

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Letícia da Fontoura Xavier Costa

**CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIDADE DA MICROBIOTA DE *SOURDOUGH* E  
AVALIAÇÃO SENSORIAL DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL**

Porto Alegre  
2022



Letícia da Fontoura Xavier Costa

**CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIDADE DA MICROBIOTA DE *SOURDOUGH* E  
AVALIAÇÃO SENSORIAL DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Coorientadora: Prof. Dra. Roberta Cruz Silveira Thys e Dra. Michele Bertoni Mann

Porto Alegre

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Costa, Leticia da Fontoura Xavier  
CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIDADE DA MICROBIOTA DE  
SOURDOUGH E AVALIAÇÃO SENSORIAL DE PÃES DE FERMENTAÇÃO  
NATURAL / Leticia da Fontoura Xavier Costa. -- 2022.  
130 f.  
Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Coorientadoras: Roberta Cruz Silveira Thys, Michele  
Bertoni Mann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e  
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. sourdough. 2. fermentação natural. 3.  
microbiota. 4. bactérias ácido lácticas. 5. levedura.  
I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Thys,  
Roberta Cruz Silveira, coorient. III. Mann, Michele  
Bertoni, coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“O maior risco é não correr nenhum risco. Em um mundo que muda rapidamente, a única estratégia que certamente falhará é não arriscar”.

- Mark Zuckerberg

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio incondicional, principalmente a minha mãe e minha irmã Mica. Agradeço ao meu noivo Mateus pela paciência, apoio, troca de ideias, compreensão e toda ajuda prestada em todas as etapas desse ciclo. Neste período tu foste essencial pra me manter firme e forte! Também a todos amigos que sempre me compreenderam durante este período, sem cobranças e sem julgamentos. Agradecimento especial para a Fê, Nic e Tiela. Cada mensagem de bom dia, cada almoço, cada palavra de apoio que vocês me passaram foram essenciais. Sem elas esse caminho não teria sido tão prazeroso.

Não tenho palavras para agradecer a todo apoio, carinho, motivação, confiança e amor que minha querida amiga Ana Folmer me oferece desde o mestrado, servindo como um grande exemplo de pessoa e profissional a ser seguido. Sou grata a todo suporte tecnológico, profissional e pessoal que a minha querida orientadora, Ana Frazzon, e minhas co-orientadoras, Roberta Thys e Michele Mann, disponibilizaram a mim durante estes intensos quatro anos. Pelas palavras de incentivo e todos os ensinamentos: muito obrigada! E Roberta: obrigada pela receita do pão de aipim! haha

Agradeço muito a todo suporte relacionado a bioinformática que a Carol Kothe forneceu apesar de estarmos em países e instituições diferentes. Além disso, a toda amizade, apoio e motivação que ela me injetava ao longo das análises e acontecimentos pessoais. Sem ela não teríamos as análises de bioinformática que direcionam essa tese. *Thank you so much for this!*

Agradeço por todo apoio, acolhimento e ajuda dos colegas do laboratório 208 de bioquímica de microrganismos localizado no ICTA e principalmente a todo suporte, ajuda e *insights* fornecidos pelo professor Jeverson Frazzon ao longo do estudo. Também a todos colegas do ICTA que me receberam de braços abertos e me ajudaram muito nos experimentos e análises que eram tão novos e diferentes para mim. Agradecimento especial aos colegas da padaria que viraram amigos, Raquel, Matheus, Patrik e Carol, e às minhas ICs maravilhosas Bia e Duda. Também agradeço à funcionária Lucimara por auxiliar na limpeza de materiais (que foram muitos!), e aos técnicos do ICTA que colaboraram com todas as análises químicas e de tecnologia

de alimentos aplicadas neste trabalho.

Agradeço à banca da minha qualificação, doutoras Patrícia Valente, Michele Spier e Ana Muterle, por todas sugestões e enriquecimento fornecidos a este trabalho. A professora Patrícia serviu e continua servindo também como fonte de exemplo e apoio desde que entrei no PPGMAA, sendo ela uma pessoa a qual sempre pude contar, a qual sempre me incentivou e me impulsionou profissionalmente. Também agradeço ao suporte na escrita dos artigos pelas queridas doutoras Ana Muterle e Janira Prichula. Agradeço à professora Marisa Costa por todas sugestões e auxílios que sempre esteve disposta a me repassar desde o momento que entrei na UFRGS, bem como ser fonte de motivação e exemplo. Tenho enorme gratidão a todos membros da secretaria do PPGMAA, principalmente à Eladir, que além de secretária se tornou uma amiga, conselheira e uma pessoa a qual sempre pude contar e confiar. Agradeço de coração a todos que estavam torcendo por mim e não nomeei aqui nestes agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço a concessão da bolsa de doutorado e por permitir que fosse possível concretizar mais essa realização profissional. Por fim, agradeço à UFRGS por ter sido minha casa durante muitos anos e por ter me recebido cheia de conhecimentos, experiências e desenvolvimento profissional e pessoal.

# CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIDADE DA MICROBIOTA DE *SOURDOUGH* E AVALIAÇÃO SENSORIAL DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL

Autor: MSc. Letícia da Fontoura Xavier Costa

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Cruz Silveira Thys e Dra. Michele Bertoni Mann

## RESUMO

*Sourdough* é o resultado da fermentação espontânea proveniente da mistura de farinha e água quando mantidas à temperatura ambiente. Os produtos do metabolismo dos microrganismos presentes na fermentação oferecem ao pão *sourdough* características singulares e específicas. Entre os fatores que influenciam a ocorrência dos microrganismos no *sourdough*, está o tipo de farinha. Até o momento, poucos estudos avaliaram a composição e estabilidade da microbiota em *sourdoughs* preparados com farinhas de trigo integral orgânicas ou convencionais. Este estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota de *sourdough* feito com farinhas de trigo integral convencional e orgânica, bem como avaliar o impacto do metabolismo bacteriano nas características dos pães. O *sourdough* foi preparado e amostras foram coletadas para análises de acidez, sequenciamento pela plataforma Illumina MiSeq e análise de predição metabólica. O fermento final (216 horas) foi utilizado para preparo de pães e foram avaliados parâmetros de acidez, volume específico, cor, textura e análise sensorial. Os resultados demonstraram que bactérias ácido lácticas (*Pediococcus* sp.) e ácido acéticas (*Gluconobacter* sp.), bem como leveduras (*Issatchenkia* sp.), foram predominantes ao fim do processo fermentativo, e foi inferido que os metabolismos de carboidratos e aminoácidos foram cruciais para o direcionamento das características dos pães assados. Não houve diferença estatística em relação à diversidade e funcionalidade entre as farinhas orgânica e convencional. A partir de fermentação curta e longa aplicadas na massa do pão, foi observada preferência dos painelistas pelos pães de curta fermentação, os quais demonstraram menor acidez e dureza e maior volume específico. Os resultados deste estudo indicam a importância de se conhecer a microbiota durante o processo fermentativo e de que maneira estes microrganismos podem influenciar o produto final. Além disso, a tese traz a ideia de direcionamento na produção de panificados utilizando *sourdough* a fim de buscar padronização e maior aceitação desta linha de panificados.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (130 p.) maio, 2022.

# CHARACTERIZATION AND FUNCTIONALITY OF SOURDOUGH'S MICROBIOTA, AND SENSORY EVALUATION OF SOURDOUGH BREADS.

Author: MSc. Leticia da Fontoura Xavier Costa

Advisor: PhD. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-Advisor: PhD. Roberta Cruz Silveira Thys and PhD. Michele Bertoni Mann

## ABSTRACT

Sourdough is the result of spontaneous fermentation from the mixture of flour and water when kept at room temperature. The products of the microorganism's metabolism present in fermentation process give sourdough bread unique and specific characteristics. The type of flour is between the factors that influence the occurrence of microorganisms in sourdough. To date, few studies have evaluated the microbiota composition and stability in sourdoughs prepared with organic or conventional whole wheat flours. This study aimed to characterize the microbiota of sourdough made with conventional and organic whole wheat flours, as well as to evaluate the impact of bacterial metabolism on the characteristics of breads. Sourdough was prepared and samples were collected for acidity analysis, sequencing by the Illumina MiSeq platform and metabolic prediction analysis. The final sourdough (216 hours) was used to prepare breads and parameters of acidity, specific volume, color, texture and sensory analysis were evaluated. The results showed that lactic acid bacteria (*Pediococcus* sp.) and acetic acid bacteria (*Gluconobacter* sp.), as well as yeasts (*Issatchenkia* sp.), were predominant at the end of the fermentation process, and it was inferred that carbohydrate and amino acid metabolism were crucial for directing the characteristics of baked breads. There was no statistical difference in terms of diversity and functionality between organic and conventional flours. From the short and long fermentation applied to the bread dough, panelists' preference for short fermentation breads was observed, which showed lower acidity and hardness, and higher specific volume. The results of this study indicate the importance of knowing the microbiota during the fermentation process and how these microorganisms can influence the final product. In addition, the thesis brings the idea of driving the production of baked goods using sourdough to seek standardization and greater acceptance of this line of baked goods.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (130 p.) May, 2022.

## SUMÁRIO

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 1  |
| <b>2.</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 3  |
| 2.1       | Objetivo Geral.....  | 3  |
| 2.2       | Objetivos Específicos.....   | 3  |
| <b>3.</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....   | 4  |
| 3.1       | Trigo e pães: panorama geral.....  | 4  |
| 3.2       | <i>Sourdough</i> como alternativa na panificação .....   | 8  |
| 3.3       | Pão <i>sourdough</i> : propriedades e benefícios.....  | 10 |
| 3.4       | Microbiota presente no <i>sourdough</i> .....  | 12 |
| 3.4.1     | Perfil bacteriano do <i>sourdough</i> .....  | 14 |
| 3.4.2     | Perfil fúngico do <i>sourdough</i> .....   | 15 |
| 3.5       | Funcionalidade da microbiota de <i>sourdough</i> .....   | 17 |
| <b>4.</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 18 |
| 4.1       | Produção do <i>sourdough</i> .....   | 18 |
| 4.2       | Preparo dos pães.....  | 21 |
| 4.2.1     | Avaliação de volume e <i>baking loss</i> dos pães <i>sourdough</i> .....   | 22 |
| 4.2.2     | Colorimetria de casca e miolo dos pães <i>sourdough</i> .....  | 22 |
| 4.2.3     | Propriedades alveolares dos pães <i>sourdough</i> .....  | 23 |
| 4.2.4     | Perfil de textura dos pães <i>sourdough</i> .....  | 23 |
| 4.2.5     | Avaliação sensorial dos pães <i>sourdough</i> .....  | 23 |
| 4.3       | Avaliação da acidez do <i>sourdough</i> e dos pães.....  | 24 |
| 4.4       | Diversidade microbiana em <i>sourdough</i> .....   | 24 |
| 4.4.1     | Extração de DNA total e PCR.....   | 24 |
| 4.4.2     | Preparo das bibliotecas.....   | 25 |
| 4.4.3     | Depósito das sequências .....  | 25 |
| 4.4.4     | Análises dos dados do sequenciamento.....  | 25 |
| 4.5       | Análise estatística .....  | 26 |
| <b>5.</b> | <b>ARTIGOS</b> .....   | 27 |
| 5.1       | Capítulo publicado: Uso de levedura comercial como alternativa para redução do tempo de preparo de pães de fermentação natural ..... | 27 |
| 5.2       | Artigo 1: Evolution of microbiota in spontaneous sourdoughs prepared   |    |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
|            | with organic or conventional whole wheat from South Brazil.....  | 36         |
| 5.3        | Artigo 2: Bacteria functional prediction: an innovative way to understand the quality of sourdough bread ..... | 66         |
| 5.4        | Resultados não apresentados nos artigos. ....  | 91         |
| <b>6.</b>  | <b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....   | <b>99</b>  |
| <b>7.</b>  | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>103</b> |
| <b>8.</b>  | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>104</b> |
| <b>9.</b>  | <b>APÊNDICES</b> .....   | <b>113</b> |
| 9.1        | Apêndice A: Tabela de especificações das farinhas utilizadas neste trabalho.....                               | 113        |
| 9.2        | Apêndice B: Ficha fornecida aos painelistas na análise sensorial...  | 114        |
| <b>10.</b> | <b>ANEXOS</b> .....  | <b>115</b> |
| 10.1       | Anexo 1: Ficha técnica da farinha trigo integral convencional .....  | 115        |
| 10.2       | Anexo 2: Ficha técnica da farinha branca .....   | 116        |

## LISTA DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| Tabela 1: Formulação dos pães avaliados ..... | 22     |

## LISTA DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Fluxograma explicativo dos processos de fabricação dos três tipos de <i>sourdough</i> ..... | 9      |
| Figura 2. Esquema da produção de <i>sourdough</i> .....   | 20     |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |   |
|-----------|---|
| BAA / AAB | Bactérias ácido-acéticas                            |
| BAL / LAB | Bactérias ácido-láticas                             |
| DNA       | Ácido desoxirribonucleico                           |
| FODMAPs   | Oligo-, di-, monossacarídeos e polióis fermentáveis |
| OTUs      | Unidades taxonômicas operacionais                   |
| pb        | Pares de bases                                      |
| PCR       | Reação em cadeia da polimerase                      |
| pH        | Potencial Hidrogeniônico                            |
| RDC       | Resolução da Diretoria Colegiada                    |
| RNA       | Ácido ribonucleico                                  |
| TBCA      | Tabela Brasileira de Composição de Alimentos        |
| TTA       | Acidez total titulável                              |

## 1. INTRODUÇÃO

A mistura de água com farinha de trigo é capaz de fermentar espontaneamente graças à diversa microbiota proveniente das farinhas utilizadas no processo e o produto dessa fermentação é chamado de *sourdough* (Reese et al., 2020). A composição da microbiota do *sourdough* é influenciada principalmente pelo tipo de farinha e pelas condições aplicadas durante o processo, o que impacta diretamente na mudança das características de produtos panificados produzidos com este fermento natural. Diferentes farinhas são utilizadas para produção de pães, no entanto o trigo da espécie *Triticum aestivum* é o mais comumente utilizado (De Vuyst et al., 2014; Gänzle, 2014; De Vuyst et al., 2016; Gänzle & Ripari, 2016; Gobbetti et al., 2016; Van Kerrebroeck et al., 2017).

A microbiota do *sourdough* é composta por bactérias e leveduras provenientes das farinhas utilizadas (Reese et al., 2020). A partir do seu metabolismo, os microrganismos são capazes de gerar compostos aromáticos voláteis, ácidos orgânicos e dióxido de carbono, o que garante a melhora nas características sensoriais. Além disso, ocorre a inibição de algumas bactérias patogênicas e deteriorantes, uma vez que a elevada taxa de acidez nesses produtos impede o estabelecimento de microrganismos indesejáveis no alimento. Deste modo, a validade dos pães de fermentação natural é aumentada graças aos compostos produzidos pela microbiota presente no *sourdough* (Poffo & Silva, 2011; Jeronymo-Geneviva et al., 2014, Menezes et al., 2019).

A partir do metabolismo natural da microbiota, ocorrem bioconversões de macromoléculas presentes no próprio *sourdough*, como carboidratos, proteínas e lipídeos, e é a partir dessas reações que pode ser gerada uma série de compostos. Esses compostos, por sua vez, podem ser utilizados novamente no metabolismo dos microrganismos, os quais podem ser convertidos em outras moléculas devido aos processos de nutrição e crescimento celular, bem como a biossíntese de novas substâncias. Muitas dessas substâncias geradas permanecem nos pães depois de assados, o que influencia nas características sensoriais (Annett et al., 2007; Menezes et al., 2019; Landis et al., 2021). Esse conjunto de atividades microbianas geram substâncias químicas que podem servir como alternativa aos aditivos químicos nos produtos alimentícios, garantindo um maior prazo de validade, e uma maior inserção no mercado atual como emergente produto “rótulo limpo” (*clean label*). Ou seja, um

alimento sem qualquer tipo de produto químico sintético ou artificial, que seja mais próximo ao natural e com o mínimo de processamento possível (Nascimento et al., 2018).

Até o momento, poucos estudos avaliaram a composição e a estabilidade da microbiota em massas fermentadas preparadas com farinhas de trigo integral orgânicas ou convencionais. Neste contexto, esta tese de doutorado apresenta um compilado de experimentos e discussão caracterizando e buscando diferenciar a microbiota entre farinhas convencional e orgânica. Além disso, esta tese traz resultados novos para a área de microbiologia de alimentos, já que os dados apresentados podem servir futuramente para auxiliar no direcionamento da formulação de *sourdough* tipos I e II e processamento de panificados, bem como garantir maior padronização para estes produtos, visando o uso da microbiota presente no *sourdough* como ferramenta no preparo de panificados. Esta tese está dividida em três principais estudos. O primeiro apresenta os dados de como os pães *sourdough* de curta fermentação são mais aceitos quando realizada análise sensorial, mantendo sabor característico no alimento. O segundo estudo caracterizou a microbiota de dois fermentos *sourdough* diferentes, feitos a partir de farinhas de trigo integrais convencional e orgânica, avaliando a estabilidade e a evolução dos microrganismos presentes durante o processo fermentativo para produção do fermento natural. Foram avaliadas beta e alfa diversidade para bactérias e fungos, e foi discutida a importância das espécies encontradas em maior abundância em relação à fermentação.

O terceiro estudo deu continuidade ao segundo, onde foram produzidos pães com o *sourdough* fermentado, e foram avaliadas características físico-químicas e sensoriais dos pães a partir de um painel randômico aprovado pelo comitê de ética da UFRGS. Além disso, esse mesmo estudo tentou relacionar as características dos pães produzidos com análises de bioinformática de predição de metabolismo das bactérias presentes no *sourdough* utilizado na formulação dos pães, o que pode indicar um possível direcionamento na padronização e escolha de produtos panificados. Por fim, o último estudo ainda está em fase de preparo e contempla toda a parte de tecnologia de alimentos, onde análises de textura e imagem foram feitas para os pães obtidos no terceiro artigo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar *sourdough* tipo I preparado com duas diferentes farinhas, orgânica e convencional, a partir de avaliação de diversidade e funcionalidade da microbiota bacteriana e fúngica, e da qualidade física e sensorial de pães produzidos em diferentes tempos de fermentação.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar se a microbiota presente na produção de *sourdough* se diferencia entre farinhas de trigo integral orgânica e convencional, e se as respectivas microbiotas são capazes de gerar resultados significativamente diferentes em parâmetros físico-químicos, sensoriais e metabólicos;
- 2.2.2 Confirmar se, de acordo com o tempo de fermentação, ocorre a inibição ou redução do desenvolvimento de microrganismos não desejáveis durante o processo fermentativo;
- 2.2.3 Analisar se os microrganismos presentes no *sourdough* são capazes de influenciar as características sensoriais de panificados.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Trigo e pães: panorama geral

O trigo representa em torno de 30% da produção mundial de cereais, sendo os principais produtores a União Europeia, Estados Unidos, China, Rússia, Canadá e Argentina. Pela diversidade de produtos gerados a partir do trigo, este cereal tem grande importância mundial. Desde a elaboração de produtos não alimentícios até a alimentação humana e animal, o trigo possui elevada qualidade nutricional, já que é composto por elevado teor proteico (Borém & Scheeren, 2015). Em 2019/2020, o volume global de produção de trigo totalizou mais de 765 milhões de toneladas métricas (Shahbandeh, 2021). Nesse contexto, o Brasil é o 15º maior produtor de trigo do mundo, com produção de em torno de 7,8 milhões de toneladas em 2021. Os estados de plantio em maior volume de produção estão o Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Conab, 2021).

O trigo pertence à família das gramíneas e gênero *Triticum* (Poaceae). Dentro do gênero, existe aproximadamente 20 espécies, sendo o *Triticum aestivum* uma das mais importantes espécies cultivadas para a fabricação de pão, e a mais cultivada para a alimentação de animais (Neto & Santos, 2017). A espécie *T. aestivum* é a mais frequente no consumo humano devido ao seu aprimoramento genético devido a adaptação aos solos e climas diferentes, podendo ser cultivada em regiões de clima desértico a países com elevado índice de precipitação (Santos, 2017). No entanto, o rendimento da colheita não chega a ser autossuficiente para o próprio consumo do país, fazendo-se necessária sua importação. Atualmente a Argentina é o principal fornecedor do grão e da farinha de trigo para o Brasil (Borém & Scheeren, 2015; Siepmann et al., 2019).

O *T. aestivum* é a cultura mais frequente na agricultura orgânica, assim como na agricultura convencional. A utilização de farinhas orgânicas tem ganhado destaque na produção de produtos de panificação. Além disso, tem crescido o interesse em estudos para avaliar o teor nutricional de farinhas de trigo oriundas de sistemas de produção orgânicos e convencionais. Alguns estudos são divergentes em relação às características entre farinhas convencionais e orgânicas, uma vez que foi observado que amostras orgânicas apresentaram teores de proteínas e microelementos de alta qualidade (Vrcek et al., 2013) ao mesmo tempo que não houve diferenças significativas de umidade, proteína e glúten entre farinhas orgânicas e

convencionais em outro estudo (Draghici et al., 2011), indicando diferenciação entre produtos de diferentes regiões e variedades.

Legislações referentes às farinhas de trigo tradicionais e orgânicas brasileiras existem a fim de padronizar a sua composição e comercialização. A Resolução Brasileira RDC nº150, de 13 de abril de 2017, dispõe sobre os requisitos de obrigatoriedade de enriquecimento da farinha de trigo tradicional, incluindo a categoria integral, com 140 µg a 220 µg de ácido fólico e de 4 mg a 9 mg de ferro a cada 100 g de farinha de trigo. No entanto, a lei brasileira de nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, dispõe sobre a agricultura orgânica, e tem por objetivo salientar que estes produtos devem atender à sustentabilidade econômica e ecológica. A lei determina que o alimento deverá manter sua integridade e qualidade em todas as etapas do processo, desde a plantação até a comercialização, não podendo ser modificado e nem possuir aditivos de teor nutricional.

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA), uma quantidade de 100 g de farinha de trigo integral possui: 15,4% de umidade, 312 kcal (1321 kJ) de energia, 11,6 g de proteínas, 1,31 g de lipídios, 70,0 g de carboidratos, 12,8 g de fibra alimentar e 1,69 g de cinzas (TBCA, 2021). As cinzas representam os minerais presentes na farinha, ganhando destaque ferro, sódio, potássio, magnésio e fósforo. Esses minerais são obtidos pela queima de matéria orgânica da farinha. Assim, uma elevada concentração de cinzas simboliza maior contaminação deste material, uma vez que um maior teor de cinzas é encontrado na parte externa do grão de trigo (Nitzke et al., 2019). O cálcio e o magnésio afetam os parâmetros de farinografia e extensografia da massa feita a partir da farinha de trigo, onde elevadas quantidades de cálcio conferem uma maior absorção de água pela massa. Além disso, os íons cálcio e magnésio atuam no equilíbrio de minerais no corpo humano, podendo ser utilizados também como fonte de nutrientes em produtos panificados (Sehn et al., 2015).

Como principais carboidratos presentes na farinha de trigo, são descritos os amidos e os açúcares. Dentre este último grupo estão os mono-, di-, oligo- e polissacarídeos, e frutanos (D'Appolonia & Rayas-Duarte, 1994; Arendt & Zannini, 2013). A concentração de açúcares, como glicose, frutose e rafinose, reduz conforme o tempo de fermentação dos produtos panificados. Os amidos têm a função de auxiliar na estruturação da massa, efetuando ligação com o glúten formado (D'Appolonia & Rayas-Duarte, 1994). Os lipídios influenciam positivamente na qualidade dos pães, e

auxiliam em um volume maior nestes alimentos. A maior parte dos lipídios presentes na farinha de trigo acaba por se ligar em um complexo formado por lipídios, proteínas e amido (Prabhasankar & Rao, 1999; Arendt & Zannini, 2013).

A estrutura dos pães está relacionada às proteínas presentes em cada espécie de trigo. Muitas vezes a determinação da quantidade de proteínas na farinha de trigo é calculada pela quantidade de glúten presente, uma vez que a quantidade de glúten determina a qualidade funcional da farinha utilizada (Nitzke et al., 2019). O glúten age na estrutura da massa e é formado por gliadinas e gluteninas. As gliadinas são formadas por ligações dissulfeto intramoleculares e sua ruptura gera o desdobramento da molécula da proteína. Após a hidratação das moléculas, as gliadinas se comportam como um líquido viscoso, conferindo características de viscosidade e extensibilidade na massa, garantindo um bom desenvolvimento. As gluteninas são proteínas polimerizadas, principalmente por pontes dissulfeto, e garantem força e elasticidade na massa. Essas características são essenciais para a retenção de gases produzidos durante a fermentação (Barak et al., 2013; Barak et al., 2014; Dhaka & Khatar, 2015).

Quando a massa é desenvolvida, gliadinas e gluteninas formam uma rede viscoelástica tridimensional contínua, conhecida por glúten, a qual é estabilizada por ligações covalentes dissulfeto, ligações não covalentes e interações hidrofóbicas. As quantidades de gliadina e glutenina presentes na farinha de trigo interferem diretamente na qualidade do pão, afetando as propriedades reológicas e de textura da massa, pois proporcionam uma maior força ao glúten formado (Barak et al., 2013; Barak et al., 2014).

A farinha é fonte rica em carboidratos e este macronutriente desempenha papel essencial no corpo como fonte preferencial energética. Diferentes tipos de farinha têm sido usados no pão, como trigo, centeio, cevada e milho. Os pães são ricos em calorias e estão presentes na alimentação diária dos indivíduos. Eles são amplamente consumidos no Brasil e no mundo, com muitas variedades encontradas em confeitarias, panificadoras e padarias. O mercado brasileiro de panificação cresceu nos últimos anos devido à elevada demanda por estes produtos. Os pães integrais e os pães contendo maior teor de fibras foram os que apresentaram maior aumento nas vendas, já que a busca por uma alimentação mais saudável vem crescendo no país. Apesar disso, o consumo de pão branco ainda é maior, pois o pão integral tem menor maciez e sua coloração é mais escura, o que não agrada tanto ao

paladar de todos os consumidores (Ishida & Steel, 2014).

O processo de panificação pode ser realizado através do uso de leveduras comerciais, chamado panificação tradicional, ou através do uso de *sourdough*, chamado processo de fermentação natural longa, realizado através do cultivo de uma massa fermentada naturalmente. Alguns alimentos produzidos utilizando a fermentação natural são mundialmente apreciados, sendo panettone, pandoro, colomba, focaccia e brioche os principais (De Vuyst & Neysens, 2005).

Nos últimos anos, foi observado um aumento no consumo de alimentos fermentados naturalmente (iogurtes, bebidas e pães), uma vez que são considerados alimentos funcionais. No caso dos pães de fermentação natural, os benefícios à saúde são vários. Dentre eles se destacam os benefícios gerados ao trato gastrointestinal devido a redução dos teores de oligo-, di- e monossacarídeos e polióis fermentáveis, do inglês *Fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols* (FODMAPs), e de glúten, bem como um menor índice glicêmico do alimento e o aumento da quantidade de vitaminas, minerais e antioxidantes presentes nesses pães (Lau et al., 2021). Da mesma forma, observou-se um maior consumo de alimentos orgânicos, por possuírem menor quantidade de contaminantes e serem livres de pesticidas e aditivos suplementares (Giraffa, 2004; Hoefkens et al., 2009). Os componentes bioativos de alimentos fermentados têm sido reconhecidos devido ao seu histórico de uso seguro e pelos seus ingredientes benéficos (Shah, 2007).

O processo de fermentação espontânea tem se destacado devido à qualidade nutricional e sensorial e pela durabilidade resultante dos produtos que utilizam essa técnica (De Vuyst & Neysens, 2005). Atualmente, os consumidores se preocupam com os ingredientes que compõem este alimento, de onde vem esse produto e de qual maneira ele foi preparado. Por este motivo, comidas menos processadas geralmente são formuladas com ingredientes de fácil reconhecimento pelos consumidores (Nascimento et al., 2018).

Há aproximadamente 20 anos atrás, no Reino Unido, surgiu o termo *clean label* (rótulo limpo). Este termo está associado principalmente a questões como: natureza, onde quanto mais próximo da natureza melhor é o ingrediente ou o produto; simplicidade, uma vez que o uso de menor quantidade de substâncias químicas torna o produto mais amigável e de maior simplicidade e familiaridade; transparência, a qual envolve o conhecimento dos ingredientes presentes no alimento bem como de sua procedência; e processamento, onde quanto menos processado é o alimento, mais

*clean* ele é considerado (Sweetman, 2016; Nascimento et al., 2018).

Uma vez que alguns compostos químicos têm sido associados a doenças, a biopreservação vem sendo estudada como alternativa para substituir os conservantes tradicionais, já que garante maior tempo de vida aos produtos alimentícios (Samapundo et al., 2016). A biopreservação confere maior segurança para o alimento e um maior tempo de validade de produtos alimentícios, pois os bioconservantes são gerados a partir da microbiota normal natural ou controlada do alimento durante o processo de fabricação (Axel et al., 2015). Algumas bactérias ácido lácticas (BAL) vêm sendo estudadas pelo aumento da segurança do alimento ou prolongamento da validade, principalmente as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus* e *Weissella* (Ananou et al., 2007; Reginensi et al., 2016).

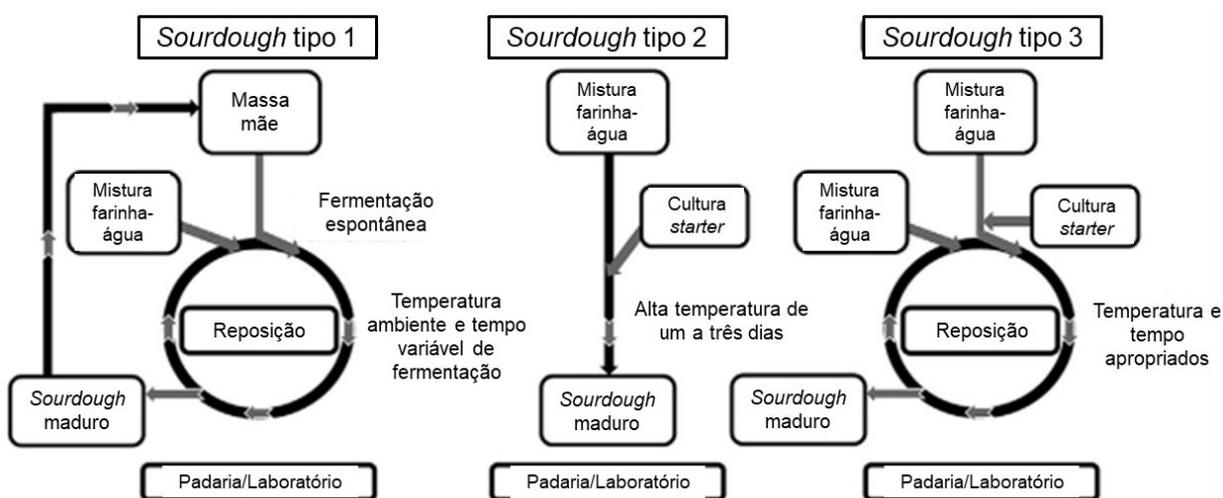
Desta forma, o uso de *sourdough* no preparo de pães vem sendo estudado para verificação da redução da deterioração destes pães e maior tempo de prateleira de produtos panificados (Katina et al., 2002; Axel et al., 2015). Isso pode estar relacionado ao grupo de bactérias presente, o qual produz uma quantidade significativa de ácidos que atuam como bioconservantes (Lavermicocca et al., 2003; Rizzello et al., 2011; Garofalo et al., 2012). Além disso, o processo de longa fermentação e uso de *sourdough* em produtos panificados vêm sendo inseridos dentro do grupo de alimentos considerados *clean label* (Ganzle & Ripari, 2016; Ua-Arak et al., 2017).

### 3.2 *Sourdough* como alternativa na panificação

O *sourdough*, também conhecido como *levain*, *lievito* ou *masa madre*, é um fermento natural originado há mais de 5 mil anos atrás (Torrieri et al., 2014; Borém & Scheeren, 2015; Arora et al., 2021). O nome é originado da palavra *sour*, que significa azedo, e resulta da mistura de água e farinha. Essa mistura é fermentada principalmente por BAL heterofermentativas e leveduras, as quais podem ser espontaneamente ativas no processo de fermentação ou podem ser adicionadas como culturas *starter*. A massa madre já fermentada representa o inóculo natural de microrganismos para as massas subsequentes. A acidez característica dos produtos que utilizam este fermento se deve a ação das BAL, as quais produzem diferentes ácidos durante a fermentação, onde os ácidos láctico e acético se destacam em maiores proporções (De Vuyst & Neysens, 2005; Gobbetti et al., 2014; Minervini et al.,

2014).

O *sourdough* pode ser classificado em três tipos com base na tecnologia utilizada para sua produção: tipo I ou tradicional; tipo II ou acelerado; e tipo III ou seco (Figura 1) (Böcker et al., 1995). O *sourdough* tipo I, também conhecido como *sourdough* tradicional, é caracterizado pela elevada atividade metabólica dos microrganismos devido à contínua reposição de farinha e água para manutenção dessa atividade. O preparo desse fermento é realizado a uma temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C durante um período de aproximadamente 10 dias, gerando acidez de aproximadamente pH 4,0 (Stolz, 1999). Essa fermentação ocorre sem adição de fermento biológico e é influenciada pela frequência de reposição de farinha e água e pela temperatura de fermentação. No final da última etapa da fermentação, o *sourdough* é então utilizado como agente de fermentação, podendo ser considerado como uma cultura *starter* (Hammes, 1991; De Vuyst et al., 2017).



**Figura 1.** Fluxograma explicativo dos processos de fabricação dos três tipos de *sourdough*. Fonte: Tradução livre de De Vuyst et al., 2017.

Com a alta demanda de produtos de fermentação natural, a indústria desenvolveu uma metodologia para produção de *sourdough* tipo II para reduzir o tempo de preparo. Neste caso, o fermento é uma preparação líquida, com culturas *starter* pré-selecionadas, que é produzida em nível industrial utilizando biorreatores ou tanques com temperaturas controladas acima de 30°C (Decock & Cappelle, 2005). Valores de pH em torno de 3,5 são observados logo após as primeiras 24 horas de fermentação. No entanto, as atividades metabólicas se mantêm restritas (Bocker et

al., 1995; Hammes & Gänzle, 1998; De Vuyst & Neysens, 2005; De Vuyst et al., 2017).

Esse tipo de *sourdough* normalmente não age como fermentador, e sim como acidificador, auxiliando na qualidade da massa. Devido ao longo tempo de fermentação (2 a 5 dias) e temperatura em torno de 30°C, as espécies mais frequentemente encontradas nestes fermentos são de *Lactobacillus* spp., visto que são mais tolerantes a pHs mais ácidos. Por outro lado, as leveduras presentes nesse ecossistema são inibidas e o volume da massa final é obtido a partir da adição de fermento biológico comercial (Böcker et al., 1995; Wiese et al., 1996).

Quando o *sourdough* do tipo II é seco e estabilizado após o seu preparo, ele é considerado tipo III (Decock & Cappelle, 2005). O *sourdough* do tipo III é uma massa em forma de pó seco que é utilizada para acidificar a massa e conferir aroma durante o processo de panificação. O processo de secagem leva a um aumento da vida de prateleira do *sourdough*, transformando-o em um produto de fácil transporte e armazenamento até o seu uso. Além da facilidade de uso, o *sourdough* tipo III resulta em produtos padronizados e de maior qualidade quando comparado aos tipos I e II, em relação à cor, ao aroma e ao teor de acidez do pão (Böcker et al., 1995; Hammes & Gänzle, 1998; De Vuyst & Neysens, 2005).

Estudos comprovam que as culturas *starter* são importantes para a textura, aroma, fatores nutricionais e tempo de vida útil do pão, devido às suas atividades metabólicas da microbiota simbiótica presente nesse ambiente. No entanto, é fundamental entender as interações microbianas e suas atividades metabólicas de forma mais ampla. Com isso, torna-se possível delinear uma mistura de culturas fermentativas mais adequada, capaz de se assemelhar aos traços desejados no pão produzido. Por este motivo, torna-se necessário o uso de microrganismos que possam ter seus processos fermentativos padronizados, controlados e otimizados (Liu et al., 2012; Navarrete-Bolaños, 2012; Zhu, 2014; Zhang et al., 2018).

### 3.3 Pão *sourdough*: propriedades e benefícios

A partir do metabolismo dos microrganismos durante a fermentação de pães, foi verificada a redução de FODMAPs. Os FODMAPs compõem uma classe heterogênea de compostos que incluem lactose, frutose em excesso de glicose, frutanos e frutooligosacarídeos, família rafinose de oligossacarídeos e polióis de açúcar (Muir et al., 2009). Em virtude de os pães serem consumidos em diversos países, existe a ingestão diária de uma elevada quantidade de FODMAPs

(Biesiekierski et al., 2011; Shewry & Hey, 2015; Ziegler et al., 2016; Menezes et al., 2018). Este grupo de substâncias pode ser pouco absorvido pelo intestino uma vez que são açúcares altamente fermentáveis, gerando uma série de efeitos nos processos do trato gastrointestinal, sendo um importante fator para desencadear sintomas da síndrome do intestino irritável e desconforto abdominal (Menezes et al., 2018). Para diminuição de desconfortos causados por esta síndrome, a qual acomete em torno de 7 a 21% da população mundial, uma dieta com quantidade reduzida de FODMAPs tem sido relatada como uma terapia eficiente (Lovell & Ford, 2012; Zannini & Arendt, 2018).

Além disso, recentemente os sintomas da sensibilidade não-celíaca ao glúten (*Non-Celiac Gluten Sensitivity*), condição caracterizada por desconfortos gastrointestinais na ausência de doença celíaca ou alergia à farinha, diminuíram com a restrição de FODMAPs na dieta alimentar (Biesiekierski et al., 2013; Halmos et al., 2015; Dieterich et al., 2019; Skodje et al., 2018). Ziegler et al. (2016) avaliaram a formação de FODMAPs em variedades de trigo. Os autores observaram que independente da espécie utilizada o que mais importa para redução de FODMAPs é a técnica utilizada para o preparo dos pães, na qual o tempo de fermentação superior há quatro horas reduz significativamente as quantidades destes compostos. Desta forma, é possível afirmar que o tempo de fermentação elevado reduz esses compostos nos pães produzidos.

Alguns estudos confirmam os benefícios do *sourdough* em relação às características sensoriais, tecnológicas e nutricionais dos pães produzidos (Gobbetti et al., 2014; Torrieri et al., 2014; Pétel et al., 2017; Rinaldi et al., 2017). Essas características dependem da composição microbiana do fermento, que é modulado pelo tempo, temperatura, origem da farinha entre outros fatores variáveis (Gänzle, 2014; Minervini et al., 2014). Uma casca mais grossa e mais escura é observada em pães *sourdough*, e é ocasionada pelo maior tempo de fermentação. A coloração mais escura é proveniente da reação de Maillard e caramelização dos açúcares disponíveis no pão (Fennema, 1996).

Inúmeros estudos verificaram uma elevada dureza da casca e do miolo dos pães *sourdough*, porém o aroma e o sabor resultantes são diferenciados. O resultado da ação dos microrganismos presentes no *sourdough* tornam o pão de fermentação natural um produto singular (Sanz-Penella et al., 2012; Acquistucci et al., 2019; Yildirim & Arici, 2019). Siepmann et al. (2019) verificaram que a elevada acidez

presente nestes produtos leva a uma desestabilização da estrutura do amido e do glúten, e resulta em uma massa mais elástica. A elasticidade e a dureza desses pães não agradam tanto sensorialmente, conforme indicam alguns estudos que realizaram degustação com painelistas variados (Sanz-Penella et al., 2012; Abedfar & Sadeghi, 2019).

### 3.4 Microbiota presente no *sourdough*

As farinhas de trigo e de outros cereais contêm uma microbiota composta por bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos que se desenvolvem espontaneamente no *sourdough* durante o processo fermentativo. Os microrganismos presentes na fermentação do *sourdough* dependem da composição química da massa, bem como sua qualidade nutricional, temperatura, atividade de água, presença de sal, número de etapas durante o preparo e tempo de fermentação (De Vuyst & Neysens, 2005).

A microbiota do *sourdough* metaboliza carboidratos e aminoácidos produzindo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e ácidos orgânicos. Muitas vezes, as BAL e leveduras competem por disponibilidade de substratos, resultando em populações heterogêneas (De Vuyst & Neysens, 2005). Normalmente, após uma semana de realimentação e fermentação do *sourdough* tipo I, esta microbiota se torna estável (De Vuyst et al., 2017). No entanto, a qualidade da farinha utilizada influencia no período de fermentação do *sourdough*, uma vez que a farinha é capaz de alterar as características microbiológicas, enzimáticas e nutricionais desta microbiota em razão dos nutrientes, enzimas e compostos que, por sua vez, direcionam as características sensoriais do produto (Ercolini et al., 2013; De Vuyst et al., 2014; De Vuyst et al., 2017).

Siepmann et al. (2019) observaram no início da fermentação uma quantidade de 0,371 g/g de carboidratos na massa, sendo 0,355 g/g de amido, 0,008 g/g de maltose, 0,004 g/g de glicose e 0,003 g/g de frutose. Os mesmos autores perceberam que 25% de amido foi hidrolisado no primeiro dia de fermentação em sacarose e maltodextrinas pelas amilases presentes na farinha utilizada e o acúmulo dessas moléculas ocorreu até o terceiro dia de fermentação. Após esse período, foi verificado o uso dessas moléculas para produção de ácido lático e ácido acético pelo metabolismo do açúcar, o que ocasionou mudanças físico-químicas significativas no meio. Além disso, diferentes álcoois foram formados e posteriormente oxidados,

formando novos compostos, que por sua vez foram consumidos pelos microrganismos para que fossem formados novos produtos metabólicos (Siepmann et al., 2019).

Com a disponibilidade de substrato e a não predominância de espécies produtoras de ácidos nos primeiros dias de fermentação, microrganismos como *Enterococcus* spp. podem ser observados entre os três primeiros dias de processo de fermentação. No entanto, em torno do quinto dia de fermentação ocorre um aumento dos gêneros *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*, demonstrando que estes são os microrganismos mais adaptados a uma massa com um maior teor de acidez (Corsetti et al., 2007; Van der Meulen et al., 2007; Ercolini et al., 2013; Weckx et al., 2010; De Vuyst et al., 2017).

Foi observado em um estudo que houve crescimento exponencial de BAL e leveduras em apenas 24 horas de crescimento, sendo que as bactérias tiveram significativo crescimento até o terceiro dia, seguido por redução da viabilidade celular após esse período. As leveduras se multiplicaram até o sétimo dia de fermentação, com uma estabilidade entre os microrganismos observada após o quinto dia de fermentação (Siepmann et al., 2019).

Di Cagno et al. (2014) afirmaram que o *sourdough* com microbiota estável é composto principalmente por gêneros de BAL heterofermentativas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Gluconobacter*, *Lactococcus*, *Acetobacter*) e leveduras (*Candida*, *Torulaspota*, *Saccharomyces*). O domínio de lactobacilos heterofermentativos em *sourdough* pode ser explicado pela sua competitividade com outros microrganismos e sua fácil adaptação neste ambiente, uma vez que o metabolismo de carboidratos deste microrganismo é adequado às principais fontes de energia da massa como substrato: maltose e frutose. Esse gênero também possui diversas respostas ao estresse metabólico, sendo a mais comum na produção de compostos com atividade antimicrobiana (como lactato, acetato e bacteriocinas), os quais contribuem para a competitividade com os demais microrganismos do ambiente (De Vuyst & Neysens, 2005).

Entretanto, essa microbiota pode ser alterada pela adição de outros componentes. Estudos demonstraram que quando o fermento biológico comercial é adicionado na produção de produtos panificados, a microbiota é alterada e as características do produto são influenciadas. Isso ocorre devido à competição entre os microrganismos adicionados na massa e os microrganismos presentes no ambiente, além do aumento na produção de CO<sub>2</sub>, realizado pelas leveduras do

fermento biológico. Desta forma, pode-se afirmar que as características finais de produtos panificados são afetadas pelas diferentes interações microbianas, matérias primas e tecnologias (De Vuyst & Neysens, 2005).

#### 3.4.1 Comunidade bacteriana do *sourdough*

O grupo das BAL compreende bactérias gram-positivas não esporuladas que são capazes de produzirem ácidos durante a fermentação de carboidratos (Poffo & Silva, 2011). Os ácidos são formados de maneira rápida durante o metabolismo desses microrganismos, fato de extrema importância para a prevenção de contaminações do ambiente e de matérias primas utilizadas. O pH ácido, consequente da produção de ácidos orgânicos, tem ação antimicrobiana, impedindo o estabelecimento de microrganismos contaminantes (Jeronymo-Ceneviva et al., 2014).

As BAL podem ser divididas em homofermentativas e heterofermentativas. As BAL homofermentativas consomem hexoses para que ocorra a produção de ácido láctico, e incluem as espécies *Lactococcus* spp., *L. delbruckii*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. helveticus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Aerococcus* spp. Essas espécies são utilizadas onde uma rápida acidificação do meio é desejada (De Vuyst et al., 2016; Siepmann et al., 2019).

As BAL heterofermentativas consomem pentoses para produzir ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e etanol. Normalmente, a formação de gás é a característica que as diferenciam das homofermentativas. As espécies *Leuconostoc* spp., *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum* e *Limosilactobacillus reuteri* são consideradas heterofermentativas obrigatórias. No entanto, algumas espécies formam CO<sub>2</sub> e outros subprodutos apenas sob condições específicas ou pelo uso de substratos específicos, e por isso se classificam em heterofermentativas facultativas. Alguns microrganismos que se destacam nesse grupo são espécies diferentes de lactobacilos, como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei* e *Latilactobacillus curvatus*. Outras vias de formação de gás também podem ocorrer quando outros substratos, como citrato, gluconato e aminoácidos, são utilizados (De Vuyst & Neysens, 2005; De Vuyst et al., 2016; Siepmann et al., 2019).

Microrganismos como *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., dentre outros gêneros, também podem ser encontrados na composição da microbiota do *sourdough*. Os gêneros bacterianos frequentemente descritos em outros estudos são *Lactobacillus*, em predominância, seguido por *Leuconostoc*, *Weissella* e *Pediococcus*.

Estes microrganismos podem atuar na primeira fase da fermentação e são importantes para o crescimento em associação com os lactobacilos. O gênero *Pediococcus* normalmente está presente no fim do processo fermentativo, enquanto *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* raramente são encontrados nesta mesma fase (De Vuyst & Neysens, 2005; Siepmann et al., 2019).

As atividades metabólicas mais expressivas das comunidades bacterianas durante a fermentação são a acidificação e a formação de aromas, e estão relacionadas ao metabolismo dos carboidratos (Van Kerrebroeck et al., 2017). O catabolismo da maltose e o uso de frutose e outros açúcares têm importante papel na acidificação, já que aumentam a biodisponibilidade de nutrientes, uma vez que os fitatos complexam nutrientes importantes (De Vuyst & Neysens, 2005).

No geral, as BAL produzem metabólitos com efeito positivo na textura e durabilidade dos pães, como ácidos orgânicos, álcoois, aldeídos, diacetil, enzimas e exopolissacarídeos. A transformação de substratos em compostos aromáticos, como aminoácidos livres ou peptídeos, também auxiliam no aroma e sabor destes alimentos (Torrieri et al., 2014). Di Cagno et al. (2014) observaram que o *sourdough* tem a capacidade de formar ácido acético, acetaldeído, etanol e outros compostos, sendo o ácido acético composto chave na produção do sabor característico dos pães *sourdough* (De Vuyst & Neysens, 2005). Além disso, a partir da ação bacteriana e da acidificação da massa, é possível obter diferentes compostos aromáticos, aumentando assim a vida útil do produto e melhorando as suas características sensoriais (Nascimento, 2017).

#### 3.4.2 Comunidade fúngica do *sourdough*

O *sourdough* é conhecido por hospedar uma diversidade significativa de fungos filamentosos e leveduriformes, destacando os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Torulaspota* e *Saccharomyces* (De Vuyst & Neysens, 2005). Estes microrganismos estão relacionados principalmente com a fermentação da massa e conferem sabor em pães de longa fermentação (De Vuyst et al., 2014; De Vuyst et al., 2016). A espécie *Saccharomyces cerevisiae* possui elevado potencial biotecnológico na indústria de alimentos e de bebidas e, normalmente, está associada à comunidade microbiana do *sourdough*. A sua presença pode estar relacionada ao uso de fermento biológico no mesmo ambiente, indicando uma transferência desse microrganismo do ambiente para o fermento natural (Vrancken et

al., 2010; Daniel et al., 2011). Essa espécie atua na produção de CO<sub>2</sub> através do metabolismo da fermentação alcoólica de açúcares, permitindo o aumento do volume dos pães, e atua também no processo de formação do glúten e compostos aromáticos, como álcoois, aldeídos, carbonilas e ésteres (Paramithiotis et al., 2000; Zhang et al., 2018).

O *sourdough* também pode hospedar a espécie *Wickerhamomyces anomalus*, que, juntamente com a *S. cerevisiae*, se mostra resistente a um meio mais ácido e à elevada pressão osmótica no ambiente (Vrancken et al., 2010). A presença destes microrganismos em *sourdough* está relacionada ao grau de hidratação da massa, o cereal utilizado e a temperatura aplicada, além de outros fatores como a quantidade de reposições realizadas e o tempo de fermentação em cada etapa (De Vuyst et al., 2014; De Vuyst et al., 2016). Temperaturas mais elevadas, que estejam em torno de 35°C, afetam o crescimento das leveduras, sendo prejudiciais a estes microrganismos devido ao pH ácido neste ambiente, caracterizado pelo metabolismo ativo intensificado das BAL em sua temperatura ideal de crescimento. No entanto, temperaturas mais baixas, aplicadas durante a fermentação, favorecem o crescimento das leveduras, elevando o teor de etanol e a saborização do produto (Gänzle et al., 1998; De Vuyst et al., 2016).

A quantidade de oxigênio presente durante a fermentação também influencia no crescimento das leveduras. Algumas espécies são capazes de se desenvolver apenas na presença de oxigênio, e por isso se tornam ativas em fermentos menos consistentes e na superfície do *sourdough* (Vogelmann & Hertel, 2011). A reposição diária de matéria prima é de extrema importância para o crescimento das leveduras, pois além de uma leve aeração, a reposição de farinha e água a cada 24 a 48 horas garante um crescimento mais homogêneo quando comparado às BAL, que se desenvolvem em um menor período de tempo (Vogelmann & Hertel, 2011; De Vuyst et al., 2016).

Estudos sobre a microbiota de *sourdough* utilizando sequenciamento de alto desempenho vem sendo desenvolvidos buscando caracterizar a diversidade microbiana desses fermentos. No entanto, até o presente momento não existem informações das diferenças microbiológicas entre as farinhas integrais orgânicas e convencionais com a mesma abordagem do presente estudo, incluindo a análise sensorial. O trabalho foi realizado visando caracterizar e comparar a microbiota presente em *sourdough* preparado com farinhas de trigo integral convencional e

orgânica. Além disso, buscou-se verificar como as diferenças na microbiota afetam as características físicas e sensoriais de pães *sourdough*.

### 3.5 Funcionalidade da microbiota de *sourdough*

É de extrema importância que se conheça os metabolismos dos microrganismos presentes em *sourdough* bem como é interessante que se faça uso disso a fim de aprimorar os produtos gerados a partir do processo fermentativo. O metabolismo dos microrganismos presentes em *sourdough* e a atividade enzimática são interdependentes, já que a acidificação do meio é capaz de modular a atividade das enzimas presentes nos cereais e a solubilidade de substratos, com destaque para as proteínas do glúten (Gänzle, 2014). Como fator de impacto direto, o tipo de farinha é capaz de influenciar na interação entre os microrganismos presentes na microbiota, onde uma contribuição positiva dos metabólitos das BAL em *sourdough* e no aroma do pão pode ser observada (Gobbetti et al., 1994). Já foi observado que no trigo a diferença de metabolismos encontrados foi dependente do conteúdo de grãos integrais nas amostras avaliadas (Koistinen et al., 2018). É necessário reconhecer os diferentes metabolismos dos diferentes microrganismos presentes no fermento a fim de direcionar o produto final com as características desejadas. Os principais metabolismos de bactérias ácido lácticas e acéticas e de leveduras são de carboidratos e de aminoácidos (Liu et al., 2018).

O metabolismo de carboidratos é responsável pela geração de fontes abundantes de co-fatores reduzidos, sendo responsável principalmente pela alteração de características como textura, retenção de água, conservação, sabor e a durabilidade de panificados. A geração de açúcares reduzidos durante o metabolismo bacteriano gera uma gama diversa de aromas bem como acaba por produzir oligossacarídeos que servem como prébióticos a outros microrganismos. Um dos maiores determinantes do miolo de panificados é o amido, pois sua degradação fornece carboidratos fermentáveis e açúcares reduzidos pela ação da enzima amilase. Além disso, muitos microrganismos formadores de exopolissacarídeos (EPS) contribuem para o metabolismo de carboidratos, aumentando o volume dos pães e melhorando a textura dos mesmos (Gänzle, 2014). Metabolismo de amido, sucrose, piruvato, ciclo de Krebs, via pentose fosfato e glicólise já foram observadas anteriormente (Zhang et al., 2021). Esse metabolismo vem sendo descrito como o mais importante quando se busca uma saudável interação entre bactérias e leveduras

fermentadoras (Zhang et al., 2021).

O metabolismo de aminoácidos e proteínas atua com importante papel na adaptação de BAL ao ambiente ácido devido a estabilização de pH dentro e fora das células bacterianas (Wang et al., 2021). Além disso, é capaz de gerar compostos bioativos que são responsáveis pela formação do glúten e volume da massa, bem como geração de sabor e aroma em panificados (Katina et al., 2006; Gänzle, 2014). Katina et al. (2006) destacam o aumento na proteólise devido a elevada atividade enzimática em farinhas integrais, o que leva ao aumento da concentração de aminoácidos no *sourdough* e no pão. Esse aumento de aminoácidos na massa é de extrema importância, visto que BAL requerem aminoácidos livres para um metabolismo celular e crescimento ativos (Zhang et al., 2021). Como boa parte dos consumidores tolera apenas baixo nível de acidez em produtos provenientes do trigo, o processo de fermentação deve ser controlado para que não haja acidez excessiva. Com o uso de algumas espécies de BAL homofermentativas, o aumento de intensidade de sabor em panificados pode ser atingido após um curto tempo de fermentação (Katina et al., 2006).

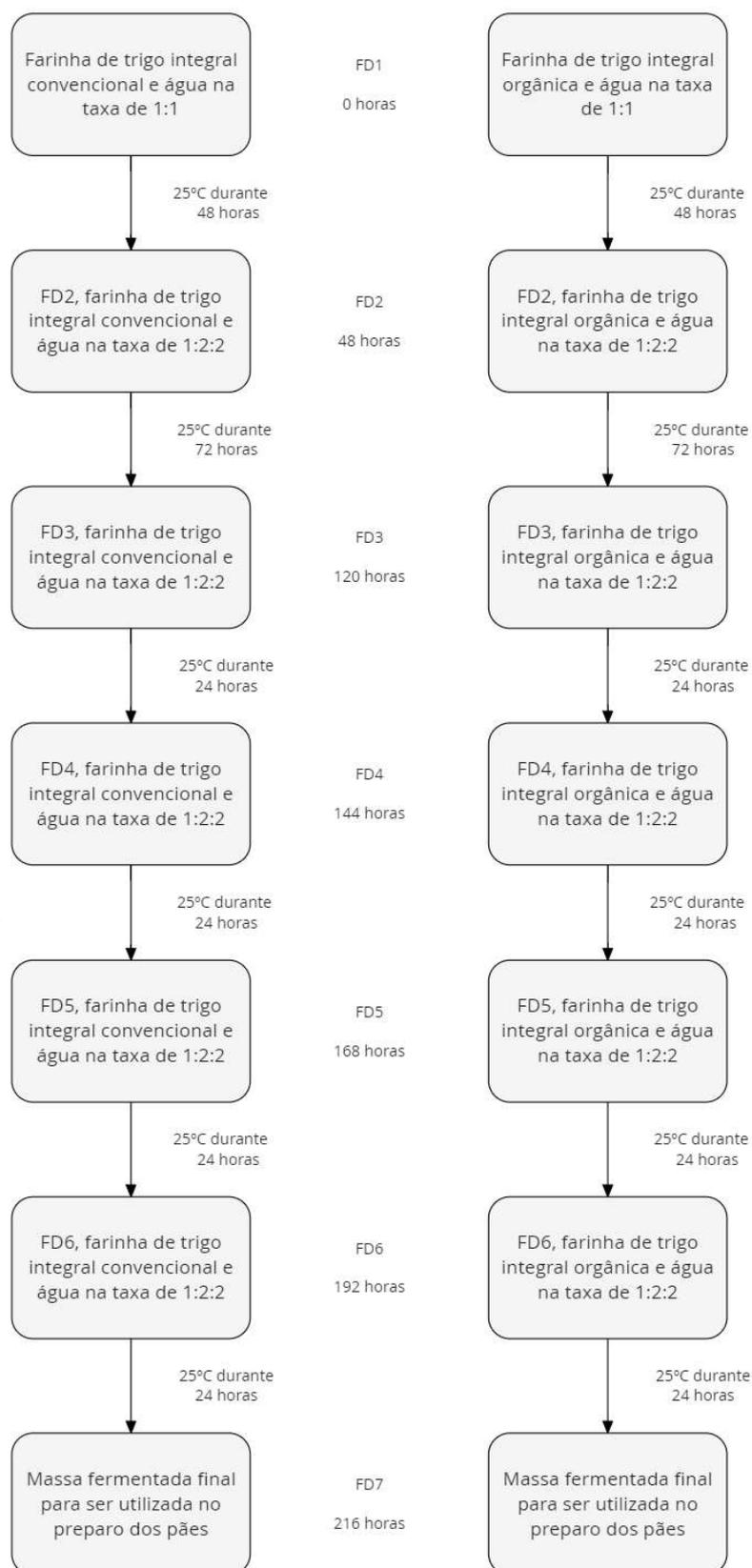
Culturas *starter* pré-definidas vem sendo utilizadas em *sourdough* para que características já conhecidas sejam mantidas nos panificados, o que auxilia também na estabilidade e facilidade do processo como um todo (Plessas, 2021). As BAL utilizam os carboidratos como a principal fonte energética para o metabolismo celular, o que leva a formação de ácidos e aprimoramento aromático, hidrólise proteica e queda de pH. Esse mesmo grupo de bactérias, durante o metabolismo de proteínas, pode eliminar alguns compostos alergênicos proteicos presentes nos alimentos, sendo capazes de degradar albumina e gliadina, por exemplo (Wang et al., 2021). Por este motivo, este trabalho traz a importância da caracterização do metabolismo dos microrganismos com ação principal durante a fermentação natural de pães.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Produção do *sourdough*

A produção de *sourdough* tipo I foi baseada na metodologia de Menezes et al. (2019) com modificações (Figura 2). Foram utilizadas farinha de trigo integral convencional (PanFácil, Canoas, Brasil), nomeada como F2, farinha de trigo integral orgânica (ecoBio, Coronel Bicaco, Brasil), nomeada como F4, e água potável

(informações das farinhas fora apresentadas no Apêndice A). A primeira fermentação (FD1) foi realizada usando uma mistura [1:1] de água e farinha, e mantida em estufa a 25 °C durante 48 horas. Os próximos passos da fermentação (FD2 – FD7) foram realizados utilizando uma mistura [1:2:2] da massa previamente fermentada, água e farinha, respectivamente, onde a mistura foi mantida em estufa a 25°C. A segunda fermentação (FD2) foi mantida por 72 horas em estufa e as demais etapas (FD3 – FD7) durante 24 horas. Em cada etapa de reposição de farinha e água as amostras foram homogeneizadas e coletadas a fim de aferir pH e acidez total titulável (TTA), incluindo os tempos zero e final (216 horas).



**Figura 2.** Esquema da produção de *sourdough*. Fonte: a autora. FD: massa fermentada.

#### 4.2 Preparo dos pães

A massa fermentada final (216 horas) foi utilizada para a produção dos pães, juntamente com os demais ingredientes (Tabela 1). Farinha branca premium (PanFácil, Canoas, Brasil), fermento natural, água, fermento biológico seco (Fleischmann, Pederneiras, Brasil) (quando utilizado) e açúcar refinado (União, Brasil) foram colocados em misturadora (Britânia Multi Pane, Joinville, Brasil) e homogeneizados por 3 minutos. Na sequência, a gordura vegetal (Coamo, Brasil) foi adicionada e a massa foi misturada até sua completa absorção. O sal foi adicionado e a massa continuou sendo misturada por mais 10 minutos sob velocidade rápida. A massa foi dividida em porções de 180 gramas e, subsequentemente, foram passadas pelo cilindro modelador, moldadas e colocadas em fôrmas, as quais foram mantidas em câmara fermentadora com umidade constante de 85% a 35°C (modelo AC20T, Venâncio). Pães *sourdough* acrescidos de fermento biológico comercial foram mantidos durante uma hora em câmara fermentadora, enquanto pães *sourdough* permaneceram durante 8 horas.

Após os respectivos tempos de fermentação, as massas foram assadas em forno de convecção (FTT 150E, Indústria e Comércio de Fogões Tedesco Ltda., Caxias do Sul, Brasil) durante 13 minutos a 180°C. Após assados, os pães foram retirados das fôrmas e resfriados em grades metálicas a temperatura ambiente durante uma hora. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Como controle, foram preparados pães utilizando apenas o fermento biológico comercial na sua formulação, com período de fermentação de uma hora.

Tabela 1. Formulação dos pães avaliados.

| Ingredientes            | Pão controle | Pão FN* | Pão FN / FB** |
|-------------------------|--------------|---------|---------------|
|                         |              |         |               |
| Farinha de trigo        | 100.0        | 60.0    | 60.0          |
| Fermento natural        | 0            | 40.0    | 40.0          |
| Água                    | 60.0         | 24.0    | 24.0          |
| Fermento biológico seco | 2.0          | 0       | 2.0           |
| Açúcar refinado         | 3.0          | 3.0     | 3.0           |
| Gordura vegetal         | 2.0          | 2.0     | 2.0           |
| Sal                     | 2.0          | 2.0     | 2.0           |

\*FN: fermento natural; \*\*FB: fermento biológico comercial; \*\*\*Em percentual sobre o total de farinha de trigo.

#### 4.2.1 Avaliação de volume e *baking loss* dos pães *sourdough*

O volume específico dos pães ( $\text{cm}^3 / \text{g}$ ) foi determinado pela técnica de deslocamento de sementes de painço e calculado pela taxa entre o volume e o peso de cada pão (Silva et al., 1998). O *baking loss* (P) foi calculada pela equação:  $P\% = [(P_{aa} - P_{da}) / (P_{da})] \times 100$ , sendo  $P_{aa}$  o peso da massa antes do assamento e  $P_{da}$  o peso depois do assamento e resfriamento à temperatura ambiente (Demirkesen et al., 2013).

#### 4.2.2 Colorimetria dos pães *sourdough*

A análise de cor das crostas e miolos dos pães foi realizada com a utilização da escala de cor de Minolta através do colorímetro CR-400 (Konica Minolta). Foram avaliados os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E$ . O valor de  $\Delta E$  foi indicado conforme equação:  $\Delta E = [(L^*_c - L^*_a) + (a^*_c - a^*_a) + (b^*_c - b^*_a)]^{1/2}$ , onde “a” é valor obtido na análise da amostra e “c” é o valor obtido pela análise do controle. O valor de  $\Delta E$  indica a diferença entre os parâmetros de cor das amostras e do controle (Delgado-Nieblas et al., 2012).

#### 4.2.3 Propriedades alveolares dos pães *sourdough*

A análise das propriedades alveolares dos pães foi realizada utilizando fotos de fatias de pães de mesmo tamanho pelo software ImageJ, versão 1.52a (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, public domain). A porcentagem de alvéolos maiores que 5 mm<sup>2</sup>, a densidade de células de gás (células de gás / cm<sup>2</sup>) e a porcentagem de porosidade nas fatias (área de células de gás / área do pão) foram avaliadas conforme Machado & Thys (2019).

#### 4.2.4 Perfil de textura dos pães *sourdough*

A análise de textura para crosta e miolo dos pães foi realizada em triplicata para cada formulação utilizando texturômetro (modelo TA.XT Plus, Stable Micro Systems) com o software *Exponent Lite*. A dureza da crosta, bem como os parâmetros de dureza, coesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência do miolo foram determinados de acordo com as recomendações do fabricante (*Texture Technologies* - TTC, 2019). O teste de crosta foi realizado utilizando o probe P/2 mm, com célula de carga de 50 kg, com velocidades pré-teste 1 mm/s, teste 1 mm/s e pós teste 10 mm/s, a uma distância de 9.500 mm. O teste aplicado no miolo teve o probe P/36, com célula de carga de 50 kg, com velocidades pré-teste 2 mm/s, teste 1,7mm/s e pós teste 2 mm/s, com percentual de compressão de 40%.

#### 4.2.5 Avaliação sensorial dos pães *sourdough*

A análise sensorial dos pães que utilizaram fermento natural foi realizada com 59 painelistas não treinados escolhidos aleatoriamente, de acordo com EN ISO 8589 (ISO, 2007). Uma escala hedônica de 7 pontos foi aplicada no teste de aceitação dos pães com fermento natural, onde em um extremo a qualificação era “desgostei muito”, no centro era “nem gostei, nem desgostei” e no outro extremo “gostei muito”, de acordo com a NBR 12994 (ABNT, 1993). Os painelistas avaliaram os atributos de cor, aroma, sabor, textura e impressão global de cada amostra de pão. A intenção de compra foi realizada conforme escala de 5 pontos, com o número 1 significando que “certamente não compraria”, o número 3 significando “talvez comprasse, talvez não comprasse”, e o número 5 significando “certamente compraria”. Também foi avaliado se o julgador já conhecia pães de fermentação natural. A ficha aplicada na análise sensorial está no apêndice B. A análise foi aceita pelo Comitê de Ética da UFRGS sob número CAAE 50441621.4.0000.5347.

### 4.3 Avaliação da acidez do *sourdough* e dos pães

O fermento natural foi coletado em cada estágio de propagação (0, 48, 120, 144, 168, 192 e 216 horas) e analisado quanto ao pH e acidez total titulável (TTA). O mesmo procedimento foi realizado em triplicata para os pães produzidos. A metodologia do TTA foi empregada de acordo com IAL (2005) e o valor de TTA foi expresso pela quantidade de mL de NaOH 0.1 mol / L necessária para atingir pH 8.5.

### 4.4 Diversidade microbiana em *sourdough*

#### 4.4.1 Extração do DNA total e PCR

Amostras de duas gramas cada, em triplicata, foram coletadas das farinhas de trigo integral convencional e orgânica puras, bem como das amostras de massa fermentada homogeneizadas nas etapas 1 (0 horas), 3 (120 horas), 5 (168 horas) e 7 (216 horas), e foram submetidas a extração de DNA total utilizando o kit E.Z.N.A. (Bio-Tek), conforme recomendações do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi realizada por fluorimetria utilizando Qubit® 3.0 (ThermoFischer Scientific).

A investigação da comunidade bacteriana foi realizada utilizando oligonucleotídeos para a região V4 do gene 16S rRNA (F515 e R806) (Caporaso et al., 2011), enquanto para a comunidade fúngica foram utilizados oligonucleotídeos direcionados para a região do espaçador transcrito interno do gene *DNAr* (*internal transcribed spacer - ITS*) (ITS1 e ITS2) (White et al., 1990; Gardes & Bruns, 1993). Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados acrescidos da sequência de adaptadores da plataforma Illumina (Endres et al., 2021).

As reações de amplificação da região V4 do gene 16S rRNA foram conduzidas em um volume total de 50 µL, contendo 1x tampão da enzima, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2U da enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase (INVITROGEN, California, USA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, aproximadamente 10 ng de DNA genômico e água para completar o volume total. Para *ITS*, as reações foram conduzidas em um volume total de 50 µL, contendo 1x tampão da enzima, 0,2 mM dNTPs, 0,16 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2U da enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase (INVITROGEN, California, USA), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, aproximadamente 10 ng de DNA genômico e água para completar o volume total.

As condições de amplificação do gene 16S rRNA foram compostas por uma etapa de desnaturação inicial (94°C durante 3 minutos), seguida por 30 ciclos de 3 etapas cada (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante

30 segundos) e extensão final (72°C durante 5 minutos). Para a amplificação do gene *ITS* as condições utilizadas foram compostas por uma etapa de desnaturação inicial (95°C durante 5 minutos), seguida por 35 ciclos de 3 etapas cada (95°C durante 45 segundos, 56°C durante 45 segundos e 72°C durante 1 minuto) e extensão final (72°C durante 10 minutos). As reações foram conduzidas no termociclador BioRad (BioRad, Hemel Hempstead, Reino Unido) para as amplificações. Os produtos obtidos das amplificações (5 µL) foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % e revelados com Brometo de Etídio (10 mg/mL) sob luz ultravioleta.

#### 4.4.2 Preparo das bibliotecas

Após verificação das amplificações, os produtos amplificados foram purificados utilizando Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN), de acordo com o protocolo do fabricante. Os Índices foram adicionados aos produtos purificados e as bibliotecas foram preparadas seguindo as instruções do fabricante (Illumina Inc., San Diego, California, USA). O sequenciamento foi conduzido na plataforma Illumina MiSeq utilizando o MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles; Illumina Inc., San Diego, California, USA).

#### 4.4.3 Depósito das sequências

As sequências obtidas foram depositadas no banco de dados NCBI sob o número de acesso PRJNA632575, identificadas como "*Sourdough microbiome: bacterial and fungal diversity using 16S rRNA and ITS genes by Illumina MiSeq platform*".

#### 4.4.4 Análise dos dados do sequenciamento

Os dados gerados pelo sequenciamento foram avaliados quanto à sua qualidade com FastQC (Andrews, 2018). As *reads* obtidas foram analisadas utilizando o *pipeline* FROGS (*Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution*) (Escudié et al., 2018) para verificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As sequências foram filtradas por tamanho (340-500pb para *16S* rRNA; 150-500 pb para *ITS*) e então agrupadas em OTUs utilizando o SWARM (Mahé et al., 2015) com o parâmetro de distância "d = 3". As quimeras foram removidas pelo VSEARCH (Rognes et al., 2016) e as OTUs foram retidas com pelo menos 0,1% das leituras em todo o conjunto de dados. Estes passos resultaram em 98 e 56 OTUs para bactérias e fungos,

respectivamente, as quais foram avaliadas com o banco de dados de SILVA 132 SSU para bactérias (Quast et al., 2013) e UNITE 8.2 (UNITE, 2021) para os fungos.

A predição metabólica da comunidade bacteriana do *sourdough* foi inferida utilizando o PICRUST2 (v2.3.0) (Douglas et al., 2020) e as sequências foram executadas utilizando o script “picrust2\_pipeline.py”. Esse script executa cada uma das quatro etapas principais: inserção da sequência, predição de genomas ocultos, predição de metagenoma e predições em nível de vias metabólicas. As funções foram classificadas utilizando a tabela de mapeamento do banco de dados de KEGG (Kanehisa et al., 2017).

#### 4.5 Análise estatística

As análises estatísticas para os testes de pH, TTA e qualidade tecnológica e sensorial dos pães foram realizadas a partir do teste exato de Fischer e qui-quadrado, onde  $p < 0,05$  foi considerado fator de diferença significativa entre as amostras avaliadas. Para explorar a diversidade microbiana dos dados metagenômicos, foi utilizado o pacote “phyloseq” (v1.30.0) do *software* R Studio (v.3.6.1) (McMurdie & Holmes, 2013). A abundância relativa das espécies presentes nas amostras foi plotada com auxílio da função “plot\_composition”. Um agrupamento hierárquico baseado na distância de Jaccard foi plotado com o método ward.D2 e visualizado com a função “hclust”. A riqueza das espécies encontradas foi estimada com “plot\_richness” e plotada com função boxplot utilizando os índices “Chao1”, “se.chao1”, “Simpson” e “InvSimpson”. Os valores numéricos foram estimados com “estimate\_richness”. Um *heatmap* contendo as abundâncias das OTUs foi plotado utilizando a função plot\_heatmap do ggplot2 package v3.3.0 (Wickham, 2010).

## 5. ARTIGOS

### 5.1 Capítulo publicado: Uso de levedura comercial como alternativa para redução do tempo de preparo de pães de fermentação natural

O capítulo intitulado como “Capítulo 9: Uso de levedura comercial como alternativa para redução do tempo de preparo de pães de fermentação natural”, de autoria de Letícia da Fontoura Xavier Costa, Matheus Cardoso Vieira, Raquel Pischke Garske, Roberta Cruz Silveira Thys, Michele Bertoni Mann e Ana Paula Guedes Frazzon, foi publicado no livro digital Ciência e Tecnologia de Alimentos, 13º volume, 1ª edição, sob responsabilidade da Editora Poisson: Belo Horizonte, 2022. O capítulo pode ser acessado pelo link <https://doi.org/10.36229/978-65-5866-168-9.CAP.09>. Abaixo segue documento enviado e aceito para publicação.

#### USO DE LEVEDURA COMERCIAL COMO ALTERNATIVA PARA REDUÇÃO DO TEMPO DE PREPARO DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL

Letícia da Fontoura Xavier Costa, Matheus Cardoso Vieira, Raquel Pischke Garske, Roberta Cruz Silveira Thys, Michele Bertoni Mann, Ana Paula Guedes Frazzon.

#### RESUMO

A busca por hábitos saudáveis faz com que o mercado seja abastecido com alimentos alternativos, e a fermentação natural vem se destacando neste nicho alimentício. Este processo demanda tempo e pode interferir no comércio destes alimentos. Devido a poucos estudos na literatura, o objetivo deste trabalho foi a verificação da adição de levedura comercial conjuntamente ao fermento natural em pães com a intenção de reduzir o tempo de fermentação, sem alteração das características finais do produto. O pH, acidez total titulável, volume específico, textura e intenção de compra foram avaliados. A inserção de levedura comercial fez com que os pães dobrassem de volume em sete horas a menos de fermentação, e reduziu a acidez e dureza dos

pães, afetando positivamente a intenção de compra. A inserção de levedura comercial em pães sourdough é uma alternativa satisfatória, pois mantém certa acidez característica de pães sourdough e diminui o tempo de preparo, viabilizando a comercialização deste alimento.

PALAVRAS-CHAVE: fermentação natural; sourdough; levedura; ácidos; dureza.

## 1. INTRODUÇÃO

Um aumento na demanda de produtos mais saudáveis e saborosos fez com que o nicho de alimentos considerados naturais se ampliasse (Gobbetti et al., 2014; Abedfar e Sodeghi, 2019). Alimentos de fermentação espontânea têm ganhado destaque, pois são considerados naturais e saudáveis, responsáveis por conterem compostos desejáveis para a saúde (Giraffa, 2004). O sourdough, também conhecido como levain ou massa madre, é um fermento natural resultante da mistura de água e farinha, fermentado principalmente por bactérias ácido lácticas (BAL) heterofermentativas e leveduras. O nome sourdough é originado da palavra *sour*, que significa azedo. Essa característica ácida se deve a ação das BAL, que produzem ácidos orgânicos durante o processo fermentativo (De Vuyst e Neysens, 2005; Gobbetti et al., 2014), deixando o produto final com acidez elevada e maior dureza.

Este processo de fermentação espontânea apresenta vantagens na qualidade nutricional e sensorial, bem como maior durabilidade devido à formação de ácido láctico durante o processo fermentativo, o que evita o crescimento de fungos deteriorantes. Porém, o longo tempo de preparo do fermento natural, assim como do processo de fermentação do pão elaborado exclusivamente a partir deste fermento, fazem com que um seleto grupo de comerciantes do ramo da panificação utilizem esta técnica no mercado atual (De Vuyst e Neysens, 2005). Devido a poucos estudos na literatura relacionados a este assunto, o objetivo deste trabalho foi a verificação da viabilidade da adição de levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, conjuntamente ao fermento natural, em pães, com intuito de redução do tempo de fermentação, sem alteração das principais características do produto. Para tanto, os pães com e sem a adição da levedura comercial foram comparados em relação à acidez, textura, volume específico e análise sensorial.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Fermento natural

A produção de sourdough foi realizada utilizando farinha de trigo integral orgânica conforme metodologia de Menezes et al. (2019), com modificações. Uma mistura inicial [1:1] de água e farinha foi mantida em estufa a 25 °C durante 48 horas. Os passos seguintes (2 a 7) foram preparados utilizando uma mistura [1:2:2] da massa fermentada da etapa anterior, água e farinha, respectivamente, e a mistura foi mantida em estufa a 25 °C. A segunda fermentação ocorreu em estufa durante 72 horas e as demais (3 a 7), durante 24 horas. Após a sétima etapa de fermentação, o sourdough foi mantido em geladeira a 5 °C até sua utilização. Para elaboração dos pães, a massa fermentada da sétima etapa (MF7) foi reativada na mesma condição da etapa 7 e utilizada imediatamente na formulação do pão.

### 2.2 Preparo do pão

A formulação do pão consistiu em farinha de trigo adicionada da massa fermentada MF7 (60% farinha de trigo tradicional e 40% MF7), sendo os demais ingredientes calculados em percentual sobre o peso desta mistura. Assim, o restante da formulação foi: 24% de água, 2% de levedura comercial (quando utilizada), 3% de açúcar e 2% de gordura vegetal. Os ingredientes foram colocados em batedeira planetária e homogeneizados. Uma quantidade de 2% de sal foi adicionada e a massa foi misturada por mais 2 minutos, em velocidade rápida. A massa foi dividida em porções de 180 g, cilindrada, modelada manualmente, colocada em fôrmas e mantida em câmara fermentadora durante uma hora (pães com fermento natural e levedura comercial) ou durante 8 horas (pães apenas com fermento natural), em umidade e temperaturas constantes de 85% a 35 °C. Após a fermentação, as massas foram assadas em forno de convecção durante 13 minutos a 180 °C. Os pães assados foram resfriados durante uma hora em temperatura ambiente antes das análises serem realizadas. Todas as análises foram avaliadas em triplicata.

### 2.3 Análise das propriedades dos pães

Os pães foram analisados quanto ao pH, à acidez total titulável (*total titratable acidity* - TTA), ao volume específico e à dureza do miolo. A análise de TTA foi realizada de acordo com IAL (2005). O volume foi determinado pela técnica de deslocamento de sementes de painço, sendo o volume específico (cm<sup>3</sup> / g) calculado pela taxa entre

o volume e o peso de cada pão (Silva et al., 1998). A análise da dureza foi realizada pelo uso de texturômetro (modelo TA.XT Plus, Stable Micro Systems) com o software Exponent Lite, onde foi determinada conforme TTC (2019), utilizando probe P/36, com célula de carga de 50 kg, com velocidades pré-teste 2 mm / s, teste 1,7 mm / s e pós teste 2 mm / s, com percentual de compressão de 40%. A análise estatística do teste de Fischer ( $p < 0,05$ ) foi aplicada nos resultados obtidos.

## **2.4 Análise sensorial**

A análise sensorial foi realizada com 59 painelistas não treinados escolhidos aleatoriamente, de acordo com EN ISO 8589 (ISO, 2007). A intenção de compra foi avaliada conforme escala de 5 pontos, com o número 1 significando que “certamente não compraria”, o número 3 significando “talvez comprasse, talvez não comprasse”, e o número 5 significando “certamente compraria”. Também foi avaliado se o julgador já conhecia pão de fermentação natural.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Caracterização do pH, TTA, textura e volume específico**

O pH dos pães contendo somente fermento natural foi menor (Tabela 1), e pode-se inferir que este valor seja resultante da produção de ácido pelas BAL, uma vez que um maior tempo de fermentação leva a um maior crescimento destas bactérias e, conseqüentemente, a uma maior produção de ácidos (Sanz-Penella et al., 2012; Ripari et al., 2016). A adição de fermento biológico comercial garante o aumento da quantidade de levedura dentro da massa, reduzindo o tempo de fermentação e, conseqüentemente, reduzindo a acidez do produto (Rocha e Malcata, 2012; Sanz-Penella et al., 2012; De Vuyst et al., 2016). O metabolismo das BAL produz elevada quantidade de ácidos orgânicos, reduzindo o pH e conseqüentemente elevando o valor de TTA necessário para alcançar um pH de 8.5, e essa informação está de acordo com o que foi observado nos resultados deste estudo (Ripari et al., 2016; Bender et al., 2018).

Tabela 1. Valores de pH, TTA\*, dureza e volume obtidos pela análise dos pães sourdough

| Amostras de pão                  | pH                       | TTA*<br>(Meq/kg)         | Dureza (g)                   | Volume específico<br>(cm <sup>3</sup> /g) |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|---|
| Sourdough                        | 4,60 ± 0,05 <sup>a</sup> | 6,45 ± 0,16 <sup>a</sup> | 1943,57 ± 85,53 <sup>a</sup> | 2,63 ± 0,03 <sup>a</sup>                  |
| Sourdough + <i>S. cerevisiae</i> | 5,21 ± 0,01 <sup>b</sup> | 5,55 ± 0,34 <sup>b</sup> | 747,70 ± 44,08 <sup>b</sup>  | 2,90 ± 0,14 <sup>a</sup>                  |

\*TTA: acidez total titulável. Fonte: a autora.

Não houve diferença significativa entre o volume de ambas as amostras, o que pode ser explicado pela diferença no tempo de fermentação, pois o pão de longa fermentação necessita de um tempo mais elevado para atingir o mesmo volume que o pão que utilizou a levedura comercial (De Vuyst e Neysens, 2005; Aplevicz et al., 2013).

O pão sourdough tradicional de longa fermentação apresenta maior dureza, e estes valores estão relacionados à acidez de cada massa fermentada (Sanz-Penella et al., 2012; Yildirim e Arici, 2019). De acordo com Siepmann et al. (2019), um aumento da acidez resulta em modificações das estruturas do glúten e amido, onde uma massa mais elástica pode se formar e uma maior dureza pode ser resultante. O rompimento da estrutura do glúten ocorre devido a atividade proteolítica ativada em baixo pH, e alguns estudos já observaram uma redução significativa nos teores de glúten quando bactérias do gênero *Lactobacillus* e proteases isoladas de fungos foram adicionadas em amostras de pães sourdough (Arendt et al., 2007; Rizzello et al., 2007; De Angelis et al., 2010).

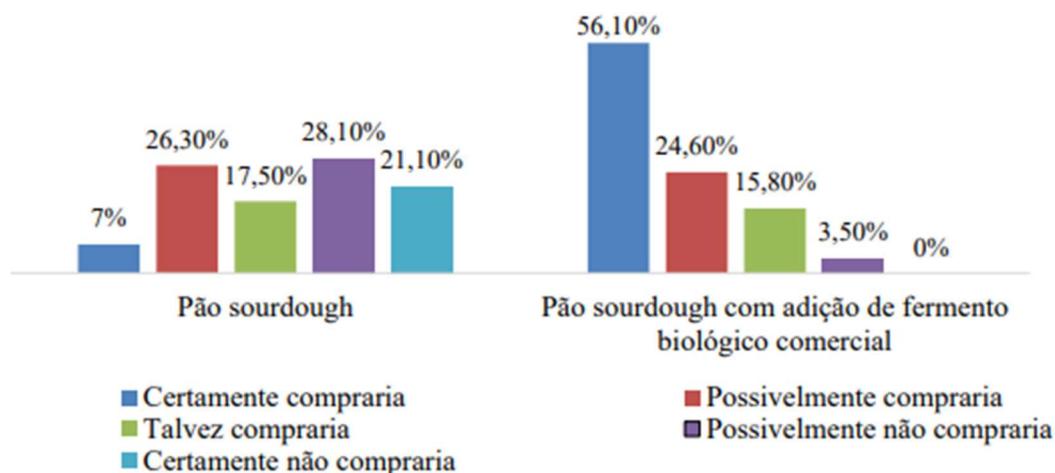
### 3.2 Análise sensorial

Entre os painelistas participantes da avaliação sensorial, apenas 25,4% já haviam consumido pães de fermentação natural, enquanto 71,2% não conheciam esta linha de produto. Uma pequena parte dos julgadores (3,4%) não respondeu à essa questão. De acordo com a Figura 1, pelo fato de a maior parte dos julgadores não conhecer o produto, é provável que este tenha sido o motivo da baixa intenção de compra do pão sourdough sem adição de levedura comercial, já que uma elevada

acidez e uma maior dureza são características predominantes neste pão. Muitas vezes a dureza é relacionada com alimentos mais velhos, e, mesmo não sendo este o caso, essa característica pode não ser muito bem aceita pelos consumidores que não conhecem este tipo de produto (Abedfar e Sadeghi, 2019).

Além disso, os resultados demonstram (dados não apresentados) que tanto quem já havia experimentado quanto quem não conhecia este tipo de produto preferiu o pão sourdough com adição da levedura comercial. Este dado indica que o aumento do pH e a redução da dureza observados para a amostra com levedura comercial não descaracterizaram o produto e, sendo assim, é possível reduzir o tempo de produção destes pães sem afetar a intenção de compra do consumidor. No entanto, um estudo adicional, direcionado ao público consumidor de pães de fermentação natural, é fator primordial para um melhor entendimento da aceitabilidade do produto elaborado.

Figura 1. Intenção de compra de pães sourdough sem e com o fermento biológico comercial de acordo com o total de painelistas.



Fonte: a autora.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível observar elevada aceitação sensorial dos pães sourdough contendo levedura comercial mesmo no público que já conhecia as características do produto. Com o mesmo volume e menor acidez e dureza que o pão sourdough, uma diminuição de sete horas de fermentação destes pães pode ser aplicada na produção de panificados, o que leva a uma diminuição do custo relacionado ao tempo de preparo. Como o painel realizado era, na sua maioria, composto por pessoas que não conheciam o pão de fermentação natural, uma avaliação adicional, direcionada

apenas ao público consumidor de pão de fermentação natural, deve ser realizada.

## 5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi beneficiado por verba disponibilizada pela CAPES e pelo CNPq. Agradecemos ao professor Dr. Jeverson Frazzon pela disponibilização do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (UFRGS) para realização das etapas de preparo e fermentação do fermento natural.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDFAR, A., SADEGHI A. 2019. Response surface methodology for investigating the effects of sourdough fermentation conditions on Iranian cup bread properties. *Heliyon*, 5(2019), e02608. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02608>

APLEVICZ, K.S., OGLIARI, P.J., SANT'ANNA, E.S. 2013. Influence of fermentation time on characteristics of sourdough bread. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 233-239. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000200005>

ARENDRT, E.K., RYAN, L.A., DAL BELLO, F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24, 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.011>

BENDER, D., FRABERGER, V., SZEPASVÁRI, P., D'AMICO, S., TOMOSKOZI, S., CAVAZZI, G., JAGER, H., DOMIG, K.J., SCHOENLECHNER, R. 2018. Effects of selected lactobacilli on the functional properties and stability of gluten-free sourdough bread. *European Food Research and Technology*, 244, 1037-1046. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3020-1>

DE ANGELIS, M., CASSONE, A., RIZZELLO, C.G., GAGLIARDI, F., MINERVINI, F., CALASSO, M., DI CAGNO, R., FRANCAVILLA, R., GOBBETTI, M. 2010. Mechanism of Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes from *Triticum turgidum* L. var. *durum* by Sourdough Lactobacilli and Fungal Proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 508-518. <https://doi.org/10.1128/AEM.01630-09>

DE VUYST, L., NEYSENS, P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>

DE VUYST, L., HARTH, H., VAN KERREBROECK, S., LEROY, F. 2016. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities.

International Journal of Food Microbiology, 239, 26-34.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>

GIRAFFA, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. FEMS Microbiology Reviews, 28, 251-260.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005>

GOBBETTI, M., RIZZELLO, C.G., DI CAGNO, R., DE ANGELIS, M. 2014. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. Food Microbiology, 37, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.012>

Instituto Adolfo Lutz (IAL). (2005). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Norma 016/IV. Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos (volume 1, 4. ed.). Brasília.

ISO. (2007). Sensory analysis-General guidance for the design of test rooms. ISO Standard 8589.

MENEZES, L.A.A., SARDARO, M.L.S., DUARTE, R.T.D., MAZZON, R.R., NEVIANI, E., GATTI, M., DE DEA LINDNER, J. 2019. Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil. Food Microbiology, 85, 103302. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103302>

RIPARI, V., GÄNZLE, M.G., BERARDI, E. 2016. Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. International Journal of Food Microbiology, 232, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.025>

RIZZELLO, C.G., DE ANGELIS, M., DI CAGNO, R., CAMARCA, A., SILANO, M., LOSITO, I., DE VINCENZI, M., DE BARI, M.D., PALMISANO, F., MAURANO, F., GIANFRANI, C., GOBBETTI, M. 2007. Highly Efficient Gluten Degradation by Lactobacilli and Fungal Proteases during Food Processing: New Perspectives for Celiac Disease. Applied and Environmental Microbiology, 73, 4499-4507. <https://doi.org/10.1128/AEM.00260-07>

ROCHA, J.M., MALCATA, F.X. 2012. Microbiological profile of maize and rye flours, and sourdough used for the manufacture of traditional Portuguese bread. Food Microbiology, 31, 72-88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.008>

SANZ-PENELLA, J.M., TAMAYO-RAMOS, J.A., HAROS, M. 2012. Application of Bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. Food and Bioprocess Technology, 5, 2370-2380. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0547-1>

SIEPMANN, F.B., ALMEIDA, B.S., RIPARI, V., SILVA, B.J.G., PERALTA-

ZAMORA, P.G., WASZCZYNSKYJ, N., SPIER, M.R. 2019. Brazilian sourdough: microbiological, structural and technological evolution. *European Food Research and Technology*, 245, 1583-1594. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03254-8>

SILVA, M.R., SILVA, M.A.A.P.D., CHANG, Y.K. 1998. Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. *Food Science and Technology*, 18, 25-34. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000100007>

Texture Technologies (TTC). (2019). Overview of Texture Profile Analysis. <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#tpa-measurements>

YILDIRIM, R.M., ARICI, M. 2019. Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread. *LWT – Food Science and Technology*, 112, 108224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.122>

## 6. DISCUSSÃO GERAL

O trigo está presente no cenário mundial e é utilizado para produção de diferentes alimentos panificados, os quais são diariamente consumidos por grande parte dos brasileiros. No país, boa parte deste cereal é importada. Com resgate cultural de alimentos mais naturais e contendo menos aditivos, o processo de fermentação vem se tornando mais corriqueiro dentre a comunidade. O *sourdough*, apesar de ser uma técnica muito antiga no preparo de pães, tem se tornado presente uma vez que existe uma busca dos indivíduos pelo preparo dos seus próprios alimentos (Borém & Scheeren, 2015; Siepmann et al., 2019).

Responsável por gerarem sabores aprimorados nos alimentos fermentados, os microrganismos que compõem a microbiota deste fermento natural são capazes de proporcionar experiências sensoriais únicas, com acidez acentuada e textura diferenciada, com notas aromáticas muito marcantes. O longo tempo de preparo do *sourdough* e dos pães faz com que aumente a demanda de compra e venda destes produtos em padarias artesanais, uma vez que muitos consumidores não possuem tempo disponível para suprir a demanda do processo de fermentação espontânea. Padarias, apesar de estarem constantemente preparando os mesmos produtos para comercialização, não têm uma padronização efetiva, já que o fermento pode ser alterado de acordo com a farinha utilizada, bem como os pães podem ter diferentes resultados sensoriais de acordo com as condições do processo aplicado, como tempo de fermentação, umidade e temperatura. Por esse motivo existe a busca de uma maior padronização dos produtos *sourdough* pensando em uma produção em larga escala (Pétel et al., 2017; Rinaldi et al., 2017).

Durante a revisão bibliográfica, foi observado que a maior parte das pesquisas publicadas são de instituições italianas, uma vez que este tipo de técnica tem forte presença nos países europeus. Com abordagens distintas, os trabalhos analisados durante a produção da tese demonstraram uma lacuna de pesquisa, onde percebemos a falta de publicações aqui no país, provavelmente devido à baixa aceitação dos consumidores por estes produtos de longa fermentação. Indo além, poucas publicações buscam relacionar a microbiota do fermento natural com as características obtidas em pães de fermentação natural, da mesma forma que não foi observada comparação sensorial de fermentações longa e curta utilizando o *sourdough*.

A partir destes achados durante o desenvolvimento da tese, as lacunas de estudo foram separadas em tópicos, os quais foram transformados em publicações, correlacionando os resultados obtidos neste estudo. No primeiro artigo foi abordada a caracterização e evolução da microbiota de dois *sourdoughs* produzidos de duas diferentes farinhas de trigo integral: convencional e orgânica. Foi avaliada a microbiota das farinhas puras bem como diferentes tempos selecionados dentro o processo fermentativo, que totalizou 216 horas. Os resultados foram muito interessantes e realmente foram condizentes com a literatura, onde foi observada a evolução da microbiota bacteriana e fúngica em relação à diminuição de microrganismos indesejáveis e aumento de microrganismos benéficos. Essa seleção se deve principalmente à acidificação do meio, uma vez que bactérias ácido lácticas e ácido acéticas tiveram papel principal na produção de ácidos orgânicos.

Além disso, foi observado que a farinha é a matéria prima responsável pela caracterização do fermento, como já descrito na literatura (Reese et al., 2020), uma vez que as análises das farinhas puras e dos *sourdough* no tempo zero mantiveram as caracterizações muito semelhantes. As bactérias ácido lácticas foram as mais abundantes, predominando os lactobacilos e o gênero *Pediococcus*, bem como leveduras fermentadoras. Apesar da hipótese inicial ser a observação de uma diferença entre as farinhas convencional e orgânica, não foi observada diferença significativa nas microbiotas de ambos os fermentos preparados.

No segundo artigo trouxemos uma abordagem inédita que visou correlacionar a predição do metabolismo das bactérias presentes nos *sourdough* utilizados no preparo dos pães com as características obtidas no produto final. Também foi averiguada a adição de fermento biológico seco comercial aos pães, bem como aplicação de um período menor da fermentação da massa. Os resultados demonstraram uma maior acidez e menor volume específico para os pães contendo *sourdough* na formulação, o que comprovou a influência da microbiota nas condições físico-químicas dos pães. Parâmetros como cor e dureza foram modificados em relação ao pão controle principalmente nos pães de fermentação longa, uma vez que as características da massa do pão foram alteradas de forma a aumentar a dureza e diminuir a luminosidade do miolo. Em relação ao aumento da dureza, foi possível observar que a adição do *sourdough* na massa do pão, independente do tempo de fermentação, foi capaz de gerar diferença entre os produtos obtidos.

A dureza resultante nos pães de longa fermentação foi maior que nas

demais amostras. Esse parâmetro, junto da elevada acidez proveniente do longo tempo de fermentação, fez com que esses pães obtivessem os menores escores nas análises sensoriais. Os pães de curta fermentação obtiveram as maiores porcentagens relacionadas a aceitação do produto, indicando que o fator tempo de fermentação é determinante para as características do panificado. Um menor período de fermentação da massa dos pães foi melhor aceito pelos painelistas, indicando uma possível simplificação e encurtamento do processo, o que garante um menor tempo de preparo destes panificados e maior chances de aplicação desta metodologia em grande escala visando a produção industrial. Apesar da microbiota e da predição metabólica não possuírem diferença estatística entre os *sourdough* preparados com farinhas orgânica ou convencional, o pão de curta fermentação produzido com *sourdough* de farinha orgânica obteve os melhores resultados de aprovação dentre os painelistas.

As características obtidas nas análises dos pães correspondem à predição metabólica analisada. Os metabolismos de carboidratos e aminoácidos foram os mais prevalentes, indicando que houve elevada degradação proteica e consequente produção de aminoácidos livres, o que provavelmente interferiu nos parâmetros avaliados nos pães. Esses metabolismos provavelmente foram os principais responsáveis pela formação de aroma, cor e sabor característico deste tipo de produto, bem como aumento de acidez e alteração da textura dos pães.

As demais publicações da tese foram divididas em capítulo publicado, o qual foi um compilado de dados voltados à área de ciência e tecnologia de alimentos; e dados de análises do pão *sourdough* em relação a características tecnológicas, onde os resultados serão ajustados e publicados futuramente como *short communication*. Estas análises são de extrema importância quando se busca padronização na fabricação de alimentos que usam fermento natural na composição, uma vez que é de interesse industrial a produção de panificados com sabores estabelecidos e constantes. Além disso, os estudos de cepas individuais, tanto de predição metabólica quanto de aplicação em pães, são interessantes, uma vez que é possível fazer a aplicação de cepas específicas como *starter* para obtenção de características específicas em produtos formulados.

Por fim, analisando e interligando os resultados obtidos nesta tese, compreende-se a importância do estudo da microbiota para aplicação na área de alimentos a fim de melhorar e garantir resultados desejados em pães *sourdough*. A

caracterização obtida na microbiota e na predição metabólica servem como base para as indústrias alimentícias incrementarem sua produção e utilizarem estes dados como passo inicial na implementação de processos biotecnológicos padronizados para a produção de fermento natural com uso de culturas *starter*, que direcionem os sabores e características desejadas no produto final. Mais estudos devem ser realizados para que seja possível complementar os resultados obtidos neste trabalho, sendo esta tese fonte de ideias para pesquisas futuras.

## 7. CONCLUSÃO

Foi possível caracterizar a composição e a diversidade bacteriana e fúngica da microbiota que compõe as amostras de *sourdough* preparadas a partir das farinhas de trigo integral convencional e orgânica, as quais não se diferenciaram estatisticamente. No entanto, resultados diferentes foram obtidos para alguns parâmetros, indicando metabolismos diferenciados dentre os microrganismos presentes. A microbiota presente nos fermentos produzidos foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos, algum deles indesejados, conforme foi avançando o processo fermentativo do fermento, o que ocorreu devido ao aumento de acidez e estresse do meio. A microbiota de *sourdough* foi capaz de influenciar diretamente os pães formulados e produzidos nesta tese, e o tempo de fermentação da massa do pão demonstrou ter papel chave nas características sensoriais finais dos pães. Este trabalho demonstra a relevância dos microrganismos durante o processo fermentativo, sendo fonte de ideias para estudos futuros.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abedfar A, Sadeghi A. 2019. Response surface methodology for investigating the effects of sourdough fermentation conditions on Iranian cup bread properties. *Heliyon*. 5:e02608. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02608>
- Acquistucci R, Melini V, Tusa S, Mecozzi M. 2019. Effect of different leavening agents on the nutritional characteristics of two durum wheat breads. *European Food Res Technol*. 245(10): 2173-2181. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03324-x>
- Ananou S, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E. 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. *Communicating Cur Res Edu Topics Trends App Microbiol*. 475-486.
- Andrews S. 2018. FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 12 jan. 2021.
- Annett LE, Spaner D, Wismer WV. 2007. Sensory profiles of bread made from paired samples of organic and conventionally grown wheat grain. *J Food Sci*. 72(4): S254-S260. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00331.x>
- Arendt EK, Zannini E. 2013. Wheat and others *Triticum* grains. Em: Arendt EK, Zannini E (Eds.), **Cereal grains for the food and beverage industries**. WP Limited, Cambridge, UK. 1-67. <https://doi.org/10.1533/9780857098924.1>
- Arora K, Ameer H, Polo A, Di Cagno R, Rizzello CG, Gobbetti M. 2021. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends Food Sci Technol*. 108:71-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>
- Associação Brasileira De Normas Técnicas (ABNT). **Métodos de Análise Sensorial dos alimentos e bebidas - NBR 12994**. São Paulo: ABNT, 1993.
- Axel C, Röcker B, Brosnan B, Zannini E, Furey A, Coffey A, Arendt EK. 2015. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiol*. 47:36-44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.005>
- Barak S, Mudgil D, Khatkar BS. 2013. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Sci Technol*. 51(1):211-217. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.011>
- Barak S, Mudgil D, Khatkar BS. 2014. Influence of Gliadin and Glutenin Fractions on Rheological, Pasting, and Textural Properties of Dough. *Int J Food Properties*. 17(7):1428–1438. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.717154>
- Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Guéguen M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol*. 126(3):278-285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015>
- Biesiekierski JR, Rosella O, Rose R, Liels K, Barrett JS, Sheperd SJ, Gibson PR, Muir JG. 2011. Quantification of fructans, galacto-oligosaccharides and other short-chain carbohydrates in processed grains and cereals. *J Hum Nutr Diet*. 24(2):154-176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2010.01139.x>
- Biesiekierski JR, Peter SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR. 2013. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology*. 145(2):320-328. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.051>
- Böcker G, Stolz P, Hammes W. 1995. Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des Sauerteig-typischen Stammes *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl Brot*. 49(6):370-374.

- Borém A, Scheeren PL. (Eds). 2015. **Trigo do plantio à colheita**. Editora UFV, Viçosa, MG. 260 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1022684/trigo-do-plantio-a-colheita>>. Acesso em: 28 jan. 2020.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of a millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(Supplement\_1):4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Coghetto CC, Brinques GB, Ayub MAS. 2016. Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions. *Int J Food Sci Nutr*. 67(8):929-943. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.121199>
- Conab, Companhia Nacional de Abastecimento. 2021. Produção de grãos pode chegar a 291,1 milhões de toneladas na safra 2021/22. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4422-producao-de-graos-pode-chegar-a-291-1-milhoes-de-toneladas-na-safra-2021-22>. Acesso em 09 dez. 2021.
- Corsetti A, Settanni L, Valmorri S, Mastrangelo M, Suzzi G. 2007. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiol*. 24(6):592-600. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.002>
- D'Appolonia BL, Rayas-Duarte P. 1994. Wheat carbohydrates: structure and functionality. Em: Bushuk W, Rasper VF (Eds.), **Wheat**. Springer, Boston, MA. 107-127. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2672-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2672-8_8)
- Daniel HM, Moons MC, Huret S, Vrancken G, De Vuyst L. 2010. *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99(1):63–73. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9517-2>
- De Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vos WM. 2006. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J*. 16(9):1018-1028. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.003>
- De Vuyst L, Neysens P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Tech*. 16:43-56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>
- De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel HM, Weckx S. 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol*. 37:11-29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>
- De Vuyst L, Harth H, Van Kerrebroeck S, Leroy F. 2016. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *Int J Food Microbiol*. 239:26-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>
- De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Leroy F. 2017. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv Appl Microbiol*. 100:49-160. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.02.003>
- Decock P, Cappelle S. 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends Foods Sci Technol*. 16(1-3):113-120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.012>
- Delgado-Nieblas C, Aguilar-Palazuelos E, Gallegos-Infante A, Rocha-Guzmán N, Zazueta-Morales J, Caro-Corrales J. 2012. Characterization and Optimization of Extrusion Cooking for the Manufacture of Third-Generation Snacks with Winter Squash (*Cucurbita moschata* D.) Flour. *Cereal Chem J*. 89(1):65-72. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-02-11-0016>

- Demirkesen I, Sumnu G, Sahin S. 2013. Quality of gluten-free bread formulations baked in different ovens. *Food Bioprocess Technol.* 6(3):746-753. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0712-6>
- Dhaka V, Khatar BS. 2015. Effects of gliadin/glutenin and HMW-GS/LMW-GS ratio on dough rheological properties and bread-making potential of wheat varieties. *J Food Quality.* 38:71-82. <https://doi.org/10.1111/jfq.12122>
- Dieterich W, Schuppan D, Schink M, Schwappacher R, Wirtz S, Agaimy A, Neurath MF, Zopf Y. 2019. Influence of low FODMAP and gluten-free diets on disease activity and intestinal microbiota in patients with non-celiac gluten sensitivity. *Clin Nutr.* 38(2):697-707. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.03.017>
- Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI. 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol.* 38:685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Endres CM, Castro IMS, Trevisol LD, Severo JM, Mann MB, Varela APM, Frazzon APG, Mayer FQ, Frazzon J. 2021. Molecular characterization of the bacterial communities present in sheep's milk and cheese produced in South Brazilian Region via 16S rRNA gene metabarcoding sequencing. *LWT Food Sci Technol.* 147:111579. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111579>
- Ercolini D, Pontonio E, De Filippis F, Minervini F, Storia AL, Gobbetti M, Di Cagno R. 2013. Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *App Environ Microbiol.* 79(24):7827-7836. <https://doi.org/10.1128/AEM.02955-13>
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics.* 34(8):1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Fennema OR. 1996. **Food Chemistry.** 3<sup>a</sup> ed. Marcel Dekker, New York.
- Gänzle MG, Ehmann M, Hammes WP. 1998. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *App Environ Microbiol.* 64(7):2616–2623. <https://doi.org/10.1128/aem.64.7.2616-2623.1998>
- Gänzle MG. 2014. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* 37:2-10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007>
- Gänzle M, Ripari V. 2016. Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. *Int J Food Microbiol.* 239:19-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004>
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol.* 2(2): 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- Garofalo C, Zannini E, Aquilanti L, Silvestri G, Fierro O, Picariello G, Clementi F. 2012. Selection of sourdough Lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *J Agric Food Chem.* 60(31):7719-7728. <https://doi.org/10.1021/jf301173u>
- Giraffa G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol Rev.* 28(2):251-260. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005>
- Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J. 1994. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41(4):456-460. <https://doi.org/10.1007/bf00939035>
- Gobbetti M, Rizzello CG, Di Cagno R, De Angelis M. 2014. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiol.* 37:30-

40. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.012>
- Gobbetti M, Minervini F, Pontonio E, Di Cagno R, De Angelis M. 2016. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *Int J Food Microbiol.* 239:3-18. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022
- Halmos EP, Christophersen CT, Bird AR, Sheperd SJ, Gibson PR, Muir JG. 2015. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut.* 64(1):93-100. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307264>
- Hammes WP. 1991. Fermentation of non-dairy foods. *Food Biotechnol.* 5(3):293-303. <https://doi.org/10.1080/08905439109549811>
- Hammes WP, Gänzle MG. 1998. Sourdough breads and related products. Em: Wood BJB (Eds.), **Microbiology of fermented foods**. Springer, Boston, MA. 199-216. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_8)
- Hill D, Sugrue I, Arendt E, Hill C, Stanton C, Ross RP. 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research.* 6(751):1-9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10896.1>
- Hoefkens C, Verbeke W, Aertsens J, Mondelaers K, Van Camp J. 2009. The nutritional and toxicological value of organic vegetables: Consumer perception versus scientific evidence. *British Food J.* 111(10):1062-1077. <https://doi.org/10.1108/00070700920992916>
- Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Norma 016/IV.** 2005. Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos. Brasília. V.1, 4 edição, 1018 p.
- Ishida PMG, Steel CJ. Physicochemical and sensory characteristics of pan bread samples available in the Brazilian market. 2014. *Food Sci Technol.* 34(4):746-754. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6453>
- ISO. 2007. **Sensory analysis-General guidance for the design of test rooms.** *ISO Standard 8589*, 9-11.
- Jeronymo-Ceneviva AB, de Paula AT, Silva LF, Todorov SD, Franco BDGM, Penna ALB. 2014. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo mozzarella cheese. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 6(3-4):141–156. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9166-2>
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. 2017. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D353–D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Katina K, Sauri M, Alakomi HL, Mattila-Sandholm T. 2002. Potential of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Rope Spoilage in Wheat Sourdough Bread. *LWT - Food Sci Technol.* 35(1):38–45. <https://doi.org/10.1006/fstl.2001.0808>
- Katina K, Heinio RL, Autio K, Poutanen K. 2006. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT – Food Sci Technol.* 39(10):1189-1202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.08.001>
- Koistinen VM, Mattila O, Katina K, Poutanen K, Aura AM, Hanhineva K. 2018. Metabolic profiling of sourdough fermented wheat and rye bread. *Scientific Reports;* 8(1):5684. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24149-w>
- Landis EA, Oliverio AM, McKenney EA, Nichols LM, Kfoury N, Biango-Daniels M, Shell LK, Madden AA, Shapiro L, Sakunala S, Drake K, Robbat A, Booker M, Dunn RR, Fierer N, Wolfe BE. 2021. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *eLife.* 10:e61644. <https://doi.org/10.7554/eLife.61644>
- Lau SW, Chong AQ, Chin NL, Talib RA, Basha RK. 2021. Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms.* 9(7):1355.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355>

- Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *App Environ Microbiol.* 69(1):634-640. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.634-640.2003>
- Liu C, Chang Y, Li z, Liu H. 2012. Effect of ratio of yeast to Jiaozi on quality of Chinese steamed Bread. *Proc Environ Sci.* 12:1203-1207. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.408>
- Liu X, Zhou M, Jiabin C, Luo Y, Ye F, Jiao S, Hu X, Zhang J, Lü X. 2018. Bacterial diversity in traditional sourdough from different regions in China. *LWT – Food Sci Technol.* 96:251-259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.023>
- Lovell RM, Ford AC. 2012. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 10(7):712-721. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.02.029>
- Machado CR, Thys RCS. 2019. Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. *Innovative Food Sci Emerging Technol.* 56:102180. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102180>
- Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2015. Swarmv2: Highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ.* 3:e1420. <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>
- McMurdie PJ, Holmes S. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* 8(4):e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Menezes LAA, Minervini F, Filannino P, Sardaro MLS, Gatti M, Lindner JD. 2018. Effects of sourdough on FODMAPs in Bread and potential outcomes on irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Front Microbiol.* 9:1972. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01972>
- Menezes LAA, Molognoni L, de Sá Polêncio LA, Costa FBM, Daguer H, De Dea Lindner J. 2019. Use of sourdough fermentation to reducing FODMAPs in breads. *European Food Research and Technology.* 245:1183-1195. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03239-7>
- Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP. 2003a. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 69(1):475-482. <https://doi.org/10.1128/aem.69.1.475-482.2003>
- Meroth CB, Hammes WP, Hertel C. 2003b. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 69(12):7453-7461. <https://doi.org/10.1128/aem.69.12.7453-7461.2003>
- Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M. 2014. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int J Food Microbiol.* 171:136-146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021>
- Muir JG, Rose R, Rosella O, Liels K, Berrett JS, Shepherd SJ, Gibson PR. 2009. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem.* 57(2):554-565. <https://doi.org/10.1021/jf802700e>
- Nascimento LCS. 2017. **Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São José do Rio Preto, São Paulo.

- Nascimento KO, Paes SND, Augusta IM. 2018. A review 'Clean Labeling': applications of natural ingredients in bakery products. *J Food Nut Res.* 6(5):285-294. <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-5-2>
- Navarrete-Bolaños JL. 2012. Improving traditional fermented beverages: how to evolve from spontaneous to directed fermentation. *Eng Life Sci.* 12(4):410-418. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100128>
- Neto AAO, Santos CMR. (Eds.). 2017. **Companhia Nacional de Abastecimento: A cultura do trigo.** Conab, Brasília, DF. 218 p. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/institucional/publicacoes/outras-publicacoes/item/2903-2017-a-cultura-do-trigo>>. Acesso em: 28 fev. 2021.
- Nitzke JA, Thys RCS, Oliveira A, Schäffer I, Carneiro MLF. 2019. Avaliação da Qualidade Tecnológica/Industrial da Farinha de Trigo. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/napead/projetos/avaliacao-farinha-trigo/index.php>>. Acesso em 25 abr. 2019.
- Nualkaekul S, Charalampopoulos D. 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *Int J Food Microbiol.* 146(2):111-117. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.04>
- Paramithiotis S, Müller MRA, Ehrmann MA, Tsakalidou E, Seiler H, Vogel R, Kalantzopoulos G. 2000. Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. *Syst Appl Microbiol.* 23(1):156-164. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80057-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80057-0)
- Pétel C, Onno B, Prost C. 2017. Sourdough volatile compounds and their contribution to Bread: a review. *Trends Food Sci Technol.* 59:105-123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>
- Plessas S. 2021. Innovations in sourdough bread making. *Fermentation.* 7(1):29. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010029>
- Poffo F, Silva MAC. 2011. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. *Ciênc Tecnol Aliment.* 31(2):303–307. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612011000200004>
- Prabhasankar P, Rao PH. 1999. Lipids in Wheat Flour Streams. *J Cereal Sci.* 30(3): 315–322. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1999.0289>
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41(D1):D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Reese AT, Madden AA, Joossens M, Lacaze G, Dunn RR. 2020. Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread. *mSphere.* 5(1):e00950-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00950-19>
- Reginensi SM, Olivera JA, Bermúdez J, González MJ. 2016. *Lactobacillus* in the Dairy Industry: From Natural Diversity to Biopreservation Resources. Castro-Sowinski S (Eds.), *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability.* Springer, Sinagapore. 57–81. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_4)
- Rinaldi M, Paciulli M, Caligiani A, Scazzina F, Chiavaro E. 2017. Sourdough fermentation and chestnut flour in gluten-free bread: a shelf-life evaluation. *Food Chem.* 224:144-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.055>
- Rizzello CG, Cassone A, Coda R, Gobbetti M. 2011. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem.* 127(3):952–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.063>
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: A versatile open

- source tool for metagenomics. PeerJ. 4:e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rokka S, Rantamaki P. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol.* 231(1):1-12. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1246-2>
- Samapundo S, Devlieghere F, Vroman A, Eeckhout M. 2016. Antifungal properties of fermentates and their potential to replace sorbate and propionate in pound cake. *Int J Food Microbiol.* 237:157–163. <https://doi.org/j.ijfoodmicro.2016.08.020>
- Sanz-Penella JM, Tamayo-Ramos JA, Haros M. 2012. Application of Bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. *Food Bioprocess Technol.* 5:2370-2380. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0547-1>
- Sehn GAR, Nogueira AC, Almeida EL, Chang YK, Steel CJ. 2015. Fortification of Wheat Dough with Calcium and Magnesium Ions Affects Empirical Rheological Properties. *Cereal Chem J.* 92(4):405–410. <https://doi.org/10.1094/cchem-01-15-0002-r>
- Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J.* 17(11):1262-1277. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>
- Shewry PR, Hey SJ. 2015. The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur.* 4(3):178-202. <https://doi.org/10.1002/fes3.64>
- Siepmann FB, Almeida BS, Ripari V, Silva BJB, Peralta-Zamora PG, Waszczynskyj N, Spier MR. 2019. Brazilian sourdough: microbiological, structural, and technological evolution. *Eur Food Res Technol.* 245:1583-1594. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03254-8>
- Silva MR, Silva MAAPD, Chang YK. 1998. Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. *Food Sci Technol.* 18:25-34. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000100007>
- Skodje GI, Sarna VK, Minelle IH, Rolfsen KL, Muir JG, Gibson PR, Veierod MB, Henriksen C, Lundin KEA. 2018. Fructan, rather than gluten, induces symptoms in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity. *Gastroenterology.* 154(3):529-539. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.040>
- Stolz P. 1999. Mikrobiologie des sauerteiges. Em: Spicher G, Stephan H (Eds.), **Handbuch sauerteig: biologie, biochemie, technologie.** Behr's Verlag. 35-60.
- Sweetman J. 2016. Commercialization of foods for customers with specific dietary needs. Em: Osborn S, Morley W (Eds.), *Developing food products for consumers with specific dietary needs.* WP Series. 63-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100329-9.00004-9>
- TBCA, **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** 2021. Disponível em: <[http://www.tbca.net.br/base-dados/int\\_composicao\\_alimentos.php?cod\\_produto=C0132A](http://www.tbca.net.br/base-dados/int_composicao_alimentos.php?cod_produto=C0132A)>. Acesso em 22 mar. 2021.
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE.* 7(7):e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Torrieri E, Pepe O, Ventrino V, Masi P, Cavella S. 2014. Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of Bread. *LWT Food Sci Technol.* 56(2):508-516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.005>
- TTC - Texture Technologies. **Overview of Texture Profile Analysis.** 2019. Disponível em: <<https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#tpa-measurements>>. Acesso em: 04 set. 2019.

- Ua-Arak T, Jakob F, Vogel RF. 2017. Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads. *Food Microbiol.* 65:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.002>
- UNITE. 2021. rDNA ITS based identification of Eukaryotes and their communication via DOIs. Disponpivel em: <<https://unite.ut.ee/>>. Acesso em: 10 Mar. 2021.
- Van der Meulen R, Scheirlinck I, Van Schoor A, Huys G, Vancanneyt M, Vandamme P, De Vuyst L. 2007. Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl Environ Microbiol.* 73(15):4741-4750. <https://doi.org/10.1128/AEM.00315-07>
- Van Kerrebroeck S, Maes D, De Vuyst L. 2017. Sourdough as a function of their species diversity and processes conditions, a meta-analysis. *Trends Food Sci Technol.* 68:152-159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.016>
- Vogelmann SA, Hertel C. 2011. Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol.* 28(3):583–589. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.010>
- Vrancken G, De Vuyst L, Van der Meulen R, Huys G, Vandamme P, Daniel HM. 2010. Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Res.* 10(4):471–481. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x>
- Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, Bai X, Xie J, Wang Y, Geng W. 2021. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers Bioeng Biotechnol.* 9:612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Weckx S, Van der Meulen R, Maes D, Scheirlinck I, Huys G, Vandamme P, De Vuyst L. 2010. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiol.* 27(8):1000-1008. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.005>
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Em: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.), **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego. 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wiese BG, Strohmair W, Rainey FA, Diekmann H. 1996. *Lactobacillus panis* sp. nov., from sourdough with a long fermentation period. *Int J Syst Evol Microbiol.* 46(2):449-453. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-449>
- Yazar G., Tavman S. 2012. Functional and technological aspects of sourdough fermentation with *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Food Eng Rev.* 4:171-190. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9052-1>
- Yildirim RM, Arici M. 2019. Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread. *LWT – Food Sci Technol.* 112:108224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.122>
- Zannini E, Arendt EK. 2018. Low FODMAPs and gluten-free foods for irritable bowel syndrome treatment: lights and shadows. *Food Res Int.* 110:33-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.001>
- Zhang G, Sun Y, Sadiq FA, Sakandar HA, Guoqing H. 2018. Evaluation of the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on fermentation characteristics and volatile compounds of sourdough. *J Food Sci Technol.* 55(6):2079-2086. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3122-1>

- Zhang G, Qi Q, Sadiq FA, Wang W, He X, Wang W. 2021. Proteomic analysis explores interactions between *Lactiplantibacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during sourdough fermentation. *Microorganisms*. 9(11):2353. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112353>
- Zhao Z, Mu T, Sun H. 2018. Microbial characterization of five Chinese traditional sourdoughs by high-throughput sequencing and their impact on the quality of potato steamed bread. *Food Chem*. 274:710-717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.143>
- Zhu F. 2014. Influence of ingredients and chemical components on the quality of Chinese steamed bread. *Food Chem*. 163(20):154-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.067>
- Ziegler JU, Steiner D, Longin CFH, Würschum T, Schweiggert RM, Carle R. 2016. Wheat and the irritable bowel syndrome – FODMAP levels of modern and ancient species and their retention during bread making. *J Funct Foods*. 25:257-266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.05>

## 9. APÊNDICES

9.1 Apêndice A: Tabela de especificações das farinhas utilizadas neste trabalho.

|                  | Farinha de trigo<br>integral<br>convencional* | Farinha de trigo<br>integral orgânica* | Farinha de trigo<br>convencional<br>branca* |
|------------------|---|--|---|
| Valor energético | 160 kcal                                      | 170 kcal                               | 170 kcal                                    |
| Carboidrato      | 35 g  | 36 g                                   | 36 g  |
| Proteína         | 5.6 g   | 7 g                                    | 5 g   |
| Gordura total    | 0.69 g  | 0.9 g                                  | 0.7 g                                       |
| Gordura saturada | 0 g   | 0 g                                    | 0 g   |
| Gordura trans    | 0 g   | 0 g                                    | 0 g   |
| Colesterol       | NI  | 0 g                                    | NI  |
| Fibra alimentar  | 5.6 g   | 6.1 g                                  | 1.6 g                                       |
| Cálcio           | NI  | 17 mg                                  | NI  |
| Ferro            | 2 – 4.5 mg**                                  | 2 mg                                   | 2.1 mg                                      |
| Magnésio         | NI  | 70 mg                                  | NI  |
| Fósforo          | NI  | 173 mg                                 | NI  |
| Sódio            | 0 mg  | 0 mg                                   | 0 mg  |
| Vitamina B1      | NI  | 0.2 mg                                 | NI  |
| Vitamina B2      | NI  | 0.1 mg                                 | NI  |
| Vitamina B3      | NI  | 3 mg                                   | NI  |
| Vitamina B5      | NI  | 0.5 mg                                 | NI  |
| Vitamina B6      | NI  | 0.17                                   | NI  |
| Ácido fólico     | 70 – 110 µg**                                 | NA                                     | 75 µg                                       |

NA: não se aplica; NI: não informado; \* Valores para 50 g de farinha; \*\* De acordo com Resolução Brasileira RDC N° 150 ANVISA (2017).

## 9.2 Apêndice B: Ficha fornecida aos painelistas na análise sensorial

**ANÁLISE SENSORIAL DE PÃO SOURDOUGH**Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Sexo:  Masc. ( ) ~~Fem.~~

1. Você está recebendo quatro amostras de pão ~~sourdough~~. Avalie cada uma das amostras codificadas e utilize a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou cada uma nos atributos solicitados:

- 7- Gostei muito  
 6- Gostei moderadamente  
 5- Gostei ligeiramente  
 4- Nem gostei, nem desgostei  
 3- Desgostei ligeiramente  
 2- Desgostei moderadamente  
 1- Desgostei muito

| Amostra | Cor | Aroma | Sabor | Textura | Impressão global |
|---------|-----|-------|-------|---------|------------------|
| 275     |     |       |       |         |                  |
| 334     |     |       |       |         |                  |
| 182     |     |       |       |         |                  |
| 297     |     |       |       |         |                  |

2. Para cada uma das amostras de pão ~~sourdough~~ codificadas, indique qual seria a sua intenção de compra utilizando a escala abaixo:

- 5- Certamente compraria  
 4- Provavelmente compraria  
 3- Talvez comprasse, talvez não comprasse  
 2- Provavelmente não compraria  
 1- Certamente não compraria

| Amostra | Intenção de compra |
|---------|--------------------|
| 275     |                    |
| 334     |                    |
| 182     |                    |
| 297     |                    |

3. Você já conhecia este produto?  sim ( ) não

4. Comentários: \_\_\_\_\_

Obrigado pela participação!

## 10. ANEXOS

## 10.1 Anexo 1: Ficha técnica da farinha integral convencional.

|   |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
|---|---|--|---------------------------------------|--|------------------------------|---------|--------------|------------------|---------|---------|----------------------------|--------|---------------|---------|
|    |   | <b>ASSOCIAÇÃO RIOGRANDENSE DE EMPREENDIMENTOS DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL</b><br><b>EMATER/RS - ASCAR</b><br>CNPJ - 89.161.475/0001-73<br><small>CREDENCIADA PELO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO PARA EXECUTAR A CLASSIFICAÇÃO DE PRODUTOS VEGETAIS. REGISTRADA NO CGC/MAPA SOB O Nº RS001837-6.</small>  |                                       | Nº do Certificado<br><b>RS 001837-6T-18547</b> |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
|   |   |  |                                       | 1ª Via<br><b>Cliente</b>                       |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| <b>CERTIFICADO DE CLASSIFICAÇÃO</b><br><small>DE ACORDO COM O QUE ESTABELECE A LEI Nº 9.972, DE 25 DE MAIO DE 2000, E COM O DECRETO Nº 6.268, DE 22 DE NOVEMBRO DE 2007. CERTIFICAMOS QUE A AMOSTRA EM NOSSO PODER APRESENTOU OS RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO CONSTANTES NESTE CERTIFICADO.</small>  |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| NOME OU RAZÃO SOCIAL<br><b>Moinho Estrela Ltda - Canoas</b>   |   | CNPJ/CPF<br><b>89.776.991/0001-02</b>  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| ENDEREÇO/MUNICÍPIO/UF<br><b>Rua Berto Cirio, 1600, São Luiz, Canoas - RS</b>  |   | TIPO DE SERVIÇO<br><b>Alimentação Humana</b>   |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| PRODUTO<br><b>Farinha de Trigo</b>  | MARCA<br><b>Panfácil Integral</b>                   | Nº DA AMOSTRA<br><b>341011495-001511-19</b>  | SAFRA<br><b>2019/2019</b>             |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| PROCEDÊNCIA<br><b>Canoas-RS</b>   | LOTE Nº<br><b>81</b>                                | Nº VOLUMES<br><b>29.770,00</b>   | PESO LÍQUIDO (KG)<br><b>29.770,00</b> |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| NOTA FISCAL / FATURA Nº<br><b>Diversas</b>  | PLACAS  | Nº SIGVIG  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| LOCAL DE ARMAZENAGEM<br><b>Moinho Estrela Ltda - Canoas, Rua Berto Cirio 1600 São Luiz Canoas / RS</b>  |   |  |                                       | EMBALAGEM<br><b>Pacotes</b>                    |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| <b>ESPECIFICAÇÕES</b><br>CLASSIFICAÇÃO<br><b>Tipo: Integral.</b>  |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| INSTRUÇÃO NORMATIVA<br><b>IN Nº 8/05</b>  | PROTOCOLO AMOSTRA<br><b>4948</b>                    |  | <b>OUTRAS INFORMAÇÕES</b>             |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| LACRES DAS AMOSTRAS   |   | <table border="0"> <tr> <td>Teor de proteína (base seca)</td> <td style="text-align: right;">12,12 %</td> </tr> <tr> <td>Acidez graxa</td> <td style="text-align: right;">79,19 mgKOH/100g</td> </tr> <tr> <td>Umidade</td> <td style="text-align: right;">13,20 %</td> </tr> <tr> <td>Teor de cinzas (base seca)</td> <td style="text-align: right;">1,53 %</td> </tr> <tr> <td>Granulometria</td> <td style="text-align: right;">78,88 %</td> </tr> </table> |                                       |  | Teor de proteína (base seca) | 12,12 % | Acidez graxa | 79,19 mgKOH/100g | Umidade | 13,20 % | Teor de cinzas (base seca) | 1,53 % | Granulometria | 78,88 % |
| Teor de proteína (base seca)  | 12,12 %   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| Acidez graxa  | 79,19 mgKOH/100g                                    |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| Umidade   | 13,20 %   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| Teor de cinzas (base seca)  | 1,53 %  |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| Granulometria   | 78,88 %   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| DATA DA CLASSIFICAÇÃO<br><b>28/06/2019</b>  | DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA<br><b>26/06/2019</b> |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| RESPONSÁVEL PELA COLETA<br><b>CNPJ: 89.776.991/0001-02</b>  | REGISTRO<br><b>***</b>                              |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| RESPONSÁVEL PELO ENSAIO - REGISTRO<br><b>CAMILA SOMAVILLA KELLING - 05203338</b>  |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| RESPONSÁVEL PELA CLASSIFICAÇÃO<br><b>JANINE VIEIRA CALEFFI</b>  | REGISTRO<br><b>1664</b>                             |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| UNIDADE DE CLASSIFICAÇÃO<br><b>UCL - PORTO ALEGRE</b>   |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| OBSERVAÇÕES* Amostra Fornecida pelo interessado.<br>"O presente Certificado não tem validade quando o produto, objeto dessa classificação, for destinado às compras, vendas ou doações do Poder Público (Federal, Estadual e Municipal)"  |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| Os resultados constantes deste documento se referem somente aos itens ensaiados. Metodologia referenciada na IN 08 de 02/06/2005 do MAPA e complementada pela IN 31 de 18/10/2005 do MAPA: Proteína AACC 46-11A (revisão 1999); Acidez graxa: AACC 02-02A (revisão de 1999); Umidade: AACC 44-15A (revisão 1999); Cinzas: AACC 08-12 (revisão 1999); Granulometria: AACC 66-20 revisão(1999). |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| OBSERVAÇÕES DO LAUDO<br>Protocolo de amostra UCL- Porto Alegre nº 1558 - Produto comercializado em pacotes de 1kg   |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| Emissão: 01/07/2019 - Emitido por: 24198<br>ASSINATURA DO RESPONSÁVEL<br><b>JANINE VIEIRA CALEFFI - 1664</b>  |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| <small>*QUALQUER EMENDA OU RASURA, MESMO RESSALVADA, INVALIDARÁ O PRESENTE CERTIFICADO*</small>   |   |  |                                       |  |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| <small>LABORATÓRIO DE CLASSIFICAÇÃO VEGETAL DA EMATER/RS / ASCAR, situado na Av. Farrapos, 285 / 7ª andar - Porto Alegre/RS.<br/>         Contatos: labclass@emater.rs.br Fone (0XX) 51-3225-4631.</small>  |   |  |                                       | Página 1/1                                     |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |
| <small>GERÊNCIA DE CLASSIFICAÇÃO E CERTIFICAÇÃO<br/>         Rua Botafogo, 1051 - Porto Alegre - RS - CEP 90150-053<br/>         Fone: (0XX) 51-2125-3144, e-mail: gcc@emater.rs.br</small>   |   |  |                                       | <b>1305388</b>                                 |                              |         |              |                  |         |         |                            |        |               |         |

## 10.2 Anexo 2: Ficha técnica da farinha branca.

|   |                                   |            |              |               |  |
|---|-----------------------------------|------------|--------------|---------------|--|
|  | FICHA TÉCNICA DE FARINHA DE TRIGO |            |              |               |  |
|   | FARINHA DE TRIGO PANFÁCIL – P 50  |            |              |               |  |
| Código  | Autor                             | Revisão Nº | Data Revisão | Revisado por: | Nº da Página   |
| FITEC P-50 ME   | Luiz Paulo B. Júnior              | 0          | *            | *             | 1 de 1   |

|   |                        |   |                            |                  |  |
|---|------------------------|---|----------------------------|------------------|--|
| APC:  |                        |   |                            |                  |  |
| FONE/FAX:   |                        |   |                            |                  |  |
| DE: Luiz Paulo Bartomezi Júnior   |                        |   | DATA:                      |                  | 25. abr. 2019  |
| PRODUTO: Farinha de trigo Panfácil – P-50, enriquecida com ferro e ácido fólico.  |                        |   |                            |                  |  |
| CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS   |                        |   | CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS |                  |  |
| Umidade (%)   | 14,5 (mín.)            |   | FARINOCRAFIA               |                  |  |
| Cinza (a) (%)   | 0,300 a 0,620          |   | Absorção (%)               | 25,00 a 80,00    |  |
| Cor (L) Minolta   | 69,20 a 74,20          |   | Densar. (mm)               | Mín: 8           |  |
| Cor (a) Minolta   | -                      |   | Eritr. (mm)                | Mín: 20          |  |
| Cor (b) Minolta   | 9,00 (mín.)            |   | PT.M. (US)                 | Mín: 20          |  |
| Classe Umidade (a) (%)  | 25,00 a 30,00          |   | A 20 (US)                  | +                |  |
| Classe Saco (a) (%)   | 3,00 a 11,00           |   | ALVEOCRAFIA                |                  |  |
| Falling Number (s)  | 300 (mín.)             |   | W (10-g)                   | 250 (mín.)       |  |
| Proteína (a) (%)  | -                      |   | P (mm)                     | +                |  |
|   |                        |   | L (mm)                     | +                |  |
| CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS  |                        |   | P/L                        | 1,5 a 2,50       |  |
| Aspecto   | Fó fino                |   | EXTENSO-CRABA              |                  |  |
| Cor   | Branco                 |   | R (U.E.)                   | +                |  |
| Sabor   | Próprio                |   | E (mm)                     | +                |  |
| Olhar   | Próprio                |   | A (mm <sup>2</sup> )       | +                |  |
|   |                        |   | VE                         | +                |  |
| INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS  |                        |   |                            |                  |  |
| Conteúdo médio por 50g de farinha - (1/2 xícara)  |                        |   |                            |                  |  |
| Quantidade de por porção  |                        | % |                            | VDI <sup>1</sup> |  |
| Valor Energético  | 1700 (kJ) = 414 (kcal) |   |                            |                  |  |
| Carboidratos  | 36 g                   |   |                            |                  | <sup>1</sup> Valores típicos de referência nutricionais em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Sem valores típicos podem ser omitidos em situações dependentes de suas necessidades nutricionais. |
| Proteínas   | 5,0 g                  |   |                            |                  |  |
| Gorduras Totais   | 0,7 g                  |   |                            |                  |  |
| Gorduras Saturadas  | 0 g                    |   |                            |                  |  |
| Gorduras Trans  | 0 g                    |   |                            |                  |  |
| Fibra Alimentar   | 1,6 g                  |   |                            |                  |  |
| Sódio   | 0 mg                   |   |                            |                  |  |
| Ferro   | 2,1 mg                 |   |                            |                  |  |
| Ácido Fólico (vitamina B9)  | 77 mcg                 |   |                            |                  | <sup>2</sup> VD não estabelecido   |
| CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS (*)   |                        |   |                            |                  |  |
| (*) Conforme RDC nº 14, de 28 de março de 2014 - ANVISA/MS.   |                        |   |                            |                  |  |
| CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS (**)  |                        |   |                            |                  |  |
| (**) De acordo com a resolução RDC nº 12 - ANVISA, 2 de janeiro de 2001.  |                        |   |                            |                  |  |
| VALIDADE DO PRODUTO: 180 dias   |                        |   |                            |                  |  |
| ADICIVOS: CONTÉM DERIVADOS DE TRIGO E PODE CONTER SOJA, CERVEJA, CERVADA E AVELA  |                        |   |                            |                  |  |
| DISCRICÃO DA EMBALAGEM: Saco de polipropileno (rifle)   |                        |   |                            |                  |  |
| PESO LÍQUIDO: 50 kg   |                        |   |                            |                  |  |
| ROTULAGEM: Modo de preparo, ingredientes, data de validade, peso líquido, tipo de farinha, classes "Cozinha Civil" e "informações nutricionais".          |                        |   |                            |                  |  |
| CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: Armazenar o produto em sacos ou paletes, lugar fresco e seco, sem incidência de luz solar direta, umidade e odores estranhos. |                        |   |                            |                  |  |
| NÚMERO DE REGISTRO DO PRODUTO NO ÓRGÃO COMPETENTE: Produto isento de registro conforme Resolução nº 273 de 22/08/2005 da ANVISA.                          |                        |   |                            |                  |  |

Luiz Paulo Bartomezi Júnior  
 CMC - R. Região Ssg. 10 0500100