



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERÍA

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL
TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA
FORMACIÓN DE
5-HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) EN
MATRICES LÁCTEAS TIPO MANJAR**

JOSEFINA ANDREA BARRERA MORELLI

Tesis para optar al grado de
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:

**FRANCO WILFREDO PEDRESCHI PLASENCIA
MARÍA SALOMÉ MARIOTTI CELIS**

Santiago de Chile, Julio, 2020

© 2020, Josefina Andrea Barrera Morelli



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERÍA

ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA FORMACIÓN DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) EN MATRICES LÁCTEAS TIPO MANJAR

JOSEFINA ANDREA BARRERA MORELLI

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

FRANCO PEDRESCHI PLASENCIA

M. SALOMÉ MARIOTTI CELIS

M. CAROLINA MORENO CONSTENLA

Carolina Moreno

ROMMY ZÚÑIGA PARDO

DANIEL HURTADO SEPULVEDA

D.H.S.P.

Para completar las exigencias del grado de
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, Julio, 2020

A mis padres, René y Giovanna,
y a mi hermano Rodrigo,
quienes me han guiado todos
estos años. A mi familia y
amigos gracias por el apoyo
incondicional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi madre, Giovanna. Puede que ya no estés en este mundo, pero las enseñanzas que me dejaste durante tu tiempo en él siguen guiando mi vida. Gracias por los bellos recuerdos y consejos, y por nunca haberte rendido.

Agradezco también a mi padre y a mi hermano, sin ustedes, no estaría donde estoy ahora. Me han inspirado y dado fuerzas para seguir adelante en todos los aspectos de mi vida. Al mismo tiempo agradezco a Carmen Gloria Montes, por alegrar nuestras vidas estos últimos años y estar ahí siempre que lo necesitamos.

A toda mi familia y a aquellas personas que se han ganado un lugar en ella. Su apoyo incondicional significa mucho para mí, gracias por la paciencia y compañía a lo largo de todo este proceso. Y a los que ya partieron, mis abuelos Inés, José Victorino y Edmundo, a mi tía Eugenia y a Rosita, ustedes marcaron mi vida y sé que me siguen acompañando en espíritu.

A mis profesores de Enseñanza Media, Justo Margalet y Luis Carmona, por todo lo que me enseñaron y además plantearme nuevos desafíos. Gracias por motivarme a tomar este rumbo.

A mis amigas Fernanda, Francesca y Javiera, después de todo lo que hemos vivido solo me queda darles las gracias por los buenos y no tan buenos momentos.

Agradezco a los amigos que conocí en la Universidad. José y Constanza, gracias por la compañía, las risas y las tardes de estudio en el DIQB. Para mis queridísimos FR que me han levantado el ánimo siempre que lo he necesitado desde el primer día de clases hace ya tanto tiempo, gracias por siempre estar ahí y por todos los almuerzos que compartimos. A todos los amigos que conocí en judo y yu-gi-oh, les agradezco la alegría y diversión que le aportan a mí vida.

Me gustaría agradecer también a mis mascotas, en especial al Rolly, por acompañarme en los peores momentos de frustración durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a M. Salomé Mariotti y a Rommy Zúñiga por la ayuda y apoyo durante el desarrollo de esta tesis. A los miembros de la comisión Franco Pedreschi, M. Carolina Moreno y Daniel Hurtado les agradezco sus sugerencias y comentarios. Agradezco también a los encargados de laboratorio, Juan Pablo, Carla y Camila, por ayudarme y enseñarme tanto.

Por último, me gustaría agradecer a la Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM) y su proyecto interno L2-216 y al proyecto FONDECYT 1190080 por el apoyo financiero aportado a esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	x
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	4
2.1. Manjar o dulce de leche.....	4
2.1.1. Elaboración del manjar	5
2.2. Reacción de Maillard.....	7
2.2.1. 5-Hidroximetilfurfural (HMF)	12
2.3. Textura	27
3. Hipótesis	29
4. Objetivos.....	30
4.1. Objetivo General	30
4.2. Objetivos específicos.....	30
5. Metodología.....	31
5.1. Formulación y elaboración de matriz láctea tipo manjar	31
5.2. Caracterización de manjar	33
5.2.1. Sólidos solubles	34
5.2.2. pH	34
5.2.3. HMF.....	34
5.2.4. Azúcares reductores	38
5.2.5. Color	39

5.2.6. Propiedades reológicas.....	40
6. Resultados y discusión.....	42
6.1. Validación metodológica de medición de HMF en manjar/matriz láctea..	42
6.2. Caracterización de manjares comerciales y matrices lácteas	44
7. Conclusiones y propuestas futuras.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61
A N E X O S.....	74
Anexo A: Ingredientes alimentarios utilizados en la fabricación de manjar.....	75
Anexo B: Mecanismos de formación de HMF.....	76
Anexo C: Presencia de HMF en alimentos	81
Anexo D: Cromatogramas.....	83
Anexo E: Caracterización de manjares comerciales y matrices lácteas	86

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2-1. Efectos potenciales en la salud del HMF y SMF, parte 1.....	20
Tabla 2-2. Efectos potenciales en la salud del HMF y SMF, parte 2.....	21
Tabla 2-3. Ejemplos de mitigación de HMF en distintas matrices alimentarias, parte 1....	23
Tabla 2-4. Ejemplos de mitigación de HMF en distintas matrices alimentarias, parte 2....	24
Tabla 5-1. Formulación de matriz láctea, porcentajes respecto a total de ingredientes sin procesamiento térmico.	31
Tabla 5-2. Condiciones cromatográficas para la determinación HMF en lácteos.	36
Tabla 5-3. Condiciones cromatográficas para la determinación de azúcares reductores en lácteos.....	39
Tabla 6-1. Coeficientes de regresión lineal.	43
Tabla 6-2. Análisis de regresión lineal.....	43
Tabla 6-3. Resultados de precisión y exactitud.....	44
Tabla 6-4. Identificación de matrices lácteas.	45
Tabla 6-5. Caracterización química de manjares comerciales y matrices lácteas.....	47
Tabla 6-6. HMF libre en dulce de leche.....	48
Tabla 6-7. Parámetros ajustados al modelo Herschel-Bulkley.	55
Tabla 6-8. Viscosidad aparente de manjares comerciales y matrices lácteas para gradiente de deformación de 50 s ⁻¹ y 25°C.....	56
Tabla A-1. Ingredientes alimentarios utilizados en la fabricación de dulce de leche. Adaptada de Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Dulce de Leche (1996).	75
Tabla C-1. Presencia de HMF en alimento.	81
Tabla E-1. Mediciones efectuadas durante el procesamiento de matrices lácteas IV.....	86
Tabla E-2. Mediciones efectuadas durante el procesamiento de matrices lácteas V.	87
Tabla E-3. Mediciones efectuadas durante el procesamiento de matrices lácteas VI.....	88
Tabla E-4. Comparación de parámetros estudiados entre manjares comerciales y matrices lácteas.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2-1. Esquema reacción de Maillard adaptado de de Oliveira et al. (2016).....	11
Figura 2-2. Esquema de formación de HMF. Adaptado de Capuano y Fogliano (2011). ..	14
Figura 2-3. Contenido de HMF en algunos productos alimentarios (elaboración propia). (*)	
Contenido de HMF expresado en mg/L. Referencias en tabla C-1.....	18
Figura 5-1. Procedimiento de preparación de ML.	33
Figura 5-2. Espacio de color CIE Lab (ilustración) (<i>Glosario gráfico</i> , s.f.).....	40
Figura 6-1. Contenido de azúcares reductores de manjares comerciales y matrices lácteas.	
.....	49
Figura 6-2. Coordenadas CIE Lab e ilustración de color para cada muestra.	51
Figura 6-3. Curvas esfuerzo de corte v/s gradiente de deformación, experimentales y	
ajustadas por modelo Herschel-Bulkley, representativa de cada muestra, parte 1.	53
Figura 6-4. Curvas esfuerzo de corte v/s gradiente de deformación, experimentales y	
ajustadas por modelo Herschel-Bulkley, representativa de cada muestra, parte 2.	54
Figura B-1. Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante reacción de	
Maillard, parte 1 (Bruhns, Kaufmann, Koch, y Kroh, 2018; Capuano y Fogliano, 2011;	
Kocadağlı, 2016).	76
Figura B-2. Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante reacción de	
Maillard, parte 2 (Bruhns et al., 2018; Capuano y Fogliano, 2011; Kocadağlı, 2016).	77
Figura B-3. Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante reacción de	
Maillard, parte 3 (Bruhns, Kaufmann, Koch, y Kroh, 2018; Capuano y Fogliano, 2011;	
Kocadağlı, 2016).	78
Figura B-4. Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante caramelización	
(Kocadağlı, 2016).	79
Figura B-5. Formación de HMF a partir de sacarosa en condiciones pirolíticas secas.	
Adaptado de Capuano y Fogliano (2011), Kocadağlı, (2016), y Lund y Ray (2017).	80
Figura D-1. Cromatogramas de solución estándar de HMF (500 µg/L).	83
Figura D-2. Cromatogramas de: b) Leche en polvo con tratamiento para medir HMF libre;	
c) Leche en polvo con tratamiento para medir HMF total.	84
Figura D-3. Cromatogramas de: d) Manjar comercial con tratamiento para medir HMF	
libre; e) Manjar comercial con tratamiento para medir HMF total.	85
Figura E-1. Ingredientes identificados en etiquetado de manjares comerciales.	89
Figura E-2. Tendencia de HMF según °Brix y pH para manjares comerciales y matrices	
lácteas.	90
Figura E-3. Tendencia de HMF según coordenadas CIE Lab para manjares comerciales y	
matrices lácteas.	91

RESUMEN

El manjar o dulce de leche es un producto altamente consumido en Sudamérica que se elabora mediante el calentamiento de leche y sacarosa. Su alto contenido de azúcares sumado al tratamiento térmico al que se somete durante su elaboración favorecen la reacción de Maillard y con esto la formación de 5-hidroximetilfurfural (HMF), compuesto potencialmente cancerígeno.

Este trabajo evaluó el efecto de la temperatura sobre la formación de HMF en manjar, manteniendo las propiedades físicas que lo caracterizan. Con el fin de realizar dicho objetivo, se implementó y validó una metodología de determinación de HMF por HPLC-DAD, en matrices lácteas tipo manjar. El método demostró buena linealidad (coeficiente de correlación 99,98%), precisión (repetibilidad 1,99%-4,12% CV y reproducibilidad 3,62%-5,98% CV), y exactitud (recuperación 89,04%-91,89%), además de bajos límites de detección (19,51 µg/L) y cuantificación (65,05 µg/L). Además, se caracterizaron los productos comerciales de las tres marcas con mayor producción en Chile en términos de contenido de sólidos solubles, pH, contenido de HMF, contenido de azúcares reductores (glucosa y fructosa), coordenadas de color CIE Lab, y propiedades reológicas. Se caracterizaron bajo los mismos parámetros fisicoquímicos, matrices lácteas preparadas a nivel laboratorio, en baño termostático a tres temperaturas (110, 130 y 150 °C).

Los productos comerciales presentaron concentraciones de HMF significativamente diferentes ($p < 0,05$) (2,63; 4,43 y 9,03 µg/g_{b.h.}). El valor más alto de las matrices lácteas correspondió a 1,52 µg/g_{b.h.}, para el tratamiento efectuado a 130 °C, logrando así la

mitigación de HMF (42,3-87,2%). La misma no presentó diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en los parámetros reológicos respecto a los manjares comerciales estudiados. Por tanto, es factible mitigar la formación de HMF preservando las propiedades reológicas en lácteos tipo manjar. Basándose en los resultados obtenidos en el presente estudio, en caso de consumir manjar; se recomienda preferir productos más claros debido a su menor contenido de HMF.

Palabras Claves: matrices lácteas, tratamiento térmico, HMF, propiedades reológicas, color CIE Lab

ABSTRACT

“Manjar” or “Dulce de leche” is a product widely consumed in South America, which is prepared by the heat treatment of milk and sucrose. Its high sugar content combined with the heat treatment that it is subjected, favor the Maillard reaction and with it, the formation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF), a potentially carcinogenic compound.

The present study explores the effect of the temperature on the occurrence of HMF in “manjar”, while maintaining the physical properties that characterize it. To accomplish this purpose, an HMF determination methodology by HPLC-DAD was validated for “manjar” like dairy matrixes. The method demonstrated good linearity (determination coefficient over 0.999), precision (repeatability RSD of 1,99%-4,12% and reproducibility RSD of 3,62%-5,98%), and accuracy (recovery of 89,04%-91,89%), also low limits of detection (19,51 µg/L) and quantification (65,05 µg/L). In addition, the commercial products of the three major Chilean producers were characterized in terms of soluble solids content, pH, HMF content, reducing sugars content (fructose and glucose), CIE Lab color coordinates, and rheological properties. Dairy matrixes elaborated in the laboratory on a thermoregulated bath at 110, 130, 150 °C were characterized under the same physicochemical parameters. Commercial products presented significant differences ($p < 0,05$) on their HMF content (2,63; 4,43 y 9,03 µg/g_{w.b.}). The highest HMF value on the dairy matrixes corresponded to 1,52 µg/g_{w.b.}, for the 130 °C treatment, achieving the desired HMF mitigation (42,3-87,2%). The sample prepared under this thermic treatment (130 °C), did not present significant differences ($p \geq 0,05$) on rheological parameters in comparison with the commercial

samples studied. Therefore, the HMF mitigation in “manjar” is possible maintaining their characteristic rheological properties. Based on the obtained results, if “manjar” is going to be consumed, it is highly recommended to prefer the lighter products due to its lower HMF content.

Keywords: dairy matrixes, heat treatment, HMF, rheological properties, CIE Lab color

1. INTRODUCCIÓN

El procesamiento térmico de los alimentos confiere en ellos colores, texturas, aromas y sabores, junto con mejorar la preservación producto de la denaturación de enzimas y microorganismos (Capuano y Fogliano, 2011; Kowalski et al., 2013). El desarrollo de estas características sensoriales se debe en gran medida a la reacción de Maillard, sin embargo, compuestos nocivos para la salud denominados neo-contaminantes (ej. 5-hidroxiacetilfurfural) son generados como productos de esta reacción (Delgado-Andrade et al., 2010; Martins y Van Boekel, 2005; Rannou et al., 2016).

Entre los alimentos susceptibles a la formación de 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) se encuentra el manjar o dulce de leche, producto típico de la cocina latinoamericana, preparado a partir de la cocción de leche azucarada (Akal et al., 2018; Bellarde, 2005; Francisquini et al., 2016; Pavlovic et al., 1994). Entre los factores que afectan la formación de HMF se encuentran: la temperatura y tiempo de procesamiento, el pH, la actividad de agua, la presencia de cationes, el tipo y cantidad de azúcares disponibles (Capuano y Fogliano, 2011; Lund y Ray, 2017; Morales, 2009).

En cuanto al efecto del tratamiento térmico, Tosi et al. (2002) encontraron que a 150 °C la formación de HMF en 30 segundos es similar a la cantidad formada en 90 segundos a 130 °C, para mieles tratadas en baño térmico. Estos autores establecen que la formación de HMF se rige de acuerdo con una cinética de primer orden, cuya constante de velocidad se correlaciona exponencialmente con $1/RT$.

Francisquini et al. (2018) estudiaron el efecto del pH y tipo de azúcar sobre la formación de HMF en dulce de leche. Para determinar el efecto de pH adicionaron bicarbonato de

sodio a la preparación, siendo la formación de HMF favorecida al aumentar la concentración de este aditivo. Este aumento está también asociado al incremento de la concentración monovalente Na^+ en el dulce de leche, cuya presencia es, bajo ciertas condiciones, favorable para la formación de HMF (Gökmen y Şenyuva, 2007; H. Liu et al., 2015). Por su parte, el efecto del tipo de azúcar se estudió reemplazando parte de la sacarosa de la formulación por glucosa, esto promueve la formación de este neo-contaminante, puesto que aumenta la disponibilidad de azúcares reductores para la reacción con grupos amino.

Producto del carácter carcinogénico y genotóxico de los neo-contaminantes, el estudio de tecnologías para su mitigación ha sido de gran importancia en los últimos años con el fin de disminuir su ingesta (Anese et al., 2013; Capuano y Fogliano, 2011; Rannou et al., 2016). Entre los métodos de mitigación se encuentran la modificación de las formulaciones, temperaturas de proceso y la adición de extractos polifenólicos (Fels-klerx et al., 2014; Y. Liu et al., 2015; Martins y Van Boekel, 2005; Miao et al., 2014; Oral et al., 2014; Zhu et al., 2011).

Si bien la aplicación de estas metodologías a nivel de laboratorio ha demostrado ser efectiva en términos de reducción del contenido de HMF, su efecto sobre las características sensoriales de los alimentos es aún un tema pendiente. En este sentido, la caracterización física de matrices alimentarias permite predecir el efecto de los cambios en las condiciones de proceso y la formulación sobre alguna de sus propiedades sensoriales (textura y color) (Bourne, 2002; Garcia Loredó y Guerrero, 2011; C. M. Lee y Resurrección, 2006; Meullenet et al., 1998; Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas,

2005). El objetivo de esta investigación es determinar la temperatura de proceso que permita disminuir la formación de HMF, preservando las propiedades físicas de matrices lácteas tipo manjar.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Manjar o dulce de leche

El manjar, también conocido como dulce de leche, corresponde a un producto lácteo obtenido de la cocción de leche con azúcar. Es ampliamente consumido en América Latina, sin embargo, su origen no está bien esclarecido, siendo disputado por variados países de la región, entre ellos Argentina, Chile, y Uruguay (Malec et al., 2005; Penci y Marín, 2016; Zunino, 1998). En los últimos años su consumo se ha propagado a Estados Unidos y Europa (Oliviera et al., 2009).

En el año 2018 se produjeron alrededor de 38.600 toneladas de manjar en Chile, teniendo un aumento del 9% respecto al año previo, siendo el aumento promedio de los últimos 10 años de un 4,5% (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile, 2019). El principal productor de manjar a nivel nacional aporta con el 49,3% de la producción (19.036.152 kg), el segundo con 27,2% (10.514.382 kg), y el tercero con 12,1% (4.656.562 kg) (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile, 2019).

En cuanto al consumo de este producto, el promedio per cápita chileno fue de 2,1 kg el año 2014 (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile, 2015).

De acuerdo con la normativa chilena, el manjar debe cumplir con las siguientes características: el contenido de sólidos totales de leche será 25,5% como mínimo,

no contendrá más de 35% de agua, y se podrá adicionar sustancias amiláceas únicamente a los productos de repostería (Ministerio de Salud Republica de Chile, 2017).

2.1.1. Elaboración del manjar

El manjar tradicionalmente se prepara hirviendo leche entera con sacarosa, generalmente a presión atmosférica, concentrando la mezcla hasta alcanzar un producto con 70% m/m de sólidos totales (Hough et al., 2010; Oliviera et al., 2009). Entre las variantes de formulación se encuentran el uso de leches descremadas o deslactosadas (mediante β -galactosidasa), reemplazo de sacarosa por otros azúcares, adición de bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio o hidróxido de calcio como regulador de pH, y el uso de almidones como espesantes (Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Dulce de Leche, 1996; Malec et al., 2005). A estos ingredientes suelen agregarse distintos aditivos como espesantes, estabilizantes, preservantes o saborizantes. La Tabla A-1 contiene una lista de los aditivos autorizados para la elaboración de dulce de leche según lo establecido por el MERCOSUR (Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Dulce de Leche, 1996).

Los atributos del manjar más influyentes sobre la aceptación de los consumidores son el color y la textura, incluso por sobre el sabor (Hough et al., 1986, 1992), convirtiéndolos en parámetros clave en cuanto a evaluación de calidad comercial, estandarización de productos y elección de la formulación (Navarro et al., 1999; Rodríguez et al., 2012).

Durante el proceso de cocción del manjar ocurren diferentes reacciones de pardeamiento no enzimático (Reacción de Maillard), las cuales son responsables en gran medida no solo de las características sensoriales del producto (color, sabor y aroma), sino que además de la generación de compuestos no deseables tales como HMF (Francisquini et al., 2018; Pavlovic et al., 1994). Estas reacciones se pueden ver afectadas por la formulación y momento de adición de los distintos ingredientes (Corradini y Peleg, 2000).

Por ejemplo, el reemplazo de parte del azúcar por glucosa es muy utilizado para favorecer la plasticidad del producto y disminuir la arenosidad causada por la cristalización de la lactosa (Oliviera et al., 2009). Sin embargo, esta variación en la formulación promueve la formación de HMF (Francisquini et al., 2018).

El bicarbonato de sodio, por su parte, es utilizado para regular el pH, favoreciendo la reacción de Maillard hacia productos de color pardo (Gaze, Oliveira, et al., 2015) y evitando a su vez la coagulación de la caseína. El punto isoeléctrico (pI) de la caseína de la leche en condiciones ambientales es de 4,6 (Oliviera et al., 2009; Rollema y Muir, 2009), producto del incremento de la temperatura para la cocción el pI aumenta. Por su parte, el pH de la leche sin tratamiento (pH=6,6) disminuye al aumentar la concentración de ácido láctico producto de la evaporación (Malec et al., 2005; Oliviera et al., 2009). La combinación de ambos factores tiene como resultado la coagulación y precipitación de la caseína, resultado que es evitado con regulación adecuada de pH. Sin embargo, la adición de bicarbonato de sodio genera dióxido de carbono, el cual promueve la formación

de espuma, por lo que se recomienda agregarlo en la leche fría y calentarla paulatinamente para prevenir su formación (Giménez et al., 2008; Oliviera et al., 2009).

La elección de los ingredientes también afecta en las concentraciones finales de HMF, dependiendo de los tratamientos previos que estos tuvieran. Por ejemplo, utilizar leche en polvo en vez de leche líquida conlleva un nivel base aproximado de 28 $\mu\text{mol/L}$, superior a los 7,66 $\mu\text{mol/L}$ de HMF que contiene la leche sin tratamiento térmico previo (Rehman et al., 1999).

2.2. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard es un tipo de pardeamiento no enzimático que involucra la interacción entre un grupo amino y grupos carbonilo (Ames, 1992; Ruan et al., 2018). Esta reacción corresponde a un conjunto complejo de reacciones entrelazadas que ocurren durante el procesamiento de alimentos, principalmente en tratamientos térmicos, y cuyos productos suelen ser determinantes en el sabor, olor, funcionalidad y calidad nutricional de los alimentos resultantes (Ames, 1992; Ruan et al., 2018). Entre los productos formados también es posible identificar antioxidantes, antimicrobianos, compuestos mutagénicos y cancerígenos (Jaeger et al., 2010; van Boekel et al., 2010).

La reacción de Maillard puede ser subdividida en tres etapas esquematizadas en la Figura 2-1, estas corresponden a:

- **Etapa inicial:** consta de una condensación y el reordenamiento de la molécula resultante (Rannou et al., 2016). La condensación entre el grupo carbonilo de un

azúcar reductor y el grupo amino deprotonado proveniente de un aminoácido o proteína, para formar una imina denominada base de Schiff, de este proceso se libera una molécula de agua (de Oliveira et al., 2016). La base de Schiff se reordena en: producto de Amadori (1-amino-1-dioxietosa) en el caso de que grupo carbonilo proviniera de una aldosa; producto de Heyns (2-amino-2-dioxialdosa), si proviene de una cetosa. Esta etapa no genera cambios de color (Kocadağlı y Gökmen, 2016).

- **Etapa intermedia:** incluye la deshidratación y fragmentación de azúcares, y la degradación del producto de Amadori o Heyns (Rannou et al., 2016). La deshidratación de azúcares conlleva a la formación de dehidroreductones y furfurales, mientras que la fragmentación de azúcares, que ocurre por retroaldosilación, forma productos volátiles o precursores de volátiles (Rannou et al., 2016). Los dehidroreductones pueden reaccionar con los productos de fragmentación y dar origen a la formación de aldehídos mediante la degradación de Strecker, estos últimos pueden ser transformados en aminocetonas (Parisi y Luo, 2018). La degradación de los productos de Amadori y Heyns depende en gran medida del azúcar reductor original y pH (de Oliveira et al., 2016; Parisi y Luo, 2018). A $\text{pH} > 7$, la degradación de los productos de Amadori/Heyns conlleva principalmente la formación de reductones por enolizaciones 2,3, los cuales se pueden fraccionar en dehidroreductones (de Oliveira et al., 2016). A $\text{pH} < 7$, la degradación se debe a enolizaciones 1,2, formándose furfural si el azúcar de origen corresponde a una pentosa, o 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) en el caso de tratarse

de una hexosa (de Oliveira et al., 2016). Los productos de la etapa intermedia son incoloros o amarillos, pero con gran relevancia en cuanto a aromas (Rannou et al., 2016).

• **Etapa final:** está constituida por la condensación aldólica y aldehído-amina, y la formación de compuestos heterocíclicos nitrogenados, a partir de los compuestos altamente reactivos formados en la etapa anterior (Rannou et al., 2016). Las condensaciones aldólicas, catalizadas por aminas, dan origen a moléculas que proporcionan olores característicos en los alimentos (Ruan et al., 2018). Los polímeros y co-polímeros nitrogenados de color marrón formados en esta etapa, conocidas como melanoidinas, corresponden a los pigmentos responsables de la coloración característica asociada a esta reacción (de Oliveira et al., 2016; Rannou et al., 2016). Las reacciones de polimerización son responsables al mismo tiempo de los cambios en la textura (Rannou et al., 2016).

Entre las variables que afectan la reacción de Maillard se encuentran: temperatura y tiempo de procesamiento, pH, actividad de agua, tipo y disponibilidad de reactantes, siendo el factor más significativo sobre la velocidad de reacción la temperatura (Jaeger et al., 2010). En este sentido estudios han indicado que la cinética de Arrhenius describiría de manera apropiada la formación de gran parte de los productos de Maillard (Carabasa-Giribet y Ibarz-Ribas, 2000; Taylor y Linfoth, 2010).

Asimismo, tanto el tipo como la disponibilidad de los reactantes son factores clave al momento de determinar los productos que serán obtenidos. Por ejemplo, la

reacción entre lisina y glucosa genera notas de sabor caramelo mientras que la fenilalanina con glucosa conlleva sabores florales cuando se calientan a 100 °C por 24 horas en proporciones 1:3 aminoácido:glucosa (Taylor y Linforth, 2010; Wong et al., 2008). El pH al igual que la actividad de agua, influyen sobre la ruta de reacciones efectuadas y con esto sobre los productos de Maillard resultantes (de Oliveira et al., 2016).

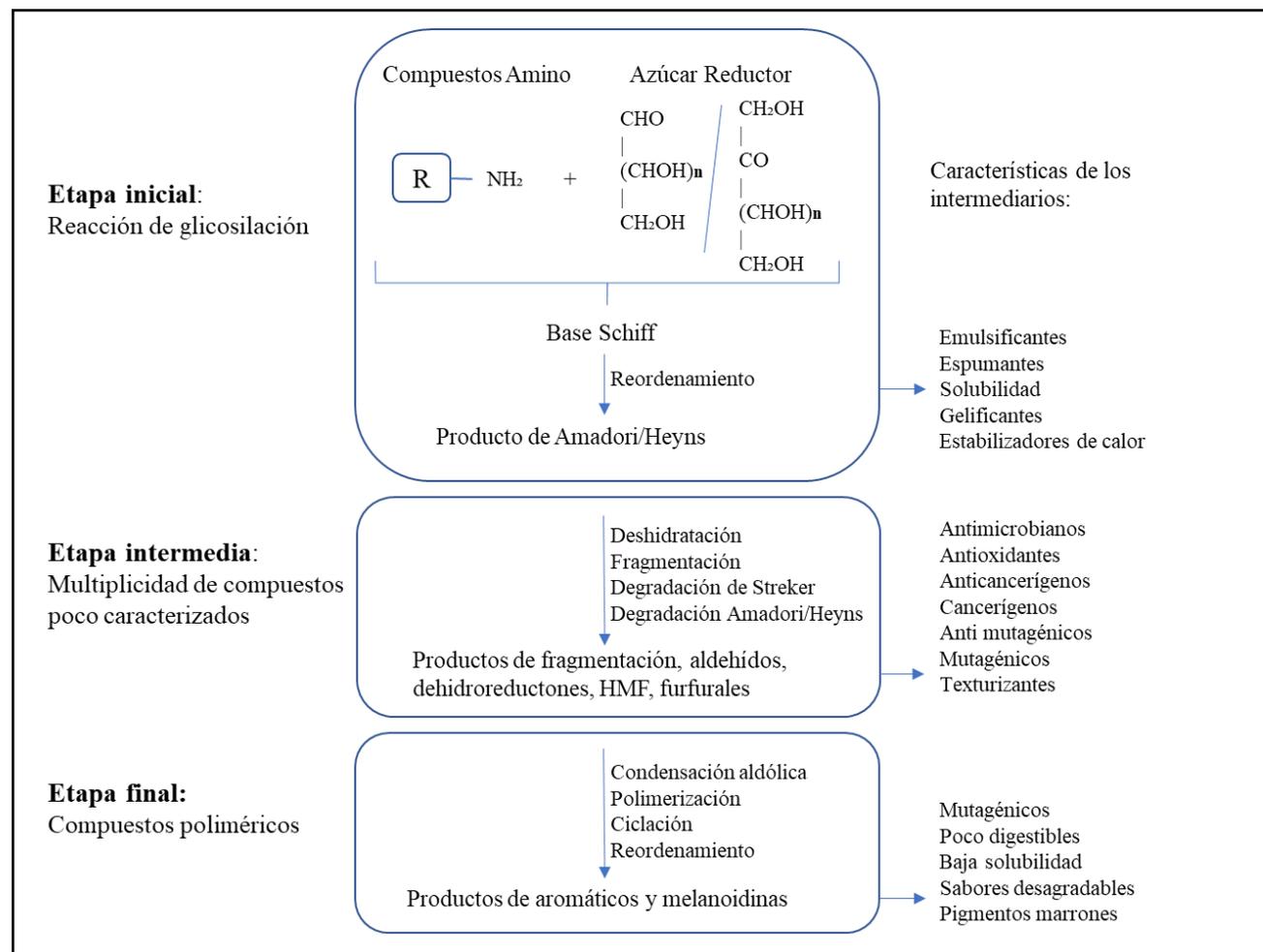


Figura 2-1. Esquema reacción de Maillard adaptado de de Oliveira et al. (2016).

2.2.1. 5-Hidroximetilfurfural (HMF)

El 5-hidroximetilfurfural (HMF), también conocido como 5-(hidroximetil)-2-furanocarbaldehído, corresponde a un derivado del furano que se forma como intermediario de la reacción de Maillard y por deshidratación directa de azúcares en medio ácido (caramelización) (Capuano y Fogliano, 2011). Durante largo tiempo se utilizó como marcador de deterioro térmico en alimentos, sin embargo, estudios recientes han revelado la actividad carcinogénica y mutagénica en animales de experimentación, situándolo dentro del grupo de los “neo contaminantes” generados durante la reacción de Maillard (Anese y Suman, 2013; Godfrey y Chen, 1999; Matsushita et al., 2012; Morales, 2009). Entre los factores que afectan la formación de HMF se encuentran: la temperatura, el pH, la actividad de agua, presencia de cationes (monovalentes y divalentes), tipo de azúcares (Capuano y Fogliano, 2011; Lund y Ray, 2017; Morales, 2009).

2.2.1.1. Mecanismos de formación

Durante la reacción de Maillard, el HMF es formado en la etapa intermedia mediante la degradación en medio ácido de productos de Amadori y Heyns cuyo azúcar correspondiera a una hexosa (de Oliveira et al., 2016). Las Figuras B-1, B-2 y B-3 esquematizan la formación de HMF mediante la reacción de Maillard a partir de glucosa y fructosa.

Por otro lado, durante la caramelización el HMF es formado por tres deshidrataciones de las hexosas con catálisis ácida y la acción de mecanismos de

ciclación (Morales, 2009; Morales y Jiménez-Pérez, 1998). Estas reacciones ocurren a temperaturas superiores a la reacción de Maillard, sin embargo, en condiciones ácidas la formación de HMF por este mecanismo puede ocurrir a bajas temperaturas (Capuano y Fogliano, 2011; Morales, 2009). La Figura B-4 esquematiza la formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante caramelización.

Existe una ruta alternativa para la formación de HMF bajo condiciones pirolíticas y secas (Capuano y Fogliano, 2011), la cual es catalizada en presencia de cationes (Gökmen y Şenyuva, 2007; Lund y Ray, 2017). Esta ruta involucra la formación del catión fructofuranosil, el cual es altamente reactivo hacia HMF. La Figura B-5 esquematiza este mecanismo de formación de HMF mediante pirolisis.

A continuación, la Figura 2-2, presenta un esquema para la formación de HMF que incluye las tres rutas mencionadas anteriormente.

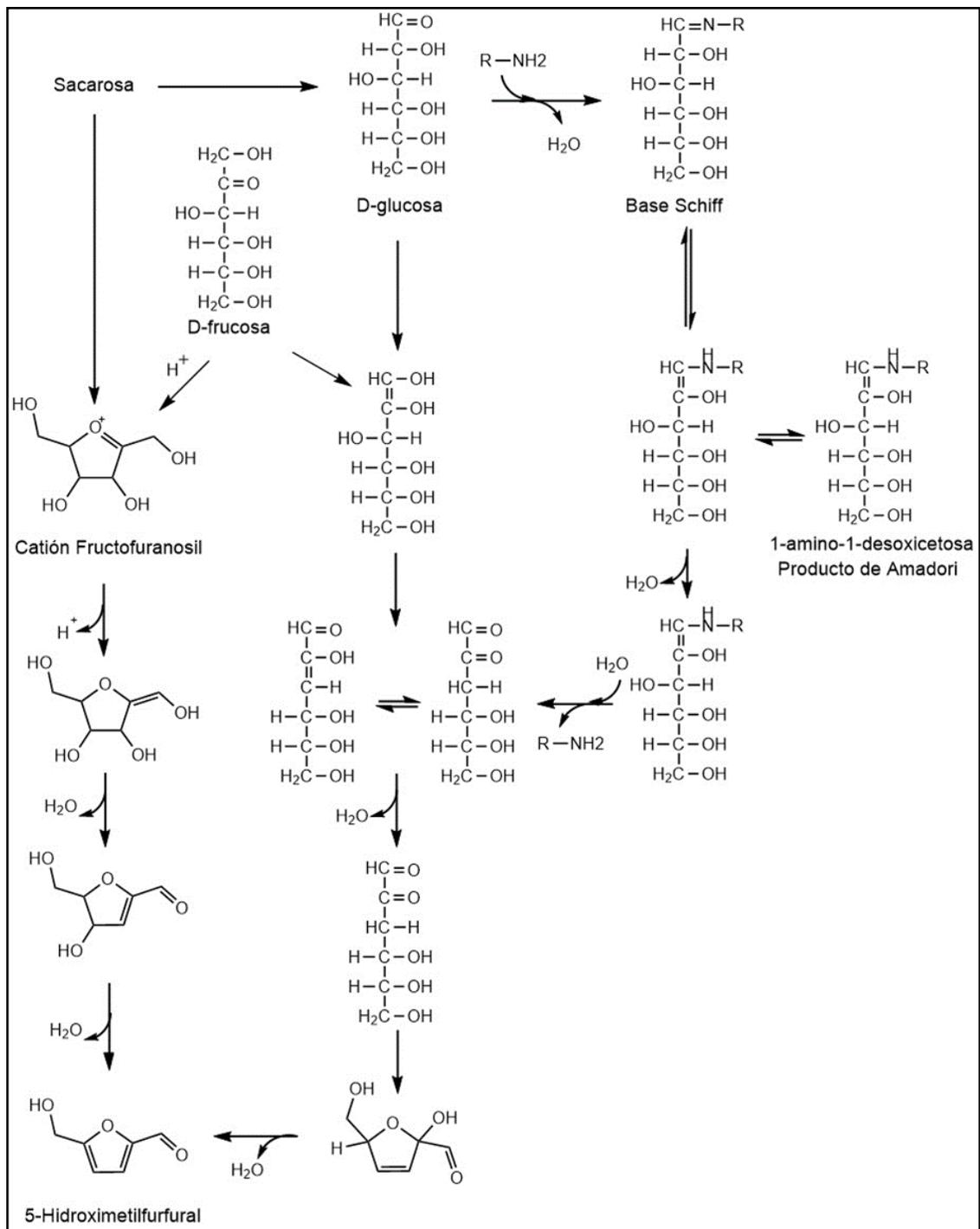


Figura 2-2. Esquema de formación de HMF. Adaptado de Capuano y Fogliano (2011).

2.2.1.2. Determinación de HMF en alimentos

Debido al procesamiento térmico al que son sometidos gran número de alimentos, la determinación de HMF para ser utilizado como indicador de daño térmico, e inclusive de deterioro de calidad, resulta de interés para la industria (Makawi et al., 2009). Las propiedades de cada matriz alimentaria son determinantes al momento de seleccionar una metodología analítica y, por consiguiente, la validación de la misma resulta de gran importancia para evitar las determinaciones imprecisas (Morales, 2009).

Entre las técnicas de determinación de HMF se encuentran:

- a) Colorimetría: el método original correspondía a una identificación cualitativa, en la actualidad adaptado a mediciones cuantitativas mediante la medición del color generado por la reacción del HMF con determinados reactivos (Morales, 2009).
- b) Espectrofotometría: la determinación de HMF se efectúa midiendo la absorbancia de manera directa o indirecta (mediante preparación de un derivado), siendo la mayor fuente de error la interferencia de compuestos que absorban la misma longitud de onda requerida en la medición (Morales, 2009).
- c) Cromatografía: el método es ampliamente utilizado para medir HMF y otros furfurales por su alta absorción de UV cercanos a los 280 nm, siendo 284 nm la longitud de onda que genera mayor respuesta para HMF (Morales, 2009).

2.2.1.2.1. Determinación de HMF en productos lácteos

En particular la determinación de HMF en productos lácteos se basa en el método desarrollado por Keeney y Bassette (1959), el cual consiste en una determinación por espectrofotometría utilizando una reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Morales, 2009). En la actualidad el método propuesto por estos autores ha sido modificado y adaptado en diversas ocasiones, sin embargo, marcó una distinción entre HMF libre y HMF total que aún es utilizada en las metodologías de determinación de HMF en productos lácteos (Albalá-Hurtado et al., 1997; Chávez-Servin et al., 2005; Morales, 2009).

El HMF total corresponde a la suma entre el HMF libre y el HMF potencial, es decir, el que se encuentra en forma de HMF en la muestra estudiada sumado al HMF proveniente de precursores (Chávez-Servin et al., 2005; Keeney y Bassette, 1959; Morales, 2009). Entre los precursores de HMF se encuentran: HMF ligados a proteínas intermediarios de la reacción de Maillard (productos de Amadori, base de Schiff, productos enólicos 1-2, etc.) y azúcares reductores disponibles (Chávez-Servin et al., 2005; Keeney y Bassette, 1959; Morales, 2009; Morales y Jiménez-Pérez, 1998). La diferencia entre la medición de ambos radica en un tratamiento térmico en condiciones ácidas con el fin de liberar el HMF potencial (Chávez-Servin et al., 2005; Morales, 2009).

2.2.1.3. Ocurrencia en alimentos

El HMF se encuentra en un amplio espectro de alimentos sometidos a tratamientos térmicos para su preservación y la generación de atributos sensoriales. Productos sometidos a tratamientos de extrusión, cocción, horneado, tostado y pasteurización, entre otros, son susceptibles a la formación de este neo-contaminante (Shapla et al., 2018). La Figura 2-3 contiene concentración de HMF promedio reportados para algunos alimentos.

En cuanto a la ingesta HMF, diversos estudios se han llevado a cabo en distintas poblaciones con el fin de estimar la exposición a HMF producida por la dieta local (Husøy et al., 2008; Monakhova y Lachenmeier, 2012; Rufián-Henares y de la Cueva, 2008). Según lo reportado por Janzowski et al. (2000) el consumo diario estimado de HMF se encuentra entre 30-150 mg/persona, siendo varias órdenes de magnitud superior al de otros neo-contaminantes (Durling et al., 2009). Cabe tener en cuenta que estos valores corresponden a la exposición dietaria a HMF. Entre otras fuentes de exposición se encuentran la inhalación de humo de tabaco, el consumo de fármacos que lo contengan, o bien por inhalación de vapores o contacto con esta sustancia en industrias que utilicen polímeros o químicos derivados de HMF (Ünivar, 2018).

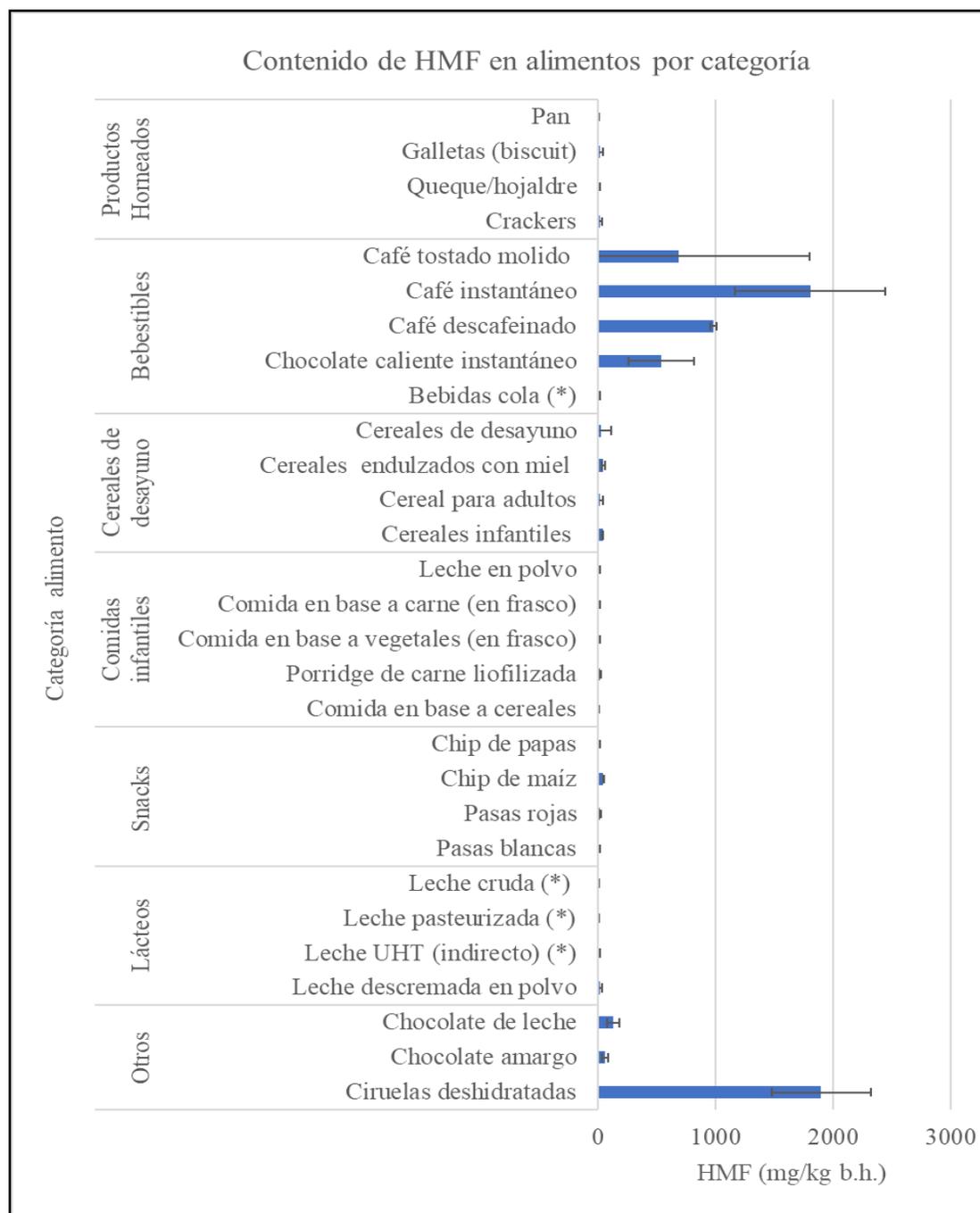


Figura 2-3. Contenido de HMF en algunos productos alimentarios (elaboración propia). (*) Contenido de HMF expresado en mg/L. Referencias en tabla C-1.

2.2.1.4. Toxicología

El HMF ha sido reportado como citotóxico e irritante para las membranas mucosas, tracto respiratorio superior, piel y ojos, mutagénico y carcinogénico para animales y humanos (Capuano y Fogliano, 2011). Adicionalmente, daños a nivel de músculos estriados y vísceras han sido asociados al HMF y su combinación con proteínas, causantes de acumulación de toxinas en el cuerpo (Makawi et al., 2009). Sin embargo, estudios recientes han detectado una amplia gama de efectos positivos como son cualidades antioxidantes, antialérgicas, y antianémico, entre otros (Shapla et al., 2018).

Estudios llevados a cabo para determinar el potencial mutagénico y genotóxico del HMF han sido claves en la detección de su derivado el sulfoximetilfurfural (SMF). El SMF es formado a partir del HMF en especies que expresan sulfotransferasas humanas y animales, y cuyo potencial mutagénico es mayor al HMF debido a su capacidad de formar aductos ADN-SMF (Capuano y Fogliano, 2011; Fels-klerx et al., 2014; Pastoriza de la Cueva et al., 2016).

Si bien los estudios toxicológicos no son concluyentes, el riesgo potencial por exposición dietaria de HMF y otros neo-contaminantes es crítico para la seguridad alimentaria, siendo clave el desarrollo de estrategias de mitigación para estos compuestos.

Las Tablas 2-1 y 2-2 presentan algunos de los potenciales efectos sobre la salud que pueden tener el HMF y SMF.

Tabla 2-1. Efectos potenciales en la salud del HMF y SMF, parte 1.

Compuesto	Efecto potencial en la salud	Actividad biológica	Referencia	
			<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
HMF	Carcinogénico	Induce el intercambio entre cromátidas hermanas, favoreciendo la formación de adenomas en intestinos y piel.	Nishi et al. (1989)	Bruce et al. (1993); Kitts et al. (2012); Surh et al. (1994)
	Anticarcinogénico	Tiene efectos apoptóticos y de “arresto” G0/G1 en células con daños en el ADN, actúa sobre la regulación por transducción de señales ROS.	Zhao et al. (2014)	
	Antioxidante	Protege de daños inducidos por ROS y radicales libres, mediante la quelación con ellos.	Zhao et al. (2014)	
	Irritante	Aumenta la incidencia de daño en el epitelio del tracto respiratorio y membranas mucosas.		National Toxicology Program (2010)
	Antialérgico	Bloquea la liberación de histamina y las señales de Ca ²⁺ mediante la formación de aductos.	Suzuki et al. (2005); Yamada et al. (2011)	Alizadeh et al. (2017)

Tabla 2-2. Efectos potenciales en la salud del HMF y SMF, parte 2.

Compuesto	Efecto potencial en la salud	Actividad biológica	Referencia	
			<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
HMF	Antianémico	Las moléculas de HMF se unen de manera covalente con la hemoglobina falciforme (HbS), generando un aducto base de Schiff HbS y los terminales N α Val1 de la HbS, cambiando alostericamente la hemoglobina a una con mayor solubilidad de oxígeno.	Abdulmalik et al. (2005)	Abdulmalik et al. (2005)
	Antiinflamatorio	Inhibe la producción de citocinas inflamatorias (NO, PGE2, TNF- α , IL-6, IL-1 β) y ROS en LPS-estimulada RAW 264.7.	Kong et al. (2019)	
SMF	Carcinogénico	Forma aductos ADN-SMF, principalmente en tejido de riñones, piel, leucocitos y células hepáticas.	Y.-C. Lee et al. (1995)	Pastoriza de la Cueva et al. (2016); Surh y Tannenbaum (1994)

2.2.1.5. Mecanismos de mitigación de HMF

Producto de los mecanismos comunes que tienen la formación de HMF y el desarrollo de colores, aromas y sabores deseados en alimentos, su mitigación es compleja y puede tener consecuencias adversas en la calidad y aceptabilidad de los alimentos (Capuano y Fogliano, 2011). En este sentido, es necesario tener en cuenta que la mayor parte de los estudios actuales fueron llevados a cabo en sistemas modelo y a nivel de laboratorio, por lo que su extrapolación a matrices alimentarias podría llevar a resultados indeseados (Anese y Suman, 2013).

Entre las técnicas de mitigación estudiadas se encuentran las modificaciones en las condiciones de procesamiento y las modificaciones de formulación. Existen también técnicas basadas en la eliminación de los contaminantes como tratamientos de vacío o fermentación, cuyas alteraciones sobre los productos requieren aún evaluación (Rannou et al., 2016).

Las Tablas 2-3 y 2-4 presentan ejemplos de mitigación de HMF en distintas matrices alimentarias y sistemas modelo.

Tabla 2-3. Ejemplos de mitigación de HMF en distintas matrices alimentarias, parte 1.

Matriz	Tipo de modificación	Técnica de mitigación	Efecto	Mecanismo	Referencia
Sistema modelo tipo galletas	Formulación	Sustitución de azúcares reductores por no reductores o alcoholes de azúcar	El reemplazo de sacarosa por maltitol conllevó reducciones cercanas al 99% en la formación de HMF.	No reportado.	Courel et al. (2009)
Hexosas en soluciones acuosas acidificadas	Formulación	Selección adecuada del azúcar reductor	En soluciones de ácido sulfúrico 100 mM la conversión de cetosas a HMF tras 60 minutos a 120 °C es de: 60% para la sorbosa, 70% para la fructosa y 90% para la tagatosa.	La reactividad de las cetosas durante la deshidratación con catálisis ácida hacia HMF se ve afectada por la orientación de los grupos hidroxilos en los carbonos C3 y C4.	Van Putten et al. (2013)
Sistema modelo tipo galleta	Formulación	Modificación del pH	El aumento de pH de 3,28 a 4,37 para galletas horneadas a 205 °C por 11 minutos, significó una reducción del contenido de HMF cercana al 93%.	La hidrólisis de sacarosa se ve favorecida por las disminuciones de pH.	Gökmen et al. (2007)
Soluciones acuosas de fructosa	Formulación	Adición de polifenoles	La adición de ácido rosmarínico en concentraciones de 10 mM a soluciones de fructosa 40%	No reportado.	X. Zhang et al. (2013)

			(p/v) sometidas a calentamiento a 120 °C por 2 horas provocó reducciones de HMF cercanas al 40%.		
--	--	--	--	--	--

Tabla 2-4. Ejemplos de mitigación de HMF en distintas matrices alimentarias, parte 2.

Matriz	Tipo de modificación	Técnica de mitigación	Efecto	Mecanismo	Referencia
Sistema modelo tipo galleta	Formulación	Encapsulación de sal	La encapsulación de NaCl con cera de carnaúba provocó reducciones de 61% en la concentración final de HMF.	El NaCl actúa como ácido de Lewis y acelera la descomposición de sacarosa, catalizando la formación de HMF en condiciones pirolíticas.	Fiore et al. (2012)
Sistema modelo tipo galletas	Procesamiento	Disminución de la temperatura de horneado	Las concentraciones de HMF disminuyeron de 229 mg/kg bs a 0,3 mg/kg bs al bajar la temperatura de horneado de 230 °C a 150 °C.	La hidrólisis de sacarosa en azúcares reductores simples es favorecida a altas temperaturas.	Courel et al. (2009)
Sistema modelo de sacarosa y proteínas de leche	Procesamiento	Disminución del tiempo de procesamiento	A 83 °C el procesamiento por 15 segundos en lugar de 25 segundos significó una reducción de 20% en las concentraciones de HMF.	No reportado.	Shukla et al. (2017)

Sistema modelo tipo queque	Procesamiento	Uso de horno a vapor	El uso de un horno a vapor, en lugar de un horno tradicional, para la cocción del sistema modelo por 60 minutos genero una reducción superior al 90% en el contenido de HMF.	El uso de vapor reduce la evaporación de agua en la superficie del queque y en consecuencia se reduce la reacción de Maillard y la caramelización.	Petisca et al. (2013)
----------------------------	---------------	----------------------	--	--	-----------------------

2.2.1.5.1. Modificaciones en condiciones de procesamiento

La reacción de Maillard y caramelización son altamente dependientes de la temperatura y tiempo aplicados, y las condiciones del medio de reacción. La formación de HMF es a su vez directamente dependiente de estos factores, en este sentido, los productos reducidos en HMF suelen tener reducciones en el color y aromas que los caracteriza (Capuano y Fogliano, 2011).

Entre las técnicas que han sido aplicadas como cambios en las condiciones de proceso se puede destacar el uso de: hornos de vapor para evitar la evaporación en superficies de bizcochos generando menor contenido de HMF y furfurales; hornos de vacío para disminución de acrilamida y HMF en galletas; optimización de temperatura y tiempo para un tratamiento determinado (Rannou et al., 2016; Toker et al., 2013).

2.2.1.5.2. Modificaciones en la formulación

La modificación de la formulación corresponde a una medida preventiva a la formación de HMF, sin embargo, en la práctica el uso de una misma técnica puede, dependiendo de la composición del sistema y condiciones de proceso, mitigar o favorecer la formación del contaminante (Anese y Suman, 2013).

Entre las modificaciones propuestas se encuentra: la sustitución de azúcares reductores por azúcares no reductores o polialcoholes (Anese y Suman, 2013; Capuano y Fogliano, 2011); modificación en proporción azúcar/aminoácido (Elmore et al., 2010); disminuir la presencia de cationes o cambiarlos (Fiore et al.,

2012; Gökmen y Şenyuva, 2007); aumentar el pH (Capuano y Fogliano, 2011); aumentar el contenido de agua y actividad de agua (Gökmen et al., 2008; Petisca et al., 2013).

Producto de la correlación entre la formación de HMF y el desarrollo de las características sensoriales de las reacciones de Maillard y caramelización, la mitigación de este contaminante por los métodos anteriormente mencionados compromete la aceptabilidad de los consumidores. En este sentido la adición de extractos polifenólicos como tecnología de mitigación para la reacción de Maillard resulta de gran interés por el bajo efecto que ha demostrado sobre las propiedades sensoriales de los productos (Rannou et al., 2016). El efecto sobre la reacción de Maillard de variados polifenoles ha sido estudiado, obteniendo resultados de mitigación, promoción o bien concentraciones invariantes dependiendo del polifenol, su origen, condiciones de procesamiento y matriz alimentaria sobre la cual fue aplicado (Rannou et al., 2016; X. Zhang et al., 2013).

2.3. Textura

La textura en alimentos es principalmente la respuesta de los sentidos táctiles al estímulo hecho por el contacto entre una parte del cuerpo y la comida (Bourne, 2002). En este sentido la textura queda categorizada como una propiedad sensorial, que puede ser percibida por la visión, tacto y sonido o bien la combinación de estas (Lawless y Heymann, 2010).

Es por esta razón que los estudios de textura están asociados a las evaluaciones con paneles sensoriales entrenados. Sin embargo, el desarrollo de técnicas

instrumentales para medir parámetros físicos y correlacionarlos a los atributos identificados por los panelistas ha permitido predecir de mejor manera la aceptabilidad de los consumidores ante productos testeados instrumentalmente (Bourne, 2002; Lawless y Heymann, 2010; Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

Entre las áreas de la física relevantes para el estudio de la textura se encuentra la reología, ciencia que estudia la deformación y flujo de la materia bajo estímulos externos (Bourne, 2002; Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005). En alimentos la reología tiene aplicaciones en control de calidad y atributos sensoriales, diseño de plantas, e investigación y desarrollo de matrices alimentarias (McKenna y Lyng, 2003). Los estudios reológicos se llevan a cabo con un reómetro, siendo los ensayos más comunes: viscosimetría rotacional, viscosimetría oscilatoria, análisis de compresión, extensión y torsión (Nielsen, 2017).

3. HIPÓTESIS

A través de la modulación de la temperatura de procesamiento es posible mitigar la formación de HMF en matrices lácteas tipo manjar preservando sus propiedades físicas en comparación a las de un producto comercial.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Mitigar la formación de HMF en matrices lácteas tipo manjar preservando sus propiedades físicas en comparación a un producto comercial.

4.2. Objetivos específicos

1. Implementar y validar una metodología de cuantificación de HMF en matrices lácteas.
2. Determinar las características fisicoquímicas de tres marcas comerciales de manjar con el fin de establecer los parámetros de comparación de las matrices tipo manjar.
3. Estudiar el efecto de la temperatura de proceso sobre el pardeamiento no enzimático y la formación de HMF en un sistema lácteo modelo tipo manjar.

5. METODOLOGÍA

5.1. Formulación y elaboración de matriz láctea tipo manjar

Las matrices lácteas tipo manjar (ML) se elaboraron a partir de leche líquida entera (31 g de grasa/L de leche), sacarosa, agar y bicarbonato de sodio. Las proporciones de estos ingredientes se establecieron de una combinación entre las formulaciones propuestas en literatura y ensayos preliminares realizados en laboratorio. De la metodología propuesta por Malec et al. (2005) se estableció la proporción leche:sacarosa, empleándose 200 g de la última por cada litro de leche utilizado. La cantidad de agar y bicarbonato de sodio se establecieron en 2,0 g y 1,5 g respectivamente, por litro de leche. La proporción de ingredientes para la elaboración de las ML se muestra en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1. Formulación de matriz láctea, porcentajes respecto a total de ingredientes sin procesamiento térmico.

Ingrediente	Cantidad (%)
Leche líquida	83,09
Sacarosa	16,62
Agar	0,17
Bicarbonato de sodio	0,12

Las ML fueron procesadas térmicamente a diferentes temperaturas (110, 130 y 150 °C) y tiempos (Tabla E-1, E-2 y E-3) en un baño termorregulado de aceite hasta obtener una concentración de sólidos solubles entre 65 y 70 °Brix. Luego se enfriaron en un baño de agua a temperatura ambiente (25 °C) hasta alcanzar temperaturas inferiores a 35 °C. Con el fin de establecer el momento adecuado para el término del procesamiento, se midió la concentración de sólidos solubles cada 20, 15 o 10 minutos, para las temperaturas de 110, 130 y 150 °C, respectivamente

Una vez alcanzada la temperatura deseada de enfriamiento ($T^{\circ} \leq 35^{\circ}\text{C}$), las ML fueron envasadas en recipientes plásticos rotulados y refrigeradas a 4 °C hasta su caracterización fisicoquímica.

La preparación de las ML se realizó en triplicado, mediante el procedimiento descrito en el diagrama de la Figura 5-1.

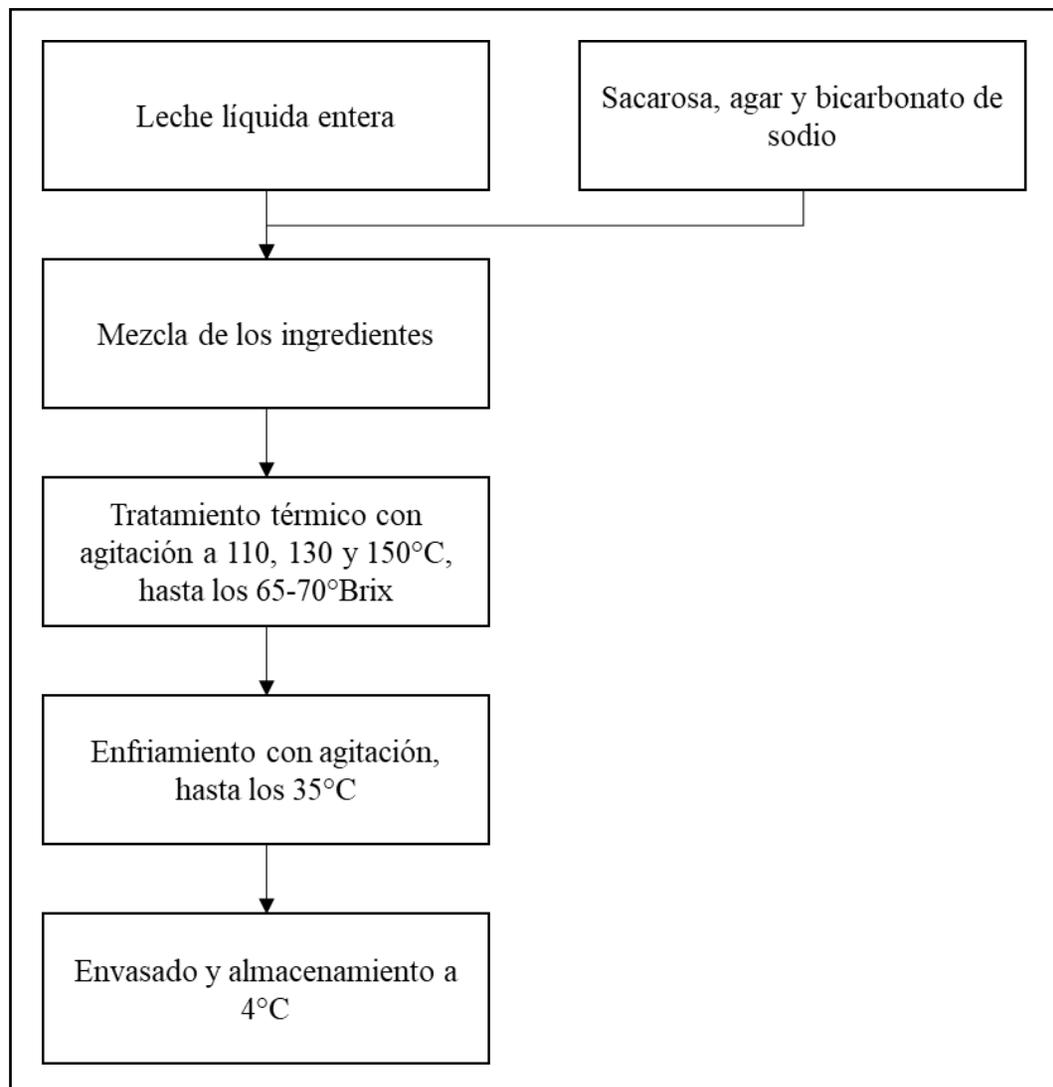


Figura 5-1. Procedimiento de preparación de ML.

5.2. Caracterización de manjar

Las determinaciones fisicoquímicas que se establecen a continuación se llevaron a cabo en los manjares comerciales y en las ML experimentales.

5.2.1. Sólidos solubles

La determinación de sólidos solubles se realizó mediante el uso de un refractómetro (R0062007, Refractec, Hong Kong, China) según la metodología propuesta por Novoa y Ramírez Navas (2016).

5.2.2. pH

Los valores de pH se determinaron con un pH-metro (FC2022 Halo, Hanna Instruments, Rhode Island, Estados Unidos) según la metodología propuesta por Ranalli et al. (2011).

5.2.3. HMF

La determinación de HMF se efectuó en manjares comerciales y matrices lácteas únicamente para HMF libre. Esto, tomando en cuenta que este es el valor reportado en literatura para diversos productos alimentarios. Sin embargo, la validación de la metodología se realizó tanto para HMF libre como HMF total, producto de su posible uso en investigaciones futuras.

El contenido de HMF total y HMF libre se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000, Massachusetts, Estados Unidos) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD), según la metodología descrita por Chávez-Servin et al. (2005) sujeto a modificaciones.

Las muestras para determinación de HMF total se prepararon disolviendo 0,8 g de manjar (o ML) en 4 mL de ácido oxálico 0,2 N (solución preparada diariamente)

en un tubo sellado. El tubo se calentó en un baño de agua a 100 °C por 25 minutos y luego se dejó a temperatura ambiente a enfriar. Se agregaron 1,2 mL de solución de ácido tricloroacético (TCA) 40% (m/v) y se agitó en vortex. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se filtró y recolectó en un matraz aforado de 10 mL. Al residuo sólido se adicionaron 4 mL de TCA 4% (m/v), la solución obtenida fue agitada y luego centrifugada nuevamente. El sobrenadante se filtró y adicionó al matraz aforado, la fase sólida fue descartada tras este paso. La solución contenida en el matraz se aforó con TCA 4% (m/v), tras lo cual se agitó y filtró por medio de filtros de jeringa de nylon de 0,22 µm. La solución obtenida de esta filtración se recolectó en viales de 2 mL para su inyección en el equipo HPLC.

Las muestras para medición de HMF libre se preparan de manera similar, pero omitiendo el baño de agua caliente.

Para las inyecciones de muestras de manjar en HMF total se diluyó la solución obtenida por el método en 1:14 con TCA 4% (m/v).

Durante la validación de metodología se realizó el procedimiento en manjar como en leche en polvo, utilizando 2 g de esta última en lugar de los 0,8 g señalados anteriormente.

Las condiciones de trabajo del equipo HPLC-DAD se presentan en la Tabla 5-2.

Tabla 5-2. Condiciones cromatográficas para la determinación HMF en lácteos.

Columna	Acclaim TM 120 C18 5 μ m 120 Å 4.6 x 150 mm
Fase móvil	Agua:acetonitrilo (95,5:4,5 v/v)
Flujo fase móvil	1 mL/min
Temperatura columna	30 °C
Volumen de inyección de muestra	20 μ L
Longitud de onda del detector	284 nm

5.2.3.1. Validación del método

Se realizó una *in house validation* considerando los protocolos de validación aplicados por Chávez-Servin et al. (2005) y De Andrade et al. (2016). Los análisis estadísticos se hicieron con el programa STATGRAPHICS Centurion 16.

5.2.3.1.1. Selectividad

Se evaluó mediante la comparación de los tiempos de retención y los picos de HMF entre las soluciones estándar y las muestras de alimentos (De Andrade et al., 2016).

5.2.3.1.2. Calibración y linealidad

Se construyó una curva de calibración en el rango de 50 - 5000 μ g/L a partir de una solución stock de HMF (1000 mg/L) (Chávez-Servin et al., 2005). Tres soluciones estándar se prepararon para cada punto de la curva y fueron inyectadas por triplicado (De Andrade et al., 2016). La linealidad se evaluó mediante la aplicación de una regresión lineal a los resultados con un nivel de confianza del

95% (De Andrade et al., 2016). La significancia de los coeficientes de la curva de calibración fue testeados por el t-test con una confianza del 95% (De Andrade et al., 2016).

5.2.3.1.3. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Los LOD y LOQ se determinaron usando las ecuaciones 5.1 y 5.2 descritas a continuación, empleadas por De Andrade et al. (2016).

$$LOD = \frac{3 * SD}{m} \quad (5.1)$$

$$LOQ = \frac{10 * SD}{m} \quad (5.2)$$

Donde SD : desviación estándar del intercepto y m : pendiente de la curva de calibración.

5.2.3.1.4. Precisión

La precisión del método se determinó por repetibilidad y reproducibilidad. En las pruebas de repetibilidad, tres muestras de un mismo stock se prepararon según el análisis de HMF estudiado e inyectadas por triplicado el mismo día (De Andrade et al., 2016). Para las pruebas de reproducibilidad, se efectuó el mismo procedimiento en 5 días consecutivos (De Andrade et al., 2016). Los valores de desviación estándar relativa (RSD) se calcularon a partir de los resultados para repetibilidad y reproducibilidad (Chávez-Servin et al., 2005). Los valores de

Horrorat fueron obtenidos de los resultados de un análisis de varianza (ANOVA) con 95% de confianza (De Andrade et al., 2016).

5.2.3.1.5. Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante ensayos de recuperación. Las muestras, previamente analizadas, se prepararon agregando a la muestra 140 µL de una solución stock de HMF (10 µg/mL), exceptuando las mediciones de HMF total en manjar a las cuales se adiciono 1400 µL. El porcentaje de recuperación se calculó como según la ecuación 5.3 (Chávez-Servin et al., 2005).

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{contenido HMF recuperado}}{\text{contenido de HMF adicionado}} * 100\% \quad (5.3)$$

5.2.4. Azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se determinó mediante el uso de HPLC (Thermo Scientific, Dionex UltiMate 3000, Massachusetts, Estados Unidos) con detector de índice de refracción (IR), método adaptado de Mariotti-Celis et al. (2017). Se pesaron 0,1 g de muestra en una balanza analítica y se suspendieron en 10 mL de agua Milli Q, ayudado por agitación en vortex. La solución se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró mediante el uso de filtros de jeringa de nylon 0,22 µm. Del filtrado se tomaron 300 µL, se incorporó en viales de 2 mL, y se agregaron 700 µL de acetonitrilo para el análisis en el equipo HPLC-IR.

Las condiciones de trabajo del equipo HPLC-IR se presentan en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3. Condiciones cromatográficas para la determinación de azúcares reductores en lácteos.

Columna	LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR NH ₂ (5 µm)
Fase móvil	Acetonitrilo/agua (70/30%)
Flujo fase móvil	1 mL/min
Temperatura columna	40 °C
Volumen de inyección de muestra	20 µL
Temperatura celda IR	30 °C

5.2.5. Color

El color se midió en las muestras de marcas comerciales y en los productos experimentales terminados mediante el método CIE Lab presentado por Novoa y Ramírez-Navas (2012) con algunas modificaciones. Para esto se utilizó un colorímetro (CR-400, Konica Minolta, Tokio, Japón).

La Figura 5-2 contiene la ilustración del espacio de color mencionado anteriormente.

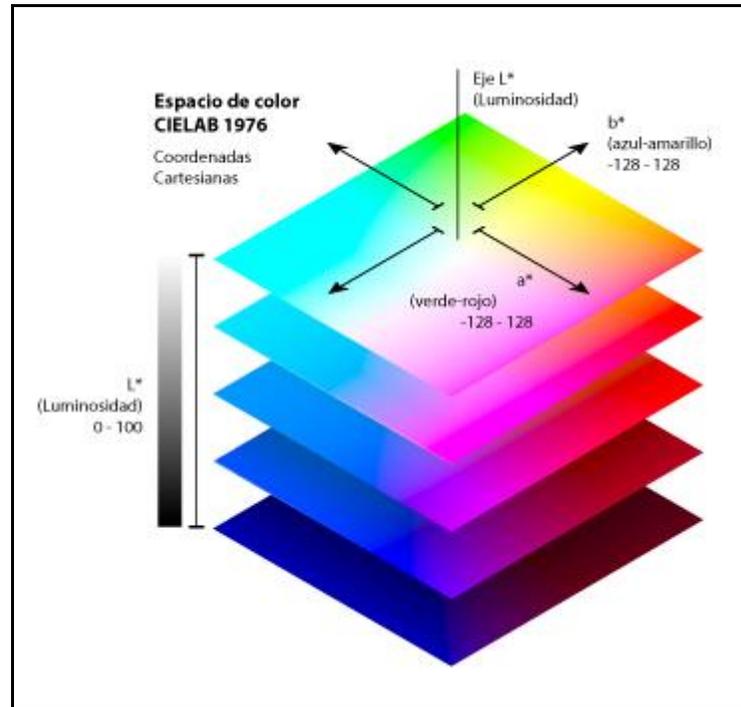


Figura 5-2. Espacio de color CIE Lab (ilustración) (*Glosario gráfico*, s.f.).

5.2.6. Propiedades reológicas

Las matrices se sometieron a pruebas de esfuerzo de corte, mediante el uso de un reómetro (RheolabQC, Anton-Paar, Graz, Austria) con un sistema de medición de cilindros concéntricos (CC27/S, Anton-Paar, Graz, Austria). Las mediciones se realizaron a 25 °C y el gradiente de deformación fue variando entre 0 y 100/s. Los ensayos duraron 10 minutos.

Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo no lineal Herschel-Bulkley, cuya ecuación se presenta a continuación (Ranalli et al., 2017).

$$\sigma = \sigma_0 + K (\dot{\gamma})^n \quad (5.4)$$

Donde:

σ : Esfuerzo de corte (Pa).

σ_0 : Umbral de fluencia (Pa).

K: Coeficiente de consistencia (Pa · sⁿ).

n: Índice de comportamiento de flujo (adimensional).

$\dot{\gamma}$: Gradiente de deformación (s⁻¹).

Los ajustes del modelo se efectuaron utilizando Solver de Excel (Microsoft Corporation, Washington, Estados Unidos), minimizando la ecuación para raíz de error cuadrático medio (RMS) descrita por Moyano y Zúñiga (2003) presentada a continuación (Ec. 5.5). Para estos ajustes se fijó el valor de σ_0 al valor σ correspondiente al menor gradiente de deformación medido experimentalmente.

$$RMS (\%) = \sqrt{\frac{1}{n} * \sum \left(\frac{V_{exp} - V_{fit}}{V_{exp}} \right)^2} * 100\% \quad (5.5)$$

Donde:

V_{exp} : valor experimental.

V_{fit} : valor ajustado por modelo.

n: número de datos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Validación metodología de medición de HMF en manjar/matriz láctea

La validación de la metodología se llevó a cabo simultáneamente en leche en polvo y en un manjar comercial. Las Figuras D-1, D-2 y D-3 presentan los cromatogramas de las distintas matrices estudiadas bajo los parámetros seleccionados. Es posible apreciar la similitud en los tiempos de retención para HMF para todas ellas, además de la ausencia de compuestos cuyos picos interfieran con el de HMF requerido. Tomando esto en consideración, se establece que el método tiene una selectividad adecuada para la medición de HMF, tanto en la leche en polvo, como en manjar.

La linealidad se evaluó mediante el ajuste de las curvas de calibración a una regresión lineal. En el rango empleado para las curvas de calibración, 50-5000 $\mu\text{g/L}$, se obtuvo un coeficiente de correlación de 99,98%, demostrando un ajuste lineal significativo entre la concentración de HMF y el área medida por cromatografía. Esto se enfatiza por el alto valor del factor F de la regresión en un nivel de confianza del 95%. Por su parte, los coeficientes de la curva se evaluaron mediante el t-test con 95% de confianza, obteniendo que ambos valores son necesarios en el modelo. Las Tablas 6-1 y 6-2 presentan los resultados del análisis de regresión lineal efectuado.

Tabla 6-1. Coeficientes de regresión lineal.

Parámetro	Ajuste	SD	Estadístico t	Valor P
Intercepto	-0,0468759	0,0172866	-2,71169	0,0154
Pendiente	0,00265755	7,13x10 ⁻⁶	372,694	0,0000

Tabla 6-2. Análisis de regresión lineal.

Coeficiente de correlación	Estadístico R ²	ANOVA	
		Razón F	Valor P
0,999942	99,9885%	138900,76	0,0000

Tomado en consideración el análisis de la regresión lineal, se comprueba la linealidad de las curvas de calibración en el rango estudiado, las cuales pueden ser descritas mediante la siguiente ecuación:

$$HMF(\mu\text{g/L}) = 376,3430 * \text{Área (mAU * min)} + 17,8219 \quad (6.1)$$

Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de los parámetros ajustados a la regresión lineal corresponden a 19,51 $\mu\text{g/L}$ y 65,05 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Los resultados para precisión y exactitud se presentan en la Tabla 6-3 explicitando el método aplicado, matriz y tipo de HMF evaluado.

Tabla 6-3. Resultados de precisión y exactitud.

	Leche polvo		Manjar	
	HMF libre	HMF total	HMF libre	HMF total
Repetibilidad (CV%)	-	2,83	4,12	1,99
Reproducibilidad (CV%)	-	3,76	5,98	3,62
HorRat _(r)	-	0,63	1,00	0,91
Recuperación (%)	-	87,83	89,04	91,89

Los coeficientes de variación obtenidos para los ensayos de repetibilidad, reproducibilidad y recuperación se encuentran en el rango esperado según las pautas establecidas por la AOAC International (2012). Por su parte, los valores de HorRat intralaboratorio, se encuentran dentro del rango aceptable (0,3-1.3) para la AOAC International (2012).

Tomando en consideración los resultados obtenidos, la metodología propuesta para la determinación de HMF libre y total en leche y manjar resulta adecuada según las guías internacionales de métodos de análisis (AOAC International, 2012; National Association of Testing Authorities, 2012).

6.2. Caracterización de manjares comerciales y matrices lácteas

Se evaluaron las tres marcas comerciales de manjar con mayor producción en el año 2018 (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile, 2019), las cuales se identificarán a partir de este momento como I (49,3% de la producción nacional), II (27,2%) y III (12,1%). Para cada

marca se seleccionó la formulación “*Tradicional*” de la misma y se adquirieron tres muestras de cada una.

Por otra parte, empleando el procedimiento descrito anteriormente se fabricaron matrices lácteas (ML) tipo manjar en tres condiciones de proceso, cada una por triplicado. A partir de este momento se identificarán dichas matrices como IV, V y VI, dependiendo del procesamiento recibido. La Tabla 6-4 indica las condiciones respectivas. Las Tablas E-1, E-2 y E-3 contienen los resultados de las mediciones efectuadas durante el procesamiento.

Las muestras I-VI se sometieron a los ensayos de caracterización descritos anteriormente, efectuando dichos ensayos por triplicado.

Tabla 6-4. Identificación de matrices lácteas.

Identificación	Temperatura del baño (°C)	Intervalos medición (min)
IV	110	20
V	130	15
VI	150	10

La Tabla 6-5 presenta los resultados de sólidos solubles, pH y HMF libre para las seis muestras. En cuanto al contenido de sólidos solubles, las muestras se encontraron en un rango entre 66,1 y 69,8 °Brix. Estos valores resultan similares a los obtenidos por da Silva et al. (2015), que van de 66,7 a 69,5 °Brix. Es posible notar que el valor de las ML es muy cercano al obtenido de las muestras comerciales, el cual era el objetivo durante su fabricación.

Por su parte, los valores de pH de los manjares comerciales presentaron diferencias significativas respecto a las ML, según el método LSD de Fisher al 95% de confianza. Los productos comerciales presentaron valores de pH en el rango 5,96 – 6,01, comprendido en lo reportado por Ranalli et al. (2011) para dulces de leche tradicionales, los cuales van entre 5,70 y 6,04. Las diferencias entre las marcas se pueden deber al pH inicial de las materias primas, al tipo y cantidad de reguladores de acidez utilizados por el productor, y la concentración de éstos durante la elaboración de los productos, los ingredientes reportados por cada productor se presentan en la Figura E-1. Los altos valores de pH obtenidos en las ML se pueden explicar por las cantidades de bicarbonato de sodio utilizados en su fabricación, y cuyo valor no es necesariamente comparable al utilizado por los fabricantes de los productos comerciales estudiados.

El contenido de HMF determinado para los productos comerciales en esta investigación fluctuó entre 2,63 y 9,03 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{b.h.}}$. La Tabla 6-6 presenta algunos de los valores de HMF libre en dulce de leche reportados en literatura. Es pertinente destacar que el manjar y el dulce de leche son equivalentes en formulación y procesamiento, y la diferencia de nombre radica en el país de procedencia. Los resultados obtenidos en las muestras comerciales son comparables a los reportados por Francisquini et al. (2018) para dulces de leche elaborados a nivel laboratorio.

Al evaluar el contenido de HMF en las ML, con valores entre 1,34 - 1,52 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{b.h.}}$, estos resultan ser inferiores al obtenido para los manjares comerciales, siendo dicha diferencia significativa ($p < 0,05$) para dos de los productos comerciales

evaluados. Esto se puede deber a la formulación empleada y su efecto sobre el pH alcanzado por las ML. Producto de la incorporación de bicarbonato de sodio, el pH de las ML es más básico que los productos comerciales, influyendo en los subproductos de la reacción de Maillard, y en particular, la formación de HMF la cual se ve promovida por condiciones ácidas (Morales, 2009). Al graficar los valores de HMF contra sus pH respectivos, se puede apreciar una tendencia de aumento de HMF a medida que disminuye el pH del producto (Figura E-2), lo cual está en concordancia con lo planteado anteriormente.

Adicionalmente, se realizó la determinación de HMF sobre la leche líquida utilizada, y los valores obtenidos se encuentran por debajo del límite de cuantificación del método.

Tabla 6-5. Caracterización química de manjares comerciales y matrices lácteas.

Muestra	° Brix	pH	HMF libre μg/g _{b.h.}
I	66,1 ± 0,7 ^a	5,96 ± 0,05 ^a	2,63 ± 0,34 ^a
II	69,8 ± 1,5 ^b	6,01 ± 0,12 ^a	9,03 ± 1,89 ^c
III	66,4 ± 0,1 ^a	5,98 ± 0,01 ^a	4,43 ± 0,48 ^b
IV (110 °C)	66,6 ± 1,1 ^a	7,03 ± 0,04 ^c	1,34 ± 0,07 ^a
V (130 °C)	67,1 ± 1,2 ^a	6,72 ± 0,05 ^b	1,52 ± 0,05 ^a
VI (150 °C)	67,8 ± 1,6 ^{ab}	6,81 ± 0,08 ^b	1,38 ± 0,02 ^a

Tabla 6-6. HMF libre en dulce de leche.

Tipo de muestra	Metodología de medición	Cantidad HMF ($\mu\text{g/g}_{\text{b.h.}}$)	Referencia
Laboratorio	Espectrofotometría (TBA)	$0,63 \pm 0,03$	Pavlovic et al. (1994)
Laboratorio (n=4)	Espectrofotometría (TBA)	$11,47 \pm 0,90$	Francisquini et al. (2018)
Comercial (n=24)	Espectrofotometría (TBA)	$43.642,88 \pm 30.913,34$	Francisquini et al. (2016)

La Figura 6-1 presenta los resultados obtenidos para el contenido de azúcares reductores de las muestras. El contenido de fructosa de las distintas muestras va entre 62,94 y 271,75 mg/g_{b.h.}, mientras que la glucosa se mueve entre 86,96 y 160,67 mg/g_{b.h.}. Los valores de glucosa obtenidos, si bien, son superiores a los reportados por Gaze, Costa, et al. (2015) de entre 0,9 y 7,5 mg/g de dulce de leche, son inferiores a los propuestos por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (2010) para la fabricación del mismo producto (200 mg/g de producto). Esto se puede deber a las formulaciones empleadas en cada caso y a las materias primas utilizadas.

Los resultados de fructosa en las ML son significativamente menores que el encontrado en las muestras comerciales, siendo menos de la mitad del contenido de estas últimas. La diferencia con respecto a las marcas comerciales puede deberse en gran medida a las formulaciones de cada muestra, tanto en la cantidad de azúcares iniciales como el pH resultante de dichas formulaciones, el cual afecta en la hidrólisis de sacarosa (Asadi, 2005). Por otra parte, entre las ML, las

diferencias pueden ser explicadas producto de las temperaturas de proceso y su efecto en la hidrólisis de sacarosa, aumentando la presencia de fructosa y glucosa a medida que se eleva la temperatura de proceso (Asadi, 2005).

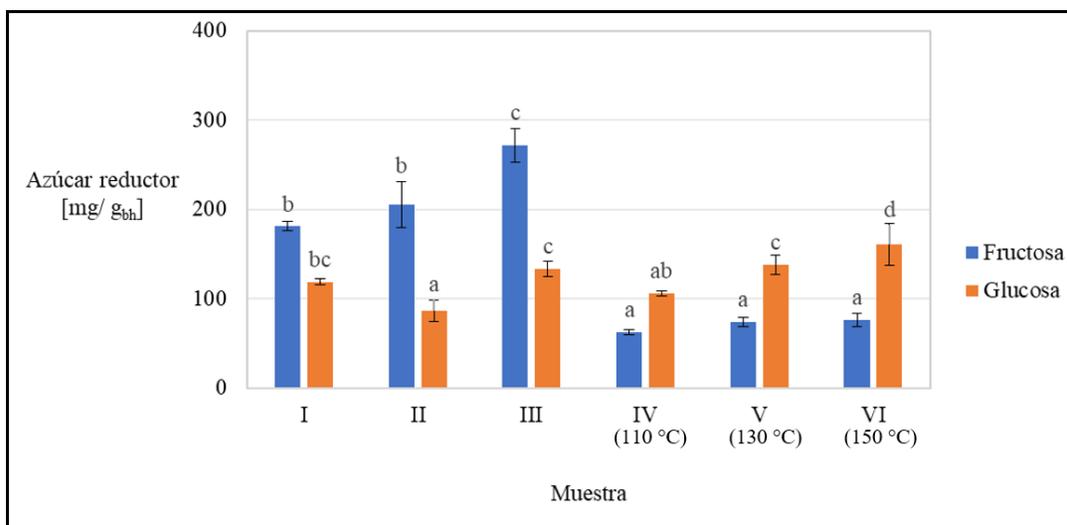


Figura 6-1. Contenido de azúcares reductores de manjares comerciales y matrices lácteas.

En cuanto a la caracterización física de los productos, se efectuaron mediciones de color y propiedades reológicas. La Figura 6-2 presenta los valores de color en coordenadas CIE Lab para las muestras, además de la ilustración de dichas coordenadas. Los resultados obtenidos tanto para L como b, son menores a los encontrados por Ranalli et al. (2011) (L=36,4-44,4; b=16,9-25,4) y Bellarde (2005) (L=50,77; b=24,21) para las muestras comerciales, sin embargo, las ML reportan valores cercanos a los de dichas publicaciones. Por su parte, la

coordinada a de las muestras presenta valores similares a los reportados en los estudios mencionados anteriormente, 6,56-8,15 y 7,45 respectivamente, exceptuando la muestra IV. Las muestras comerciales resultan tener menor luminosidad, pero tonalidades más rojas que las ML.

La muestra IV reporta diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de las muestras estudiadas en todas las coordenadas, estos resultados se relacionan en gran medida a la temperatura de procesamiento a la que se sometieron estas muestras ($T^{\circ} < 90^{\circ} \text{C}$), desfavorable para el desarrollo de colores pardos mediante reacción de Maillard, la cual es beneficiada con aumentos de temperatura (Bates et al., 2006).

Al graficar los valores de HMF contra las coordenadas CIE Lab, se puede apreciar una tendencia de aumento en el valor a medida que aumenta el HMF (Figura E-3). A esto se suman la tendencia de disminución de los valores L y b a medida que aumenta el HMF (Figura E-3). Estos comportamientos pueden ser explicados por la formación de productos de tonalidades pardas o rojizas hasta marrones oscuros por la reacción de Maillard (Singla et al., 2018).

I			II			III		
L	a	b	L	a	b	L	a	b
$34,22 \pm 0,93^b$	$7,43 \pm 0,19^{bc}$	$13,29 \pm 0,40^b$	$31,00 \pm 0,98^a$	$7,08 \pm 0,42^b$	$11,50 \pm 0,24^a$	$32,52 \pm 1,14^{ab}$	$8,24 \pm 0,60^c$	$12,70 \pm 0,64^{ab}$
IV			V			VI		
L	a	b	L	a	b	L	a	b
$53,48 \pm 1,79^d$	$5,30 \pm 0,65^a$	$19,78 \pm 0,70^e$	$40,51 \pm 1,29^c$	$6,92 \pm 0,55^b$	$14,88 \pm 1,30^c$	$42,99 \pm 2,90^c$	$7,01 \pm 0,39^b$	$17,23 \pm 1,19^d$

Figura 6-2. Coordenadas CIE Lab e ilustración de color para cada muestra.

En cuanto a la caracterización reológica, se realizaron ensayos de esfuerzo de corte sobre las muestras y los resultados se ajustaron al modelo Herschel-Bulkley (HB). Las Figuras 6-3 y 6-4 presentan las gráficas de esfuerzo de corte v/s gradiente de deformación para uno de los ensayos realizados sobre cada muestra, junto a la curva descrita por el modelo HB (con los parámetros optimizados para el ensayo en particular). Las gráficas de las muestras I, III, V y VI se asemejan en forma a las obtenidas por Navarro et al. (1999) para dulce de leche de repostería, cuya formulación incluye almidones u otros espesantes, mientras que las muestras II y IV mantiene un comportamiento similar al producto tradicional del mismo estudio.

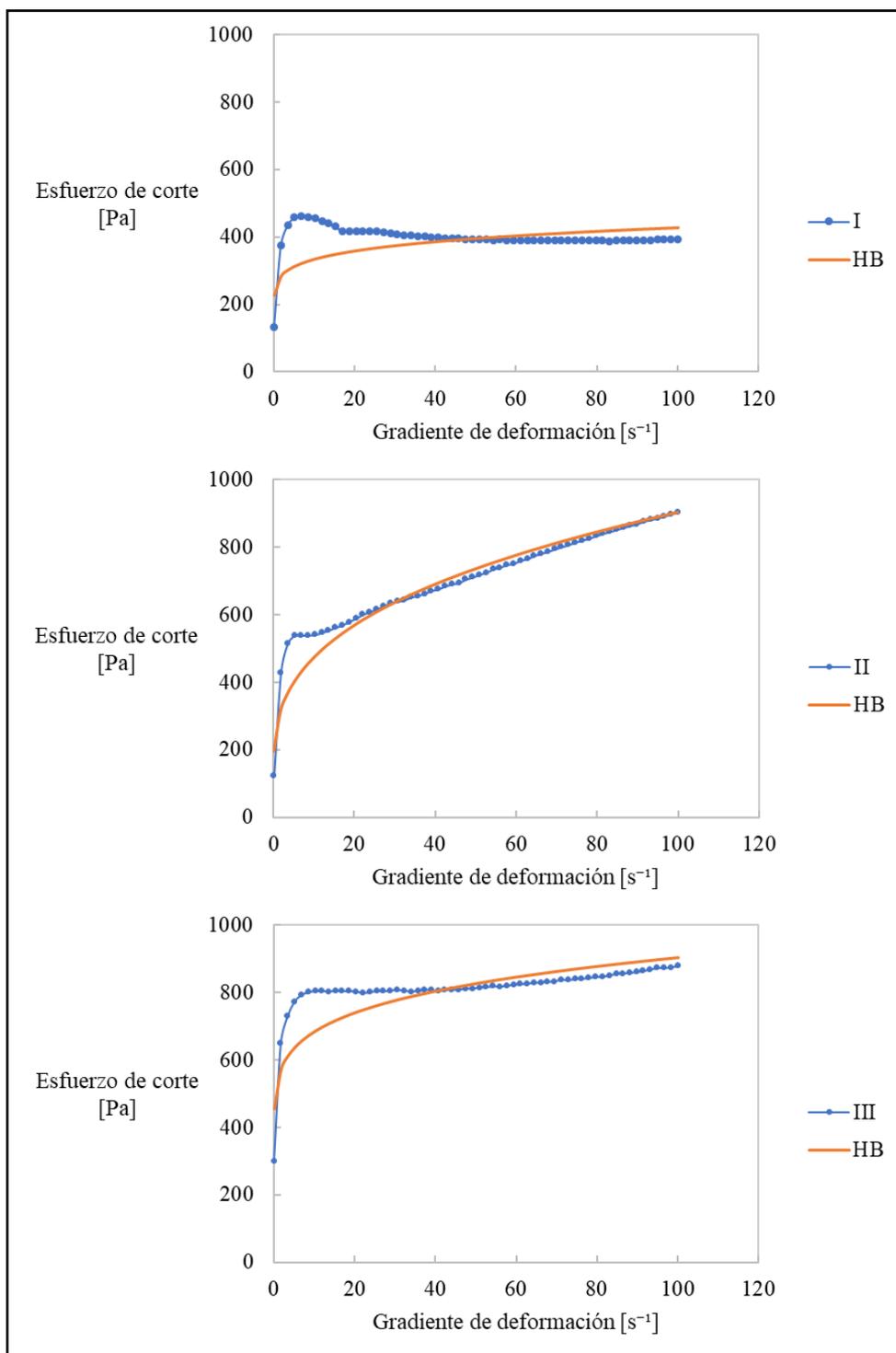


Figura 6-3. Curvas esfuerzo de corte v/s gradiente de deformación, experimentales y ajustadas por modelo Herschel-Bulkley, representativa de cada muestra, parte 1.

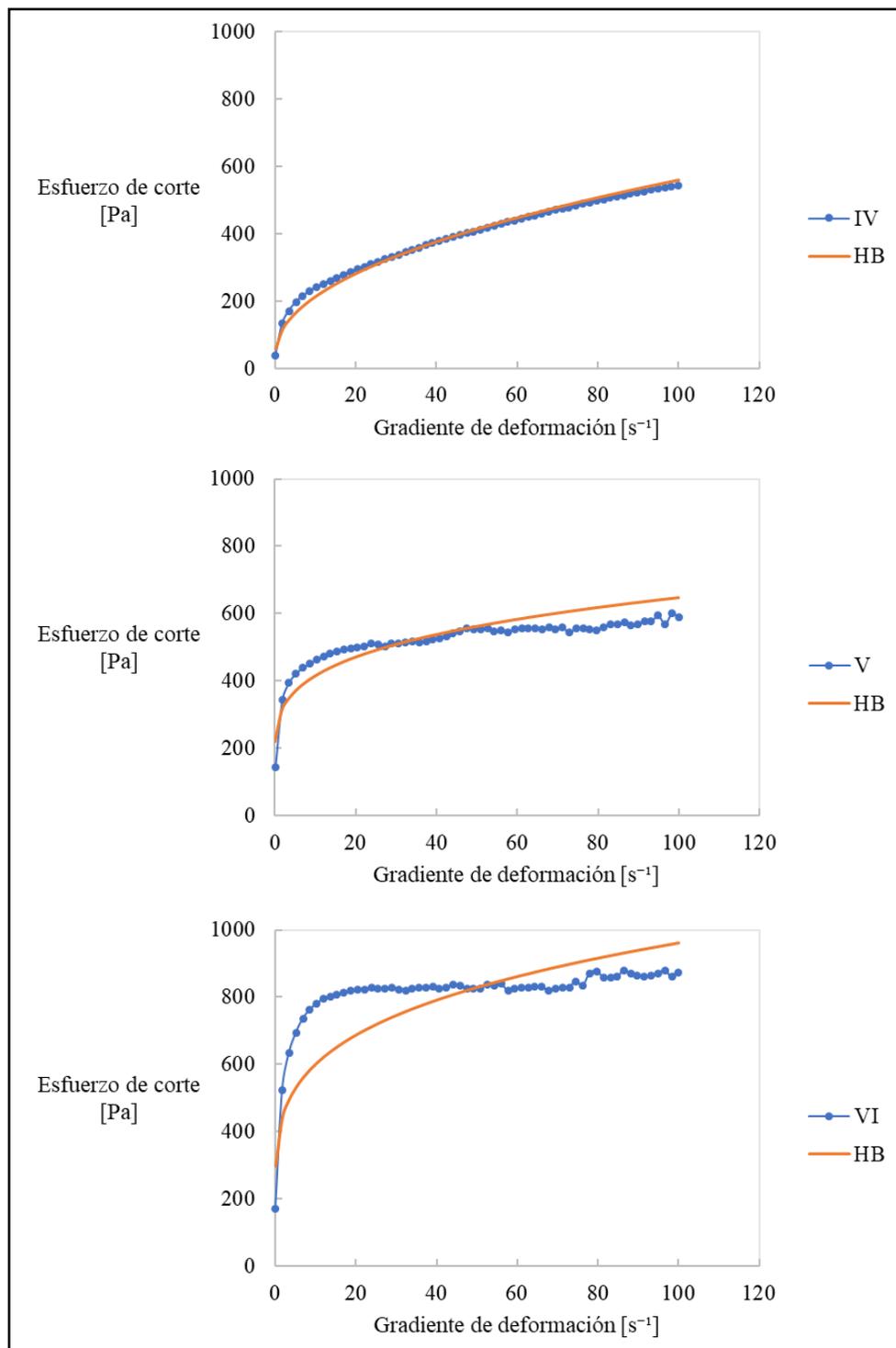


Figura 6-4. Curvas esfuerzo de corte v/s gradiente de deformación, experimentales y ajustadas por modelo Herschel-Bulkley, representativa de cada muestra, parte 2.

La Tabla 6-7 contiene los promedios de parámetros del modelo HB ajustados para cada marca comercial junto con la raíz de error cuadrático medio porcentual (RMS). Los resultados de RMS para todas las muestras resultan adecuados según el rango de 6%-23% empleado por Kaymak-Ertekin y Sultanoglu (2000), en este sentido es posible afirmar que las muestras tienen un comportamiento del tipo HB. Cabe destacar la similitud de la ML V con al menos dos de los productos comerciales para cada parámetro del ajuste.

Tabla 6-7. Parámetros ajustados al modelo Herschel-Bulkley.

Muestra	Parámetro			RMS (%)
	σ_0 [Pa]	K [Pa s ⁿ]	<i>n</i>	
I	125,58 ± 32,75 ^b	137,68 ± 21,00 ^b	0,18 ± 0,05 ^a	15,28 ± 0,21
II	111,85 ± 21,02 ^b	162,87 ± 1,14 ^{bc}	0,37 ± 0,03 ^b	11,72 ± 1,69
III	212,95 ± 74,18 ^c	205,59 ± 31,45 ^{cd}	0,23 ± 0,04 ^a	10,98 ± 0,99
IV (110 °C)	27,61 ± 9,79 ^a	51,77 ± 13,92 ^a	0,51 ± 0,04 ^c	9,35 ± 1,12
V (130 °C)	180,32 ± 35,00 ^{bc}	187,54 ± 42,94 ^{bcd}	0,24 ± 0,01 ^a	10,76 ± 1,00
VI (150 °C)	207,24 ± 48,44 ^c	241,61 ± 56,08 ^d	0,22 ± 0,03 ^a	14,16 ± 2,30

Con el fin de poder comparar las muestras en términos de sus características reológicas se determinó su viscosidad aparente a un mismo gradiente de deformación. El gradiente de deformación seleccionado se escogió dentro del rango para masticación y deglución (10-100 s⁻¹) (Steffe, 1996) conforme a la referencia estándar estipulada por la Asociación Dietética Americana para tratamiento de la disfagia, 50 s⁻¹ a 25 °C (Martínez et al., 2019). Los valores de viscosidad aparente para un gradiente de deformación de 50 s⁻¹ para cada marca comercial y las ML se presentan en la Tabla 6-8.

Tabla 6-8. Viscosidad aparente de manjares comerciales y matrices lácteas para gradiente de deformación de 50 s^{-1} y 25°C .

Muestra	Viscosidad aparente [Pa s]
I	$7,95 \pm 0,21^a$
II	$15,90 \pm 0,76^b$
III	$14,30 \pm 1,99^b$
IV (110°C)	$8,11 \pm 1,26^a$
V (130°C)	$13,52 \pm 2,98^b$
VI (150°C)	$15,47 \pm 3,82^b$

Los resultados obtenidos para las muestras II, III, V y VI se encuentran cercanos al valor reportados por Ranalli et al. (2011) para dulce de leche repostero (15 Pa s), a un gradiente de deformación de 50 s^{-1} y temperatura de 20°C . Por su parte, las muestras I y IV se asemeja a los resultados del mismo autor para los dulces de leche reducido en calorías y reducido en grasa ($8,2 \text{ Pa s}$). Sin embargo, ninguno de los productos se asemeja al dulce de leche tradicional del mismo estudio (12 Pa s). Tomando en consideración la información recopilada es posible aludir los comportamientos reológicos a las formulaciones de las muestras, las cuales indican presencia de espesantes como agar y carragenina en sus etiquetados nutricionales (Figura E-1).

En el caso de las ML, y tomando en consideración que todas tenían la misma proporción de agar en su formulación, este comportamiento se puede explicar debido a las temperaturas de proceso a las cuales se sometieron. La temperatura medida en las ML IV no superó los 85°C . Considerando que la temperatura de disolución del agar se encuentra entre 85 y 95°C (Chemical Book, s.f.), es posible

que parte del agar adicionado no se solubilizara completamente disminuyendo con esto la viscosidad aparente del producto. Esto puede explicarse, por la mayor viscosidad intrínseca que confieren al producto los agares con mayor temperatura de disolución, los cuales corresponden a las fracciones de agar con mayor tamaño molecular (Bird et al., 1990; Lai y Lii, 1997).

Considerando que el objetivo de esta investigación corresponde a mitigar la formación de HMF en matrices lácteas preservando las propiedades físicas respecto a los productos comerciales, se compararon los distintos parámetros estudiados mediante un estudio ANOVA con 95% de confianza, estableciéndose las similitudes entre las distintas muestras. La Tabla E-4 presenta dicha comparación, y sobre ella se puede concluir que la ML V comparte el mayor número de características estudiadas similares a los manjares comerciales caracterizados. La ML V presentó tanto los parámetros de ajuste de HB como la viscosidad aparente similares ($p \geq 0,05$) a los valores determinados en al menos dos de las marcas comerciales evaluadas. En cuanto al color, este presentó valores de L y b superiores a las muestras comerciales, pero la coordenada a estaba en un rango similar a la de los productos I y II. Tanto el pH, como el contenido de azúcares reductores resultaron significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los valores comerciales, principalmente debido a la formulación utilizada. Si bien, no se logra mantener todas las características fisicoquímicas dentro de los rangos de los productos comerciales, el contenido de HMF en esta ML ($1,52 \mu\text{g/g}_{\text{bh}}$) es

significativamente menor ($p < 0,05$) que el reportado en los manjares comerciales (II y III), lográndose así la mitigación deseada.

7. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS FUTURAS

La determinación de HMF mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD) en matrices lácteas tipo manjar puede ser considerada una metodología atractiva producto de su alta selectividad por el compuesto, en comparación a las metodologías alternativas basadas en colorimetría. Se validó una metodología en HPLC-DAD ($\lambda=285\text{nm}$), con una buena linealidad (coeficiente de correlación 99,98%), precisión (repetibilidad 1,99-4,12% CV y reproducibilidad 3,62-5,98% CV), y exactitud (recuperación 89,04-91,89%), además de bajos límites de detección (19,51 $\mu\text{g/L}$) y cuantificación 65,05 $\mu\text{g/L}$).

Se obtuvo una matriz láctea (T° procesamiento = 130 $^\circ\text{C}$) similar a los manjares comerciales, pero con concentraciones menores de HMF (1,52 $\mu\text{g/g}_{\text{b.h.}}$ contra 2,63; 4,43 y 9,03 $\mu\text{g/g}_{\text{b.h.}}$ en productos comerciales), manteniendo la concentración de sólidos solubles, la viscosidad aparente y el comportamiento descrito por el modelo HB para los manjares comerciales. La matriz obtenida presentó más luminosidad (L) y tonalidades más amarillas (b) en comparación al producto comercial, pero las tonalidades rojizas (a) resultaron equiparables. En cuanto al pH se obtuvo una diferencia significativa ($p<0,05$) producto de la concentración de bicarbonato de sodio utilizada en la formulación de las matrices lácteas. Respecto a los azúcares reductores, se alcanzó una concentración de glucosa similar, pero la diferencia en fructosa fue significativa entre la matriz láctea y los productos comerciales.

Las matrices lácteas procesadas a 110 y 150 °C, a pesar de tener un menor contenido de HMF (1,34 y 1,38 $\mu\text{g/g}_{\text{b.h.}}$, respectivamente) tienen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la mayoría de los parámetros físicos estudiados.

En base a los resultados obtenidos, en términos de proyección, resulta interesante el estudio de diferentes formulaciones de manjar, modificando pH, con el fin de obtener una matriz optimizada en cuanto a mitigación de HMF, y la preservación del color característico de los productos comerciales. Como recomendación final, se insta a los consumidores de manjar a preferir productos de tonalidades claras, debido a que estos debiesen presentar un menor contenido de HMF.

BIBLIOGRAFÍA

Abdulmalik, O., Safo, M. K., Chen, Q., Yang, J., Brugnara, C., Ohene-Frempong, K., Abraham, D. J., & Asakura, T. (2005). 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *British Journal of Haematology*, *128*(4), 552–561.

Akal, C., Buran, İ., Delialioğlu, R. A., & Yetişemiyen, A. (2018). The Effect of Different Sugar Ratio on the Quality Properties of Milk Jam. *Gida / The Journal of Food*, *43*(5), 865–875.

Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (1997). Determination of Free and Total Furfural Compounds in Infant Milk Formulas by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(6), 2128–2133.

Alizadeh, M., Khodaei, H., Mesgari Abbasi, M., & Saleh-Ghadimi, S. (2017). Assessing the effect of 5-hydroxymethylfurfural on selected components of immune responses in mice immunised with ovalbumin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(12), 3979–3984.

Ames, J. M. (1992). The Maillard Reaction. In *Biochemistry of food proteins* (pp. 99–153). Springer.

Anese, M., Manzocco, L., Calligaris, S., & Nicoli, M. C. (2013). Industrially applicable strategies for mitigating acrylamide, furan, and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(43), 10209–10214.

Anese, M., & Suman, M. (2013). Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Food Research International*, *51*(1), 257–264.

AOAC International. (2012). Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). *AOAC Official Methods of Analysis*, 1–17.

Arribas-Lorenzo, G., & Morales, F. J. (2010). Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(2), 644–649.

Asadi, M. (2005). Beet-Sugar Handbook. In *Beet-Sugar Handbook*.

Bates, L., Ames, J. M., MacDougall, D. B., & Taylor, P. C. (2006). Laboratory Reaction Cell to Model Maillard Color Development in a Starch-Glucose-Lysine System. *Journal of Food Science*, *63*(6), 991–996.

Bellarde, F. B. (2005). Elaboração de Doce de Leite Pastoso com Substituição Parcial dos Sólidos de Leite por Concentrado Proteico de Soro. *Revista Brasileira Multidisciplinar*, 9(2), 249.

Bird, K. T., Chynoweth, D. P., & Jerger, D. E. (1990). Effects of marine algal proximate composition on methane yields. *Journal of Applied Phycology*, 2(3), 207–213.

Bourne, M. C. (2002). *Food Texture and Viscosity*. Elsevier.

Bruce, W. R., Archer, M. C., Corpet, D. E., Medline, A., Minkin, S., Stamp, D., Yin, Y., & Zhang, X. M. (1993). Diet, aberrant crypt foci and colorectal cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 290(1), 111–118.

Bruhns, P., Kaufmann, M., Koch, T., & Kroh, L. W. (2018). 2 - Deoxyglucosone : A New C 6 - α -Dicarbonyl Compound in the Maillard Reaction of D - Fructose with γ - Aminobutyric Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6–11.

Calabretti, A., Calabrese, M., Campisi, B., & Bogoni, P. (2017). Quality and Safety in Commercial Baby Foods. *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(8), 587–593.

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

Carabasa-Giribet, M., & Ibarz-Ribas, A. (2000). Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *Journal of Food Engineering*, 44(3), 181–189.

Chávez-Servin, J. L., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2005). Analysis of potential and free furfural compounds in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography. Evolution during storage. *Journal of Chromatography A*, 1076, 133–140.

Chemical Book. (n.d.). 9002-18-0(Agar) Product Description. https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB6704452.aspx

Corradini, M. G., & Peleg, M. (2000). Lubricated squeezing flow viscometry for dulce de leche (milk sweet) Viscometría de extensión biaxial sin fricción de dulce de leche. *Food Science and Technology International*, 6(4), 339–344.

Courel, M., Ait-Ameur, L., Capuano, E., Fogliano, V., Morales, F. J., Courtois, F., & Birlouez-Aragon, I. (2009). Effects of formulation and baking conditions on neo-formed contaminants in model cookies. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(SPEC. ISS.), 93–

95.

da Silva, F. L., Ferreira, H. A. L., de Souza, A. B., Almeida, D. de F., Stephani, R., Pirozi, M. R., de Carvalho, A. F., & Perrone, I. T. (2015). Production of dulce de leche: The effect of starch addition. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(1), 417–423.

De Andrade, J. K., Komatsu, E., Perreault, H., Torres, Y. R., Da Rosa, M. R., & Felsner, M. L. (2016). In house validation from direct determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Brazilian corn and cane syrups samples by HPLC-UV. *Food Chemistry*, *190*, 481–486.

De Block, J., Merchiers, M., Mortier, L., Braekman, A., Ooghe, W., & Van Renterghem, R. (2003). Monitoring nutritional quality of milk powders: Capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods. *International Dairy Journal*, *13*(2–3), 87–94.

de Oliveira, F. C., Coimbra, J. S. dos R., de Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G. (2016). Food Protein-polysaccharide Conjugates Obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(7), 1108–1125.

Delgado-Andrade, C., Morales, F. J., Seiquer, I., & Pilar Navarro, M. (2010). Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. *Food Research International*, *43*(5), 1304–1311.

Durling, L. J. K., Busk, L., & Hellman, B. E. (2009). Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(4), 880–884.

Elliott, A. J., Dhakal, A., Datta, N., Deeth, H. C., & Elliott, T. (2003). Heat-induced changes in UHT milks - Part 1. *Australian Journal of Dairy Technology*, *58*(1), 3–10.

Elmore, J. S., Dodson, A. T., Muttucumar, N., Halford, N. G., Parry, M. A. J., & Mottram, D. S. (2010). Effects of sulphur nutrition during potato cultivation on the formation of acrylamide and aroma compounds during cooking. *Food Chemistry*, *122*(3), 753–760.

Fels-klerx, H. J. Van Der, Capuano, E., Nguyen, H. T., Mogol, B. A., Kocada, T., Göncüo, N., Hamzal, A., Boekel, M. A. J. S. Van, & Gökmen, V. (2014). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature – time pro fi le effects and kinetics. *Food Research International*, *57*, 210–217.

Fiore, A., Troise, A. D., Mogol, B. A., Roullier, V., Gourdon, A., Jian, S. E. M.,

Hamzaloğlu, B. A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Controlling the Maillard Reaction by Reactant Encapsulation: Sodium Chloride in Cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 10808–10814.

Francisquini, J. d'Almeida, de Oliveira, L. N., Fortes Pereira, J. P., Stephani, R., Perrone, Í. T., & Fonseca da Silva, P. H. (2016). Evaluation of Maillard Reaction intensity, Physical-chemistry Attributes and Texture Analysis in “Dulce de Leche.” *Revista Ceres*, *63*(5), 589–596.

Francisquini, J. d'Almeida, Neves, L. N., Torres, J. K., Carvalho, A. F., Perrone, I. T., & da Silva, P. H. F. (2018). Physico-chemical and compositional analyses and 5-hydroxymethylfurfural concentration as indicators of thermal treatment intensity in experimental dulce de leche. *Journal of Dairy Research*, *85*(04), 476–481.

Garcia Loredo, A. B., & Guerrero, S. N. (2011). Correlation between instrumental and sensory ratings by evaluation of some texture reference scales. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(9), 1977–1985.

Gaze, L. V., Costa, M. P., Monteiro, M. L. G., Lavorato, J. A. A., Conte Júnior, C. A., Raices, R. S. L., Cruz, A. G., & Freitas, M. Q. (2015). Dulce de Leche, a typical product of Latin America: Characterisation by physicochemical, optical and instrumental methods. *Food Chemistry*, *169*, 471–477.

Gaze, L. V., Oliveira, B. R., Ferrao, L. L., Granato, D., Cavalcanti, R. N., Conte Júnior, C. A., Cruz, A. G., & Freitas, M. Q. (2015). Preference mapping of dulce de leche commercialized in Brazilian markets. *Journal of Dairy Science*, *98*(3), 1443–1454.

Giménez, A., Ares, G., & Gámbaro, A. (2008). Consumer reaction to changes in sensory profile of dulce de leche due to lactose hydrolysis. *International Dairy Journal*, *18*(9), 951–955.

Glosario gráfico. (n.d.). http://www.glosariografico.com/categoria_colorimetria

Godfrey, V. B., & Chen, L.-J. (1999). DISTRIBUTION AND METABOLISM OF (5-HYDROXYMETHYL) FURFURAL IN MALE F344 RATS AND B6C3F1 MICE AFTER ORAL ADMINISTRATION. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A, *57*(3), 199–210.

Gökmen, V., Açar, Ö. Ç., Köksel, H., & Acar, J. (2007). Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chemistry*, *104*(3), 1136–1142.

Gökmen, V., Açar, Ö. Ç., Serpen, A., & Morales, F. J. (2008). Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking.

European Food Research and Technology, 226, 1031–1037.

Gökmen, V., & Şenyuva, H. Z. (2007). Effects of some cations on the formation of acrylamide and furfurals in glucose-asparagine model system. *European Food Research and Technology*, 225(5–6), 815–820.

Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Dulce de Leche, Llave Operativa Aduanera 6 (1996). <http://www.loa.org.ar/legNormaDetalle.aspx?id=4218>

Gul, O., Mortas, M., Dervisoglu, M., Er, M., Atmaca, M., & Atalar, İ. (2016). Furfural Contents and Some Physical and Chemical Properties of Raisins. *Kuru Üzümlerin Furfural İçerikleri ile Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.*, 14(3), 235–241. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,cookie,uid&db=aph&AN=120001944&site=ehost-live&scope=site>

Hendek Ertop, M., & Öztürk Sarikaya, S. B. (2017). The Relations Between Hydroxymethylfurfural Content, Antioxidant Activity and Colorimetric Properties of Various Bakery Products. *Gıda / the Journal of Food*, 42(6), 834–843.

Hough, G., Bratchell, N., & Wakeling, I. (1992). Consumer Preference of Dulce De Leche Among Students in the United Kingdom. *Journal of Sensory Studies*, 7(2), 119–132.

Hough, G., Contarini, A., & Moro, O. (1986). Análisis sensorial de preferencia en dulce de leche. *La Alimentación Latinoamericana*, 20, 72–74.

Hough, G., Moro, O., Segura, J., & Calvo, N. (2010). Flow Properties of Dulce de Leche, a Typical Argentine Dairy Product. *Journal of Dairy Science*, 71(7), 1783–1788.

Huang, Y., Li, C., Hu, H., Wang, Y., Shen, M., Nie, S., Chen, J., Zeng, M., & Xie, M. (2019). Simultaneous Determination of Acrylamide and 5-Hydroxymethylfurfural in Heat-Processed Foods Employing Enhanced Matrix Removal - Lipid as a New Dispersive Solid-Phase Extraction Sorbent Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(17), 5017–5025.

Husøy, T., Haugen, M., Murkovic, M., Jöbstl, D., Stølen, L. H., Bjellaas, T., Rønningborg, C., Glatt, H., & Alexander, J. (2008). Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3697–3702.

Instituto Nacional de Tecnología Industrial. (2010). *Productos lácteos: Elaboración de Dulce de Leche*. 28.

- Jaeger, H., Janositz, A., & Knorr, D. (2010). The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathologie Biologie*, 58(3), 207–213.
- Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., & Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 38(9), 801–809.
- Keeney, M., & Bassette, R. (1959). Detection of Intermediate Compounds in the Early Stages of Browning Reaction in Milk Products. *Journal of Dairy Science*, 42(6), 945–960.
- Kitts, D. D., Chen, X. M., & Jing, H. (2012). Demonstration of antioxidant and anti-inflammatory bioactivities from sugar-amino acid maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6718–6727.
- Kocadağlı, T. (2016). *Investigation and kinetic modelling of α -dicarbonyl compound formation in foods* [Hacettepe University].
- Kocadağlı, T., & Gökmen, V. (2016). Multiresponse kinetic modelling of Maillard reaction and caramelisation in a heated glucose/wheat flour system. *Food Chemistry*, 211, 892–902.
- Kong, F., Lee, B. H., & Wei, K. (2019). 5-Hydroxymethylfurfural mitigates lipopolysaccharide-stimulated inflammation via suppression of MAPK, NF- κ B and mTOR activation in RAW 264.7 cells. *Molecules*, 24(2).
- Kowalski, S., Lukasiewicz, M., Duda-Chodak, A., & Zięc, G. (2013). 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) -heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(4), 207–225.
- Lai, M. F., & Lii, C. Y. (1997). Rheological and thermal characteristics of gel structures from various agar fractions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21(1–2), 123–130.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food*. Springer New York.
- Lee, C. M., & Resurreccion, A. V. A. (2006). Consumer Acceptance of Stored Roasted Peanuts Using Instrumental Measurements. *Journal of Food Quality*, 29(2006), 319–338.
- Lee, Y.-C., Shlyankevich, M., Jeong, H.-K., Douglas, J. S., & Surh, Y.-J. (1995). Bioactivation of 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde to an electrophilic and mutagenic

allylic sulfuric acid ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209(3), 996–1002.

Liu, H., Wang, H., Li, Y., Yang, W., Song, C., Li, H., Zhu, W., & Jiang, W. (2015). Glucose dehydration to 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquid over Cr³⁺-modified ion exchange resin. *RSC Advances*, 5(12), 9290–9297.

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

Lund, M. N., & Ray, C. A. (2017). Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 4537–4552.

Makawi, S. Z. A., Taha, M. I., Zakaria, B. A., Siddig, B., Mahmood, H., Rahim, A., Elhusein, M., & Ahmed, E. (2009). Identification and Quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in Some Sugar-Containing Food Products by HPLC. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(9), 1391–1396.

Malec, L. S., Llosa, R. A., Naranjo, G. B., & Vigo, M. S. (2005). Loss of available lysine during processing of different dulce de leche formulations. *International Journal of Dairy Technology*, 58(3), 164–168.

Mariotti-Celis, M. S., Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Pedreschi, F., Iglesias-Rebolledo, N., & Pérez-Correa, J. R. (2017). Impact of an integrated process of hot pressurised liquid extraction–macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of *Vitis vinifera* ‘Carménère’ pomace extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(4), 1072–1078.

Martínez, M. P., Troncoso, E., Robert, P., Quezada, C., & Zúñiga, R. N. (2019). Time-Dependent Rheological Behavior of Starch-Based Thickeners and Herb Infusion Dispersions for Dysphagia Management. *Starch/Staerke*, 71(1–2), 1–10.

Martins, S. I. F. S., & Van Boekel, M. A. J. S. (2005). A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chemistry*, 90(1–2), 257–269.

Matsushita, K., Ishii, Y., Kijima, A., Jin, M., Takasu, S., & Kuroda, K. (2012). Reporter gene mutation in the livers of *gpt delta* mice treated with 5- (hydroxymethyl) -2-furfural , a contaminant of various foods. 37(5), 1077–1082.

McKenna, B. M., & Lyng, J. G. (2003). Introduction to food rheology and its measurement. In *Texture in Food* (Vol. 1, pp. 130–160). Woodhead Publishing Ltd.

- Mesías, M., Sáez-Escudero, L., Morales, F. J., & Delgado-Andrade, C. (2019). Occurrence of furosine and hydroxymethylfurfural in breakfast cereals. Evolution of the Spanish market from 2006 to 2018. *Foods*, *8*(5).
- Meullenet, J. F., Lyon, B. G., Carpenter, J. A., & Lyon, C. E. (1998). Relationship between sensory and instrumental texture profile attributes. *Journal of Sensory Studies*, *13*(1), 77–93.
- Miao, Y. T., Zhang, H. J., Zhang, L. L., Wu, S. J., Sun, Y. J., Shan, Y., & Yuan, Y. (2014). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in reconstituted potato chips during frying. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(12), 4005–4011.
- Ministerio de Salud Republica de Chile. (2017). *Reglamento Sanitario de los Alimentos*.
- Monakhova, Y. B., & Lachenmeier, D. W. (2012). The Margin of Exposure of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in Alcoholic Beverages. *Environmental Health and Toxicology*, *27*, e2012016.
- Morales, F. J. (2009). Hydroxymethylfurfural (HMF) and Related Compounds. In *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks* (pp. 135–174).
- Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (1998). Study of Hydroxymethylfurfural Formation from Acid Degradation of the Amadori Product in Milk-Resembling Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(10), 3885–3890.
- Moyano, P. C., & Zúñiga, R. N. (2003). Kinetic Analysis of Osmotic Dehydration Carried Out with Reused Sucrose Syrup. *Journal of Food Science*, *68*(9), 2701–2705.
- Murkovic, M., & Pichler, N. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular Nutrition and Food Research*, *50*(9), 842–846.
- National Association of Testing Authorities. (2012). Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. *Nata*, December 2006, 1–32.
- National Toxicology Program. (2010). Toxicology and carcinogenesis studies of 5-hydroxymethyl-2-furfural. *National Institutes of Health*, *67*, 184.
- Navarro, A. S., Ferrero, C., & Zaritzky, N. E. (1999). *Rheological Characterization of "Dulce de Leche" By Dynamic and Steady Shear Measurements*. *30*, 43–58.
- Nielsen, S. S. (2017). Food Analysis. In *Food Analysis* (Fifth Edit). Springer.
- Nishi, Y., Miyakawa, Y., & Kato, K. (1989). Chromosome aberrations induced by

pyrolysates of carbohydrates in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research Letters*, 227(2), 117–123.

Novoa, D. F., & Ramírez-Navas, J. S. (2012). Caracterización Colorimétrica Del Manjar Blanco Del Valle. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 54–60.

Novoa, D. F., & Ramírez Navas, J. S. (2016). *Caracterización Reológica De Manjar Blanco Del Valle Del Cauca Rheological*. 54–62.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile. (2015). *Situación del Mercado de Manjar en Chile*. http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1442255638Manjar201508.pdf

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile. (2019). *Boletín de la leche*. www.odepa.gob.cl

Oliviera, M. N., Penna, A. L. B., & Garcia Nevarez, H. (2009). Production of Evaporated Milk, Sweetened Condensed Milk and “Dulce de Leche.” In *Dairy Powders and Concentrated Products* (pp. 149–179). <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>

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

Oral, R. A., Dogan, M., Sarioglu, K., Kayacier, A., & Sagdic, O. (2015). Determination of HMF in Some Instant Foods and Its Biodegradation by Some Lactic Acid Bacteria in Medium and Food. *Annals of Chromatography and Separation Techniques*, 1(1), 1–4.

Parisi, S., & Luo, W. (2018). *Chemistry of Maillard Reactions in Processed Foods*. Springer.

Pastoriza de la Cueva, S., Álvarez, J., Végvári, Á., Montilla-Gómez, J., Cruz-Lopez, O., Delgado-Andrade, C., & Rufián-Henares, J. A. (2016). Relationship between HMF intake and SMF formation in vivo: An animal and human study. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(3), 1–24.

Pavlovic, S., Santos, R. C., & Glória, M. B. A. (1994). Maillard reaction during the processing of ‘Doce de leite.’ *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(2), 129–132.

Penci, M. C., & Marín, M. A. (2016). Dulce de Leche: Technology, Quality, and Consumer Aspects of the Traditional Milk Caramel of South America. In *Traditional*

Foods (pp. 123–136).

Petisca, C., Henriques, A. R., Pérez-Palacios, T., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2014). Assessment of hydroxymethylfurfural and furfural in commercial bakery products. *Journal of Food Composition and Analysis*, *33*(1), 20–25.

Petisca, Catarina, Henriques, A. R., Pérez-Palacios, T., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2013). Study of hydroxymethylfurfural and furfural formation in cakes during baking in different ovens, using a validated multiple-stage extraction-based analytical method. *Food Chemistry*, *141*(4), 3349–3356.

Ranalli, N., Andrés, S. C., & Califano, A. N. (2011). Physicochemical and rheological characterization of “dulce de leche.” *Journal of Texture Studies*, *43*(2), 1–9.

Ranalli, N., Andrés, S. C., & Califano, A. N. (2017). Dulce de leche-like producto enriched with emulsified pecan oil: assessment of physicochemical characteristics, quality attributes, and shelf-life. *European Journal of Lipid Science and Technology*.

Rannou, C., Laroque, D., Renault, E., Prost, C., & Sérot, T. (2016). Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods. *Food Research International*, *90*, 154–176.

Rehman, Z.-U., Saeed, A., & Zafar, S. I. (1999). Hydroxymethylfurfural as an indicator for the detection of dried powder in liquid milk. *Milchwissenschaft*, *55*(5), 256–257.

Rodríguez, A., Piagentini, A., Rozycki, S., Lema, P., Pauletti, M., & Panizzolo, L. (2012). Evolución del desarrollo del color en sistema modelo de composición similar al dulce de leche . Influencia del tiempo de calentamiento y del pH *Materiales y Métodos. Revista Del Laboratorio Tecnológico Del Uruguay*, *7*, 38–42.

Rollema, H. S., & Muir, D. D. (2009). Casein and Related Products. In *Dairy Powders and Concentrated Products*.

Ruan, D., Wang, H., & Cheng, F. (2018). *The Maillard Reaction in Food Chemistry: Current Technology and Applications*. Springer.

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

Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2006). Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *Journal of Cereal Science*, *43*(1), 63–69.

Salvatierra Virgen, S., Ceballos-Magaña, S. G., Salvatierra-Stamp, V. del C., Sumaya-Martínez, M. T., Martínez-Martínez, F. J., & Muñiz-Valencia, R. (2017). HPLC-DAD method development and validation for the quantification of hydroxymethylfurfural in corn chips by means of response surface optimisation. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(12), 2101–2110.

Shapla, U. M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–18.

Shukla, P., Bajwa, U., & Bhise, S. (2017). Effect of Industrial Processing on HMF Generation in Sucrose-Milk Protein Model Systems. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 10(4), 429.

Singla, R. K., Dubey, A. K., Ameen, S. M., Montalto, S., & Parisi, S. (2018). *Analytical Methods for the Assessment of Maillard Reactions in Foods*.

Steffe, J. F. (1996). Rheological Methods in Food Process Engineering. In *Freeman Press*. Elsevier.

Surh, Y. J., Liem, A., Miller, J. A., & Tannenbaum, S. R. (1994). 5-Sulfooxymethylfurfural As a Possible Ultimate Mutagenic and Carcinogenic Metabolite of the Maillard Reaction Product, 5-Hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis*, 15(10), 2375–2377.

Surh, Y. J., & Tannenbaum, S. R. (1994). Activation of the Maillard Reaction Product 5-(Hydroxymethyl)furfural to Strong Mutagens via Allylic Sulfonation and Chlorination. *Chemical Research in Toxicology*, 7(3), 313–318.

Suzuki, M., Nakamura, T., Iyoki, S., Fujiwara, A., Watanabe, Y., Mohri, K., Isobe, K., Ono, K., & Yano, S. (2005). Elucidation of anti-allergic activities of curcumin-related compounds with a special reference to their anti-oxidative activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(8), 1438–1443.

Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 147–156.

Taylor, A. J., & Linfoth, R. S. T. (2010). *Food Flavour Technology* (Second Ed.). Wiley-Blackwell.

Teixidó, E., Núñez, O., Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2011). 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic

chromatography. *Food Chemistry*, 126(4), 1902–1908.

Toker, O. S., Dogan, M., Ersöz, N. B., & Yilmaz, M. T. (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 & Products*, 50, 137–144.

Tosi, E., Ciappini, M., Ré, E., & Lucero, H. (2002). Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, 77, 71–74.

Ünüvar, S. (2018). Determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Expired Pharmaceutical Syrups by Using HPLC-DAD Method. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(3), 1433–1442.

van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V., Knorr, D., Jasti, P. R., & Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(9), 1215–1247.

Van Putten, R. J., Soetedjo, J. N. M., Pidko, E. A., Van Der Waal, J. C., Hensen, E. J. M., De Jong, E., & Heeres, H. J. (2013). Dehydration of different ketoses and aldoses to 5-hydroxymethylfurfural. *ChemSusChem*.

Wong, K. H., Aziz, S. A., & Mohamed, S. (2008). Sensory aroma from Maillard reaction of individual and combinations of amino acids with glucose in acidic conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1512–1519.

Yamada, P., Nemoto, M., Shigemori, H., Yokota, S., & Isoda, H. (2011). Isolation of 5-(hydroxymethyl)furfural from lycium chinense and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells. *Planta Medica*, 77(5), 434–440.

Zhang, X., Chen, F., & Wang, M. (2013). Impacts of selected dietary polyphenols on caramelization in model systems. *Food Chemistry*, 141(4), 3451–3458.

Zhang, Y., Song, Y., Hu, X., Liao, X., Ni, Y., & Li, Q. (2012). Determination of 5-hydroxymethylfurfural and furfural in soft beverages by HPLC. *Advanced Materials Research*, 550–553, 1959–1966.

Zhao, L., Su, J., Li, L., Chen, J., Hu, S., Zhang, X., & Chen, T. (2014). Mechanistic elucidation of apoptosis and cell cycle arrest induced by 5-hydroxymethylfurfural, the important role of ROS-mediated signaling pathways. *Food Research International*, 66, 186–196.

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

Agriculture, 91(April), 2477–2483.

Zunino, A. (1998). *Dulce De Leche Aspectos Basicos Para Su Elaboracion*.
https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44440527/dulce_de_leche_inf.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1523024601&Signature=LjSzsm1t4W25whicjk97JRLFhPI%3D&response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DDULCE_DE_LECHE.pdf

ANEXOS

**ANEXO A: INGREDIENTES ALIMENTARIOS UTILIZADOS EN LA
FABRICACIÓN DE MANJAR**

Tabla A-1. Ingredientes alimentarios utilizados en la fabricación de dulce de leche.

Adaptada de Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Dulce de Leche (1996).

Función	Aditivos/coadyuvante	Conc. Max. en prod. final
Preservante	Ácido sórbico y sus sales de Na, K o Ca	600 mg/kg (en ac.sórbico)
	Natamicina (en superficie libre)	1mg/dm ²
Texturizante	Lactato de calcio	b.p.f.
Aromatizante	Aromatizante de vainilla, vainilina y/o etilvainilina	b.p.f
Colorante	Caramenlo (INS 150 a,b,c,d)	b.p.f.
Humectante	Sorbitol	500mg/kg
Espezante/ Estabilizante	Ácido Alginico	5000mg/kg
	Alginato de amonio	5000mg/kg
	Alginato de calcio	5000mg/kg
	Alginato de potasio	5000mg/kg
	Alginato de sodio	5000mg/kg
	Agar	5000mg/kg
	Carboximetilcelulosa	5000mg/kg
	Carragena incluidas furcellarana y sales de sodio y potasio	5000mg/kg
	Celulosa microcristalina	5000mg/kg
	Hidroxipropilcelulosa	5000mg/kg
	Gelatina	5000mg/kg
	Goma arábica	5000mg/kg
	Goma Caraia	5000mg/kg
	Goma Garrofin	5000mg/kg
	Goma Tragacanto	5000mg/kg
	Goma Xantana	5000mg/kg
Metilcelulosa	5000mg/kg	
Metiletilcelulosa	5000mg/kg	
Pectina y pectina amida	5000mg/kg	

ANEXO B: MECANISMOS DE FORMACIÓN DE HMF

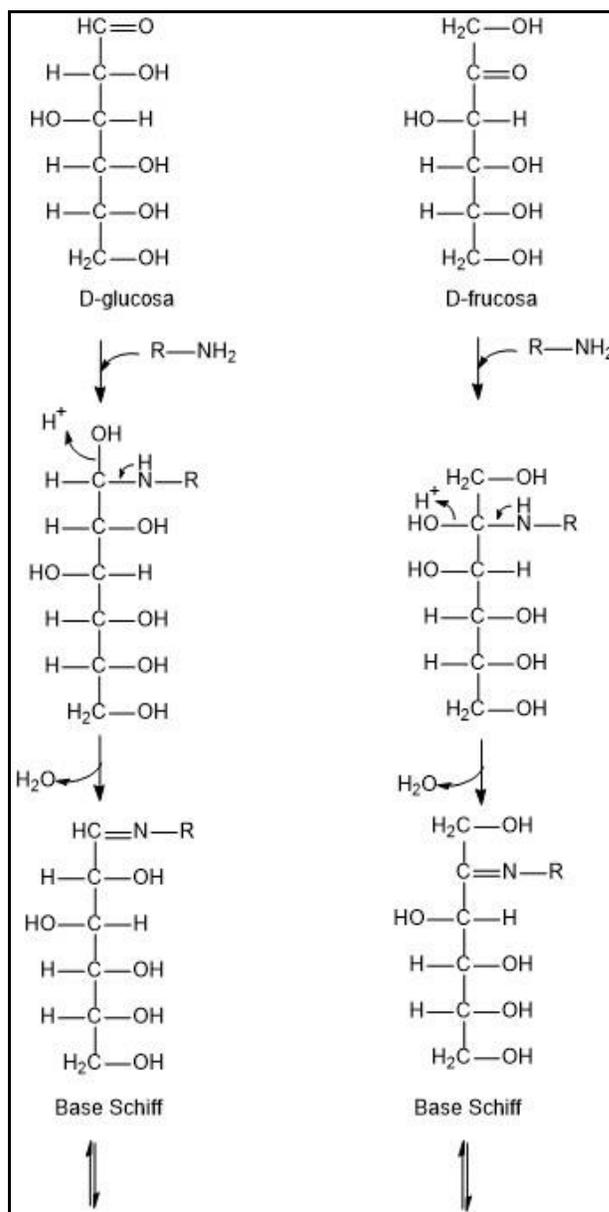


Figura B-1. Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante reacción de Maillard, parte 1 (Bruhns, Kaufmann, Koch, y Kroh, 2018; Capuano y Fogliano, 2011; Kocadağlı, 2016).

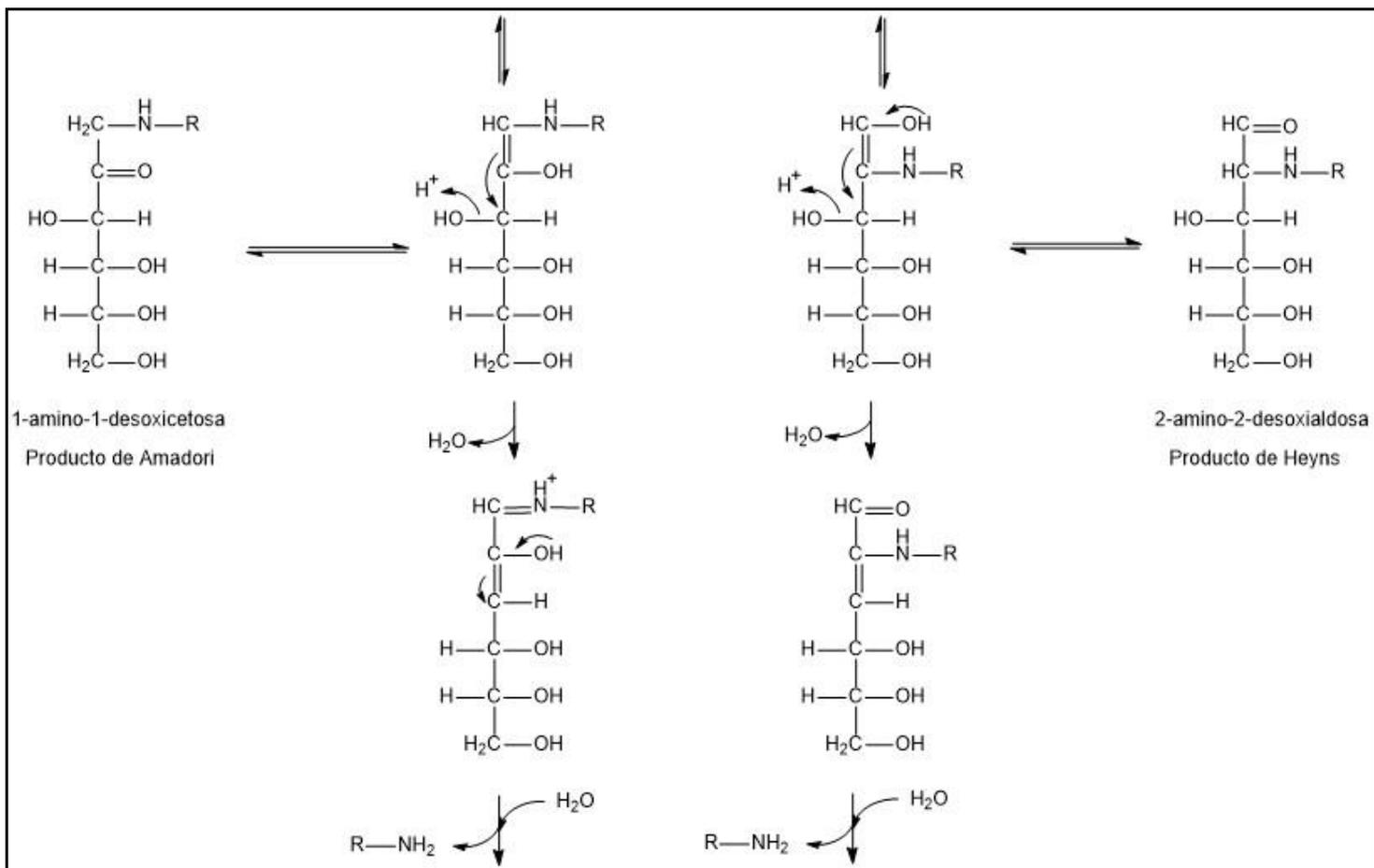


Figura B-2. Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante reacción de Maillard, parte 2 (Bruhns et al., 2018; Capuano y Fogliano, 2011; Kocadağlı, 2016).

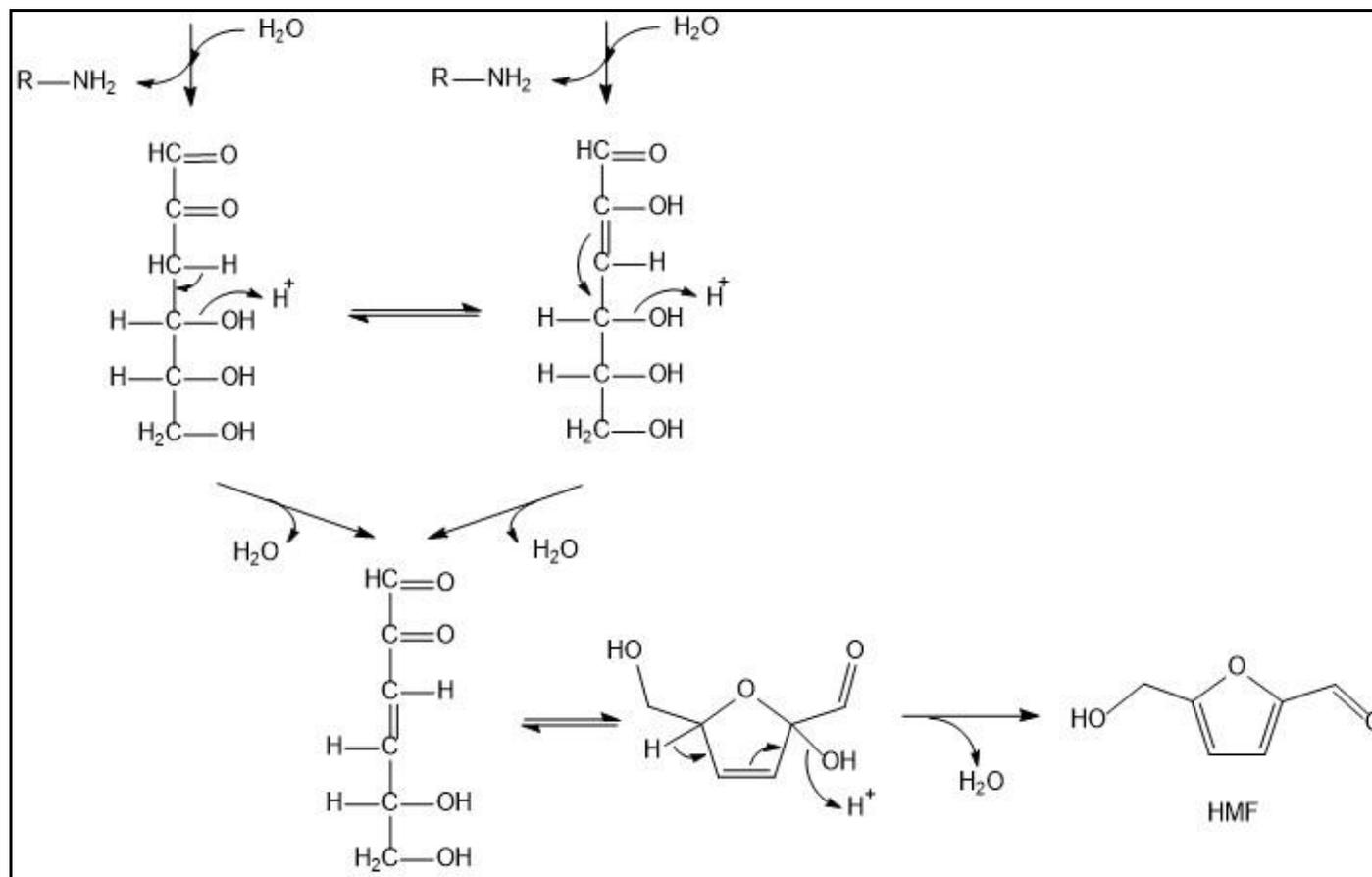


Figura B-3. Formación de HMF a partir de glucosa y fructosa mediante reacción de Maillard, parte 3 (Bruhns, Kaufmann, Koch, y Kroh, 2018; Capuano y Fogliano, 2011; Kocadağlı, 2016).

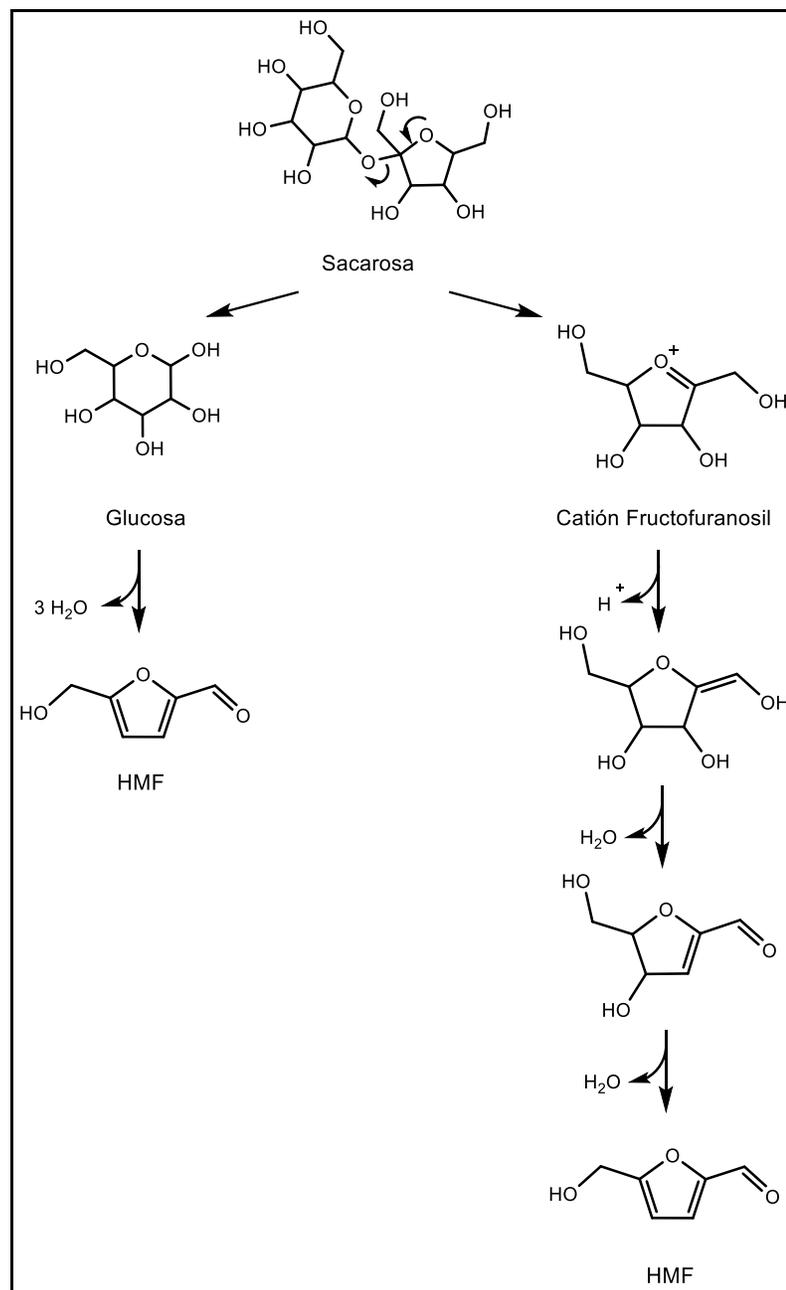


Figura B-5. Formación de HMF a partir de sacarosa en condiciones pirolíticas secas. Adaptado de Capuano y Fogliano (2011), Kocadağlı, (2016), y Lund y Ray (2017).

ANEXO C: PRESENCIA DE HMF EN ALIMENTOS

Tabla C-1. Presencia de HMF en alimento.

Categoría	Producto	Contenido HMF (mg/kg b.h.)	Referencia
Productos Horneados	Pan	4,85 ± 4,38	C. Petisca et al. (2014)
	Galletas (biscuit)	15,99 ± 24,39	C. Petisca et al. (2014)
	Queque/hojaldre	5,25 ± 8,55	C. Petisca et al. (2014)
	Crackers	14,25 ± 16,78	Hendek Ertop y Öztürk Sarikaya (2017)
Bebestibles	Café tostado molido	689,00 ± 1107,36	Arribas-Lorenzo y Morales (2010)
	Café instantáneo	1804,91 ± 640,27	Oral et al. (2015)
	Café descafeinado	983,20 ± 24,50	Teixidó et al. (2011)
	Chocolate caliente instantáneo	534,29 ± 278,28	Oral et al. (2015)
	Bebidas cola (*)	5,17 ± 2,35	Y. Zhang et al. (2012)
Cereales de desayuno	Cereales de desayuno	21,30 ± 86,55	Mesías et al. (2019)
	Cereal para adultos	17,10 ± 21,70	Mesías et al. (2019)
	Cereales infantiles	36,65 ± 6,50	Rufián-Henares et al. (2006)
	Cereales endulzados con miel	43,44 ± 10,41	Rufián-Henares et al. (2006)
Comidas infantiles	Leche en polvo	4,46 ± 0,44	Calabretti et al. (2017)
	Comida en base a carne (en frasco)	9,26 ± 3,90	Calabretti et al. (2017)
	Comida en base a vegetales (en frasco)	7,92 ± 3,18	Calabretti et al. (2017)
	Porridge de carne liofilizada	15,55 ± 3,32	Calabretti et al. (2017)
	Comida en base a cereales	3,41 ± 2,15	Calabretti et al. (2017)

Snacks	Chip de papas	3,90 ± 11,93	Huang et al. (2019)
	Chip de maíz	44,35 ± 5,73	Salvatierra Virgen et al. (2017)
	Pasas rojas	15,14 ± 4,41	Gul et al. (2016)
	Pasas blancas	9,15 ± 1,89	Gul et al. (2016)
Lácteos	Leche cruda (*)	0,30 ± 0,04	Elliott et al. (2003)
	Leche pasteurizada (*)	0,48 ± 0,01	Elliott et al. (2003)
	Leche UHT (indirecto) (*)	1,92 ± 0,03	Elliott et al. (2003)
	Leche descremada en polvo	15,00 ± 16,46	De Block et al. (2003)
Otros	Chocolate de leche	126,05 ± 54,66	Teixidó et al. (2011)
	Chocolate amargo	58,85 ± 23,69	Teixidó et al. (2011)
	Ciruelas deshidratadas	1900,00 ± 424,26	Murkovic y Pichler (2006)

(*) Contenido de HMF expresado en mg/L.

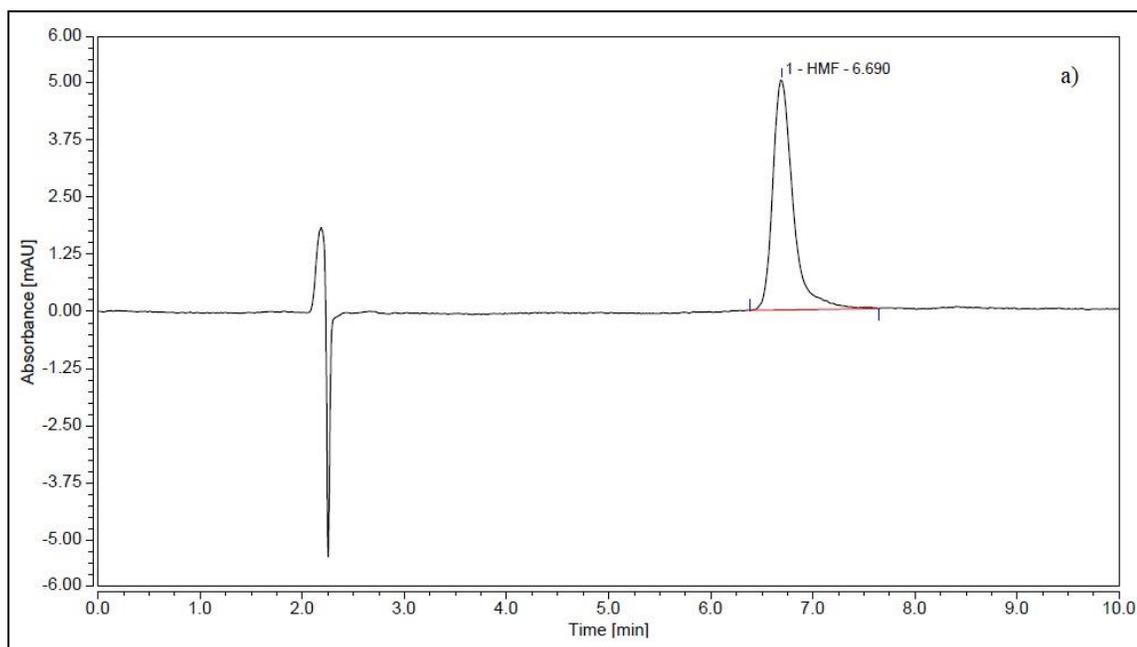
ANEXO D: CROMATOGRAMAS

Figura D-1. Cromatogramas de solución estándar de HMF (500 µg/L).

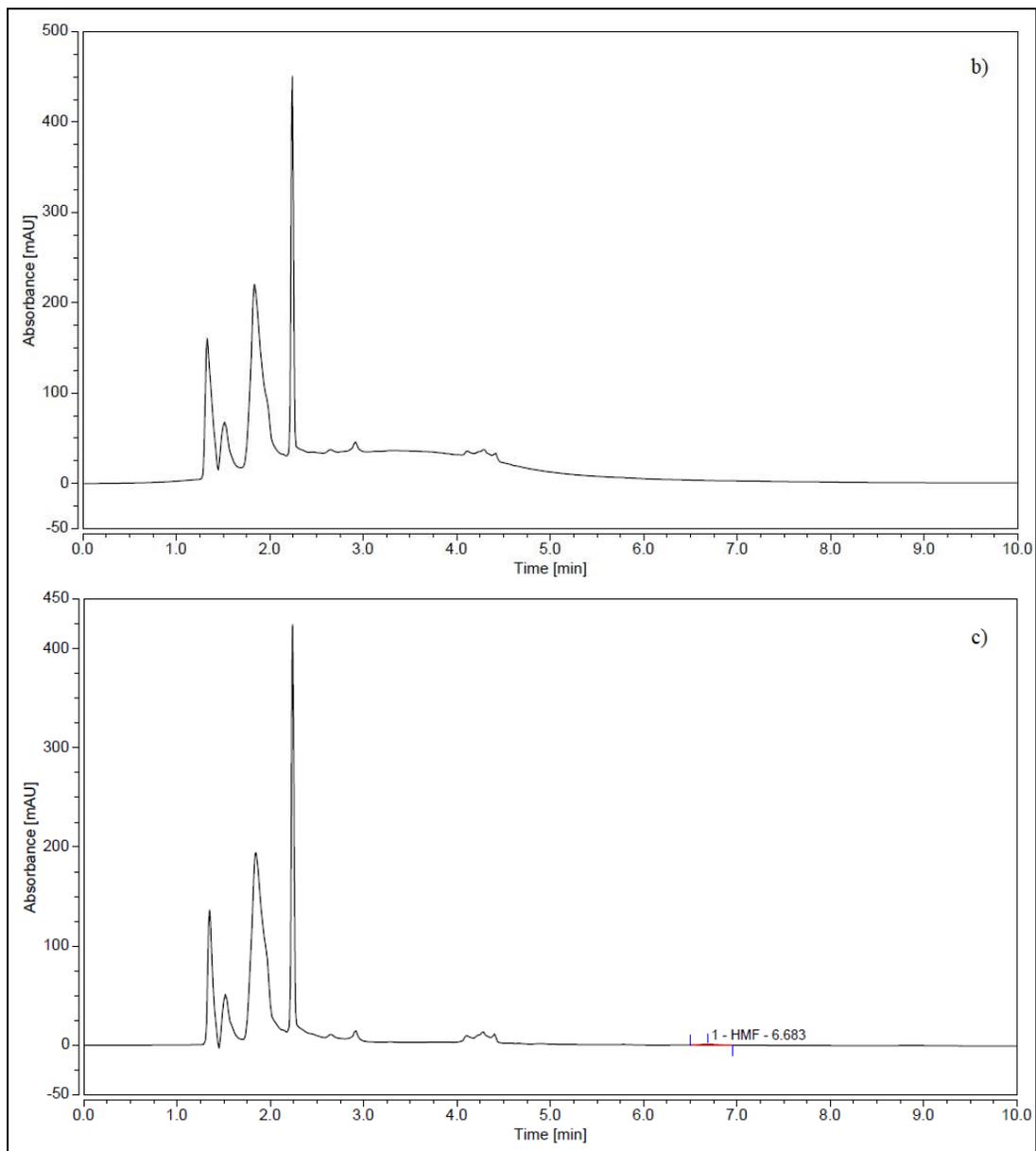


Figura D-2. Cromatogramas de: b) Leche en polvo con tratamiento para medir HMF libre; c) Leche en polvo con tratamiento para medir HMF total.

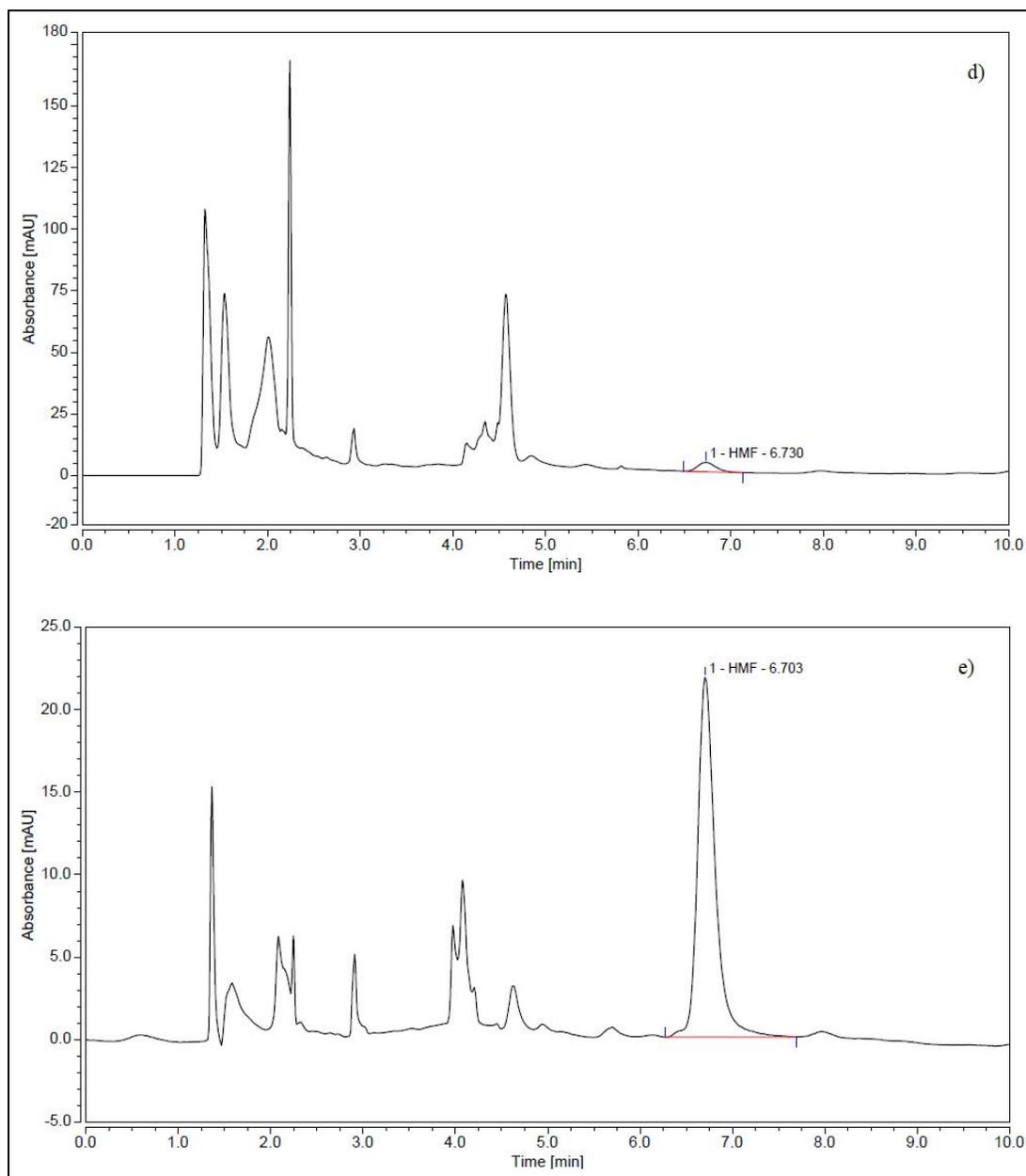


Figura D-3. Cromatogramas de: d) Manjar comercial con tratamiento para medir

HMF libre; e) Manjar comercial con tratamiento para medir HMF total.

**ANEXO E: CARACTERIZACIÓN DE MANJARES COMERCIALES Y
MATRICES LÁCTEAS**

Tabla E-1. Mediciones efectuadas durante el procesamiento de matrices lácteas IV.

Tiempo (minutos)	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)
0	23		23		24	
20	77		78		77	
40	83		84		82	
60	83		84		82	
80	83		84		83	
100	83		84		83	
120	84		85		83	
140	84		85		83	
160		49		46		45
180		50		48		48,5
200		51		50		52,5
220		54		53		57
240		57		58,5		64,5
260		63,5		61		66,5
280		70		67,5		
Post enfriamiento		68		67		66

Tabla E-2. Mediciones efectuadas durante el procesamiento de matrices lácteas V.

Tiempo (minutos)	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)
0	24		23		23	
15	88		86		86	
30	95		93		93	
45	95		93		93	
60	95		93		93	
75	95		93		93	
90	95		93		93	
105		45,5		45,5		45
120		50,5		50		49
135		53,5		52		53
150		57		57		58
165		66		65		67,5
173				69		
Post enfriamiento		66		69		67

Tabla E-3. Mediciones efectuadas durante el procesamiento de matrices lácteas VI.

Tiempo (minutos)	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)	Temperatura (°C)	Sólidos solubles (°Brix)
0	23		22		23	
10	88		90		90	
20					99	
30			99			
40	99		99			
50	99	45			99	
60		49		45	99	
70		55		50		46,5
80		59		56,5		56
90		67,5		63		62
95				66		69
Post enfriamiento		68,5		66,5		69

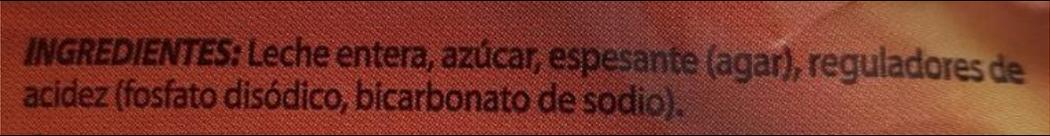
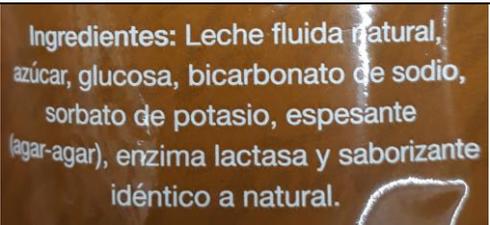
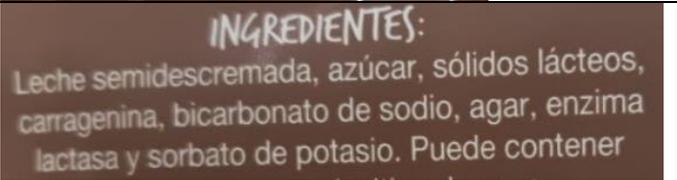
I		
	<p>Ingredientes: Leche entera, azúcar, espesante (agar), reguladores de acidez (fosfato disódico, bicarbonato de sodio).</p>	
II		<p>Ingredientes: Leche fluida natural, azúcar, glucosa, bicarbonato de sodio, sorbato de potasio, espesante (agar-agar), enzima lactasa y saborizante idéntico a natural.</p>
III		<p>Ingredientes: Leche semidescremada, azúcar, sólidos lácteos, carragenina, bicarbonato de sodio, agar, enzima lactasa y sorbato de potasio.</p>

Figura E-1. Ingredientes identificados en etiquetado de manjares comerciales.

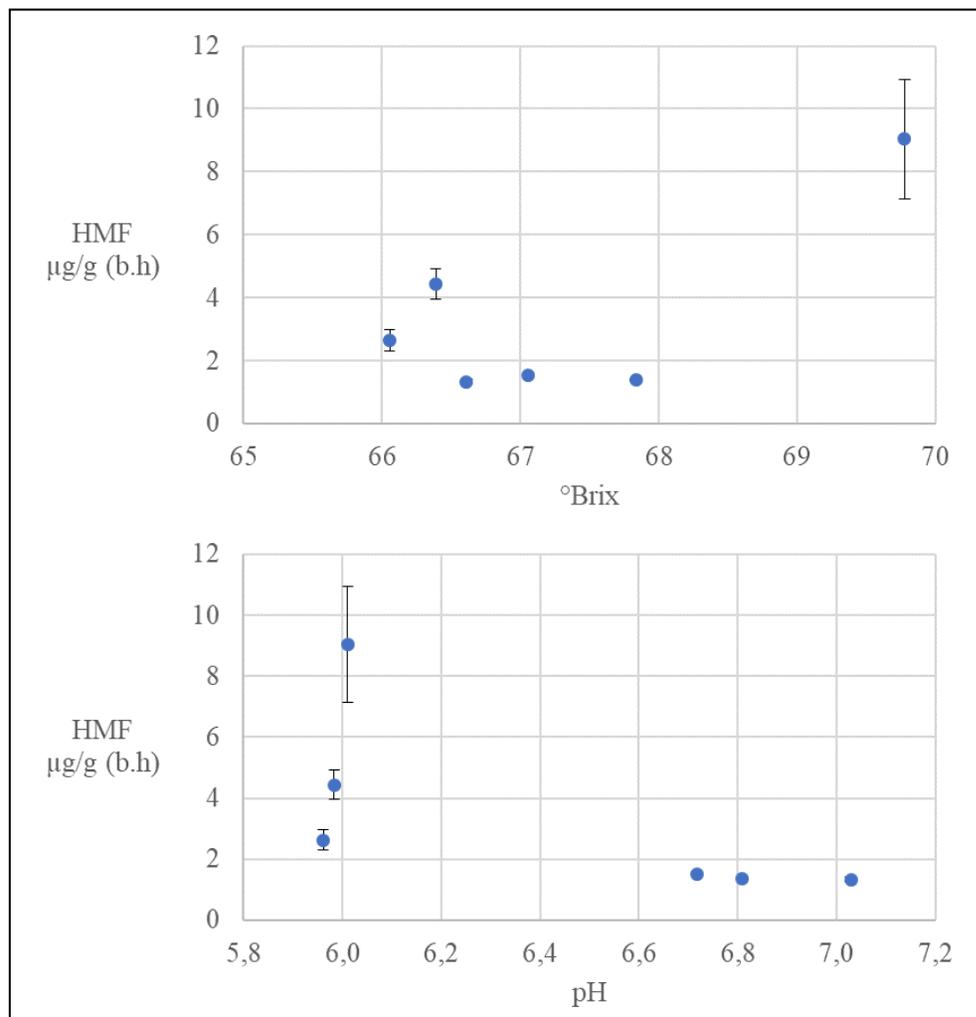


Figura E-2. Tendencia de HMF según °Brix y pH para manjares comerciales y matrices lácteas.

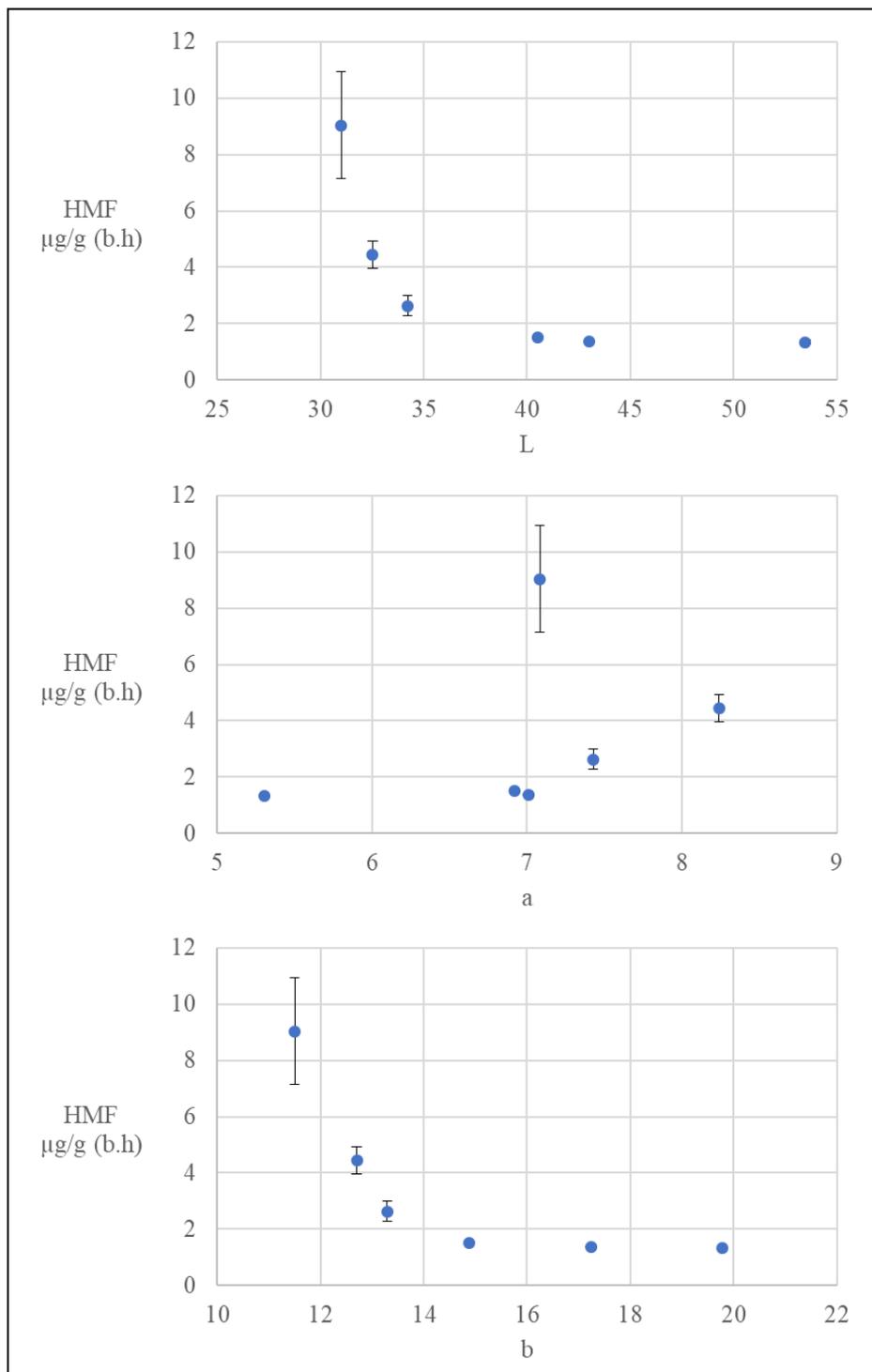


Figura E-3. Tendencia de HMF según coordenadas CIE Lab para manjares comerciales y matrices lácteas.

Tabla E-4. Comparación de parámetros estudiados entre manjares comerciales y matrices lácteas.

Parámetro	Muestras comerciales			Muestras laboratorio		
	I	II	III	IV	V	VI
°Brix	a	b	a	a	A	a b
pH	a	a	a	c	B	b
HMF	a	c	b	a	A	a
Fructosa	b	b	c	a	A	a
Glucosa	b c	a	c	a b	C	d
L	b	a	a b	d	C	c
a	b c	b	c	a	B	b
b	b	a	a b	e	C	d
σ_0	b	b	c	a	b c	c
K	b	b c	c d	a	b c d	d
n	a	b	a	c	A	a
Viscosidad (50 s ⁻¹)	a	b	b	a	B	b