

Rodríguez de Marco, Melisa Estefanía

Elaboración de panes reducidos en sodio

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Magister en Tecnología de los Alimentos**

Directora: Steffolani, María Eugenia

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.





Universidad Católica de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas

ELABORACIÓN DE PANES REDUCIDOS EN SODIO

Maestría en Tecnología de los Alimentos

Estefanía Rodríguez De Marco

Córdoba, 2016

Director del trabajo final

Dra. María Eugenia Steffolani, Facultad de Ciencias
Agropecuarias, UNC.

Comisión de trabajo final

AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. María Eugenia Steffolani* por su dirección y constante apoyo, por transmitirme sus conocimientos y colaborar en mi formación.

A los integrantes de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, por su buena predisposición para participar de los análisis sensoriales. Un agradecimiento especial a *Soledad*, por su compañía y valiosa amistad.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, por haberme brindado un lugar de trabajo para el desarrollo de este estudio.

A mis amigas, *Micaela* y *Noé*, por estar presentes en cada momento de mi vida.

A mis hermanos, por su paciencia y compañía.

A mis padres, por haberme permitido el inicio de esta carrera y acompañado hasta lograr la meta. Por sus ayudas constantes y su apoyo incondicional.

Mi más infinito agradecimiento para *Renato*, mi novio y futuro esposo, compañero, consejero y amigo. Por su paciencia, apoyo y ayudas incondicionales.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-------------|
| LISTADO DE ABREVIATURAS | IX |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XI |
| ÍNDICE DE TABLAS | XIII |
| RESUMEN | XV |
| SUMMARY | XVII |
| 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1. CONSUMO DE SODIO: Efectos de los efectos benéficos y perjudiciales para la salud | 4 |
| 1.2. EL PAN | 7 |
| 1.3. HARINA DE TRIGO: Ingredientes principales en la elaboración del pan | 9 |
| 1.3.1. Proteínas | 11 |
| 1.3.2. Hidratos de Carbono: Almidón | 17 |
| 1.4. FENÓMENOS QUE OCURREN DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PAN | 20 |
| 1.5. EFECTO DEL CLORURO DE SODIO EN EL PAN | 23 |
| 1.6. EFECTO DEL CLORURO DE SODIO EN LA MASA PANARIA | 24 |
| 1.7. ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL CLORURO DE SODIO EN EL PAN | 26 |
| 2. OBJETIVO | 29 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 30 |
| 2.2. OBJETIVO ESPPECÍFICOS | 30 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 3.1. CARCTERIZACIÓN DE LA HARINA | 32 |
| 3.2. CALIDAD TECNOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LA HARINA DE TRIGO CON AGREGADO DE SAL | 33 |
| 3.2.1. Ensayos de predicción de la calidad tecnológica de la harina con agregado de sal | 33 |
| 3.2.1.1. Índice de Sedimentación en SDS (IS-SDS) | 33 |
| 3.2.1.2. Capacidad de Retención de Solventes (SRC) | 34 |
| 3.2.1.3. Índice de Retención de Agua Alcalina (IRAA) | 35 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.2. | Efecto de la sal sobre las interacciones que se producen entre los componentes de la harina | 35 |
| 3.2.2.1. | Obtención del macropolímero de gluteninas..... | 36 |
| 3.2.2.2. | Extracción secuencial de las proteínas de la masa | 36 |
| 3.3. | EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS Y TÉRMICAS DE MASAS PANARIAS CON DISTINTOS PORCENTAJES DE SAL | 37 |
| 3.3.1. | Ensayos de reología empírica | 37 |
| 3.3.1.1. | Ensayos farinográficos | 37 |
| 3.3.1.2. | Ensayos alveográficos..... | 38 |
| 3.3.2. | Ensayos de reología dinámica | 40 |
| 3.3.3. | Calorimetría diferencial de barrido | 41 |
| 3.4. | CALIDAD TECNOLÓGICA DEL PAN | 43 |
| 3.4.1. | Elaboración del pan | 43 |
| 3.4.2. | Volumen específico | 44 |
| 3.4.3. | Textura de la miga de pan | 45 |
| 3.4.4. | Microestructura de la miga | 45 |
| 3.4.5. | Color de la corteza | 46 |
| 3.5. | EVALUACIÓN SENSORIAL DEL PAN..... | 46 |
| 3.5.1. | Determinación del umbral de diferencia | 46 |
| 3.5.2. | Aceptabilidad del pan elaborado con mezclas de NaCl y KCl . | 50 |
| 3.6. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 51 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 52 |
| 4.1. | CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE TRIGO..... | 53 |
| 4.2. | CALIDAD TECNOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LA HARINA CON AGREGADO DE SALES..... | 53 |
| 4.3. | COMPORTAMIENTO REOLÓGICO Y TÉRMICO DE LAS MASAS PANARIAS CON DISTINTOS PORCENTAJES DE SALES | 61 |
| 4.4. | CALIDAD TECNOLÓGICA DEL PAN DE MOLDE | 72 |
| 4.5. | ANÁLISIS SENSORIAL DEL PAN | 79 |
| 4.5.1. | Umbral de diferencia de KCl en el pan | 79 |
| 4.5.2. | Aceptabilidad del pan elaborado con mezclas de NaCl y KCl . | 81 |
| 5. | CONCLUSIONES GENERALES | 83 |
| 6. | ANEXOS..... | 86 |

7. BIBLIOGRAFÍA 89

LISTADO DE ABREVIATURAS

2-AFC: Elección forzada entre dos alternativas.

ΔH_g : Entalpía de gelatinización.

ΔH_r : Entalpía de retrogradación.

ΔT_g : Rango de temperatura de gelatinización.

ACV: Accidentes cerebro-vasculares.

ASTM: American Society for Testing and Materials.

CAA: Código Alimentario Argentino.

CASH: Consensus Action on Salt and Health.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

E: Estabilidad de la masa

ECV: Enfermedades cardio-vasculares.

G' : Módulo de almacenamiento.

G'' : Módulo de pérdida.

GMP: Macropolímero de gluteninas.

HMW-GS: Gluteninas de alto peso molecular.

IRAA: Índice de retención en agua alcalina

IRAM: Instituto Argentino de Normalización y Certificación.

IS-SDS: Índice de sedimentación en SDS.

LMW-GS: Gluteninas de bajo peso molecular.

L: Extencibilidad.

Na^+ : Ion sodio.

NaCl: Cloruro de sodio.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P: Tenacidad.

P/L: Equilibrio.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

SRC: Capacidad de retención de solventes.

To: Temperatura de onset.

Te: Temperatura de endset.

Tp: Temperatura de pico.

TE: Tiempo de desarrollo de la masa.

VE: Volumen específico.

W: Fuerza panadera.

WASH: World Action on Salt and Health.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.3.1. Estructura del grano de trigo | 10 |
| Figura 1.3.2. Modelo estructural de las subunidades de gluteninas de alto peso molecular | 14 |
| Figura 1.3.3. Estructura del gluten | 16 |
| Figura 1.3.4. Regiones amorfas y cristalinas del almidón | 18 |
| Figura 1.3.5. Influencia del tratamiento hidrotérmico en las características físicas del almidón | 19 |
| Figura 1.4.1. Transformaciones estructurales de la masa durante el proceso de elaboración del pan | 21 |
| Figura 3.3.1.1 Farinograma | 38 |
| Figura 3.3.1.2 Alveograma | 39 |
| Figura 3.4.1 Proceso de elaboración del pan de molde | 44 |
| Figura 3.5.1. Preparación de las muestras para el análisis sensorial | 48 |
| Figura 3.5.2. Desarrollo de la prueba: Detección de umbral de diferencia de KCl en el pan | 49 |
| Figura 3.5.3. Desarrollo de la prueba: Aceptabilidad de pan con KCl | 50 |
| Figura 4.2.1 Macropolímero de glutenina y Fracciones proteicas de la harina con mezclas de sal | 57 |
| Figura 4.2.2. Macropolímero de gluteninas y Fracciones proteicas de la harina con NaCl y KCl | 60 |
| Figura 4.3.1. Comportamiento reológico de masas con reducción de NaCl | 65 |
| Figura 4.3.2. Comportamiento reológico de masas con mezclas de NaCl y KCl | 68 |
| Figura 4.4.1. Rodaja de la zona central de un pan elaborado con reducción de NaCl, escaneada | 73 |
| Figura 4.4.2. Análisis de imagen de la miga de los panes elaborados con reducción de NaCl | 74 |
| Figura 4.4.3. Evolución de la firmeza durante el almacenamiento de panes obtenidos por reducción de NaCl | 75 |
| Figura 4.4.4. Rodaja de la zona central de un pan elaborado por reemplazo de NaCl por KCl, escaneada | 77 |
| Figura 4.4.5. Análisis de imagen de la miga de los panes elaborados con reemplazo de NaCl por KCl | 78 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.4.6. Evolución de la firmeza durante el almacenamiento de panes obtenidos por reemplazo de NaCl por KCl | 78 |
| Figura 4.5.1. Umbral de diferencia de KCl en pan | 80 |
| Figura 4.5.2. Aceptabilidad de muestras de panes codificadas | 81 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1.3.1. Composición química del grano de trigo | 10 |
| Tabla 3.5.1. Cantidad de sal utilizada en la formulación del pan de molde | 48 |
| Tabla 4.1.1. Caracterización de la harina de trigo | 53 |
| Tabla 4.2.1. Índice de sedimentación en SDS e Índice de retención en agua alcalina de mezclas de harina con NaCl en cantidades decrecientes | 55 |
| Tabla 4.2.2. Capacidad de retención de solventes de la harina con distintas proporciones de sal | 56 |
| Tabla 4.2.3. Índice de sedimentación en SDS e Índice de retención en agua alcalina de mezclas de harina con NaCl y KCl | 59 |
| Tabla 4.2.4. Capacidad de retención de solventes de la harina con distintas proporciones de NaCl y KCl | 59 |
| Tabla 4.3.1. Efecto de la reducción de NaCl sobre los parámetros farinográficos | 62 |
| Tabla 4.3.2. Efecto de la reducción de NaCl sobre los parámetros alveográficos | 64 |
| Tabla 4.3.3. Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre los parámetros farinográficos | 66 |
| Tabla 4.3.4. Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre los parámetros alveográficos | 67 |
| Tabla 4.3.5. Efecto de la reducción de NaCl sobre la gelatinización del almidón..... | 69 |
| Tabla 4.3.6. Efecto de la reducción del NaCl sobre la retrogradación del almidón..... | 70 |
| Tabla 4.3.7. Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre la gelatinización del almidón | 71 |
| Tabla 4.3.8. Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre la retrogradación del almidón | 72 |
| Tabla 4.4.1. Efecto de la reducción de NaCl sobre la calidad del pan.... | 72 |
| Tabla 4.4.2. Color de la corteza de los panes elaborados con cantidades decrecientes de NaCl | 76 |
| Tabla 4.4.3. Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre la calidad del pan..... | 77 |

| | |
|---|-----------|
| Tabla 4.4.4. Color de la corteza de los panes elaborados con NaCl y KCl | 79 |
| Tabla 4.5.1. Análisis de la varianza de muestras codificadas..... | 82 |

RESUMEN

El consumo elevado de sodio representa un importante factor de riesgo de diversas enfermedades. Por tal motivo, se busca reducirlo en la formulación de aquellos alimentos de gran demanda por los consumidores, como es el pan. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la reducción de NaCl y el de su reemplazo por KCl sobre el desarrollo de masas panarias, y sobre la calidad tecnológica y sensorial del pan de molde. Se determinó el efecto de las sales sobre los componentes de la harina mediante ensayos de predicción (IS-SDS, IRAA, SRC) y sobre las interacciones proteicas en la masa (GMP y el perfil proteico). Se utilizaron técnicas de reología empírica y dinámica para evaluar las características viscoelásticas de las masas con NaCl y con mezclas de NaCl y KCl. Se elaboraron panes de molde con cantidades decrecientes de NaCl y con reemplazo parcial y total del NaCl por KCl; y se les determinó el volumen específico, la firmeza inicial, la velocidad de envejecimiento, la microestructura de la miga y el color de la corteza. Por último, se llevó a cabo un análisis sensorial de panes elaborados con KCl. La reducción del NaCl en la formulación de masas panarias resultó en una menor proporción del GMP obtenido y una menor solubilidad de proteínas. También se observó una disminución del tiempo de desarrollo, estabilidad, tenacidad y viscoelasticidad de las masas con menos NaCl. Estos resultados sugieren el desarrollo de una masa más débil y menos elástica. No se observaron diferencias en las características de la masa con mezcla parcial de NaCl y KCl, con respecto a la elaborada solo con NaCl. La masa elaborada solo con KCl mostró una tendencia similar a las observadas en la masa con bajo NaCl, sin embargo estas modificaciones no fueron lo suficientemente importantes como las observadas en la masa sin sal. La reducción del NaCl dio lugar a panes con menor volumen específico, mayor firmeza y mayor velocidad de envejecimiento. La miga presentó mayor cantidad de celdas de aire más pequeñas, y la corteza una menor coloración. Los panes con KCl mostraron una calidad similar a los elaborados con 2%NaCl, y mediante el análisis sensorial se determinó que

se puede reemplazar el 50% del NaCl por KCl sin afectar la aceptabilidad del consumidor.

Palabras clave: Pan de molde; Cloruro de sodio; Cloruro de Potasio.

SUMMARY

High sodium intakes represent an important risk factor for various diseases. Thus, it is necessary to reduce sodium content on those foods that are demanded by consumers, like bread. The aim was to evaluate the effect of the NaCl reduction and NaCl replacement by KCl on dough development and on technological and sensorial quality of bread. The effect of both salts on wheat components interaction was determined by prediction tests (IS-SDS, IRAA, SRC) and on protein interaction (GMP and protein profile). Viscoelastic properties of dough with NaCl and KCl were evaluated using empirical and dynamic rheology. Bread with decreasing amounts of NaCl and with partial and total replacement of NaCl by KCl were elaborated, and specific volume, initial firmness, staling rate, bread crumb structure and crust color were analyzed. Finally, sensorial analysis of bread with KCl was conducted. NaCl reduction in bread dough formulation resulted in a smaller proportion of GMP obtained and a lower protein solubility. A decrease on development time, stability, toughness and viscoelasticity of doughs with less NaCl in formulation was also observed. These results suggest the formation of weaker and less elastic dough. No differences in the characteristics of the dough with partial replacement of NaCl by KCl in comparison with dough with NaCl were observed. The properties of the dough made only with KCl were similar to those observed in the dough with low NaCl, but these changes were not sufficient enough as observed in the dough without salt. The reduction of NaCl resulted in breads with lower specific volume, high firmness and faster staling. The crumb had higher number of small air cells, and crust less coloration. KCl breads showed similar quality compared to 2% NaCl bread, and by sensorial analysis was determined that it is possible to replace 50% of NaCl by KCl without affecting consumer acceptability.

Key words: Bread; sodium chloride; potassium chloride.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El sodio (Na) es esencial para la salud humana, sin embargo diversos estudios han demostrado los efectos perjudiciales de la ingesta de un exceso de dicho mineral. Es de amplio conocimiento que un consumo elevado de sodio (ingerido como sal, cloruro de sodio -NaCl-) aumenta la presión arterial, representando un importante factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares y renales (1). A su vez, promueve el desarrollo de osteoporosis (2), hipertrofia ventricular derecha (3), obesidad (4) (5), cálculos renales (6) (7) (8), cáncer de estómago (9), y puede estar vinculado a la gravedad del asma (10).

Actualmente, el consumo promedio de sal excede en gran medida el valor recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que es de 5 g diarios por persona, llegando a duplicarlo o triplicarlo en la mayoría de los países. En Argentina, según datos del Ministerio de Salud de la Nación, el consumo de sal por persona por día es de aproximadamente 12-13 g, más del doble del sugerido por la OMS.

Entre las políticas públicas que los países están adoptando se destaca la de priorizar la promoción de la salud, no solo para prolongar la longitud de vida, sino para mejorar su calidad. Una forma efectiva de contribuir a la prevención de las enfermedades prevalentes es la promoción de estilos de vida saludable, incluyendo una alimentación adecuada. En este sentido, en todo el mundo se impulsan diversas iniciativas para aminorar el consumo de sal en la población, entre las que se cuentan: reglamentar la rotulación de la sal; realizar campañas de concientización destinadas a los consumidores; promulgar leyes nacionales y promover convenios con la industria alimentaria para disminuir el contenido de sal de una amplia gama de productos; entre otros.

El Reino Unido, en 1996, fue el primer país en lograr una reducción coherente, sistemática y continua de la sal agregada a casi todos los alimentos procesados, por medio del programa *Consensus Action on Salt and Health* (CASH; www.actiononsalt.org.uk). A través de este programa, se llegó a reducir un 30% la sal en algunos alimentos sin que se produzca rechazo por parte de los consumidores. Considerando el ejemplo del Reino Unido, y para promover que todos los países adapten políticas de

reducción de sodio, en 2005 se creó una ONG: *World Action on Salt and Health* (WASH; www.worldactiononsalt.com) que tiene por objetivo mejorar la salud de la población por medio de una reducción gradual del consumo de sal. Participan de dicho programa 95 países del mundo, dentro de los cuales se encuentra Argentina mediante el programa "Menos sal, más vida". Esta iniciativa, que se está llevado a cabo desde el año 2010, es coordinada por el Ministerio de Salud de la Nación, y participan organismos públicos y más de 60 empresas de la industria de alimentos y bebidas.

También a nivel local, el 13 de Noviembre de 2013 el Ministerio de Salud de la Nación sancionó la Ley 26.905 que tiene como objeto promover la reducción progresiva del consumo de sodio en la población. La Ley fija valores máximos de sodio que deberán contener ciertos grupos de alimentos, y los plazos de adecuación que tienen las empresas productoras desde que se puso en vigencia la ley. Esta norma obliga a productores e importadores a acreditar ante la autoridad sanitaria que están cumpliendo con las condiciones establecidas en la ley para poder comercializar y publicitar sus productos. De la misma forma, la ley establece sanciones a diversas infracciones en caso de incumplimiento. Además, la ley regula la fijación de advertencias en los envases en los cuales se comercializa la sal sobre los riesgos de su consumo excesivo y fija el tamaño máximo de dichos envases, el cual no debe superar los 500 mg; y también promueve la eliminación de los saleros en las mesas de los locales gastronómicos. Una forma efectiva de aminorar el consumo de sodio es disminuir su uso en los alimentos que representan un vehículo de altas cantidades sal, o en aquellos alimentos que tienen una gran demanda por parte de los consumidores, y el pan responde a estas dos características. El consumo de productos de panificación en nuestro país es uno de los más altos del mundo y se estima que se consumen más de 200 g de pan por día por persona, lo que significa que más del 25% del total de sodio ingerido por día proviene del pan. En este sentido, en colaboración con la Federación Argentina de la Industria del Pan y Afines y el Instituto Nacional de Tecnología Industrial, el Ministerio de Salud

elaboró una campaña destinada a los panaderos artesanales, quienes proveen el 98% del pan a nivel nacional. El objetivo de la campaña es alentar a los panaderos a reducir los niveles de sodio por barra de pan. Sin embargo, la sal cumple un rol importante en la calidad tecnológica y sensorial del pan. Los alimentos deben responder a las exigencias del consumidor, los cuales no solo reclaman adecuadas propiedades nutricionales sino que demandan alimentos de alta calidad, mínimamente procesados, libres de aditivos, seguros desde el punto de vista microbiológico y con buenas características sensoriales. *En este sentido, es fundamental generar conocimientos relacionados con el efecto de la sal en el proceso de obtención de panes para proponer alternativas que permitan disminuir el contenido de sal sin afectar la calidad tecnológica y sensorial del producto, y que responda a las exigencias de los consumidores.*

1.1. CONSUMO DE SODIO: Efectos benéficos y perjudiciales para la salud

En el contexto de nuestra historia evolutiva, la adición de grandes cantidades de sal (NaCl) en la dieta es un fenómeno reciente, de los últimos 5000 años. Se estima que en la dieta de la era paleolítica, el consumo de sal era de aproximadamente 1 a 1,5 g por día, suficiente para la supervivencia. Alrededor de 2000 años AC, el uso de la sal como conservante, principalmente en las carnes, fue uno de los factores más importantes que promovió la ingesta excesiva de sodio. El advenimiento de la refrigeración mecánica en el siglo XIX disminuyó la dependencia de la sal como conservante, reduciendo la ingesta media de sodio a los niveles actuales (11).

El sodio es esencial para la salud humana. La necesidad fisiológica es aproximadamente de 8-10 mmol (184-230 mg) de sodio al día, y los riñones excretan la mayor parte del sodio ingerido. Este ion, que se encuentra en mayor proporción en el líquido extracelular, cumple la función en el organismo de mantener el equilibrio y la distribución

adecuada del volumen de los líquidos intracelulares y extracelulares, así como también mantiene la concentración de sustancias dentro y fuera de las células (12). Por otro lado, el sodio genera una diferencia de potencial transmembranas que promueve la excitabilidad de células, como las que forman parte de los nervios y músculos, participando en el proceso de transmisión nerviosa y en la contracción muscular (12). Una adecuada ingesta de sodio es necesaria para el correcto desarrollo. Así se demostró en estudios realizados en ratas alimentadas con una baja proporción de sal, quienes mostraron una disminución ósea y muscular, necesitando una ingesta diaria de 300 mEq de Na⁺ para el correcto crecimiento de la grasa, huesos y tejido muscular (13). En otro estudio en el cual se restringió el consumo de sal en ratas en período de gestación se observó un aumento del número de crías nacidas muertas, un menor tamaño del cerebro, una menor cantidad de proteínas por unidad de tejido cerebral húmedo y una disminución del ARN total del cerebro (14). El sodio también interviene en varias reacciones metabólicas del organismo. Una importante restricción de sodio afecta negativamente el metabolismo de la glucosa y modifica la viscosidad normal de la sangre (15).

A pesar de ser un mineral esencial para el organismo, son raros los síntomas relacionados con la deficiencia de sodio debido a que está ampliamente distribuido en los alimentos. Por el contrario, diversos estudios han demostrado los efectos perjudiciales del consumo de un exceso de dicho mineral.

Los valores de presión arterial se ven influidos por el nivel de sodio en el organismo. Luis Dahl, en 1960, fue el primero en advertir el posible efecto del consumo elevado de sodio sobre la hipertensión, tras observar que, en un grupo de sociedades primitivas (Alaska Eskimo) donde se consumía habitualmente bajas cantidades de sal en la dieta (5 g por día o menos) la enfermedad no era común; sin embargo, en sociedades en las cuales el consumo de sal era alto (Japón, 10-15 g por día), los casos de hipertensión eran numerosos (16). Desde entonces se llevaron a cabo diversos estudios con modelos animales experimentales, de población de consumo restringido de sal, epidemiológicos, de intervención en la

población, ensayos clínicos controlados y meta-análisis; y todos apoyaron el concepto que el consumo de sal es el factor principal de aumento de la presión arterial en la población (1). La elevada presión arterial es responsable del 62% de los accidentes cerebrovasculares (ACV), tanto isquémicos como hemorrágicos, y del 46% de las enfermedades cardíacas coronarias (17) y, junto con el elevado colesterol y el hábito de fumar, son los responsables del 80% de enfermedades cardiovasculares (ECV), principal causa de muerte en el mundo. Además, el consumo de sodio ejerce un efecto independiente de la presión sanguínea sobre las ECV, ya que produce un aumento de la masa ventricular derecha (3) e izquierda (18) (19). También se observó que el exceso de sal en la dieta tiene un efecto directo sobre los ACV, independientemente de la presión arterial (20) (21) (22).

La sal es uno de los principales componentes de los alimentos que determina la excreción urinaria del calcio. Desde 1959, investigadores han demostrado que el elevado consumo de sal en adultos sanos aumenta los niveles de calcio en orina (6) (7) (8). Debido a que el calcio es el principal componente de la mayoría de las piedras urinarias (oxalato de calcio), el consumo de sodio es, de esta manera, una importante causa para la formación de cálculos renales. Además, el aumento del consumo de sodio disminuye la excreción urinaria de citrato, un factor que inhibe la cristalización del oxalato de calcio, siendo el efecto del sodio aumentar la posibilidad de cristalización de sales de calcio en la orina (23) (24). Por otro lado, cuando aumenta el nivel de sodio en el organismo se produce un balance negativo del contenido de calcio como resultado de su mayor excreción, lo que estimula la re-absorción de calcio intestinal y el movimiento de calcio desde los huesos, lo que aumenta el riesgo de padecer osteoporosis (2). Además de aumentar la excreción de calcio, el aumento de sodio incrementa la excreción urinaria de proteínas (albúminas), lo que significa un importante riesgo para el desarrollo de enfermedades renales y ECV (25).

El consumo de altas cantidades de sal ha sido relacionado también de forma indirecta con la obesidad: ya que promueve una elevada ingesta de

líquidos, de los cuales gran parte son gaseosas, y el alto consumo de gaseosas produce un incremento de la masa corporal (4) (5); con la severidad del asma (10); y con el cáncer de estómago (9). Estudios demostraron que la infección con la bacteria *Helicobacter pylori*, que ocasiona úlceras gástricas y duodenales, y cáncer de estómago, está asociado con el consumo de sodio (26).

Debido a los efectos perjudiciales que trae aparejado el consumo de grandes cantidades de sal, resulta de suma importancia su reducción en la dieta. Una forma efectiva, es disminuirla en aquellos alimentos de amplio consumo como es el pan.

1.2. EL PAN

El pan es un alimento de primera necesidad, se consume desde épocas remotas y forma parte de la dieta tradicional de la mayor parte de la población mundial. En 2010, el consumo anual *per cápita* en Argentina se estimó en 70,6 Kg para el pan tradicional de panadería y en 4,6 Kg para el pan industrial (pan de molde y bollería). Esto significa que el consumo promedio diario de pan supera los 200 gramos por habitante.

El término "pan" es utilizado para describir un amplio rango de productos con diferentes formas, tamaños, textura, corteza, color, aroma y sabor. El Código Alimentario Argentino (CAA) define al Pan como el "*producto obtenido por la cocción en hornos y a temperatura conveniente de una masa fermentada o no, hecha con harina y agua potable, con o sin el agregado de levadura, con o sin la adición de sal, con o sin la adición de otras substancias permitidas para esta clase de productos alimenticios*" (27). Sin embargo, muchos coinciden que la receta mínima para la elaboración del pan es harina, levadura, sal y agua. La **harina de trigo** es la más utilizada y es el componente estructural más importante, ya que es la responsable de formar una masa viscoelástica capaz de retener los gases producidos durante la fermentación y dar productos aireados luego de su cocción. Esta propiedad se debe a su composición química y en

especial a las proteínas y a su capacidad para formar gluten (28). La **levadura** es otro de los ingredientes fundamentales; su papel principal consiste en convertir los hidratos de carbono fermentables en dióxido de carbono y etanol. Los gases que se producen proporcionan la expansión de la masa que permite la obtención de/que resulta en una pieza de pan esponjosa. La levadura está definida en el capítulo XVI del CAA: "Correctivos y Coadyuvantes", en el artículo 1255: "*producto constituido a base de hongos microscópicos (Sacaromicetas). Pueden tener diferentes orígenes: obtenerse de la fabricación de cerveza, vino, sidra, etc, u obtenerse especialmente en establecimientos destinados a ese fin, donde se cultiva en mostos especiales. Puede presentarse en varias formas: prensada, seca, para panificación, etc.*" (27). El **agua** es un plastificante y disolvente, que promueve las propiedades de fluido viscoso y permite el desarrollo de muchas de las reacciones químicas y físicas que se llevan a cabo durante el proceso de elaboración del pan. Por último, la **sal** también está definida en el CAA, en el capítulo "Correctivos y Coadyuvantes", artículo 1264: "*Se entiende con el nombre de Sal, sin agregado alguno, el producto comercialmente puro o purificado, que químicamente se designa con el nombre de cloruro de sodio. Su origen podrá ser de fuentes naturales (Sal gema o Sal de roca), salinas, sal de evaporación, así como la proveniente de procesos adecuados de recuperación de las industrias que hayan sido autorizadas por la autoridad sanitaria nacional*" (27). Se suele utilizar en un 2% del peso de la harina y tiene dos funciones principales: impartir sabor al producto y modificar las propiedades reológicas de la masa, lo que impacta en las características del producto final.

Debido a que los componentes químicos encontrados en la harina juegan un rol esencial en las interacciones que se producen durante la formación de la masa y determinan las características del pan, se estudiarán en mayor detalle.

1.3. HARINA DE TRIGO: Ingrediente principal en la elaboración de pan

Trigo es un término que designa al conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, que pertenecen al género *Triticum*. Es uno de los cereales más cultivados globalmente, junto al maíz y al arroz, y el más consumido por el hombre en la civilización occidental desde la Antigüedad.

Existen muchos tipos de trigo, aunque comercialmente tres son los más importantes: el trigo de grano más duro (*Triticum turgidum* (L) Thell. conv. *durum*), que en nuestro país se denomina candeal y se utiliza principalmente para la elaboración de pastas; el trigo común o pan (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *aestivum*) es el más ampliamente cultivado y produce harinas de calidad superior para elaborar productos leudados como pan, galletitas tipo "crackers", masa para pizza, pan dulce y otros productos que requieren una masa muy elástica y extensible; y el trigo club (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *compactum* (Host)) posee granos blandos y con bajo contenido de proteínas por lo que produce harinas aptas para elaborar ciertos tipos de tortas y galletitas donde se necesita un gluten débil (29).

Los granos de trigo, como todos los cereales, están formados por tres partes principales: el salvado o parte externa, formado por numerosas capas ricas en vitaminas y minerales, con un alto contenido de proteínas; el germen o embrión, es una de las partes más ricas en vitaminas del grupo E y B, y contiene proteínas, grasas y minerales; y el endospermo, que es la parte más interna del grano, está formado principalmente por almidón, proteínas y, en menor medida, celulosa (**Figura 1.3.1**).

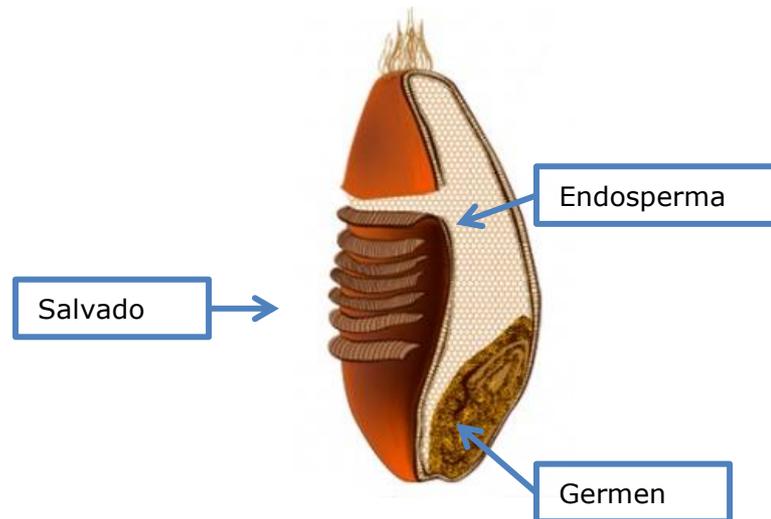


Figura 1.3.1 Estructura del grano de trigo

La composición del grano de trigo puede variar según la región, las condiciones de cultivo y el año de cosecha. La **Tabla 1.3.1** muestra los intervalos típicos de la composición química del grano de trigo (30).

Tabla 1.3.1 Composición química del grano de trigo

| Componentes | Proporción, g/100 g* |
|--------------------|-----------------------------|
| Agua | 8,0 - 18,0 |
| Proteínas | 7,0 - 18,0 |
| Lípidos | 1,5 - 2,0 |
| Almidón | 60,0 - 68,0 |
| Fibra Cruda | 2,0 - 2,5 |
| Cenizas | 1,5 - 2,0 |

*Valores mínimos y máximos de cada componente en porcentaje.

A través de las fases de molienda del grano de trigo se obtienen una serie de productos de características químicas diversas. El CAA las clasifica en: "cuatro ceros (0000), tres ceros (000), dos ceros (00), cero (0), medio cero (medio 0), Harinilla de primera y Harinilla segunda, a los productos que se obtienen de la molienda gradual y metódica del endosperma en cantidad de 70-80% del grano limpio" (27)

La composición en base seca de una harina es aproximadamente un 70% de almidón, 9-18% de proteínas, 2% de lípidos y 2,5% de polisacáridos no almidonosos.

1.3.1 Proteínas

Osborne, en 1907, clasificó a las proteínas de los cereales de acuerdo a su solubilidad, en cuatro tipos: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas; prolaminas, solubles en alcohol al 70%; y glutelinas, solubles en ácidos o bases diluidas (31). En el trigo se utilizan los términos gliadinas y gluteninas para definir a las prolaminas y glutelinas, respectivamente. Chen y Bushuk (1970) encontraron que sólo una parte de las gluteninas son solubles en ácido acético diluido, diferenciando dos fracciones proteicas: una soluble y una insoluble (32). El uso de detergentes y solventes orgánicos permitió una mejor separación y la insolubilidad de las proteínas se atribuyó al tamaño y al alto grado de polimerización de los agregados proteicos (33). Finney y Barmore (1948) observaron una correlación positiva entre el contenido de proteínas de la harina de trigo y el volumen de pan (34), sin embargo luego se determinó que el volumen de pan depende mayormente de la calidad de las proteínas más que de la cantidad en sí. En base a estos hechos, se utiliza más frecuentemente otra clasificación de las proteínas de la harina de trigo: proteínas que no forman gluten y proteínas formadoras de gluten.

Las *proteínas no formadoras de gluten*, entre las que se encuentran las albúminas y las globulinas, representan el 20-25% del contenido total de proteínas, son monoméricas, metabólicamente activas y estructurales, siendo la mayoría enzimas. Estas proteínas poseen un buen balance de aminoácidos, ya que contienen proporciones relativamente altas de lisina, triptofano y metionina; tres aminoácidos que se encuentran en baja proporción en la mayoría de los cereales.

Las *proteínas formadoras de gluten* son las gliadinas y las gluteninas, proteínas de almacenamiento en el grano de trigo, y conforman la mayor parte de las proteínas del gluten (75-80%). Las propiedades de la harina de trigo para formar una masa cohesiva que puede ser horneada para producir pan, son derivadas de estas proteínas. Cada una tiene características y funciones específicas.

Gliadinas

Las gliadinas son un grupo amplio de proteínas mayormente monoméricas, ricas en glutamina y prolina, con un bajo nivel de aminoácidos cargados. El peso molecular varía entre 30-80 kDa y se clasifican de acuerdo a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida a pH ácidos en: α -, β -, γ -, y ω -gliadinas (35). Las α - y β -gliadinas están formadas por 250-300 residuos de aminoácidos; poseen un dominio N-terminal repetitivo rico en residuos de prolina y glutamina, y representa entre 1/3 y 1/2 de la secuencia de la proteína; y un dominio C-terminal no repetitivo que posee residuos de cisteínas (36). Las ω -gliadinas están formadas por aproximadamente 350 residuos de aminoácidos y contienen repeticiones sucesivas de un octapéptido (Pro.Gln.Gln.Pro.Phe.Pro.Gln.Gln) y no presentan residuos de cisteína, por lo que están limitadas para formar interacciones covalentes en la masa (37). Las γ -gliadinas poseen ocho residuos de cisteínas que se encuentran localizados en el dominio C-terminal y forman cuatro enlaces disulfuro intramoleculares, por lo que no son capaces de formar nuevos enlaces covalentes con otras proteínas del gluten. Las α -gliadinas poseen seis residuos de cisteínas igualmente ubicados como en las γ -gliadinas y forman tres enlaces disulfuro intramolecularmente. Sin embargo, estos enlaces disulfuro son importantes para retener el plegamiento de la estructura de las gliadinas que determina la naturaleza de las interacciones no covalentes con la red de gluteninas (38).

Algunos investigadores proponen que son las responsables de la cohesividad de las masas (39), aunque otros sugieren que controlan el potencial de volumen de pan (40). Cuando se encuentran hidratadas tienen poca elasticidad y contribuyen principalmente a la viscosidad y extensibilidad de la masa (41).

Gluteninas

Las gluteninas son un grupo heterogéneo de proteínas poliméricas, formadas por agregados proteicos unidos por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes intermoleculares. Estos agregados presentan un peso

molecular que oscila entre 500 kDa a más de 10 millones (41). La composición de aminoácidos es similar a las gliadinas, con un alto porcentaje de glutaminas y prolinas, y bajo contenido de aminoácidos cargados (42). Por medio de agentes reductores que reducen los puentes disulfuros, se pueden diferenciar dos subunidades: las gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) y gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS). Payne y Corfield (1979) informaron que, de acuerdo a su movilidad en SDS-PAGE, las gluteninas están formadas por tres grupos de subunidades denominados A, B y C (43). El primer grupo con masa molecular entre 95.000-136.000 (HMW-GS); el segundo entre 42.000-51.000, y el último entre 31.500-35.500. Los grupos B y C corresponden a las gluteninas de baja masa molecular (LMW-GS). Posteriormente, Jackson y col., (1983) observaron que las LMW-GS pueden dividirse en tres grupos, por lo que adicionó un grupo más al que denominó grupo D (44).

Las HMW-GS presentan una masa molecular entre 95 a 136 kDa y constituyen no más del 10% del contenido total de proteínas, sin embargo juegan un rol determinante en la calidad de los productos panificados debido a que intervienen en la formación de polímeros de gluteninas (45). En base al comportamiento durante la polimerización, determinado por el número de sulfhidrilos, las HMW-GS se clasifican en dos subgrupos: subunidades tipo-X y tipo-Y. El dominio N-terminal de las subunidades tipo-X contienen cuatro residuos de cisteínas y el dominio N-terminal de las subunidades tipo-Y contienen cinco residuos de cisteínas. Además, las subunidades tipo-X tienen una menor movilidad electroforética que las subunidades tipo-y (37). Estudios basados en datos espectroscópicos realizados por Shewry et al. (2001) muestran a la subunidad de gluteninas de alto peso molecular como una molécula alargada que posee una estructura β -espiral en la región central repetitiva. Mientras que los dominios N- y C-terminal poseen una estructura de α -hélice desordenada (**Figura 1.3.2**). En los dominios terminales se encuentran la mayoría de los residuos cisteínas que proveen los sitios para la formación de puentes disulfuro intermoleculares (46).

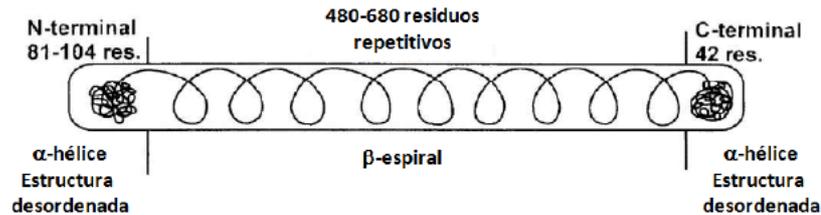


Figura 1.3.2 Modelo estructural de las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (46)

Las LMW-GS también están unidos por medio de uniones disulfuros inter- e intra- catenarias, que permiten su incorporación dentro de los polímeros de gluteninas (47). La mayoría de las LMW-GS contienen entre siete y ocho residuos de cisteínas, seis residuos están en una posición homóloga a las gliadinas, y por lo tanto forman puentes disulfuro intramoleculares. Los residuos de cisteínas adicionales no son capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares, probablemente por impedimento estérico, por lo que formarían puentes disulfuro intermoleculares generando agregados proteicos entre ellas y con HMW-GS (48) (49).

Aunque HMW-GS son el grupo principal de proteínas del gluten que determinan las características panaderas de la masa, LMW-GS también cumplen un importante rol. En general, LMW-GS se relacionan con la resistencia y la extensibilidad de la masa (50) (51) (52) e incluso algunas formas alélicas causan mayores efectos sobre las propiedades de la masa que las HMW-GS (53) (54) (55).

Parte de las gluteninas poliméricas pueden ser separadas como una capa de gel insoluble en SDS llamado **macropolímero de gluteninas (GMP)**. El GMP está compuesto por agregados proteicos de gran tamaño formados por gluteninas de alto y bajo peso molecular (HMW-GS y LMW-GS) (56). Weegels et al. estudiaron esta fracción en detalle, y presentaron firme evidencia de una alta correlación positiva entre la cantidad de GMP de la harina y el volumen de pan (57) (58). Pritchard sugirió que el módulo elástico (G') del gel de proteínas (GMP) puede ser utilizado como un indicador de la calidad de la harina (59). Cornec et al. (60) y Lefebvre et al. (61) mostraron una correlación positiva entre el tamaño de los

agregados insolubles de gluteninas y la elasticidad de la masa. El GMP producido a partir de la harina es diferente al obtenido a partir de la masa. Durante el amasado el contenido de GMP disminuye debido a una depolimerización del mismo. Luego, en el reposo se restablecen las interacciones y el GMP es re-polimerizado (59) (60).

Gluten

El gluten es definido como una red compleja de proteínas insolubles, gliadinas y gluteninas, que se obtiene a partir del amasado de la harina de trigo con agua y el posterior lavado de la masa con una solución salina para eliminar las proteínas solubles (gliadinas y globulinas) y el almidón.

Durante la formación de la masa, las interacciones de tipo covalentes y no covalentes entre los polipéptidos más grandes producen una matriz elástica y extensible. Los elementos estructurales responsables de esta propiedad particular son los enlaces disulfuro, interacciones iónicas e hidrofóbicas y secuencias ricas en glicina (62) (63).

La composición de aminoácidos de las proteínas del gluten muestra que aproximadamente la mitad de los constituyentes son glutamina y prolina, por lo que se supone que hay gran cantidad de enlaces puente hidrógeno en el sistema. Otro aporte importante son las interacciones hidrofóbicas, ya que aproximadamente el 35% de los aminoácidos posee cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica (64).

En la estructura del gluten (**Figura 1.3.3**) (46) las gluteninas de alto peso molecular forman la columna vertebral del polímero, estas HMW-GS se encuentran unidas entre sí a través de puentes disulfuro intermoleculares ubicados en los extremos. La columna vertebral de gluteninas de alto peso molecular sirve de base para que se unan a ella las subunidades de bajo peso molecular (LMW-GS) mediante puentes disulfuro formando puntos de ramificación. Las gliadinas interactúan principalmente con los polímeros de gluteninas mediante interacciones no covalentes.

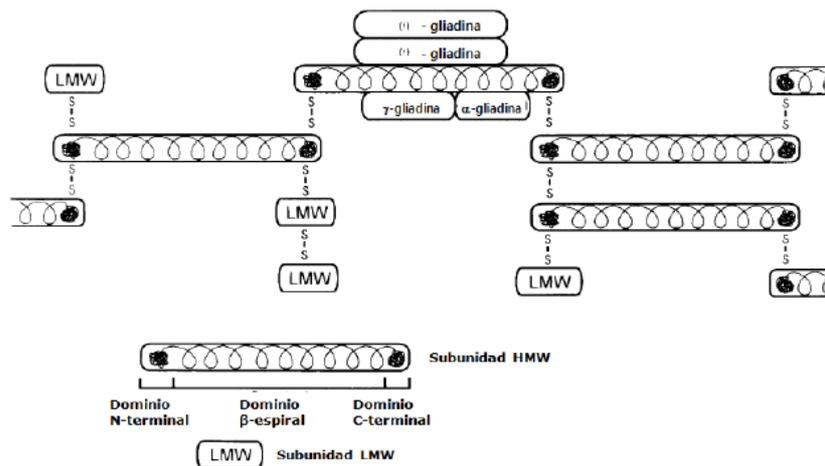


Figura 1.3.3 Estructura del gluten

En el dominio central de las HMW-GS ocurren fuertes interacciones puentes de hidrógeno probablemente entre las amidas de los residuos de glutamina. Estas interacciones son muy importantes porque contribuyen a la viscoelasticidad de la masa (65) (66) (67). Debido al gran tamaño que poseen, se ha sugerido que los polímeros de gluteninas forman la red continua que provee fuerza y elasticidad a la masa, mientras que los monómeros de gliadinas aportan plasticidad y viscosidad (67).

Shewry et al. (46) propusieron un modelo para explicar la elasticidad del gluten basado en una estructura de bucles y colas (*loop and trains*), regiones donde existen interacciones polímero-solvente y regiones con interacciones polímero-polímero, respectivamente. En este modelo las proteínas del gluten están estabilizadas por interacciones no covalentes entre moléculas paralelas. HMW-GS inicialmente presentan una conformación en forma de bucle (loop) que son estiradas durante la extensión del gluten para formar polímeros alineados en los cuales la formación de altas proporciones de estructuras β -sheet se encuentra favorecida. Por esta razón tales polímeros son altamente resistentes a la extensión. El estiramiento de los polímeros produce primero la deformación de los bucles (loops) y posteriormente de las colas (trains), a la vez que se rompen las interacciones no covalentes. Durante la extensión, los puentes disulfuro se rompen y se restablecen derivando en una red alineada en dirección a la extensión. Sin embargo, puede producirse la restauración del equilibrio de bucles y colas

espontáneamente, resultando en la relajación de la estructura del polímero.

Este modelo estructural fue extensamente relacionado con la viscoelasticidad del gluten y con la estabilidad de los polímeros (68) (69).

1.3.2. Hidratos de carbono: Almidón

El almidón es el hidrato de carbono mayoritario en el grano de trigo maduro, representando entre el 65 y el 70% de la harina de trigo. Químicamente, el almidón es una macromolécula compuesta esencialmente por dos fracciones de un α -D-glucanos: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero esencialmente lineal compuesto por 500-6000 unidades de glucosas, unidas por enlaces α -1,4 y con una pequeña cantidad de ramificaciones unidas por enlaces α -1,6. Presenta una estructura helicoidal, con un interior hidrofóbico conteniendo átomos de hidrógeno, lo que permite a la amilosa formar complejos clatratos con los constituyentes hidrofóbicos como son los lípidos, tanto ácidos grasos libres como ácidos grasos constituyentes de mono- y di- glicéridos; algunos alcoholes y yodo. Estos complejos que forma la amilosa con los lípidos y los emulsificantes como mono- y di- glicéridos altera las propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón. Por otro lado, la amilopectina es la molécula predominante en la mayoría de los almidones, es un polímero ramificado mucho más largo que la amilosa. Está compuesta por segmentos de cada 9 a 20 unidades de D-glucosa unidos por enlace α -1,4, conectados por enlaces α -1,6 a puntos de ramificación. Las diferencias estructurales entre estos dos polímeros contribuyen a las propiedades y funciones del almidón.

El almidón se acumula en gránulos que se forman dentro de los amiloplastos. Estos gránulos muestran una distribución bimodal: los más pequeños (Tipo B) son esféricos y presentan un diámetro inferior a 10 μm , mientras que los grandes (Tipo A) son lenticulares y tienen un diámetro cercano a 20 μm . El interior de los gránulos está formado por regiones alternadas cristalinas, correspondientes a regiones ordenadas de

cadena de amilopectina; y amorfas, compuestas por regiones ramificadas de la amilopectina y las cadenas de amilosa (**Figura 1.3.4**). Esto hace que se comporte como un polímero semicristalino o parcialmente cristalino y esta naturaleza semicristalina es la responsable de los cambios y transiciones de fase cuando se lo somete a procesos de calentamiento, procesos conocidos como gelatinización y retrogradación.

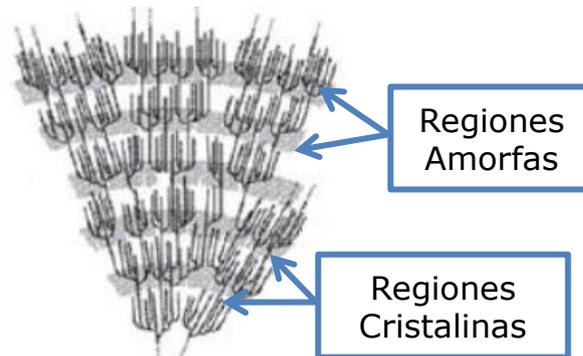


Figura 1.3.4 Regiones amorfas y cristalinas del almidón

La gelatinización es la destrucción irreversible del orden molecular de los gránulos de almidón (70). A temperatura ambiente y con suficiente cantidad de agua, el gránulo de almidón absorbe hasta un 50% de su peso en agua. Este es un proceso exotérmico y reversible. Sin embargo, cuando la suspensión de almidón es calentada por encima de cierta temperatura (llamada temperatura de gelatinización), se producen una serie de cambios que llevan a la destrucción irreversible del orden molecular del almidón. Estos cambios involucran: la hidratación del almidón con aumento de volumen de los gránulos, ruptura de la estructura del gránulo, absorción de calor y pérdida de la cristalinidad del gránulo (**Figura 1.3.5A**). Este proceso se produce durante la cocción del pan, debido a la combinación de calor y humedad.

Durante la gelatinización, una pequeña cantidad de almidón, principalmente amilosa, es liberada en la región intergranular lo que conduce a un aumento de la viscosidad (**Figura 1.3.5B**). Parte de la amilosa solubilizada forma complejos de inclusión con los lípidos polares de la harina de trigo. El calentamiento y la hidratación de las regiones amorfas del gránulo de almidón facilitan la movilidad molecular en esta

región e inician una transición molecular irreversible, que incluye la disociación de la doble hélice de amilopectina y la fusión de los cristales. Con el tiempo, las moléculas de almidón gelatinizado se reasocian en un estado más ordenado o cristalino, se produce un incremento en la rigidez de la matriz, y una separación del solvente del polímero (**Figura 1.3.5C**). Este fenómeno es conocido como retrogradación (70). Durante el enfriamiento, la amilosa solubilizada gelifica rápidamente, lo que implica la formación de dobles hélices en varios segmentos de las cadenas y la constitución de una red continua que rodea los gránulos de almidón hinchados y deformes (71). La recristalización de la amilopectina ocurre a una velocidad mucho menor que la de la amilosa, por lo que se cree que es uno de los fenómenos responsables del envejecimiento del pan durante el período de almacenamiento (72).

El almidón cumple distintas funciones en la elaboración de productos de panificación: actúa diluyendo el gluten y de este modo da consistencia a la masa; proporciona azúcares para la fermentación; aporta una superficie para que el gluten se adhiera fuertemente; y ayuda en la retención del gas formado. Además, disminuye el contenido de agua disponible durante la gelatinización, de este modo favorece la fijación de la película del gluten para que sea más rígido e impermeable al gas y evita el colapso de la masa durante el enfriamiento (74).

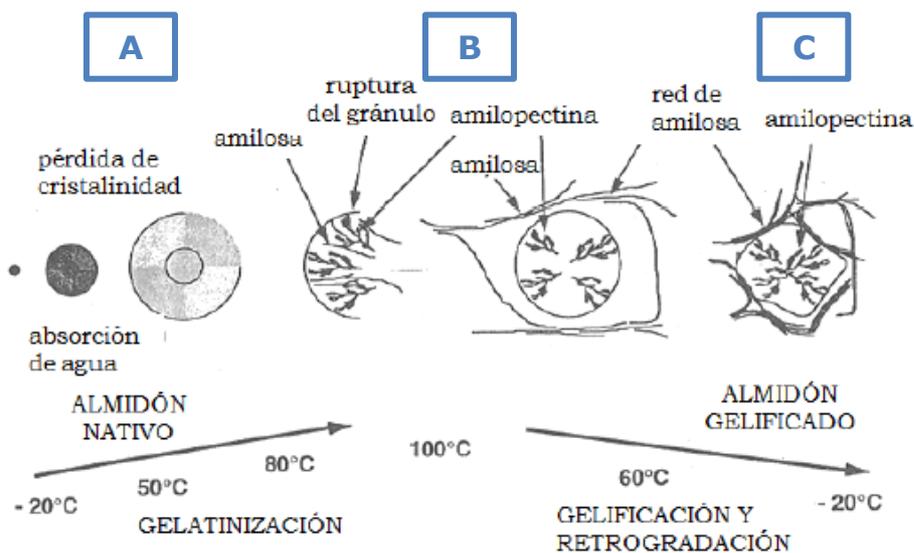


Figura 1.3.5 Influencia del tratamiento hidrotérmico en las características físicas del almidón (Adaptado de Bornet, 1993 (73)).

1.4. FENÓMENOS QUE OCURREN DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PAN

Durante la elaboración del pan se llevan a cabo importantes procesos físicos, físico-químicos y bioquímicos que transforman la masa viscoelástica, en una miga elástica y una corteza crujiente.

La primera etapa en la elaboración de la masa es el mezclado y amasado de los ingredientes. En el amasado las partículas de harina se hidratan lentamente y, gracias al trabajo mecánico, las proteínas del gluten interaccionan entre si y dan lugar a la formación de una red tridimensional, resultando una masa cohesiva y extensible. El almidón también se integra en la red de gluten, al igual que el resto de los componentes de la harina, mientras que los ingredientes solubles, como es el caso de la sal o el azúcar, permanecen en solución. A la vez que se desarrolla la red de gluten, la masa incorpora aire. El aire incorporado forma núcleos de celdas de gas, que luego serán expandidos durante la fermentación y el horneado. La presencia de aire, y específicamente de oxígeno molecular, es esencial para un óptimo desarrollo del gluten (75) (30) (76). Durante la fermentación, las levaduras convierten los carbohidratos disponibles en CO₂ y etanol. Ambas sustancias se disuelven en la fase acuosa de la masa por lo que su pH disminuye. Cuando esta fase se encuentra saturada de dióxido de carbono, se produce su liberación hacia las celdas de gas creadas por la incorporación de aire durante el proceso de amasado. Esto produce el aumento de volumen de la pieza (75) (30) (77).

En el proceso de cocción, a medida que la temperatura de la pieza aumenta, hasta 100 °C en el interior, y a temperaturas superiores en la superficie; la masa se expande hasta un 50% debido a un aumento en la producción de CO₂ (hasta que las células de levaduras son inactivadas) y un aumento en la vaporización de otras sustancias como etanol y mezclas de etanol-agua. Además, el aumento de la temperatura provoca un incremento de la presión de los gases producidos. A medida que la estructura interna se cocina, la estructura de la masa, similar a una

espuma, cambia a una estructura tipo esponja con celdas de gas interconectadas (**Figura 1.4.1**). La viscosidad incrementa rápidamente por arriba de 60 °C debido a la gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas del gluten.

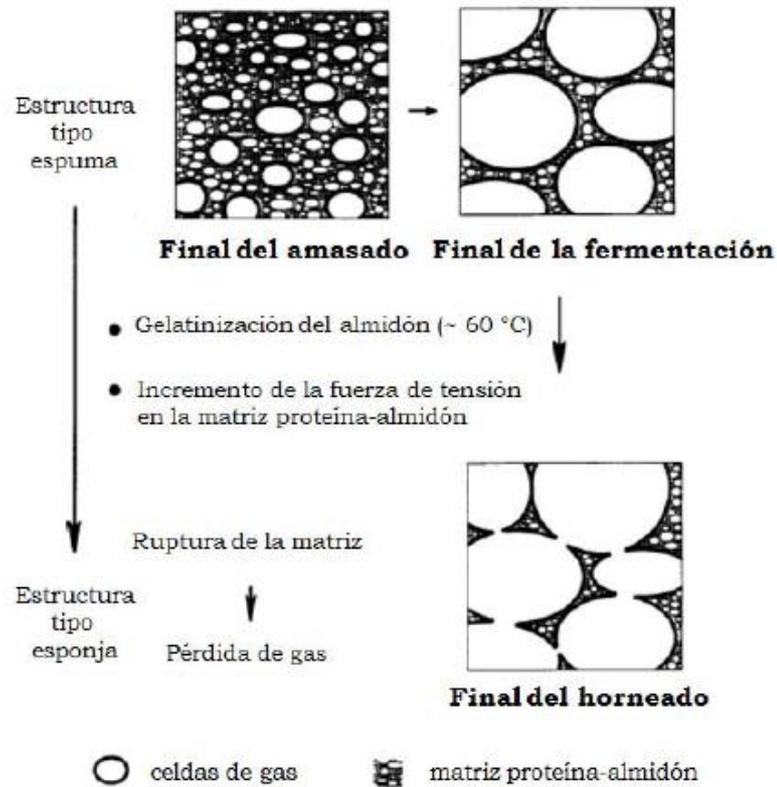


Figura 1.4.1 Transformación estructural de la masa durante el proceso de elaboración del pan (Adaptado de Gan y col., 1995) (78)

En etapas posteriores del horneado se producen las reacciones de caramelización de los azúcares y las reacciones de oscurecimiento de Maillard entre los azúcares reductores y los aminoácidos libres de las proteínas, procesos que son influenciado en gran medida por el pH, el contenido de agua y el tipo de azúcares reductores formados (79). Las reacciones de Maillard son favorecidas en sistemas con una humedad intermedia, temperaturas mayores a 50-70 °C y pH entre 4-7, y dan lugar a la formación de Melanoidinas, compuestos responsables de la coloración, y aldehídos y cetonas, compuestos volátiles responsables del sabor y aroma. Por otro lado, las reacciones de caramelización depende directamente de la degradación de azúcares y requiere condiciones más drásticas: temperaturas mayores a 120 °C; baja actividad de agua y pH

menores a 3 o superiores a 9 (80). Como resultado de estas reacciones, la corteza de los panes presentan un color tostado-pardo.

Las características del pan se modifican en el tiempo y durante el almacenamiento experimenta grandes transformaciones que llevan a una pérdida de la calidad. Estas modificaciones son conocidas como "envejecimiento del pan", fenómeno complejo que se refiere a los cambios que se producen en el pan luego de la cocción y que no son producidos por microorganismos (81). El deterioro del pan afecta tanto a la miga, que tiende a aumentar su firmeza tornándose dura, seca y quebradiza; como a la corteza, que se hidrata y pierde su crujibilidad; y también produce pérdida de los aromas y sabores que se desarrollan durante el proceso elaboración. Todos estos cambios hacen al producto inaceptable para los consumidores.

El proceso de envejecimiento es causado por la transferencia de humedad desde la miga hacia la corteza, y por la recristalización (o retrogradación) de la amilopectina durante el almacenamiento. La amilosa presente en el pan se asocia después del horneado, durante el enfriamiento de la pieza, y contribuye con la dureza inicial de la miga de pan. El aumento de la dureza de la miga en el almacenamiento se atribuye a los cambios de la molécula de la amilopectina, que parte del estado completamente amorfo en el producto fresco, para ir adoptando un estado cristalino en el tiempo. En el pan fresco, las cadenas ramificadas se encuentran planas y dispersas en el agua disponible y se agregan gradualmente por interacciones intermoleculares, lo que aumenta la rigidez de la estructura del almidón y causa el endurecimiento de la miga (82).

Las proteínas del gluten también intervienen en el proceso de envejecimiento por medio de uniones puente hidrógeno que establecen con la fracción de los gránulos de almidón gelatinizados durante el horneado. Sin bien aportan al proceso, la presencia de gluten no es imprescindible para que el envejecimiento ocurra, como es el caso de productos de panificación libres de gluten (83).

1.5. EFECTO DEL CLORURO DE SODIO EN EL PAN

La sal se usa principalmente para impartir sabor a los alimentos y su omisión en la formulación lleva al rechazo de los productos por parte de los consumidores.

Si bien muchos compuestos químicos son sales y muchas de estas sales son solubles en agua e imparten lo que se conoce como sabor salado, proporcionan sabores que son mezclas de salado con amargo, agrio o metálico. Esto tiene que ver con el mecanismo por el cual se percibe el sabor salado, que es un mecanismo de transducción mediado por canales iónicos específicos (30). Los iones Na^+ ingresan a las células receptoras por medio de canales iónicos que se encuentran en la membrana apical de las células gustativas, se produce la despolarización de las células y la liberación de neurotransmisores que se unen a receptores ubicados en las neuronas aferentes gustativas. Solo el Na^+ y el Litio (ion: Li^+) pueden atravesar estos canales iónicos, por lo que se dice que solo estos dos iones son los que desatan el sabor salado característico.

La sal, además de influir en el sabor del producto, favorece la coloración de la superficie del pan, dando a la corteza una coloración más viva, haciéndola más crujiente y confiriéndole un aroma más intenso, respecto del pan sin sal. También influye en la duración y estado de conservación del producto. Debido a su capacidad para absorber agua, se reduce la migración de ésta desde interior de la miga al ambiente, retrasando el endurecimiento del producto (84).

Estudios más profundos sobre el efecto del NaCl en la calidad tecnológica del pan mostraron que, dependiendo de la calidad proteica de la harina de trigo utilizada, la sal puede influir en el volumen del pan y en la estructura de la miga. Algunos autores encontraron que el aumento del contenido de NaCl en la formulación aumenta el volumen del pan en harinas con distintas características (85) (86) (87) (88). Sin embargo, otros autores observaron una reducción, o no destacaron cambios en el volumen, cuando la sal fue agregada durante la elaboración de la masa (89) (90).

1.6. EFECTO DEL CLORURO SODIO EN LA MASA PANARIA

La sal afecta las interacciones que participan en la conformación de la masa. Desde el año 1942 se han llevado a cabo diversas investigaciones para estudiar el efecto de las sales sobre las propiedades de las proteínas del gluten y más precisamente, los efectos del NaCl en la formación y el desarrollo de la masa. Para esto, se realizaron estudios mixográficos, farinográficos, alveográficos, y de reología fundamental y dinámica. A través de estos ensayos se observó que la sal aumenta el tiempo de mezclado y desarrollo de la masa; disminuye la absorción de agua por parte de la harina; y fortalece la red de gluten (91) (92) (93) (94) (95).

El fundamento de estos efectos permanece en discusión y se han propuesto distintas teorías para poder explicarlos: por un lado, al efecto que tienen los iones sobre las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de las proteínas del gluten; y por otro lado, a la interacción de la sal y el agua en el sistema.

Efecto de los iones sobre las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas

El desarrollo de la masa involucra la hidratación de las proteínas del gluten y la formación de interacciones entre gluteninas y gliadinas (67). Durante el mezclado, las gluteninas tienden a alinearse y formar entrecruzamientos, aumentando la fuerza de la masa.

La masa es un sistema de harina-agua de pH 5,5, bajo estas condiciones las proteínas del gluten presentan una ligera densidad de carga positiva, originada por los residuos de los aminoácidos cargados que las constituyen: lisina (pKa 10) y arginina (pKa 12,5) se encuentran cargados positivamente en su totalidad; mientras que ácido glutámico (pKa 4,07) y ácido aspártico (pKa 3,9) presentan cargas negativas; y por último, la histidina (pKa 6,3) está parcialmente protonada. Esto produce una repulsión electrostática entre las cadenas de proteínas (92). Como consecuencia, el gluten se hidrata rápidamente, disminuyendo los tiempos

de mezclado, y manteniendo las cadenas de proteínas sin interaccionar unas con otras, resultando en una masa débil.

Las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas del gluten pueden modificarse por el agregado de sales neutras (96) (97) (98) (95). Preston (96) encontró que a bajas concentraciones de sales, la extracción de proteínas del gluten disminuye mientras que aumenta la agregación proteica. Este resultado se asoció al enmascaramiento electrostático de los aminoácidos iónicos presentes en la superficie de las proteínas.

De esta manera, el agregado de bajos niveles de sal en la masa enmascara las cargas positivas de las proteínas, disminuyendo la repulsión electrostática y permitiendo a las cadenas de proteínas aproximarse unas con otras e interaccionar por medio de interacciones hidrofóbicas. Esto produce una hidratación más lenta y tiempos de mezclado mayores, resultando a una masa más fuerte (92).

Efecto de los iones en la fase acuosa del sistema

La sal también afecta la fase acuosa de la masa. Por un lado, la competencia de los iones sodio con los iones hidrógeno para situarse en la molécula de gluten, reduce los enlaces puente de hidrógeno. Como consecuencia de esta competencia el gluten se endurece y libera agua, las moléculas de gluten se entrecruzan y el trabajo mecánico para desenrollar el gluten y realineararlo es mayor. Por otro lado, un aumento en la concentración de NaCl generalmente aumenta el orden de la estructura del agua, lo que resulta en la exposición de grupos apolares en la superficie de las proteínas permitiendo la interacción entre ellas mediante interacciones hidrofóbicas (99) (100).

En lo que respecta al uso de la reología dinámica para evaluar el efecto del NaCl en la masa, los resultados informados fueron, en muchos casos, contradictorios. Algunos autores observaron una disminución del módulo de almacenamiento G' (componente elástica) a medida que se incrementa el contenido de NaCl en la formulación (90) (101), mientras que otros reportaron un aumento del módulo (89).

Otra importante función de la sal en la elaboración de productos de panificación es la estabilización de la fermentación. He et al. (87) encontraron que el agregado de sal disminuía la producción de gas en la masa. Esto se debe a una disminución de la velocidad de fermentación de las levaduras como consecuencia del aumento de la presión osmótica de las levaduras en presencia del NaCl; y como consecuencia de la acción de los iones Na^+ y Cl^- sobre la membrana de las levaduras, que limita su actividad metabólica (30). Como resultado, la producción de CO_2 es controlada y la miga de pan presenta mejores características texturales. En las masas sin sal se produce una excesiva fermentación, resultando en una masa más aireada y agria, con una mala textura (30).

Frente a las diferencias encontradas en estudios previos sobre el efecto del NaCl en el pan, resulta imprescindible hacer un análisis profundo y detallado del efecto NaCl sobre las interacciones que se desarrollan durante la formación de la masa que determinan sus propiedades reológicas, así como en las características del producto final, para poder sacar conclusiones y para comparar con el efecto de otras sales.

1.7. ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL CLORURO DE SODIO EN EL PAN

La principal estrategia que se está llevando a cabo actualmente para aminorar el consumo de sal es su reducción gradual en todos los alimentos, incluyendo al pan. Y a pesar que la mayoría de los países están implementando políticas y acciones en conjunto con las industrias alimenticias para ir disminuyendo el NaCl en los alimentos de forma paulatina, esta estrategia requiere de largos períodos de tiempo para lograr la adecuación de los consumidores. Por este motivo, y sumado al detrimento en la calidad que producirían la reducción de sal en el pan, las industrias alimenticias continúan investigando nuevas formas de disminuir el NaCl manteniendo la calidad sensorial y tecnológica de los productos.

Una alternativa, que se viene analizando desde hace muchos años, es reemplazarlo por otras sales inorgánicas. Varias sales fueron evaluadas

como posibles reemplazante de NaCl en productos de panificación (KCl, CaCl₂, LiCl, MgCl₂, MgSO₄, Na₂SO₄, CaSO₄ y Mg(OAc)₂) sin embargo, con ninguna se logró obtener panes de buenas características. Salovaara, en 1982 (95), estudio el efecto del reemplazo de NaCl por algunas de estas sales en la formación y el desarrollo de la masa; y observó que el CaCl₂ y MgCl₂ reducían significativamente el tiempo de desarrollo y la estabilidad de la masa. Este efecto se vio también reflejado en la menor resistencia a la extensión y en el menor tiempo necesario para el desarrollo de la masa que presentaron las masas elaboradas con estas sales, en comparación con la masa control elaborada solamente con NaCl. Sin embargo, el Na₂SO₄ y el MgSO₄ tuvieron el efecto contrario, aumentaron la estabilidad de la masa comparado al NaCl. El sulfato tiene un mayor efecto de estabilización de la estructura nativa de las proteínas en comparación con el cloruro, lo que ha sido asociado a su ubicación en la serie liotrópica de los iones (99). De esta manera, el efecto de fortalecimiento del sulfato sobre la masa contrarresta el efecto contrario del ion magnesio. El Mg(OAc)₂ no produjo diferencias significativas en la estabilidad de la masa.

Por su parte, He et al. (87) observaron que el CaCl₂, el LiCl y el CaSO₄ no producían un aumento del volumen del pan a ninguna de las concentraciones ensayadas. Además, estos resultados estuvieron en concordancia con los obtenidos en relación al efecto de las sales en la producción de gas. A partir de esto, los autores concluyeron que, aparentemente, el LiCl y el CaCl₂, tendrían un efecto tóxico sobre las levaduras.

El KCl es ampliamente utilizado en los alimentos. Pocos son los estudios que se llevaron a cabo para evaluar su efecto en el desarrollo de la masa y en el pan. A partir de estos estudios se observó que tendría un efecto similar al NaCl (87) (95), sin embargo, cuando se usa en altas cantidades, impartiría un sabor indeseable descrito como metálico o amargo (95) (102). Por este motivo es que no se continuó evaluando su posible uso como reemplazante en el pan. Sin embargo, estos estudios datan de muchos años. Los hábitos y gustos de los consumidores se modifican en el

tiempo, por lo que resulta de interés evaluar la aceptabilidad actual de los panes elaborados con reemplazo de NaCl por KCl, así como realizar estudios más profundos de su efecto en la masa y en el producto final.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la reducción de NaCl y de su reemplazo por KCl en la formulación de masas panarias sobre la calidad tecnológica y sensorial del pan de molde

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto del cloruro de sodio y el cloruro de potasio sobre las interacciones que se producen entre los componentes de la masa durante la elaboración de panes.
2. Analizar el efecto del NaCl, el KCl o ambas sales sobre el desarrollo de masas panarias mediante estudios reológicos.
3. Evaluar el efecto de cantidades decrecientes de NaCl y su reemplazo con KCl sobre la calidad tecnológica y sobre el envejecimiento de los panes obtenidos.
4. Determinar el umbral de detección de KCl en la formulación del pan de molde y evaluar la aceptabilidad de panes reducidos en NaCl, por medio de su reemplazo por KCl.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se utilizó una harina de trigo comercial (Graciela Real, Córdoba, Argentina), sin aditivos. El NaCl (Dos Anclas, Argentina) y el KCl, fueron de grado alimenticio.

METODOLOGÍA

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA

Humedad (103): El contenido de humedad de las muestras se determinó pesando $2,00 \pm 0,01$ g y se llevó a estufa isotérmica de calentamiento eléctrico durante 2 h a 130 °C. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso medido antes y después del calentamiento de la muestra y se expresó como porcentaje de agua perdida. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el valor fue expresado como media \pm desviación estándar.

Proteínas (103): El contenido de nitrógeno de las muestras se determinó de acuerdo al micro método de Kjeldahl modificado para ácido bórico. Se realizó la mineralización de la muestra (200 mg) con H_2SO_4 a 400 °C en un bloque de digestión MB-6, Raypa (R. Espinar SL, España). Luego se llevó a cabo la destilación del amonio resultante sobre ácido bórico en un destilador UDK 126, Velp Scientifica (Velp Scientifica SRL, Italia) y se tituló con HCl. El porcentaje de proteínas totales se calculó como $N \times 5,7$. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el valor fue expresado como media \pm desviación estándar.

Lípidos (103): la evaluación de la composición lipídica de las harinas se realizó mediante una extracción con hexano en Soxhlet. El contenido de lípidos se determinó por diferencia entre el peso de la harina antes de la extracción y la harina deslipidizada, expresado como porcentaje de lípidos totales en base seca. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el valor fue expresado como media \pm desviación estándar.

Cenizas (103): el contenido de cenizas se calculó por diferencia de peso de 2 g de harina exactamente medidos, antes y después de calentar en mufla a 600 °C hasta masa constante. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el valor fue expresado como media \pm desviación estándar.

Hidratos de carbono (103): Los carbohidratos se estimaron por diferencia, como se muestra en la ecuación abajo indicada:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ Lípidos} + \% \text{ Cenizas})$$

El valor fue expresado como media \pm desviación estándar.

3.2. CALIDAD TECNOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LA HARINA CON AGREGADO DE SAL

3.2.1 Ensayos de predicción de la calidad tecnológica de la harina con agregado de sal

3.2.1.1 Índice de sedimentación en SDS (IS-SDS)

El índice de sedimentación en SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) determina la capacidad de hidratación y expansión de las proteínas en un medio ligeramente ácido mediante la medición del volumen de sedimentación de una suspensión de harina (103). Mezclas de harina de trigo (1 g) y sal en las siguientes proporciones: 2% NaCl; 1,5% NaCl; 1% NaCl; 0,5% NaCl; 0% NaCl; 1,5%:0,5% NaCl:KCl; 1%:1% NaCl:KCl; 0,5%:1,5% NaCl:KCl y 2% KCl, fueron suspendidas en una solución de azul de coomassie (10 mg/L) y se dejaron reposar por 4,40 min. Luego, se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 5 s, se dejaron reposar por 1,55 min y se agitaron por 5 s. Inmediatamente, se agregaron 12 mL de una solución de SDS al 2% ácido láctico 1/8 v/v y se agitaron en un agitador horizontal durante 1 min. Se dejaron reposar por 14 min y transcurrido el

tiempo se determinó el volumen de harina humectada en cm^3 . El ensayo se realizó por triplicado y se expresó como media \pm desviación estándar.

3.2.1.2 Capacidad de retención de solventes (SRC)

La capacidad de retención de solventes (SRC, Solvent Retention Capacity) mide la capacidad de una harina para retener un grupo de cuatro solventes: sacarosa 50%, relacionado con el contenido de gliadinas y pentosanos; carbonato de sodio 5%, se relaciona con el almidón dañado; ácido láctico 5%, relacionado a las gluteninas; y agua, que está relacionado con los componentes hidrofílicos (99). La determinación se realizó sobre $5,000 \pm 0,005$ g de harina de trigo de humedad conocida y las distintas proporciones de sal mencionadas anteriormente. Las mezclas fueron suspendidas en $25,00 \pm 0,05$ g de soluciones de: 50% p/p de sacarosa, 5% p/p de carbonato de sodio, 5% p/p de ácido láctico, y agua destilada; se dejaron hidratar durante 20 min, agitando con un vórtex cada 5 min durante 5 s; se centrifugaron a 1000 xg por 15 min; y se descartó el sobrenadante. Se escurrieron los tubos durante 10 min y luego se pesaron los precipitados y se calculó el perfil de retención para cada solvente, por medio de la siguiente fórmula:

$$\%SRC = \left[\frac{PG}{PH} \times \frac{86}{100 - \%H} - 1 \right] \times 100$$

PG: Peso del gel

PH: Peso de la harina

%H: Porcentaje de humedad de la harina

El ensayo se realizó por triplicado y se expresó como media \pm desviación estándar.

3.2.1.3 Índice de retención de agua alcalina (IRAA)

La capacidad de retención de agua alcalina mide la cantidad de agua alcalina (NaHCO_3) absorbida por la harina después de la centrifugación, y su valor se correlaciona inversamente con el diámetro de las galletas (99). En un tubo de 10 ml, previamente tarado, se pesó 1 g de harina de trigo y sal en las mismas proporciones mencionadas en el punto anterior. Las mezclas fueron suspendidas en 5 mL de solución de Na_2CO_3 0,1 N, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar por 20 min, agitando cada 5 min. Luego, se centrifugaron a 1000 xg durante 15 min, se descartaron los sobrenadantes y se escurrieron los precipitados por 10 min. Por último se pesó el tubo y se determinó el índice de retención de agua alcalina (%) por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{IRAA} = \left[\frac{(PT + GEL) - PT}{PH} \times \frac{86}{100 - \%H} - 1 \right] \times 100$$

PT + GEL: Peso del tubo más el gel obtenido

PT: Peso del tubo

PH: Peso de la harina

%H: Porcentaje de humedad de la harina

El ensayo se realizó por triplicado y se expresó como media \pm desviación estándar.

3.2.2. Efecto de la sal sobre las interacciones que se producen entre los componentes de la harina

Preparación de masas liofilizadas: se prepararon masas con harina de trigo, 58% de agua y las distintas proporciones de las sales mencionadas previamente. Los ingredientes fueron amasados durante 2,5 min y la masa se dejó reposar durante 1 h a 25° C. Posteriormente, las masas fueron congeladas, liofilizadas y almacenadas hasta su posterior análisis.

3.2.2.1 Obtención del macropolímero de gluteninas (GMP)

El GMP corresponde a la fracción de gluteninas que pueden ser separadas como una capa de gel insoluble en Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), y es indicador de la calidad panadera de una harina. El GMP fue obtenido de acuerdo a Don et al. (56) (104) (105). Las masas liofilizadas fueron suspendidas (1:20) en 1,5 mL de una solución de SDS 1,5% p/v. Las suspensiones se agitaron por 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron por 30 min a 80000 x g a 20 °C. El precipitado resultante estuvo compuesto por una capa de gel de proteínas insolubles, denominado GMP, depositada sobre el almidón. El contenido total de proteínas del precipitado fue determinado por el método de Kjeldahl ($N \times 5,7$) (103) y expresado como porcentaje de proteínas del GMP (g proteína GMP/100 g de masa liofilizada). El ensayo se realizó por triplicado y se expresó como media \pm desviación estándar.

3.2.2.2. Extracción secuencial de las proteínas de la masa

Se llevó a cabo una extracción secuencial de las proteínas partir de 100 mg de masa liofilizada. La primera extracción se realizó con 1 mL de NaCl 0,5% p/v con agitación continua durante 2 h. Transcurrido el tiempo, la muestra fue centrifugada durante 10 min a 1100 x g, el sobrenadante correspondió a la F1, conteniendo albúminas y globulinas. Al precipitado se le agregó 1 mL de isopropanol al 70% v/v con 3 h de agitación, luego se centrifugó de la misma manera que en el paso anterior y se obtuvo la F2, conteniendo gliadinas. El tercer paso fue con 1 mL de SDS 1,5% p/v con agitación por 8 h, luego de la centrifugación se obtuvo la F3, correspondiente a la fracción de gluteninas. Sobre el precipitado resultante se llevó a cabo la determinación de proteínas correspondiente a la fracción de agregados insolubles de gluteninas (F4). El contenido de proteínas de cada fracción fue determinado por el método de Kjeldahl ($N \times 5,7$) (103) y se expresó como porcentaje de proteínas de cada fracción, es decir, g proteína fracción / 100 g de masa liofilizada. La determinación

del contenido de proteínas de cada fracción se realizó por triplicado y se expresó como media \pm desviación estándar.

3.3. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS Y TÉRMICAS DE MASAS PANARIAS CON DISTINTOS PORCENTAJES DE SALES

Comportamiento reológico de las masas

La Reología es la ciencia del flujo que estudia la deformación de un cuerpo sometido a esfuerzos externos. Es la parte de la mecánica que estudia la elasticidad, la plasticidad y la viscosidad de la materia (106).

Las masas elaboradas a partir de harina de trigo son materiales viscoelásticos y sus propiedades reológicas dependen de su composición y de las condiciones de proceso utilizadas en su elaboración (107). El comportamiento reológico de las masas se puede conocer a través de dos tipos de técnicas de medición; las de tipo fundamental y las de tipo empírico.

3.3.1. Ensayos de reología empírica

3.3.1.1 Ensayos Farinográficos

Los ensayos farinográficos se utilizan para evaluar el comportamiento de las masas durante el amasado y determinan la fuerza necesaria para mezclar una masa a una velocidad constante, brindando información de la cantidad de agua absorbida para alcanzar una determinada consistencia. También provee información del tiempo de desarrollo de la masa y la estabilidad de la misma.

Se empleó un farinógrafo Brabender (C.W. Brabender Instruments, Inc., Alemania) (103). Los ensayos farinográficos se llevaron a cabo con 0, 1 y 2% de NaCl y con las siguientes proporciones de NaCl:KCl: 1%:1% y 0%:2%. Para esto, se incorporó en una amasadora 50 g de harina, una

cantidad de sal apropiada de manera de obtener las proporciones previamente descritas y el agua necesaria para elaborar una masa con 500 UB de consistencia. Se amasó a velocidad constante y se registró la resistencia que opone la masa al trabajo mecánico continuo en función del tiempo. A partir del gráfico obtenido (**Figura 3.3.1.1**), se determinaron los siguientes parámetros:

- *Capacidad de Absorción de agua.* Corresponde a la cantidad de agua necesaria para que la masa alcance una consistencia de 500 unidades brabender (UB).
- *Tiempo de desarrollo de la masa.* Corresponde al tiempo comprendido entre el inicio del amasado y el punto de la curva de máxima consistencia.
- *Estabilidad de la masa.* Corresponde al tiempo transcurrido entre el punto en el que la parte superior de la curva alcanza la línea de las 500 UB y el punto en el que la misma parte superior de la curva cruza nuevamente dicha línea.

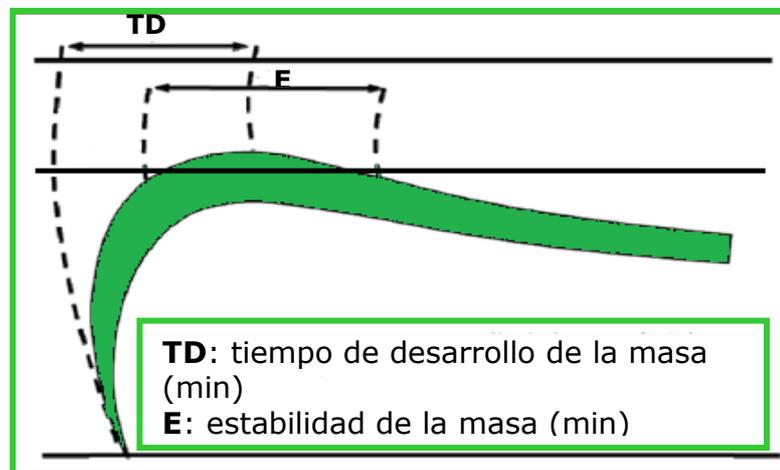


Figura 3.3.1.1 Farinograma

3.3.1.2 Alveógrafo

Mediante ensayos alveográficos se pueden evaluar las características mecánicas (viscoelásticas) de la masa, como ser la tenacidad (P), extensibilidad (L), fuerza panadera (W) o equilibrio (P/L). Se utilizó un

Alveógrafo (Chopin, Francia) (103). Se prepararon masas de harina de trigo y agua o con solución de salina, siguiendo las siguientes proporciones: 2% NaCl, 1% NaCl, 1%:1% NaCl:KCl y 2% KCl. A partir de las masas elaboradas, se obtuvieron 5 piezas en forma de disco, que fueron reposadas durante 20 min en una cámara de fermentación a 25°C. Transcurrido el tiempo, se insufló aire en cada una de las piezas de manera de formar una burbuja de aire que expandió la masa hasta su ruptura. A partir de los gráficos obtenidos (**Figura 3.3.1.2**) se obtuvieron los siguientes parámetros:

- *Tenacidad (P)*: Corresponde a la presión máxima dentro de la burbuja.
- *Extensibilidad (L)*: Corresponde a la distancia en el punto de rotura de la masa.
- *Equilibrio (P/L)*: es la relación entre la tenacidad y la extensibilidad
- *Fuerza panadera (W)*: Corresponde a la energía de deformación de la masa.

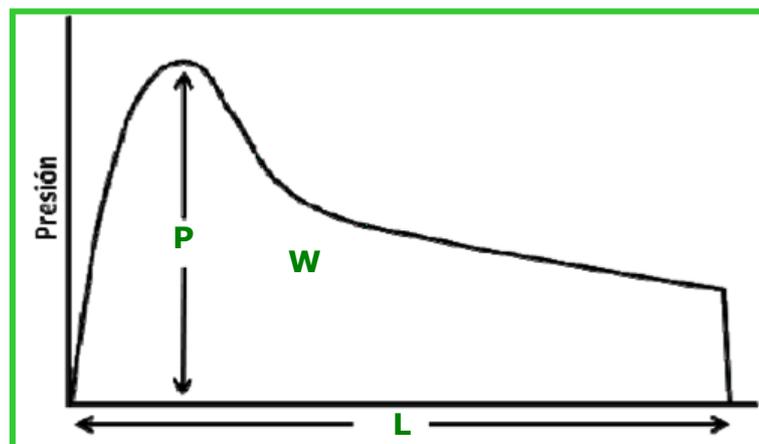


Figura 3.3.1.2 Alveograma. Valor P = tenacidad, valor L = extensibilidad, valor W = trabajo.

Ambas determinaciones fueron realizadas por duplicado y cada parámetro se expresó como media \pm desviación estándar.

3.3.2. Ensayos de reología dinámica

Las pruebas dinámicas oscilatorias se realizan aplicando una pequeña deformación (o esfuerzo) sinusoidal y midiendo el esfuerzo (o deformación) resultante.

En los ensayos reométricos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante, las masas viscoelásticas responden a la deformación aplicada almacenando parte de la energía (componente elástica) y disipando la energía restante en forma de calor (componente viscosa). La deformación oscilatoria aplicada al material es una función del tiempo y puede ser definida como:

$$\gamma = \gamma_0 \sin \omega t$$

donde γ_0 es la deformación máxima o amplitud y ω la velocidad angular o frecuencia (108). La deformación aplicada genera dos componentes del esfuerzo en el material: uno elástico en línea con la deformación, y otro viscoso 90° fuera de la fase. En función de esto, la respuesta elástica y viscosa del sistema se describen como:

$$\zeta E = G * \gamma_0 * \sin(\omega t)$$

$$\zeta V = \eta * \omega * \gamma_0 * \cos(\omega t)$$

La medida de la diferencia de fase entre la deformación generada y el esfuerzo de corte de la respuesta indica la viscoelasticidad del sistema. Si la diferencia de fase es de 0° el material es puramente elástico, y si por el contrario, es de 90° el material es puramente viscoso. Si la diferencia se encuentra entre estos dos valores el sistema es viscoelástico (108).

La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo elástico o de almacenamiento, G' , y la energía disipada en el elemento viscoso por el módulo viscoso o de pérdida, G'' .

$$G' = G * \cos \delta$$

$$G'' = G * \sin \delta$$

donde δ es el ángulo de desfase entre el esfuerzo de corte y la deformación.

De la relación de G' y G'' surge otro parámetro utilizado para caracterizar la naturaleza viscoelástica de un material, la tangente del ángulo de desfase ($\text{Tan } \delta$).

$$\text{Tan } \delta = G''/G'$$

La tangente del ángulo de desfase también es función de la frecuencia y está directamente vinculada con la relación entre la energía perdida con respecto a la energía recuperada en cada ciclo. Puede variar entre 0 e infinito y cuanto menor su valor, mayor carácter elástico tiene el material estudiado (109).

Realización del ensayo: La reología dinámica de las masas fue medida por medio de un reómetro RHEOPLUS/32 (Anton Paar, Germany), usando una geometría de platos paralelos de 25 mm (pp25); entre 0,03 y 100 Hz y dentro del rango de viscoelasticidad lineal (0,05% de deformación), éste último fue determinado experimentalmente al comenzar el ensayo mediante un barrido de deformación (0,5-50 Pa) a frecuencia constante (1 Hz). Las determinaciones fueron realizadas sobre una masa elaborada con 50 g de harina, el porcentaje de sal correspondiente y 59% de agua, la cual fue amasada por 2 min, y se dejó reposar durante 1 h. Pasado el tiempo, una porción de cada masa fue colocada sobre el plato inferior del reómetro y, una vez alcanzado el gap de 1,5 mm, se cortaron los bordes de masa y sobre la masa expuesta se colocó silicona para evitar deshidrataciones durante el ensayo. Por medio del software Rheoplus/32 V3.10 se calcularon los datos de G' , G'' y $\text{tan } \delta$. Las masas fueron elaboradas por duplicado para cada porcentaje de sal, y los ensayos fueron repetidos cinco veces para cada masa.

3.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se estudiaron los procesos de gelatinización y de retrogradación del almidón mediante un Calorímetro Mettler Toledo DSC 823e (Suiza), donde se obtuvieron las temperaturas y entalpías de transición mediante el

software STARe SW9.01 (Mettler Toledo, Suiza). Para ello, se prepararon las muestras de masa utilizando 100% de harina de trigo, 59% de agua y 3% de levadura; y distintas proporciones de sales: 2% NaCl; 1% NaCl; 1% NaCl:1% KCl; 2% KCl; y sin sal. Los ingredientes se amasaron durante 2,5 min con una amasadora Philips HR 1495 (Philips, Argentina) y se llevaron a cámara de fermentación por 1 h a 30 °C y 80% de humedad relativa. Luego de este tiempo, la masa fue desgasificada, laminada, y boleada a mano. Se tomó una pequeña porción de la misma (30 ± 3 mg) y se la colocó en una cápsula de aluminio de 100 μ L de capacidad. Las cápsulas selladas se analizaron inmediatamente.

Gelatinización del almidón: Las muestras de masa fueron calentadas en el calorímetro siguiendo un perfil de temperatura con el objeto de simular la temperatura en el centro de la miga durante el horneado del pan (110). Para ello se programó el calorímetro de acuerdo al siguiente perfil de temperatura: en un primer momento, se mantuvo la masa a 30 °C durante 2 min con el objetivo de estabilizar las condiciones de medición; luego se aumentó la temperatura desde 30 °C hasta 110 °C a una velocidad de 11,7 °C/min, y finalmente se mantuvo la muestra a 110 °C durante 5 min. Para cada muestra de masa se obtuvieron los termogramas de flujo de calor versus tiempo, a partir de los cuales se determinaron la temperatura de inicio, "onset" (T_0), la temperatura de pico (T_p) y el rango de temperatura de gelatinización (ΔT_g), así como la entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g) (expresada como J/g de muestra seca).

Retrogradación de la amilopectina: Con el objetivo de estudiar el efecto del tiempo de almacenamiento del pan en la retrogradación de la amilopectina, las muestras gelatinizadas ("horneadas") en las cápsulas de DSC se dejaron enfriar y se almacenaron durante 3 días a 25 °C. Al 1° y 3° día de almacenamiento, las cápsulas fueron calentadas nuevamente en el calorímetro según el siguiente programa: isoterma a 25 °C por 2 min, y calentamiento de 25 hasta 120 °C a una velocidad de 10 °C/min. A partir de los termogramas obtenidos se determinó la temperatura de inicio,

“onset” (T_0), la temperatura de pico (T_p), el rango de temperatura (ΔT_r) y la entalpía de retrogradación del almidón (ΔH_r) (expresada como mJ/mg de muestra seca).

Las masas con las distintas proporciones de sales se elaboraron por duplicado. Sobre cada masa, se determinaron los parámetros de gelatinización del almidón por cuadruplicado y los parámetros de retrogradación del almidón a cada tiempo de almacenamiento por duplicado, expresándose los resultados como media \pm desviación estándar.

3.4. CALIDAD TECNOLÓGICA DEL PAN

3.4.1. *Elaboración del pan*

Los panes se elaboraron mediante la metodología del pan de molde según norma IRAM 15858-1 (111). Se utilizó 100% de harina de trigo, 3% de levadura, 59% de agua y 2% de NaCl para la muestra control (Co). Para evaluar la reducción del NaCl, se elaboraron panes con 1%, y 0% de NaCl. Para evaluar el reemplazo por KCl se elaboraron panes con mezclas de NaCl:KCl en las siguientes proporciones: 0,5%:1,5%; 1%:1%; 1,5%:0,5% y 0%:2%.

La sal o las mezclas de sales, previamente disueltas en agua (a una temperatura tal de obtener masa final a $27 \pm 1^\circ\text{C}$), fue incorporada a la harina de trigo y se amasó durante 1,5 min. Se incorporó la levadura, también previamente disuelta en agua, y se amasó nuevamente por 1,5 min. Luego, se amasó por 9 min para formar la masa (amasadora Argental L-20, Argentina). Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de pre-fermentación, para lo cual se colocó la masa en una cámara de fermentación a 30°C y 98% humedad relativa (HR) durante 45 min y se prosiguió a desgasificar la masa de forma manual. Se colocó nuevamente en la cámara por 15 min, seguido por una segunda desgasificación y por último se dejó 20 min más en la cámara de fermentación. Concluida la

pre-fermentación, la masa fue laminada en una sobadora Mi-Pan vfrroller (Mi-Pan, Córdoba, Argentina) con dos rodillos de 50,0 x 12,7 cm y separada en trozos de 180 g que fueron pasados por una armadora (Braesa, Brasil), colocados en moldes y llevados a la cámara de fermentación por 75 min a 30°C y 98% HR. Por último, las masas fueron horneadas a 215°C por 20 min. Cada ensayo de panificación fue realizado por duplicado. En la **Figura 3.4.1** se ilustra el proceso de elaboración.

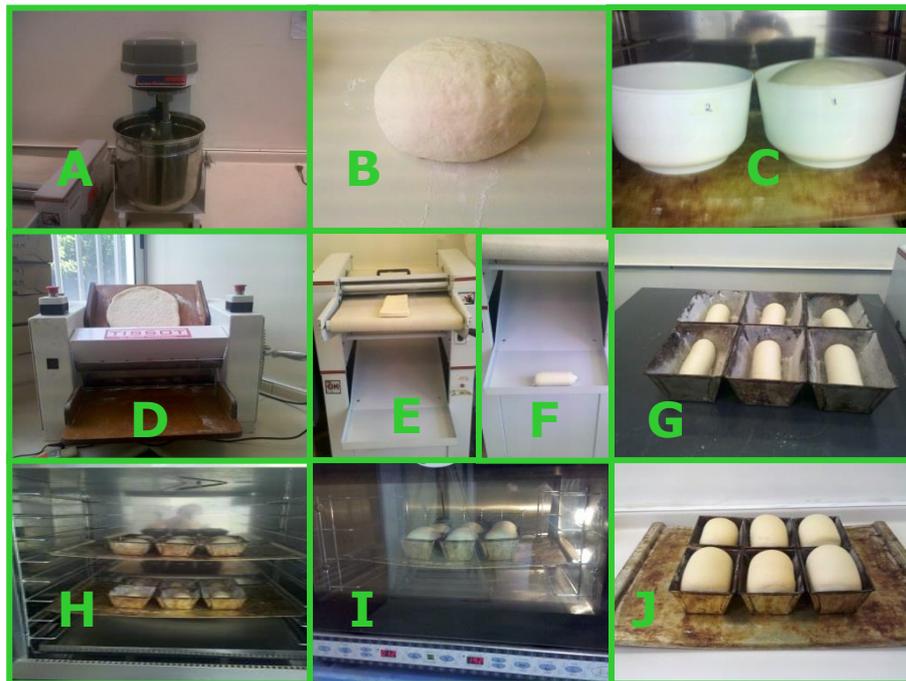


Figura 3.4.1 Proceso de elaboración del pan de molde. A: Amasado. B: Armado del bollo. C: Pre-fermentado. D: Laminado. E y F: Armado. G: Colocación molde. H: Fermentado. I: Horneado. J: Pan luego de cocción.

3.4.2. *Volumen específico*

Se determinó por desplazamiento de semillas de colza luego de 1 h de horneado. El volumen específico (VE) se obtuvo dividiendo el volumen de la muestra por su peso (cm^3/g) (103). Se realizaron 3 determinaciones de cada lote, se informaron el valor promedio \pm desviación estándar de los dos ensayos de panificación de cada muestra.

3.4.3. Textura de la miga de pan

Para evaluar la firmeza inicial (día 0), a 2 h de finalizado el horneado, dos hogazas de pan fueron cortadas en rodajas de 2,5 cm de espesor, obteniéndose dos rodajas de cada hogaza, los extremos fueron desechados. El centro de cada rodaja se sometió a una compresión del 40% del espesor original (103). Para evaluar la evolución de la firmeza de la miga durante el almacenamiento, las hogazas de pan fueron guardadas en bolsas de polietileno y almacenadas a 25 °C por 1 y 3 días. A las fechas, se realizó la misma determinación del día 0.

3.4.4. Estructura de la miga

Se evaluó a través del número y el tamaño de los alvéolos de la miga de pan por medio de un análisis de imagen. Dos rodajas de 2,5 cm de la región central de cada pan fueron escaneadas con un escáner fotográfico (HP Scanjet G3010, Palo Alto CA, USA) y fueron analizadas con el programa Image-J 1.38N (National Institutes of Health, USA). Se seleccionó manualmente de la parte central de la rodaja un área de igual tamaño en todos los panes, que fue representativa de la miga total de cada rodaja. La imagen de color se convirtió a imagen de 8-bits y se analizó en escala de grises (0 negro, 255 blanco). La segmentación de la imagen (conversión a imagen binaria) la hizo el programa por selección automática del valor del umbral. Este método de selección del valor umbral representó mejor los rasgos fundamentales de las imágenes que la selección de un valor de umbral único e igual para todas las imágenes, debido a que existen pequeñas diferencias en los fondos de cada imagen. La imagen binaria tiene sólo dos niveles de grises: 0 para las áreas vacías (negro, alveolos de gas) y 255 para las paredes de los alveolos (blanco, miga de pan). Se asignó la categoría de objeto (celdas de gas) a aquellas zonas de la imagen que tenían una intensidad de gris entre 0 y el valor umbral que correspondiera a cada imagen. Del análisis de las imágenes se obtuvieron los siguientes parámetros:

- *Área promedio del alveolo.* Número de píxeles que hacen al alveolo multiplicado por el área de un píxel.
- *Número total de alveolos, N.* Cantidad de alveolos por unidad de superficie de miga de pan.

3.4.5. Color de la corteza

Se utilizó un espectrofotómetro de reflectancia Minolta 508d (EEUU) de 8 mm de apertura, ángulo observador 10°, iluminante D65, componente especular incluido, por medio de la escala CIE-Lab. Los resultados fueron expresados en términos de L*, luminosidad; a*, rojo-verde; b* amarillo-azul. Sobre la superficie de la corteza de cada muestra de pan se realizaron 6 mediciones, informándose el valor promedio.

3.5. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL PAN

El análisis sensorial es la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído.

Debido a que se utiliza a las personas como instrumento, se deben controlar todos los métodos y condiciones de la prueba para evitar errores, ya que las condiciones mentales y físicas del evaluador; la influencia del medio ambiente donde se desarrolla la prueba; el tiempo y el momento pueden influir sobre la disposición del evaluador.

3.5.1. Determinación de umbral de diferencia de KCl en pan

El **umbral de diferencia** se define como el grado de cambio en el estímulo que es necesario para producir un cambio detectable en la percepción (112). Se evalúa con el objetivo de determinar la cantidad de

NaCl que puede reemplazarse por KCl en la formulación del pan de molde sin que se detecten diferencias en el sabor del producto.

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo al método E 679-04, ASTM (113). Para determinar el umbral de diferencia se aplicó la metodología de diferencia pareada, 2-AFC (Two Alternative Forced Choice), en la cual cada evaluador recibe una serie de pares de muestras compuestas por una muestra control y una muestra problema, y se los fuerza a que seleccionen aquella muestra que responda mejor a las indicaciones del ensayo.

Se elaboraron panes mediante la metodología del pan de molde según norma IRAM 15858-1 (111). Se precisó de una semana para elaborar la cantidad de muestra necesaria para realizar la prueba. Con el objetivo que no se deteriore la calidad del pan en el transcurso de la semana de elaboración, se elaboraron panes pre-cocidos. A diferencia del procedimiento expuesto anteriormente, los panes fueron cocinados durante 11 minutos y luego fueron congelados hasta el día del ensayo, momento en el cual se completó la cocción (a 15 minutos).

Los niveles de concentración de la sustancia a determinar, en este caso el KCl, deben comenzar muy por debajo del nivel al cual la mayoría de los panelistas son capaces de detectarla y terminar por encima de la concentración a la cual los panelistas dan una respuesta correcta. A su vez, las concentraciones deben aumentar en forma geométrica, de manera que dos niveles de concentración adyacentes deben estar separado por un factor constante (113).

Se utilizó un factor constante de 0,875 que permitió obtener las concentraciones inferiores y superiores al 1% de KCl que los panelistas deberían ser capaces de detectar. Con dicho factor de corrección se determinó el porcentaje de NaCl, para lo cual se multiplicó el factor por 2% (contenido regular de sal en la formulación) y se obtuvo el porcentaje de NaCl para la reducción 1; éste valor de reducción fue utilizado para calcular el valor de la reducción 2, y así sucesivamente. Por diferencia del contenido regular de sal en pan (2%) y el porcentaje de NaCl determinado con el factor para cada reducción, se calculó el porcentaje de KCl a utilizar

en cada caso. Los valores así obtenidos se presentan en la **Tabla 3.5.1**.

Tabla 3.5.1 Cantidad de sales utilizada en la formulación del pan de molde

| Muestra | NaCl (%) | KCl (%) |
|-------------|----------|---------|
| Reducción 1 | 1,75 | 0,25 |
| Reducción 2 | 1,53 | 0,47 |
| Reducción 3 | 1,34 | 0,66 |
| Reducción 4 | 1,17 | 0,83 |
| Reducción 5 | 1,03 | 0,97 |
| Reducción 6 | 0,90 | 1,10 |

El día del ensayo se descongelaron los panes y se completó la cocción a 215°C por 4 min más. Luego se dejaron los panes 1 h a temperatura ambiente para que se enfríen, se cortaron en rodajas de 1,5 cm y cada rodaja se cortó a su vez en dos porciones, lo que correspondió aproximadamente a 15 g de cada muestra. Las porciones se colocaron en bolsas de plástico selladas herméticamente para disminuir la pérdida de humedad hasta el momento de realizar la prueba (**Figura 3.5.1**).



Figura 3.5.1 Preparación de las muestras para análisis sensorial. A y B: Descongelado. C: Horneado. D: Enfriado. E: Corte. F: Almacenamiento en bolsas herméticas.

Los platos que se presentaron a los jueces se prepararon inmediatamente antes de comenzar con la evaluación. Cada uno de los seis pares de muestras se colocó en un plato de plástico y las muestras se presentaron codificadas con números de tres dígitos obtenidos al azar. Se prepararon igual número de combinaciones AB-BA, dispuestas también de forma aleatoria.

A cada evaluador se le facilitó la planilla de evaluación (**ANEXO A**), un vaso con agua para la neutralización y dos vasos pequeños vacíos para descarte en el caso que sea necesario (**Figura 3.5.2**).

Los seis platos que contenían cada par de muestra fueron presentados de forma ascendente en concentración de KCl, de a uno por vez a medida que concluían la evaluación del par anterior. Se les indicó que comiencen por la muestra que tienen a la izquierda y que indique para cada par cuál de las dos muestras presentó mayor sabor amargo o metálico. Se les recomendó que se tomen el tiempo necesario para la selección de la muestra y se les indicó que una de las opciones debería ser marcada, incluso cuando no se encuentren diferencias entre las dos muestras, de manera de que toda la información pueda ser utilizada (**Figura 3.5.2**).



Figura 3.5.2 Desarrollo de la prueba: Detección de umbral de diferencia de KCl en pan.

Los resultados fueron analizados por medio de una correlación lineal entre el porcentaje de respuestas correctas y el logaritmo de la concentración,

así como también por regresión logarítmica entre la proporción de respuestas correctas y la concentración de KCl. La concentración promedio del umbral de diferencia se determinó como el porcentaje de KCl correspondiente al 75% de respuestas correctas.

3.5.2. Aceptabilidad del pan elaborado con mezcla de NaCl y KCl

Se llevó a cabo un ensayo de aceptabilidad de panes elaborados con reemplazo de NaCl por KCl en una proporción ligeramente mayor a la detectada mediante el análisis de detección de umbral de diferencia. Se elaboraron panes con 2% de NaCl como control.

Para medir el grado de aceptabilidad sensorial del pan de molde se utilizó una escala hedónica de 9 puntos y se evaluaron los siguientes atributos: apariencia, textura, sabor y aceptabilidad global.



Figura 3.5.3 Aceptabilidad del pan con KCl

A cada evaluador se le presentó el plato con las muestras codificadas con un número de tres dígitos dispuestos al azar, la planilla de evaluación, agua para enjuague, y un vaso para posibles descartes; y se les pidió que indicaran el grado de aceptabilidad de cada muestra utilizando la escala presentada en la planilla (**ANEXO B**) (**Figura 3.5.3**).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el software InfoStat v. 1.0. (114). Las herramientas estadísticas empleadas fueron ANOVA, test de comparaciones múltiples de LSD Fisher, y análisis de correlación de Pearson, todos a un nivel de significancia del 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE TRIGO

En la Tabla **4.1.1** se presenta la composición de la harina de trigo sin aditivos, que se utilizó para evaluar las interacciones entre los componentes principales de la harina y las sales; así como para elaborar las masas panarias para el estudio del efecto de la adición de sales sobre las propiedades reológicas y térmicas de las masas; y finalmente, la elaboración de los panes reducidos en NaCl para determinar su calidad tecnológica y sensorial.

Tabla 4.1.1 Caracterización de la harina de trigo

| Parámetro (%)* | Harina de trigo |
|-----------------------|------------------------|
| Proteínas | 14,29±0,02 |
| Lípidos | 1,03±0,01 |
| Cenizas | 0,70±0,01 |
| Humedad | 12,98±0,09 |
| Hidratos de Carbono | 71,00±0,30 |

*Los resultados se expresan en base seca.

4.2. CALIDAD TECNOLÓGICA Y FUNCIONAL DE HARINA CON AGREGADO DE SALES

Efecto de la reducción del NaCl.

La prueba ideal para determinar la calidad de una harina para obtener un determinado producto de panificación es elaborar dicho producto. Sin embargo, en muchas ocasiones esto no es posible ya que es necesario tener la información de forma rápida o porque se cuenta con muy poca cantidad de harina. Debido a esto, es necesario utilizar pruebas predictivas que se correlacionen significativamente con la aptitud de las harinas para elaborar diferentes productos. Algunas de estas determinaciones son el Índice de Sedimentación en SDS (IS-SDS), el Índice de Retención de Agua Alcalina (IRAA) y la Capacidad de Retención de Solventes (SRC). Es posible que estas pruebas también puedan ser de utilidad para evaluar el efecto de la cantidad y el tipo de sal agregada a la harina sobre la calidad de los productos de panificación; y cuyos

resultados permitan explicar la naturaleza de las interacciones que se produce entre las sales y los componentes principales de la harina.

El IS-SDS determina la capacidad de hidratación y expansión de las proteínas en un medio ligeramente ácido mediante la medición del volumen de sedimentación de una suspensión de harina. El sedimento formado se debe al hinchamiento de las gluteninas, las cuales están estrechamente relacionadas con la calidad panadera de la harina. Mientras mayor sea el valor del índice, la harina va a presentar una mayor aptitud para la elaboración del pan. Esto ha sido demostrado en diversos estudios: Steffolani et al. (115) encontraron una correlación positiva entre el valor de IS-SDS y el porcentaje de gluteninas en la harina; Colombo et al. (116) observaron una correlación positiva entre el IS-SDS y el volumen del pan. Es de interés evaluar si la sal interfiere en las interacciones de las proteínas o modifica la solubilidad de las mismas, de manera que se vea afectado el valor del IS-SDS; y determinar si dicho índice se correlaciona con la calidad final del producto.

En la **Tabla 4.2.1** se presentan los valores correspondientes al IS-SDS de las mezclas de harina con distintos porcentajes de NaCl. El menor valor de IS-SDS correspondió a la muestra con la mayor cantidad de NaCl (2%), y se observó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de este parámetro cuando se redujo el contenido de sal en la formulación. Estudios previos han demostrado que la incorporación de sales neutras en bajas proporciones en una mezcla de harina y agua enmascara las cargas de los aminoácidos cargados que se encuentran sobre la superficie de las proteínas, permitiendo que éstas se aproximen unas a otras y que interactúen mediante interacciones hidrofóbicas, lo que retarda su hidratación (94) (96). Como consecuencia de esto, se disminuye la expansión y el volumen de sedimentación de las proteínas. Por lo tanto, es de esperar que a mayor contenido de NaCl el Índice de Sedimentación en SDS sea menor y que esta metodología no refleje la aptitud panadera de la mezcla de harina y sal.

Tabla 4.2.1. Índice de sedimentación en SDS (IS-SDS) e Índice de retención de agua alcalina (%IRAA) de mezclas de harina con NaCl en cantidades decrecientes.

| Muestra | IS-SDS | % IRAA |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| 2% NaCl | 10,17±0,29 ^a | 78,87±2,06 ^a |
| 1,5% NaCl | 10,50±0,00 ^a | 78,80±0,13 ^a |
| 1% NaCl | 11,38±0,18 ^b | 79,57±0,22 ^a |
| 0,5% NaCl | 12,21±0,35 ^c | 78,66±0,07 ^a |
| 0% NaCl | 14,25±0,35 ^d | 79,31±1,35 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

El Índice de Retención de Agua Alcalina (%IRAA) determina la cantidad de solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) que puede retener una harina (103). Los valores obtenidos se correlacionan inversamente con el diámetro de las galletas, por lo que esta técnica permite predecir la calidad galletitera de una muestra de harina (117). A su vez, es utilizado en la diferenciación de trigos pan y trigos blandos. Sin embargo, el poder predictivo de este test se reduce cuando se utiliza para distinguir trigos que pertenecen a una misma clase de dureza (117) (118). La presencia de NaCl en la harina no produjo diferencias significativas en el valor de IRAA con respecto a la muestra de harina sin NaCl (**Tabla 4.2.1**).

El perfil de Capacidad de Retención de Solventes (SRC) determina la habilidad de una harina para retener cuatro solventes, y los porcentajes de SRC de cada solvente se relacionan con un componente de la harina: sacarosa al 50% se relaciona con pentosanos y gliadinas; carbonato de sodio al 5% se relaciona con almidón dañado; ácido láctico al 5% se relaciona con gluteninas; y agua destilada se relaciona con los componentes hidrofílicos de la harina. La técnica permite generar un perfil de calidad y funcionalidad útil para predecir su aptitud panadera (103). Al igual que el IS-SDS, es de interés evaluar si el porcentaje de SRC es de utilidad para determinar la aptitud panadera de una mezcla de harina con distintas cantidades de sal para la elaboración del producto o si nos permite obtener información del efecto de las sales sobre las interacciones entre los componentes de la harina.

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de SRC se muestran en la

Tabla 4.2.2. Como se puede observar, la variación del contenido de NaCl no produjo diferencias significativas cuando se utilizó como solventes carbonato de sodio, sacarosa y agua destilada. Sin embargo, el valor de % SRC ácido láctico fue significativamente mayor en la muestra de harina con bajas proporciones de NaCl, con respecto a aquellas en las que se empleó mayor cantidad de dicha sal. Estos resultados muestran la misma tendencia que la observada mediante la técnica de IS-SDS, y se puede concluir que mediante ambas determinaciones se pudo corroborar que la sal interfiere en el proceso de hidratación de las gluteninas, retardando tanto su hidratación como su hinchamiento.

Tabla 4.2.2 Capacidad de retención de solventes de la harina con distintas proporciones de sal.

| Muestra | SRC-Carbonato | SRC-Sacarosa | SRC-Láctico | SRC-Agua |
|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2% NaCl | 90,07±0,36 ^a | 91,01±0,63 ^a | 83,75±0,73 ^a | 71,79±0,35 ^a |
| 1,5% NaCl | 90,60±0,27 ^a | 92,29±1,20 ^a | 84,77±0,01 ^a | 72,82±1,55 ^a |
| 1% NaCl | 90,89±0,72 ^a | 91,63±0,19 ^a | 82,81±1,68 ^a | 72,92±1,84 ^a |
| 0,5% NaCl | 90,53±0,59 ^a | 91,93±1,28 ^a | 89,39±0,99 ^b | 74,01±0,52 ^a |
| 0% NaCl | 90,81±0,01 ^a | 91,81±0,22 ^a | 89,41±0,41 ^b | 71,52±1,14 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

En lo que respecta a las propiedades funcionales de la harina, se determinó el contenido de macropolímero de gluteninas (GMP) y se llevó a cabo un fraccionamiento de las proteínas en base a su solubilidad en distintos solventes (**Figura 4.2.1**).

El GMP corresponde a la fracción de gluteninas que puede ser separada de la masa/harina como una capa de gel insoluble en SDS, por lo que su cantidad y calidad se relaciona con las propiedades de la masa/harina. Una alta correlación positiva fue encontrada entre la cantidad de GMP obtenido de la harina y el volumen de pan (57) (58).

Se elaboraron masas con distintos porcentajes de NaCl, que se dejaron reposar (1 h) y fueron liofilizadas previamente a la determinación. La masa con el mayor porcentaje de NaCl (2%) presentó el mayor contenido de GMP; y a medida que se disminuyó el contenido de sal en la

formulación, se redujo la proporción de GMP obtenido. Estos resultados indicarían que durante la formación de la masa, el NaCl promueve las interacciones entre las proteínas del gluten aumentando la agregación proteica. Este resultado se correlaciona con el observado por Preston (96) sobre el efecto de diversas sales en la extracción de proteínas del gluten y sus propiedades turbidimétricas: a concentraciones de sal entre 0,05-0,5M todas las sales promueven un fuerte "salting out" (precipitación salina de proteínas o polímeros), resultados evidenciados mediante la disminución del contenido de proteínas extraídas y el aumento de la turbidez de la solución.

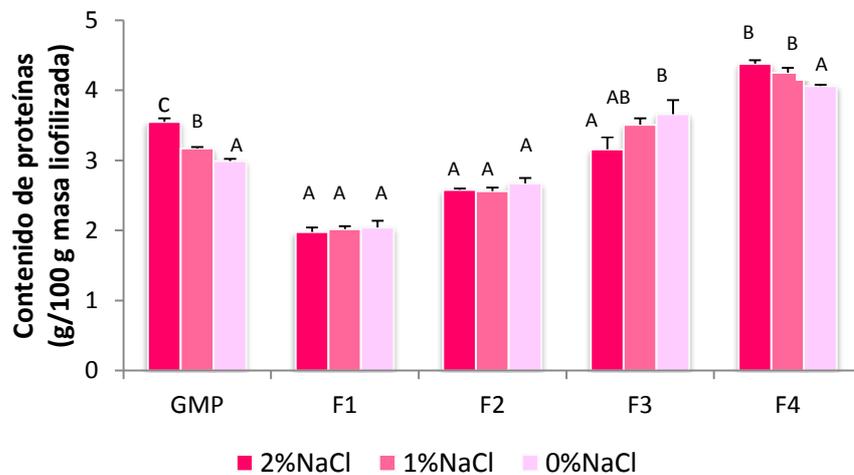


Figura 4.2.1 Macropolímero de gluteninas (GMP) y Fracciones proteicas de harina con mezclas de sal. Letras diferentes en cada clasificación, indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Las proteínas del trigo son una mezcla compleja que para profundizar en su estudio muchas veces se requiere su fraccionamiento. Para analizar el efecto del agregado de distintas proporciones NaCl en la elaboración de la masa sobre las proteínas, se prosiguió a fraccionarlas en base a su diferente solubilidad en distintos solventes. De cada fracción se determinó el contenido de proteínas (g proteínas / 100 g masa liofilizada).

En el primer paso de la extracción (F1) se solubilizaron con una solución de NaCl principalmente albúminas y globulinas. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de estas proteínas extraídas en las muestras con distintos porcentajes de sal en la masa. En el segundo paso de la extracción (F2) se utilizó isopropanol al 70% para

solubilizar a las gliadinas. Nuevamente, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la solubilidad de estas proteínas en las muestras con NaCl y sin la sal. En el tercer paso de extracción (F3) se solubilizaron gluteninas por medio del agregado de SDS 1,5% y, del precipitado resultante, se obtuvo la F4. Se observó que la reducción del NaCl en la formulación de las masas aumentó el contenido de gluteninas presentes en la fracción F3 y disminuyó el contenido de gluteninas insolubles obtenidas en la fracción F4, es decir que la muestra con 2% de NaCl presentó la mayor proporción de gluteninas insolubles. Estos resultados están en concordancia con los expuestos previamente y, nuevamente, ponen en evidencia la función del NaCl sobre la promoción de las interacciones proteicas y la formación de agregados proteicos de mayores tamaños e insolubles. El aumento de las interacciones intra- e inter-proteicas, como consecuencia del agregado de aniones no-chaotrópicos, como el Cl^- , también está asociado al efecto de los iones sobre la estructura del agua, y se debe al incremento de la entropía libre del sistema como resultado de la exposición de grupos apolares en un ambiente acuoso (94) (96).

Efecto del reemplazo de NaCl por KCl

Por otro lado, se evaluó el efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre la calidad tecnológica y funcional de la harina de trigo.

Los valores obtenidos del índice de sedimentación en SDS (IS-SDS) y del índice de retención de agua alcalina (%IRAA) para la harina de trigo con el agregado de mezclas de NaCl:KCl en diferentes proporciones, se presentan en la **Tabla 4.2.3**. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ambos ensayos entre la muestra de harina de trigo con NaCl y con mezclas de NaCl:KCl. Solo el IS-SDS para la muestra con el agregado de 2% de KCl fue significativamente mayor con respecto a las otras muestras ensayadas. Posiblemente esto se relacione con la mayor densidad de carga del ion Na^+ con respecto al ion K^+ . Una mayor densidad de carga podría aumentar el enmascaramiento de las cargas de las proteínas del gluten, haciendo que las interacciones entre los polímeros

sean mayores en presencia de NaCl que en presencia de altos contenidos de KCl.

Tabla 4.2.3 Índice de sedimentación en SDS (IS-SDS) e Índice de retención de agua alcalina (%IRAA) de mezclas de harina con NaCl y KCl

| Muestras | IS-SDS | % IRAA |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2% NaCl | 10,17±0,29 ^a | 78,87±2,06 ^a |
| 1,5% NaCl:0,5% KCl | 10,25±0,35 ^a | 78,94±1,30 ^a |
| 1% NaCl:1% KCl | 10,00±0,01 ^a | 78,66±0,35 ^a |
| 0,5% NaCl:1,5% KCl | 10,50±0,50 ^a | 79,10±0,20 ^a |
| 2% KCl | 11,50±0,01 ^a | 79,29±0,80 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

En la **Tabla 4.2.4** se presentan los resultados obtenidos para el % SRC de las harinas con mezclas de NaCl y KCl para los cuatro solventes empleados. Cuando se utilizó carbonato de sodio y sacarosa como solvente se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los valores de % SRC en las distintas proporciones de NaCl:KCl, sin embargo no se observó una tendencia clara del efecto del reemplazo de NaCl por KCl.

Tabla 4.2.4 Capacidad de retención de solventes de la harina con distintas proporciones de NaCl y KCl.

| Muestra | SRC-Carbonato | SRC-Sacarosa | SRC-Láctico | SRC-Agua |
|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2% NaCl | 90,07±0,35 ^a | 91,01±0,63 ^a | 83,75±0,73 ^a | 71,78±0,35 ^a |
| 1,5%NaCl:0,5%KCl | 91,70±0,07 ^{ab} | 92,13±0,33 ^{ab} | 82,67±2,47 ^a | 72,09±0,19 ^a |
| 1%NaCl:1%KCl | 90,81±0,28 ^b | 92,83±0,74 ^b | 81,00±0,47 ^a | 72,58±0,41 ^a |
| 0,5%NaCl:1,5%KCl | 90,61±0,12 ^c | 95,03±0,51 ^c | 79,54±0,85 ^a | 72,92±1,08 ^a |
| 2% KCl | 91,08±0,15 ^b | 91,85±0,55 ^{ab} | 81,97±0,87 ^a | 73,29±1,12 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Dependiendo de las proporciones de sales utilizadas, éstas pueden afectar en mayor o menor medida la capacidad de retención de estos solventes por los pentosanos, el almidón dañado y las gliadinas de la harina. Los % SRC con agua y ácido láctico de las harinas con NaCl y KCl no presentaron diferencias significativas, indicando que el reemplazo de NaCl por KCl tendría el mismo efecto frente a las gluteninas y a los componentes

hidrofílicos; por lo tanto, las diferencias en las densidades de carga de los iones no afecta a la capacidad de retención de los solventes utilizados. A diferencia de los resultados obtenidos en los ensayos de IS-SDS y % SRC-ácido láctico para la harina con cantidades decrecientes de NaCl, los cuales correlacionaron positivamente; en la harina con mezclas de NaCl:KCl no se observó la misma tendencia.

En la **Figura 4.2.2** se presentan los valores obtenidos de GMP y de las distintas fracciones proteicas extraídas de las masas liofilizadas elaboradas con 2% de NaCl y con distintas proporciones de KCl. El reemplazo de NaCl por KCl disminuyó significativamente el contenido de macropolímero de gluteninas de la masa, con respecto a la muestra en la cual se utilizó solamente NaCl. Este resultado estaría indicando que las sales se comportan de forma diferente, a pesar que son muy similares químicamente; y que el NaCl tiene un efecto mayor sobre las interacciones proteicas favoreciendo la formación de agregados de mayor tamaño e insolubles.

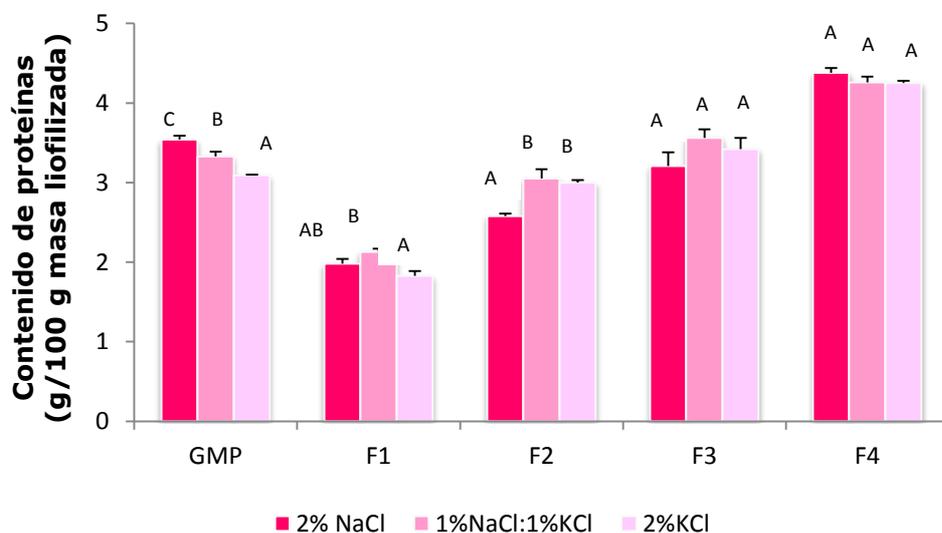


Figura 4.2.2 GMP y Fracciones proteicas de masa de harina de trigo con mezclas de NaCl y KCl. Letras diferentes en la misma columna, para cada clasificación, indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Con respecto al contenido de proteínas de cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de extracción secuencial, se observó que en la masa elaborada con 2% de KCl se disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la solubilidad de albúminas y globulinas (F1), con respecto a las otras dos

masas analizadas. La masa elaborada con 2% NaCl presentó un contenido significativamente menor ($p < 0,05$) de gliadinas (F2) con respecto a las masas en las cuales se utilizó KCl en la formulación, las cuales no presentaron diferencias significativas a pesar de los distintos porcentajes utilizados. En el caso de las gluteninas (F3) y las gluteninas insolubles (F4) no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las cantidades obtenidas en las distintas muestras. Sin embargo, los resultados obtenidos en F3 y F4 muestran la misma tendencia que la obtenida mediante la determinación de GMP.

A partir de todos los resultados obtenidos por medio de las distintas técnicas se puede concluir que el reemplazo de KCl por NaCl podría tener un efecto diferente en las propiedades de las proteínas durante el proceso de elaboración de los productos de panificación. Esto puede deberse a las diferencias de tamaño entre los dos cationes y a las distintas densidades de carga. La diferencia del uso de las sales en la formulación podría, o no, verse reflejada en las características reológicas y térmicas de las masas panarias como así también en la calidad tecnológica del producto final.

4.3. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO Y TÉRMICO DE LAS MASAS PANARIAS CON DISTINTAS PROPORCIONES DE SALES

Efecto de la reducción del NaCl sobre el comportamiento reológico de las masas

El estudio de las características reológicas de la masa es muy importante ya que provee información acerca de su comportamiento durante el proceso de elaboración. Diversos ensayos son utilizados en el análisis de las propiedades reológicas de la masa y el gluten con el fin de conocer la aptitud de una harina para panificación. Sin embargo, es necesario diferenciar entre análisis empíricos y fundamentales, ya que no brindan el mismo tipo de información, y se correlacionan de distinto modo con la composición de la harina y la calidad del gluten.

Cuando se llevan a cabo ensayos empíricos se imita la deformación

aplicada a la masa durante su procesamiento. Estos análisis proveen una medida de las propiedades físicas de la masa y, en general, tienen una buena correlación con la calidad final del pan.

Para evaluar el comportamiento reológico de masas panarias con distintas cantidades de NaCl mediante ensayos empíricos, se llevaron a cabo ensayos farinográficos y alveográficos.

La reducción de NaCl en la masa produjo modificaciones en los parámetros farinográficos (**Tabla 4.3.1**). Como se observó en estudios previos realizados por diversos autores (91) (92) (93) (94) (95), el NaCl redujo significativamente la capacidad de la harina de absorber agua, aumentó el tiempo de desarrollo de la masa y la estabilidad de la misma.

Tabla 4.3.1 Efecto de la reducción del NaCl sobre los parámetros farinográficos

| Muestra | Absorción agua (%) | Tiempo de desarrollo (min) | Estabilidad (min) |
|---------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| 2% NaCl | 58,9±0,2 ^a | 13,9±1,1 ^c | 18,3±0,2 ^c |
| 1% NaCl | 59,7±0,0 ^b | 11,3±0,2 ^b | 13,7±0,6 ^b |
| 0% NaCl | 62,8±0,1 ^c | 7,4±0,4 ^a | 9,9±0,6 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

El efecto del NaCl sobre la capacidad de absorción de agua de la harina de trigo se debe a la competencia de los iones sodio y cloruro con las moléculas de agua sobre la superficie de las proteínas: los iones interaccionan con las cadenas laterales de las proteínas y dificultan la absorción de agua por parte de la harina (89) (91).

Las proteínas del gluten son las que determinan las propiedades físicas de una masa de harina de trigo. Los cambios que ocurren en la estructura y las propiedades de los sistemas proteicos como consecuencia de la incorporación de sales neutras, son atribuidos al efecto de las interacciones electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas (94). A bajas concentraciones de sal, como son los casos de estudio, el efecto que predomina son las interacciones electrostáticas entre los iones de la sal y los aminoácidos de la superficie de las proteínas (94).

El desarrollo de la masa consiste en la hidratación de las proteínas y la formación de interacciones entre gluteninas y gliadinas (67). La masa

panaria es un sistema de harina y agua, que se encuentra a pH 6. Bajo esta condición de pH, las proteínas del gluten presentan cargas positivas y se produce la repulsión electrostática entre ellas, haciendo que las proteínas se hidraten rápidamente (86). Sin embargo, la repulsión electrostática mantiene a las cadenas de proteínas alejadas unas con otras, dificultando la interacción entre gliadinas y gluteninas, lo que resulta en una masa más débil.

Como se dijo anteriormente, bajos niveles de sal, enmascaran las cargas de las proteínas; disminuyendo las repulsiones electrostáticas y permitiendo a las cadenas proteicas aproximarse unas con otras. Esto hace que las proteínas se hidraten más lentamente y permite que interaccionen por medio de interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, resultando en un incremento de la estructura β -sheet entre las proteínas (119) y la formación de grandes estructuras fibrilares que conducen a una masa más fuerte y con mayor estabilidad.

McCann y Day (88) evaluaron la influencia del NaCl en el tiempo de desarrollo de la masa por medio de microscopía confocal láser de barrido (MCLS) y observaron que, en ausencia de sal, la red de gluten comenzaba a formarse a los 2 min de mezclado y estaba completamente desarrollada a los 6 min, mientras que la muestra con 2% de sal mostró grandes hebras de proteínas a los 6 min y se desarrolló completamente cerca del tiempo final de mezclado (20 min). Con esto demostraron que la hidratación de las proteínas y el desarrollo de la matriz de gluten en la masa son más lentos en presencia de NaCl. En conclusión, el NaCl aumenta el tiempo de desarrollo de la masa debido a que la hidratación de las proteínas es más lenta y hay una mayor interacción entre proteínas, lo que a su vez, favorece la estabilidad de la masa debido a la formación de una masa más fuerte y elástica.

Por medio de los estudios alveográficos se obtuvieron los valores de tenacidad (P), extensibilidad (L), la relación entre ellos (P/L) y el área de la curva o fuerza de masa (W) (**Tabla 4.3.2**). No se observó una clara tendencia en la extensibilidad de la masa, siendo el mayor valor obtenido correspondiente a la muestra con 1% de NaCl. La relación entre dichos

parámetros tampoco mostró una tendencia clara conforme se redujo el contenido de NaCl. La tenacidad de la masa y el valor área bajo la curva, disminuyeron significativamente con la disminución del contenido de NaCl. Nuevamente, se puede ver el efecto de la sal sobre las interacciones electrostáticas de las proteínas del gluten y la promoción de las interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro a mayores cantidades de NaCl, lo que se ve reflejado en un aumento en la tenacidad de la masa en presencia de sal así como en los mayores valores del parámetro W.

Tabla 4.3.2 Efecto de la reducción del NaCl sobre los parámetros alveográficos

| Muestra | P | L | P/L | W |
|---------|------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2% NaCl | 149,0±4,2 ^c | 52,0±1,4 ^a | 2,87±0,01 ^b | 264,0±7,07 ^c |
| 1% NaCl | 133,0±7,1 ^b | 60,0±1,4 ^b | 2,22±0,17 ^a | 232,0±12,7 ^b |
| 0% NaCl | 121,5±3,5 ^a | 47,5±2,1 ^a | 2,57±0,19 ^{ab} | 199,5±7,8 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Los ensayos realizados por medio del farinógrafo y alveógrafo, si bien proveen información valiosa para inferir en la calidad final del pan, proporcionan medidas empíricas por lo que los resultados no pueden ser interpretados en términos de las propiedades de los componentes de la masa (120). En los test de reología fundamental se aplican pequeñas deformaciones que reflejan las propiedades de los polímeros, tales como distribución de tamaño, y grado y tipo de entrecruzamientos (121). Debido a que la masa es un sistema viscoelástico complejo en el cual la red de gluten está embebida en la matriz de almidón, en muchas ocasiones las interacciones almidón-almidón y almidón-proteína enmascaran las interacciones proteína-proteína, las cuales no pueden ser resueltas por estos ensayos, y es por ello que pueden no correlacionar con la calidad final del pan (122) (123) (124).

Los ensayos dinámicos, especialmente en la región viscoelástica lineal, se utilizan para comprender la estructura y las propiedades de la masa, y para estudiar la función de los ingredientes (125). Estos ensayos miden simultáneamente características viscosas y elásticas de la masa cómo el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G''), la tangente

(δ) y el módulo complejo (G^*).

En las masas elaboradas con reducción de sodio, así como en el control con 2% de NaCl, los valores de G' fueron superiores a los valores G'' a lo largo de todo el rango de frecuencia estudiado, indicando un comportamiento viscoelástico de las masas, con predominio de la componente elástica (**Figura 4.3.1**).

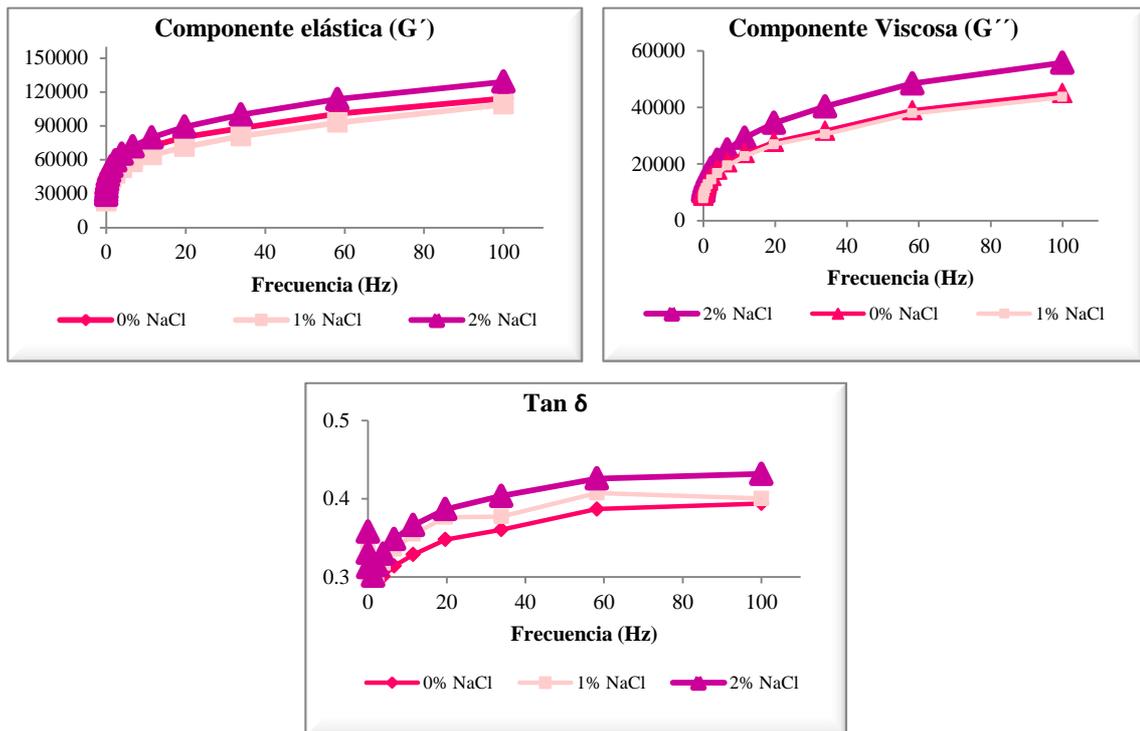


Figura 4.3.1 Comportamiento reológico de masas con reducción de NaCl

La reducción del NaCl no produjo cambios significativos en la viscoelasticidad de la masa ($\tan \delta$), pero si disminuyó significativamente el valor de los módulos G' y G'' , significando una mayor interacción entre las proteínas en presencia de sal, lo que refuerza la red de gluten. La disminución del valor de los módulos con la reducción del contenido de NaCl coinciden con los resultados expuestos previamente por Larsson (126) y Beck et al. (89). Mayores valores de G' y G'' a mayor contenido de sal, estaría indicando una mayor agregación proteica, resultados que coinciden con los obtenidos por medio del empleo de ensayos de reología empírica y mediante la caracterización de las proteínas. Sin embargo, estos resultados se contradicen con los encontrados por Lynch et al. (90)

y Angioloni y Dalla-Rosa (101). Wu et al. (127) en sus estudios reológicos de masas de noodles demostraron que el módulo elástico de masas elaboradas con harinas de diferente composición proteica presentaron una tendencia diferente a medida que se disminuyó el contenido de sal en el sistema.

Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre el comportamiento reológico de las masas

Las masas elaboradas mediante el reemplazo de KCl por NaCl también fueron evaluadas por medio de ensayos reológicos, tanto empíricos como fundamentales.

El reemplazo de NaCl por KCl en la elaboración de las masas no mostró diferencias significativas en la absorción de agua y el tiempo de desarrollo, resultados que coinciden con los expuestos por Salovaara (95). Con respecto a la estabilidad de la masa, se observó una disminución de dicho parámetro cuando se utilizó KCl en la formulación (**Tabla 4.3.3**). Sin embargo, a pesar que la disminución de la estabilidad fue significativa ($p < 0,05$), el valor fue levemente menor al de la masa con NaCl y muy superior al obtenido cuando no se incorporó sal en la masa, lo que estaría indicando que podría utilizarse como reemplazante del NaCl en la formulación del pan. La estabilidad de la masa es un indicador de la tolerancia de la masa al amasado. En presencia de KCl, al igual que con NaCl, se produce una fuerte interacción entre las proteínas, siendo masas más resistentes al amasado.

Tabla 4.3.3 Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre los parámetros farinográficos

| Muestra | Absorción agua (%) | Tiempo de desarrollo (min) | Estabilidad (min) |
|----------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 2 %NaCl | 58,95±0,21 ^a | 13,9±1,1 ^a | 18,25±0,21 ^b |
| 1% NaCl:1% KCl | 58,25±0,07 ^a | 12,0±0,0 ^a | 16,80±0,24 ^a |
| 2% KCl | 58,20±0,42 ^a | 12,6±0,4 ^a | 16,40±0,00 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Con respecto a los valores obtenidos por medio de los ensayos alveográficos (**Tabla 4.3.4**), el reemplazo del 50% de NaCl por KCl no mostró un efecto marcado sobre estos parámetros, indicando que durante la fermentación de las piezas panarias las masas tendrán un comportamiento similar y la calidad del pan probablemente no disminuya. Cuando se utilizó 2% KCl en la formulación de la masa no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la extensibilidad de la masa, sin embargo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) del valor P, P/L y W de la masas con respecto a las muestras en las que se incorporó NaCl.

Tabla 4.3.4. Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre los parámetros alveográficos

| Muestra | P | L | P/L | W |
|--------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| 2% NaCl | 149,0±4,2 ^b | 52,0±1,4 ^a | 2,87±0,01 ^b | 264±7 ^b |
| 1% Na:1% KCl | 148,0±1,4 ^b | 53,0±4,2 ^a | 2,81±0,25 ^{ab} | 261±4 ^b |
| 2% KCl | 138,0±0,0 ^a | 60,0±4,2 ^a | 2,29±0,19 ^a | 242±3 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

En la **Figura 4.3.2** se muestran los resultados obtenidos por medio de reología dinámica de las muestras de masas elaboradas con 2% de NaCl, 2% KCl y mezcla de éstas. Los valores de G' fueron superiores a los valores de G'' , para todas las muestras en el rango de frecuencias evaluadas, lo que indica un comportamiento viscoelástico, con predominio de la componente elástica. Los valores tanto del módulo de almacenamiento como del módulo de pérdida disminuyeron de forma significativa cuando se reemplazó el NaCl por KCl de forma parcial o total. Esto podría indicar que las interacciones entre las proteínas y su agregación es levemente menor en presencia de KCl con respecto al uso de NaCl, como fue visto previamente en los ensayos de caracterización de la harina (GMP) y mediante los ensayos de reología empírica. Sin embargo, estas modificaciones no son lo suficientemente importantes como las que se observaron en la masa elaborada sin NaCl, por lo que el reemplazo de NaCl por KCl es una buena alternativa en lo que respecta a las características de la masa.

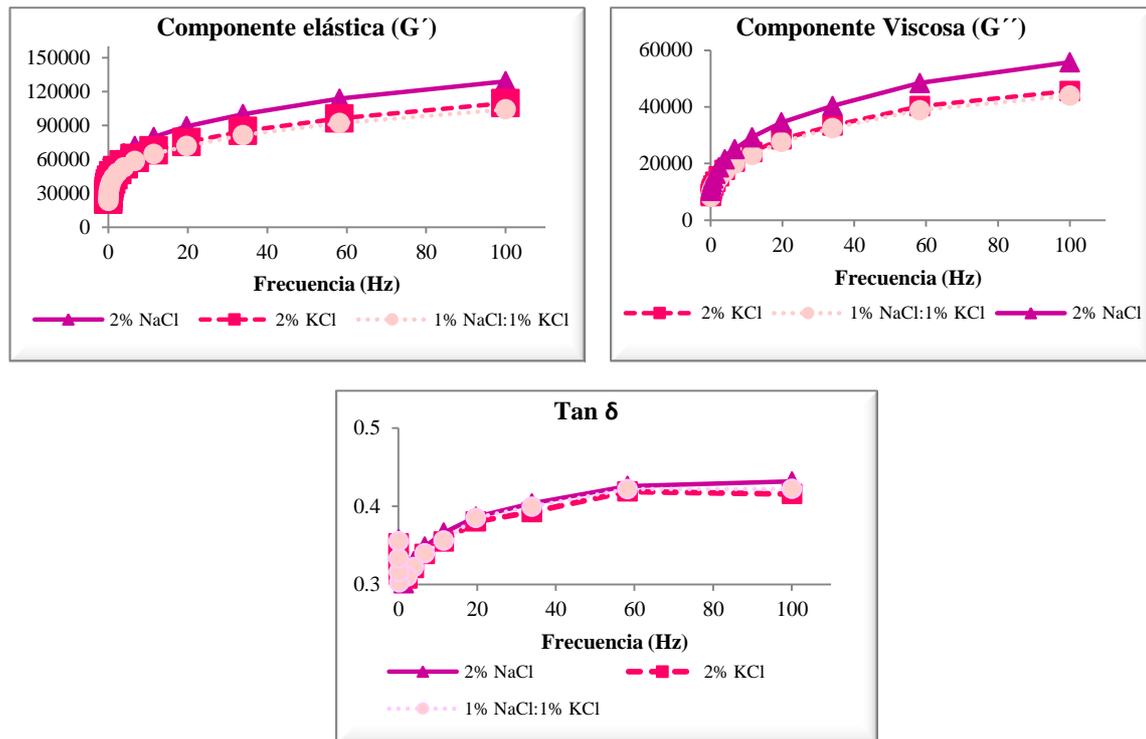


Figura 4.3.2. Comportamiento reológico de masas con mezclas de NaCl y KCl

Efecto de la reducción de NaCl sobre las propiedades térmicas de masas panarias

Diversos estudios han demostrado que el NaCl afecta al proceso de gelatinización del almidón (128) (129). La gelatinización del almidón es un proceso importante durante la elaboración del pan e influye en sus características finales. A su vez, es afectada por los demás componentes presentes en la masa. Las técnicas calorimétricas se han utilizado ampliamente para entender la estructura y las transiciones de fase en el almidón tanto puro como en sistemas alimenticios. Con el objetivo de analizar la influencia de la reducción de sal en la masa del pan de molde durante el proceso de gelatinización del almidón, se simularon las condiciones de horneado en un calorímetro diferencial de barrido (DSC). De los termogramas obtenidos se evaluó la temperatura de onset (T_o), la temperatura de pico (T_p), la temperatura de endset (T_e), el rango de temperatura (ΔT_g) y la entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g) de las masas panarias (**Tabla 4.3.5**).

Se encontró que la reducción de sal en la masa de pan disminuyó la

temperatura de gelatinización (T_o) así como la T_p y la T_e , resultados que concuerdan con los observados para diversos autores al evaluar el efecto de la sal en la gelatinización del almidón (128) (129). El efecto del NaCl sobre la gelatinización del almidón ha sido asociado, por un lado, a la acción de la sal sobre el agua del sistema; y por otro lado a las interacciones electrostáticas entre la sal y los grupos oxidrilos del almidón (130) (127). Chiotelli et al. (131) relacionaron la mayor temperatura de gelatinización del almidón disperso en una solución de NaCl a un aumento en la viscosidad del sistema, lo que retarda la hidratación y la desorganización estructural de los gránulos de almidón.

La visualización de la endoterma de gelatinización está fuertemente afectada por la disponibilidad de agua. Así, para mezclas almidón/agua que contienen más de un 60% de agua (p/p), se observa una sola endoterma simétrica. Mientras que cuando la cantidad de agua es entre intermedia y limitada, la gelatinización ocurre más lentamente y comienzan a observarse dos endotermas de transición: una correspondiente a la gelatinización del almidón y otra a la de la fusión de los cristales más estables (132). En los resultados obtenidos, se observó una disminución tanto del AHg como del ATg a medida que se redujo la sal en la muestra. Al incorporar NaCl en el sistema disminuye el agua disponible para la gelatinización, lo que hace que una mayor parte de los cristales más estables fundan en lugar de gelatinizar. Esto lleva a la fusión de las endoterma de gelatinización y de fusión de cristales más estables del almidón, lo que aumenta el valor de AHg y ATg.

Tabla 4.3.5. Efecto de la reducción de NaCl sobre la gelatinización del almidón

| Muestra | AHg | T_o (°C) | T_p (°C) | T_e (°C) | ATg (°C) |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2% NaCl | 1,66±0,04 ^b | 61,73±0,56 ^b | 72,90±0,22 ^c | 84,93±0,64 ^b | 23,51±0,87 ^b |
| 1% NaCl | 1,59±0,04 ^{ab} | 61,56±0,71 ^b | 72,22±0,18 ^b | 82,68±0,48 ^{ab} | 21,06±0,81 ^{ab} |
| 0% NaCl | 1,44±0,08 ^a | 60,17±0,03 ^a | 70,83±1,50 ^a | 79,83±1,36 ^a | 19,60±1,47 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Cuando una muestra de pan envejecido es calentada en la cápsula de

DSC, se observa una nueva endoterma cuyo pico de temperatura se relaciona con la temperatura a la cual funde la amilopectina retrogradada, y el cambio entálpico asociado a esa transición de fase puede ser medido. Debido a que la escala de tiempo en la cual transcurre la endoterma y el incremento de la firmeza de la miga son globalmente similares en magnitud, el DSC puede ser utilizado para cuantificar la tasa de envejecimiento (133). Sin embargo, mientras que la medida de firmeza obtenida a partir del ensayo de deformación (TPA) es dependiente del volumen de pan, la retrogradación de la amilopectina no parece estar relacionada con este parámetro (134).

Con el objetivo de analizar el proceso de retrogradación del almidón, las muestras horneadas en el DSC fueron sometidas a un segundo ensayo calorimétrico luego del almacenamiento.

Tabla 4.3.6 Efecto de la reducción de NaCl sobre la retrogradación del almidón

| Muestra | AHr | To (°C) | Tp (°C) | Te (°C) | ATr (°C) |
|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Día 1 | | | | | |
| 2% NaCl | 0,10±0,01 ^a | 56,26±0,39 ^a | 62,80±1,65 ^a | 69,45±2,12 ^a | 12,20±0,83 ^a |
| 1% NaCl | 0,33±0,02 ^b | 55,35±0,89 ^a | 64,95±0,10 ^a | 76,54±0,07 ^b | 20,97±0,52 ^c |
| 0% NaCl | 0,43±0,03 ^c | 55,94±0,41 ^a | 64,40±1,32 ^a | 72,77±0,57 ^{ab} | 16,82±0,98 ^b |
| Día 3 | | | | | |
| 2% NaCl | 0,69±0,01 ^a | 56,06±0,49 ^a | 65,15±0,20 ^a | 77,41±0,71 ^{ab} | 21,38±0,21 ^a |
| 1% NaCl | 0,74±0,03 ^b | 57,14±0,18 ^a | 66,02±0,51 ^a | 78,65±0,35 ^b | 21,50±0,53 ^a |
| 0% NaCl | 1,06±0,01 ^c | 55,38±1,60 ^a | 65,26±0,55 ^a | 76,30±0,73 ^a | 20,91±2,00 ^a |

Letras diferentes en la misma columna, para cada día, indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Se pudo observar que la reducción del NaCl aumentó significativamente la entalpía de retrogradación (AHr) al día 1 y al día 3 de almacenamiento. A su vez, el mayor tiempo de almacenamiento aumentó significativamente el AHr para cada formulación (**Tabla 4.3.6**). Una mayor entalpía de retrogradación en las muestras sin NaCl podría indicar que estos panes tendrán una mayor dureza durante su almacenamiento y una mayor velocidad de envejecimiento.

Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre las propiedades térmicas de masas panarias

De la misma manera que para la reducción de NaCl, en el presente estudio se evaluó el efecto del reemplazo del NaCl por KCl sobre las propiedades de gelatinización del almidón en la masa de pan. A partir de los termogramas obtenidos (**Tabla 4.3.7**) se observó que la temperatura de inicio de gelatinización aumentó a medida que se reemplazó la sal. Estos resultados no coinciden con los expuestos por Janes y Ames (130), quienes informaron que el incremento en la T_o siguió el mismo orden que el aumento de la densidad de carga de los iones de los metales alcalinos: $LiCl > NaCl > KCl > RbCl$. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la temperatura de pico y en la temperatura de finalización de la gelatinización. A su vez, se observó una disminución del AHg y ATg a medida que se reemplazó el NaCl por KCl. Posiblemente, el NaCl tenga una mayor interacción con el agua del sistema, lo que haga que una mayor cantidad de cristales estables fundan.

Tabla 4.3.7 Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre la gelatinización del almidón

| Muestra | AHg | T_o (°C) | T_p (°C) | T_e (°C) | ATg (°C) |
|--------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2% NaCl | 1,66±0,04 ^b | 61,17±0,56 ^a | 72,89±0,22 ^a | 84,93±0,64 ^a | 23,51±0,88 ^b |
| 1%NaCl:1%KCl | 1,68±0,12 ^b | 62,44±0,99 ^{ab} | 73,46±0,95 ^a | 85,46±2,16 ^a | 23,03±1,32 ^b |
| 2% KCl | 1,05±0,01 ^a | 63,56±1,01 ^b | 72,96±0,48 ^a | 82,12±1,59 ^a | 18,57±0,57 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

También se llevó a cabo un segundo proceso de horneado en el DSC de las masas elaboradas por reemplazó de NaCl por KCl, gelatinizadas y almacenadas bajo condiciones controladas, para evaluar su efecto en la retrogradación del almidón. Como se puede ver en la **Tabla 4.3.8** la entalpía de retrogradación aumentó con el tiempo de almacenamiento para cada formulación. El reemplazo del 50% de NaCl por KCl modificó levemente la entalpía de retrogradación, observándose diferencias significativas solo al día 1 de almacenamiento. El uso de KCl aumentó el AHr tanto al día 1 como al día 3 de almacenamiento, con respecto al uso del NaCl.

Tabla 4.3.8 Efecto de la reducción de NaCl sobre la retrogradación del almidón

| Muestra | AHr | To (°C) | Tp (°C) | Te (°C) | ATr (°C) |
|---------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Día 1 | | | | | |
| 2% NaCl | 0,10±0,01 ^a | 57,25±1,39 ^b | 62,80±1,65 ^a | 69,45±2,22 ^a | 12,21±0,83 ^a |
| 1% NaCl:1%KCl | 0,23±0,04 ^b | 52,99±2,31 ^a | 64,69±1,40 ^a | 77,05±0,99 ^b | 24,06±1,30 ^c |
| 2% KCl | 0,21±0,01 ^b | 56,67±0,11 ^{ab} | 63,61±0,94 ^a | 72,41±0,11 ^a | 15,74±0,22 ^b |
| Día 3 | | | | | |
| 2% NaCl | 0,69±0,01 ^a | 56,06±0,49 ^b | 65,15±0,20 ^a | 77,41±0,71 ^b | 21,38±0,21 ^b |
| 1% NaCl:1%KCl | 0,65±0,04 ^a | 56,10±0,09 ^b | 65,23±0,71 ^a | 75,49±0,70 ^a | 19,39±0,79 ^a |
| 2% KCl | 0,95±0,01 ^b | 54,87±0,09 ^a | 64,80±0,22 ^a | 76,07±0,11 ^{ab} | 21,20±0,02 ^b |

Letras diferentes en la misma columna, para cada clasificación, indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

4.4. CALIDAD TECNOLÓGICA DEL PAN

Efecto de la reducción de NaCl sobre la calidad del pan

Entre los criterios de aceptación del pan por parte del consumidor se encuentran la formación de un pan con alto volumen específico y una miga tierna con alveolado pequeño y uniforme. La metodología de pan de molde es llevada a cabo con el fin de obtener un producto panificado que presente una relación de forma específica (alto/ancho) y que permita expresar mejor las diferencias que puedan ser encontradas entre las distintas formulaciones.

En la **Tabla 4.4.1** se muestran los resultados correspondientes al volumen específico y la firmeza inicial de la miga de los panes elaborados mediante la reducción de NaCl en la formulación.

Tabla 4.4.1 Efecto de la reducción de NaCl sobre la calidad del pan

| Muestra | Volumen Específico (cm ³ /g) | Firmeza Inicial (N) |
|---------|---|---------------------|
| 2% NaCl | 3,16±0,03 ^b | 533±27 ^a |
| 1% NaCl | 3,17±0,04 ^b | 601±69 ^a |
| 0% NaCl | 2,90±0,05 ^a | 717±60 ^b |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

El pan elaborado sin NaCl presentó un volumen específico

significativamente menor ($p > 0,05$) con respecto al obtenido en las muestras con NaCl. Esto se observa también en la **Figura 4.4.1**, en la cual se presenta la imagen escaneada de una rodaja de la zona central de los panes elaborados.

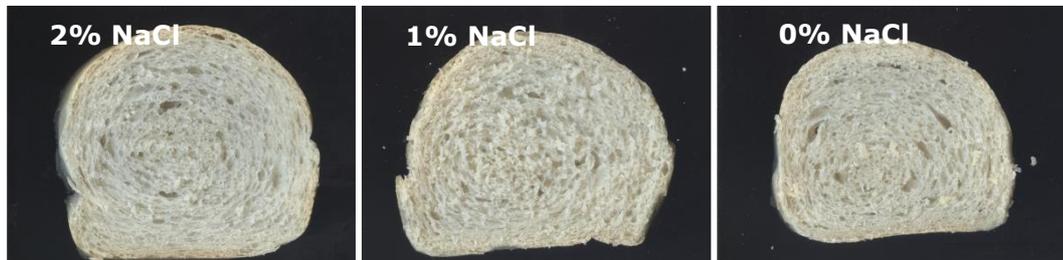


Figura 4.4.1. Rodajas de la zona central de los pan elaborados con reducción del contenido de NaCl, escaneadas.

En las imágenes se puede ver que el tamaño de los panes elaborados con 2% y 1% de NaCl son muy similares entre sí, sin embargo el pan elaborado sin sal es más pequeño. Resultados similares fueron reportados por diversos autores (85) (86) (87) (88). Sin embargo, algunos estudios no encontraron variaciones en el valor del volumen específico con la disminución de NaCl (90). Estas diferencias se pueden deber a la calidad de harina de trigo utilizada, más precisamente a su calidad proteica. McCann y Day (88) observaron que el efecto de la sal sobre el volumen del pan y el número total de celdas de gas de la miga de pan era más evidente en pan elaborado con harina de trigo con un contenido bajo de proteínas que en un pan elaborado con una harina de trigo con elevado contenido proteico. También, la formulación utilizada y las condiciones de elaboración del producto pueden ser las responsables de las discrepancias entre los distintos estudios.

Con respecto a la firmeza inicial de la miga de los panes elaborados con reducción del contenido de sodio, como era de esperar, aquellos que presentaron un mayor volumen específico (2%NaCl y 1%NaCl) tuvieron una menor firmeza inicial que el pan sin agregado de sodio, lo que significa una miga más tierna. A su vez, una reducción del 50% de NaCl permitió obtener panes de calidad similar que al pan elaborado con 100% de sal.

A partir de las imágenes escaneadas de una rodaja de la zona central de los panes elaborados (**Figura 4.4.1**) se llevó a cabo un análisis de la microestructura de la miga del pan, en la cual se determinó el número de alveolos y el tamaño promedio de los mismos.

Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 4.4.2** y muestran que la reducción de NaCl de la formulación aumenta el número de alveolos, siendo menor el tamaño promedio de los mismos. Esto es lógico considerando el menor volumen de los panes sin sal. Esta misma tendencia fue observada en estudios previos realizados por Noort et al. (135).

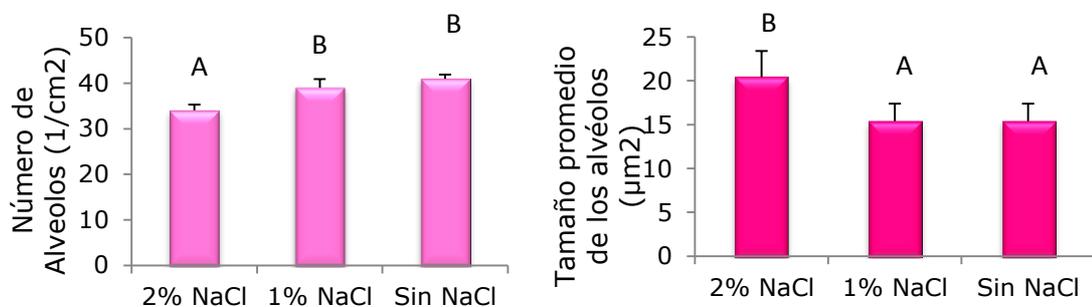


Figura 4.4.2. Análisis de imagen de la miga de los panes elaborados con reducción de NaCl. Letras diferentes en la misma imagen indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

En resumen, el agregado de sal permite obtener panes con un alto volumen específico, baja firmeza inicial y con una estructura de miga más abierta con grandes alvéolos. Estas diferencias con respecto al pan sin sal pueden deberse al reforzamiento de la estructura de las celdas de gas por aumento de las interacciones entre las proteínas que permitieron una mayor expansión de las piezas de pan durante el horneado.

El envejecimiento del pan es un fenómeno complejo que lleva a una disminución de la aceptación por parte del consumidor y que puede ocasionar grandes pérdidas económicas. Durante su almacenamiento, el pan pierde gradualmente su frescura y experimenta cambios en el aroma y sabor. El proceso de envejecimiento del pan comprende, principalmente, los siguientes aspectos: pérdida de la crujibilidad de la corteza, y aumento de la firmeza y disminución de la elasticidad de la miga (136). En general,

este fenómeno es evaluado por el incremento en la firmeza de la miga en el tiempo. Sin embargo, esta propiedad está además influenciada por sus características estructurales y el volumen de pan. En la evolución de la dureza de la miga, dos mecanismos son admitidos como válidos, la pérdida de humedad desde la miga hacia la corteza y la recristalización de la amilopectina (136). A causa de que la amilosa retrograda rápidamente luego del enfriamiento del pan, se considera que contribuye poco o nada en el endurecimiento de la miga durante su almacenamiento (72).

Como se puede ver en la **Figura 4.4.3**, la velocidad de envejecimiento de la miga del pan elaborado sin agregado de sal fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en los panes en los que se incorporó alguna de las sales estudiadas. Esto se puede ver a través de la pendiente del gráfico de firmeza en función de los días de almacenamiento, la cual es superior en el caso del pan elaborado sin NaCl y disminuye con el agregado de sal en la formulación.

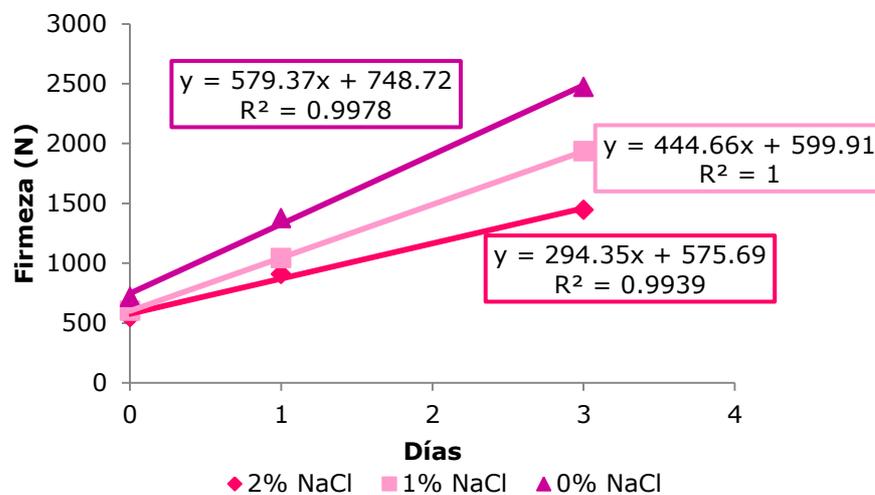


Figura 4.4.3 Evolución de la firmeza durante el almacenamiento, en panes obtenidos por reducción de NaCl.

La tasa de retrogradación del almidón es directamente proporcional al contenido de humedad. La sal, al disminuir la movilidad del agua, reduce la tasa de migración de agua desde el interior de la miga hacia la corteza del pan. Esto resulta en un sistema más hidratado que envejece a una velocidad menor cuando es comparado con sistemas en los que la sal no

está presente (90) (137).

Por último se evaluó el color de la corteza de los panes y se observó que la reducción del NaCl produce un aumento de la luminosidad y una disminución del valor a^* y b^* (**Tabla 4.4.2**) indicando la obtención de panes con corteza más clara. El desarrollo del color en el pan es resultado de las reacciones de caramelización y las reacciones de Maillard, las cuales están influenciadas por el contenido de agua, el pH, la cantidad de azúcares reductoras y los aminoácidos (138) (139).

Durante la fermentación, las levaduras convierten los carbohidratos provenientes de la harina en CO_2 y etanol. El NaCl limita la actividad metabólica de las levaduras debido al aumento de la presión osmótica de las levaduras en presencia de la sal; y como consecuencia de la acción de los iones Na^+ y Cl^- sobre la membrana de las levaduras (30). En las masas sin sal se produce una excesiva fermentación, y posiblemente el menor contenido de azúcares como consecuencia de la mayor velocidad de fermentación sea la responsable de la disminución de las reacciones de caramelización y las reacciones de Maillard que resulte en panes con corteza más blanca.

Tabla 4.4.2 Color de la corteza de los panes elaborados con cantidades decrecientes de NaCl

| Muestra | L | a^* | b^* |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2% NaCl | 66,2±1,2 ^a | 11,9±0,6 ^c | 37,9±0,9 ^c |
| 1% NaCl | 71,4±0,1 ^b | 8,4±0,3 ^b | 35,7±0,9 ^b |
| 0% NaCl | 72,2±1,9 ^b | 6,6±0,9 ^a | 34,2±1,5 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre la calidad del pan

La **Tabla 4.4.3** muestra los resultados obtenidos en los ensayos de calidad de panes elaborados con mezclas de las sales evaluadas. Se puede ver que el reemplazo parcial o total de NaCl por KCl permitió obtener panes con un volumen específico similar al de la muestra elaborada con 2% de NaCl, resultados que pueden observarse también a partir de la

Figura 4.4.4, en la cual se presentan las imágenes escaneadas de las rodajas obtenidas de la zona central de los panes. Si bien, en los ensayos anteriores observamos que el KCl causaba una disminución significativa de las interacciones proteicas, lo que posiblemente debilite la red de gluten, este efecto no se observó en la calidad del producto final.

Tabla 4.4.3 Efecto del reemplazo de NaCl por KCl sobre la calidad del pan

| Muestra | Volumen específico (cm³/g) | Firmeza Inicial (N) |
|----------------|--|--------------------------------|
| 2% NaCl | 3,16±0,03 ^a | 532,79±27,47 ^b |
| 1% NaCl:1%KCl | 3,06±0,11 ^a | 531,01±50,70 ^b |
| 2% KCl | 3,20±0,04 ^a | 466,94±43,19 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Con respecto a la firmeza, no se obtuvieron diferencias significativas en el valor obtenido entre las muestras elaboradas con mezclas parciales de sales y el pan elaborado con 2% de NaCl, sin embargo, el valor de firmeza inicial obtenido en el pan con 2% de KCl fue menor que para las otras muestras.

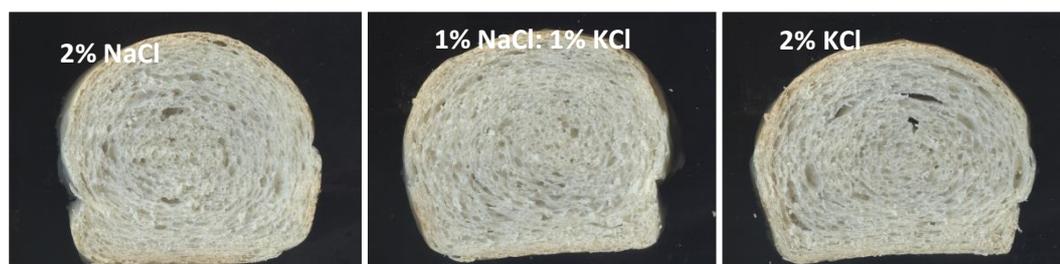


Figura 4.4.4 Rodajas de la zona central de los panes elaborados por reemplazo de NaCl por KCl, escaneadas.

A partir de las imágenes escaneadas de la zona central de la miga de los panes (**Figura 4.4.4**) se llevó a cabo el análisis de la microestructura de la miga.

No se observaron diferencias significativas en el número de alveolos y en el área promedio de los alveolos de los panes elaborados con NaCl y reemplazo parcial o total de KCl (**Figura 4.4.5**).

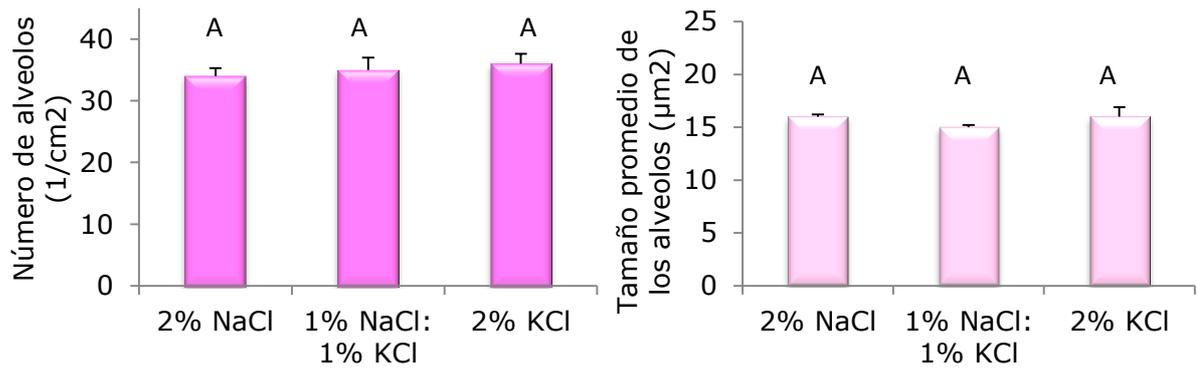


Figura 4.4.5. Análisis de imagen de la miga de los panes elaborados con reemplazo de NaCl por KCl. Letras diferentes en la misma imagen indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Además, la velocidad de envejecimiento del pan no se vio afectado por el reemplazo de NaCl por KCl, tal como se puede ver en la **Figura 4.4.6** en la cual las pendientes de las curvas son muy similares.

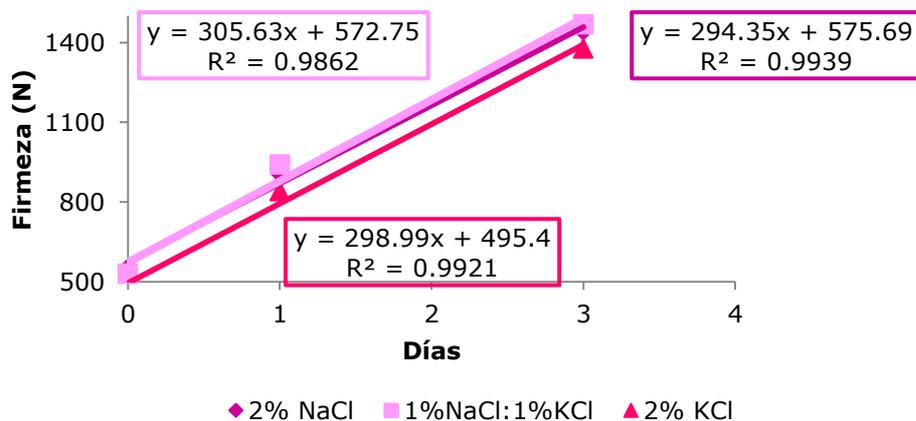


Figura 4.4.6 Evolución de la firmeza durante el almacenamiento, en panes obtenidos por reemplazo de NaCl por KCl

A partir de estas determinaciones se puede ver que el uso KCl en la formulación de las masas panarias no produce grandes cambios en los principales parámetros de calidad tecnológica del producto final, cuando se compara con el uso de NaCl, por lo tanto puede ser utilizada como reemplazante de ésta última.

Por último, se determinó el color de la corteza de los panes. Como se puede ver en la **Tabla 4.4.4**, el reemplazo de NaCl por KCl no produjo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el valor de luminosidad y en los

parámetros a^* y b^* . Simsek y Martinez (140), en su reciente trabajo publicado sobre la calidad de panes elaborados con sal marina, caracterizada por presentar un elevado contenido de KCl y Mg_2Cl , observaron que la corteza de panes elaborados con altos niveles de dicha sal (2% y 3%) fue significativamente más clara que en los panes con menor contenido de sal marina y los elaborados con NaCl; y atribuyeron estos resultados a la presencia de los minerales Mg y K.

Tabla 4.4.4 Color de la corteza de panes elaborados por reemplazo de NaCl por KCl

| Muestra | L | a^* | b^* |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2% NaCl | 66,2±1,2 ^a | 11,9±0,6 ^a | 37,9±0,9 ^a |
| 1%NaCl:1%KCl | 67,1±0,5 ^a | 12,1±0,7 ^a | 37,3±1,2 ^a |
| 2% KCl | 64,5±1,4 ^a | 12,8±0,4 ^a | 38,0±1,2 ^a |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

4.5. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL PAN

4.5.1. Umbral de diferencia de KCl en pan

Salovaara (102) evaluó el efecto del KCl sobre las características sensoriales del pan y encontró que, a altas concentraciones, imparte un sabor indeseable, descrito como metálico o amargo. Con el objetivo de determinar la cantidad de NaCl que puede reemplazarse por KCl en la formulación del pan de molde sin que se detecten diferencias significativas con respecto a un pan elaborado con el contenido regular de NaCl, se llevó a cabo un ensayo de detección de umbral de diferencia. El umbral de diferencia se define como el grado de cambio en el estímulo necesario para producir un cambio detectable en la percepción. Los umbrales suelen estar mal definidos, son difíciles de determinar y no se puede obtener un valor preciso, ya que la habilidad para detectar una sustancia es influenciada por factores psicológicos y el criterio usado en producir una respuesta. Sin embargo, existe un rango de concentraciones en donde por

debajo del cual la sustancia no es detectada bajo ninguna circunstancia y por encima del cual puede detectarse (113).

Para llevar a cabo el análisis sensorial de detección de umbral de KCl en pan, se le presentaron a los panelistas pares de panes, uno elaborado con 2% NaCl y otro con una cierta concentración de KCl, los pares fueron presentados en concentraciones ascendentes y se les pidió que indiquen cuál de las muestras presentaba mayor sabor amargo o metálico. Luego se analizó la cantidad de respuestas correctas en cada par de muestras. En la **Figura 4.5.1** se presenta el porcentaje de respuestas correctas en función del logaritmo de la concentración. A partir del gráfico se puede observar que se logró un buen ajuste de la recta con un R^2 de 0,8902. De la ecuación de la recta se logró obtener la proporción correspondiente al umbral de diferencia, definida como el porcentaje de KCl correspondiente al 75% de respuestas correctas, la cual corresponde a 0,8918% de KCl. En función de este resultado, se puede considerar que las proporciones de sales a incorporar en la formulación a partir de la cual se comienza a detectar el KCl es: 1,11:0,89 NaCl:KCl.

El KCl puede ser utilizado en la formulación del pan de molde como reemplazante del NaCl hasta un 0,89% del contenido de sal regular (2%) sin que sea detectado por su característico sabor. Esto corresponde a una disminución del 44,5% del sodio en el pan. Esta disminución resultaría de gran importancia considerando que es un producto muy consumido y de forma masiva.

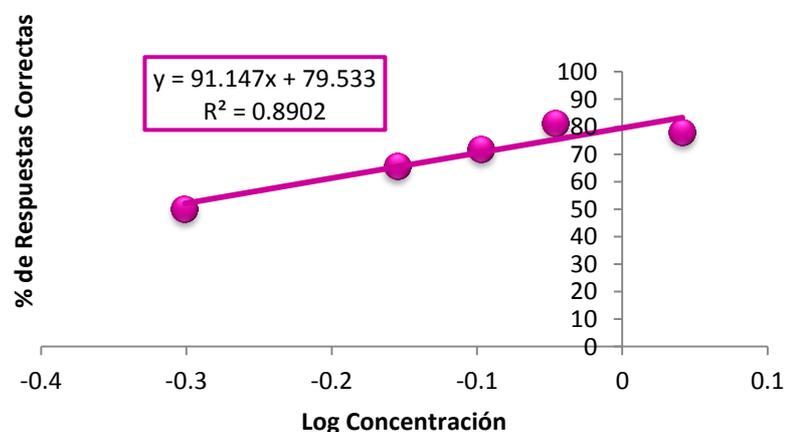


Figura 4.5.1. Umbral de diferencia de KCl en pan

4.5.2. Aceptabilidad del pan elaborado con KCl.

Los ensayos sensoriales de aceptabilidad son de gran utilidad para conocer la percepción de los consumidores hacia un producto que se está desarrollando.

Se llevó a cabo un ensayo de aceptabilidad sobre una muestra de pan en la que se redujo el contenido de sodio al 50%, valor inmediatamente superior al detectado por los consumidores, y una muestra de pan elaborada con el contenido regular de sodio. En la **Figura 4.5.2** se presenta un gráfico de estrella de los promedios de los datos obtenidos para las muestras de pan de molde con contenido regular de sodio (muestra 416) y para la muestra en la que se reemplazó el 50% del NaCl por KCl (muestra 741). En la **Tabla 4.5.1** se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de la varianza.

Se puede observar que tanto en la apariencia como en la textura, los valores obtenidos para la muestra con reducción del sodio fueron mayores que para la muestra con contenido regular de sodio, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las muestras para dichos parámetros. Las muestras fueron clasificadas como "ligeramente agradables" en estos parámetros.

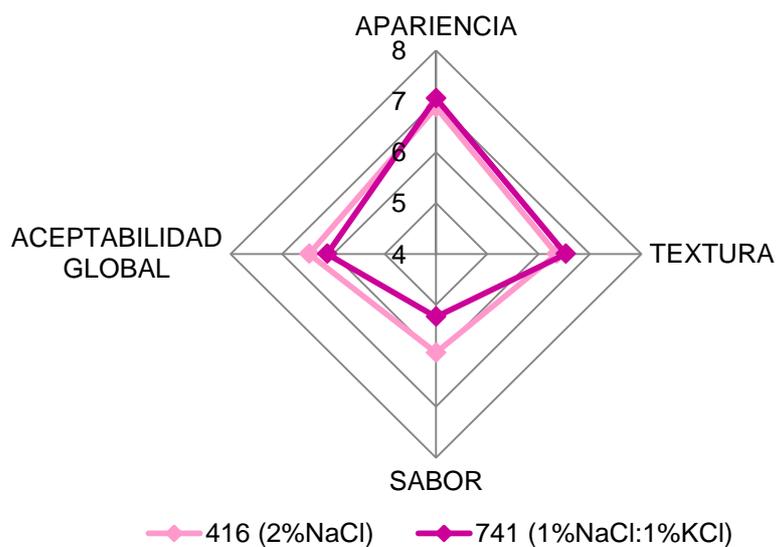


Figura 4.5.2. Aceptabilidad de muestras codificadas

En lo que respecta al sabor y a la aceptabilidad general, se obtuvieron

mayores promedios para la muestra elaborada con 2% de NaCl, sin embargo tampoco fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) las diferencias encontradas. Por su parte, el sabor, fue definido como “ni agradable ni desagradable” en ambas formulaciones, y la aceptabilidad global fue clasificada como “ligeramente agradable” en ambos panes.

Tabla 4.5.1. Análisis de la varianza de muestras codificadas, 416: 2%NaCl; 741: 1%NaCl:1%KCl

| Atributo | Muestra | Promedio | p-valor |
|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|
| Apariencia | 416 | 6.8824 | 0.7112 |
| | 741 | 7.0588 | |
| Textura | 416 | 6.3529 | 0.7502 |
| | 741 | 6.5294 | |
| Sabor | 416 | 5.9412 | 0.2795 |
| | 741 | 5.2353 | |
| Aceptabilidad General | 416 | 6.4706 | 0.4421 |
| | 741 | 6.1176 | |

A partir del ensayo de aceptabilidad se puede concluir que no hay diferencias en la percepción del consumidor entre los panes elaborados con el contenido regular de NaCl y aquellos en los que se llevó a cabo un reemplazo del 50% de la sal con KCl, cuando son presentados de forma codificada. A su vez, como no se encontró un detrimento significativo de la calidad de los panes elaborados con KCl, el uso de esta sal como reemplazante del NaCl en el pan puede representar una interesante alternativa para elaborar panes reducidos en sodio.

5. CONCLUSIONES GENERALES

El consumo elevado de sodio es un factor que interviene en el desarrollo de diversas patologías, como son las enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas. Estudios recientes indican que en Argentina se ingiere por persona por día más del doble del valor recomendado por la OMS. Una forma de aminorar el consumo de sal es reducir su contenido en aquellos alimentos que contengan elevadas cantidades de NaCl en su formulación, así como en aquellos productos de gran demanda por parte de los consumidores; y el pan responde a estas dos características. Sin embargo, la sal es un ingrediente fundamental en el pan, ya que no tan solo imparte su característico sabor salado, sino que participa en el desarrollo y formación de la masa, lo que determina la calidad final del producto. En este trabajo se evaluó en primer lugar, el efecto de la reducción del NaCl en la formulación de masas panarias sobre las interacciones que se producen entre los distintos componentes y sobre la calidad tecnológica del pan. Posteriormente, se analizó el efecto del KCl como posible reemplazante estudiando su efecto en masas, panes y analizando su aceptabilidad por parte de los consumidores.

Por medio de los ensayos de IS-SDS y SRC-Ácido Láctico se pudo corroborar el efecto de la sal sobre la capacidad de hidratación y expansión de las gluteninas: la sal enmascara las cargas de los aminoácidos cargados sobre la superficie de las proteínas, lo que permite que éstas se aproximen e interaccionen, retardando tanto su hidratación como su hinchamiento.

El NaCl promueve las interacciones entre las proteínas del gluten, dando lugar a la formación de agregados proteicos de gran tamaño e insolubles. Estas interacciones se ven reflejadas en la formación de una masa más fuerte y resistente. Por el contrario, las masas elaboradas sin sal presentaron un menor contenido del macropolímero de gluteninas y una mayor solubilidad de las proteínas, lo que indicó una menor agregación proteica. Además, la reducción de la sal en la masa disminuyó su tiempo de desarrollo como consecuencia de la mayor hidratación de las proteínas y la menor agregación proteica. Esto produjo la formación de una masa más débil y menos elástica, con una menor estabilidad, tenacidad y

viscoelasticidad. Las modificaciones generadas por la reducción de sal en las interacciones y el desarrollo de la masa se vieron reflejadas en la calidad del producto final: los panes reducidos en NaCl presentaron un menor volumen específico, una mayor firmeza y una mayor velocidad de envejecimiento en el tiempo. La microestructura de la miga se vio también afectada, obteniéndose panes con celdas de aire más pequeñas y la corteza presentó una menor coloración.

El uso de KCl como reemplazante de NaCl disminuyó las interacciones entre las proteínas del gluten, lo que se vio reflejado en la obtención de un menor porcentaje del macropolímero de gluteninas y en una mayor solubilidad de las proteínas. Estas modificaciones a nivel molecular afectaron las propiedades reológicas de las masas: si bien no se modificó la absorción de agua, el tiempo de desarrollo y la extensibilidad de la masa; el KCl disminuyó significativamente la estabilidad y la tenacidad de la masa, resultando masas más débiles y menos viscoelásticas. Esto podría deberse a las diferencias de tamaño y densidad de carga de los cationes. Sin embargo, los cambios producidos como consecuencia del reemplazo de sal no fueron lo suficientemente importantes como las que se observaron en la masa elaborada sin NaCl, por lo que el reemplazo de NaCl por KCl podría tener un impacto menor (que la reducción del NaCl) en las características del producto.

Los panes elaborados con reemplazo parcial o total del NaCl por KCl mostraron una calidad similar al pan elaborado con 100% NaCl y no se observaron diferencias significativas en el volumen específico, obteniéndose un pan con baja firmeza y con una microestructura de la miga similar. Por medio del análisis sensorial, se determinó el valor umbral a partir del cual se comienza a percibir el sabor del KCl, definido como amargo y metálico, el cual correspondió al 44,5% de reemplazo del NaCl por la sal de interés. A su vez, la aceptabilidad global de panes elaborados con un 50% de NaCl y un 50% de KCl fue buena, definiéndose los panes como "ligeramente agradables", de la misma manera que el pan elaborado con 100% NaCl.

6. ANEXOS

ANEXO A

PRUEBA DE UMBRAL TENTATIVO

Evaluador N°:.....

Fecha:...../...../.....

Nombre:.....

Usted recibirá seis pares de muestras. En cada par una de las muestras es de Pan de molde con NaCl y la otra Pan de molde con mezcla de NaCl:KCl.

Debe probar las muestras de izquierda a derecha.

Circule el número de la muestra en la que percibe un sabor menos salado, más amargo o metálico.

Entre par y par debe enjuagarse muy bien la boca tomando agua hasta eliminar cualquier sabor residual.

Pares de muestras

| PAR N° | MUESTRAS | |
|---------------|-----------------|-----|
| 1 | 241 | 706 |
| 2 | 797 | 339 |
| 3 | 865 | 923 |
| 4 | 517 | 211 |
| 5 | 572 | 714 |
| 6 | 405 | 186 |

Muchas gracias!!!

7. BIBLIOGRAFÍA

1. HE F.J., MacGregor G.A. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of Human Hypertension*. 2009, vol. 23, p. 363-384.
2. MASSEY L.K., Whiting S.J. Dietary salt, urinary calcium, and bone loss. *Journal of bone and mineral research*. 1996, vol. 6, p. 731-736.
3. KUPARI M., Koskinen P., Virolainen J. Correlates of left ventricular mass in a population sample aged 36–37 years. Focus on lifestyle and salt intake. *Circulation* 1994, vol. 89, p. 1041–1050.
4. HE F.J., Marrero N.M., MacGregor G.A. Salt intake is related to soft drink consumption in children and adolescents: a link to obesity?. *Hypertension*. 2008, vol. 51, p. 629–634.
5. VARTANIAN L.R., Schwartz M.B., Brownell K.D. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Public Health*. 2007, vol. 97, p. 667–675.
6. HILLS A.G., Parsons D.W., Webster G.D. Jr, Rosenthal P., Conover H. Influence of the renal excretion of sodium chloride upon the renal excretion of magnesium and other ions by human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1959, vol. 19, p. 1192-121.
7. KLEEMAN C.R., Bohannon J., Bernstein D., Ling S., Maxwell M.H. Effect of variations in sodium intake on calcium excretion in normal humans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1964, vol. 115 p. 29-32.
8. KING J.S. Jr., Jackson R., Ashe B. Relationship of sodium intake to urinary calcium excretion. *Invest Urol*. 1964, vol. 1, p. 555-560.
9. TSUGANE S., Sasazuki S., Kobayashi M., Sasaki S. Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer*. 2004, vol. 90, p. 128–134.

10. MICKLEBOROUGH T.D., Fogarty A. Dietary sodium intake and asthma: an epidemiological and clinical review. *Int J Clin Pract.* 2006, vol. 60, p. 1616–1624.
11. MACGREGOR G.A., De Wardener H.E. Salt, diet, and health. 1er ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1998. 233 p. ISBN: 0-521-58352-7
12. MICHELL A.R. The clinical biology of sodium. 1er ed. New York: Elsevier; 1995. 370 p. ISBN: 978-0-08-040842-2
13. FINE B.P., Ty A., Lestrangle N., Levine O.R. Sodium deprivation growth failure in the rat: alterations in tissue composition and fluid spaces. *J Nutr.* 1987, vol.117, p. 1623–8.
14. BURSEY R.G., Watson M.L. The effect of sodium restriction during gestation of offspring brain development in rats. *Am J Clin Nutr.* 1983, vol. 37, p. 43–51.
15. LIND L., Lithell H., Gustafsson I.B., Pollare T., Ljunghall S. Metabolic cardiovascular risk factors and sodium sensitivity in hypertensive subjects. *AmJHypertens.* 1992, vol. 5, p.502–5.
16. DAHL L. Possible role of salt intake in the development of hypertension. In: Cottier P. Bock KD, eds. *Essential hypertension: an international symposium.* Berlin: Springer-Verlag, 1960:53-65.
17. World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. World Health Organisation: Geneva, Switzerland, 2002. Available at <http://www.who.int/whr/2002> (Accessed June 30, 2006).
18. FERRARA L.A., de Simone G., Pasanisi F., Mancini M. Left ventricular mass reduction during salt depletion in arterial hypertension. *Hypertension.* 1984, vol. 6, p.755–759.
19. JULA A.M., Karanko H.M. Effects on left ventricular hypertrophy of long-term nonpharmacological treatment with sodium restriction in mild-to-moderate essential hypertension. *Circulation.* 1994, vol. 89, p. 1023–1031.
20. TOBIAN L., Hanlon S. High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. *Hypertension.* 1990, vol. 15, p. 900–903.

21. PERRY I.J., Beevers D.G. Salt intake and stroke: a possible direct effect. *J Hum Hypertens*. 1992, vol. 6, p. 23–25.
22. NAGATA C., Takatsuka N., Shimizu N., Shimizu H. Sodium intake and risk of death from stroke in Japanese men and women. *Stroke* 2004. vol. 35, p. 1543–1547.
23. KOK D.J., Iestra J.A., Doorenbos J., Papapoulos S.E. The effects of dietary excesses in animal protein and in sodium on the composition and the crystallization kinetics of calcium oxalate monohydrate in urines of healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990, vol. 71, núm. 4, p. 861-7.
24. SAKHAE K., Harvey J.A., Padalino P.K., Whitson P., Pak C.Y.C. The potential role of salt abuse on the risk for kidney stone formation. *J Urol*. 1993, vol. 150, p. 310-312.
25. VERHAVE J.C., Hillege H.L., Burgerhof J.G., Janssen W.M., Gansevoort R.T., Navis G.J., et al. Sodium intake affects urinary albumin excretion especially in overweight subjects. *J Intern Med*. 2004, vol. 256, p. 324–330.
26. BEEVERS D.G., Lip G.Y., Blann A.D. Salt intake and Helicobacter pylori infection. *J Hypertens*. 2004, vol. 22, p. 1475–1477.
27. CAA, Código Alimentario Argentino, Ley 18.284 18/07/69, Decreto 2126/71- Reglamentario de la Ley 18.284. 2009/10b. Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos, consultado en Abril de 2015.
28. GÓMEZ PALLARÉS M., León A.E., Rosell C.M. "Trigo". En: De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Ed: León AE y Rosell CM. Córdoba, Argentina. Baez Ediciones.2007. p. 19-33.
29. MACKEY J. The boundaries and subdivision of the genus Triticum. *Int. Bot. Congr*. 1975. 12th edition, 2: 509.
30. MATZ S. "Ingredients from wheat". En: Bakery Technology and Engineering, 3º Edition. Editado por Matz S. USA. Pan-Tech Internarional. 1999. p. 1-21.

31. OSBORNE TB. Proteins of the wheat kernel. Washington D.C.: Publication of the Carnegie Institution. 1907. núm. 84, p. 119.
32. CHEN C.H., Bushuk W. Nature of proteins in Triticale and its parental species I. Solubility characteristics and amino-acid composition of endosperm proteins. Canadian Journal of Plant Science. 1970, vol. 50. p. 9-14.
33. GRAVELAND A. Extraction of wheat proteins with sodium dodecyl sulphate. Annales de Technologie Agricole. 1980. vol. 29, p. 113-123.
34. FINNEY K.F., Barmore M.A. Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. Cereal Chemistry. 1948. vol: 25, p. 291-312.
35. SHEWRY P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M., Mifflin B.J. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. Journal of Cereal Science. 1986. vol. 4, p. 97-106.
36. SHEWRY P.R., Tatham A.S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochemical Journal. 1990. vol. 267, p. 1-12.
37. TATHAM A. "The structures of wheat protein". En: Wheat Structure. Biochemistry and Funcctionality. Editado por Schofield, Journal Royal society of Chemistry, England. Woodhead Publishing Limited. 1995. p. 53-63.
38. WRIGLEY C., Andrews J., Bekes F., Gras P., Gupta R., MacRitchie F., Skerritt J. Protein-protein interactions-essential to dough rheology. En: Interactions: The Keys to Cereal Quality. Ed. Hamer R, Hosney R. American Association of Cereal Chemists, USA. 1998. p. 18-20.
39. HOSENEY R.C. Rheology of doughs and batters. En: Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition. Editado por Hosney RC. American Association of Cereal Chemists, USA. 1994b. p. 213-228.
40. KHATKAR B.S., Fido R.J., Tatham A.S., Schofield J.D. Functional properties of wheat gliadins. II. Effects on dynamic rheological

- properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*. 2002. vol. 35, p. 307- 313.
41. WIESER H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*. 2007. vol. 24, p.115-119.
 42. GOESAERT H., Brijs K., Veraverbeke W.S., Courtin C.M., Gebruers K., Delcour J.A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*. 2005. vol. 16, p. 12-30.
 43. PAYNE P., Corfield K. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in dissociating medium. *Planta*. 1979. vol. 145, p. 83-88.
 44. JACKSON E.A., Holt L.M., Payne P.I. Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two dimensional electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes. *Theoretical and Applied Genetics*. 1983. vol. 66, p. 29-37.
 45. SHEWRY P.R., Halford N.G., Tatham A.S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*. 1992. vol. 15, p. 105-120.
 46. SHEWRY P.R., Popineau Y., Lafiandra D., Belton P. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat Project. *Trend in Food Science & Technology*. 2001. vol. 11, p. 433-441.
 47. VERAVERBEKE W.S., Delcour J.A. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002. vol. 42, p. 179-208.
 48. GROSCH W., Wieser H. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science*. 1999. vol. 29, p. 1-16.
 49. WIESER H. The use of redox agents. In: *Bread Making— Improving Quality*. Cauvain, S.P. (Ed.). Woodhead Publishing Ltd., Cambridge. 2003. p. 424-446.
 50. METAKOVSKII E.V., Wrigley C.W., Bekes F., Gupta R.B. Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in

- Australian wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1990. vol. 41, p. 289–306.
51. ANDREWS J.L., Hay R.L., Skerritt J.H., Sutton K.H. HPLC and immune assay based glutenin subunit analysis: screening for dough properties in wheats grown under different environmental conditions. *Journal of Cereal Science*. 1994. vol. 20, p. 203–215.
 52. CORNISH G.B., Bekes F., Allen H.M., Martin D.J. Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. *Australian Journal of Agricultural Research*. 2001. vol. 52, p. 1339–1348.
 53. PAYNE P.I., Nightingale M.A., Krattiger A.F., Holt L.M. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality in British-grown wheat varieties. *Journal of Food Science and Agriculture*. 1987. vol. 40, p. 51–65.
 54. GUPTA R.B., Singh N.K., Shepherd K.W. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics*. 1989. vol. 77, p. 57–64.
 55. GUPTA R.B., Paul J.G., Cornish G.B., Palmer G.A., Bekes F., Rathjen A.J. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *Journal of Cereal Science*. 1994. vol. 19, p. 9–17.
 56. DON C., Lichtendonk W.J., Plijter J.J., Hamer R.J. Glutenin macropolymer: a gel formed by particles. *Journal of Cereal Science*. 2003a. vol. 37, p. 1–7.
 57. WEEGELS P., van der Pijpekamp A., Graveland A., Harmer R., Schofield J. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Journal of Cereal Science*. 1996. vol. 23, p. 103–111.
 58. WEEGELS P.L., Hamer R.J., Schofield J.D. Functional properties of low Mr wheat proteins. III. Effects on composition of the glutenin

- macropolymer during dough mixing and resting. *Journal of Cereal Science*. 1997. vol. 25, p. 165-173.
59. PRITCHARD PE. The glutenin fraction (gel-protein) of wheat protein - a new tool in the prediction of baking quality. *Aspects of Applied Biology*. 1993, vol. 36, p. 75-84.
 60. CORNEC M., Popineau Y., Lefebvre J. Characterization of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *Journal of Cereal Science*. 1994. vol. 19, p. 131-139.
 61. Lefebvre J, Popineau Y, Deshayes G, Lavenant L. Temperature-induced changes in the dynamic rheological behaviour and size distribution of polymeric proteins for gluteins from wheat near isogenic lines differing in HMW-GS composition. *Cereal Chemistry*. 2002, vol. 77, p. 193-201.
 62. BELITZ H., Kieffer R., Seilmeier W., Wieser H. Structure and function of gluten protein. *Cereal Chemistry*. 1986. vol. 63, p. 336-341.
 63. NG P., Xu C., Bushuk, W. Model of glutenin structure based on farinograph and electrophoretic results. *Cereal Chemistry*. 1991. Vol. 68, p. 231-235.
 64. HOSENEY R.C. "Gluten proteins". En: *Principles of Cereal Science and Technology*. Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists, USA. 1994a. p. 197-211.
 65. EWART J.A.D. Hypothesis for how linear glutenin holds gas in dough. *Food Chemistry*. 1989. vol. 32, núm. 2, p. 135-150.
 66. JEFFREY G.A., Saenger W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*. Berlin: Springer-Verlag. 1994. 569 p. ISBN 978-3-642-85135-3
 67. BELTON P. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*. 1999. vol. 29, p.103-107.
 68. BELTON P.S. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*. 2005. vol. 41, p. 203-211.

69. WELLNER N., Mills E.N., Brownsey G., Wilson R.H., Brown N., Freeman J., Halford N.G., Shewry P.R., Belton P.S. Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*. 2005, vol. 6, pag 255-261.
70. ATWELL W.A., Hood L.F., Lineback D.R., Varriano-Marston E., Zobel H.F. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Foods World*. 1988. vol. 33, p. 306-311.
71. ELIASSON A., Larsson K. "Bread". En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson A, Larsson K. Marcel Dekker, USA. 1993a. p. 325-363.
72. MILES M.J., Morris V.J., Orford P.D., Ring S.G. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*. 1985. vol. 135, p. 271-281.
73. BORNET F. Technological treatments of cereals. Repercussions on the physiological properties of starch. *Carbohydrate Polymers*. 1993. vol. 21, p. 195-203.
74. SANDSTEDT R. The function of starch in the baking of bread. *Baker's Dig*. 1961. vol. 35, p. 36-41.
75. HOSENEY R.C. "Yeast-leavened products". En: *Principles of Cereal Science and Technology*. Second Edition. Editado por Hosene y R.C. American Association of Cereal Chemists. USA. 1994d. p. 229-273.
76. HUI Y.H., Corke H., De Leyn I., Nip W.K., Cross N. "Mixing, dough making and dough makeup". En: *Bakery Products, Science and Technology*. Editor: Hui Y.H., Blackwell Publishing. 2006a. p. 245-259
77. HUI Y.H., Corke H., De Leyn I., Nip W.K., Cross N. 2006b. Fermentation. En: *Bakery Products, Science and Technology*. Editor: Hui Y.H., Blackwell Publishing. 2006b. p. 261-271.
78. GAN Z., Ellis P.R., Schofield J.D. Mini review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*. 1995. vol. 21, p. 215-230.

79. ESKIN N.A.M. "Biochemistry of Food Processing: Browning Reactions in Foods". En: *Biochemistry of Foods*, second ed. Academic Press, London. 1990. p. 240-295
80. RAMÍREZ-JIMÉNEZ A., García-Villanova B., Guerra-Hernández E. Effect of toasting time on the browning of sliced bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001. vol. 81, p. 513-518.
81. BECHTEL W. G., Meisner D. F., and Bradley W. B. The Effect of the Crust on the Staling of Bread. *Cereal Chem.* 1953. vol. 30, p. 160.
82. RIBOTTA P.D., Tadini C.C. "Masas congeladas". En: *Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados*. Ed: Ribotta PD, Tadini CC. Universidad Nacional de Córdoba Editorial, Córdoba. 2009. p: 16-59.
83. RONAYNE P., Brites C., Ferrero C., Arocha M., León A. "Efecto de los tratamientos tecnológicos sobre la calidad nutricional y saludable de panes y productos de panadería". En: *Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación*. Ed: Lutz M y León AE, Universidad de Valparaíso Editorial, España. 2009. p. 124-150.
84. QUAGLIA G. 1er ed. *Ciencia y Tecnología de la panificación*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. 1991. 502 p. ISBN: 8420007188.
85. CZUCHAJOWSKA Z., Pomeranz Y., Jeffers H.C. Water activity and moisture-content of 492 dough and bread. *Cereal Chemistry*. 1989. vol. 66, núm.2, p. 128-132.
86. MILLER R.A., Hosney, R. C. Role of salt in baking. *Cereal Food World*. 2008, vol. 53, pag. 4-6.
87. HE H., Roach R.R. y Hosney R.C. Effect of nonchaotropic salts on flour bread-making properties. *Cereal Chemistry*. 1992. vol. 69, p. 336-371.
88. MCCANN T.H. y Day L. Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. *Journal of Cereal Science*. 2013. vol. 57, p. 444-452.
89. BECK M., Jekle M., Becker T. Impact of sodium chloride on wheat flour dough for yeast-leavened products. I. Rheological attributes.

- Journal of the Science of Food and Agriculture. 2012. vol. 92, núm. 3, p. 585-592.
90. LYNCH E.J., Dal Bello F., Sheehan E.M., Cashman K.D., Arendt E.K. Fundamental studies on the reduction of salt on dough and bread characteristics. *Food Research International*. 2009. vol. 42, núm. 7, p. 885-891.
 91. HLYNKA I. Influence of temperature, speed of mixing, and salt on some rheological properties of dough in the farinograph. 1962. *Cereal chemistry*. vol. 39, p. 286-303.
 92. MAHER GALAL A., Varriano-Marston E. y Johnson J.A. Rheological dough properties as affected by organic acids and salt. *Cereal chemistry*. 1978. vol. 55, p. 683-691.
 93. MOORE C.L. y Herman R.S. The effect of certain ingredients and variations in manipulations on the farinograph curve. *Cereal chemistry*. 1942. vol. 19, p. 568-587.
 94. PRESTON K.R. Effects of neutral salts of the lyotropic series on the physical dough properties of Canadian red spring wheat flour. *Cereal chemistry*. 1989. vol. 66, p. 144-148.
 95. SALOVAARA H. Effect of partial sodium chloride replacement by other salts on wheat dough rheology and breadmaking. *Cereal chemistry*. 1982. vol. 59, p. 422-426.
 96. PRESTON K.R. Effects of Neutral Salts upon Wheat Gluten Protein Properties. I. Relationship Between the Hydrophobic Properties of Gluten Proteins and Their Extractability and Turbidity in Neutral Salts. *Cereal Chemistry*. 1981. vol. 58, p. 317-324.
 97. BENNETT R. y Ewartt J.A.O. The effects of certain salts on dough. *Journal of Science Food Agriculture*. 1965. vol. 16, p. 199.
 98. DANNO G. y Hosney R.C. Effect of sodium chloride and sodium dodecyl sulfate on mixograph properties. *Cereal Chemistry*. 1982. vol. 59, p. 202-204.
 99. VON HIPPEL P.H. y Schleich T. The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solutions. En: *Structure and stability of biological macromolecules*.

- Ed: Timasheff S.N. y Forman G.D. Marcel Dekker, Nueva York. 1969. p. 417.
100. MELANDER W. y Horvath C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1977. vol. 183, p. 200-215.
 101. ANGIOLONI A., Dalla Rosa M. Dough thermo-mechanical properties: influence of sodium chloride, mixing time and equipment. *Journal of Cereal Science*. 2005. vol. 41, núm. 3, p. 327-331.
 102. SALOVAARA H. Sensory Limitations to Replacement of Sodium with Potassium and Magnesium in Bread. *Cereal chemistry*. 1982. vol. 59, p. 427-430.
 103. AACC. American Association of Cereal Chemistry. 2000. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th Ed.*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. USA.
 104. DON C., Lichtendonk W.J., Plijter J.J., Hamer R.J. Understanding the link between GMP and dough: from glutenin particles in flour towards developed dough. *Journal of Cereal Science*. 2003, vol.38, pag. 157-165.
 105. DON C., Lichtendonk W.J., Plijter J.J., Hamer R.J. Glutenin macropolymer is a gel formed by particles: average particle size determines the gel rigidity. In: Dickinson E, van Vliet T. (Eds.), *Food Colloids—Biopolymers and Materials 2002*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 2003, pag. 275-281.
 106. RAMÍREZ NAVAS J.S. *Fundamentos de la Reología en Alimentos*. Colombia, Suramerica: Ed. JSR e-books. Colombia. 2006. 46 p.
 107. RODRIGUEZ SANDOVAL E., Fernandez Quintero A., Ayala Aponte A. Modelos reológicos aplicados a masas de trigo y maíz. *Ingeniería e Investigación*. 2005. vol. 58, p. 87-93.
 108. STEFFE J. *Rheological methods in food process engineering*. 2 da ed. Michigan, USA: Ed. Freeman Press. 1996. 412 p. ISBN: 0-9632036-1-4

109. GUNASEKARAN S. y Ak M. Dynamic oscillatory shear testing of foods-selected applications. Trends in Food Science and Technology. 2000. vol. 11, p. 115-127.
110. LEÓN A., Durán E., Barber C. A new approach to study starch changes occurring in dough baking process and during bread storage. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung. 1997a. vol. 204, p. 316-320.
111. INSTITUTO ARGENTINO DE RACIONALIZACIÓN DE MATERIALES (IRAM). Método número 15858-1. Cereales. Ensayo de panificación experimental. Diciembre, 1996.
112. LUNDAHL D.S., Lukes B.K., McDaniel M.R., Henderson L.A. A semi-ascending paired difference method for determining sensory thresholds of added substances to background media. Journal of sensory studies. 1986. vol. 1, p. 291-306.
113. ASTM. Standard practice for determination of odor and taste thresholds by a forced-choice ascending concentration series methods of limits. 1997. E, 679-704.
114. INFO STAT. InfoStat/Profesional (version 1.1). Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2002.
115. STEFFOLANI, M.E., Pérez G.T., Ribotta P.D., León A.E. Relationship between variety clasification and breadmaking quality in argentine wheats. International Journal of Agricultural Research. 2008, vol. 2, p. 33-42.
116. COLOMBO A., Ribotta P.D., León A. Aplicación de electroforesis capilar para la caracterización de gliadinas de trigos argentinos. Agriscientia. 2008, vol. 2, p. 57-64.
117. YAMAZAKI W. An alkaline Water Retention Capacity Test for the Evaluation of Cookie Baking Potentialities Of Soft Winter Wheat Flours. Cereal Chemistry. 1953. vol. 30, p. 242-246
118. KITTERMAN J.S., Rubenthaler G.L. Assesing the quality of early generation wheat selections with the micro AWRC test. Cereal Science Todat. 1971. vol. 116, p. 313-316.

119. WELLNER N., Bianchini D., Mills E.N.C., Belton P.S. Effect of selected Hofmeister anions on the secondary structure and dynamics of wheat prolamins in gluten. *Cereal Chemistry*. 2003. vol. 80, núm. 5, p. 596-600.
120. MENJIVAR J.A. "Fundamental aspects of dough rheology". En: *Dough Rheology and Baked Product Texture*. Editado por Faridi H y Faubion JM. Van Nostrand Reinhold: New York. 1990. p. 1-28.
121. FERRY J.D. *Viscoelastic properties of polymers*. Third edition. New York: John Wiley & Sons. 1980. 672 p. ISBN: 978-0-471-04894-7
122. AMEMIYA J.I., Menjivar J.A. Comparison of small and large deformation measurements to characterize the rheology of wheat flour doughs. *Journal of Food Engineering*. 1992. vol. 16, p. 91-108.
123. JANSSEN A.M., van Vliet T., Vereijken J.M. Fundamental and empirical rheological behaviour of wheat flour doughs and comparison with bread making performance. *Journal of Cereal Science*. 1996. vol. 23, p. 43-54.
124. KHATKAR B.S., Schofield J.D. Dynamic rheology of wheat flour dough. II. Assessment of dough strength and bread-making quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002. vol. 82, p. 823-826.
125. MILLER K.A., Hosney R.C. Effect of oxidation on the dynamic rheological properties of wheat flour water doughs. *Cereal Chemistry*. 1999. vol. 76, p. 100-104.
126. LARSSON H. Effect of pH and sodium chloride on wheat flour dough properties: Ultracentrifugation and rheological measurements. *Cereal Chem*. 2002. vol. 79, p.544-545.
127. WU J., Beta J., & Clarke H. Effects of salt and alkaline reagents on dynamic rheological properties of raw oriental wheat noodles. *Cereal Chemistry*. 2006. vol. 83, p. 211-217.
128. CHIOTELLI E., Pulosio G. and Le Meste M. Effect of sodium chloride on the gelatinization of starch: a multimeasurement study. *Biopolymers*. 2002. vol. 63, p.41-58.

129. WOOTTON M. and Bamunuarachchi A. Application of differential scanning calorimetry to starch gelatinization. III. Effect of sucrose and sodium chloride. *Starch/Stärke*. 1980. vol. 32, p.126–129.
130. JANE J.L., Ames I.A. Mechanism of starch gelatinization in neutral salt solutions. *Starch/Stärke*. 1993. vol. 45, p.161–166.
131. CHIOTELLI E., Pulosio G., Le Meste M. Effect of Sodium Chloride on the Gelatinization of Starch: A Multimeasurement Study. *Biopolymers*. 2001, vol. 63, pag. 41-58.
132. Eliasson A.C. y Gudmundsson M. Capítulo: Starch: Physicochemical and functional properties. En: *Carbohydrates in food*. Editado por Eliasson A. Marcel Dekker Inc., Nueva York, USA. 1996.
133. JAGANNATH J.H., Jayaraman K.S., Arya S.S. Studies on glass transition temperature during staling of bread containing different monomeric and polymeric additives. *Journal of Applied Polymer Science*. 1999. vol. 71, p. 1147-1152.
134. FEARN T., Russell P.L. A Kinetic study of bread staling by differential calorimetry. The effect of loaf specific volume. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1982. vol. 33, p. 537-548.
135. NOORT M.W.J., Bult J.H.F., Stieger M., Hamer, R.J. Saltiness enhancement In bread by inhomogeneous spatial distribution of sodium chloride. *Journal of cereal science*. 2010. vol. 52, p. 378-386.
136. CAUVAIN S.P. Improving the control of staling in frozen bakery products. *Food Science and Technology*. 1998. vol. 9, p. 56-61.
137. HE H., Hosney R.C. Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. *Cereal Chemistry*. 1990. vol. 67, p. 603-605.
138. MONDAL, A. and DATTA, A.K. Bread baking—a review. *J. Food Eng.* 2008. vol. 86, p. 465–474.
139. HIDALGO A. y Brandolin A. Evaluation of heat damage, sugars, amylases and colour in breads from einkorn, durum and bread wheat flour. *Journal of cereal science*. 2011. vol. 54, p. 90-97.

140. SIMSEK S and Ovando Martinez M. Quality of dough and bread prepared with sea salt or sodium chloride. *Journal of Food Process Engineering*. 2015. doi:10.1111/jfpe.12197