



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL
BACHARELADO EM GASTRONOMIA**

JOANDERSON GAMA SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE RESÍDUO DE
FRUTAS COMO CULTIVO INICIADOR: VIABILIDADE TECNOLÓGICA NA
ELABORAÇÃO DE FERMENTOS E PÃES.**

**JOÃO PESSOA - PB
2020**

JOANDERSON GAMA SANTOS

UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE RESÍDUO DE FRUTAS COMO CULTIVO INICIADOR: VIABILIDADE TECNOLÓGICA NA ELABORAÇÃO DE FERMENTOS E PÃES.

Trabalho de conclusão de curso que apresentado à Coordenação do Bacharelado em Gastronomia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Gastronomia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Estefânia Fernandes Garcia

JOÃO PESSOA - PB
2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237u Santos, Joanderson Gama.

Utilização de bactérias ácido lácticas isoladas de resíduo de frutas como cultivo iniciador: viabilidade tecnológica na elaboração de fermentos e pães. /

Joanderson Gama Santos. - João Pessoa, 2020.

41 f. : il.

Orientação: Estefânia Fernandes Garcia.

Monografia (Graduação) - UFPB/CTDR.

1. Panificação. 2. Sourdough. 3. Bactérias Ácido Lácticas.
I. Garcia, Estefânia Fernandes. II. Título.

UFPB/BC

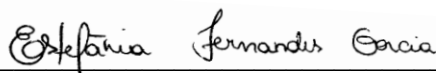
JOANDERSON GAMA SANTOS

UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE RESÍDUO DE FRUTAS COMO CULTIVO INICIADOR: VIABILIDADE TECNOLÓGICA NA ELABORAÇÃO DE FERMENTOS E PÃES.

Trabalho de conclusão de curso que apresentado à Coordenação do Bacharelado em Gastronomia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Gastronomia.

Data: 26/03/2020

Banca Examinadora



**Prof.^a Dr.^a Estefânia Fernandes Garcia
(Orientadora)**



Prof.^a Dr.^a Ingrid Conceição Dantas Guerra



Me. Vanessa Pedro da Silva

JOÃO PESSOA - PB
2020

RESUMO

A fermentação espontânea foi por muitos anos o principal meio para a fabricação do que conhecemos por pão. A utilização do fermento natural vem sendo motivada pelas características positivas empregadas na utilização desse tipo de fermento. As Bactérias Ácido Láticas (BAL) e as leveduras desse tipo de fermentação são os principais responsáveis pelos compostos de sabor, aroma, flavor, textura e volume do pão, bem como, contribuem no desenvolvimento do glúten, no controle microbiano, gerando uma maior vida de prateleira do pão. Portanto, o objetivo desse estudo foi selecionar cepas de *Lactobacillus* spp. como cultivo iniciador e avaliar as características microbiológicas e físico-químicas do fermento natural e dos pães elaborados. Inicialmente foi feita uma avaliação das cepas Lf 56, Lpc 106, Lpe 129, Lf 139 e Lf 141 através das etapas de acidificação, proteólise e produção de exopolissacarídeo e com base no resultado dessa avaliação, foram selecionadas as cepas Lf 56, Lpe 129 e Lf 139 e a partir delas foram desenvolvidos três tipos de fermento natural mais um controle. Todas as etapas de produção do fermento e dos pães foram realizadas nas mesmas condições para todas as amostras, alíquotas dos fermentos e dos pães foram tomadas para as análises microbiológicas e físico-químicas durante dez dias de propagação. No 11º dia de propagação dos fermentos, os pães foram elaborados sob as mesmas condições, com exceção do pão comercial, elaborado com levedura comercial. Os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas dos fermentos e pães elaborados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizando-se teste de média de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), assim como para a avaliação sensorial. Os pães elaborados foram analisados no tempo 0, 1, 3 e 7 dias para os parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Entre os pães elaborados com BAL, os resultados mostraram-se positivos para as amostras inoculadas com os fermentos naturais 129 e 139, ambas resistiram bem ao armazenamento de no mínimo 7 dias, a amostra 56 apresentou pontos de deterioração no mesmo período. O desenvolvimento de fermento natural inoculado com as cepas selecionadas permitiu a produção de fermentos com maior controle microbiológico, além da produção de pães com maior padronização. Ao prazo de 14 dias de armazenamento, todas as amostras foram deterioradas por ação fúngica. A avaliação sensorial nos pães C, 56, 129 e 139 foi realizada por meio do método de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) que identificou que nos pães elaborados com BAL a acidez característica identificada nas análises microbiológicas e físico-químicas não foi notada durante a análise sensorial, no entanto, foi identificado que as amostras adicionadas de BAL obtiveram os maiores valores no quesito textura. No futuro, recomenda-se maiores estudos investigando o potencial antimicrobiano das cepas Lpe 129 e Lf 139 frente a fungos deterioradores de produtos de panificação.

Palavras-chave: Panificação. *Sourdough*. Bactérias Ácido Láticas.

ABSTRACT

Spontaneous fermentation was for many years the main means for the manufacture of what we know as bread. The use of natural yeast has been motivated by the positive characteristics used in the use of this type of yeast. Lactic Acid Bacteria (BAL) and yeasts from this type of fermentation are mainly responsible for the compounds of flavor, aroma, flavor, texture and volume of bread, as well as contributing to the development of gluten, in microbial control, generating a longer life of bread shelf. Therefore, the objective of this study was to select strains of *Lactobacillus* spp. as a starter crop and evaluate the microbiological and physicochemical characteristics of natural yeast and prepared breads. Initially, an evaluation of the strains Lf 56, Lpc 106, Lpe 129, Lf 139 and Lf 141 was carried out through the stages of acidification, proteolysis and exopolysaccharide production and based on the result of this evaluation, the strains Lf 56, Lpe 129 and Lf 139 and from them three types of natural yeast plus a control were developed. All stages of production of the yeast and breads were carried out under the same conditions for all samples, aliquots of the yeasts and breads were taken for microbiological and physical-chemical analyzes during ten days of propagation. On the 11th day of the yeast spread, the breads were made under the same conditions, with the exception of commercial bread, made with commercial yeast. The results of the microbiological and physical-chemical analyzes of the prepared yeasts and breads were subjected to analysis of variance (ANOVA), with Tukey's mean test at the 5% level of significance ($p < 0.05$), as well as for sensory evaluation. Elaborated breads were analyzed at 0, 1, 3 and 7 days for microbiological and physical-chemical parameters. Among the breads made with BAL, the results were positive for samples inoculated with natural yeasts 129 and 139, both resisted storage for at least 7 days, sample 56 showed deterioration points in the same period. The development of natural yeast inoculated with the selected strains allowed the production of yeasts with greater microbiological control, in addition to the production of breads with greater standardization. Within 14 days of storage, all samples were damaged by fungal action. The sensory evaluation in breads C, 56, 129 and 139 was performed using the method of Quantitative Descriptive Analysis (ADQ) which identified that in breads made with BAL the characteristic acidity identified in microbiological and physical-chemical analyzes was not noted during the analysis sensory, however, it was identified that the added samples of BAL obtained the highest values in the item texture. In the future, further studies are recommended investigating the antimicrobial potential of the strains Lpe 129 and Lf 139 against fungi that deteriorate bakery products.

Key words: Bread making. Sourdough. Lactic Acid Bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 MATERIAIS.....	11
3.2 MÉTODOS	11
3.2.1 Avaliação das características tecnológicas de espécies de <i>Lactobacillus</i> spp. para produtos de panificação.....	12
3.2.1.1 Acidificação (pH).....	12
3.2.1.2 Proteólise.....	12
3.2.1.3 Produção de exopolissacarídeo (EPS).....	12
3.2.2 Preparação dos inóculos e elaboração dos fermentos naturais.....	12
3.2.3 Elaboração dos pães.....	13
3.2.4 Caracterização microbiológica e físico-químicas dos fermentos naturais e pães elaborados.....	15
3.2.4.1 Análises microbiológicas	15
3.2.4.2 Análises físico-químicas	16
3.2.5 Análise descritiva quantitativa (ADQ) dos pães elaborados ou não com cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	17
3.2.5.1 Recrutamento de provadores e pré-seleção	17
3.2.5.2 Levantamento e agrupamento dos termos descritores.....	17
3.2.5.3 Treinamento e seleção dos provadores.....	18
3.2.5.4 Avaliação das amostras por ADQ	18
3.2.6 Análise estatística	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. PARA PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO	19
4.1.1 Acidificação (pH)	19
4.1.2 Produção de exopolissacarídeo (EPS) e proteólise.....	20

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS FERMENTOS NATURAIS	21
4.2.1 Contagem de bactérias ácido láticas, bolores e leveduras, determinação de pH e acidez titulável (ATT)	21
4.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS PÃES ELABORADOS	24
4.3.1 Contagem de células viáveis (BAL), bolores e leveduras e análises microbiológicas.....	24
4.3.2 Determinação de pH, acidez titulável (ATT), umidade e volume específico	26
4.3.2 Determinação de cor	28
4.3.3 Determinação de textura	30
4.4 ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA	31
5 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	39
APÊNDICE B – FICHAS DE AVALIAÇÃO	40
APÊNDICE C – DESCRITORES	41
APÊNDICE D – FICHA DE AVALIAÇÃO (ADQ)	42

1 INTRODUÇÃO

O processo de fabricação do pão foi por muitos anos baseado na fermentação espontânea sofrida pela mistura da farinha, naturalmente contaminada com bactérias e leveduras selvagens e algum líquido. Geralmente, esse processo sofre variações de acordo com a microbiota, condições de fermentação e tipo de matéria prima empregada. A produção de pães fermentados de forma espontânea acontece desde aproximadamente 3000 a.C. (CAUVAIN, 2016; MINERVINI et al., 2016).

A utilização cada vez mais maior de fermento natural, também conhecido por *sourdough*, *levain*, *massa madre* ou massa azeda, na produção de pães vem sendo motivada pelas características positivas gerada pela adoção desse tipo de fermento e que o diferenciam de um pão tradicional, comumente elaborado a partir de cepas do fermento industrializado *Saccaromyces cerevisiae*. (MINERVINI et al 2010; STEFANELLO 2018).

O fermento natural é basicamente composto de uma mistura de farinha de cereais e água, na qual se desenvolve uma população heterogênea de bactérias, principalmente bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras que serão responsáveis pela fermentação, tais microrganismos conferem ao produto características peculiares de sabor, aroma e *flavor*, bem como participam ativamente no processo de produção de ácidos orgânicos, contribuem na textura e volume do produto, ajudam na formação da rede tridimensional de glúten e a acidificação gerada nesse processo promove o controle microbiano e potencializa a vida de prateleira do produto. (MINERVINI et al 2010; CODA et al 2014; VENTIMIGLIA et al., 2015).

A adição de microrganismos, sobretudo de forma isolada, vem sendo bastante explorada em produtos de panificação, diversos estudos corroboram que o uso de culturas iniciadoras na produção de fermento natural, principalmente a partir das BAL têm se mostrado tecnologicamente viável, seja na utilização de uma única cepa ou em conjunto com outras cepas e/ou leveduras. Esses mesmos microrganismos, majoritariamente pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp., na fermentação, exercem funções de grande importância, atuando na produção de compostos que conservam e diminuem as chances de contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patógenos. (CODA et al 2014; HADAEGH et al 2017; MARTINBIANCO et al 2013; REALE et al 2016; TODOROV, FRANCO 2010).

Na utilização de cepas de *Lactobacillus* spp. como culturas iniciadoras, algumas espécies se mostram mais adequadas, a exemplo: *L. plantarum*, *L. casei*, *L. pentosus*, *L. sanfranciscensis*, entre outras, adaptando-se com mais facilidade a microbiota do fermento natural (RANDAZZO et al., 2005; VENTIMIGLIA et al., 2015). Conjuntamente, nas últimas décadas, o uso de bactérias ácido lácticas produtoras de exopolissacarídeo (EPS) têm se intensificado e ganhado interesse na indústria de panificação, devido ao biopolímero naturalmente encontrado nesses microrganismos, que assim, juntamente com as leveduras, produzem diversos metabolitos que atuam de forma benéfica e determinam características positivas no fermento e pães. (LYNCH, COFFEY, ARENDT, 2017; MORONI et al., 2009). Independente da sua origem, as BAL demonstram através das inúmeras pesquisas possuir grande potencial tecnológico quando aplicadas na área da panificação, seja no desenvolvimento de novos produtos como no aperfeiçoamento de protocolos já existentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar cepas de *Lactobacillus* spp. como cultivo iniciador e seu impacto nas características de fermento natural e qualidade de pães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar espécies de *Lactobacillus* spp. com base nas características tecnológicas apresentadas para produtos de panificação;
- Elaborar fermento natural inoculado ou não com *Lactobacillus* spp. selecionados;
- Elaborar pães com fermento natural inoculados ou não com *Lactobacillus* spp. selecionados;
- Avaliar as características microbiológicas e físico-químicas do fermento natural durante o período de propagação;
- Avaliar as características microbiológicas e físico-químicas dos pães durante o período de envelhecimento;
- Avaliar as características sensoriais dos pães elaborados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração dos fermentos naturais e dos pães foi realizada no Laboratório Gastronômico/CTDR/UFPB. As análises físico-químicas no Laboratório de Análises Físico-químicas/CTDR/UFPB. A determinação de cor foi realizada no Laboratório de Bromatologia/CCS/UFPB. As análises microbiológicas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos/CTDR/UFPB. A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial/CTDR/UFPB.

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados como ingredientes para elaboração dos fermentos naturais e pães: farinha de trigo tipo 1 (Dona Benta, Moinho J. Macêdo, Salvador, Brasil); sal refinado, açúcar cristal e manteiga. Para os pães denominados de “Comercial” também se utilizou fermento biológico seco instantâneo (Dr. Oetker, São Paulo, Brasil). Todos os ingredientes foram adquiridos em supermercados locais da cidade de João Pessoa-PB.

Foram testadas cinco cepas de *Lactobacillus* spp. pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos/CCS/UFPB, as quais são descritas no Quadro 1:

Quadro 1 – Descrição das cepas de *Lactobacillus* spp. selecionadas para estudo do potencial uso para cultura *starter* em panificação.

Cepa	Origem	Referência
<i>Lactobacillus fermentum</i> 56 (Lf 56)	Resíduo de Acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.)	GARCIA et al., 2016; GARCIA et al., 2018.
<i>Lactobacillus paracasei</i> 106 (Lpc 106)	Resíduo de Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	
<i>Lactobacillus pentosus</i> 129 (Lpe 129)	Resíduo de Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	
<i>Lactobacillus fermentum</i> 139 (Lf 139)	Resíduo de Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	
<i>Lactobacillus fermentum</i> 141 (Lf 141)	Resíduo de Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	

Fonte: Dados da pesquisa

As cepas foram mantidas em caldo MRS suplementado com 200 µL de solução de glicerol 80% sob congelamento (-18 °C). A cada necessidade de utilização uma alíquota era tomada dos respectivos criotubos, inoculada em caldo MRS e incubada à 37 °C / 24h até formação de biomassa visível.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação das características tecnológicas de espécies de *Lactobacillus* spp. para produtos de panificação

3.2.1.1 Acidificação (pH)

A acidificação das cepas testadas foi avaliada *in vitro*, usando um caldo de farinha estéril (CFE) preparado conforme descrito por Alfonzo et al. (2013). As cepas foram inoculadas em caldo MRS até fase estacionária e em seguida coletadas por centrifugação a 5000 g/ 5 min, com posterior lavagem do pellet em tampão PBS (duas vezes), após padronização do inóculo bacteriano a $OD_{625nm} = 1,0$. As amostras selecionadas foram inoculadas uma a uma, separadamente (1%, v/v) em 20 mL de CFE e incubados durante 24 h/30°C. O pH foi medido em intervalos de 2 h, 4h, 6h e 8 h de incubação, e após em intervalos de 24, 48 e 72 h após a inoculação inicial (VENTIMIGLIA et al., 2015). As amostras foram mantidas a temperatura constante de 30°C em estufa, até última leitura (72h).

3.2.1.2 Proteólise

A proteólise extracelular das cepas foi avaliada em placas de ágar, segundo método descrito por Vermelho et al. (1996). Foi utilizado gelatina (Sigma e Aldrich) como substrato de protease, incorporados em cada meio a 1% (p / v). A atividade proteolítica foi considerada positiva quando um halo ≥ 1 mm foi identificado e negativa se esse halo era ≤ 1 mm.

3.2.1.3 Produção de exopolissacarídeo (EPS)

As cepas de *Lactobacillus* spp. foram cultivadas em caldo MRS suplementado com glicose a 2% (p/v) durante 3 dias a 37 °C sob anaerobiose (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). As células foram centrifugadas (4500 × g 20 min, 20 °C), misturadas em uma proporção de 1: 2 com etanol frio a 95% (v / v) (Fmaia, Minas Gerais, Brasil), e mantidas a 4 °C durante 24 h para induzir a precipitação do exopolissacarídeo (EPS). Os precipitados de EPS foram recuperados por centrifugação (2000 x g, 15 min, 4 °C), lavados com água destilada e secos a 55 °C até peso constante. O peso seco (mg/l) foi medido para determinar a quantidade de EPS produzido (ALBUQUERQUE et al., 2017).

3.2.2 Preparação dos inóculos e elaboração dos fermentos naturais

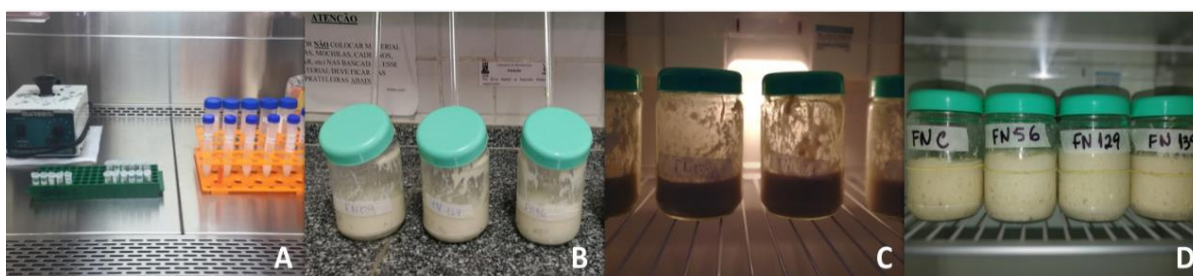
A partir da avaliação da acidificação, proteólise e produção de EPS foram selecionadas as cepas: Lf 56; Lpe 129 e Lf 139. A elaboração e propagação do fermento foi realizada seguindo protocolo descrito por Minervini et al., (2010) com adaptações.

Para o preparo dos inóculos (Figura 1A) as cepas selecionadas de *Lactobacillus* spp. (Lf 56; Lpe 129 e Lf 139) foram inoculadas em caldo MRS e incubadas a 37°C até a fase exponencial. Posteriormente as células foram centrifugadas a 5500 x g / 4°C / 10 minutos, lavadas duas vezes com tampão PBS (pH 7,2) e ressuspensas em água destilada estéril (4 - 5

log UFC/ml), para posteriormente serem inoculadas (Figura 1B) nos seus respectivos fermentos (FN 56, FN 129 e FN 139). O fermento natural controle (FN C) foi preparado com a mesma quantidade de água e farinha, porém sem adição de microrganismo.

Logo após o preparo dos fermentos (Tempo 0), as amostras foram incubadas em B.O.D. (30 °C / 24h) e após esse período foi realizada a primeira etapa da propagação (Figura 1C) que consistiu na tomada de uma alíquota de fermento do dia anterior (Tempo 1) a ser misturado com uma alíquota de água e uma alíquota de farinha de trigo. O processo de propagação foi realizado nas mesmas condições para todas as amostras (FN C, FN 56, FN 129 e FN 139). Logo após a primeira propagação as amostras foram novamente incubadas (30 °C/24h). Após a incubação realizada depois da primeira propagação (Tempo 2), o processo de propagação e incubação se repetiu a cada 24 horas com tomada de alíquotas dos fermentos para análises físico-químicas e microbiológicas depois de 2; 3; 4; 5; ;6 ;7 ;8; 9 e 10 dias. (Figura 1D)

Figura 1 – Preparo do fermento: (A) preparo do inóculo; (B) preparo do fermento; (C) propagação do fermento e incubação; (D) fermento após 24 horas.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.2.3 Elaboração dos pães

Após o período de 10 dias de propagação e avaliação dos fermentos naturais: FN C, FN 56, FN 129 e FN 139 (Figura 2A). Alíquotas de cada fermento foram utilizadas para elaboração de pães de acordo com formulação descritas no Quadro 2.

Quadro 2 – Formulações de pães adicionados ou não de fermentos naturais inoculados com cepas de *Lactobacillus* spp.

Formulação	Cepa <i>Lactobacillus</i> spp.	Fermento comercial
FN 0	Não	Sim
FN C	Não	Não
FN 56	Sim – Cepa 56	Não
FN 129	Sim – Cepa 129	Não
FN 139	Sim – Cepa 139	Não

Fonte: Dados da pesquisa.

As condições de mistura, modelagem e forneamento foram semelhantes para todos os tratamentos. Para a fabricação dos pães, todos os ingredientes (Figura 2B) foram pesados de acordo com as proporções adotadas nesse estudo e disponível na Tabela 1. Inicialmente foi realizada a mistura dos ingredientes secos (farinha, açúcar e sal), logo em seguida, os líquidos

(água e fermento natural) com exceção da amostra FN 0 que foi adicionada de 1,5% de fermento biológico seco.

A massa foi misturada em máquina panificadora (Britânia Multi Pane - Joinville - SC, Brasil) de forma contínua durante 5 minutos, após 3 minutos foi adicionado a manteiga até que a massa apresentasse características de homogeneidade e maciez. Após a sova, a massa seguiu para a 1ª fermentação durante 20 minutos, até que atingisse ponto de véu. Após a 1ª fermentação, a massa foi pesada e dividida em porções de 100g, boleadas e depois modeladas em forma de filão, sendo imediatamente dispostas em assadeiras untadas com farinha de trigo para a segunda fermentação (Figura 2C), por se tratar de um fermento comercial, os pães elaborados com esse tipo de fermento possuem tempo de fermentação reduzido (45m – 1h). Em seguida à 2ª fermentação, os pães foram colocados em formas e assados em forno de lastro a 200 °C / 30 minutos (Figura 3A), imediatamente após saída do forno foram resfriados em temperatura ambiente, embalados em sacos de polietileno, etiquetados e armazenados (Figura 3B sob a mesma temperatura para as análises físico-químicas e microbiológicas (Figura 3C). A Figura 4 demonstra o fluxograma da produção dos pães.

Tabela 1 – Protocolo de elaboração de pães adicionados ou não de fermentos naturais inoculados com cepas de *Lactobacillus* spp.

Ingredientes	Formulação %	
	Pão (C, 56, 129, 139)	Pão Comercial
Farinha de trigo branca	100	100
Água	55	55
Açúcar	4	4
Sal	1,5	1,5
Manteiga	2	2
Fermento natural	40	-
Fermento biológico seco comercial	-	1,5

Fonte: Stefanello et al. (2018) com modificações.

Figura 2 – Elaboração dos pães: (A) fermento maduro (após 10 dias de propagação); (B) *mise en place* dos ingredientes; (C) divisão, modelagem e fermentação.



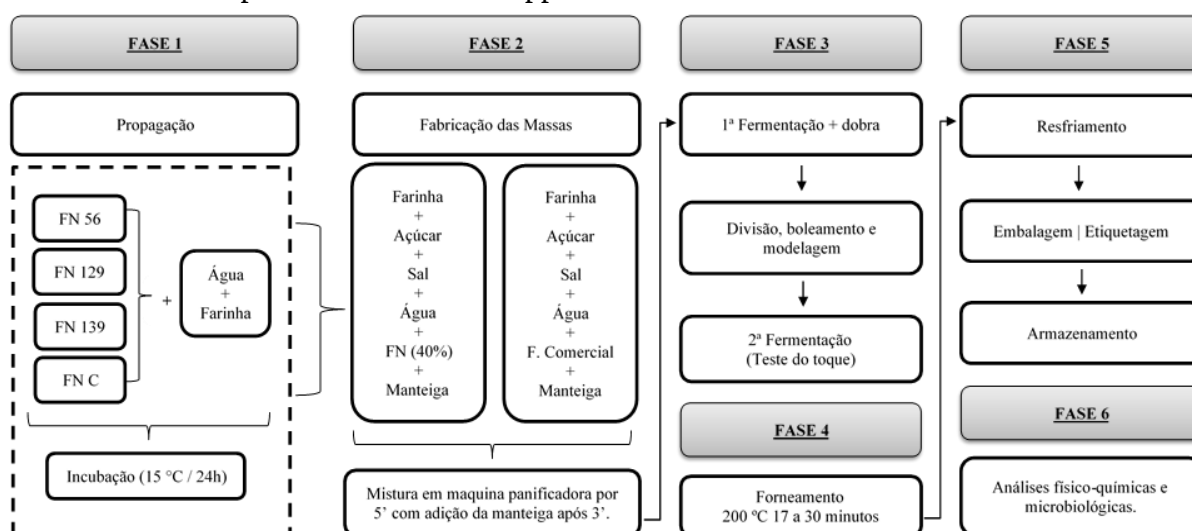
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 3 – Elaboração dos pães: (A) forneamento após a 2ª fermentação; (B) resfriamento, etiquetagem e armazenamento; (C) avaliação das amostras.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 4 - Fluxograma de elaboração de pães adicionados ou não de fermentos naturais inoculados com cepas de *Lactobacillus* spp.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.2.4 Caracterização microbiológica e físico-químicas dos fermentos naturais e pães elaborados

Os fermentos naturais foram analisados em triplicata após 0 horas, 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 dias, enquanto que os pães foram analisados em triplicata após 0, 1, 3, 7 e 14 dias para contagem de BAL, bolores e leveduras, determinação de Coliformes e teste de presença e ausência para *Salmonella* spp.

3.2.4.1 Análises microbiológicas

a) *Contagem de células viáveis de BAL*: Amostras de fermentos naturais e pães foram avaliadas nesse quesito. Foram pesados 25 g de cada amostra, as quais foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 0,1% e diluídas até 10^{-6} . Aliquotas de 20 μ L de cada diluição foram inoculadas em superfície (método de micro-gota) em placas contendo ágar MRS para contagem total de células

viáveis de BAL, incubadas a 37 °C/ 48 horas. Os resultados foram expressos como log UFC/g (LIU et al., 2018).

b) *Bolores e Leveduras*: Amostras de fermento natural e pães foram avaliadas. Foram pesados 25 g de cada amostra, as quais foram diluídas em 225 ml de água peptonada a 0,1% e diluídas até 10^{-5} . Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em superfície de placas contendo ágar Batata dextrose e incubadas a 28 °C/3 a 5 dias. Os resultados foram expressos como em log UFC/g, (SILVA, 2010).

c) *Determinação de coliformes a 35 e a 45 °C e Escherichia coli*: Amostras de pão foram pesadas (25 g), as quais foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 0,1% e diluídas até 10^{-3} . Foram determinados os coliformes a 35 °C e a 45 °C pela técnica dos tubos múltiplos, além da detecção de *E. coli* em ágar EMB (SILVA, 2010).

d) *Determinação de presença/ausência de Salmonella spp.*: Amostras de pão foram pesadas (25 g), as quais foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 0,1% e incubadas a 35 °C por 24 horas (pré-enriquecimento), posteriormente um mL dessa amostra foi inoculada em 10 mL de caldo Rappaport Rassiliadis e em mesmo volume de Selenito Cistina e incubado sob mesmas condições. Alíquotas desses caldos foram inoculadas em ágar XLD, ágar Bismuto Sulfito e ágar *Salmonella/Shiguelia* (SILVA, 2010).

3.2.4.2 Análises físico-químicas

a) *Peso e Volume Específico*: Peso foi determinado em balança analítica (SCHOBER et al., 2005; VENTIMIGLIA et al., 2015). O volume específico dos pães foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (*Panicum miliaceum* L.) e os resultados foram expressos em cm³/g (MANTZOURANI et al., 2019).

b) *pH*: Amostras de pães e de fermento natural foram pesadas (10 g) em balança analítica modelo M214Ai (Bel engineering, Piracicaba, Brasil), e misturadas com 90 ml de água destilada em seguida homogeneizados. O pH da suspensão resultante foi determinado utilizando potenciômetro modelo PHS-3E (Even, São Paulo, Brasil), previamente calibrado e operado de acordo com as instruções do manual do fabricante (AOAC, 2016).

c) *Acidez titulável*: A partir de 10 g de cada amostra (pães e fermentos naturais), foram misturadas com 90ml de água destilada e em seguida homogeneizados. Posteriormente, a suspensão foi acrescida de duas gotas de solução fenolftaleína, e titulada com solução de hidróxido de sódio (NaOH, 0,1N). A acidez titulável, foi expressa em ml de NaOH 0,1N consumida por 10 g de amostra (ROBERT et. al., 2006; AOAC, 2016).

d) *Umidade*: Os teores de umidade das amostras de pão foram determinados pelo método de dessecação direta de 2 g das amostras por secagem em estufa de circulação de ar (ACB Labor, São Paulo, Brasil) a 105 °C, até peso constante (AOAC, 2016)

e) *Cor*: A cor foi determinada em três pontos do miolo das fatias centrais por meio de um colorímetro (Chroma Meter CR-400C, Minolta, Osaka, Japão), medindo os parâmetros L *, a * e b* do método Hunter's (STEFANELLO et al., 2018).

f) *Textura*: As amostras foram preparadas com o auxílio de um paquímetro, resultando em fatias de 1,5 cm de espessura, 3 cm de altura e 3 cm de largura. Os parâmetros de textura serão determinados em triplicata, por meio do teste de dupla compressão em texturômetro modelo CT3 Texture Analyzer (Brookfield, Middleborough, U.S.A), equipado com probe cilíndrico de compressão 25mm de diâmetro. A análise instrumental de textura foi realizada sob as seguintes condições: velocidade pré-teste 5 mm/s, velocidade teste 1,0 mm/s, e velocidade pós-teste 5 mm/s, 30% de compressão e tempo entre as duas compressões de 5 s. Os parâmetros de textura avaliados foram: dureza, mastigabilidade e elasticidade (YILDIRIM; ARICI, 2019).

3.2.5 Análise descritiva quantitativa (ADQ) dos pães elaborados ou não com cepas de *Lactobacillus* spp.

O ensaio sensorial foi realizado seguindo o método descrito por Stone e Sidel (1993). A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba sob número de protocolo: 56337916.2.0000.5188 (Apêndice A). O teste sensorial foi realizado em cinco etapas: recrutamento, seleção dos provadores, desenvolvimento da terminologia descritiva, treinamento e avaliação das amostras.

3.2.5.1 Recrutamento de provadores e pré-seleção

Para a aplicação da ADQ, foi realizado inicialmente um recrutamento de 32 provadores, com idade média de 30 anos, todos não fumantes, os quais demonstraram interesse em participar da pesquisa e dispunham de tempo e afinidade pelo produto.

Inicialmente, foi realizado teste triangular, aplicado aos 32 provadores, para verificar sua sensibilidade e perspicácia ao escolher a amostra de pão (apêndice B). (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). Os provadores receberam três amostras de pão de fermentação natural, sendo duas iguais e uma diferente. (TOLEDO, 2013). O teste foi conduzido em cabines individuais, sob luz branca, longe de ruídos e odores.

Os provadores foram informados que duas das amostras de pão eram iguais e uma era diferente. Foi solicitado que a prova das amostras corresse da esquerda para a direita e que se identificasse a amostra diferente. Em seguida, foi realizado o teste de reconhecimento de gostos básicos. Para essa etapa, foram ofertadas 25 mL de soluções quimicamente puras dos gostos básicos, a saber: doce (0,58% de sacarose), ácido (0,04% de ácido cítrico), e amargo (0,06% de cafeína) (TOLEDO, 2013).

Ao final dos respectivos testes, foram selecionados 16 possíveis provadores, os quais obtiveram 100% de acerto em ambos os testes. Por fim, foi avaliada a habilidade dos provadores no uso de escalas não estruturadas através da expressão de proporcionalidade.

3.2.5.2 Levantamento e agrupamento dos termos descritores

O levantamento dos descritores foi definido a partir da consulta dos dados obtidos na metanálise realizada por CALLEJO et al., (2011), que descreve em sua revisão os principais descritores para análise sensorial de pão. Durante o treinamento, foram apresentados ao grupo 16 descritores e suas referências para as amostras (apêndice C). Com os termos descritores foi

gerada uma ficha descritiva, associando os termos a escala não estruturada de nove centímetros ancoradas nos extremos esquerdo/direito (pouco/muito) (apêndice D). Essa etapa foi realizada em 2 sessões.

3.2.5.3 Treinamento e seleção dos provadores

Os resultados dessa etapa foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SigmaStat 4.0. Foram selecionados para compor a equipe descritiva final aqueles provadores que demonstraram bom poder discriminativo.

3.2.5.4 Avaliação das amostras por ADQ

Ao final, nove provadores selecionados avaliaram as amostras de pão elaborados com fermento natural inoculado ou não com *Lactobacillus* spp. com os atributos previamente definidos como mais característicos. Essa etapa foi realizada em 1 sessão, onde uma fatia de 1,5 cm de pão de fermento natural foi servida de forma monádica e identificada a partir do tipo de fermento utilizado, neste caso C, 56, 129 e 139. As análises foram feitas em cabines individuais, em ambiente com iluminação e temperatura controladas e longe de ruídos.

3.2.6 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes e os resultados foram expressos como uma média dos ensaios. A análise estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando ANOVA seguido pelo teste Tukey. Para o cálculo dos dados, foi utilizado o programa SigmaStat versão 4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS* SPP. PARA PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO

4.1.1 Acidificação (pH)

Durante a avaliação da acidificação em caldo de farinha estéril CFE para as cepas estudadas inicialmente (após 0 horas) o pH das amostras variou de $5,58 \pm 0,12$ a $6,67 \pm 0,04$, enquanto que após 72 horas de avaliação os valores de pH observados para as amostras foram de $3,42 \pm 0,11$ a $3,60 \pm 0,01$. Observa-se que até 4 horas do teste, as amostras não apresentaram redução de pH, com exceção da amostra inoculada com a cepa Lpe 129. Até 8 horas de avaliação, as amostras Controle e Lf 56 não apresentaram variação ($p > 0,05$) do pH ao longo do tempo, sendo as amostras com maiores valores de pH observados, enquanto que até 24 horas de teste as amostras inoculadas com as cepas Lpe 129, Lf 139 e Lf 141 apresentaram os menores valores de pH observados. Nesse mesmo período, com exceção da amostra Controle, todas apresentaram queda significativa ($p < 0,05$) no pH. Após 72 horas, observou-se que ambas as amostras apresentaram valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$). A Tabela 2 apresenta os resultados do teste de acidificação das cepas avaliadas.

Tabela 2 – Valores médios $\pm$ desvio padrão para determinação de acidificação (g/100g) em caldo de farinha estéril (CFE) durante 72 horas (30 ± 1 °C) de cepas de *Lactobacillus* spp. e controle.

Tempo (horas)	Cepas					
	Controle	Lf 56	Lpc 106	Lpe 129	Lf 139	Lf 141
0	5,65 ^{Ba} ($\pm 0,07$)	6,41 ^{Aa} ($\pm 0,01$)	6,67 ^{Aa} ($\pm 0,04$)	5,58 ^{Ba} ($\pm 0,12$)	5,78 ^{Ba} ($\pm 0,03$)	5,80 ^{Ba} ($\pm 0,13$)
2	5,75 ^{Ba} ($\pm 0,07$)	6,46 ^{Aa} ($\pm 0,08$)	6,66 ^{Aa} ($\pm 0,09$)	5,65 ^{Ba} ($\pm 0,07$)	5,75 ^{Ba} ($\pm 0,07$)	5,88 ^{Ba} ($\pm 0,11$)
4	5,79 ^{Ba} ($\pm 0,13$)	6,59 ^{Aa} ($\pm 0,13$)	6,59 ^{Aa} ($\pm 0,13$)	5,06 ^{Cb} ($\pm 0,06$)	5,26 ^{BCb} ($\pm 0,06$)	5,55 ^{Ba} ($\pm 0,07$)
6	5,78 ^{Ba} ($\pm 0,11$)	6,48 ^{Aa} ($\pm 0,12$)	6,55 ^{Aa} ($\pm 0,07$)	4,58 ^{Cc} ($\pm 0,03$)	4,67 ^{Cc} ($\pm 0,10$)	4,78 ^{Cb} ($\pm 0,11$)
8	5,75 ^{Ba} ($\pm 0,07$)	6,56 ^{Aa} ($\pm 0,08$)	5,98 ^{Bb} ($\pm 0,03$)	4,47 ^{Cc} ($\pm 0,04$)	4,45 ^{Cc} ($\pm 0,08$)	4,54 ^{Cb} ($\pm 0,08$)
24	5,44 ^{Aa} ($\pm 0,08$)	4,08 ^{Bb} ($\pm 0,02$)	3,76 ^{Cc} ($\pm 0,09$)	3,59 ^{Cd} ($\pm 0,01$)	3,55 ^{Cd} ($\pm 0,07$)	3,76 ^{Cc} ($\pm 0,06$)
48	4,35 ^{Ab} ($\pm 0,07$)	4,03 ^{Bb} ($\pm 0,10$)	3,47 ^{Cc} ($\pm 0,03$)	3,57 ^{Cd} ($\pm 0,04$)	3,59 ^{Cd} ($\pm 0,01$)	3,69 ^{Cc} ($\pm 0,01$)
72	3,60 ^{Ac} ($\pm 0,01$)	3,48 ^{Ac} ($\pm 0,02$)	3,42 ^{Ad} ($\pm 0,11$)	3,48 ^{Ad} ($\pm 0,03$)	3,48 ^{Ad} ($\pm 0,03$)	3,58 ^{Ac} ($\pm 0,03$)

^{a-d} Em uma coluna, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{A-D} Em uma linha, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Controle: CFE não inoculado; Lf 56: *Lactobacillus fermentum* 56; Lpc 106: *Lactobacillus paracasei* 106; Lpe 129: *Lactobacillus pentosus* 129; Lf 139: *Lactobacillus fermentum* 139; Lf 141: *Lactobacillus fermentum* 141.

Fonte: Dados da pesquisa.

Microrganismos selecionados para utilização em fermentação natural requerem apresentar algumas características específicas para que possam adaptar-se bem à matriz inserida e às condições de fermentação. A escolha correta do microrganismo é caracterizada pela importância que ele trará ao fermento natural, principalmente no estágio inicial do seu desenvolvimento. A capacidade de produzir ácidos orgânicos e resistir a essas variações de pH ao longo do processo fermentativo são essenciais para a seleção dessas cepas. (ALFONZO et al 2013).

Alfonzo et al., (2013) ao avaliar a capacidade de acidificação de cepas de BAL isoladas de farinha de trigo, identificou após 6 horas de teste, valores de pH < 5,00 para 11 das cepas estudadas, o que também foi observado neste estudo para as amostras inoculadas com as cepas Lpe 129, Lf 139 e Lf 141 no mesmo período. Ainda no estudo de Alfonzo et al., (2013) após 24 horas de acidificação, os autores observaram valores de pH < 4,00. Comportamento semelhante foi observado para as amostras inoculadas com *Lactobacillus* spp., após 24 horas.

4.1.2 Produção de exopolissacarídeo (EPS) e proteólise

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para produção de EPS e atividade proteolítica. As amostras apresentaram valores ($p < 0,05$) de produção de EPS que variam de $0,13 \pm 0,01$ a $0,33 \pm 0,03$, sendo a amostra Lf 56 a com maior valor $0,33 \pm 0,03$ e a Lf 141 com o menor valor $0,13 \pm 0,01$, as amostras Lpc 106, Lpe 129, Lf 139 e Lf 141 apresentaram valores ($p < 0,05$) estaticamente semelhantes. A partir dos resultados obtidos nos testes, foi realizada a análise de componentes principais apresentada na Figura 5. De acordo com a análise da figura 1, a amostra Lf 56 apresenta destaque na produção de EPS, como evidenciado anteriormente, enquanto que a amostra Lpc 106 apresentou-se como a que menos produziu EPS e com menor capacidade de acidificação dentre as demais. Já as amostras Lf 139, Lpe 129 apresentaram-se como as melhores cepas dentre as demais testadas já que apresentaram melhor desempenho na capacidade de acidificação e de produção de EPS. Como todas as cepas apresentaram atividade proteolítica negativa, não se considerou esse teste para análise.

Tabela 3 – Valores médios $\pm$ desvio-padrão de exopolissacarídeo (EPS) e avaliação qualitativa de atividade proteolítica de cepas de *Lactobacillus* spp.

Cepas	EPS (mg/l)	Proteólise*
Lf 56	$0,33 \pm 0,03^a$	-
Lpc 106	$0,16 \pm 0,03^b$	-
Lpe 129	$0,20 \pm 0,01^b$	-
Lf 139	$0,20 \pm 0,06^b$	-
Lf 141	$0,13 \pm 0,01^b$	-

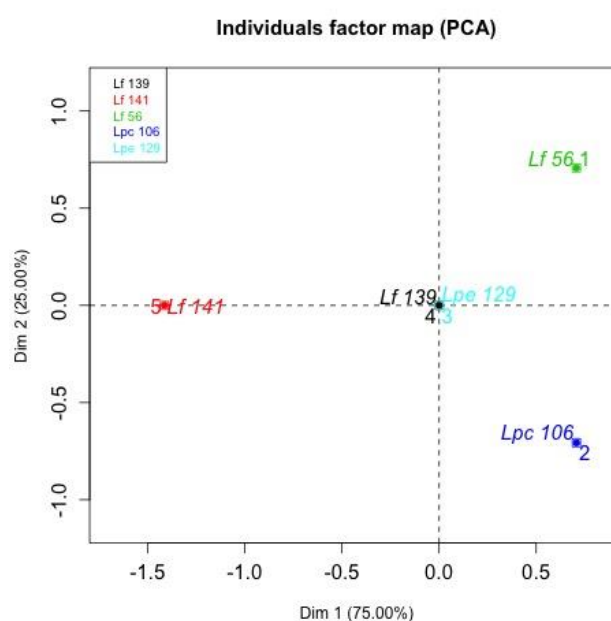
^{a-b} Em uma coluna, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

* Atividade proteolítica considerada (+) quando detectado halo ≥ 1 mm. Lf 56: *Lactobacillus fermentum* 56; Lpc 106: *Lactobacillus paracasei* 106; Lpe 129: *Lactobacillus pentosus* 129; Lf 139: *Lactobacillus fermentum* 139; Lf 141: *Lactobacillus fermentum* 141.

Fonte: Dados da pesquisa.

Na natureza, uma grande diversidade de BAL através da fermentação e acidificação do fermento produzem EPS, que influenciam diretamente na viscosidade, gelatinização e nas propriedades reológicas da massa, bem como, os baixos valores de pH exercem um impacto direto sobre os componentes responsáveis pelo desenvolvimento da estrutura da massa, tais como o glúten, o amido, a hemicelulose, e consequentemente, sobre a estrutura do pão, atuando diretamente na maior vida de prateleira do produto. (LYNCH, COFFEY, ARENDT, 2017; NOGUEIRA, 2015; VOGEL et al., 2002). A atividade proteolítica durante a fermentação libera aminoácidos que contribuem nas características de aroma e sabor do pão, contudo, a degradação proteolítica pode afetar as características reológicas da massa. (THIELE; GRASSL; GÄNZLE, 2004; THIELE; GÄNZLE; VOGEL, 2002).

Figura 5 – Análise de Componentes principais na seleção de cepas de *Lactobacillus* spp. para emprego em produtos fermentados de panificação.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS FERMENTOS NATURAIS

4.2.1 Contagem de bactérias ácido lácticas, bolores e leveduras, determinação de pH e acidez titulável (ATT)

As contagens de BAL variaram entre <2 e $9,20 \pm 0,01$ log. UFC / mL para as amostras nos tempos avaliados. Para as amostras controle e FN 56 nos tempos 0; 1 e 2 dias observaram-se os menores valores referentes às contagens de BAL, dentre as amostras. De maneira geral, oscilações nas contagens ao longo do tempo, para todas as amostras, são observadas entre o terceiro e oitavo dia de propagação, porém no nono e décimo dia, todas as amostras apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) nas contagens de BAL. Quando avaliamos tais contagens entre as amostras, em cada tempo, percebeu-se que o fermento natural inoculado com a cepa Lf 56 apresentou as maiores ($p < 0,05$) contagens até o sétimo dia de avaliação, com

exceção do quarto dia. No entanto, após dez dias de propagação, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as contagens de BAL de todos os fermentos avaliados. Essa estabilização das bactérias ácido-láticas após dez dias de propagação de fermento natural já era esperada e também observada por outros estudos (GOBETTI et al., 2016; VAN DER MEULEN et al., 2007; WECKX et al., 2010a, 2010b). A Tabela 4 apresenta as contagens totais de células viáveis de bactérias ácido láticas (BAL) e bolores e leveduras em fermento natural durante período de propagação (30 ± 1 °C) de 10 dias.

Tabela 4 – Valores médios ($\log_{10}$ UFC/mL) $\pm$ desvio padrão para contagem total de BAL e bolores e leveduras em fermento natural durante período de propagação (30 ± 1 °C) de 10 dias.

T (dias)	BAL				Bolores e Leveduras			
	Amostras							
	FN C	FN 56	FN 129	FN 139	FN C	FN56	FN129	FN139
0	<2	5,70 ^{Ag}	5,70 ^{Af}	5,44 ^{Bg}	3,26 ^{Ac}	1,60 ^{Afg}	2,93 ^{Ac}	3,26 ^{Ac}
		(±0,01)	(±0,02)	(±0,06)	(±0,03)	(±0,14)	(±1,63)	(±0,09)
1	4,15 ^{Bf}	7,18 ^{Af}	6,68 ^{Ae}	6,65 ^{Af}	2,42 ^{Cd}	4,10 ^{Bcd}	4,98 ^{Aa}	5,16 ^{Aa}
	(±0,21)	(±0,09)	(±0,08)	(±0,24)	(±0,08)	(±0,14)	(±0,08)	(±0,06)
2	4,00 ^{Cf}	7,59 ^{Ae}	7,22 ^{Bd}	7,23 ^{Bde}	1,31 ^{Bf}	6,39 ^{Aa}	5,52 ^{Aa}	5,53 ^{Aa}
	(±0,01)	(±0,16)	(±0,06)	(±0,04)	(±0,10)	(±0,55)	(±0,06)	(±0,04)
3	8,17 ^{Ad}	8,73 ^{Abc}	5,56 ^{Bf}	5,36 ^{Bg}	1,18 ^{Cef}	3,37 ^{Ade}	3,00 ^{ABbc}	2,20 ^{Bd}
	(±0,01)	(±0,09)	(±0,36)	(±0,26)	(±0,08)	(±0,39)	(±0,10)	(±0,08)
4	5,69 ^{Ce}	8,33 ^{Bcd}	6,22 ^{Ce}	9,16 ^{Aa}	1,60 ^{Bef}	1,00 ^{Bg}	1,30 ^{Bc}	2,20 ^{Ad}
	(±0,08)	(±0,01)	(±0,11)	(±0,11)	(±0,04)	(±0,02)	(±0,06)	(±0,04)
5	8,62 ^{ABc}	8,75 ^{Ab}	8,42 ^{Bbc}	7,00 ^{Cef}	1,05 ^{Bf}	1,78 ^{ABf}	1,60 ^{ABc}	2,20 ^{Ad}
	(±0,06)	(±0,09)	(±0,02)	(±0,02)	(±0,10)	(±0,10)	(±0,43)	(±0,10)
6	8,82 ^{Bbc}	9,10 ^{Aab}	9,05 ^{Aa}	9,12 ^{Aa}	1,00 ^{Cf}	2,15 ^{Bfg}	3,67 ^{Aac}	2,29 ^{Bd}
	(±0,03)	(±0,01)	(±0,03)	(±0,03)	(±0,07)	(±0,21)	(±0,27)	(±0,02)
7	9,19 ^{Aa}	9,20 ^{Aa}	8,24 ^{Bc}	7,59 ^{Bcd}	1,00 ^{Bf}	1,47 ^{Bg}	4,10 ^{Aa}	3,52 ^{Ac}
	(±0,02)	(±0,01)	(±0,11)	(±0,16)	(±0,02)	(±0,04)	(±0,14)	(±0,25)
8	8,50 ^{Ac}	7,98 ^{Bde}	7,97 ^{Bc}	7,77 ^{Bc}	2,30 ^{Bd}	2,55 ^{Bef}	5,27 ^{Aa}	4,5 ^{Ab}
	(±0,02)	(±0,01)	(±0,02)	(±0,21)	(±0,06)	(±0,21)	(±0,23)	(±0,18)
9	9,16 ^{Aab}	8,88 ^{Bab}	8,78 ^{Bab}	8,44 ^{ABb}	4,46 ^{Ab}	4,40 ^{Abc}	5,46 ^{Aa}	5,4 ^{Aa}
	(±0,15)	(±0,26)	(±0,05)	(±0,06)	(±0,37)	(±0,25)	(±0,22)	(±0,29)
10	9,13 ^{Aab}	9,03 ^{Aab}	8,87 ^{Aab}	9,01 ^{Aa}	5,52 ^{Aa}	5,20 ^{Ab}	5,57 ^{Aa}	5,6 ^{Aa}
	(±0,02)	(±0,04)	(±0,04)	(±0,08)	(±0,16)	(±0,01)	(±0,24)	(±0,15)

^{a-g} Em uma coluna, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{A-C} Em uma linha, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

Fermento natural, também denominado de *levain*, *sourdough* ou *massa madre* é basicamente uma mistura de farinha de cereais e água, constituído por uma população heterogênea de bactérias ácido láticas e leveduras que realizam a fermentação que pode ser espontânea ou por meio da inoculação de uma cultura starter (DE VUYST et al., 2014; CORSETTI, SETTANNI, 2007; VENTIMIGLIA et al., 2015). As BAL são as populações microbianas mais importantes durante produção de fermento natural.

O pH e acidificação correlacionam-se com o crescimento dos organismos, influenciando as taxas de crescimento de BAL, além das interações entre BAL e leveduras que representam um aspecto importante para a estabilidade da microbiota do *sourdough* (BRANDT et al., 2004). A alta concentração de BAL nos fermentos naturais elaborados com inoculação de cepas de

Lactobacillus spp. resulta da produção de ácidos orgânicos que reduzem significativamente o pH (ROSSEL, 2016). Observamos que a partir do oitavo dia de propagação todas as amostras têm os menores valores de pH, dados disponíveis na Tabela 5, o que corrobora com as maiores contagens observadas para as BAL nesse período.

As contagens de bolores e leveduras nos fermentos variaram entre $1,00 \pm 0,07$ e $6,39 \pm 0,55$ log. de UFC / mL para as amostras nos tempos avaliados. No tempo zero as amostras não diferem ($p > 0,05$) estatisticamente entre si, no entanto, no primeiro e segundo dia tivemos as maiores concentrações de bolores e leveduras para as amostras FN 129 e FN 139. Do segundo ao sétimo dia o FN Controle manteve as menores contagens para bolores e leveduras, que retoma o crescimento no oitavo dia, atingindo a maior contagem no nono dia. Entre o quarto e o sexto dia, todas amostras apresentaram as menores taxas de bolores e leveduras, abaixo de <3 log. UFC / ml, com variações nos dias sete e oito. A partir do nono dia todas as amostras apresentam as maiores quantidades de bolores e leveduras que se estabilizam, não havendo diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre as amostras avaliadas. É importante destacar que apenas colônias características de leveduras foram observadas em todo o período de propagação para todas as amostras, e que a multiplicação de fungos filamentosos foi inibida, provavelmente pelo baixo pH das amostras ao longo do tempo.

Tabela 5 – Valores médios $\pm$ desvio padrão para determinação de pH e acidez titulável (g/100g) em fermento natural durante período de propagação (30 ± 1 °C) de 10 dias.

T (dias)	pH				Acidez Titulável			
	Amostras							
	FN C	FN 56	FN 129	FN 139	FN C	FN56	FN129	FN139
0	5,59 ^{Bb} ($\pm 0,03$)	5,78 ^{Aa} ($\pm 0,07$)	5,78 ^{Aa} ($\pm 0,06$)	5,69 ^{Abb} ($\pm 0,05$)	1,62 ^{Ag} ($\pm 0,24$)	1,85 ^{Ah} ($\pm 0,42$)	1,98 ^{Af} ($\pm 0,23$)	2,40 ^{Af} ($\pm 0,34$)
1	5,9 ^{Aa} ($\pm 0,02$)	5,78 ^{Ba} ($\pm 0,07$)	5,69 ^{Ba} ($\pm 0,02$)	5,78 ^{Ba} ($\pm 0,03$)	2,82 ^{Af} ($\pm 0,19$)	2,89 ^{Ag} ($\pm 0,20$)	2,82 ^{Aef} ($\pm 0,35$)	2,66 ^{Aef} ($\pm 0,30$)
2	6,0 ^{Aa} ($\pm 0,14$)	4,33 ^{Cb} ($\pm 0,06$)	5,41 ^{Bb} ($\pm 0,09$)	5,6 ^{Bcb} ($\pm 0,04$)	2,43 ^{Cf} ($\pm 0,17$)	5,25 ^{Af} ($\pm 0,10$)	3,37 ^{Be} ($\pm 0,23$)	3,18 ^{Be} ($\pm 0,11$)
3	4,17 ^{Ac} ($\pm 0,16$)	3,49 ^{Bc} ($\pm 0,03$)	3,55 ^{Bc} ($\pm 0,03$)	3,55 ^{Bd} ($\pm 0,01$)	6,87 ^{Be} ($\pm 0,15$)	7,39 ^{Ae} ($\pm 0,19$)	7,00 ^{ABd} ($\pm 0,02$)	6,94 ^{Ad} ($\pm 0,20$)
4	3,45 ^{Ad} ($\pm 0,03$)	3,30 ^{Bd} ($\pm 0,01$)	3,25 ^{Bde} ($\pm 0,01$)	3,30 ^{Bgh} ($\pm 0,01$)	11,28 ^{Bcd} ($\pm 0,19$)	12,26 ^{Abc} ($\pm 0,49$)	11,03 ^{Bc} ($\pm 0,28$)	12,03 ^{ABbc} ($\pm 0,30$)
5	3,39 ^{Ad} ($\pm 0,04$)	3,3 ^{Ad} ($\pm 0,07$)	3,35 ^{Ade} ($\pm 0,02$)	3,38 ^{Aefg} ($\pm 0,02$)	10,70 ^{BCd} ($\pm 0,09$)	11,22 ^{ABd} ($\pm 0,07$)	11,48 ^{Abc} ($\pm 0,35$)	10,31 ^{Cc} ($\pm 0,26$)
6	3,56 ^{Ad} ($\pm 0,01$)	3,37 ^{Bcd} ($\pm 0,05$)	3,44 ^{ABcd} ($\pm 0,01$)	3,43 ^{Abe} ($\pm 0,02$)	11,97 ^{Ab} ($\pm 0,49$)	11,67 ^{ACd} ($\pm 0,29$)	11,61 ^{Abc} ($\pm 0,46$)	11,41 ^{Ac} ($\pm 0,20$)
7	3,56 ^{Ad} ($\pm 0,06$)	3,4 ^{Bcd} ($\pm 0,03$)	3,33 ^{Bde} ($\pm 0,01$)	3,35 ^{Befg} ($\pm 0,02$)	13,04 ^{Aba} ($\pm 0,10$)	12,63 ^{BCab} ($\pm 0,49$)	13,74 ^{Aa} ($\pm 0,45$)	11,95 ^{Cbc} ($\pm 0,07$)
8	3,45 ^{Ad} ($\pm 0,07$)	3,32 ^{Bd} ($\pm 0,03$)	3,30 ^{Bde} ($\pm 0,02$)	3,29 ^{Bh} ($\pm 0,03$)	11,22 ^{Bd} ($\pm 0,29$)	11,77 ^{ABbd} ($\pm 0,26$)	12,32 ^{Ab} ($\pm 0,15$)	12,19 ^{Ab} ($\pm 0,15$)
9	3,42 ^{Ad} ($\pm 0,07$)	3,35 ^{ABd} ($\pm 0,01$)	3,30 ^{ABde} ($\pm 0,02$)	3,28 ^{Bh} ($\pm 0,03$)	12,31 ^{Babc} ($\pm 0,29$)	13,23 ^{Aab} ($\pm 0,04$)	12,39 ^{Bb} ($\pm 0,20$)	13,81 ^{Aa} ($\pm 0,02$)
10	3,43 ^{Ad} ($\pm 0,07$)	3,30 ^{Bd} ($\pm 0,03$)	3,35 ^{ABde} ($\pm 0,04$)	3,29 ^{Bh} ($\pm 0,02$)	10,74 ^{Bd} ($\pm 0,28$)	11,27 ^{ABd} ($\pm 0,25$)	11,79 ^{Ab} ($\pm 0,14$)	11,67 ^{Abc} ($\pm 0,14$)

^{a - g} Em uma coluna, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{A - C} Em uma linha, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao longo do período de propagação, conforme Tabela 5, realizado a cada 24 horas, nota-se que durante o tempo 1 as amostras FN 56 e FN 129 estatisticamente ($p < 0,05$) não tiveram variações em seus valores. A partir do tempo 3 ambas as amostras apresentaram redução nos níveis de pH, e, conseqüentemente, aumento da ATT, com estabilização entre os tempos 5-8. Na avaliação de pH as amostras variaram de $5,78 \pm 0,07$ – $3,28 \pm 0,03$ e acidez com valores que variaram de $1,62 \pm 0,24$ - $13,81 \pm 0,02$ g/100g. As amostras não sofreram variações estatísticas ($p < 0,05$) durante o tempo 0 e o tempo 1. As amostras 129 e 139 também tiveram dados semelhantes durante o tempo 2. Os valores médios encontrados tanto na determinação do pH quanto na acidez titulável, demonstrando uma correlação entre os dados.

Mantzourani et al. (2019) em recente pesquisa observou o efeito de uma cepa de *L. paracasei* como starter no fermento e sua qualidade no pão. O fermento cultivado com *L. paracasei* obteve valores de pH e acidez, respectivamente de 3,8 e 13,1 g/100g, valores que se assemelham com os encontrados nesse estudo após o sexto dia de propagação, conforme valores apresentados na Tabela 5. Após o tempo 4, o pH de todas as amostras apresentaram-se abaixo de 4 ($p < 0,05$), assim como a acidez apresentou valores acima de 11 g/100g. Entre os tempos 4 e 10 poucas variações são percebidas, sendo a amostra FNC a que possui os maiores valores de pH, oscilando com valores de acidez entre 1,62 – 13,04 g/100g.

Em seu estudo com BAL, Minervini et al., (2016), encontraram após 5 propagações do fermento natural, valores de pH que variaram de 3,84 a 4,34 e acidez de 8,8 a 12 g/100g, valores próximos aos encontrados nesse estudo durante o tempo 5. Já Reale et al. (2016) observaram que a amostra controle após 24 horas apresentou acidificação ausente, enquanto isso, suas amostras inoculadas com *L. casei* obtiveram alta acidificação após o mesmo período, obtendo valores semelhantes ao encontrado nesse estudo.

A partir do oitavo dia temos uma relação direta entre a queda de pH, elevação de acidificação e a maior concentração de BAL, juntamente com estabilização de bolores e leveduras. Tendo em vista os resultados destes e outros estudos, a relação entre bactérias ácido-láticas e leveduras é afetada pelos microrganismos (MINERVINI et al., 2016) adicionados às formulações FN 56, FN 129 e FN 139. As BAL produzem ácidos láctico e acético, mantendo o pH abaixo de 5. As leveduras produzem dióxido de carbono e etanol. Interações entre os *Lactobacillus* e as leveduras são importantes para a atividade metabólica do fermento natural (POUTANEN et al., 2009). À medida que as etapas de propagação seguem, uma “seleção” de microrganismos mais resistentes às condições do meio vai acontecendo. Provavelmente por isso, as contagens de leveduras vão aumentando gradativamente, tendo em vista que àquelas células resistentes ao pH mais ácido passam a sobreviver e multiplicar-se. Justamente por serem importantes produtoras de CO_2 é importante que ao final do período de propagação essa contagem de leveduras seja maior, o que irá contribuir com o volume do pão em que o fermento será inserido.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS PÃES ELABORADOS

4.3.1 Contagem de células viáveis (BAL), bolores e leveduras e análises microbiológicas

Em relação aos pães, quanto as BAL não se observaram contagem de células viáveis nas amostras em nenhum dos tempos analisados, isso ocorreu devido à duração e a temperatura de forneamento, que ocasionou a inviabilidade das células presentes nos fermentos durante as etapas anteriores. Zhang et al., (2018) identificou em seu recente estudo, que devido as altas

temperaturas empregadas no processo de forneamento de pães, grande parte das BAL são inviabilizadas, afetando negativamente a sobrevivência desses microrganismos e seu possível efeito probiótico no pão.

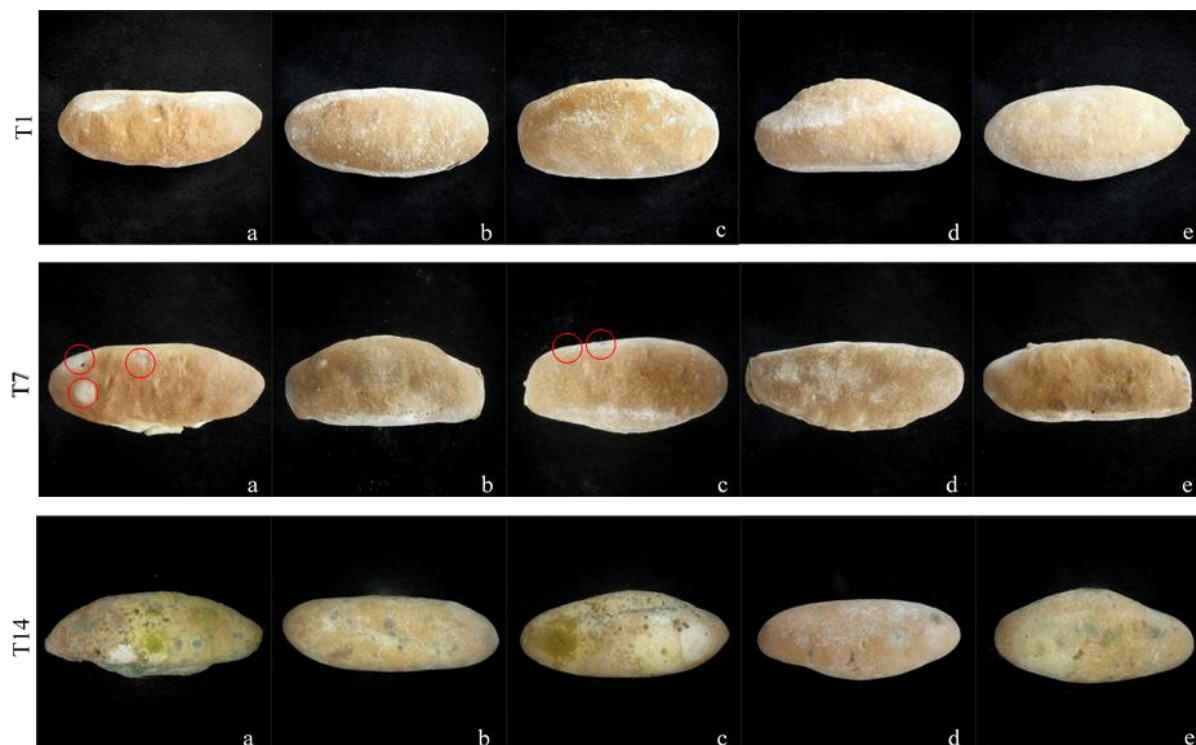
No tocante a bolores e leveduras, observaram-se contagens em todos os tempos no pão produzido pelo fermento comercial e no fermento natural controle (microbiota selvagem) com aumento após sete dias de armazenamento. Nos pães produzidos a partir do FN 56 observou-se presença de bolores e leveduras após três dias de armazenamento. Já nos pães produzidos a partir do FN 129 e FN 139 as contagens para bolores e leveduras observadas foram $<2 \log$ UFC / ml até 7 dias de armazenamento. Nas análises microbiológicas dos pães produzidos, a contagem de coliformes a 45°C e *Salmonella spp.* foram negativas em todas as amostras e tempos analisados, o que atesta a qualidade da manipulação em acordo com a legislação brasileira para pães (BRASIL, 2005). O forneamento e a temperatura empregada faz com que qualquer possível bactéria citada seja destruída durante o procedimento.

Visualmente, após os tempos 0, 1 e 3 dias, não foi observado nenhum tipo de modificação na aparência das amostras dos pães, após 7 dias de armazenamento em condições iguais para todas as amostras, os pães: comercial e 56 apresentaram pontos de bolor em sua casca, o que pode estar associado aos valores de pH dessas amostras, que após sete dias de armazenamento foram os maiores dentre as demais. O baixo pH promove a ativação de proteases dos cereais que com a liberação de peptídeos são então hidrolisados em aminoácidos pelas peptidases intracelulares das BAL.

A síntese de ácido lático e ácido acético, além de outros compostos bioativos apresentam ação antifúngica contra os principais contaminantes do pão (ROSSEL, 2016). Os ácidos orgânicos presentes nos fermentos naturais inibem o desenvolvimento de atividades microbianas, isso explica o fato das amostras de pão 129, 139 e controle não terem sofrido qualquer tipo de contaminação ou deterioração durante os primeiros 7 dias, após 14 dias de armazenamento, todas as amostras foram deterioradas pela ação de microrganismos de origem fúngica. Os resultados podem ser visualizados na Figura 6 que apresenta os resultados visuais nos tempos 1, 7 e 14 dias.

Zhang et al., (2018) corrobora com esse dado ao afirmar que a adição de culturas iniciadoras em fermento natural possui ação antifúngica na massa de pães. Mantzourani et al., (2019) avaliou suas amostras de pão por 16 dias, as amostras controle, elaboradas sem inóculo de *Lactobacillus* suportaram 8 dias; já as amostras inoculadas com *L. paracasei*, no geral suportou quinze dias de armazenamento, após esse prazo todas as amostras se deterioraram, dado que certifica a utilização de BAL na preservação das características sensoriais e aumento da vida de prateleira.

Figura 6 – Visualização gráfica dos pães elaborados durante período de armazenamento (1, 7 e 14 dias)



(a) – pão comercial: *Saccharomyces cerevisiae*; (b) – pão controle: microbiota selvagem; (c) – pão 56: *Lactobacillus fermentum*; (d) – pão 129: *Lactobacillus pentosus*; (e) – pão 139: *Lactobacillus fermentum*.

Fonte: Dados da pesquisa.

4.3.2 Determinação de pH, acidez titulável (ATT), umidade e volume específico

A Tabela 6 apresenta respectivamente os resultados encontrados para a determinação do pH, ATT, umidade e volume específico nas amostras de pães avaliadas durante o período de armazenamento. As amostras variaram de $3,73 \pm 0,02$ - $5,65 \pm 0,10$ para pH, enquanto que os valores de acidez no mesmo espaço de tempo variou de $3,90 \pm 0,06$ g/100g - $7,32 \pm 0,10$. No tempo 0 as amostras de pão variaram de $4,06 \pm 0,04$ - $5,12 \pm 0,03$, tendo todas as amostras valores estaticamente iguais ($p < 0,05$), exceto para o pão comercial. No tempo 1, equivalente a 24 horas, as amostras do pão controle, 129 e 139 variaram de $4,10 \pm 0,09$ - $4,08 \pm 0,01$ nos valores de pH, a maior queda registrada no mesmo período de tempo, foi para a amostra 56, com valor abaixo de 4. Após o tempo 3 todas as amostras, com exceção do pão comercial, apresentaram valores abaixo de 4. Após 7 dias de armazenamento, as amostras variaram de $3,73 \pm 0,02$ - $5,00 \pm 0,03$, a amostra 139 apresentou o menor valor de pH e a comercial o maior valor, as amostras controle e 129 apresentaram resultados estaticamente iguais ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que a adição de *Lactobacillus* spp. foram eficazes no aumento da vida de prateleira dos pães, resultando na redução do pH e aumento da acidez nos pães, especialmente nas amostras 129 e 139 onde verificou-se ainda inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes durante os sete dias de armazenamento, o que provavelmente está associado ao menor pH dessas amostras após sete dias. Rehman et al., (2007) corroboram com esse dado ao afirmar que a adição de culturas iniciadoras no fermento natural teve ação antifúngica na massa de pães.

Tabela 6 – Valores médios $\pm$ desvio padrão para variáveis da caracterização físico-química em pães elaborados com cepas de *Lactobacillus spp.*, sem adição de BAL e com fermento comercial durante período de armazenamento de 7 dias.

Variáveis	Tempo (dias)	Amostras				
		Comercial	Controle	56	129	139
pH	0	5,12 ^{Ab} ($\pm 0,03$)	4,13 ^{Ba} ($\pm 0,04$)	4,06 ^{Ba} ($\pm 0,04$)	4,14 ^{Ba} ($\pm 0,02$)	4,11 ^{Ba} ($\pm 0,02$)
	1	5,65 ^{Aa} ($\pm 0,10$)	4,10 ^{Ba} ($\pm 0,09$)	3,94 ^{Cb} ($\pm 0,02$)	4,09 ^{BCb} ($\pm 0,02$)	4,08 ^{BCab} ($\pm 0,01$)
	3	5,04 ^{Ab} ($\pm 0,05$)	3,95 ^{Bbc} ($\pm 0,01$)	3,85 ^{Cc} ($\pm 0,02$)	3,84 ^{Cc} ($\pm 0,01$)	3,83 ^{Cc} ($\pm 0,02$)
	7	5,00 ^{Ab} ($\pm 0,03$)	3,87 ^{Cc} ($\pm 0,01$)	3,98 ^{Bb} ($\pm 0,01$)	3,86 ^{Cc} ($\pm 0,02$)	3,73 ^{Dd} ($\pm 0,02$)
	0	5,90 ^{Bbc} ($\pm 0,06$)	4,60 ^{Ca} ($\pm 0,20$)	6,20 ^{Abb} ($\pm 0,20$)	6,44 ^{Aa} ($\pm 0,31$)	6,41 ^{Abb} ($\pm 0,09$)
	1	5,71 ^{Bc} ($\pm 0,10$)	3,90 ^{Cb} ($\pm 0,06$)	7,31 ^{Aa} ($\pm 0,14$)	5,55 ^{Bc} ($\pm 0,10$)	5,50 ^{Bd} ($\pm 0,20$)
	3	6,40 ^{Ab} ($\pm 0,34$)	4,10 ^{Bb} ($\pm 0,52$)	6,35 ^{Ab} ($\pm 0,13$)	6,50 ^{Aa} ($\pm 0,10$)	6,90 ^{Aa} ($\pm 0,20$)
	7	7,32 ^{Aa} ($\pm 0,10$)	4,40 ^{Da} ($\pm 0,11$)	5,40 ^{BCc} ($\pm 0,24$)	5,90 ^{Bb} ($\pm 0,06$)	6,09 ^{Bbc} ($\pm 0,16$)
	0	34,17 ^{Aa} ($\pm 0,27$)	28,62 ^{Aa} ($\pm 1,57$)	31,03 ^{Aa} ($\pm 1,88$)	28,00 ^{Aab} ($\pm 2,35$)	28,28 ^{Aa} ($\pm 0,62$)
	1	30,39 ^{Aa} ($\pm 0,27$)	28,25 ^{Ca} ($\pm 0,57$)	27,00 ^{Cb} ($\pm 0,04$)	30,09 ^{Aba} ($\pm 0,69$)	28,46 ^{Ca} ($\pm 0,50$)
Umidade	3	31,78 ^{Ab} ($\pm 0,84$)	23,71 ^{Cb} ($\pm 0,10$)	27,19 ^{Bb} ($\pm 0,34$)	22,20 ^{Dc} ($\pm 0,64$)	26,61 ^{Bb} ($\pm 0,22$)
	7	30,59 ^{Ab} ($\pm 0,11$)	22,97 ^{Cb} ($\pm 0,42$)	26,91 ^{Bb} ($\pm 0,94$)	26,90 ^{Bb} ($\pm 0,21$)	26,52 ^{Bb} ($\pm 0,08$)
	0	2,62 ^{Db} ($\pm 0,01$)	3,45 ^{Aa} ($\pm 0,01$)	2,83 ^{Cb} ($\pm 0,01$)	2,83 ^{Cab} ($\pm 0,00$)	3,04 ^{Bb} ($\pm 0,02$)
	1	2,62 ^{Db} ($\pm 0,03$)	3,46 ^{Aa} ($\pm 0,01$)	2,82 ^{Cb} ($\pm 0,02$)	2,85 ^{Cab} ($\pm 0,02$)	3,07 ^{Bb} ($\pm 0,10$)
	3	2,91 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	3,26 ^{Ab} ($\pm 0,02$)	2,89 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	2,87 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	3,25 ^{Aa} ($\pm 0,02$)
	7	2,85 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	2,86 ^{Bc} ($\pm 0,01$)	2,92 ^{Aa} ($\pm 0,01$)	2,59 ^{Cc} ($\pm 0,01$)	2,44 ^{Dc} ($\pm 0,02$)
	0	2,62 ^{Db} ($\pm 0,01$)	3,45 ^{Aa} ($\pm 0,01$)	2,83 ^{Cb} ($\pm 0,01$)	2,83 ^{Cab} ($\pm 0,00$)	3,04 ^{Bb} ($\pm 0,02$)
	1	2,62 ^{Db} ($\pm 0,03$)	3,46 ^{Aa} ($\pm 0,01$)	2,82 ^{Cb} ($\pm 0,02$)	2,85 ^{Cab} ($\pm 0,02$)	3,07 ^{Bb} ($\pm 0,10$)
	3	2,91 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	3,26 ^{Ab} ($\pm 0,02$)	2,89 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	2,87 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	3,25 ^{Aa} ($\pm 0,02$)
	7	2,85 ^{Ba} ($\pm 0,01$)	2,86 ^{Bc} ($\pm 0,01$)	2,92 ^{Aa} ($\pm 0,01$)	2,59 ^{Cc} ($\pm 0,01$)	2,44 ^{Dc} ($\pm 0,02$)

^{a - g} Em uma coluna, para uma mesma variável, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{A - C} Em uma linha, para uma mesma variável, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

De maneira geral, os pães adicionados de *Lactobacillus spp* apresentaram semelhante redução do pH e aumento da acidez após sete dias de armazenamento, o que é característico de

pães com fermento natural como observado por Zhang et al., (2018), um fato interessante de ser observado é que essa adição de cepas fez com que o comportamento dos parâmetros avaliados fosse semelhante, enquanto que a acidificação dos pães controle foi superior, o que poderá ser melhor avaliado em futuros estudos com avaliação sensorial, já que pães excessivamente ácidos podem não ser bem aceitos pelos consumidores.

A umidade está relacionada a composição, qualidade e estabilidade de pães. Os padrões para umidade exigidos pela ANVISA – Resolução nº 90 (2000), tem como limite máximo o percentual de 38%. Durante a análise, as amostras variaram de $22,20 \pm 0,64$ – $34,17 \pm 0,27$, estando-as em conformidade com o padrão definido. A redução de umidade nos pães é um fenômeno esperado em decorrência do processo de envelhecimento desse tipo de produto. Com a retrogradação do amido após o resfriamento do pão forneado esse produto tende a perder água para o ambiente, o que modifica sua textura.

A redução de umidade nos pães é um fenômeno esperado em decorrência do processo de envelhecimento desse tipo de produto. Com a retrogradação do amido após o resfriamento do pão forneado esse produto tende a perder água para o ambiente, o que modifica sua textura. Mais uma vez observa-se um comportamento semelhante entre as amostras adicionadas de *Lactobacillus spp.* após sete dias de armazenamento, o que sugere uma maior padronização das características físico-químicas desses pães em comparação ao controle.

O volume específico é uma medida utilizada para verificar a capacidade da farinha em reter o gás no interior da massa e consequentemente proporcionar o crescimento dos pães. Durante o período de armazenamento os valores das amostras variaram de $3,46 \pm 0,01$ - $2,44 \pm 0,02$ mL.g⁻¹. As amostras, comercial e 129 apresentaram, em média, durante o tempo de armazenamento, os menores valores se comparado as demais, já as amostras controle, 56 e 139 não tiveram variação estática durante o tempo 0 e 1. Constata-se no tempo 7 uma redução nos valores de volume específico para todas as amostras, com exceção da 56 e da comercial que possui valores maiores que os encontrados durante o tempo 0 e 1. Em seu estudo tanto para a amostra produzidas com *L. paracasei* quanto para a controle, Mantzourani et al., (2019), encontrou valores que variaram de 2,4 - 2,5 ml/g para volume específico, dados similares ao encontrado na amostra 139 no tempo 7 deste estudo.

4.3.2 Determinação de cor

Os valores de L* indicam a luminosidade da amostra na faixa de 100 (branco) a 0 (preto), o parâmetro a* indica a variação de verde (-a*) a vermelho (+a*), enquanto o parâmetro b* indica a variação de azul (-b*) a amarelo (+b*).

A Tabela 6 apresenta os valores encontrados para determinação de cor para os parâmetros L*, a* e b*, durante o período de armazenamento. Os valores das amostras variaram de $63,92 \pm 1,21$ a $68,82 \pm 1,19$ para o parâmetro L*, de $-1,25 \pm 0,04$ a $-0,62 \pm 0,04$ para o parâmetro a* e de $12,35 \pm 0,04$ a $15,41 \pm 1,27$ para o parâmetro b*.

Durante a avaliação das características de cor do miolo das amostras, a variação na luminosidade (L*) diminui nas amostras controle e 139 durante os dias de armazenamento, o que configura um escurecimento ocorrido no miolo, as amostras comercial, 56 e 129 se mantiveram iguais ($p > 0,05$) durante todos os tempos, se comparadas entre si e entre as amostras portanto, não houve diferenças significativas da luminosidade do miolo nessas amostras, nesse caso, a adição das cepas de *Lactobacillus spp.*, não influenciou nos parâmetros de L* das amostras 56 e 129. Ventimiglia et al (2015) em seu estudo, obteve maiores valores de L* no miolo de pães elaborados com cepas de *Lactobacillus spp*, que variaram de $70,75 \pm 0,89$ – $74,68 \pm 0,67$.

Tabela 6 – Valores médios $\pm$ desvio padrão para determinação de Cor (L^* a^* b^*) em pães elaborados com cepas de *Lactobacillus spp.*, sem adição de BAL e com fermento comercial durante período de armazenamento de 7 dias.

Tempo (dias)		Análise de Cor – Pão				
		Controle	Comercial	56	129	139
1	L^*	68,21 ^{Aa} ($\pm 0,83$)	68,82 ^{Aa} ($\pm 1,19$)	63,33 ^{Ba} ($\pm 0,32$)	66,16 ^{Aa} ($\pm 1,01$)	67,12 ^{Aa} ($\pm 1,44$)
3		63,54 ^{Bb} ($\pm 0,25$)	68,48 ^{Aa} ($\pm 1,14$)	63,92 ^{Ca} ($\pm 1,21$)	62,30 ^{Ba} ($\pm 2,47$)	62,84 ^{Bb} ($\pm 0,91$)
7		62,23 ^{Ab} ($\pm 2,33$)	66,05 ^{Aa} ($\pm 1,21$)	63,58 ^{Aa} ($\pm 1,49$)	62,36 ^{Aa} ($\pm 1,26$)	63,51 ^{Ab} ($\pm 1,03$)
1	a^*	-1,16 ^{Ca} ($\pm 0,06$)	-1,82 ^{Ba} ($\pm 0,06$)	-0,88 ^{Ab} ($\pm 0,08$)	-1,22 ^{Ca} ($\pm 0,02$)	-1,25 ^{Ca} ($\pm 0,04$)
3		-0,68 ^{Bb} ($\pm 0,07$)	-1,43 ^{Ab} ($\pm 0,01$)	-0,76 ^{Bb} ($\pm 0,14$)	-1,00 ^{Cb} ($\pm 0,08$)	-0,65 ^{Bc} ($\pm 0,03$)
7		-0,58 ^{Bb} ($\pm 0,07$)	-1,36 ^{Ab} ($\pm 0,06$)	-1,08 ^{Ca} ($\pm 0,00$)	-0,62 ^{Bc} ($\pm 0,04$)	-1,08 ^{Cb} ($\pm 0,07$)
1	b^*	14,23 ^{Aa} ($\pm 0,08$)	14,75 ^{Aa} ($\pm 0,29$)	12,35 ^{BCb} ($\pm 0,04$)	12,55 ^{BCb} ($\pm 0,52$)	12,76 ^{Cb} ($\pm 0,35$)
3		14,16 ^{Aa} ($\pm 0,26$)	14,05 ^{Aab} ($\pm 0,15$)	14,29 ^{Aa} ($\pm 0,36$)	13,43 ^{Aab} ($\pm 0,96$)	14,78 ^{Aa} ($\pm 0,38$)
7		15,41 ^{Aa} ($\pm 1,27$)	13,46 ^{Ab} ($\pm 0,63$)	14,09 ^{Aa} ($\pm 0,50$)	15,16 ^{Aa} ($\pm 0,54$)	13,88 ^{Aab} ($\pm 0,82$)

^{a-c} Em uma coluna, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{A-C} Em uma linha, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

A variação no parâmetro a^* é negativa para todas as amostras, nesse sentido, as amostras de miolo tenderam a tons mais escuros. Nas amostras controle, comercial, 129 e 139 há um aumento no decorrer dos tempos 1- 7, enquanto na 56 há uma diminuição nesse mesmo período. No tempo 1 os valores encontrados para os miolos dos pães, controle, 129 e 139 são iguais ($p > 0,05$), enquanto que no mesmo período comercial e 56 diferem ($p < 0,05$) entre si e com as demais amostras. No tempo sete a amostra comercial difere-se ($p < 0,05$) de toda as outras amostras, os valores para os miolos dos pães controle e 129 são iguais ($p < 0,05$) estatisticamente, assim como, para os miolos dos pães 56 e 139. Esteller (2007) afirma que a cor juntamente com a textura e aroma são importantes características em produtos de panificação, contribuindo para a preferência do consumidor.

A variação no parâmetro b^* é positiva para todas as amostras. Na amostra controle não há variação no decorrer dos dias (1-7), enquanto diminui na amostra comercial e aumenta na 56 e 129. No tempo 1 controle e comercial são iguais ($p > 0,05$) entre si e 56 e 129 também, enquanto 139 difere ($p < 0,05$) da amostra controle e comercial. Nos tempos três e sete dias todas as amostras são iguais ($p > 0,05$) entre si. De maneira geral, a adição das cepas não parece ter influência nos parâmetros de cor avaliados.

4.3.3 Determinação de textura

A Tabela 7 apresenta os valores encontrados para análise de textura do miolo para os parâmetros de dureza (D), elasticidade (E) e mastigabilidade (M), durante o período de armazenamento dos pães. Os valores das amostras variaram de $2,21 \pm 0,65$ - $53,11 \pm 11,25$ N para o parâmetro D, de $0,250 \pm 0,00$ - $0,550 \pm 0,01$ para o parâmetro E e de $1,72 \pm 0,57$ - $32,83 \pm 4,84$ N para o parâmetro M.

Tabela 7 – Valores médios $\pm$ desvio padrão para determinação de textura nos parâmetros Dureza (D), Elasticidade (E) e Mastigabilidade (M) em pães elaborados com cepas de *Lactobacillus spp.*, sem adição de BAL e com fermento comercial durante período de armazenamento de 7 dias

Tempo (dias)		Análise de Textura – Pão				
		Controle	Comercial	56	129	139
1	D (N)	$2,85^{Ac}$ ($\pm 0,12$)	$3,88^{Ab}$ ($\pm 0,15$)	$2,21^{Bb}$ ($\pm 0,65$)	$2,42^{Bc}$ ($\pm 0,01$)	$3,07^{Abc}$ ($\pm 0,34$)
3		$21,09^{Ba}$ ($\pm 2,09$)	$8,09^{Cb}$ ($\pm 0,68$)	$18,77^{Bb}$ ($\pm 0,44$)	$16,17^{Bb}$ ($\pm 1,03$)	$31,91^{Aa}$ ($\pm 3,44$)
7		$8,37^{BCb}$ ($\pm 0,60$)	$53,11^{Aa}$ ($\pm 11,25$)	$24,82^{Ba}$ ($\pm 1,02$)	$40,18^{ABa}$ ($\pm 4,95$)	$27,40^{BCab}$ ($\pm 1,10$)
1	E	$0,510^{Aba}$ ($\pm 0,00$)	$0,550^{Aa}$ ($\pm 0,01$)	$0,450^{Ba}$ ($\pm 0,03$)	$0,510^{ABa}$ ($\pm 0,02$)	$0,515^{ABa}$ ($\pm 0,00$)
3		$0,360^{Ab}$ ($\pm 0,02$)	$0,250^{Bc}$ ($\pm 0,00$)	$0,365^{Aab}$ ($\pm 0,02$)	$0,330^{Aab}$ ($\pm 0,01$)	$0,320^{Ab}$ ($\pm 0,00$)
7		$0,275^{Ab}$ ($\pm 0,02$)	$0,300^{Ab}$ ($\pm 0,01$)	$0,280^{Ab}$ ($\pm 0,02$)	$0,315^{Ab}$ ($\pm 0,02$)	$0,260^{Ac}$ ($\pm 0,00$)
1	M (N)	$2,38^{Abb}$ ($\pm 0,00$)	$3,19^{Ab}$ ($\pm 0,04$)	$1,72^{Bb}$ ($\pm 0,57$)	$1,93^{Bc}$ ($\pm 0,06$)	$2,34^{ABb}$ ($\pm 0,06$)
3		$13,35^{ABa}$ ($\pm 1,33$)	$4,01^{Cb}$ ($\pm 0,16$)	$12,13^{ABa}$ ($\pm 0,88$)	$9,34^{Bb}$ ($\pm 0,78$)	$17,39^{Aa}$ ($\pm 2,50$)
7		$4,31^{Db}$ ($\pm 0,28$)	$32,83^{Aa}$ ($\pm 4,84$)	$13,94^{CDa}$ ($\pm 1,32$)	$25,93^{ABa}$ ($\pm 1,85$)	$14,03^{Ca}$ ($\pm 0,59$)

^{a-c} Em uma coluna, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{A-D} Em uma linha, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

A dureza das amostras de pão foi medida nos dias 1, 3 e 7, no tempo 1 todas as amostras demonstraram ser macias. Os miolos das amostras controle, comercial e 139 possui valores ($p > 0,05$) estaticamente iguais no tempo 1, ao terceiro dia de armazenamento, ambas as amostras demonstram nos resultados uma maior dureza, sendo as amostras controle e 139 as de maiores valores. Ao sétimo dia, a amostra controle é igual ($p > 0,05$) a 56, 129 e 139, enquanto que a amostra comercial é estatisticamente igual ($p > 0,05$) a 129. Ventimiglia et al., (2015) encontrou valores de dureza em pães elaborados com fermento natural inoculado com cepas de

Lactobacillus e encontrou valores de dureza que variaram de $11,58 \pm 0,02$ a $43,31 \pm 0,24$ N, valores semelhantes ao encontrado nesse estudo.

Quanto ao atributo elasticidade, todas amostras são mais elásticas no primeiro dia e menos elásticas no sétimo dia, exceto a amostra comercial que é menos elástica no terceiro dia. No primeiro dia os tratamentos controle, 129 e 139 são iguais entre si ($p > 0,05$) e no terceiro dia apenas a comercial difere ($p < 0,05$) das demais. No sétimo dia não há diferença entre os tratamentos. Nas amostras de pães feitas a partir do fermento natural inoculado de cepas de *Lactobacillus spp.*, a dureza estava intimamente ligada a elasticidade, este resultado está de acordo com vários estudos relatados por Di Monaco et al, 2015).

Em relação a mastigabilidade em todos tratamentos observa-se os menores valores no primeiro dia e os maiores nos tratamentos comercial, 56, 129 e 139 no sétimo dia, exceto controle que tem maior valor no terceiro dia, comportamento que se confirma pela dureza.

A análise de dureza, elasticidade e mastigabilidade são importantes para prever e controlar a textura do pão (PEGA et al, 2017). De maneira geral, após sete dias de armazenamento observa-se maior dureza e mastigabilidade e menor elasticidade para todas as amostras, decorrente da perda de umidade, retrogradação do amido e envelhecimento do pão.

4.4 ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA

A seguir são apresentados os dados dos resultados da análise sensorial descritiva realizada com os pães testados. Os valores médio para os atributos utilizados na ADQ podem ser visualizados na Tabela 8 e em formato de gráfico radar na Figura 7.

Tabela 8 - Parâmetros da análise sensorial descritiva (ADQ). Valores médios $\pm$ desvio padrão para amostras de pão inoculadas (56, 129 e 139) ou não (C) com cepas de *Lactobacillus spp.*

Atributos	Amostras			
	C	56	129	139
Alvéolos	$3,22 \pm 2,08^{AB}$	$3,38 \pm 2,27^A$	$2,98 \pm 2,42^{BC}$	$1,90 \pm 2,10^C$
Cor casca	$4,60 \pm 2,09^{AB}$	$5,00 \pm 1,54^{AB}$	$4,41 \pm 1,37^B$	$6,00 \pm 1,29^A$
Cor miolo	$2,68 \pm 1,53^{AB}$	$3,10 \pm 1,44^{AB}$	$2,24 \pm 1,26^B$	$3,40 \pm 1,97^A$
Aroma amanteigado	$1,73 \pm 2,30^B$	$2,32 \pm 2,24^{AB}$	$2,63 \pm 2,38^A$	$1,77 \pm 2,06^{AB}$
Aroma frutado	$1,64 \pm 2,06^{AB}$	$1,81 \pm 2,02^{AB}$	$1,46 \pm 1,78^B$	$2,51 \pm 2,09^A$
Sabor ácido	$2,34 \pm 1,89^A$	$1,00 \pm 0,64^B$	$1,17 \pm 1,79^{AB}$	$1,56 \pm 2,12^{AB}$
Sabor fermentado	$3,23 \pm 1,17^A$	$1,86 \pm 1,73^B$	$2,37 \pm 1,75^{AB}$	$2,00 \pm 2,02^{AB}$
Dureza	$4,07 \pm 1,98^{AB}$	$3,80 \pm 1,33^{AB}$	$2,82 \pm 1,61^B$	$4,42 \pm 1,24^A$
Elasticidade	$4,69 \pm 2,50^{AB}$	$6,92 \pm 1,66^{AB}$	$6,47 \pm 2,67^A$	$4,40 \pm 2,23^B$
Maciez	$4,74 \pm 2,27^{AB}$	$6,07 \pm 1,88^{AB}$	$6,39 \pm 1,69^A$	$3,67 \pm 2,57^B$

^{A-C} Em uma linha, médias seguidas de letras desiguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

Para o atributo alvéolos as amostras C e 56 obtiveram os maiores valores, dado semelhante ao relatado no estudo de Yildirim e Arici (2019) para a amostra EH4 de fermentação espontânea assim como a C deste estudo, a amostra 139 obteve a menor avaliação, enquanto que a amostra 129 é estatisticamente ($p < 0,05$) semelhante a C e a 139.

Com relação a cor, provavelmente por alguma diferença de forneamento a amostra de pão 139 obteve o maior valor entre as demais, embora estatisticamente ($p < 0,05$) seja

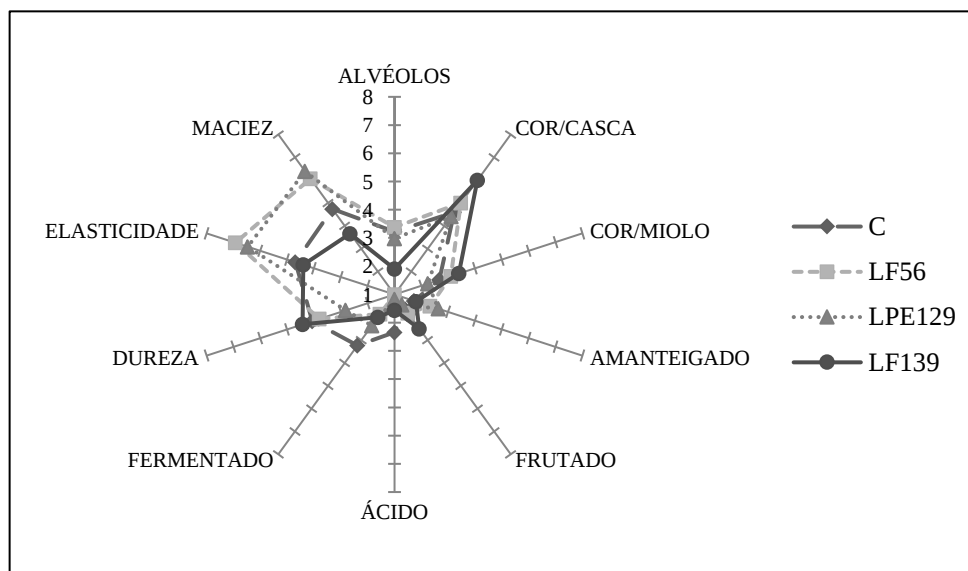
semelhante aos valores das amostras C e 56, o mesmo dado foi encontrado para a cor do miolo das amostras, onde, sabe-se que pela literatura muitas pesquisas identificam um miolo menos oxidado se comparado a um pão tradicional, graça a ação de microrganismos na fermentação longa. Yildirim e Arici (2019) durante a avaliação sensorial dos pães inoculados ou não com BAL e leveduras obteve valores para cor da casca que variaram de $4,88 \pm 0,86$ a $5,75 \pm 1,21$ valores que se aproximam dos encontrados para a amostra 56 e 139 deste estudo, já para cor do miolo, os valores encontrados por Yildirim e Arici (2019) variaram de $4,88 \pm 0,82$ a $5,88 \pm 0,62$, valores que diferem dos encontrados nesse estudo.

O aroma amanteigado foi mais pronunciado nas amostras 56 e 129, sendo a 56 estaticamente semelhante as amostras C e 139. Quanto ao aroma frutado nota-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras C, 56 e 139, sendo esta última a que apresentou o maior valor entre as demais, talvez alguma característica da cepa inocula tenha potencializado essa diferença. Uma hipótese levantada por Clément et al. (2018), é a de que a microbiota do fermento e as características da farinha podem influenciar no produto final, em seus resultados, foi identificado que o odor e o sabor azedo foram hipoteticamente afetados por essas variáveis.

Entre as inoculadas, com relação ao sabor ácido, elas são estatisticamente semelhantes entre si, embora a C tenha obtido um valor maior, estaticamente ($p < 0,05$) é semelhante com as amostras 129 e 139. O sabor ácido identificado na amostra C justifica a caracterização físico-química e microbiológica do fermento, que se diferencia pela microbiota selvagem tanto em BAL quanto em leveduras, por consequência conseguem acidificar por mais tempo o fermento o que reflete na maior percepção do sabor ácido no pão. O sabor fermentado também foi mais identificado na amostra C, com valor que se assemelha estatisticamente ao encontrado nas amostras 129 e 139, a 56 obteve a menor pontuação nesse parâmetro.

Ao observar os parâmetros de textura (dureza, elasticidade e maciez) observa-se que as amostras inoculas com *Lactobacillus spp.* ficaram menos duras (129), com maior elasticidade (56) e com maior maciez (56), mesmo que estatisticamente ($p < 0,05$) a amostra C seja semelhante com as demais nesses mesmos parâmetros. Em seu estudo A. Abedfar et al. (2019) concorda ao afirmar que a produção EPS pelas BAL afeta positivamente a percepção da textura nos pães elaborados com fermento natural, informação que corrobora com o resultado da ADQ neste estudo ao se confirmar através da avaliação dos painelistas que as amostras elaboradas com cepas de *Lactobacillus spp.* influenciam positivamente na textura do pão.

Figura 7 – Resultados médio para avaliação descritiva quantitativa em pães elaborados com cepas de *Lactobacillus spp.* e sem adição de BAL. C: microbiota selvagem; 56 (LF56): *Lactobacillus fermentum*; 129 (LPE129): *Lactobacillus pentosus*; 139 (LF139): *Lactobacillus fermentum*.



Fonte: Dados da pesquisa

5 CONCLUSÃO

- Dentre as cepas selecionadas as cepas Lf 56; Lpe 129 e Lf 139 apresentaram melhor desempenho para utilização na fermentação natural de pães;
- No geral, a utilização de cepas de *Lactobacillus* spp. influenciou as características microbiológicas e físico-químicas do fermento natural e dos pães.
- Todas as cepas testadas promoveram estabilização (maturidade) do fermento entre o nono e o décimo dia da sua propagação;
- Dentre as cepas testadas, a Lpe 129 e Lf 139 apresentaram melhores resultados quanto à inibição do aparecimento de fungos filamentosos deterioradores após sete dias de armazenamento;
- Com relação ao teste sensorial, observou-se que nos pães elaborados com as BAL a acidez característica nestes microrganismos, identificada nos testes microbiológicos e físico-químicos não foi notada durante a análise sensorial. No entanto, as amostras adicionadas de BAL obtiveram os maiores valores no quesito textura, e que valida com os dados encontrados neste estudo, considerando que a BAL são produtoras de EPS, algo de extrema importância neste tipo de pão;
- No futuro, estudos investigando o potencial antimicrobiano das cepas Lpe 129 e Lf 139 frente a fungos deterioradores de produtos de panificação poderão ser estudados.

REFERÊNCIAS

- ABEDFAR, A.; HOSSEININEZHAD, M.; CORSETTI, A. Effect of wheat bran sourdough with exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* (NR_104573.1) on quality of pan bread during shelf life, **LWT**, v. 111, p. 158-166. 2019.
- ALBUQUERQUE, T. M. R DE; GARCIA, E. F; ARAÚJO, A. O DE; MAGNANI, M; SAARELA; SOUZA, E. L. DE. In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10 p. 704-716, 2017.
- ALFONZO. A.; VENTIMIGLIA; G.; CORONA. O.; GERLANDO. R. DI.; GAGLIO. R.; FRANCESCA. N.; MOSCHETTI. G.; SETTANNI. L. Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours, **Food Microbiology**, v. 36 p. 343-354, 2013.
- ANVISA, Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2000.
- APLEVICZ, K. S. **Identificação de bactérias lácticas e leveduras em fermento natural obtido a partir de uva e sua aplicação em pães**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2013.
- ARENDT, E.K.; RYAN, L.A.M.; BELLO, F.D. Impact of sourdough on the texture of bread. **Food Microbiology**, v.24, p.165-174, 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis of Official Methods of Analysis of the Associations of Official Analytical Chemist**. Method No. 932.12, Method, No. 981.12, Method No. 942.15. 20th ed. AOAC International, Washington. 2016.
- BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P.; GÄNZLE, M. G. Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus san franciscensis* and *Candida humilis* duringrye sourdough fermentation. **Eur Food Res Technol**, v.218, p.333-338, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde Agência. Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA, RESOLUÇÃO-RDC Nº 263, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005**.
- CALLEJO, M.J. Present situation on the descriptive sensory analysis of bread. **Journal of Sensory Studies**, 26: 255-268. 2011.
- CAUVAIN, S. P. Bread: Breadmaking Processes. Encyclopedia of Food and Health, **Academic Press**, p. 478-483, 2016.
- CLÉMENT, H.; PROST, C.; CHIRON, H.; DUCASSE, M. B.; VALLE, G. D.; COURCOUX, P.; ONNO, B. The effect of organic wheat flour by-products on sourdough performances assessed by a multi-criteria approach. **Food Research International**, v.106, p. 974-981. 2018.
- CODA, R.; CAGNO, R. DI.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G. Sourdough lactic acid bacteria: Exploration of non-wheat cereal-based fermentation. **Food Microbiology**, v. 37, p. 51-58, 2014.

CORSETTI, A., SETTANNI, L. Lactobacilli in sourdough fermentation: a review. **Food Res. Int.** v. 40, p. 539-558, 2007.

DE VUYST, L.; VAN KERREBROECK, S.; HARTH, H.; HUYS, G.; DANIEL, H.-M.; WECKX, S. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform?. **Food Microbiology**, v.37, p.11–29, 2014.

DI MONACO, R.; TORRIERI, E.; PEPE, O. Effect of Sourdough with Exopolysaccharide (EPS)-Producing Lactic Acid Bacteria (LAB) on Sensory Quality of Bread during Shelf Life. **Food Bioprocess Technol.** 2015.

ESTELLER, M. S. **Modificações estruturais de produtos panificados por processos de tratamentos térmico e bioquímico.** 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.

GARCIA, E. F.; ARAÚJO, A. DE O.; LUCIANO, W. A.; DE ALBUQUERQUE, T. M. R.; DE ARCANJO, N. M. DE O.; MADRUGA, M. S.; LIMA, M. DOS S.; MAGNANI, M.; SAARELA, M.; DE SOUZA, E. L. The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic Lactobacillus strains in apple, orange and grape juices. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 98 p. 5000-5010, 2018.

GARCIA, E. F.; LUCIANO, W. A.; XAVIER, D. E.; DA COSTA, W. C. A.; OLIVEIRA, K. DE S.; FRANCO, O. L.; JÚNIOR, M. A. DE M.; LUCENA, B. T. L.; PICÃO, R. C.; MAGNANI, M.; SAARELA, M.; DE SOUZA, E. L. Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected Lactobacillus Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-11, 2016.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; PONTONIO, E.; DI CAGNO, R.; ANGELIS, M. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 3–18, 2016.

HADAEGH, H.; ARDABILI, S. M. S.; EBRAHIMI, M. T.; CHAMANI, M.; NEZHAD, R. A. The Impact of Different Lactic Acid Bacteria Sourdoughs on the Quality Characteristics of Toast Bread. **Journal of Food Quality**, 2017.

JONKUVIENĖ, D.; VAIČIULYTĖ-FUNK, L.; ŠALOMSKIENĖ, J.; GALENČIKIENĖ, A. M. Spontaneous Sourdough *L. reuteri* as Bread Starter Additive, **Food Technol. Biotechnol.**, v. 54 p. 342-350, 2016.

LIU, A.; JIA, Y.; ZHAO, L.; GAO, Y.; LIU, G.; CHEN, Y.; ZHAO, G.; XU, L.; SHEN, L.; LIU, Y.; CHEN, H.; WU, W.; LI, C.; LIU, S. Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics, **LWT**, v. 95, p. 17-22, 2018.

LYNCH, K. M.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products, **Food Research International**, v. 110, p. 52-61, 2017.

MANTZOURANI, I.; PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; GALANIS, A.; BEZIRTZOGLU, E.; BEKATOROU, A., Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. **Food Chemistry**, v. 271, p. 259–265, 2019.

MARTINBIANCO, F.; MARTINS, A. R.; RECH, R.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Avaliação sensorial de pães de fermentação natural a partir de culturas *starters* inovadoras. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 43, n. 9, p. 1701-1706, 2013.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. *Sensory evaluation techniques*. 3th ed. **Boca Raton**. 1999.

MINERVINI, F.; ANGELIS, M. DE.; CAGNO, R. DI.; PINTO, D.; SIRAGUSA, S.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. **Food Microbiology**, v. 27, p. 897-908. 2010.

MINERVINI, F.; CELANO, G.; LATTANZI, A.; ANGELIS, M. DE.; GOBBETTI, M. Added ingredients affect the microbiota and biochemical characteristics of durum wheat type-I sourdough, **Food Microbiology**, v. 60, p. 112-123. 2016.

MORONI, A. V.; BELLO, F. D.; ARENDT, E. K. Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue?, **Food Microbiology**, v. 26, p. 676-684, 2009.

NOGUEIRA, A. DE C. Utilização de massa ácida desidratada para redução de sódio em pão tipo francês. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Campinas, SP. 2015.

PEGA, B.; LIB, Y.; DING, S.; YANG, J. Characterization of textural, rheological, thermal, microstructural, and water mobility in wheat flour dough and bread affected by trehalose. **Food Chemistry**, v. 233, p. 369-377, 2017.

POUTANEN, K.; FLANDER, L.; KATINA, K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. **Food Microbiology**, v.26, p.693–699, 2009.

RANDAZZO, C.; HEILIG, H.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P.; CAGGIA, C. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 251-258, 2005.

REALE, A.; RENZO, T. DI.; ZOTTA, T.; PREZIUSO, M.; BOSCAINO, F.; IANNIELLO, R.; STORTI, L. V.; TREMONTE, COPPOLA, R. Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation, **LWT**, v. 73, p. 622-629, 2016.

REHMAN, S.U.; NAWAZ, H.; HUSSAIN, S.; AHMAD, M.M.; MURTAZA, M.; AHMAD, M.S. Effect of sourdough bacteria on the quality and shelf life of bread. **Pak. J. Nutr**, v. 6, p. 562-565, 2007.

ROSSELL, C. M. Bread: Chemistry of Baking. **Encyclopedia of Food and Health**. 2016.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A. **Métodos de Análise Microbiológica de alimentos e água**. 4ª edição. São Paulo: Varela, 2010.

STEFANELLO, R. **Produção de panetone utilizando bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de fermento natural liofilizado**. 2018. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2018.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. San Diego: Academic Press, 1993.

THIELE, C.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Contribution of Sourdough Lactobacilli, Yeast, and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for Bread Flavor. **Cereal Chemistry**, v. 79 p. 45-51, 2002.

THIELE, C.; GRASSL, S.; GÄNZLE, M. G. Gluten Hydrolysis and Depolymerization during Sourdough Fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52 p. 1307-1314, 2004.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. DE. M. Lactobacillus Plantarum: Characterization of the Species and Application in Food Production. **Food Reviews International**, p. 205-229, 2010.

TOLEDO, N. M. V. **Aproveitamento de subprodutos da industrialização do maracujá para elaboração de iogurte**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

VAN DER MEULEN, R.; SCHEIRLINCK, I.; VAN SCHOOR, A.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L. Population dynamics and metabolite target analysis during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. **Appl. Environ. Microbiol.** v.73, p.4741–4750, 2007.

VENTIMIGLIA, G.; ALFONZO, A.; GALLUZZO, P.; CORONA, O.; FRANCESCA, N.; CARACAPPA, S.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Codominance of Lactobacillus plantarum and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation, **Food Microbiology**, v. 51, p. 57-68, 2015.

VERMELHO, A. B; MEIRELLES, M. N. L.; LOPES, A.; PETINATE, S D. G.; CHAIA, A. A.; BRANQUINHA, M. H. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 91, n. 6, p. 755-760. 1996 .

VOGEL, R. F.; EHRMANN, M. A.; GÄNZLE, M. G. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 81 p. 631–638, 2002

WECKX, S.; VAN DER MEULEN, R.; MAES, D.; SCHEIRLINCK, I.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L.; HUYS, G. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. **Food Microbiology**, v.27, p.1000–1008, 2010a.

WECKX, S.; VAN DERMEULEN, R.; ALLEMEERSCH, J.; HUYS, G.; VANDAMME, P.; VAN HUMMELEN, P.; DE VUYST, L. Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their transcriptome. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 76, p. 5402–5408, 2010b.

YILDIRIM, R. M.; ARICI, M. Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread, **LWT**, v. 112. 2019.

ZHANG, L.; TAAL, M. A.; BOOM, R. M.; CHEN, X. D.; SCHUTYSER, M. A. I. Effect of baking conditions and storage on the viability of Lactobacillus plantarum supplemented to bread, **LWT**, v. 87, p. 318-325, 2018.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL DEPARTAMENTO DE GASTRONOMIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre: **Seleção, caracterização e avaliação de cepas de *Lactobacillus* spp. como cultivo iniciador na elaboração de fermentos e pães**, elaborado para o TCC do discente Joanderson Gama Santos sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Estefânia Fernandes Garcia. A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba sob número de protocolo: **56337916.2.0000.5188**

O objetivo do estudo é desenvolver pães inoculados ou não com *Lactobacillus* spp. selecionados e avaliar sua influência nas características físico-químicas e sensoriais. Solicitamos a sua colaboração para preenchimento dos formulários de teste descritivo quantitativo (ADQ) das amostras, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e gastronomia, e em revistas científicas. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos ainda que essa pesquisa não oferece riscos previsíveis para a sua saúde.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa	Assinatura do Pesquisador
--	---------------------------

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor entrar em contato com o pesquisador Joanderson Gama Santos através do telefone: (83) 99611-7942 e/ou e-mail: joanderson.gama@gmail.com.

APÊNDICE B – FICHAS DE AVALIAÇÃO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL
DEPARTAMENTO DE GASTRONOMIA**

TESTE TRIANGULAR

Nome _____

Você está recebendo 3 amostras codificadas de refrigerante sabor guaraná, sendo duas iguais e uma diferente. Espere 30 segundos entre as amostras, prove a bolacha e enxágue a boca com água entre cada avaliação. CIRCULE O NÚMERO DA AMOSTRA QUE VOCÊ JULGA DIFERENTE DAS DEMAIS.

COMENTÁRIO:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL
DEPARTAMENTO DE GASTRONOMIA**

DETECÇÃO DE GOSTOS BÁSICOS

Nome _____

Você está recebendo quatro amostras correspondentes aos diferentes gostos básicos (doce, ácido, amargo e umami). Anote na sua ficha o código da primeira amostra a ser avaliada. Prove a amostra e escreva qual gosto básico se refere. Espere 30 segundos entre as amostras, prove a bolacha e enxágue a boca com água entre cada avaliação.

CÓDIGO DA AMOSTRA	SABOR

APÊNDICE C – DESCRITORES

Atributo	Definição	Referência
APARÊNCIA		
Alvéolos	Presença ou não de alvéolos (bolhas) na amostra	Fraco: pão de forma Forte: pão de fermentação natural
Cor da casca	Grau de coloração expresso na superfície do pão variando de amarelo-claro a marrom-escuro	Fraco: casca de pão francês Forte: casca de pão de forma/doce
Cor do miolo	Grau de coloração da parte interna do pão (miolo) variando de branco a marrom-escuro	Fraco: pão de forma Forte: pão de fermentação natural
AROMA		
Amanteigado	Aroma que remete a leve semelhança a manteiga	Fraco: torrada tradicional Forte: torrada amanteigada
Fermentado	Aroma característico de pão feito com fermento natural	Fraco: fermento natural diluído Forte: fermento natural
Frutado	Aroma que remete a frutas (banana...)	Fraco: fermento natural diluído Forte: fermento natural
Tostado	Aroma característico associado ao grão de trigo que foi tostado	Fraco: pão de forma Forte: pão de fermentação natural
SABOR		
Ácido	Percepção e intensidade do sabor ácido a partir da mastigação da amostra	Fraco: suco de limão diluído Forte: suco de limão integral
Adstringente	Sensação causada pela redução da lubrificação na cavidade oral, geralmente associada aos taninos	Fraco: suco de uva/maça diluído Forte: suco de uva/maça integral
Fermentado	Percepção de sabor que corresponde a pão elaborado com fermento natural	Fraco: pão de forma Forte: pão de fermentação natural
Salgado	Percepção do sabor salgado a partir da mastigação da amostra	Fraco: pão sem sal Forte: pão com sal
TEXTURA		
Adesividade	Grau em que a amostra adere ao paladar durante a mastigação	Fraco: pão de fermentação natural Forte: pão de forma
Dureza	Força necessária empregada pelos dentes ao morder a amostra	Fraco: pão de forma Forte: pão dormido
Elasticidade	Força utilizada entre os dedos polegar e indicador ao comprimir a amostra com imediata liberação	Fraco: pão dormido Forte: pão de forma
Maciez	Sensação ao tocar/pressionar a amostra com os dedos	Fraco: pão dormido Forte: pão de forma
Mastigabilidade	Número de mastigações necessárias antes de engolir a amostra	Fraco: torrada Forte: pão de fermentação natural

APÊNDICE D – FICHA DE AVALIAÇÃO (ADQ)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
TESTE DESCRITIVO-QUANTITATIVO- PERFIL DE CARACTERÍSTICAS

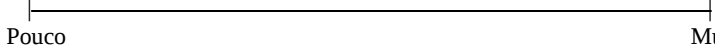
NOME: _____ DATA: _____

GÊNERO: F() M() IDADE: _____ ESCOLARIDADE: _____

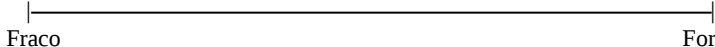
1. Você está recebendo 01 amostra codificada de pão de **FERMENTAÇÃO NATURAL**. Por favor, avalie as características sensoriais do produto. Indique a intensidade de cada atributo sensorial com um traço vertical na escala. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.

AMOSTRA: _____

APARÊNCIA

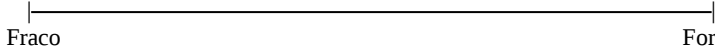
Alvéolos  Pouco Muito

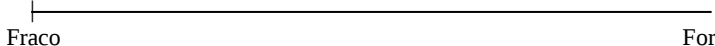
COR

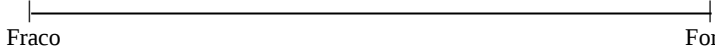
Cor da casca  Fraco Forte

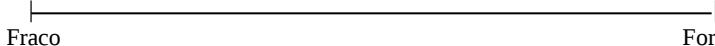
Cor do miolo  Fraco Forte

AROMA

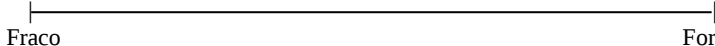
Amanteigado  Fraco Forte

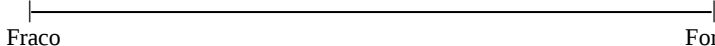
Fermentado  Fraco Forte

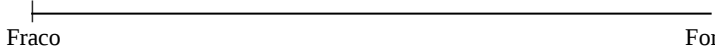
Frutado  Fraco Forte

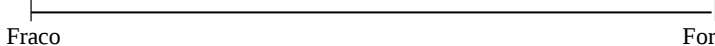
Tostado  Fraco Forte

SABOR

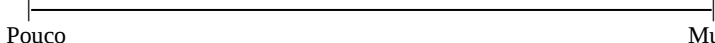
Ácido  Fraco Forte

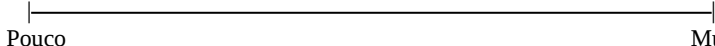
Adstringente  Fraco Forte

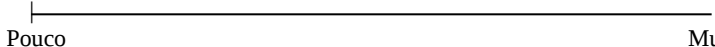
Fermentado  Fraco Forte

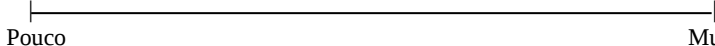
Salgado  Fraco Forte

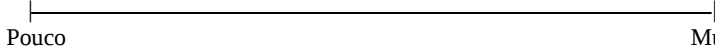
TEXTURA

Dureza  Pouco Muito

Elasticidade  Pouco Muito

Adesividade  Pouco Muito

Mastigabilidade  Pouco Muito

Maciez  Pouco Muito