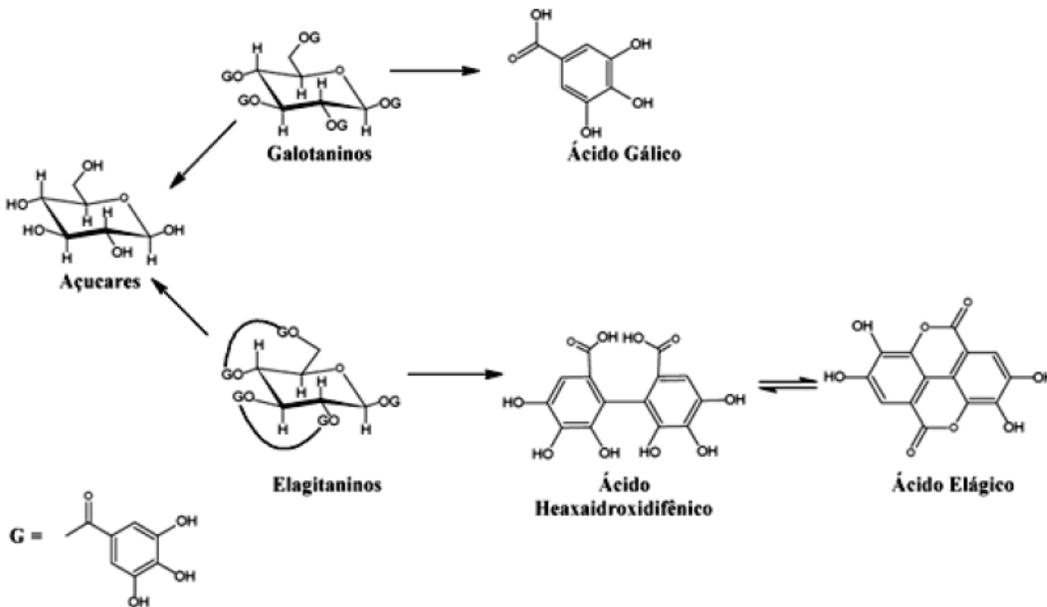
^a mg/L.

Anexo 4. Distribución documentada de *Caesalpinia spinosa*, (Orwa et al., 2009).

Native: Bolivia, Chile, Colombia, Cuba, Ecuador, Peru, Venezuela
 Exotic: Ethiopia, Kenya, Morocco



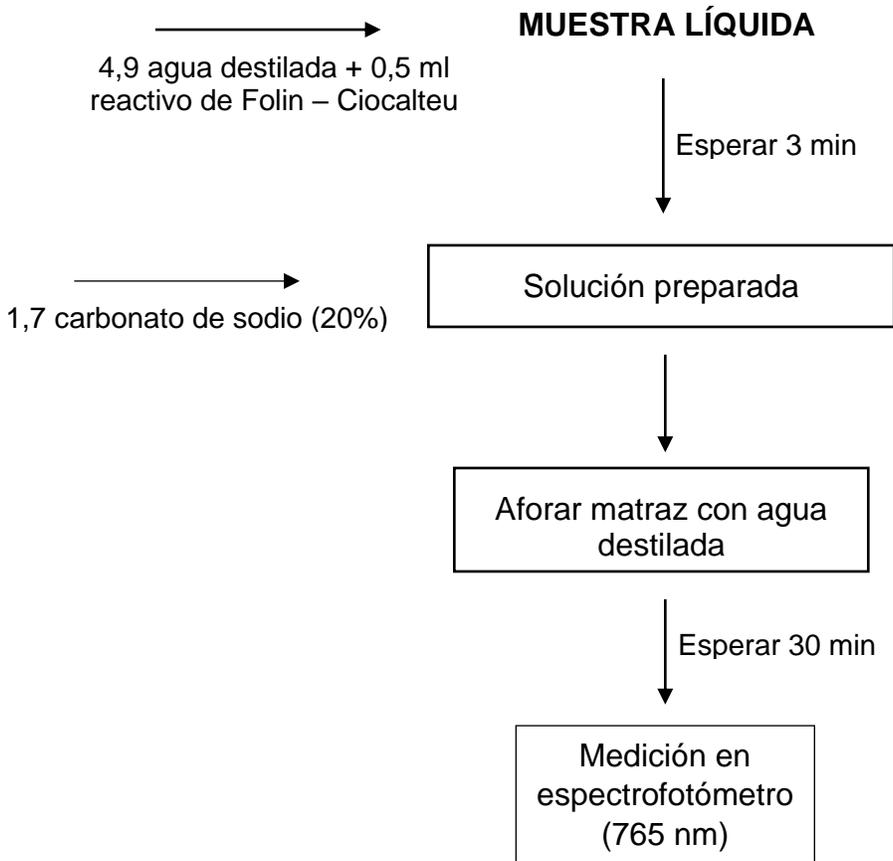
Anexo 5. Relación química de galotaninos y elagitaninos (Hagerman, 1998).



Anexo 6. Diseño experimental Box-Behnken con cuatro variables independientes para la extracción de polifenoles en vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*).

Alta Presión (MPa)	Tiempo (min)	Solvente (% Etanol)	Masa vaina tara/Volumen solvente
350	30	50	1:10
350	30	20	1:20
350	30	80	1:20
350	20	50	1:20
350	30	50	1:30
350	40	50	1:20
250	30	80	1:30
250	30	80	1:10
250	40	50	1:30
250	30	50	1:20
250	40	80	1:20
250	30	20	1:30
250	40	50	1:10
250	20	80	1:20
250	30	20	1:10
250	20	50	1:10
250	30	50	1:20
250	30	50	1:20
250	40	20	1:20
250	20	20	1:20
250	20	50	1:30
150	40	50	1:20
150	30	50	1:10
150	30	20	1:20
150	20	50	1:20
150	30	50	1:30
150	30	80	1:20

Anexo 7. Medición de polifenoles totales: método Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965) y curva de calibración de ácido gálico utilizada.

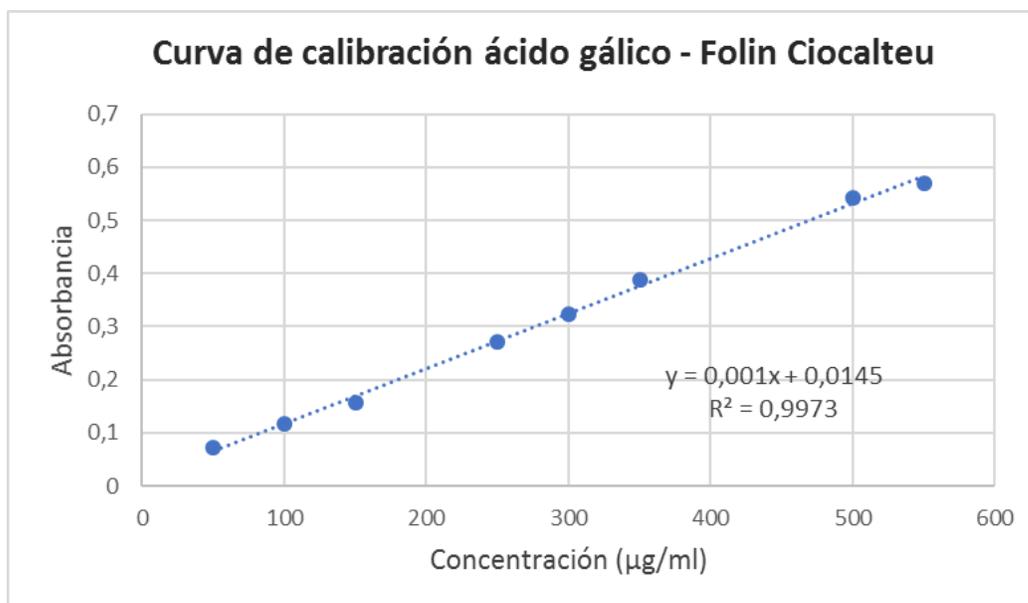


Descripción del método

Antes de la medición, se preparó la solución inicial a partir de 7,5 mg de extracto disueltos en 1 mL de etanol en un matraz aforado de 10 mL.

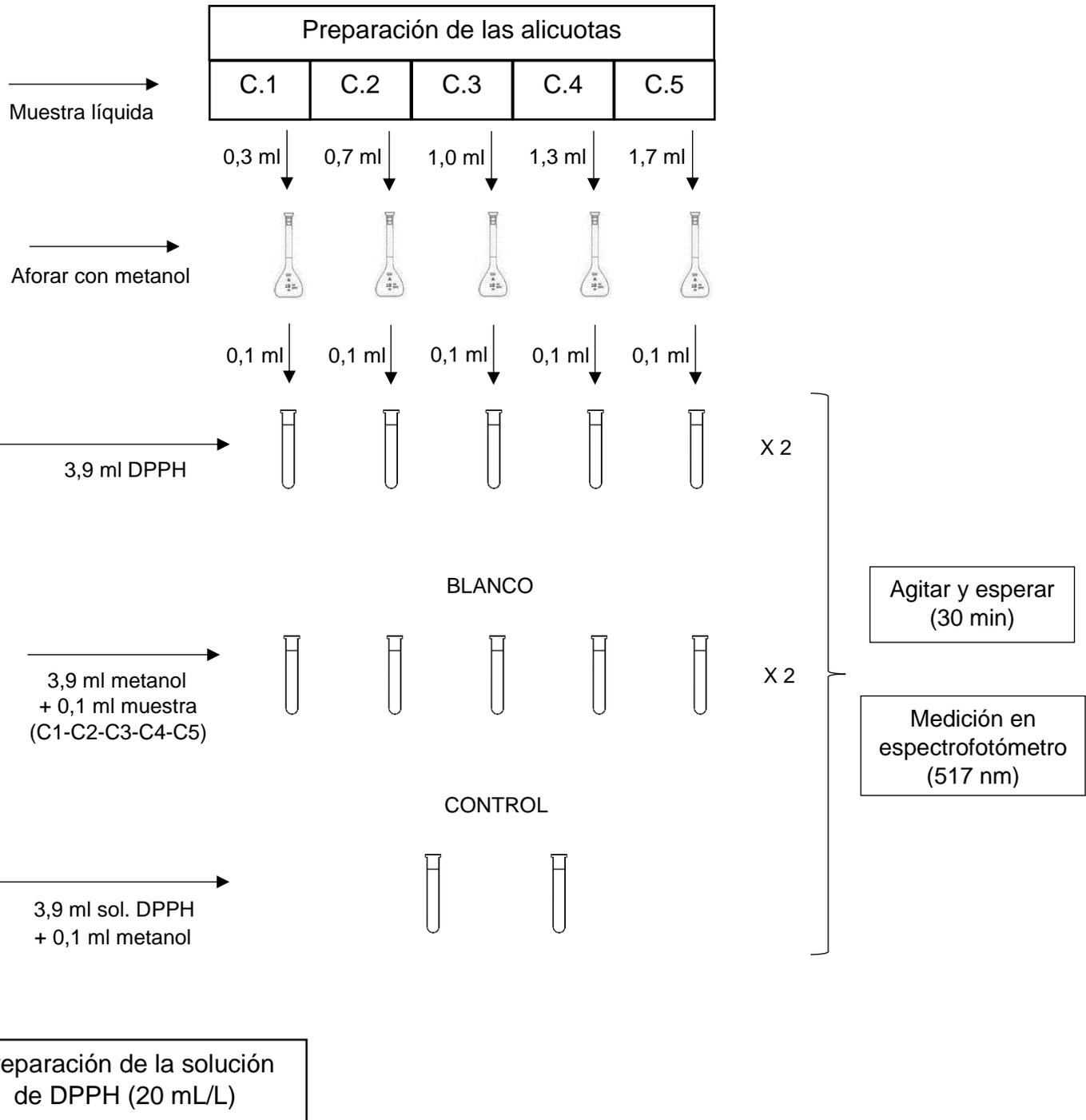
Se utilizó el método descrito por Singleton & Rossi (1965), el cual consiste en la adición de 100 μ L de la muestra líquida en un matraz aforado de 10 mL, a este matraz se añadieron 4,9 mL de agua destilada y 500 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu, luego de la espera de tres minutos, se agregaron 1,7 mL de carbonato de sodio 20% y finalmente el matraz fue aforado con agua destilada. La medición del contenido total de polifenoles se realizó mediante espectrofotometría UV/visible a 765 nm, después de 30 minutos de reacción. La absorbancia obtenida fue interpolada en la curva de calibración de ácido gálico, previamente elaborada. Los resultados obtenidos son expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g). Este ensayo se realizó por triplicado para cada extracto.

Curva de calibración



Anexo 8. Medición de la capacidad antioxidante: método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) descrito por Brand-Williams *et al.* (1995).

Preparación solución: pesar 10 mg de DPPH en un matraz volumétrico de 10 mL, aforando con metanol (Abs > 0,5)



Descripción del método

Se utilizó el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Se preparó una solución madre de concentración 1 mg/mL de metanol, a partir de ésta se preparó la solución de trabajo para el análisis, en donde se diluyó una alícuota de 1 mL en metanol en un matraz aforado de 50 mL.

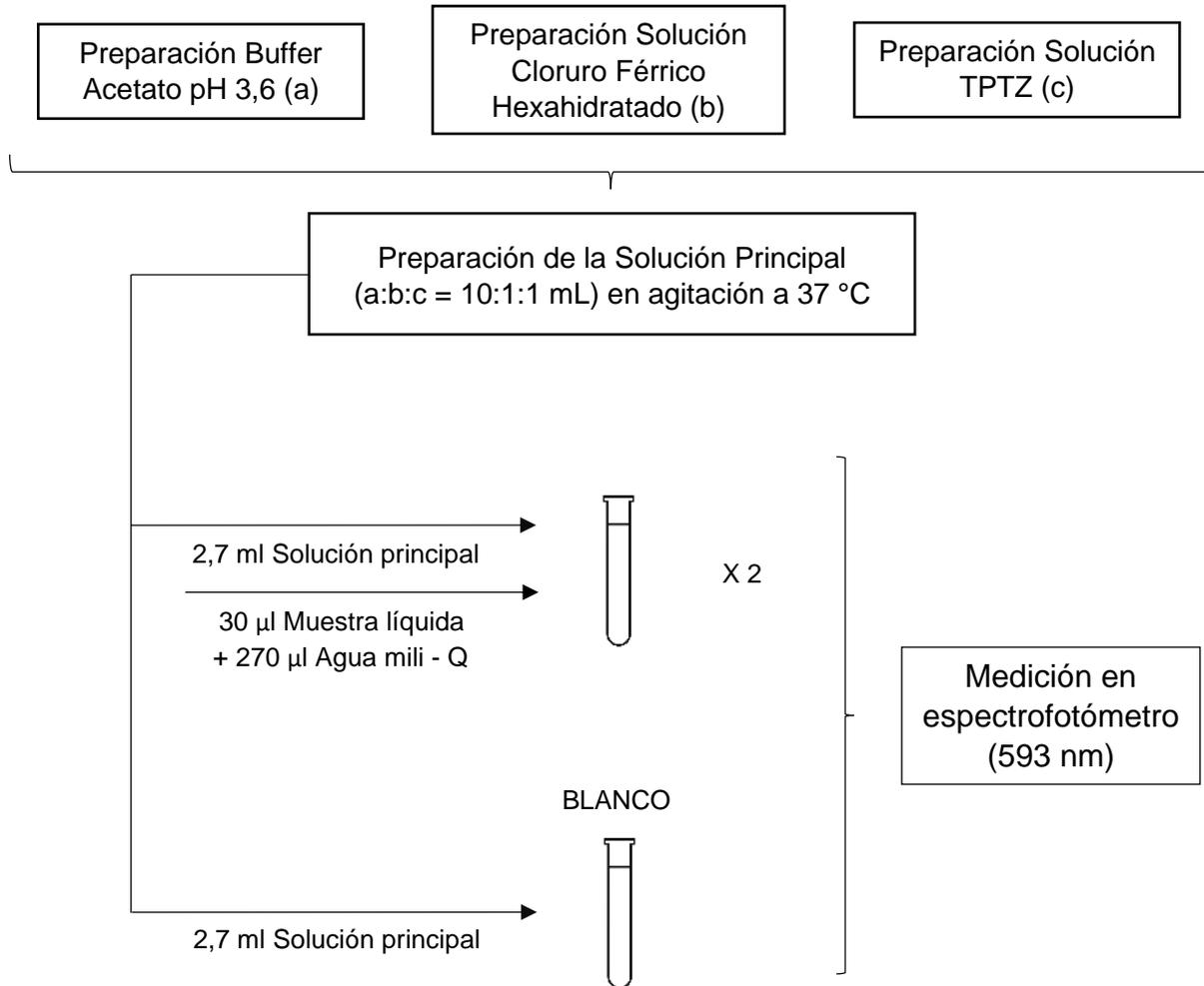
Desde de una solución inicial de 7,5 mg de extracto diluidos en 10 mL de solución etanólica, se construyó una curva de decoloración en base a cinco alícuotas estudiadas previamente, ésta se realizó en duplicado para cada corrida experimental. Para la medición de la muestra, se añadió 0,1 mL de cada alícuota y 3,9 mL de la solución de trabajo de DPPH en tubos de ensayo, se elaboró un blanco para cada alícuota añadiendo la misma cantidad de muestra y 3,9 mL de metanol, y finalmente se preparó un control añadiendo 0,1 mL de metanol y 3,9 de solución de trabajo de DPPH en un tubo de ensayo. Luego de 30 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia de cada tubo a 517 nm en un espectrofotómetro. Con la información obtenida, se determinó el porcentaje de decoloración:

$$\% \text{ Decoloración} = \left(1 - \left(\frac{\text{Abs. muestra} - \text{Abs. blanco}}{\text{Abs. control}} \right) \right) \times 100$$

A partir de esta ecuación, se calculó el valor de IC_{50} tomando en cuenta la siguiente expresión:

$$IC_{50} = \frac{50 - n}{m}$$

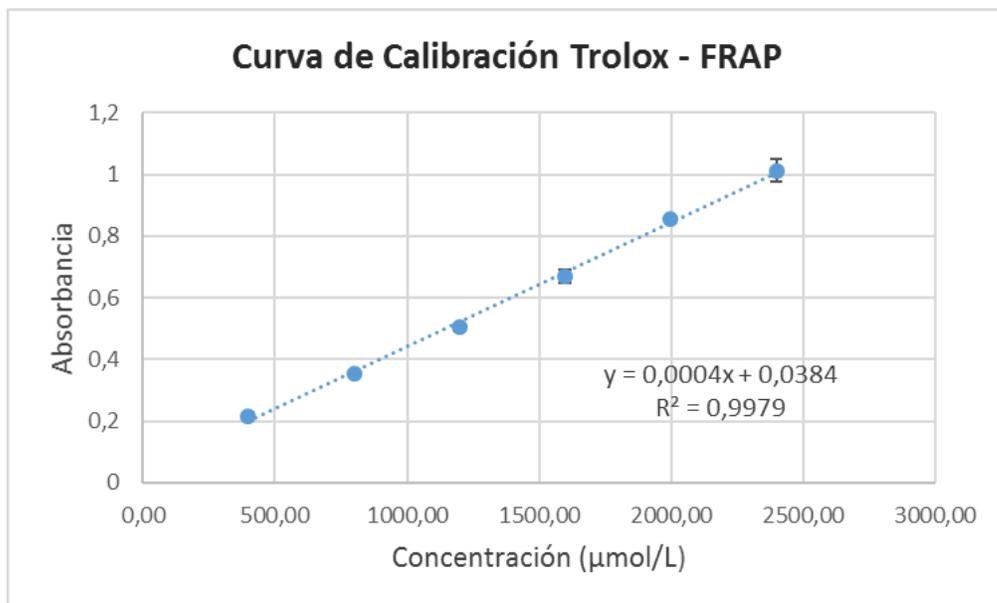
Anexo 9. Medición de la capacidad antioxidante: método del Poder Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP) descrito por Benzie & Strain (1996) y curva de calibración TROLOX utilizada.



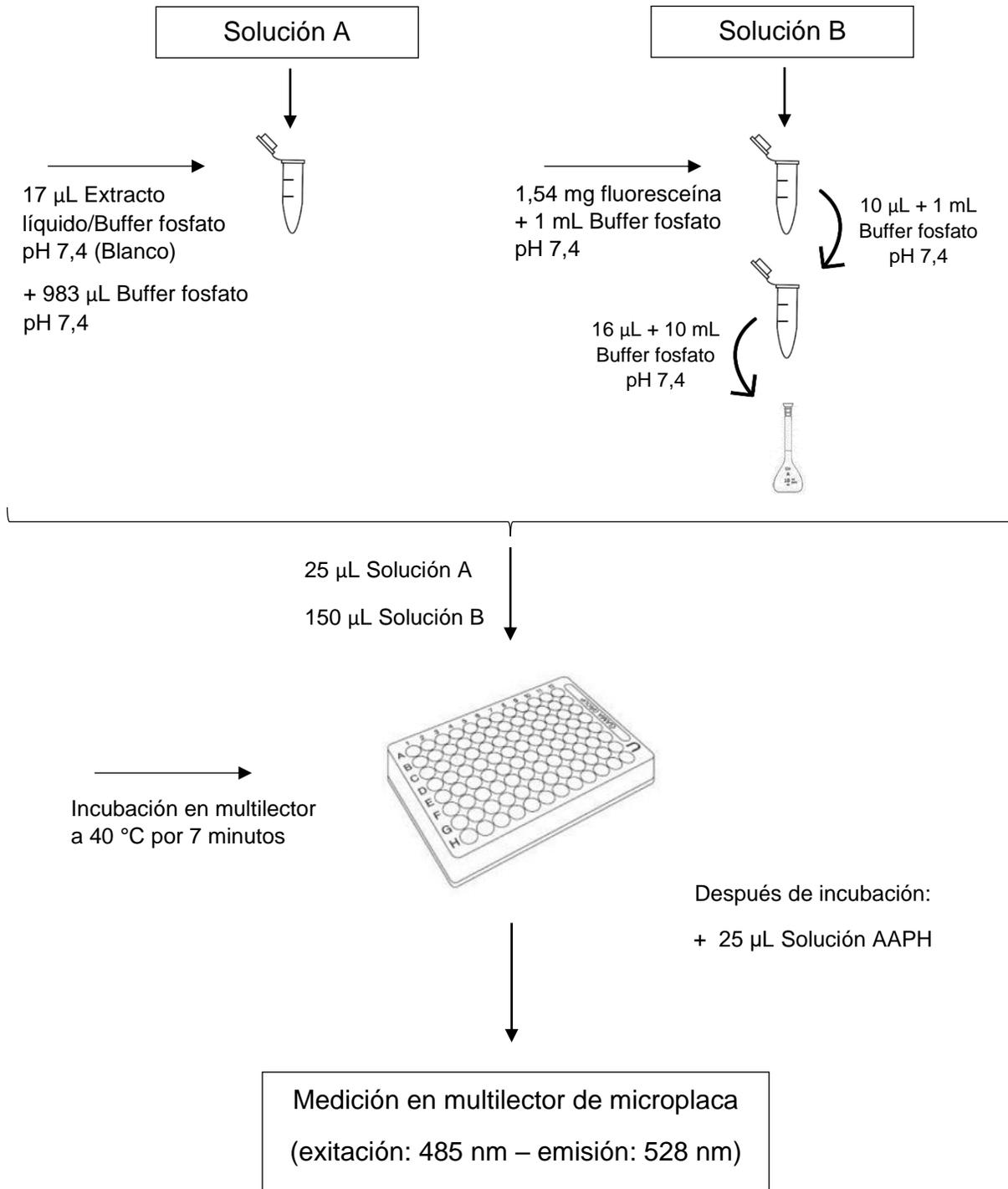
Descripción del método

Se utilizó el método descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones, el cual consistió en la preparación del reactivo FRAP, que contiene una mezcla de tres soluciones preparadas previamente: 2,5 mL del reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mmol/L en HCl 40 mmol/L, 2,5 ml de $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mmol/L y 25 mL del buffer acetato 300 mmol/L a pH 3,6. Esta solución final se incubó a 37 °C en agitación constante. En un tubo de ensayo, se añadió 30 μL de muestra (preparada previamente con 7,5 mg de extracto diluidos en 10 mL de solución etanólica) o agua mili Q para el blanco, 270 μL de agua mili Q y 2700 μL de la solución final del reactivo FRAP. El ensayo se realizó en duplicado por corrida experimental y las mediciones se registraron cada 10 minutos a una absorbancia de 593 nm en espectrofotómetro. Los resultados se obtuvieron a través de la interpolación de los datos en una curva de calibración de trolox y fueron expresados como μmol equivalente trolox por gramo de extracto seco ($\mu\text{mol TE/g}$).

Curva de calibración



Anexo 10. Medición de ORAC – FL: método de la degradación oxidativa de la fluoresceína descrito por Maturana (2019), curva de calibración TROLOX utilizada y curva de decaimiento ORAC – FL.



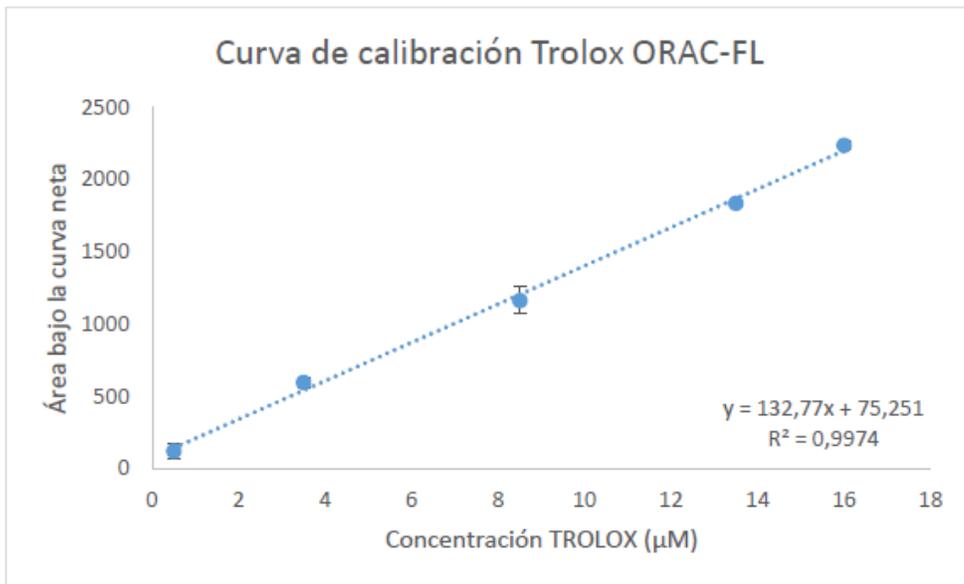
Descripción del método

Se utilizó el método descrito por Maturana (2019), a partir de una concentración 0,75 mg/mL de extracto se preparó una alícuota con 17 μ L de esta solución diluida en 983 μ L de buffer fosfato 75 mM ajustado a pH 7,4 (solución A). Luego se disolvió 1,54 mg de fluoresceína disuelto en 1 mL de buffer fosfato pH 7,4, de esta solución se tomó una alícuota de 10 μ L y se llevó a 1 mL de solución con buffer fosfato pH 7,4, de esta nueva solución se tomó una alícuota de 16 μ L en un matraz aforado ámbar de 10 mL, disolviéndola en una solución buffer fosfato pH 7,4 (solución B). A cada pocillo de una microplaca se agregaron 150 μ L de una solución de fluoresceína en buffer fosfato pH 7,4 (solución B) cuya concentración final en placa fue 40 nM, 25 μ L de muestra (solución A) para ser incubada por 7 minutos a 40°C en el multilector. Trascurrido este tiempo, se agregaron 25 μ L de una solución de AAPH cuya concentración final en placa fue 18,21 mM, resultando así en un volumen final de 200 μ L en placa. El blanco se realizó utilizando solución buffer fosfato pH 7,4 en lugar de la muestra.

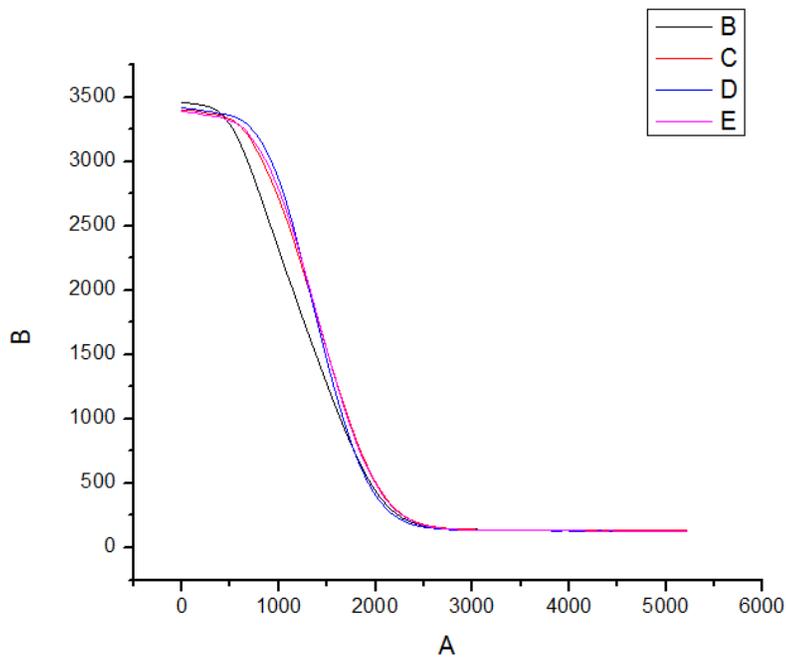
La fluorescencia se midió utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión 528 nm a intervalos de un minuto en un multilector de microplacas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc., utilizando microplacas de poliestireno blancas de 96 pocillos y el programa Gen 5 para controlar el equipo. Luego de obtener las curvas de decaimiento de la fluorescencia, éstas se normalizaron (F/F_0) y se calculó el área bajo la curva (ABC) de las diferentes concentraciones de extracto. El ABC neto de una muestra fue calculado al restar a cada ABC su blanco correspondiente. En este ensayo, las curvas de decaimiento de la fluoresceína presentaron un tiempo de latencia, que corresponde al tiempo en que la sonda está siendo protegida por los antioxidantes presentes en los extractos.

Los resultados se obtuvieron a través de la interpolación las ABC neta de las muestras en la curva de calibración de trolox y fueron expresados como μ mol equivalente trolox por gramo de extracto seco (μ mol TE/g). La medición de las muestras se realizó en cuádruplicado para cada extracto.

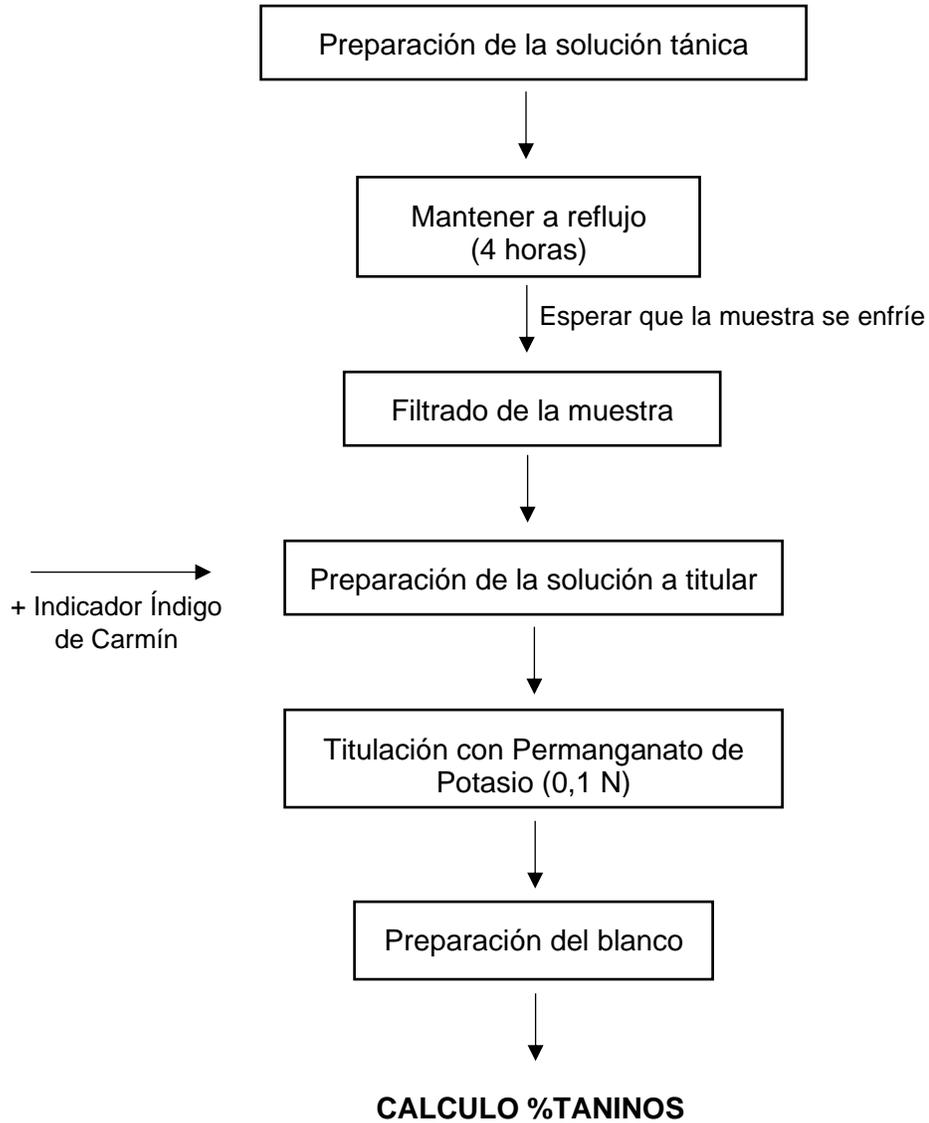
Curva de calibración



Curva de decaimiento



Anexo 11. Medición de la concentración de taninos hidrolizables Descrito por A.O.A.C (Edición 14 -1984).



Descripción del método

Se utilizó el método adaptado del Método de la A.O.A.C (Edición 14 -1984), el cual consistió en una extracción de taninos por medio de un sistema de reflujo por 4 horas con 0,25 g de muestra en 25 mL de agua destilada. Luego de que las muestras se enfriaron, se filtraron al vacío para eliminar la materia sólida remanente. En un matraz Erlenmeyer se añadieron 5 mL de la solución líquida filtrada, 4 mL del indicador índigo de carmín y 150 mL de agua destilada. Finalmente, se tituló la solución con permanganato de potasio 0,1 N hasta el viraje color amarillo y el blanco preparado con agua destilada y los reactivos en las mismas proporciones. Se tomaron en cuenta los volúmenes obtenidos y se aplicaron en la siguiente ecuación de porcentaje de taninos hidrolizables:

$$\% \text{ Taninos hidrolizados} = \left(\frac{(V_m - V_b) \cdot Pfg \cdot e}{\text{mg muestra inicial}} \right) \times 100$$

Donde:

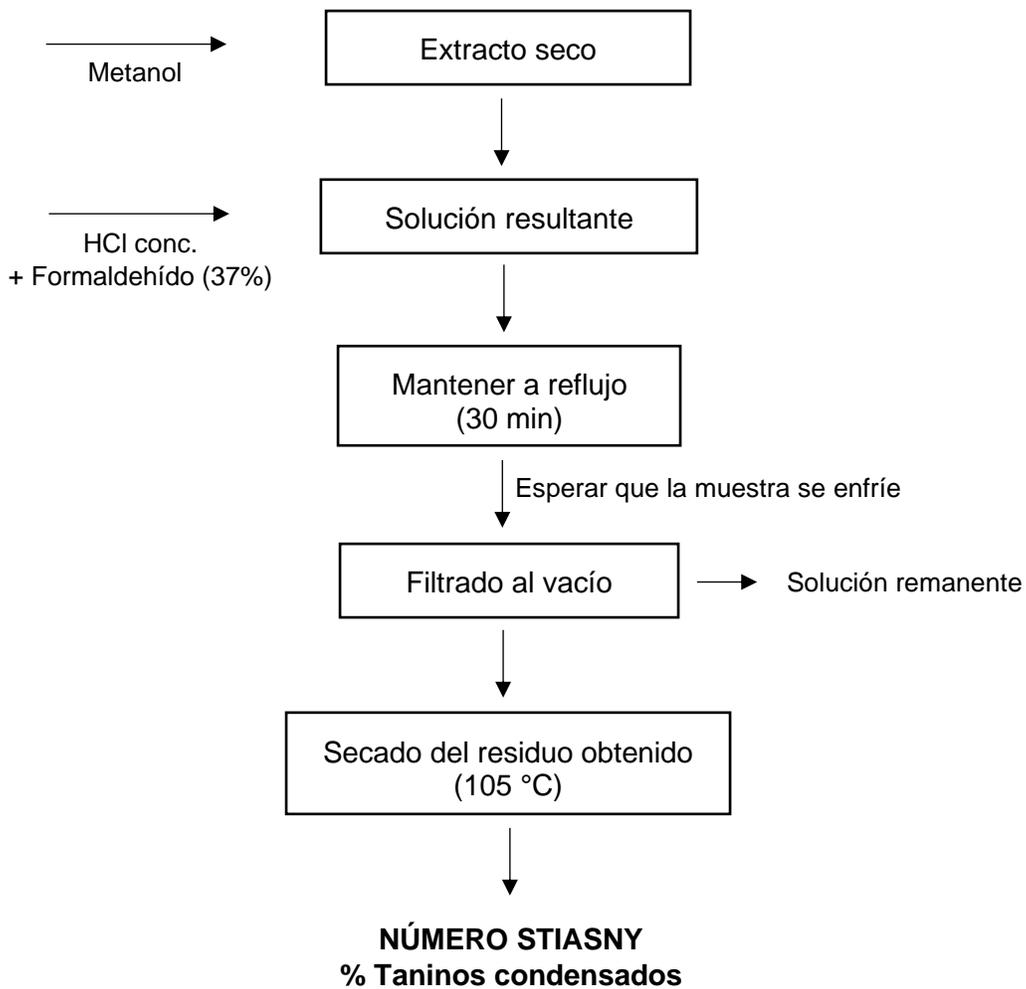
V_m : volumen gastado muestra

V_b : volumen gastado blanco

Pfg : peso fórmula tanino (4,2 g)

e : electrones intercambiados en la reacción (2e)

Anexo 12. Medición de la concentración de taninos condensados. Método gravimétrico Stiasny. Descrito por Aguilar *et al.* (2012).



Descripción del método

Se utilizó el método descrito por Aguilar *et al.* (2012), que consistió en disolver 0,1 g de extracto seco en 10 mL de metanol en un matraz de balón esmerilado, a esta mezcla se añadió 1 mL de ácido clorhídrico concentrado (ácido clorhídrico fumante 37%) y luego 2 mL de formaldehído al 37%; esta solución final se calentó a reflujo durante 30 minutos. Una vez enfriada la solución, se filtró al vacío empleando un papel filtro Sartorius grado 292 previamente tarado. El precipitado sólido se secó a 105 °C hasta alcanzar masa constante. El experimento se realizó en duplicado para cada corrida experimental, y se calculó el número de Stiasny de acuerdo a la relación entre el precipitado formado con respecto a la masa inicial de extracto seco:

$$\text{Número Stiasny} = \frac{\text{Masa precipitado (g)}}{\text{Masa inicial extracto (g)}} \times 100$$

El porcentaje de taninos condensados se calculó multiplicando el número Stiasny por el rendimiento obtenido al secar cada extracto, de acuerdo con la siguiente fórmula:

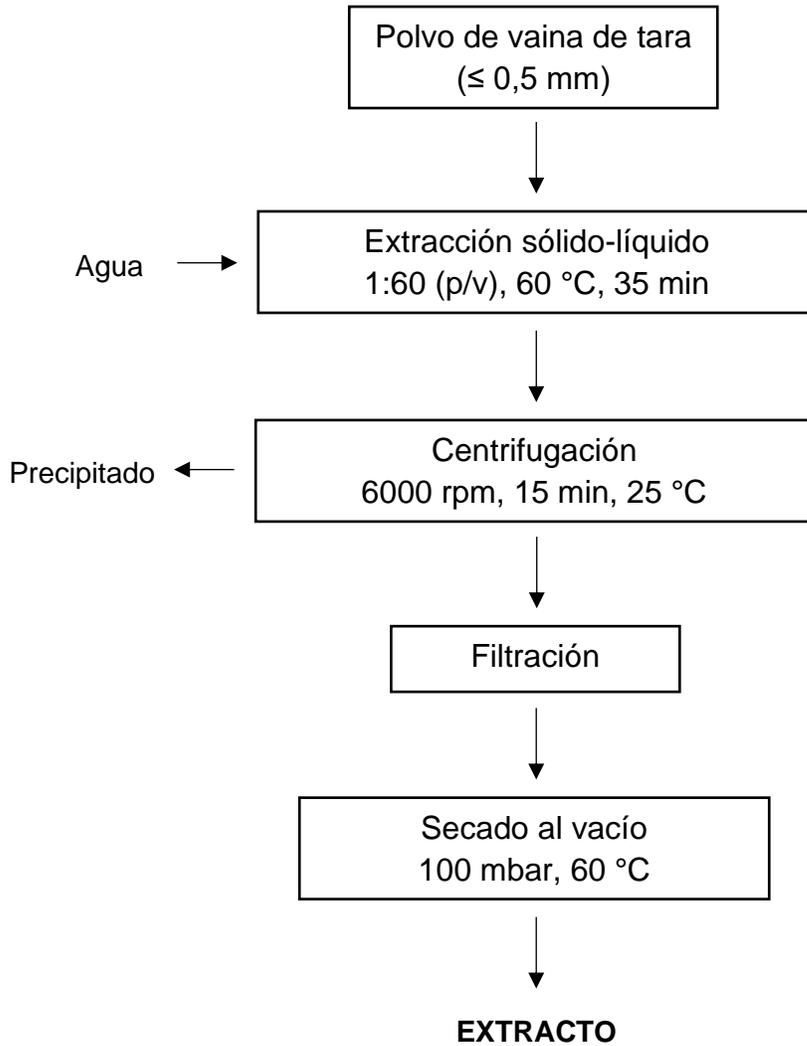
$$\% \text{ Taninos condensados} = \frac{\text{NS} \cdot \text{RE}}{100}$$

Donde:

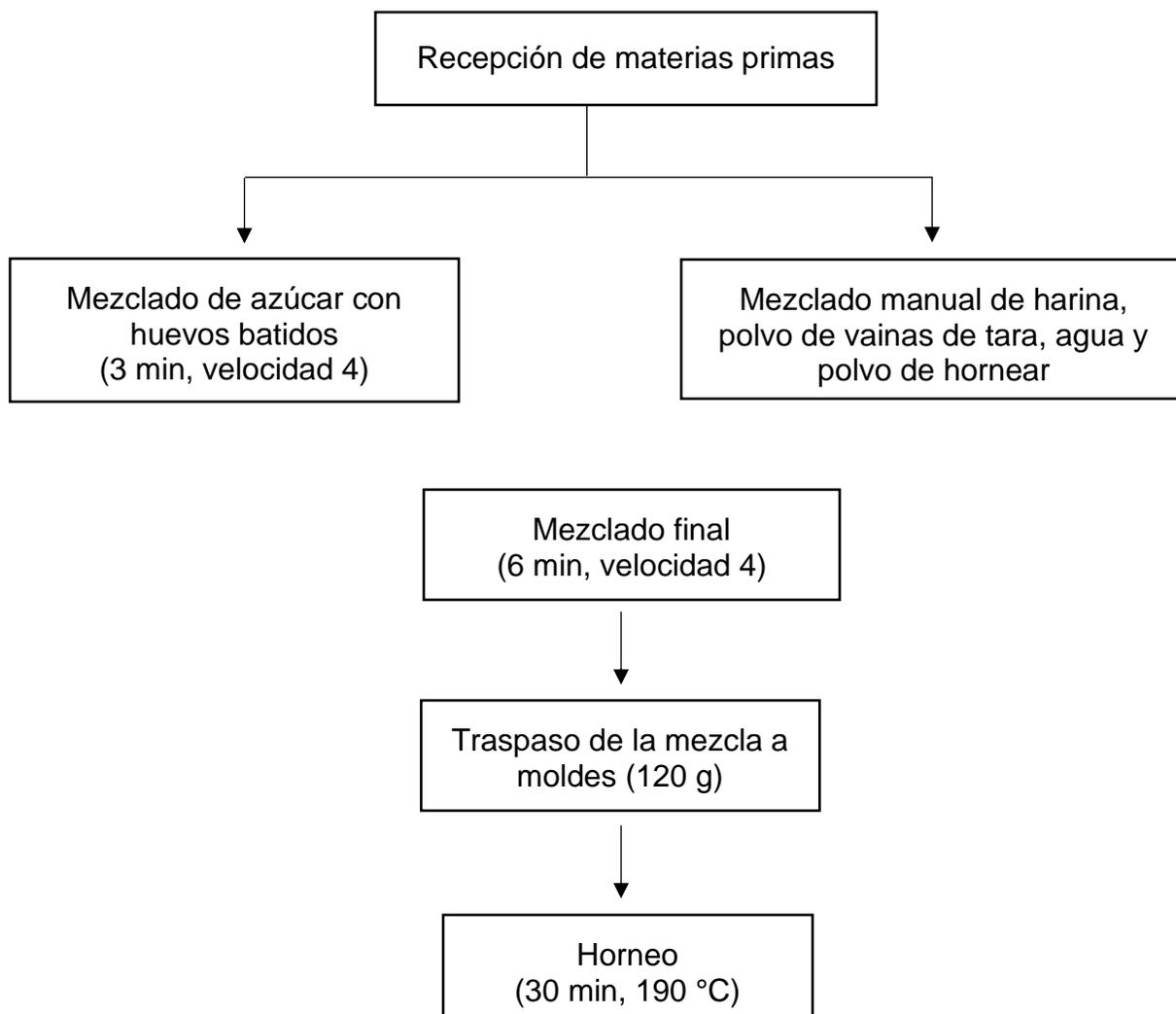
NS: número stiasny

RE: rendimiento extracto

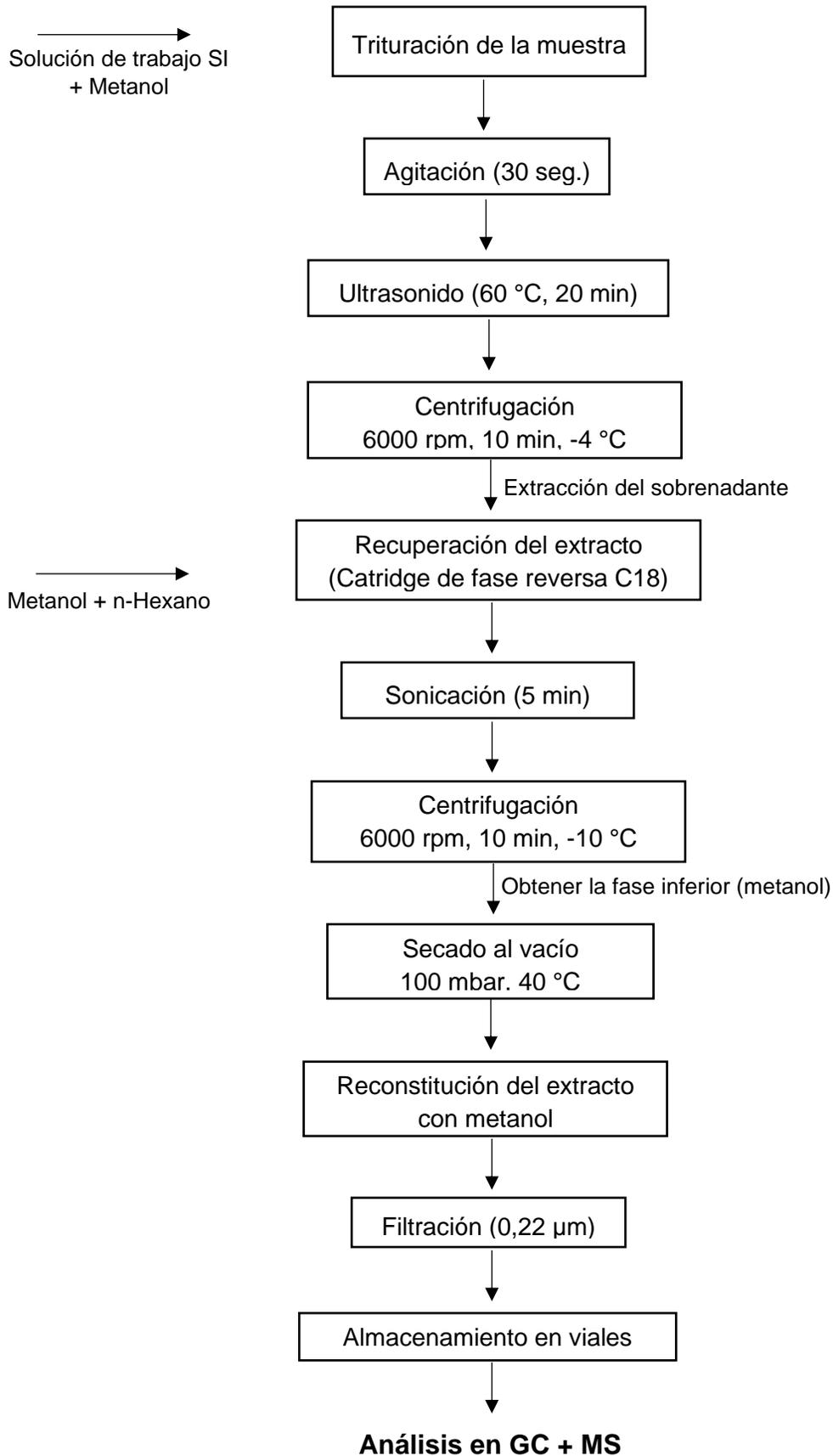
Anexo 13. Metodología extracción por solvente de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*). Modificado de Bravo (2010).



Anexo 14. Proceso de elaboración de queque. Modificado de Segundo *et al.* (2017) & Kim – Hwan (2012).



Anexo 15. Determinación de acrilamida en un producto horneado: método modificado de Ciesarová *et al.* (2006) y condiciones del equipo de cuantificación.



Descripción del método

En un tubo de centrifuga se colocaron 2 g de muestra triturada, 40 µL de la solución de trabajo SI (20mg/L AA-D3) y 10 mL de metanol. Las muestras fueron sometidas a agitación y a tratamiento por ultrasonido a 60°C por 20 minutos. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación fue filtrado en un cartridge de fase reversa C18 en condiciones de vacío. Posteriormente, el extracto fue depositado en otro tubo de centrifuga, en donde se añadieron 5 mL de metanol y 10 mL de n-hexano; la muestra obtenida fue sonicada y centrifugada. La fase metanólica fue secada a 40 °C al vacío. Finalmente, la muestra seca fue reconstituida con metanol y filtrada con un filtro de jeringa de 0,2 µm, la muestra sin interferentes fue almacenada en viales de 2 mL para su posterior inyección.

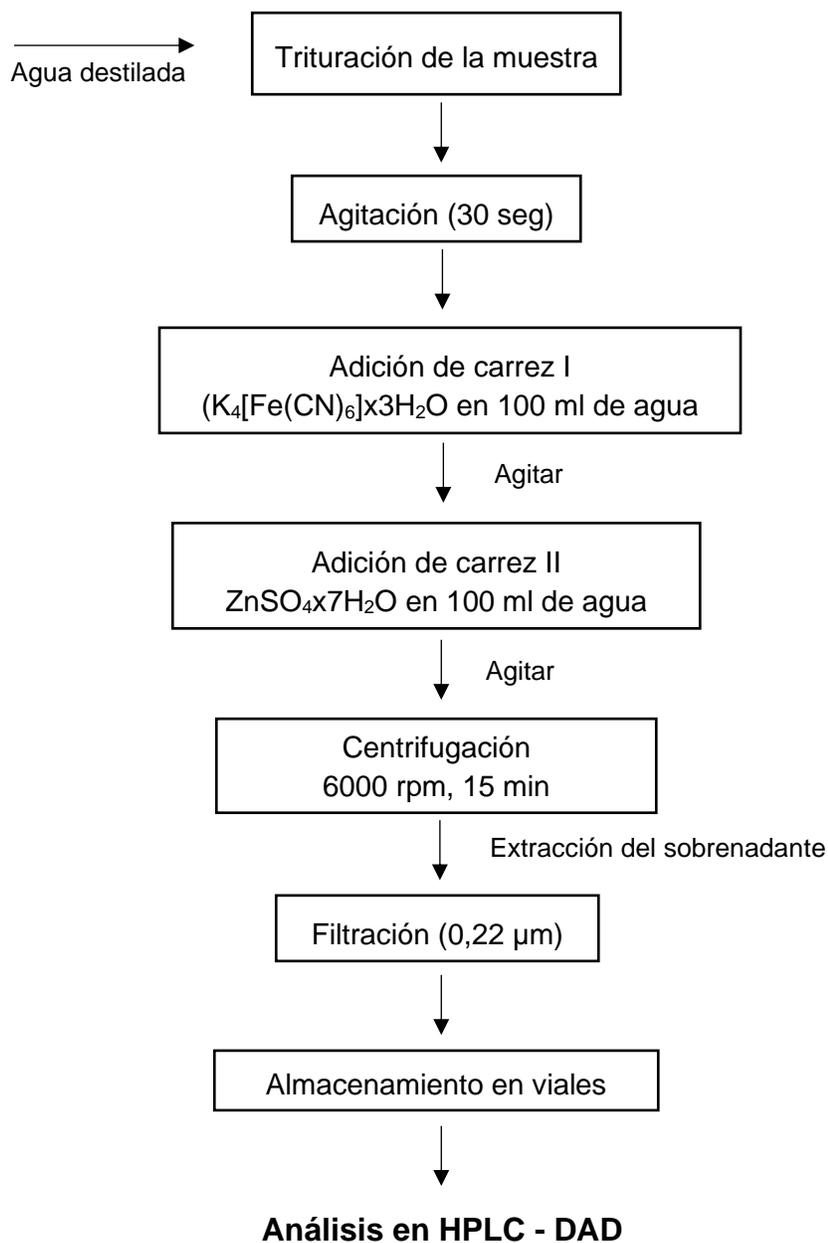
Condiciones del equipo GC – MS para la cuantificación

Para la cuantificación de AA se utilizó un equipo de cromatografía gaseosa acoplada a un detector masa (GC/MS), las muestras fueron analizadas por método GC – MS – ionización química (CH₄) en modo SIM negativo. En la siguiente tabla, se presentan las condiciones utilizadas en el equipo para la medición.

Condiciones del equipo GC/MS para la cuantificación de AA.

Equipo	Parámetro	Condición
Columna	Columna	30 m x 250 μ m x 0.25 μ m
	Tiempo de retención	13 minutos
Inyector automático	Velocidad de inyección	50 μ L/seg
	Volumen de inyección	2 μ L
	Velocidad de llenado	5 μ L/seg
Cromatógrafo de gases	Temperatura de entrada	200 °C
	Rampa de temperatura del horno	60 °C por 1 min, 10 °C/min hasta 190 °C y 50 °C/min hasta 240 °C
	Flujo columna	0,8 mL/min helio
Detector de masa	Temperatura de la fuente (MS)	250 °C
	Temperatura del cuádruplo (MS)	150 °C
	Temperatura de interfase	250 °C

Anexo 16. Determinación de hidroximetilfurfural en un producto horneado: método descrito por Toker *et al.* (2013) y condiciones del equipo de cuantificación.



Descripción del método

En un tubo de centrifuga se adicionó 1 g de muestra triturada y 20 mL de agua destilada. A la mezcla resultante se añadieron 1,5 mL de Carrez I y II, y se sometieron a centrifugación por 15 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante es filtrado con un filtro de jeringa de 0.22 μm y almacenado en un vial de 2 mL para su posterior análisis.

Condiciones del equipo HPLC-DAD para la cuantificación

La determinación de HMF se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). En siguiente tabla, se presentan las condiciones utilizadas en el equipo para la medición.

Condiciones cromatográficas del equipo HPLC-DAD para la cuantificación de HMF.

Parámetro	Condición
Fase móvil	ácido acético al 1% acetonitrilo (95:5)
Flujo fase móvil	1 mL/min
Longitud de onda del detector	284 nm
Volumen de inyección	20 μL
Columna	fase estacionaria: C18 tamaño de poro: 120 Å tamaño de partículas: 5 μm diámetro: 4,6 mm longitud: 150 mm

Anexo 17. (a) Kit para evaluación sensorial entregado a cada familia con la cantidad de muestras correspondientes, junto con agua purificada necesaria y consentimiento informado. (b) Disposición de los elementos que cada consumidor necesitó para llevar a cabo la evaluación.

(a)



(b)



Anexo 18. Estudio con consumidores realizado “en casa” de cada encuestado.



Anexo 19. Formulario on-line utilizado para llevar a cabo la evaluación sensorial individual.

Evaluación sensorial queque con propiedades antioxidantes

Instrucciones:

- No consuma alimentos ni fuma antes de la evaluación (30 minutos).
- No se cepille los dientes antes de la evaluación (30 minutos).
- No manipule las muestras antes de la evaluación.
- Realice la evaluación de manera individual y no la comente hasta que todos los integrantes del hogar finalicen la encuesta.
- Realice la evaluación el mismo día que usted recibe las muestras.
- Tenga un cuchillo a mano para cortar las muestras.
- Siga exactamente las indicaciones del formulario.

***Obligatorio**

Nombre *

Tu respuesta _____

Edad *

10 a 19 años

20 a 29 años

30 a 49 años

50 a 59 años

60 a más

Género *

Femenino

Masculino

Hábitos de consumo

Contesta las siguientes preguntas de hábitos de consumo

¿Usted posee o sigue alguna de las siguientes opciones o condiciones alimentarias? *

Intolerancia al gluten

Alergia a las proteínas del huevo

Vegetariano

Resfriado/fiebre/infección respiratoria

Ninguna

¿Usted consume habitualmente alguno de los siguientes productos? Puede marcar más de una opción: *



Berlin



Cupcake



Queque



Media luna

Presentación del producto

A continuación, le presento una descripción del queque con propiedades antioxidantes en formato individual. Por favor le atentamente la información.

Queque con propiedades antioxidantes

Producto horneado elaborado con ingredientes tradicionales, el cual posee una alta concentración de antioxidantes obtenidos a partir de las semillas de tara

¿Qué beneficios tiene su consumo a largo plazo?


Antiflamatorio


Antimutagénico


Antitumoral


Antioxidante


Antidiabético

¿De dónde se obtienen estos antioxidantes?

La Tara
Es un árbol leguminoso de tamaño pequeño, nativo de América del Sur, distribuido principalmente entre Venezuela hasta la IV Región de Chile.

Las frutas son: semillas, semillas y plúsculo, que contienen en su interior semillas molidas.

Las semillas contienen un alto contenido de antioxidantes, los que son extraídos para incorporar al queque que usted probará a continuación.

Evaluación Muestra 498

* Desmenule la muestra 498 con cuidado.
* Antes de degustar, beba un sorbo de agua.

Observe la muestra y responda: ¿Qué le parece la apariencia general de esta muestra? *

Me disgusta mucho

Me disgusta

Me disgusta levemente

No me gusta ni me disgusta

Me gusta levemente

Me gusta

Me gusta mucho

Corte la muestra con un cuchillo, obsérvela y responda: ¿Qué le parece el color de la miga de esta muestra? *

Me disgusta mucho

Me disgusta

Me disgusta levemente

No me gusta ni me disgusta

Me gusta levemente

Me gusta

Me gusta mucho

De acuerdo con lo que observó, ¿Qué le parece la intensidad de color de la miga de esta muestra? *

Mucho más clara de lo que me gusta

Más clara de lo que me gusta

Está justo como me gusta

Más oscura de lo que me gusta

Mucho más oscura de lo que me gusta

Evaluación Muestra 763

* Desmenule la muestra 763 con cuidado.
* Antes de degustar, beba un sorbo de agua.

Observe la muestra y responda: ¿Qué le parece la apariencia general de esta muestra? *

Me disgusta mucho

Me disgusta

Me disgusta levemente

No me gusta ni me disgusta

Me gusta levemente

Me gusta

Me gusta mucho

Corte la muestra con un cuchillo, obsérvela y responda: ¿Qué le parece el color de la miga de esta muestra? *

Me disgusta mucho

Me disgusta

Me disgusta levemente

No me gusta ni me disgusta

Me gusta levemente

Me gusta

Me gusta mucho

De acuerdo con lo que observó, ¿Qué le parece la intensidad de color de la miga de esta muestra? *

Mucho más clara de lo que me gusta

Más clara de lo que me gusta

Está justo como me gusta

Más oscura de lo que me gusta

Mucho más oscura de lo que me gusta

Comparación

Luego de haber evaluado las dos muestras, responda las siguientes preguntas

¿Cuál muestra prefiere? *

Primera muestra

Segunda muestra

Cualquiera de las dos

¿Por qué? Explique con detalles las razones de su preferencia. *

Tu respuesta _____

Las siguientes preguntas se harán considerando los beneficios nutricionales descritos que posee este queque. Compare la muestra que usted prefirió con un queque individual tradicional conocido por usted.

¿Usted considera que el queque que usted prefirió posee un sabor distinto o deja una sensación distinta en la boca que el queque tradicional? *

Sí

No

Si usted contesto afirmativamente, ¿Qué sabor distinto percibió?

Sabor tostado

Sabor amargo

Sabor difícil de describir

Otro: _____

Si tuviera que escoger entre el queque que usted prefirió y un queque individual tradicional ¿Cuál de los dos escogería? *

Queque tradicional

Anexo 20. Resultados de la caracterización de la extracción de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) por altas presiones hidrostáticas.

Exp.	VARIABLES INDEPENDIENTES				RESPUESTAS						
	Presión (MPa)	Tiempo (min)	% Etanol	Cantidad vaina/Volumen solvente	Polifenoles totales (mg EAG/g)	DPPH (IC ₅₀ µg/mL)	FRAP (µmol TE/g)	ORAC (µmol TE/g)	Taninos Hidrolizables (%)	Taninos Condensados (%)	Rendimiento (%)
1	150	20	50	1:20	680,79	1,57	3966,20	4795,15	43,20	5,35	72,20
2		30	20	1:20	665,01	1,57	3922,97	5055,45	36,34	9,25	72,20
3		30	50	1:30	687,57	1,59	3977,89	4539,90	39,79	7,31	70,44
4		30	50	1:10	647,71	1,65	4090,16	5652,56	39,75	7,55	73,32
5		30	80	1:20	668,70	1,59	3891,94	4688,30	39,69	7,03	70,11
6		40	50	1:20	670,40	1,52	4354,26	4794,58	38,98	6,82	73,27
7	250	20	20	1:20	726,13	1,54	4036,38	5507,80	43,39	8,72	73,93
8		20	50	1:30	768,42	1,53	4317,27	6094,11	46,21	10,18	76,19
9		20	50	1:10	748,13	1,63	4675,82	5856,59	46,26	9,32	75,21
10		20	80	1:20	703,20	1,50	4588,38	6668,21	42,39	8,96	75,20
11		30	20	1:30	724,67	1,59	4695,51	6598,55	39,31	7,89	73,59
12		30	20	1:10	727,30	1,59	4333,53	5856,43	42,61	9,36	72,99
13		30	50	1:20	733,41	1,47	4354,93	6285,17	44,41	9,85	75,09
14		30	50	1:20	753,12	1,56	4365,27	6311,23	43,58	9,87	75,74
15		30	50	1:20	764,16	1,58	4344,23	6236,75	43,56	9,99	75,79
16		30	80	1:30	713,71	1,57	4176,68	6337,71	42,35	6,98	72,87
17		30	80	1:10	717,20	1,67	4053,78	6144,74	43,08	8,42	73,03
18	350	40	20	1:20	714,40	1,60	4039,59	5922,58	41,11	9,27	74,90
19		40	50	1:30	758,59	1,53	4209,06	6550,97	45,53	8,70	77,22
20		40	50	1:10	752,51	1,56	4512,13	5189,00	46,64	7,64	73,69
21		40	80	1:20	692,77	1,65	4541,73	5236,65	40,42	8,37	75,99
22		20	50	1:20	779,12	1,44	4905,14	6733,31	48,98	10,91	75,79
23	350	30	20	1:20	748,36	1,57	4745,08	6403,50	43,80	10,81	76,99
24		30	50	1:30	789,70	1,48	4847,01	5842,76	45,51	10,56	78,06
25		30	50	1:10	779,59	1,53	4769,33	6788,37	48,80	10,95	77,49
26		30	80	1:20	758,29	1,56	4735,03	6490,86	43,96	8,16	76,01
27		40	50	1:20	727,40	1,58	4128,53	6582,71	43,97	7,92	78,75

Anexo 21. Análisis estadístico para las respuestas no ajustadas del modelo de extracción de polifenoles de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) por altas presiones hidrostáticas.

	DPPH	FRAP	TANINOS CONDENSADOS
Factores significativos	<u>VALOR-P</u> Presión (A): 0,0085 Tiempo (B): 0,0288 AB: 0,0211 CC: 0,0136	<u>VALOR-P</u> Presión (A): 0,0006 Tiempo (B): 0,0144 AB: 0,0072	<u>VALOR-P</u> Presión (A): 0,0034 Tiempo (B): 0,0165 AB: 0,0272
	<u>VALOR-F</u> Presión (A): 8,86 %Etanol (C): 5,71 AB: 6,45 CC: 7,58	<u>VALOR-F</u> Presión (A): 16,17 Tiempo (B): 7,12 AB: 8,87	<u>VALOR-F</u> Presión (A): 11,55 Tiempo (B): 7,08 AB: 5,84
R²	68,14%	68,01%	72,32%
R²_{ajust}	51,28%	60,39%	57,67%
Ecuación del modelo ajustado	DPPH = 0,00222712 - 0,00000174345 · A - 0,0000140145 · B - 0,00000499395 · C - 0,0000111636 · D + 4,8698E-8 · AB + 7,45333E-8 · BC + 4,63712E-8 · C ² - 8,04733E-8 · CD + 3,05417E-7 · D ²	FRAP = 1325,43 + 12,0072 · A + 66,9259 · B + 8,8659 · C - 0,291166 · AB - 0,0827012 · C ²	Taninos Condensados = -14,5552 + 0,0831872 · A + 0,712335 · B + 0,0517831 · C + 0,16547 · D - 0,0000727499 · A ² - 0,00111661 · AB - 0,00787301 · B ² - 0,000722281 · C ² - 0,00447558 · D ²
Valor óptimo maximizado	IC 50 = 1.425 µg/mL	5065,94 µmol TE/g DW	11,39 número de stiasny
Valor óptimo de los factores	Presión: 349,4 MPa Tiempo: 20 minutos % Etanol: 60,62% Masa tara/Volumen solvente: 1:26,2	Presión: 350 MPa Tiempo: 20 minutos % Etanol: 53,62% Masa tara/Volumen solvente: 1: 19,5	Presión: 349,4 MPa Tiempo: 20,4 minutos % Etanol: 35,85% Masa tara/Volumen solvente: 1:18,5

A: Presión; B: Tiempo; C: %Etanol; D: Masa tara/Volumen solvente

Anexo 22. Diagramas de Pareto para las respuestas ajustadas: (a) rendimiento, (b) polifenoles totales, (c) ORAC-FL y (d) taninos hidrolizables.

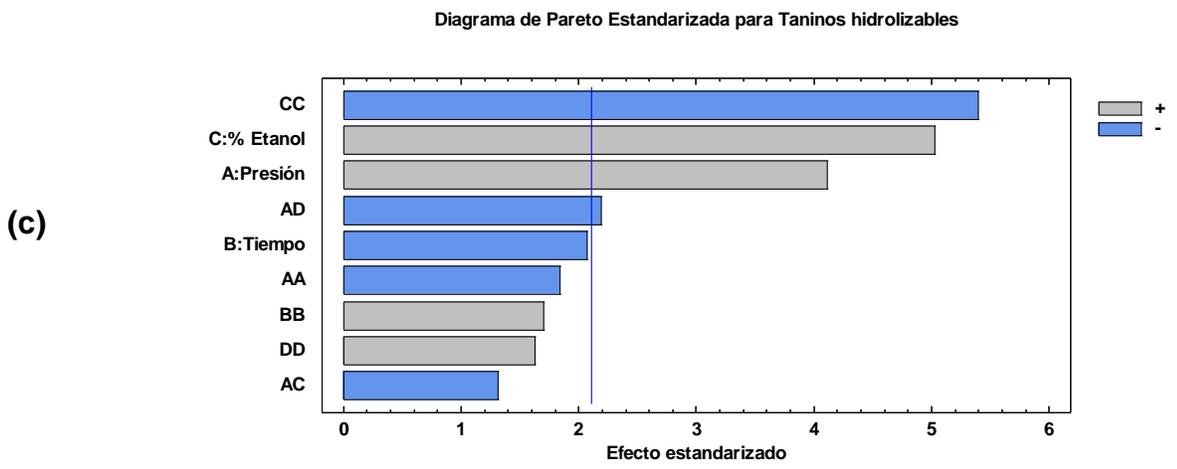
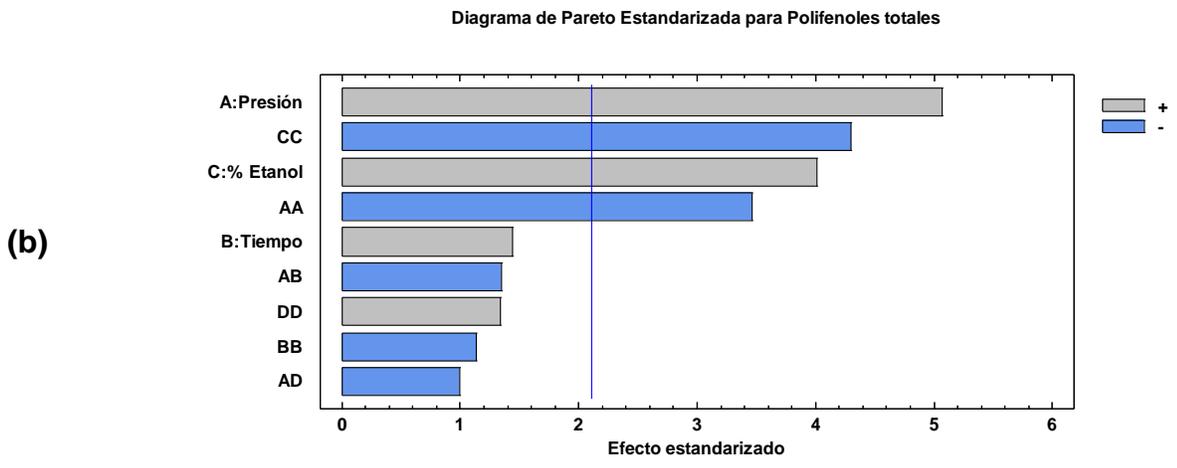
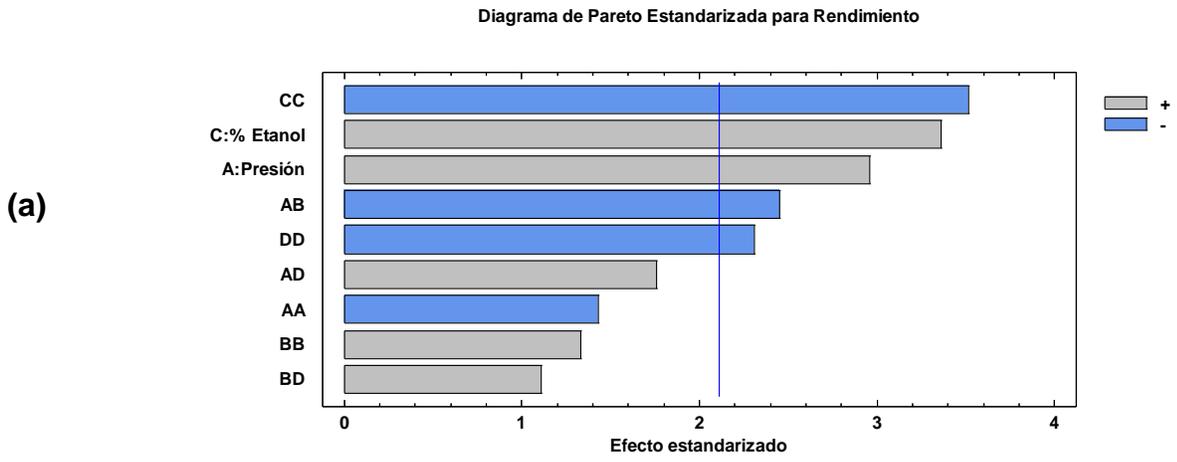
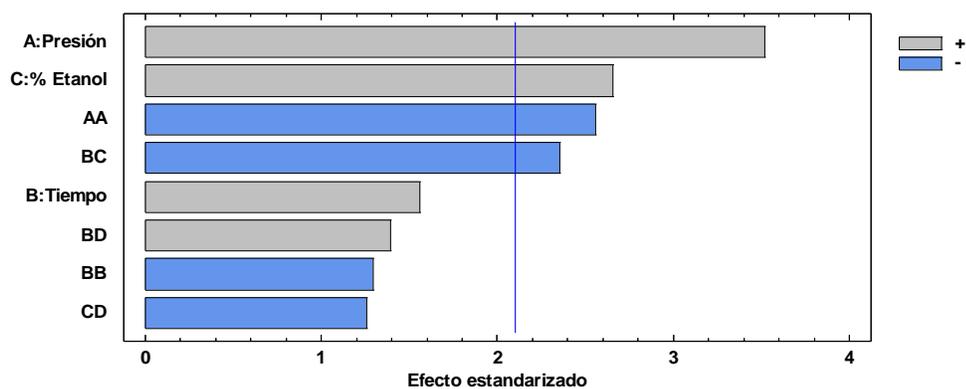


Diagrama de Pareto Estandarizada para ORAC

(d)



Anexo 23. Tabla de contenido de taninos condensados para vainas de tara (*Caesalpinia Spinosa*) (Kardel *et al.*, 2013).

extract	condensed tannins ¹	total phenols ²
quebracho (<i>Schinopsis lorentzii</i>)	122.7	~1000 ³
mimosa (<i>Acacia mearnsii</i>)	235.4	~1000 ³
tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>)	4.6	878.6
gambier (<i>Uncaria gambir</i>)	43.1	675.1

¹ determined by butanol/HCL method (TERRILL *et al.*, 1992)

Anexo 24. Análisis estadístico para aceptabilidad de las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara para los atributos de apariencia general, color de la miga, aroma, sabor general, textura y agrado general.

Tabla ANOVA para Apariencia General por Muestra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0196078	1	0,0196078	0,01	0,9038
Intra grupos	270,627	202	1,33974		
Total (Corr.)	270,647	203			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Apariencia General en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,0146356, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Apariencia General entre un nivel de Muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla ANOVA para Color miga por Muestra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,397059	1	0,397059	0,34	0,5622
Intra grupos	238,01	202	1,17827		
Total (Corr.)	238,407	203			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Color miga en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,336986, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Color miga entre un nivel de Muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla ANOVA para Aroma por Muestra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,490196	1	0,490196	0,33	0,5644
Intra grupos	297,098	202	1,47078		
Total (Corr.)	297,588	203			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Aroma en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,333289, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Aroma entre un nivel de Muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla ANOVA para Sabor General por Muestra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,828431	1	0,828431	0,61	0,4367
Intra grupos	275,578	202	1,36425		
Total (Corr.)	276,407	203			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Sabor General en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,607243, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Sabor General entre un nivel de Muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla ANOVA para Textura por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,96078	1	1,96078	1,08	0,3002
Intra grupos	367,078	202	1,81722		
Total (Corr.)	369,039	203			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Textura en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 1,079, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Textura entre un nivel de Muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla ANOVA para Agrado General por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,41667	1	1,41667	1,01	0,3169
Intra grupos	284,245	202	1,40715		
Total (Corr.)	285,662	203			

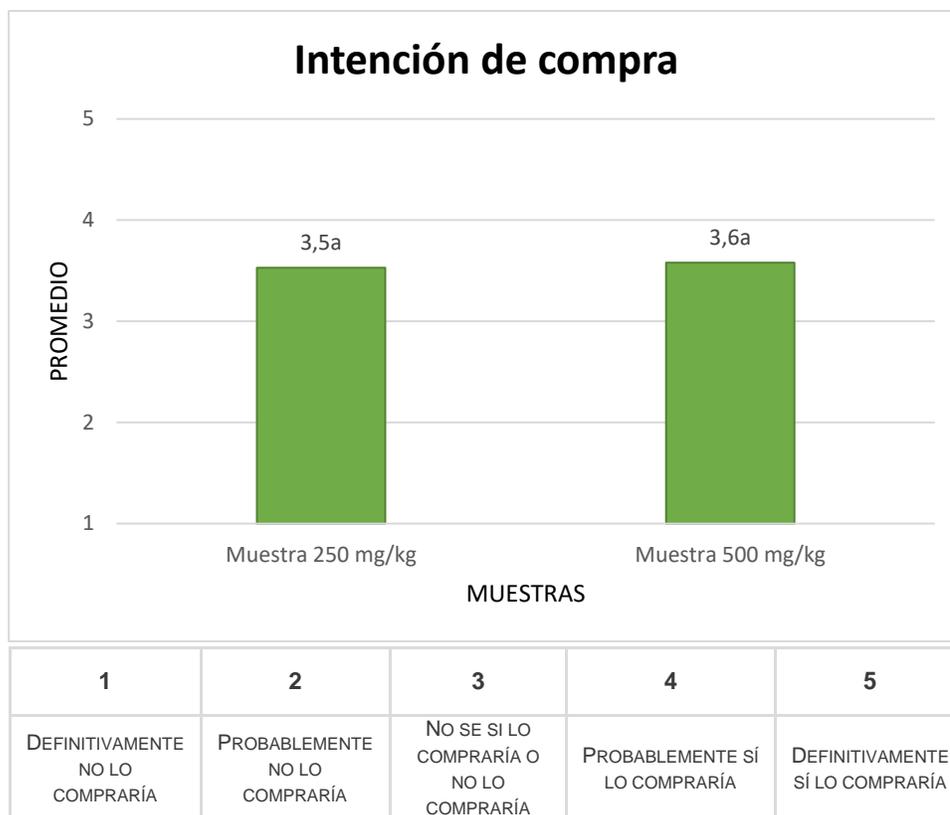
El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Agrado General en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 1,00676, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Agrado General entre un nivel de Muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Anexo 25. Cambio del color de la miga de las muestras de queque de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara frente a un queque tradicional



Anexo 26. Gráfico de intención de compra para las muestras de queque de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.



Anexo 27. Análisis estadístico para aceptabilidad de las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.

Tabla ANOVA para Intención de compra por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,122549	1	0,122549	0,11	0,7401
Intra grupos	224,284	202	1,11032		
Total (Corr.)	224,407	203			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Intención de compra en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,110373, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Intención de compra entre un nivel de Muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Anexo 28. Análisis estadístico para la preferencia entre las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.

Determinación si existen diferencias significativas entre muestras mediante el Test Chi cuadrado (χ^2), en base a la siguiente ecuación

$$\chi^2 = \frac{2(|o - e| - 0.5)^2}{e}$$

donde:

o: N° de preferencias de la muestra más preferida = 58

e: Preferencias esperadas = 51

$$\chi^2 = \frac{2(|58 - 51| - 0.5)^2}{51}$$

$$\chi^2 = 1,66$$

Si χ^2 calculado \geq χ^2 tabulado, existen diferencias significativas entre las muestras

	0,05	0,01	0,001
χ^2 = tabulado	3,84	6,64	10,83

Por lo tanto, no existen diferencias significativas entre ellas al 5%

Anexo 29. Razones de preferencia para las muestras de concentración 250 y 500 mg/kg extracto de vaina de tara.

RAZONES DE PREFERENCIA	Muestra 250 mg/kg N = 44 %	Muestra 500 mg/kg N = 58 %
APARIENCIA		
Forma/ Forma más regular	6,8	10,3
Mejor apariencia	6,8	5,2
Mejor color de miga	4,5	3,4
Otras respuestas de apariencia	11,4	8,6
AROMA		
Aroma/Más aroma/mejor aroma/aroma más agradable/buen aroma	31,8	20,6
No aroma a huevo/menos aroma a huevo	4,5	3,4
Otras respuestas de aroma	6,8	5,2
SABOR		
Sabor/más rico el sabor/Buen sabor/Sabor agradable	38,6	27,6
Sabor más intenso/más sabor/mejor sabor/sabor más notorio	36,4	27,6
Más dulce	29,5	17,2
Menos dulce/No tan dulce/dulzor no tan elevado	25	17,2
Dulzor equilibrado/dulzor adecuado/dulzor justo/dulzor agradable/dulzor parecido a queque tradicional	15,9	12
Sabor más característico/característico/parecido a un queque tradicional	15,9	10,3
Sabor menos intenso/levemente más suave	6,8	5,2

Sabor no conocido/sabor no característico/sabor diferente	4,5	3,4
Otras respuestas de sabor	6,8	5,2
TEXTURA		
Mas esponjoso	45,5	31
Mas blando/menos dura/más blanda la corteza	38,6	27,6
Textura/mejor textura	18,2	12,1
Mas húmeda/menos seca	15,9	12,1
Miga menos compacta/más aireada	9,1	5,17
Menos húmeda	4,5	3,4
Textura agradable	4,5	3,4
Otras respuestas de textura	4,5	3,4
OTROS	9,1	6,9

Anexo 30. Respuestas de sabor distinto o sensación diferente en la boca frente al queque preferido por los consumidores.

SABOR DIFERENTE			
Tipo de respuesta	Atributos	250 mg/kg %	500 mg/kg %
Alternativa	Sabor difícil de describir	55,6	52,6
	Sabor tostado	14,8	21,1
	Otros (especificar)	29,6	28,9
Otras respuestas (19 personas)	Sabor semilla/fruto seco/sabor almendrado	0	7,9
	Sabor agradable	3,7	2,6
	Sabor amargo	3,7	2,6
	Ni tan dulce	3,7	2,6
	Ni tan amargo	3,7	2,6
	Menos dulce	0	2,6
	Sabor fruto dulce	0	2,6
	Sabor harina integral con huevo	0	2,6
	Sabor harina integral con huevo	3,7	0
	Leve sabor rancio	3,7	0
	Mas dulce	3,7	0
	Menos sabor que un queque tradicional	3,7	0
	No tan invasivo el sabor	0	2,6

Anexo 31. Análisis estadístico para la preferencia entre la muestra preferida por los consumidores y un queque tradicional.

Determinación si existen diferencias significativas entre muestras mediante el Test Chi cuadrado (χ^2), en base a la siguiente ecuación

$$\chi^2 = \frac{2(|o - e| - 0.5)^2}{e}$$

donde:

o: N° de preferencias de la muestra más preferida = 81

e: Preferencias esperadas = 51

$$\chi^2 = \frac{2(|81 - 51| - 0.5)^2}{51}$$

$$\chi^2 = 34,13$$

Si χ^2 calculado \geq χ^2 tabulado, existen diferencias significativas entre las muestras

	0,05	0,01	0,001
$\chi^2 = \text{tabulado}$	3,84	6,64	10,83

Por lo tanto, Si existen diferencias significativas entre ellas al 0,1%

Anexo 32. Razones de preferencia para la muestra elegida por los consumidores y un queque tradicional.

RAZONES DE PREFERENCIA	Queque tradicional N = 21 %	Queque con propiedades antioxidantes N = 81 %
PROPIEDADES SALUDABLES		
Beneficioso para la salud	0	29,6
Propiedades antioxidantes/propiedades beneficiosas/efecto antioxidante/propiedades nutricionales/componente antioxidante/valor antioxidante	0	25,9
Mas sano/más saludable/saludable	0	14,8
Nutritivo/valor nutricional/beneficio nutricional	0	4,9
Otras respuestas de propiedades saludables	0	8,6
SABOR		
Sabor tradicional/sabor parecido o igual al tradicional/poca diferencia de sabor con el tradicional/similar al tradicional	14,3	10
Sabroso/Buen sabor/Sabor más agradable	4,8	7,4
Menos dulce/Dulzor menos intenso/No tan dulce	0	7,4
Deja buen sabor en la boca/residual/sabor permanece en el tiempo	14,3	4,9
Me gusta el sabor	4,8	4,9
Mas sabor/más intensidad de sabor/mejor sabor	14,8	3,7
Otras respuestas de sabor	0	10
TEXTURA		

Textura más esponjosa	52,4	13,6
Mas blando/No tan duro	33,3	8,6
Me gusta la textura	4,8	3,7
Textura aceptable/textura buena	0	3,7
Textura suave	9,5	2,5
Miga aireada/textura aireada	9,5	2,5
Otras respuestas de textura	4,8	6,2
OTROS		
Rico/Delicioso	0	7,4
Mejor que el tradicional/igual al queque tradicional/se parece al queque tradicional	0	3,7
Aroma más agradable/aroma agradable	0	3,7
Me gusta el queque tradicional/sabor tradicional	9,5	2,5
Otros	9,5	13,6