



# **DESARROLLO DE CRACKERS SIN GLUTEN A PARTIR DE TEFF CON ALTA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Curso: 2017/18**

**Alumna: Carolina Pérez Montero**

**Tutora: Dra. Felicidad Ronda Balbás**

**Directores del proyecto: Dr. Daniel Rico Bargues**

**Dra. Ana Belén Martín-Diana**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1 ESTADO DEL ARTE Y SITUACIÓN ACTUAL .....	2
1.2 CARACTERÍSTICAS DE <i>ERAGROSTIS TEF</i> (ZUCC.) TROTTER Y SOSTENIBILIDAD DEL CULTIVO .....	2
1.3 HARINA DE TEFF EN ALIMENTACIÓN .....	3
1.4 POTENCIAL NUTRICIONAL Y ANTIOXIDANTE DEL GRANO .....	4
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>5</b>
3.1 MATERIA PRIMA .....	5
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	5
3.3 FORMULACIÓN DE LAS GALLETAS .....	6
3.4 PREPARACIÓN DE LAS GALLETAS .....	6
3.5 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS .....	7
3.5.1 <i>Color</i> .....	7
3.6 ANÁLISIS NUTRICIONALES Y COMPOSICIONALES .....	8
3.6.1 <i>Determinación de humedad</i> .....	8
3.6.2 <i>Determinación de nitrógeno y proteína</i> .....	8
3.6.3 <i>Determinación de grasa</i> .....	8
3.6.4 <i>Determinación de cenizas</i> .....	8
3.6.5 <i>Determinación de hidratos de carbono</i> .....	8
3.7 ANÁLISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	8
3.7.1 <i>Preparación de las muestras para la determinación de la capacidad antioxidante</i> .....	9
3.7.2 <i>Determinación de polifenoles totales (TP)</i> .....	10
3.7.3 <i>Ensayo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH</i> .....	10
3.7.4 <i>TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox)</i> .....	11
3.7.5 <i>Capacidad antioxidante ORAC (Capacidad Antioxidante frente al Radical Peróxido)</i> .....	11
3.7.6 <i>Ensayo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH (QUENCHER)</i> .....	12
3.7.7 <i>TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox) (QUENCHER)</i> .....	12
3.8 EVALUACIÓN SENSORIAL .....	13
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	13
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>14</b>
4.1 CARACTERIZACIÓN DE HARINAS .....	14
4.1.1 <i>Análisis Nutricional</i> .....	14
4.1.2 <i>Análisis de Capacidad Antioxidante</i> .....	14
4.2 RESULTADOS DE LOS PRODUCTOS FORMULADOS .....	15
4.2.1 <i>Color</i> .....	15
4.2.2 <i>Análisis Nutricional</i> .....	17
4.2.3 <i>Análisis de Capacidad Antioxidante</i> .....	18
4.2.4 <i>Análisis sensorial</i> .....	23
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>24</b>
<b>6. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>25</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>26</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>29</b>



## Resumen

El Teff, un cereal antiguo autóctono del este de África (Etiopía y Eritrea), se perfila como una de las alternativas en el desarrollo de productos sin gluten con un interesante valor nutricional. La harina integral de este cereal obtenida a partir de la molienda del grano entero, contiene todas las propiedades que le confieren las partículas de salvado, entre las que se encuentra el potencial antioxidante debido a su contenido en polifenoles. Aunque se ha evaluado el efecto antioxidante de la incorporación de harina de teff como ingrediente en panes con trigo, hay información limitada respecto a la capacidad antioxidante de productos sin gluten que contienen esta harina, y se basa en el análisis del incremento en la concentración de fenoles con la fermentación del pan plano etíope *injera*.

En este estudio se evalúa el contenido en compuestos fenólicos que presentan dos variedades de este cereal (teff de grano blanco y teff marrón) y se analiza la capacidad antioxidante que pueden contener unas galletas crackers formuladas con una base de harina de arroz y harina de teff a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%). Con esta investigación se pretende demostrar que es posible el desarrollo de un producto panificado sin gluten a partir de teff, con elevadas propiedades antioxidantes y sensorialmente aceptado.

## Abstract

Teff, an ancient cereal native to East Africa (Ethiopia and Eritrea), is emerging as one of the alternatives in the development of gluten-free products with an interesting nutritional value. The integral flour of this cereal obtained from the milling of the whole grain, contains all the properties that confer it the particles of bran, among which is the antioxidant potential due to its content in polyphenols. Although the antioxidant effect of incorporating teff flour as an ingredient in wheat breads has been evaluated, there is limited information regarding the antioxidant capacity of gluten-free products containing this flour, and it is based on the analysis of the increase in phenol concentration with the fermentation of Ethiopian injera flat bread.

This study evaluates the content of phenolic compounds in two varieties of this cereal (white grain teff and brown teff) and analyses the antioxidant capacity of crackers formulated with a base of rice flour and teff flour at different concentrations (25, 50, 75 and 100%). The aim of this research is to demonstrate that it is possible to develop a gluten-free baked product from teff, with high antioxidant properties and sensorially accepted.

## 1. Introducción

### 1.1 Estado del arte y situación actual

El origen del Teff [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] como cereal de cultivo se remonta a comienzos de la Edad Antigua en Etiopía y Eritrea. Desde el siglo XIX, las semillas de teff han sido distribuidas progresivamente por India, Australia, Estados Unidos, Sudáfrica, América del Sur y otras regiones de África (Ketema, 1997). Más actualmente, el teff comenzó a cultivarse en Holanda llegando a determinadas zonas del territorio europeo. En España, se ha obtenido un alto rendimiento de la producción de este grano desde 2016 posicionando al país como uno de los máximos exportadores para consumo humano en este momento (Centro para la Promoción de Importaciones de países en desarrollo [CBI], (2017). Exporting teff to Europe. Recuperado de <https://www.cbi.eu/market-information/grains-pulses/teff/europe/>).

### 1.2 Características de *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter y sostenibilidad del cultivo

Existe una amplia biodiversidad genética de teff que se ve reflejada en las características morfológicas y agronómicas entre las distintas variedades. De manera conjunta, este cereal perteneciente a la familia de las gramíneas, es una planta herbácea anual de 25 a 135 cm de altura, con grano desnudo, ovalado y muy pequeño (entre 0,9 y 1,7 mm de largo y de 0,7 a 1 mm de diámetro) (Fig. 1). La masa del grano de teff (2,5 - 3 mg), representa en torno al 0,7% del grano de trigo. Según la variedad y las condiciones de producción, una única planta de teff puede llegar a contener hasta 90000 granos. También hay variedad en el color de la semilla incluyendo las tonalidades de blanco roto a crema y marrón claro a oscuro. (Bultosa, 2016; Collar, 2007).



**Figura 1.** Planta y grano de Teff. Fuentes: FAO (<http://www.fao.org/traditional-crops/teff/es/>) y <http://scienceviews.com/photo/browse/SIA1149.jpg>.

Como cereal antiguo, el teff mantiene sus características originales de resistencia a las plagas comunes de insectos durante el almacenamiento (Bultosa, 2016) lo que evita el uso de tratamientos químicos haciendo más viable su producción ecológica. Al residuo de paja generado después de la recogida del grano, se le puede dar una nueva función como forraje ganadero (Collar, 2007). Además, estudios recientes plantean la producción de biogás a partir de la planta de teff seca (Chufo, Yuan, Zou, Pang y Li, 2015) y el empleo de la paja de teff como adsorbente de determinados metales pesados en aguas contaminadas (Tadesse, Teju y Megersa, 2015).

Todos estos factores hacen del teff un cultivo ventajoso a nivel de sostenibilidad del medio ambiente respecto al resto de cultivos domesticados.

Por otro lado, el teff puede crecer a diferentes altitudes, desde cerca del nivel del mar hasta más de 3000 m, y aguantar condiciones ambientales muy diversas desarrollándose tanto en suelos áridos como en suelos anegados (Bultosa, 2016). Un análisis reciente del mecanismo de regulación a nivel genético que ocurre en los tejidos de esta planta ante una situación de sequía indica cómo un conjunto de microARNs pueden modularse en respuesta a esa falta de hidratación jugando un importante papel sobre la resistencia a estrés hídrico (Martinelli, Cannarozzi, Balan, Siegrist *et al.*, 2018). Es decir, la planta de teff es tolerante a distintos tipos de estrés abiótico y es capaz de adaptarse a ciertas circunstancias extremas que cada vez más se están haciendo habituales como consecuencia del cambio climático (Cheng, 2018).

### 1.3 Harina de teff en alimentación

La demanda de alimentos sin gluten aumenta progresivamente en relación con el mayor número de personas diagnosticadas de celiaquía y con el crecimiento de intolerancias y sensibilidad al gluten (Rosell, Barro, Sousa y Mena, 2014).

En los últimos años, ha habido un interés por el teff como materia para obtener harinas sin gluten de gran valor nutricional convirtiéndose en uno de los cereales de tendencia (Gebremariam, Zarnkow, y Becker, 2014). La harina de teff se obtiene de la molienda directa del pequeño grano de la planta lo que le otorga el carácter integral con todos los beneficios que conlleva. Tradicionalmente utilizada para la elaboración de *injera*, un pan plano fermentado típico etíope, recientemente ha sido utilizada en el desarrollo de diferentes productos alimenticios sin gluten adentrándose en la cultura occidental. Las elaboraciones realizadas hasta el momento de pan de trigo con hasta un 40% de harina de teff, panes sin gluten con y sin masa madre, galletas dulces o pasta sin gluten, se recogen en Zhu, 2018.

#### 1.4 *Potencial nutricional y antioxidante del grano*

Los cereales ancestrales como el teff están suscitando gran atractivo en el mercado por el valor nutritivo que muestran este tipo de granos inalterados por el tiempo. Concretamente, la semilla de teff presenta un alto contenido de fibra en relación al tamaño y posee un óptimo equilibrio en composición de aminoácidos que incluye los 8 aminoácidos esenciales para el ser humano (Gebremariam *et al.*, 2014). Su composición en minerales como el calcio, cobre, hierro y zinc es más alta en comparación con la de cebada, trigo, sorgo, mijo o maíz. (Bultosa, 2016; Gebremariam *et al.*, 2014). A su vez, se ha observado que la cantidad de antioxidantes de origen fenólico en el teff es considerablemente superior a otros cereales como el maíz y el trigo (Forsido, Rupasinghe, y Astatkie, 2013).

En los alimentos libres de gluten no sólo debe haber ausencia de gluten, sino que se debe tener en cuenta la dosis de antioxidantes que contienen (Torres, Arufe, Chenlo, y Moreira, 2017), debido a que hay evidencias científicas que asocian las dietas ricas en antioxidantes con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular, cáncer y procesos degenerativos relacionados con la edad (Gökmen, Serpen y Fogliano, 2009).

La carencia en micronutrientes (entre los que se encuentran el grupo de antioxidantes), proteínas y fibra dietética de la gran mayoría de productos sin gluten disponibles, se indican en varios estudios (Vici, Belli, Biondi y Polzonetti, 2016). Otras investigaciones han sugerido el uso de cereales alternativos como el teff para mejorar la ingesta de proteínas, hierro, calcio y fibra de pacientes celíacos (Saturni, Ferretti, Bacchetti, 2010), lo que también podría suponer una fuente de ciertos polifenoles. De la misma manera, el teff puede contribuir a la mejora de productos con gluten y ser considerado un ingrediente más que potencie la funcionalidad del alimento aportando, precisamente, esos minerales, aminoácidos y antioxidantes de los que carece el trigo generando con ello, alimentos nutritivamente más completos (Alaunyte, Stojceska, Plunkett, Ainsworth y Derbyshire, 2012; Ronda, Abebe, Pérez-Quirce y Collar, 2015).

Las cualidades de *Eragrostis tef* para el cultivo sostenible y su gran flexibilidad en las condiciones climáticas en que prospera, permite considerarlo uno de los cereales del futuro. Además, el perfil nutritivo del grano de teff junto con sus propiedades antioxidantes, lo convierten en un gran candidato a formar parte de elaboraciones alimentarias que buscan un valor añadido.



## 2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo ha sido desarrollar un producto sin gluten y saludable dirigido, fundamentalmente, a la población celíaca, con alta capacidad antioxidante, en cuya composición formase parte la harina de teff como ingrediente que aporta el valor nutricional al alimento junto con harina de arroz. Este objetivo central se alcanza a través de los objetivos secundarios que aparecen a continuación:

- Caracterizar la materia prima (harinas de teff blanco y marrón) con parámetros nutricionales y determinar su potencial antioxidante.
- Realizar un producto elaborado con teff a distintas concentraciones y analizar la composición nutricional y las propiedades antioxidantes del producto formulado.
- Evaluar las propiedades o aspectos sensoriales sobre las muestras de producto horneado que mayor perfil antioxidante muestran.
- Seleccionar el producto óptimo en función de sus características bioactivas y sensoriales.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 *Materia prima*

Como ingredientes principales se utilizaron harina de arroz, obtenida de Emilio Esteban S.A. (Valladolid, España), y harinas integrales de teff blanco y teff marrón proporcionadas por Salutef (Palencia, España) (Fig. 2). Se usaron, además, aceite de girasol alto oleico Makro, Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de Guinama, azúcar blanco, sal de mesa y agua del grifo.



**Fig. 2.** Harinas de teff blanco (izquierda) y teff marrón (derecha).

### 3.2 *Diseño experimental*

El estudio se basó en el efecto que ejerce el factor “contenido en teff” (3 niveles) y el factor “proporción de teff blanco y teff marrón” (3 niveles), sobre la media de cada

variable respuesta cuyo resultado se mide mediante un análisis de varianza de una vía o ANOVA simple.

El dominio experimental del factor “proporción” abarcó del 0 al 100 %. Se llevaron a cabo 10 experimentos dentro de los cuales había un experimento que no contenía harinas de teff (muestra control) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición porcentual en harinas de arroz, teff blanco y teff marrón de las 10 muestras de crackers.

Número de muestra	Harina de Arroz	Harina de Teff blanco	Harina de Teff marrón
1 (Control)	100	0	0
2	75	12,5	12,5
3	75	25	0
4	75	0	25
5	50	25	25
6	50	50	0
7	50	0	50
8	0	50	50
9	0	100	0
10	0	0	100

Las variables respuesta fueron los parámetros físico-químicos, nutricionales y de capacidad antioxidante.

### 3.3 *Formulación de las galletas*

Para la formulación de las galletas se utilizó la combinación de las harinas de teff con harina de arroz teniendo en cuenta que la temperatura de gelatinización de ambos almidones es similar y el comportamiento de la masa durante la cocción será uniforme (Bultosa y Taylor, 2003).

Las proporciones de ingredientes en las formulaciones de las galletas se mantuvo variando, únicamente, la relación entre las tres harinas (según el diseño experimental descrito anteriormente). Sobre la misma cantidad de harina (100 g), se añadió azúcar (10 g/100 g), sal (3 g/100 g), HPMC (2 g/100 g), aceite de girasol alto oleico (20 g/100 g) y agua (70 g/100 g).

### 3.4 *Preparación de las galletas*

El proceso de elaboración de los diez tipos de crackers diferentes incluía los siguientes pasos:

Mezclado inicial de los ingredientes secos e incorporación posterior del aceite de girasol alto oleico y el agua. Este último líquido se añadió de forma paulatina a medida que se formaba la masa.

Posteriormente, las distintas masas se introdujeron en bolsas de polietileno para su fermentación, durante 24 horas a temperatura ambiente, con el propósito de mejorar el contenido en antioxidantes del producto final (Umeta y Faulks, 1989; Shumoy, Gabaza, Vandeveldde y Raes, 2017), objetivo enmarcado dentro del presente trabajo. Pasadas las 24 horas, se laminó cada masa manualmente hasta conseguir un espesor de 2,5 mm. Seguidamente, se cortaron fragmentos con un molde cuadrangular de 35 x 35 mm y se sometieron a cocción a 165° C durante 25 minutos en horno con ventilación forzada (CAPIC, Suministros Navaher SL).

Por último, las galletas ya horneadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se envasaron a vacío para su posterior estudio. Parte de ellas, se molieron y el triturado obtenido se reservó en refrigeración a 4° C para el análisis nutricional y de bioactividad antioxidante que se describe más abajo.

Con el fin de obtener valores representativos, se realizaron dos lotes con cada elaboración de galleta crackers y se mezclaron de forma homogénea antes de proceder con la evaluación de los parámetros que se desarrollan a continuación.

### 3.5 *Análisis físico-químicos*

#### 3.5.1 Color

La medida instrumental del color fue realizada en el espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$ , siendo  $L^*$  la luminosidad,  $a^*$  una coordenada de cromaticidad rojo/ verde y  $b^*$  otra coordenada de cromaticidad amarillo/ azul. También se determinó la tonalidad (*Hue, h*) y vivacidad (*Chroma, C\**) del color. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro de reflectancia (CM-2600d, Konica Minolta Sensing, INC., Japón). Las condiciones de medida fueron las siguientes: UV 100%, iluminante D65, observador 10°, componente especular excluido.

Se midió el color de la superficie de 5 crackers de cada uno de los lotes formulados.

### 3.6 *Análisis nutricionales y composicionales*

Las determinaciones llevadas a cabo han sido humedad, nitrógeno, proteína, grasa, cenizas e hidratos de carbono, siguiendo las metodologías descritas en el Reglamento (CE) 152/2009, de la Comisión de 27 de enero.

#### 3.6.1 Determinación de humedad

El contenido de humedad de las harinas y crackers se evaluó mediante el secado de  $5 \pm 0,001$  g de muestra en polvo a  $105^\circ\text{C}$  durante 3 h y el cálculo se llevó a cabo por diferencia de peso. El contenido en humedad se expresó en porcentaje de agua sobre la muestra húmeda.

#### 3.6.2 Determinación de nitrógeno y proteína

El contenido de nitrógeno se determinó mediante el método de Dumas (AOAC 2005, método 990.03) en un analizador elemental CN-2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI, EE. UU.).

#### 3.6.3 Determinación de grasa

El método Soxtec consiste en una hidrólisis previa de las muestras con ácido clorhídrico (HCl) 3 N y una posterior extracción con éter de petróleo. El solvente se destiló y el residuo se secó y se pesó obteniendo así el porcentaje de grasa.

#### 3.6.4 Determinación de cenizas

La determinación de cenizas referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa en un horno mufla a  $550 \pm 15^\circ\text{C}$  durante 5 horas y posterior desecación y pesada, se expresó en porcentaje de cenizas.

#### 3.6.5 Determinación de hidratos de carbono

La determinación de hidratos de carbono se realizó por diferencia de los componentes anteriores calculados mediante técnicas analíticas.

### 3.7 *Análisis de capacidad antioxidante*

Se han desarrollado diversos métodos de medida que requieren procedimientos de extracción de los antioxidantes de la matriz alimentaria (André, Castanheira, Cruz, Paseiro, y Sanches-silva, 2010). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las condiciones de extracción representan una fuente de variación, ya que los alimentos

son estructuras complejas en las que los compuestos antioxidantes pueden estar interaccionando con macromoléculas, atrapados en compartimentos o estructuras celulares o unidos covalentemente a matrices insolubles (Gökmen *et al.*, 2009; Serpen, Gökmen, Pellegrini y Fogliano, 2008).

Además, el rendimiento de la extracción depende en gran medida de la solubilidad de los compuestos en el disolvente utilizado. Los ensayos revisados utilizan etanol: agua (50:50, v/v) o metanol como disolventes y estudian su efecto sobre la extracción (Serpen, Gökmen y Fogliano, 2012). Estos métodos pueden dar lugar a una medida subestimada de la capacidad antioxidante total.

Por ello, también se ha desarrollado un método que permite la medida directa de la capacidad antioxidante que consiste en mantener en contacto la muestra con el radical oxidante, y seguidamente realizar una medida espectrofotométrica. El método "QUENCHER" (Quick, Easy, New, Cheap and Reproducible) o procedimiento directo se aplica a alimentos ricos en fibra como cereales o cacao, donde la contribución a la capacidad antioxidante de las partes insolubles es comparable a las partes solubles (Gökmen *et al.*, 2009). El procedimiento directo QUENCHER no requiere extracción ni hidrólisis previa a la medida. Es adecuado para alimentos sólidos y con baja humedad, como los crackers. El tratamiento de las muestras sólidas consiste en su molienda hasta partículas finas con un tamaño medio entre 0.1 y 0.3 mm. Es importante obtener el tamaño de partícula indicado para llevar a cabo la reacción con una velocidad adecuada. Las partículas sólidas se ponen en contacto (unos 30 minutos) con la solución de radical para que se lleve a cabo la reacción. La solución de radical se prepara en una mezcla de agua y etanol o metanol. Algunos estudios muestran mejores resultados al utilizar una mezcla etanol: agua (50:50) como disolvente (Serpen *et al.*, 2012). Finalmente, la mezcla se centrifuga y se realiza una medida espectrofotométrica del sobrenadante (Gökmen *et al.*, 2009).

### 3.7.1 Preparación de las muestras para la determinación de la capacidad antioxidante

Como preparación previa a la evaluación de la capacidad antioxidante de las galletas, se llevaron a cabo dos tratamientos. Por una parte, las muestras sólidas fueron trituradas con molinillo (Modelo M20, IKA WERKE GMBH) y posteriormente tamizadas hasta un tamaño de partícula inferior a 300  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, se hicieron extracciones con metanol: agua (50:50, v/v, pH= 2). Para ello, se introdujo 1 g de cada muestra en 10 mL de solución de extracción y se agitaron a 250 rpm a temperatura ambiente durante

una hora en una incubadora (Biosan ES-20, Biogen Científica SL). Después, se centrifugaron a 4000 rpm a 25 °C durante 10 minutos, se filtró el sobrenadante y se añadió la solución extractora metanol:agua acidificada hasta enrasar a 15 ml.

### 3.7.2 Determinación de polifenoles totales (TP)

La concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co, España).

Se mezclaron 140 µL de los extractos de las muestras con 280 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co) diluido (1/10) y 980 µL de disolución de sodio carbonato 42,86 mM (Sigma Aldrich Co, España). Tanto la dilución del reactivo de Folin-Ciocalteu como la de carbonato se realizan en agua destilada. Se agita y se deja en reposo y oscuridad durante 100 minutos. Después se centrifuga durante 3 minutos a 13500 rpm. La absorbancia se mide a 760 nm en lector de placas. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico en 100 gramos de muestra usando una curva de calibración de ácido gálico (70 µM a 9,8 µM) (Sigma Aldrich, España).

### 3.7.3 Ensayo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH

El objetivo es evaluar la capacidad que tiene un antioxidante para capturar radicales libres. Este ensayo se basa en el cambio de color de la molécula 2,2- difenil1-picrilhidrazilo (DPPH). Se trata de un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe a 515 nm, pero en presencia de antioxidantes se produce su reducción, lo que conlleva una pérdida de color y, por lo tanto, una disminución de la absorbancia en función de la capacidad antioxidante de las muestras.

En este caso, la solución de DPPH se puso en contacto con el extracto de las muestras sólidas, trabajando en ausencia de luz. Después, en placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añadieron 25 µL de muestra, 100 µL de agua ultrapura y 125 µL de la solución de trabajo Radical DPPH por duplicado. Por último, una vez incubada la placa multipocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de placas. Los resultados se expresaron en porcentaje de reducción de la actividad DPPH.

### 3.7.4 TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox).

Este ensayo estima la capacidad para reducir el radical catión ABTS<sup>•+</sup>, que se genera por oxidación con persulfato potásico (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) del ABTS (2,2'-azinobis-(3etilbenzotiazolin)-6-sulfonato sal diamónica), obteniendo un producto coloreado que presenta un máximo de absorción a 734 nm. La capacidad antioxidante se mide como habilidad de los compuestos para disminuir el color reaccionando directamente con el radical catión ABTS<sup>•+</sup>.

El análisis se llevó a cabo según describen Re *et al.*, 1999. Se preparó la solución 7 mM de ABTS a la que se añadió K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Sigma Aldrich Co, España) 2,45 mM en agua ultrapura, y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 h para la formación del radical ABTS<sup>•+</sup>. Seguidamente, se diluyó hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 (±0,2) a 734 nm. Se preparó una curva de estándares de Trolox (Sigma Aldrich Co, España) con metanol de concentraciones 180, 150, 120, 60 y 30 µM.

La solución del radical ABTS<sup>•+</sup> se puso en contacto con el extracto de las muestras sólidas, trabajando en ausencia de luz.

En placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añadieron 20 µL de muestra y 200 µL de la solución de trabajo Radical ABTS<sup>•+</sup> por duplicado, las soluciones correspondientes a la curva de estándares de Trolox (Sigma Aldrich Co) (180 µM a 30 µM) y metanol para el blanco. Una vez incubada la placa durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 734 nm en lector de placas. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox por g de muestra.

### 3.7.5 Capacidad antioxidante ORAC (Capacidad Antioxidante frente al Radical Peróxido)

Este ensayo se fundamenta en que los radicales peróxidos atacan una sonda fluorescente (fluoresceína), reacción que es fácilmente cuantificada por una pérdida de fluorescencia (Ou, Hampsch-Woodill y Prior, 2001). Los antioxidantes suprimen esta reacción por el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno, inhibiendo la degradación oxidativa de la señal de fluorescencia.

La curva de estándares de Trolox (120, 90, 60 30, 15 y 7,5 µM) y los extractos de las muestras fueron diluidas (1:10, 1:20, 1:50 y 1:100) en tampón fosfato (75 mM, pH 7,4) (Sigma Aldrich Co). En cada pocillo de la microplaca se añadió 150µL de fluoresceína (Sigma Aldrich Co, España) y 25 µL de los estándares de Trolox, de las muestras o de tampón para el blanco. Las muestras, los controles y el estándar se incubaron con la solución de fluoresceína a 37°C durante 8 minutos antes de adicionar el generador de radicales AAPH (2,2'-azobis (2-methyl-propionamidine)

dihydrochloride) 153 mM (Sigma Aldrich Co, España) preparado en tampón fosfato, iniciándose la reacción. La intensidad de la fluoresceína fue monitorizada usando 485 nm excitación y 528 nm emisión cada minuto durante 90 minutos en el lector de placas. A medida que la reacción avanza, la fluoresceína es consumida y la intensidad de la misma disminuye.

La capacidad antioxidante es proporcional al área bajo la curva (AUC) de decaimiento de la fluorescencia. Se obtiene una curva estándar con la AUC de una curva patrón de Trolox. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox por 100 g de muestra.

### 3.7.6 Ensayo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH (QUENCHER)

El objetivo es el mismo que en el método indirecto, es decir, evaluar la capacidad que tiene un antioxidante para capturar radicales libres.

La solución de DPPH fue preparada en metanol (60 mM). Las muestras sólidas fueron diluidas en carboximetilcelulosa (Sigma Aldrich Co, España). Algunos autores indican que, si es necesario las muestras pueden ser diluidas con polvo de celulosa que es inerte en la reacción (Serpen, Capuano, Fogliano y Gökmen, 2007).

La solución de DPPH se puso en contacto con la muestra sólida y se agitó 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en un agitador de 24 posiciones (Thermomixer comfort, Eppendorf). Después, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 minutos. En placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añadieron 200  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra por duplicado y se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de placas (FluOstar Omega, BMG). Los resultados se expresaron en porcentaje de reducción de la actividad DPPH.

### 3.7.7 TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox) (QUENCHER)

Al igual que en el método indirecto, este ensayo estima la capacidad para reducir el radical catión  $ABTS^{•+}$ , que se genera por oxidación del ABTS con persulfato potásico ( $K_2S_2O_8$ ) en idénticas condiciones a las descritas anteriormente.

La curva de estándares de Trolox (Sigma Aldrich Co) se preparó con etanol:agua (50:50, v:v) (Panreac) de concentraciones 180, 150, 120, 60, 30 y 15  $\mu$ M y se tomaron alícuotas de 160  $\mu$ L.

Se pesaron 10 mg de las muestras sólidas, preparadas según el apartado anterior, y se añadieron 160  $\mu$ L de etanol:agua (50:50, v:v) (Panreac) para compensar el volumen con la curva de Trolox. Después se añadieron 1,6 mL de la solución de ABTS diluida a cada una de las muestras y a la curva de Trolox y se mantuvo en agitación a temperatura



ambiente y oscuridad en un agitador eppendorf (Thermomixer Compact, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) durante 30 minutos. A continuación, los tubos se centrifugaron 2 minutos a 14000 rpm.

En placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añadieron 200 $\mu$ L de cada muestra por duplicado, de los estándares de Trolox y de agua ultrapura para el blanco. La absorbancia fue medida a 730 nm en lector de placas (FluOstar Omega, BMG). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox por g de muestra.

### 3.8 *Evaluación sensorial*

En relación al análisis sensorial, se realizó una Prueba de Ordenación o Ranking Test de las muestras que mayor capacidad antioxidante presentaron.

La prueba fue llevada a cabo por 8 catadores habituados a la valoración del producto. Los atributos de textura a evaluar fueron la crujencia y la masticabilidad (energía necesaria para procesar el alimento en la boca antes de tragarlo) y, las características de sabor analizadas, se correspondieron con la intensidad de sabor inicial y persistencia de sabor residual o regusto. Además, se examinó la preferencia por el producto valorando su aceptabilidad global. La hoja de respuestas utilizada para el análisis sensorial se recoge en el anexo I.

Las muestras horneadas, debidamente codificadas con números aleatorios de tres dígitos, se presentaron sobre un mantel blanco junto con un vaso de agua para neutralizar. La prueba consistía en probar las muestras de forma aleatoria y, a partir de la primera escogida por el catador, ordenar el resto por comparación con ésta en una escala de menor a mayor en función de los atributos definidos.

### 3.9 *Análisis estadístico*

Todas las medidas analíticas fueron realizadas por triplicado y se calcularon los valores medios y las desviaciones típicas. Los resultados experimentales de la metodología fueron analizados mediante ANOVA simple con un nivel de significación del 5% usando el software Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Technologies, Inc. 1982–2014).

En cuanto al análisis sensorial, los resultados obtenidos de la prueba de ordenación fueron tratados mediante un test de Kramer con un nivel de significación del 5% ( $p < 0,05$ ). Para decidir si existían diferencias significativas entre las muestras se comparó la suma de los rangos en relación a una diferencia crítica.

#### 4. Resultados y discusión

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tanto de las materias primas principal como de los crackers formulados que forman parte del diseño central de la investigación.

##### 4.1 Caracterización de harinas

###### 4.1.1 Análisis Nutricional

El análisis nutricional de las harinas utilizadas como materias primas (Tabla 2) muestra diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre ellas para todos los parámetros medidos (cenizas, grasa, humedad, proteínas e hidratos de carbono). A pesar de ello, las harinas de ambas variedades de teff tienen humedad y contenido en hidratos de carbono similares. Sin embargo, la harina de teff blanco presenta una mayor proporción de cenizas y de grasa respecto de la marrón.

**Tabla 2.** Composición nutricional de las harinas (%).

Tipo de Harina	Cenizas	Grasa	Humedad	Proteínas	Hidratos de carbono
Arroz	1,35 ± 0 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	10,01 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,63 ± 0 <sup>a</sup>	79,95 ± 0,13 <sup>b</sup>
Teff Blanco	3,05 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,46 ± 0,06 <sup>c</sup>	11,13 ± 0,13 <sup>b</sup>	10,78 ± 0,042 <sup>b</sup>	72,58 ± 0,17 <sup>a</sup>
Teff Marrón	2,21 ± 0 <sup>b</sup>	1,98 ± 0,16 <sup>b</sup>	11,74 ± 0,56 <sup>b</sup>	11,72 ± 0,042 <sup>c</sup>	72,36 ± 0,77 <sup>a</sup>
Valor- <i>P</i>	<0,001	0,002	0,032	<0,001	0,001

Los resultados están expresados sobre materia fresca como media ± desviación estándar. Los valores con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

En cuanto al contenido proteico, la harina de teff marrón supera a las otras dos muestras; contiene entorno a un 1% de proteínas más que la harina de teff blanco y un 4% más que la harina de arroz. Tal y como confirman otros investigadores, el teff tiene un contenido en proteínas más elevado que el arroz (Abebe, Collar y Ronda, 2015; Mancebo, Picón y Gómez, 2015).

###### 4.1.2 Análisis de Capacidad Antioxidante

A continuación, se muestra el resumen de los datos obtenidos para el contenido en polifenoles y el potencial antioxidante de las harinas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de harinas utilizadas.

Tipo de Harina	TP (mg GAE/100g)	DPPH (% inhibición)	TEAC (mg Trolox/g)	ORAC (mg Trolox/100g)	TEAC-Q (mg Trolox/g)	†DPPH-Q (% inhibición)
Arroz	19,95 ± 0,83 <sup>a</sup>	53,53 ± 1,49 <sup>a</sup>	0,019 ± 0,008 <sup>a</sup>	1016,59 ± 118,09	0,58 ± 0,07 <sup>a</sup>	11,91 ± 4,44 <sup>a</sup>
*Mezcla	63,26 ± 3,88 <sup>c</sup>	103,43 ± 5,36 <sup>bc</sup>	0,013 ± 0,008 <sup>a</sup>	12562,7 ± 0	0,61 ± 0,09 <sup>a</sup>	86,49 ± 0,80 <sup>c</sup>
Teff Blanco	74,04 ± 0,83 <sup>d</sup>	111,01 ± 2,38 <sup>b</sup>	0,012 ± 0,008 <sup>a</sup>	10785,4 ± 0	0,53 ± 0,02 <sup>a</sup>	63,13 ± 2,12 <sup>b</sup>
Teff Marrón	54,64 ± 1,11 <sup>b</sup>	93,95 ± 7,44 <sup>c</sup>	0,015 ± 0,008 <sup>a</sup>	5400,84 ± 0	0,54 ± 0,02 <sup>a</sup>	90,69 ± 6,54 <sup>c</sup>
Valor-P	<0,001	0,001	0,574	N/A	0,308	<0,001

Los resultados están expresados en peso fresco como media ± desviación estándar. Los valores con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). \* La harina "mezcla" contiene un 50% de cada variedad de teff. † Los datos para DPPH-Q están referidos sobre una dilución 1:2 de las muestras.

Los ensayos de capacidad antioxidante a través de ORAC, DPPH y DPPH-Q y la determinación del contenido en polifenoles de las harinas, manifiestan que las harinas de las dos variedades de teff y la de arroz son significativamente diferentes entre sí ( $P < 0,05$ ). Al mismo tiempo, las harinas de teff se encuentran siempre por encima de la de arroz.

Los resultados para TEAC y TEAC-Q, sin embargo, no describen diferencias entre las muestras de harina, lo que puede deberse a una posible interacción anómala entre éstas y el radical ABTS utilizado.

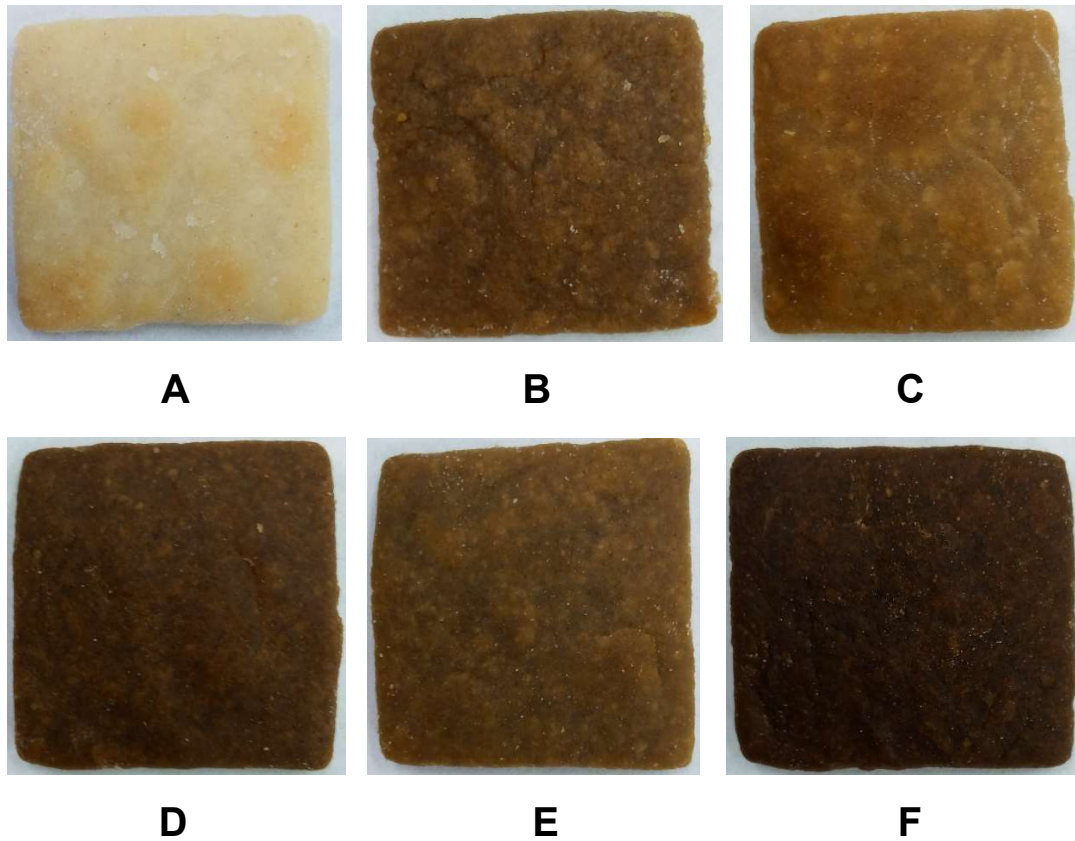
Se evidencia que la variedad blanca tiene un mayor contenido en compuestos fenólicos y una capacidad antioxidante sobre DPPH más elevada que la variedad marrón, justo al contrario de lo que han observado otros investigadores (Kotásková, Sumczynski, Miček y Valášek, 2016; Shumoy y Raes, 2016). Sin embargo, los resultados del método directo DPPH-Q muestran una actividad antioxidante mayor para la variedad marrón.

Además, las diferencias encontradas en el contenido total de polifenoles entre las harinas de este trabajo y las de otros estudios (Kotásková *et al.*, 2016; Shumoy y Raes, 2016) reflejan la disparidad de este parámetro en distintos granos de teff (Zhu, 2018). Estas diferencias pueden estar ocasionadas por las distintas procedencias de las variedades de teff sobre la que influye la amplia diversidad genética del cereal y, a su vez, por las distintas condiciones y ubicaciones del cultivo.

## 4.2 Resultados de los productos formulados

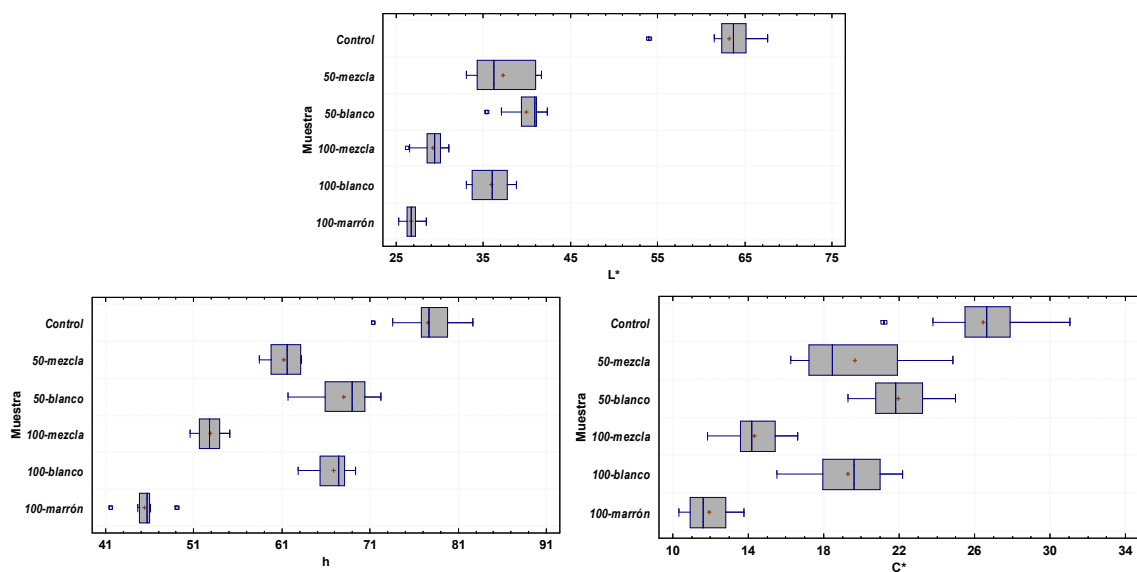
### 4.2.1 Color

Los atributos del color se estudiaron sobre los crackers elegidos para el análisis sensorial que se corresponden con el control y con las 5 formulaciones de mayor contenido en polifenoles y capacidad antioxidante por los métodos ORAC y DPPH (Fig. 3).



**Fig. 3.** Aspecto de los crackers que se evaluaron mediante análisis de color. A: muestra control. B: 50% teff mezcla. C: 50% teff blanco. D: 100% teff mezcla. E: 100% teff blanco. F: 100% teff marrón.

Las muestras analizadas son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) para los parámetros de luminosidad ( $L^*$ ), tono ( $h$ ) y saturación ( $C^*$ ) como se puede ver en la figura 4.



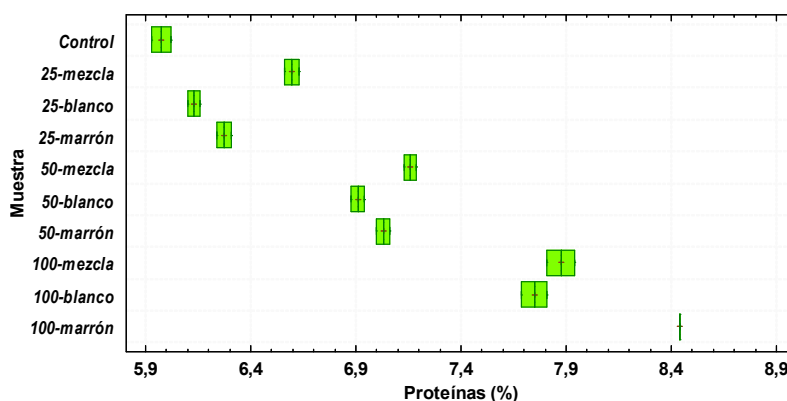
**Fig. 4.** Gráficos de dispersión y simetría para los tres atributos del color (Luminosidad o  $L^*$ , tono o  $h$  y saturación o  $C^*$ ).

#### 4.2.2 Análisis Nutricional

La exploración de los datos de composición nutricional de los crackers indica la ausencia de diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ellos en relación a su contenido de grasa. No se observa correlación entre el porcentaje de grasa y el contenido de teff de ninguna de las variedades.

Por el contrario, las galletas presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) para el resto de parámetros analizados (cenizas, humedad, proteínas e hidratos de carbono). Las cenizas aumentan a medida que se incrementa la cantidad de teff, siendo mayor para el teff blanco en las distintas formulaciones a la misma concentración de teff. La galleta control tiene el mínimo valor de cenizas (2,75%) y el máximo corresponde a la galleta con 100% de teff blanco (4,84%). Aunque en la humedad se observan diferencias, no se puede ver una relación coherente con el aumento de la concentración de teff. Sí se observan valores más altos de humedad para las formulaciones cuya composición es harina de teff en su totalidad (11,8% para marrón y 12,47% para blanco), respecto del control con harina de arroz (8,32%). El contenido graso de las harinas de teff puede influir en una mayor retención de agua dentro de las muestras.

Entre la cantidad de proteínas y el porcentaje de teff sí hay una relación directamente proporcional como se puede observar en la figura 5. Este incremento en proteínas a medida que se incorpora teff en las formulaciones ha sido mostrado en otros estudios de pan con trigo (Alaunyte *et al.*, 2012; Hofmanová, Hrušková, y Švec, 2014). Además, en todos los porcentajes ensayados, la formulación con teff marrón tiene un nivel proteico superior a la formulación con la variedad blanca.



**Fig. 5.** Gráfico de dispersión de respuesta y simetría para Proteínas.

El contenido en hidratos de carbono, al contrario que el de proteínas, refleja una relación inversamente proporcional a la concentración de teff, es decir, se percibe una

disminución progresiva del porcentaje de carbohidratos al aumentar el teff total de las muestras, siendo el valor más alto para el cracker control (69,56%) y el más bajo, para el cracker con 100% de teff mezcla (la mitad de cada variedad) (57,77%).

#### 4.2.3 Análisis de Capacidad Antioxidante

La tabla 4 muestra los valores obtenidos en los distintos métodos de capacidad antioxidante para cada muestra. Cada respuesta fue estudiada de forma independiente.

**Tabla 4.** Resultados de los ensayos de capacidad antioxidante para los productos formulados.

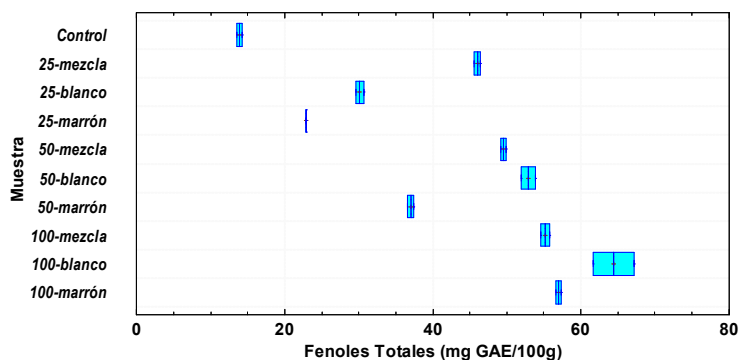
Muestra	Fenoles Totales (mg GAE/100g)	DPPH (% inhibición)	TEAC (mg Trolox/g)	ORAC (mg Trolox/100g)	DPPH-Q (% inhibición)	TEAC-Q (mg Trolox/g)
Control	13,87±0,55	52,47±1,19	0,019±0,008	364,92±237,80	20,76±4,24	0,51±0,03
25-mezcla	46,01±0,55	72,90±6,25	0,015±0,008	2301,80±710,25	41,53±2,03	0,52±0,08
25-blanco	30,14±0,83	62,58±0,60	0,017±0,008	1643,97±464,54	33,21±3,43	0,66±0,08
25-marrón	22,89±0	60,48±1,79	0,018±0,008	1059,09±88,86	29,31±3,18	0,57±0,03
50-mezcla	49,54±0,55	75,21±2,38	0,015±0,008	2984,32±329,32	43,28±3,21	0,53±0,004
50-blanco	52,87±1,39	74,58±1,49	0,014±0,008	4471,44±1097,20	38,17±2,19	0,53±0,03
50-marrón	37,00±0,55	65,95±3,57	0,017±0,008	1728,34±198,25	47,94±2,51	0,54±0,027
100-mezcla	55,22±0,83	79,00±0,60	0,014±0,008	5238,6±615,80	86,11±0,523	0,52±0,027
100-blanco	64,43±3,88	81,53±1,79	0,012±0,008	7328,67±754,37	80,84±8,94	0,53±0,02
100-marrón	56,99±0,55	92,90±12,51	0,014±0,01	4800,71±1603,28	75,88±3,12	0,56±0,08

Los resultados están expresados en peso fresco como media ± desviación estándar.

Se evaluaron los fenoles totales de los crackers y los datos derivados, expresados en mg equivalentes ácido gálico por 100 g de muestra, fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA simple. En la figura 6 se observa que las formulaciones con teff blanco respecto a sus equivalentes de teff marrón tienen una mayor cantidad de polifenoles. Sin embargo, en todos los casos con harinas de teff, la concentración de fenoles está por encima del *control*. Además, se observó un efecto significativo de los niveles de muestra sobre el contenido fenólico, lo que indica una diferencia significativa entre los resultados obtenidos identificándose 9 grupos homogéneos en los 10 ensayos realizados según el procedimiento LSD (diferencia mínima significativa) de Fisher.

Tabla ANOVA para Fenoles por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4815,75	9	535,083	268,98	0,0000
Intra grupos	19,8931	10	1,98931		
Total (Corr.)	4835,64	19			



**Fig. 6:** tabla ANOVA y gráfico de la dispersión de respuesta y simetría para fenoles totales.

El poder antioxidante de las muestras frente al radical DPPH se examinó mediante ANOVA simple. Aunque hay diferencias significativas entre las distintas medias de los ensayos, no se puede establecer una relación clara entre el incremento en el porcentaje de inhibición del radical DPPH y una de las variedades de teff. En general, un aumento en la concentración de harinas de teff de ambas variedades tuvo un efecto positivo sobre la capacidad antioxidante, medido como la reducción del radical DPPH (Fig. 7).

Tabla ANOVA para DPPH por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2466,65	9	274,072	12,20	0,0003
Intra grupos	224,673	10	22,4673		
Total (Corr.)	2691,32	19			

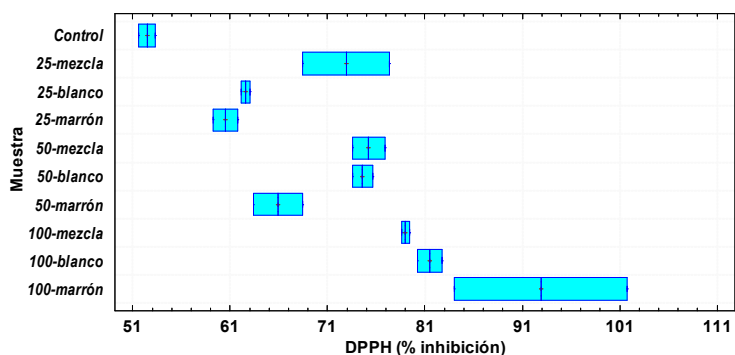


Fig. 7: tabla ANOVA y gráfico de la dispersión de respuesta y simetría para DPPH.

La medida de antioxidantes por el método TEAC no dio lugar a ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los 10 crackers (Fig. 8). Ni siquiera se observa contraste entre la muestra control y el resto de formulaciones; todas las muestras forman parte de un mismo grupo estadísticamente homogéneo.

Tabla ANOVA para TEAC por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,000170129	9	0,0000189033	0,29	0,9710
Intra grupos	0,00193039	30	0,0000643463		
Total (Corr.)	0,00210052	39			

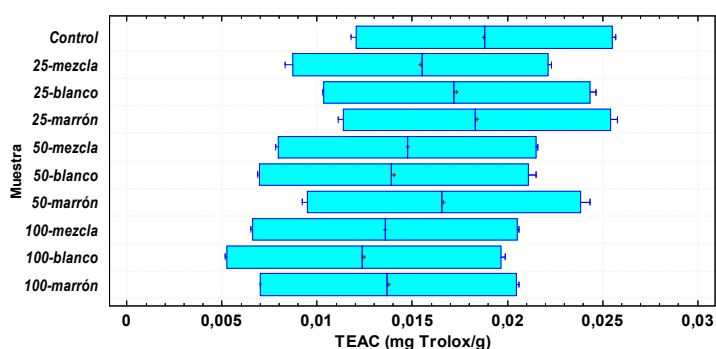


Fig. 8: tabla ANOVA y gráfico de la dispersión de respuesta y simetría para TEAC.

Con el estudio de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se observaron valores más altos de dicha capacidad en los productos en cuya composición está presente el teff blanco (Fig. 9). De igual modo, la muestra sin teff tiene el valor más

bajo de todo el análisis. De hecho, la capacidad antioxidante aumentó con el contenido en teff hasta que se sustituyó totalmente la harina de arroz (100% teff). A bajas concentraciones de teff (25%), se observó una mayor capacidad antioxidante al utilizar ambas variedades mezcladas, pero a mayores concentraciones de teff, la capacidad antioxidante más elevada se obtenía, claramente, con la variedad blanca frente a la mezcla (valor intermedio) y la variedad marrón (valor inferior). De este modo, el cracker con un 50% de teff blanco mostró una capacidad antioxidante similar al cracker con 100% de teff marrón.

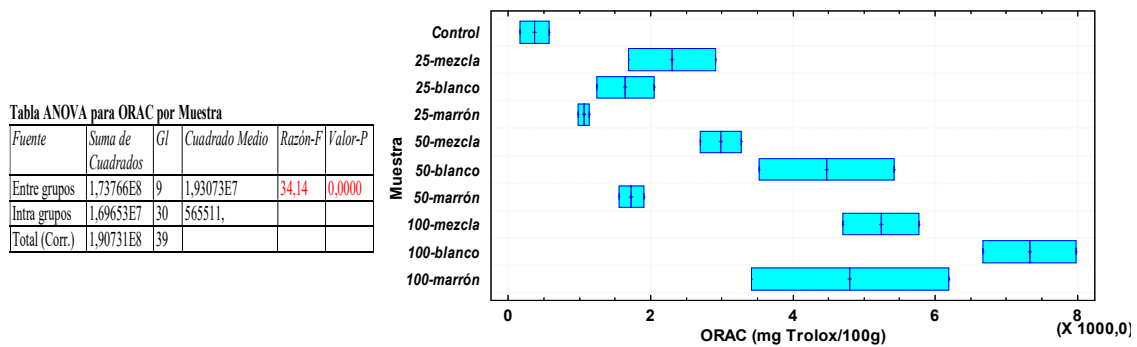


Fig. 9: tabla ANOVA y gráfico de la dispersión de respuesta y simetría para ORAC.

Los valores de reducción del radical DPPH por los antioxidantes de la muestra según el método de análisis directo reflejan diferencias significativas entre las galletas (Fig. 10). A pesar de que los resultados del DPPH-Q mostraron que la harina de teff marrón tiene superior capacidad antioxidante que la blanca, no se observó tal correlación en los datos obtenidos para los distintos crackers sobre todos niveles de porcentaje de teff salvo para las formulaciones con un 50%.

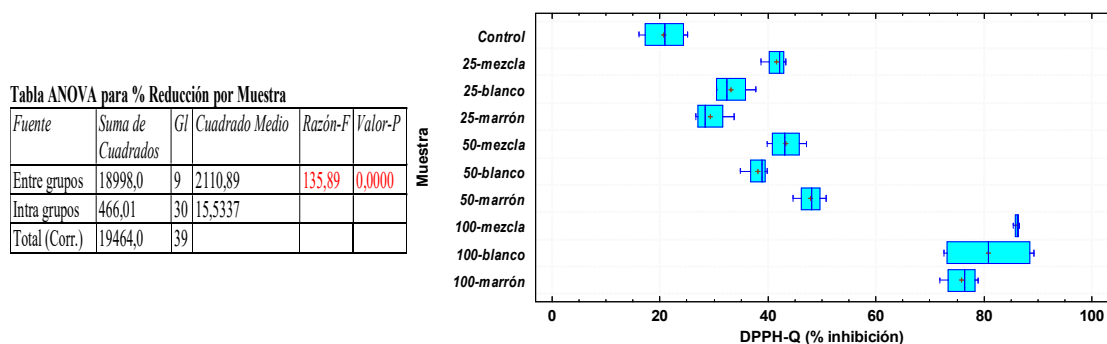


Fig. 10: tabla ANOVA y gráfico de la dispersión de respuesta y simetría para DPPH-Q.



Los datos obtenidos a partir del método TEAC-Q expresan una ligera diferencia significativa entre los crackers (Fig. 11). Únicamente, se pueden establecer 2 grupos homogéneos a partir de la LSD de Fisher que incluye, un grupo con la muestra que presenta 25% de teff blanco y otro con el resto. La muestra control no se destaca de las demás respecto a su capacidad antioxidante.

Tabla ANOVA para TEAC-Q por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0695722	9	0,00773025	2,89	0,0149
Intra grupos	0,0747701	28	0,00267036		
Total (Corr.)	0,144342	37			

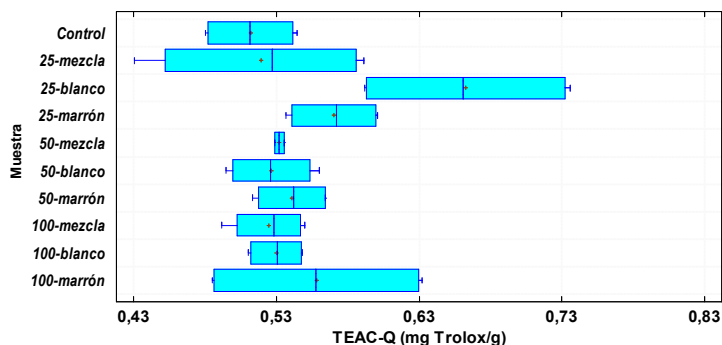


Fig. 11: tabla ANOVA y gráfico de la dispersión de respuesta y simetría para TEAC-Q.

A partir de los resultados expuestos en los análisis de Fenoles Totales, ORAC, DPPH y DPPH-Q se aprecia una relación proporcional en cuanto al contenido de antioxidantes y el porcentaje de teff total que tienen los productos de tal manera que, a medida que aumenta ese porcentaje, la capacidad antioxidante es más elevada. Esto se hace más evidente para el contenido fenólico total donde se obtienen datos menos dispersos.

Por el contrario, en los análisis TEAC y TEAC-Q no se puede establecer ningún tipo de dependencia entre los parámetros mencionados, lo que parece que esté relacionado con incompatibilidades en la reacción química entre la matriz alimentaria y el radical utilizado en estos métodos.

El contenido en polifenoles totales que presentan las muestras con un 100% de teff se comparó con los compuestos fenólicos solubles del *injera* extraídos en Shumoy *et al.*, 2017. Se aprecian valores más altos en el pan *injera* que en las galletas, siendo el rango de diferencia entre ellos de 30 a 55 mg equivalentes de ácido gálico por cada 100g de muestra en la variedad blanca y marrón, respectivamente. Esto confirma la existencia de una gran diversidad en el contenido de polifenoles de los granos de teff (Zhu, 2018).

A su vez, se han contrastado los resultados de reducción frente a DPPH obtenidos en las galletas con los de otro cracker sin gluten elaborado a partir de harina de arroz integral y pulpa de manzana (Mir, Bosco, Shah, Santhalakshmy, y Mir, 2017). La

capacidad antioxidante de todas las galletas que contienen teff (incluyendo aquellas con menor porcentaje de inhibición del radical DPPH) se sitúa por encima de la capacidad para las galletas con mayor concentración de pulpa de manzana, lo que remarca la posibilidad de hacer una galleta de este tipo, rica en antioxidantes y compuesta por cereales sin necesidad de recurrir a otras materias primas.

Por otra parte, la determinación de fenoles totales y los datos de ORAC reflejan una actividad antioxidante más alta para las formulaciones con teff blanco respecto a las de teff marrón, lo que muestra controversia con el estudio de antioxidantes sobre *injera* de Shumoy *et al.*, 2017.

Además, en tres de los métodos que exponen diferencias significativas relevantes (TP, ORAC y DPPH), se hicieron comparaciones con la muestra compuesta por 100% de teff blanco y la harina sin cocer de la misma variedad. Con ello, se evidencia que, inicialmente, la harina tiene niveles superiores de antioxidantes, lo que hace pensar que la interacción con otros componentes de la fórmula o la cocción influyen sobre el contenido final de compuestos fenólicos. Para evitarlo, se sugiere profundizar más en la investigación sobre las interferencias bioquímicas de los componentes de las galletas sin gluten a partir de teff, así como en la optimización de las condiciones de horneado. También, sería necesario buscar tratamientos de procesado de la harina o el grano para preservar o incluso, incrementar el potencial antioxidante de la materia prima de partida tal y como se muestra en otros casos (Acosta-Estrada, Gutierrez-Uribe y Serna-Saldivar, 2014).

No se observaron sinergias o efectos sumativos con relación antioxidante entre las dos variedades de teff. En ninguno de los métodos analizados, las muestras que contenían mezcla de teff blanco y marrón tuvieron valores de antioxidantes considerablemente superiores a las formulaciones con alguna de las dos variedades por separado.

La luminosidad se ve reducida a medida que aumenta la cantidad de teff añadido en las formulaciones. La disminución de este parámetro es muy evidente cuando se comparan las muestras que contienen teff con la muestra control; entre la luminosidad del control y la luminosidad más próxima (muestra con un 50% de teff), hay un salto pronunciado de 26 unidades. Este incremento no es tan elevado entre muestras que presentan 50% y 100% de teff, con un rango de 4 a 8 unidades entre ellas. Las reducciones en luminosidad debido a la incorporación de teff en las formulaciones han sido observadas también en otras investigaciones en las que se desarrollaban panes de trigo con distintos porcentajes de teff (Alaunyte *et al.*, 2012; Ronda *et al.*, 2015). Este

oscurecimiento del color de los productos tiene relación con el carácter integral de la harina de teff que hace que incorpore las partículas de salvado que lo causan (Alaunyte *et al.*, 2012).

Por otra parte, el tono (h) de las muestras cambia desde más amarillo para la galleta control elaborada sólo con harina de arroz (77,61°), a más rojizo para la galleta compuesta por un 100% de teff marrón (45,5°). Aunque la galleta con 100% de teff blanco también reduce su valor de h, se encuentra más cerca de tonalidades amarillas que la compuesta por teff marrón. Esto es debido a la presencia de determinados pigmentos en la piel de esta última variedad (marrón) que otorgan, precisamente, ese color al grano. Observaciones similares respecto a la tonalidad se han destacado por otros investigadores (Ben-Fayed, Ainsworth, y Stojceska, 2008; Ronda *et al.*, 2015). En cuanto a la saturación, los valores más altos corresponden a la galleta control (26,44) y va disminuyendo con el aumento de teff total. La reducción en la viveza del color es más notable para la variedad marrón (11,95) que para la blanca (19,3).

#### 4.2.4 Análisis sensorial

Para la evaluación sensorial se escogieron las muestras que presentaban una mayor actividad antioxidante, es decir, las correspondientes con las formulaciones de 50% mezcla de teff, 50% teff blanco, 100% Mezcla de teff, 100% teff blanco y 100% teff marrón. Además, se añadió la muestra control como referencia para ayudar a comparar los distintos resultados.

Se llevó a cabo una Prueba de Ordenamiento o Ranking según la cual, las muestras se van disponiendo en orden de intensidad para cada uno de los atributos estudiados. Los datos se analizaron mediante la Prueba de Kramer utilizando la tabla de rangos del ANEXO II.

Se observaron diferencias entre las muestras con un nivel de significación del 5% para el atributo de textura "crujencia", siendo la galleta más crujiente la que contenía un 50% de teff blanco y, las menos crujientes, las de 100% de teff blanco y 100% marrón. Por el contrario, las muestras no presentan diferencias significativas para la masticabilidad. En cuanto al sabor, la muestra control obtuvo los valores más bajos tanto en intensidad inicial como el regusto final. El cracker compuesto por 100% de teff marrón aparece como el más intenso en sabor inicial y la muestra con 100% de mezcla de las dos variedades es la que tiene mayor sabor residual.

La prueba de preferencia por ordenamiento refleja la aceptabilidad global de las muestras (Fig. 12). La galleta menos aceptada es la que tiene un 100% con mezcla de harinas de teff y, la más aceptada, la galleta en cuya formulación se encuentra teff blanco en un 50%.

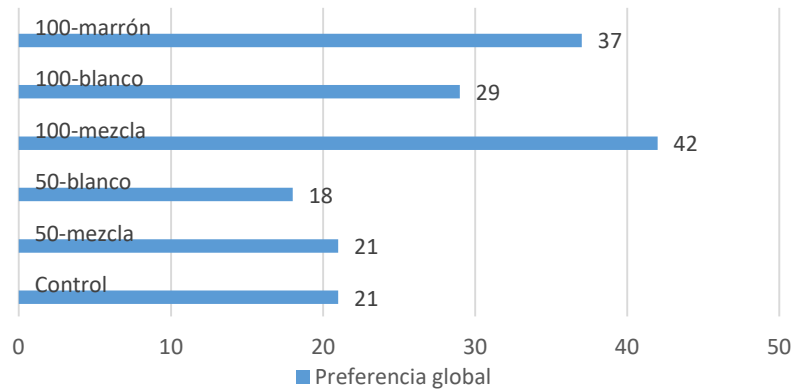


Fig. 12. Preferencia de las muestras por ordenamiento.

Al igual que en otras investigaciones, los productos con 100% de harina de teff son los menos aceptados sensorialmente (Coleman, Abaye, Barbeau, y Thomason, 2013).

Por otra parte, algunos de los catadores definieron el regusto de las muestras con mayor persistencia de sabor residual como “amargo”, lo que puede deberse al elevado contenido en polifenoles que tienen las muestras con teff respecto a la de arroz. Ciertos estudios, correlacionan los compuestos fenólicos del salvado que contiene la harina integral de teff con la percepción del retrogusto amargo (Alaunyte *et al.*, 2012).

## 5. Conclusiones

En términos generales y, a partir de los análisis llevados a cabo, se demostró que el incremento del porcentaje de harinas de teff en la formulación de los productos desarrollados aumentó considerablemente su capacidad antioxidante. En definitiva, la concentración de teff total que contienen las galletas tiene un efecto lineal significativo ( $P < 0,05$ ) sobre la actividad antioxidante, generado de manera conjunta por las variedades blanca y marrón. Entre ellas, además, se pudo observar que la harina que proporciona mayor capacidad antioxidante se corresponde con la de teff blanco.

Sin embargo, el contenido de polifenoles de las harinas de este cereal se podría ver afectado por la zona geográfica de procedencia de sus granos y las diferentes condiciones de cultivo a las que haya sido sometida la planta.

Por otro lado, el aumento de la cantidad de teff también dio lugar a un contenido proteico más elevado en el producto, mejorando con ello su composición nutricional. La harina que más contribuyó en ese efecto fue la harina de teff marrón.

Valorando las propiedades físico-químicas del color se pudo apreciar un cambio decreciente de la luminosidad al incorporar harinas de teff en las muestras. La harina de la variedad marrón por su parte, aportó más tonalidades rojizas a los crackers y en mayor medida que la variedad blanca.

En relación a la evaluación sensorial de los crackers, la muestra en cuya formulación formaba parte la harina de teff blanco al 50% obtuvo mejor aceptabilidad global. Esta muestra presentaba mayor crujencia que el resto de las analizadas y una intensidad de sabor inicial y regusto intermedios.

Todo ello demostró que la harina de teff se puede utilizar junto con la harina de arroz para desarrollar galletas crackers sin gluten sensorialmente aceptables, con características nutricionales beneficiosas y con propiedades antioxidantes. Como proyección futura de la investigación, sería interesante investigar la disponibilidad *in vitro* de los compuestos con potencial antioxidante procedentes del grano de teff que contienen estos productos para determinar su asimilación y los efectos en la salud que pueden generar.

## 6. Agradecimientos

A los directores y supervisores de este proyecto Daniel y Ana, sin los cuales no hubiera podido llevar a cabo el trabajo. Especialmente, a todas las compañeras y compañeros de la Planta de Productos y Procesos Alimentarios Innovadores del Itacyl, por su gran ayuda y consejos recibidos.

También quiero agradecer a Salutef por su colaboración a la hora de aportar las harinas de teff necesarias para la elaboración de este trabajo.

A mi familia y amigas, por el apoyo y el ánimo constante. Y a mi pareja, por estar a mi lado y prestarme esa paciencia en momentos difíciles.

A todos ellos, muchas gracias.

Daniel Rico y Ana Belén Martín-Diana agradecen el Proyecto NUGAFU, PEP 2011-769, financiado por la Consejería de Agricultura y Ganadería de Castilla y León.

Felicidad Ronda agradece el proyecto AGL2015-63849-C2-2-R financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y los Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (MINECO /FEDER) y el proyecto de la Junta de Castilla y León/FEDER de Ref: VA072P17.

## 7. Referencias bibliográficas

- Abebe, W., Collar, C. y Ronda, F., 2015. Impact of variety type and particle size distribution on starch enzymatic hydrolysis and functional properties of teff flours. *Carbohydrate Polymers*, 115, 260–268.
- Acosta-Estrada, B., Gutierrez-Urbe, J. y Serna-Saldivar, S.O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Alaunyte, I., Stojceska, V., Plunkett, A., Ainsworth, P. y Derbyshire, E. (2012). Improving the quality of nutrient-rich Teff (*Eragrostis tef*) breads by combination of enzymes in straight dough and sourdough breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 55, 22–30.
- André, C., Castanheira, I., Cruz, J.M., Paseiro, P. y Sanches-silva, A. (2010). Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 229-246.
- Ben-Fayed, E., Ainsworth, P., y Stojceska, V. (2008). The incorporation of Teff (*Eragrostis tef*) in bread-making technology. *Cereal Foods World*, 53, A84.
- Bultosa, G., y Taylor, J. R. N. (2003). Chemical and physical characterisation of grain teff (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) starch granule composition. *Starch/Stärke*, 56, 304–312.
- Bultosa, G. (2016). Teff: Overview. En C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, y J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of food grains* (2nd ed., pp. 209–220). Oxford: Elsevier.
- Cheng, A. (2018). Review: Shaping a sustainable food future by rediscovering long-forgotten ancient grains. *Plant Science*, 269, 136–142.
- Chujo, A., Yuan, H., Zou, D., Pang, Y. y Li, X. (2015). Biomethane production and physicochemical characterization of anaerobically digested teff (*Eragrostis tef*) straw pretreated by sodium hydroxide. *Bioresource Technology*, 181, 214–219.
- Coleman, J., Abaye, A. O., Barbeau, W., y Thomason, W. (2013). The suitability of teff flour in bread, layer cakes, cookies and biscuits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 877–881.
- Collar, C. (2007). Cereales antiguos. En A. E. León y C. Rosell (Eds.), *De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. (1a ed., pp.295-317). ISEKI-Food.

- Forsido, S. F., Rupasinghe, H. P. V., y Astatkie, T. (2013). Antioxidant capacity, total phenolics and nutritional content in selected Ethiopian staple food ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 915–920.
- Gebremariam, M. M., Zarnkow, M. y Becker, T. (2014). Teff (*Eragrostis tef*) as a raw material for malting, brewing and manufacturing of gluten-free foods and beverages: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2881–2895.
- Gökmen, V., Serpen, A. y Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the “QUENCHER” approach. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 278–288.
- Hofmanová, T., Hrušková, M., y Švec, I. (2014). Evaluation of wheat/non-traditional flour composites. *Czech Journal of Food Sciences*, 32, 288–295.
- Ketema, S. (1997). Tef. *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 12. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, (IPGRI) Rome Italy.
- Kotásková, E., Sumczynski, D., Miček, J. y Valášek, P. (2016). Determination of free and bound phenolics using HPLC-DAD, antioxidant activity and in vitro digestibility of *Eragrostis tef*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 46, 15–21.
- Mancebo, C. M., Picón, J. y Gómez, M. (2015). Effect of flour properties on the quality characteristics of gluten free sugar-snap cookies. *LWT-Food. Science and Technology*, 64, 264–269.
- Martinelli, F., Cannarozzi, G., Balan, B., Siegrist, F., Weichert, A., Blösch, R. *et al.* (2018). Identification of miRNAs linked with the drought response of tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Journal of Plant Physiology*, 224–225, 163–172.
- Mir, S. A., Bosco, S. J. D., Shah, M. A., Santhalakshmy, S. y Mir, M. M. (2017). Effect of apple pomace on quality characteristics of brown rice based cracker. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16, 25–32.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. y Prior, R.L. (2001). Development and Validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Ronda, F., Abebe, W., Pérez-Quirce, S. y Collar, C. (2015). Suitability of tef varieties in mixed wheat flour bread matrices: A physico-chemical and nutritional approach. *Journal of Cereal Science*, 64, 139–146.
- Rosell, C. M., Barro, F., Sousa, C., y Mena, M. C. (2014). Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. *Journal of Cereal Science*, 59, 354–364.

- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V. y Gökmen, V. (2007). A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55, 7676-7681.
- Saturni, L., Ferretti, G., Bacchetti, T. (2010). The gluten-free diet: safety and nutritional quality. *Nutrients*, 2, 16-34.
- Serpen, A., Gökmen, V. y Fogliano, V. (2012). Solvent effects on total antioxidant capacity of food measured by direct QUENCHER procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 10-16.
- Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N. y Fogliano, V. (2008). Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *Journal of Cereal Science*, 48, 816-820.
- Shumoy, H., Gabaza, M., Vandeveld, J., y Raes, K. (2017). Soluble and bound phenolic contents and antioxidant capacity of tef *injera* as affected by traditional fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 52–59.
- Shumoy, H. y Raes, K. (2016). Antioxidant potentials and phenolic composition of tef varieties: An indigenous Ethiopian cereal. *Cereal Chemistry*, 93, 465–470.
- Tadesse, B., Teju, E. y Megersa, N. (2015). The Teff straw: A novel low-cost adsorbent for quantitative removal of Cr(VI) from contaminated aqueous samples. *Desalination and Water Treatment*, 56, 2925–2936.
- Torres, M.D., Arufe, S., Chenlo, F. y Moreira, R. (2017). Coeliacs cannot live by gluten-free bread alone-every once in awhile they need antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 52, 81–90.
- Umata, M., Faulks, R.M. (1989). Lactic acid and volatile (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) fatty acid production in the fermentation and baking of tef (*Eragrostis tef*). *Journal of Cereal Science*, 9, 91–95.
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M. y Polzonetti, V. (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition*, 35, 1236-1241.
- Zhu, F. (2018). Chemical composition and food uses of teff (*Eragrostis tef*). *Food Chemistry*, 239, 402–415.



## 8. ANEXOS

### ANEXO I: Hoja de respuestas para el análisis sensorial.

#### Prueba de Ordenamiento

Nombre:

Fecha:

A continuación, se presentan 6 muestras codificadas para su evaluación sensorial de textura y sabor. Utilizando los espacios en blanco bajo cada uno de los atributos, escriba el código de la primera muestra en el centro, y vaya colocando el resto de códigos a medida que vaya probando las muestras, de manera que queden ordenados según la característica solicitada. No se preocupe si tiene que tachar o corregir. Finalmente, deben quedar seis códigos por atributo ordenados de izquierda a derecha.

**Pruebe** las muestras de una en una, tomando un sorbo de agua entre muestras, fijándose en la **textura** (crujencia y masticabilidad)

- 1) Crujencia (**de menor a mayor**)
  
- 2) Masticabilidad: energía necesaria para procesar el alimento en la boca antes de tragarlo (**de menor a mayor**)

**Vuelva a probar** las muestras de una en una, tomando un sorbo de agua entre muestras, fijándose en la intensidad y permanencia del **sabor**.

- 3) Intensidad de sabor inicial (**de menor a mayor**)
  
- 4) Persistencia de sabor residual (regusto) una vez tragado (**de menor a mayor**)

Finalmente, evalúe su preferencia global por los productos

- 5) Preferencia por el producto

- MENOS 

--	--	--	--	--	--

 + MÁS

**ANEXO II: Tabla de Kramer utilizada para la interpretación de los datos del análisis sensorial.**

**Tabla 7** Tabla de los rangos (Kramer 1963). Ranking requerido para establecer significación al 5 % ( $p \leq 0.05$ ).

Número de tratamientos o productos									
Número de repeticiones	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2				- 3-9	- 3-11	- 3-13	- 4-14	- 4-16	- 4-18
3	- -	- 4-8	- 4-11	4-14 5-13	4-17 6-15	4-20 6-18	4-23 7-20	5-25 8-22	5-28 8-25
4	- -	5-11 5-11	5-15 6-14	6-18 7-17	6-22 8-20	7-25 9-23	7-29 10-26	8-32 11-29	8-36 13-31
5	- 6-9	6-14 7-13	7-18 8-17	8-22 10-20	9-26 11-24	9-31 13-27	10-35 14-31	11-39 15-35	12-43 17-38
6	7-11 7-11	8-16 9-15	9-21 11-19	10-26 12-24	11-31 14-28	12-36 16-32	13-41 18-36	14-46 20-40	15-51 21-45
7	8-13 8-13	10-18 10-18	11-24 13-22	12-30 15-27	14-35 17-32	15-41 19-37	17-46 22-41	18-52 24-46	19-58 26-51
8	9-15 10-14	11-21 12-20	13-27 15-25	15-33 17-31	17-39 20-36	18-46 23-41	20-52 25-47	22-58 28-52	24-64 31-57
9	11-16 11-16	13-23 14-22	15-30 17-28	17-37 20-34	19-44 23-40	22-50 26-46	24-57 29-52	26-64 32-58	28-71 35-64
10	12-18 12-18	15-25 16-24	17-33 19-31	20-40 23-37	22-48 26-44	25-55 30-50	27-63 34-56	30-70 37-63	32-78 40-70
11	13-20 14-19	16-28 18-26	19-36 21-34	22-44 25-41	25-52 29-48	28-60 33-55	31-68 37-62	34-76 41-69	36-85 45-76
12	15-21 15-21	18-30 19-29	21-39 24-36	25-47 28-44	28-56 32-52	31-65 37-59	34-74 41-67	38-82 45-75	41-91 50-82