



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

TATIANA ZANELLA RODRIGUES

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL
INOCULADOS COM *Companilactobacillus paralimentarius* 41, *Lactiplantibacillus*
plantarum 47 E *Levilactobacillus brevis* 83**

João Pessoa

2025

TATIANA ZANELLA RODRIGUES

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL
INOCULADOS COM *Companilactobacillus paralimentarius* 41, *Lactiplantibacillus*
plantarum 47 E *Levilactobacillus brevis* 83**

João Pessoa

2025

TATIANA ZANELLA RODRIGUES

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL
INOCULADOS COM *Companilactobacillus paralimentarius* 41, *Lactiplantibacillus*
plantarum 47 E *Levilactobacillus brevis* 83**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof.^a Dra. Estefânia Fernandes Garcia

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ingrid Conceição Dantas Gonçalves

Área de concentração: Segurança, Qualidade e Funcionalidade de alimentos

João Pessoa

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R696p Rodrigues, Tatiana Zanella.

Propriedades bioativas de pães de fermentação natural inoculados com *Companilactobacillus paralimentarius* 41, *Lactiplantibacillus plantarum* 47 E *Levilactobacillus brevis* 83 / Tatiana Zanella Rodrigues. - João Pessoa, 2025.
109 f. : il.

Orientação: Estefânia Fernandes Garcia.

Coorientação: Ingrid Conceição Dantas Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Panificação - Fermentação natural. 2. Bactérias ácido lácticas. 3. Digestibilidade in vitro. 4. Compostos bioativos. I. Garcia, Estefânia Fernandes. II. Gonçalves, Ingrid Conceição Dantas. III. Título.

UFPB/BC

CDU 664.6(043)

TATIANA ZANELLA RODRIGUES

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DE PÃES DE FERMENTAÇÃO NATURAL
INOCULADOS COM *Companilactobacillus paralimentarius* 41, *Lactiplantibacillus*
plantarum 47 E *Levilactobacillus brevis* 83**

Dissertação APROVADA em 25/02/2025.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
ESTEFANIA FERNANDES GARCIA
Data: 17/03/2025 08:52:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Estefânia Fernandes Garcia
Presidente da Banca Examinadora – Orientadora DG/CTDR/UFPB



Documento assinado digitalmente
INGRID CONCEICAO DANTAS GONCALVES
Data: 20/03/2025 23:47:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Ingrid Conceição Dantas Gonçalves
Examinadora Externa - Coorientadora DG/CTDR/UFPB



Documento assinado digitalmente
MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA
Data: 19/03/2025 18:37:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Examinadora Interna DN/CCS/UFPB



Documento assinado digitalmente

VANESSA BORDIN VIERA

Data: 21/03/2025 14:12:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Vanessa Bordin Viera
Examinadora Externa UAS/CES/UFCG

Prof.^a Dra. Kataryne Árabe Rimá de Oliveira
Examinadora Suplente Interna DN/CCS/UFPB

Prof.^a Dra. Juliana Kessia Barbosa Soares Moreira
Examinadora Suplente Externa DG/CTDR/UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo amor e incentivo aos estudos, desde sempre.

Agradeço as minhas orientadoras, professora Dra. Estêfania Garcia e Dra. Ingrid Dantas, pela disposição, por aceitarem orientar esse trabalho, pelos momentos de aprendizado, pelos incentivos para que eu continuasse o meu caminho, em tempos nublados e em tantos outros de sol! Gratidão.

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba, ao Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), aos docentes, pela contribuição e orientações durante a pesquisa, à Professora Dra. Patrícia Pinheiro e a Professora Dra. Angela Tribuzy, agradeço imensamente.

Agradeço à UFPB/CTDR por prover a infraestrutura, ao apoio técnico, pela disponibilidade, prestatividade, por todos os auxílios, paciência e compreensão ao longo dessa pesquisa que parecia não ter fim! Gratidão a todos (em ordem alfabética): Alline (LabCoZE), Angela (LabOp.Unitárias), Camila (LabSensorial), Cláudia (LabMicro), Hebert (LabOp.Unitárias), Karol (LabMicro), Marcelo (LabPani), Maristela (LabFQ), Polyana (LabCoz I), Rene (LabFQ). São pessoas como vocês que fazem a roda girar, não há palavras que expressem tamanha importância, em todos os níveis, da graduação à Pós. Muitíssimo obrigada!

Agradeço ao Professor Dr. Yuri Manguiera e ao técnico Dr. Evandro Ferreira, do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA-UFPB), pela disponibilidade para com o ensaio-piloto em RMN.

Agradeço ao Professor Dr. Marcos Lima, do Laboratório de Análise de Águas e Bebidas, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, do Instituto Federal do Sertão Pernambucano, pela disponibilidade nos ensaios cromatográficos.

Agradeço ao grupo de pesquisa em panificação, pelos ensinamentos, pela troca de palavras. Compartilhar dúvidas e acertos com vocês é muito gratificante, a aprendizagem é eterna, e espero que assim continue :)

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, por abrir suas portas para a realização da pesquisa e aos docentes que tive a alegria de conhecer e aprender com todos eles. Agradeço ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos, na pessoa do Professor Dr. Evandro Leite e ao Laboratório de Bromatologia e de Técnica Dietética, na pessoa da Professora Dra. Elieidy Gomes, pela infraestrutura concedida. Ainda, ao corpo técnico, pela prestatividade, e em especial ao aluno do PPGCN, doutorando Jaielson Yandro, por sua imensa prestatividade e orientação nos experimentos. Agradeço à doutoranda Natália pela disponibilidade e auxílio, igualmente.

Agradeço aos colegas da turma do PPGCN pela vivência e troca.

Agradeço à banca examinadora, as professoras Dra. Elieidy Gomes e Dra. Vanessa Viera, por aceitarem o convite e pela disposição em partilhar seus conhecimentos e pelas valiosas contribuições. É uma honra aprender com vocês!

Agradeço ao amigo Joanderson, que me apresentou a panificação, e por suas palavras de incentivo na Academia e para a vida. Sem você eu não estaria escrevendo essas linhas. Gratidão!

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa jornada acadêmica.

“Gente não nasce pronta e vai se gastando, gente nasce não pronta, e vai se fazendo. Eu, no ano que estamos, sou a minha mais nova edição (revista, e às vezes, um pouco ampliada); o mais velho de mim (se é o tempo a medida) está no meu passado e não no presente”.

(Mario Sérgio Cortella - Filósofo e Escritor)

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver fermentos naturais e pães inoculados com culturas iniciadoras autóctones, e analisar suas propriedades físico-químicas e funcionais. Três formulações de fermentos naturais e pães inoculados com as espécies *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83) foram produzidos em três tempos de fermentação distintos (2, 3 e 4 h). Uma formulação controle, não inoculada, foi estabelecida. Os fermentos naturais foram avaliados quanto aos parâmetros físico-químicos (pH, acidez total e teor de exopolissacarídeos) e microbiológicos (enumeração de células viáveis). As massas fermentadas foram enumeradas e os pães avaliados quanto ao pH, acidez total, volume específico, digestibilidade das proteínas *in vitro*, índice de hidrólise (HI), glicemia média estimada (eGI), atividade antioxidante, compostos fenólicos e teor de açúcares e ácidos orgânicos. A Análise de Variância Fatorial de medidas repetidas e o teste post hoc de Tukey (5% de significância), a análise multivariada de componentes principais e a correlação de Pearson foram executados. Tanto o fermento natural quanto os pães inoculados apresentaram um pH abaixo de 4,0 e uma acidez entre 8,9 e 9,32 g/100g. As bactérias lácticas apresentaram contagens acima de 8 log UFC/g, enquanto as leveduras se estabeleceram entre 6,60 e 8,48 log UFC/g após a fermentação. O fermento natural inoculado com a espécie Lp47 exibiu a maior produção de exopolissacarídeos (13,80 ± 1,35 g/kg). Um maior volume específico dos pães foi identificado a partir de 3 horas de fermentação (2,41-2,74 cm³/g) para as formulações inoculadas. Pães produzidos com as espécies Lp47 e Lb83 apresentaram um incremento na digestibilidade da proteína *in vitro* às 4 horas de fermentação (99,70% ± 0,01 e 99,30% ± 0,01, respectivamente). O pão inoculado com a espécie Lb83 exibiu a menor glicemia estimada após 3 horas de fermentação (73,78 ± 0,91). Houve aumento da atividade antioxidante dos pães durante a fermentação, com o pão inoculado com a espécie Lb83 expressando o maior teor de compostos fenólicos com 3 horas de fermentação (28.19 mg ± 0.95 EAG/100 g). Todos os pães de fermentação natural apresentaram redução dos açúcares maltose, glicose e frutose após 4 h, e exibiram aumento do níveis de ácido lático durante o período de fermentação. Todas as amostras reduziram seu teor de ácido fórmico entre 2 e 4 h de fermentação. Os achados da pesquisa identificaram uma correlação positiva entre o volume específico dos pães com o teor de compostos fenólicos ($r = 0,66$, $p < 0,05$) e com a acidez ($r = 0,95$, $p < 0,001$). A atividade antioxidante (método DPPH') também demonstrou correlação positiva com o eGI das amostras inoculadas. A análise multivariada PCA correlacionou o caráter de bioatividade e melhor digestibilidade das proteínas e índice glicêmico para os pães adicionados de Lp47 e Lb83. Ambas as culturas são promissoras em fermentos naturais, com o tempo definido de 3 horas de fermentação. Novos estudos devem ser desenvolvidos para auxiliar na compreensão das interações e características tecnológicas das cepas, visando sua aplicação comercial e suas propriedades funcionais relacionadas à saudabilidade e à nutrição.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas; compostos bioativos; digestibilidade *in vitro*; fermentação natural; panificação.

ABSTRACT

This study aimed to develop sourdough, and breads inoculated with autochthonous starter cultures and analyze their physicochemical and functional properties. Three formulations of sourdough, and breads inoculated with *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47), and *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83) were produced at three distinct fermentation times (2, 3, and 4 hours). A non-inoculated control formulation was established. The sourdough were evaluated for physicochemical parameters (pH, total acidity, and exopolysaccharide content) and microbiological parameters (enumeration of viable cells). The fermented doughs were enumerated, and the bread were analyzed for pH, total acidity, specific volume, *in vitro* protein digestibility, hydrolysis index (HI), estimated glycemic index (eGI), antioxidant activity, phenolic compound content, and sugar and organic acid composition. Repeated-measures factorial analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test (5% significance level), principal component analysis (PCA), and Pearson correlation analysis were performed. Both the sourdough, and sourdough bread exhibited a pH below 4.0 and acidity ranging from 8.9 to 9.32 g/100g. Lactic acid bacteria showed counts above 8 log CFU/g, while yeasts ranged between 6.60 and 8.48 log CFU/g in bread dough after fermentation. The sourdough inoculated with Lp47 exhibited the highest exopolysaccharide production (13.80 ± 1.35 g/kg). An increase in loaf specific volume was observed from 3 hours of fermentation bread ($2,41\text{--}2,74$ cm³/g) across all samples. Bread produced with Lp47 and Lb83 showed enhanced *in vitro* protein digestibility at 4 hours of fermentation ($99.70 \pm 0.01\%$ and $99.30 \pm 0.01\%$, respectively). The bread inoculated with Lb83 exhibited the lowest estimated glycemic index after 3 hours of fermentation (73.78 ± 0.91). Antioxidant activity increased during fermentation, with the bread inoculated with Lb83 presenting the highest phenolic compound content at 3 hours of fermentation (28.19 mg GAE/100 g ± 0.95). All sourdough bread exhibited a reduction in maltose, glucose, and fructose levels after 4 hours, along with an increase in lactic acid content throughout fermentation. Additionally, all samples showed a reduction in formic acid content between 2 and 4 hours of fermentation. The findings identified a positive correlation between loaf specific volume, and both phenolic compound content ($r = 0.66$, $p < 0.05$) and total acidity ($r = 0.95$, $p < 0.001$). Antioxidant activity (DPPH[•] method) also demonstrated a positive correlation with the eGI of inoculated samples. PCA analysis associated the bioactive characteristics, improved protein digestibility, and glycemic index with breads inoculated with Lp47 and Lb83. Both strains showed promising potential for sourdough applications, with an optimal fermentation time of 3 hours. Further studies are needed to better understand strain interactions and technological properties, aiming for commercial application and functional benefits related to health and nutrition.

Keywords: Bioactives compounds; Bread; Digestibility *in vitro*; Lactic Acid Bacteria; Sourdough

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Tipos de processos de fermentação em função do microrganismo e das propriedades finais desejadas para panificação.....	24
Figura 2 - Impacto do pão de fermentação natural na indústria de panificação.....	29
Figura 3 - Desenho experimental para elaboração e análise do fermento natural (Tipo II), massa fermentada e pão de fermentação natural.....	39
Figura 4 - Fluxograma da produção dos pães inoculados com Cp41, Lp47, Lb83 e formulação controle (não inculado), e fermentados em diferentes tempos (2, 3 e 4 horas).....	44

FIGURAS DO ARTIGO – APÊNDICE A

Figure 1 - Pão de fermentação natural inoculado com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), e o pão controle (não inoculado), produzidos em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) à 30 ± 0.1 °C.....	88
Figura -S1 (A) Mapa de calor do coeficiente de correlação de Pearson entre pH, acidez total (TA), volume específico, digestibilidade <i>in vitro</i> de proteínas (IVPD), índice glicêmico estimado (eGI), compostos fenólicos totais (TPC) e conteúdo antioxidante (DPPH [•] , ABTS [•] e FRAP). (B) Mapa de calor do coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis açúcar, álcoois, ácidos orgânicos (ácido lático e ácido fórmico) do pão de fermentação natural inoculado (SB) com <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47), <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83) e pão controle (não inoculado). O asterisco (*) denota $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$	109

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELAS E QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1 - Bactérias ácido lácticas heterofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas, homofermentativas, e leveduras encontradas em diferentes tipos de massa fermentada.....	27
Quadro 2 - Propriedades dos gêneros <i>Companilactobacillus</i> sp., <i>Lactiplantibacillus</i> sp., <i>Levilactobacillus</i> sp., e das espécies <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> e <i>Levilactobacillus brevis</i>	28
Tabela 1 - Formulações dos pães inoculados com os isolados <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), e formulação controle (não inoculado), elaboradas em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.....	43
Tabela 2 - Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica com albumina bovina como padrão para determinação da concentração proteica pelo método de Bradford (1976).....	46
Tabela 3 - Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica para a análise da atividade de eliminação do radical livre DPPH [•] , em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).....	49
Tabela 4 - Preparo das amostras para as análises da atividade de eliminação do radical livre DPPH [•] , atividade de captura do radical livre ABTS [•] e potencial antioxidante de redução de ferro FRAP em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).....	49
Tabela 5 - Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica para a atividade sequestradora do radical livre ABTS [•] em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).....	50
Tabela 6 - Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica para a análise do potencial redutor de ferro do radical livre FRAP em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).....	51

Tabela 7 - Dados utilizados para a construção da curva-padrão de ácido gálico para a análise dos compostos fenólicos totais em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).....	53
--	----

TABELAS DO APÊNDICE A - ARTIGO

Tabela 3 - Contagem de células viáveis durante a fermentação do fermento natural (T_0 , T_{24} horas) e na massa de pão (2, 3, 4 horas) inoculada com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), a $30 \pm 0,1$ °C.....	85
Tabela 4 - pH e acidez titulável total do fermento natural e de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), e do pão controle (não inoculado), durante T_0 e T_{24} horas e 2, 3, 4 horas, respectivamente, a $30 \pm 0,1$ °C.....	86
Tabela 5 - Valores de volume específico (cm^3/g) de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), e o pão controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.....	87
Tabela 6 - Digestibilidade da proteína <i>in vitro</i> (IVPD) de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as estirpes <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47), <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83) e o pão de controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.....	89
Tabela 7 - Índice de hidrólise (HI) e índice glicêmico estimado (eGI) de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.....	89
Tabela 8 - Conteúdo de fenólicos totais, atividade de eliminação de radicais DPPH [•] e ABTS [•] , ensaio do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), e o pão	

controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.....	91
Tabela 9 - Perfil de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47), <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83) e o pão controle (não inoculado), preparados com 2 e 4 horas de fermentação ($30 \pm 0,1$ °C).....	93
Tabela S1 - Formulações de fermento natural inoculados com cepas de <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47) e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83), a $30 \pm 0,1$ °C.....	108
Tabela S2 - Formulações de pães inoculados (SB) com as cepas <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> 41 (Cp41), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 (Lp47), <i>Levilactobacillus brevis</i> 83 (Lb83) e o pão controle (não inoculado), preparados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 horas), a $30 \pm 0,1$ °C.....	108

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Equação 1 - Rendimento de massa.....	41
Equação 2 - Volume específico.....	45
Equação 3 - Digestibilidade da proteína <i>in vitro</i>	47
Equação 4 - Índice glicêmico estimado (eGI).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIP	Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate)
AICI	monocloreto de alumínio
ANOVA	analysis of variance
AUC	area under curve
BHA	2,3-tert-butyl-4-hydroxyanisole
ca	circa (latim); aproximadamente (português)
CFT	compostos fenólicos totais
CFU	colony-forming unit
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DNSA	3,5-dinitrosalicylic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
eGI	estimated glycemic index
EAG	equivalente em ácido gálico
EPS	exopolissacarídeo
FODMAPS	fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols
FRAP	ferric reducing ability of plasma
GAE	gallic acid equivalent
HCl	ácido clorídrico
HI	hidrolysis index
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
NaCl	cloreto de sódio
NaNO ₂	nitrito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
OD	optical density
PBS	phosphate buffer solution

pH	potencial hidrogeniônico
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TPC	total phenolic compounds
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroma Ne-2-carboxylic acid
UFC	unidade formadora de colônia
UR	umidade relativa
USDA	United States Department of Agriculture
w/v	weight/volume (peso por volume)

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
%	porcentagem
p/p	peso por peso
N	normalidade
α	alfa
mL	mililitro
v/v	volume por volume
™	trade marketing
°C	grau Celsius
μ g	micrograma
p/v	peso por volume
μ L	microlitro
$\pm$	mais ou menos
h	hora
nm	nanômetro
x g	times gravity (força centrífuga)
rpm	rotação por minuto
g	grama
L	litro
g/L	grama por litro
log	logaritmo
mol/L	mol por litro
g/Kg	grama por quilo
cm ³	centrímetro cúbico
M	molaridade
mg	miligrama
g/m ²	grama por metro quadrado
m/z	razão de massa/carga
mM	milimolar
μ mol	micromol
μ m	micrômetro

mm milímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1	PANIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO NATURAL.....	24
2.2	MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO NATURAL....	27
2.3	ASPECTOS NUTRICIONAIS NA FERMENTAÇÃO NATURAL.....	31
2.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NA FERMENTAÇÃO NATURAL.....	33
2.5	COMPOSTOS BIOATIVOS NA FERMENTAÇÃO NATURAL.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA.....	38
3.2	LOCAL DE EXECUÇÃO.....	38
3.3	MATERIAL.....	38
3.4	MÉTODOS.....	40
3.4.1	Manutenção, enumeração e padronização dos isolados bacterianos.....	40
3.4.2	Desenvolvimento do fermento natural.....	41
3.4.3	Enumeração das células viáveis de bactérias lácticas e leveduras do fermento natural e da massa fermentada.....	42
3.4.4	Determinação de pH e acidez total titulável do fermento natural.....	43
3.4.5	Determinação de exopolissacarídeos (EPS) do fermento natural.....	43
3.4.6	Formulação dos pães de fermentação natural.....	44
3.4.7	Determinação de pH e acidez total titulável dos pães de fermentação natural.....	45
3.4.8	Determinação do volume específico dos pães de fermentação natural.....	46
3.4.9	Digestibilidade da proteína <i>in vitro</i> dos pães de fermentação natural.....	46
3.4.10	Digestibilidade do amido <i>in vitro</i> dos pães de fermentação natural.....	48
3.4.11	Determinação da atividade antioxidante dos pães de fermentação natural...	49
3.4.11.1	Atividade de eliminação do radical livre DPPH*.....	49
3.4.11.2	Atividade de captura do radical livre ABTS*.....	51
3.4.11.3	Potencial antioxidante de redução de ferro FRAP.....	52
3.4.12	Compostos fenólicos totais dos pães de fermentação natural.....	53
3.4.13	Determinação de açúcares e ácidos orgânicos dos pães de fermentação natural.....	54
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55

4	RESULTADOS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A – Artigo.....	76

1 INTRODUÇÃO

O pão é um dos alimentos mais consumidos mundialmente, com um nicho de mercado atrativo em produtos, e em geral, com alta demanda e aberto à inovações. Parte desse mercado se deve aos denominados pães de fermentação natural, encontrados em padarias artesanais, que embora produzidos em menor escala, fomentam o mercado consumidor de produtos de valor agregado a um público-alvo diferenciado (Gil-Cardoso *et al.*, 2021).

Através de uma mistura de água e farinha, a massa fermentada (*sourdough*) se desenvolve por fermentação espontânea, gerando o fermento natural denominado de tipo I ou por fermentação através de microrganismos inoculados intencionalmente, formando o fermento natural do tipo II (Parakhina *et al.*, 2021; Thomas *et al.*, 2023). Ambas as fermentações requerem o emprego de técnicas e conhecimentos específicos para obtenção de um produto de qualidade e que expresse suas características (Ogunremi, Banwo Sanni, 2017). A falta de um protocolo e/ou ausência de padronização na produção destes pães é um desafio (Wang, Wang, 2024), principalmente por reconhecer a importância de atender às expectativas do consumidor, por isso há um esforço no sentido de prover uma produção otimizada e consistente de pães de fermentação natural (Lau *et al.*, 2021).

Os avanços tecnológicos para a otimização dos processos de produção dos produtos panificáveis, podem contribuir para corrigir a lacuna de um protocolo estabelecido. Assim, a utilização de culturas iniciadoras (culturas *starters*) surge no sentido de permitir a reprodutibilidade e manutenção da qualidade dos pães de fermentação natural (Sidari *et al.*, 2020, Subaşı, Ercan, 2023). A presença desses microrganismos permite o desenvolvimento de pães com características tecnológicas e propriedades conhecidas, desejáveis, e com reflexos positivos quando comparado com a fermentação convencional (Boakye *et al.*, 2022).

Estudos reportam o potencial tecnológico e nutricional de pães de fermentação natural (Canesin e Cazarin, Lau *et al.*, 2021; Ribet *et al.*, 2023; Alkay *et al.*, 2024) e sua contribuição para o bem estar e saudabilidade (Bartkiene; Özogul; Rocha, 2022; Calvert *et al.*, 2021; Sadeghi *et al.*, 2023a). As bactérias ácido-láticas (BAL), encontradas abundantemente em produtos fermentados como vegetais, derivados lácteos e presentes em massas fermentadas (Aburas *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2021), desempenham papel importante ao liberar peptídeos e produtos do metabolismo microbiano de aminoácidos que impactam diretamente no desenvolvimento do pão, com repercussão nos compostos bioativos e de sabor (Gänzle, 2014; Brown *et al.*, 2017, Dentice Maidana *et al.*, 2020).

Ademais, a aplicação das BAL na panificação contribui para o aumento do valor nutricional do pão, engloba melhoria da digestibilidade e consequente menor presença da fração de glúten, reduzindo alergenicidade (Fu *et al.*, 2020; Demirkesen-Bicak *et al.*, 2021; Gobetti *et al.*, 2019; Ma *et al.*; Graça *et al.*, 2021). A fermentação produz outros metabólitos favoráveis como exopolissacarídeos (EPS), uma substância bioativa de interesse na indústria de alimentos como coadjuvante (Lakra *et al.*, 2020) e, posbióticos, microrganismos não viáveis, associados, assim como o EPS, à benefícios à saúde (Salminen *et al.*, 2021). Outros impactos positivos da fermentação natural são descritos, como nos estudos sobre a resposta glicêmica e modulação da microbiota humana, importantes para a compreender a repercussão do consumo desses pães (Minervini *et al.*, 2014; Rizello *et al.*, 2019; Das, Pegu, Arya, 2021).

O potencial dos pães de fermentação natural relacionados à saúde e aos processos tecnológicos requer investigação, principalmente ao considerar os inúmeros desfechos na produção, e variáveis como a origem da matéria-prima e microrganismos inoculados (Comasio *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2021). A literatura aborda as culturas autóctones *Companilactobacillus paralimentarius*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Levilactobacillus brevis* como microrganismos que aprimoram a qualidade do pão (Corsetti e Settanni, 2007).

Lactiplantibacillus plantarum e *Levilactobacillus brevis* são considerados dominantes/co-dominantes em massas fermentadas (Ventimiglia *et al.*, 2015) e resistentes a ambientes ácidos (Aktepe *et al.*, 2024). Para além do impacto nas características sensoriais (Zahra *et al.*, 2022; Nouska *et al.*, 2023), sabe-se que as atividades enzimáticas dessas BAL reafirmam sua relevância para os produtos panificáveis, a exemplo do comportamento de degradação do glúten, da produção de compostos bioativos e bioacessibilidade de nutrientes (Siepmann *et al.*, 2019b; Litwinek *et al.*, 2022; Akamine, Mansoldo e Vermelho, 2023).

C. paralimentarius é caracterizada como um microrganismo relacionado a produção de ácidos orgânicos (Li *et al.*, 2023), liberação de peptídeos bioativos por ocasião do processo fermentativo (Marulo *et al.*, 2024), produção de fitase, atividade antifúngica (Demirbaş *et al.*, 2017) e por sua versatilidade metabólica (Van Kerrebroeck, 2016). A espécie *L. plantarum* se destaca por sua adaptação em processos fermentativos, possui alta capacidade de transformar compostos fenólicos e produzir exopolissacarídeos, peptídeos e aminoácidos (Zhou, Cui, Qu, 2019; Plessas *et al.*, 2023; Muñoz *et al.*, 2024), e ainda participa da manutenção do microbioma (Anumudu, Miri, Onyeaka, 2024). Em relação à espécie *L. brevis*, estudos reportam sua capacidade de produção de ácido láctico (Han, *et al.*, 2024) e de síntese de compostos bioativos, como o ácido gama-aminobutírico (Diana, Quílez, Rafecas, 2014; Demirbaş *et al.*, 2017), assim como é relatado sua considerável atividade de fitase, melhorando a qualidade nutricional dos

alimentos (Yildirim, Arici, 2019). A espécie ainda se destaca por colaborar no aumento dos níveis de amido resistente de pães de fermentação natural (Demirkesen-Bicak *et al.*, 2021).

Considerando que a microbiota da massa fermentanda reflete no produto e nos benefícios à saúde (Sadeghi *et al.*, 2023b), o estudo da fermentação natural com culturas microbianas selecionadas por seu caráter e aptidão para a panificação (Medeiros, 2024), como as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41, *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, propostas nesse trabalho, pode fornecer informações importantes para a nutrição e auxiliar no aprimoramento dos processos tecnológicos.

Diante do exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver fermentos naturais (Tipo II) e pães de fermentação natural inoculados com cepas autóctones *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83).

Como objetivos específicos, foi proposto analisar as características físico-químicas (pH, acidez total titulável e determinação de exopolissacarídeos) e microbiológicas (contagem de células viáveis) dos fermentos naturais inoculados com as bactérias lácticas Cp41, Lp47 e Lb83; analisar as características microbiológicas (contagem de células viáveis) das massas fermentadas inoculadas com as bactérias lácticas Cp41, Lp47 e Lb83; determinar o volume específico e analisar as características físico-químicas (pH e acidez total titulável) dos pães de fermentação natural inoculados com as bactérias lácticas Cp41, Lp47 e Lb83; conhecer as propriedades funcionais (digestibilidade da proteína *in vitro*, digestibilidade do amido *in vitro* [índice de hidrólise e índice glicêmico estimado]) e bioatividade (atividade antioxidante e compostos fenólicos totais) dos pães de fermentação natural inoculados com as bactérias lácticas Cp41, Lp47 e Lb83; identificar o perfil dos açúcares e ácidos orgânicos dos pães de fermentação natural inoculados com as bactérias lácticas Cp41, Lp47 e Lb83.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PANIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO NATURAL

A panificação é um setor que movimenta a economia. Os últimos indicadores do Instituto Tecnológico da Panificação e Confeitaria (ITPC) reportam que em 2022, o setor de panificação e confeitaria brasileiro obteve um crescimento no faturamento de R\$ 121,09 bilhões de reais (Rodrigues; Coelho, 2023). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (ABIP), mais de 70 mil padarias estavam em funcionamento no país (ABIP, 2022).

Um levantamento sistemático da produção agrícola, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2025), informa que na safra de trigo de 2024 foram produzidas 10,9 milhões de toneladas de grãos. No Brasil, as importações ultrapassaram 520 milhões de toneladas de trigo em dezembro de 2024, justificada em parte pela necessidade de importação de trigo com qualidade para a panificação (CONAB, 2025).

O relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estima que sejam colhidas 792,9 milhões de toneladas para a safra 2024/2025 (CONAB, 2025). Indicadores internacionais projetam um crescimento na cadeia de 7,45% entre os anos de 2023 e 2028, atingindo um volume de mercado de 0,64 trilhão de dólares. A receita absoluta está estimada em US\$1,9 trilhão em valor de varejo até 2029. O segmento de pães e produtos de cereais constitui quase 15% no mercado global de alimentos, e os dados revelam o potencial da *commoditie* a ser explorado na produção industrial para os produtos de panificação (ReportLinker, Statista, 2024)

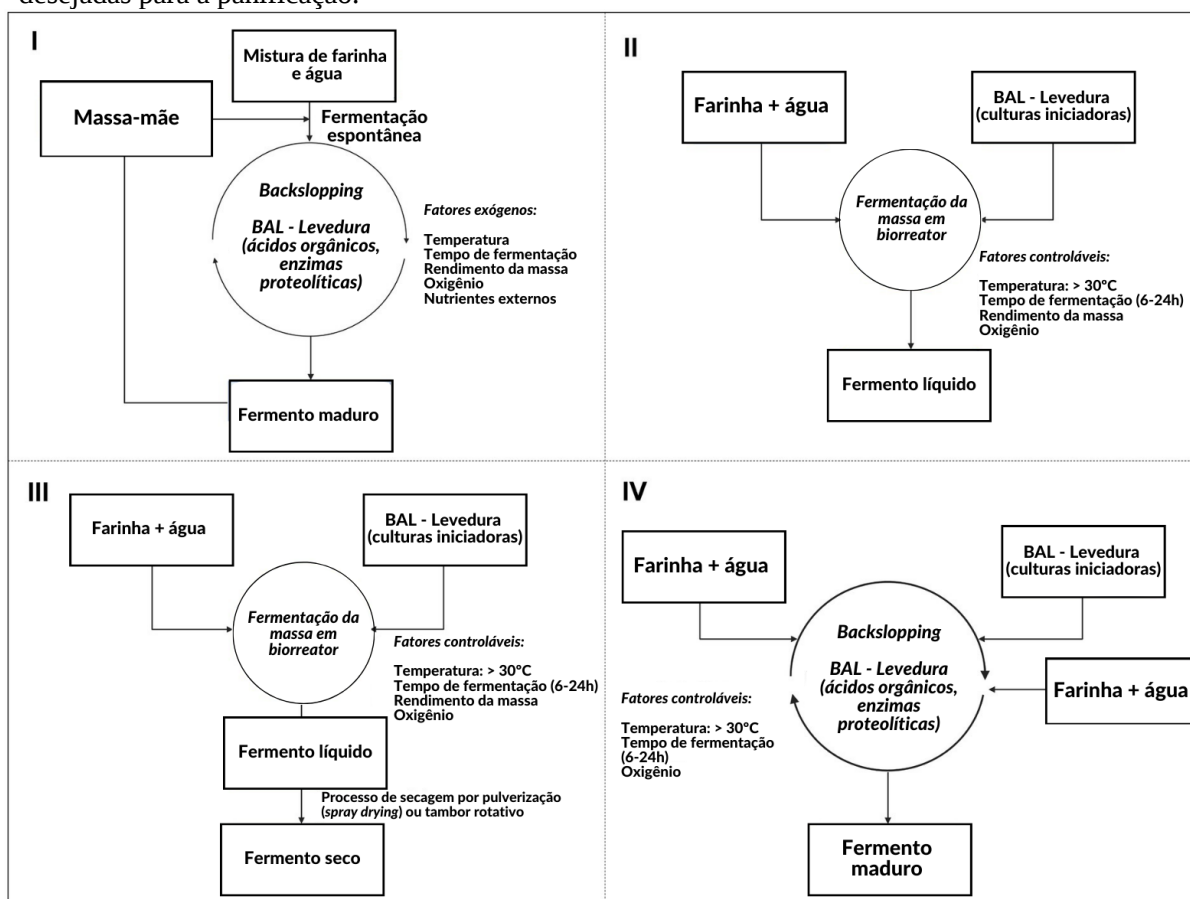
Historicamente, o consumo de pães e alimentos fermentados remete às primeiras civilizações (Arranz-Otaegui *et al.*, 2018; Korcari *et al.*, Landis *et al.*, 2021; Gobbetti, *et al.*, 2016). Com a evolução, estes alimentos passaram a ter outros significados e importância (Dimidi *et al.*, 2019), de maneira que o interesse em novos alimentos e formas de produção crescem na atualidade, e a tecnologia na indústria reflete a procura dos consumidores por inovações, produtos *clean label* (rótulo limpo), com menos aditivos, e produtos que correspondam às suas expectativas (Albertsen; Wiedmann; Schmidt, 2020; Cappelle, Gobbetti, 2023).

Os alimentos fermentados representam uma pequena parte do mercado consumidor dentro do nicho de alimentos e bebidas, que tem ganhado destaque nos últimos anos (Albagli *et al.*, 2023), onde fez surgir a necessidade de produtos vegetais altamente eficazes, saudáveis

e seguros (Yuan *et al.*, 2023). Nesse mercado, vem sendo observado o interesse crescente por pães saudáveis, como os denominados pães de fermentação natural (Kaminski *et al.*, 2020; Islam, Islam, 2024).

Sem uma definição legal estabelecida (D'Amico *et al.*, 2023), e com termos regulatórios distintos mundialmente (Brandt, 2023), os pães de fermentação natural (também referidos na literatura como pão de massa fermentada, *massa madre*, *levain*, *lievito*, *sourdough*) são produzidos através da mistura de grãos (farinha) e água (Albagli *et al.* 2021; Arora *et al.*, 2021). A composição da massa fermentada define os tipos de fermento natural (FN), I, II, III e IV, respectivamente. A Figura 1 abaixo esquematiza todos eles:

Figura 1 - Tipos de processos de fermentação em função do microrganismo e das propriedades finais desejadas para a panificação.



Fonte: Traduzido de Pérez-Alvarado *et al.* (2022).

No FN Tipo I, a fermentação ocorre de forma espontânea, pela ação de microrganismos autóctones que colonizam a mistura de farinha e água, presentes na própria matéria-prima, além dos microrganismos encontrados no ambiente. As bactérias e leveduras ambientais fermentam os hidratos de carbono digeríveis e outros nutrientes (Calvert *et al.*, 2021). O FN Tipo I mantém

sua atividade metabólica máxima pelo processo chamado de *back-slopping* (retrolavagem) ou propagação, onde um procedimento de ‘refrescagem’ é admitido, substituindo parte da mistura por novos volumes de farinha e água (D’Amico *et al.*, 2023).

Há uma diversidade considerável de cepas de BAL e espécies de leveduras no FN Tipo I e a propagação permite a prevalência de espécies melhor adaptadas ao seu ecossistema (Pérez-Alvarado *et al.*, 2022). É um fermento normalmente produzido por padeiros artesanais e sua maturação é avaliada por aspectos sensoriais como odor e aparência visual (Gobbetti *et al.*, 2016). Contudo, é possível inferir que a maturação da massa fermentada é claramente condicionada ao tipo de farinha utilizada (McKenney *et al.*, 2023). Como desvantagem, o método não permite reprodução em escala industrial, demanda maior tempo, além de possuir fatores de produção de difícil controle (Galli *et al.*, 2019).

O FN Tipo II é produzido pela adição intencional de microrganismos, conhecidos como culturas iniciadoras ou culturas *starters* (Albagli *et al.*, 2021), comumente BAL e leveduras, como o tradicional fermento de padeiro. A diversidade microbiana é menos presente e a inoculação de outras espécies pode alterar a composição presente da farinha e da água. Esse FN pode ser utilizado em maior escala e acrescido de bactérias conhecidas com a finalidade de obter características sensoriais únicas (Gänzle; Jinshui, 2019).

Quando o FN Tipo II é submetido a processo tecnológico de secagem, é denominado de FN Tipo III, de melhor manuseio, transporte e maior validade, se adequando às padarias industriais (Pérez-Alvarado *et al.*, 2022). Os FN II e III permitem a adição de bactérias e leveduras em uma única etapa, favorecendo sua aplicação pela indústria. Ambos são categorizados como fermentos líquidos ou semilíquidos, pois em formulação, a quantidade de água é superior à farinha. O parâmetro é considerado muito importante, pois determina a espessura da massa fermentada, e é expresso como o rendimento da massa (*Dough Yield* - DY), onde 100 partes de farinha são somadas a quantidade de partes de água utilizada para a hidratação (Galli *et al.*, 2019).

O FN Tipo IV se assemelha ao FN Tipo I por já possuir uma cultura iniciadora e por ser manejado (submetido a propagação) como o FN Tipo I, podendo receber elementos extras atuantes como culturas iniciadoras, a exemplo de frutas e mel (Calvert *et al.*, 2021; Siepmann *et al.*, 2018; Siepmann *et al.*, 2019b). O ecossistema desse fermento pode se alterar pela competição entre a cultura inicial e os microrganismos espontâneos, favorecendo esses últimos (De Vuyst; Van Kerrebroeck; Leroy, 2017).

Conhecer o tipo do fermento natural é um passo importante no entendimento dos desfechos dos processos em panificação, como observado no estudo de Gu *et al.* (2023), que

avaliaram o efeito da substituição de uma massa fermentada Tipo II por um novo tipo de massa fermentada preparada a partir de uma cepa pura liofilizada (submetida à secagem), em relação ao processo de fermentação. Os autores concluíram que a cepa liofilizada manteve as características de aroma provenientes dos compostos voláteis da massa fermentada Tipo II, ratificando o uso da cepa liofilizada na indústria. A produção de pães de fermentação natural envolve o desenvolvimento e manutenção de uma rede complexa de culturas microbianas (Lau *et al.*, 2021), e o conhecimento sobre as características desses microrganismos envolvidos na fermentação natural auxilia na definição e aplicação dos processos tecnológicos.

2.2 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO NATURAL

O fermento natural é considerado um ecossistema diverso onde BAL estão presentes em abundância. Um total de 111 espécies diferentes de BAL e 59 espécies de leveduras já foram isoladas de massas fermentadas em todo o mundo (De Vuyst *et al.*, 2023). As BAL encontradas nas massas fermentadas caracterizam-se por serem gram-positivas, ácido-tolerantes, parte de um grupo filogeneticamente homogêneo (Gängle, 2015), que inclui as espécies dos gêneros *Lactococcus* sp. e *Lactobacillus* sp., esse último o mais predominante entre as culturas iniciadoras (Obayomi, Olaniran, Owa, 2024; Falasconi *et al.*, 2020; Arora *et al.*, 2021).

Embora parte da microbiota humana, as BAL são geralmente consideradas seguras para a indústria de alimentos (Brandt, 2019), e de acordo com a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA), são designadas como microrganismos GRAS (*generally recognized as safe*) e com presunção qualificada de segurança (QPS) pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) (Zapašnik, Sokołowska, Bryła, 2022; Bangar *et al.*, 2021; Panel *et al.*, 2020).

As BAL se diferenciam por seu metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo. As BAL homofermentativas metabolizam hexoses e pentoses através da via Embden-Meyerhoff (via da glicólise e a via da pentose fosfato) para piruvato como o principal intermediário metabólico (Stephen, Saleh, 2023; Abedi, Mohammad, Hashemi, 2020). As BAL heterofermentativas metabolizam hexoses e pentoses através da via fosfogluconato e fosfocetolase para piruvato e acetil-fosfato como principais intermediários (Zheng *et al.*, 2020). O ácido láctico e outros compostos como dióxido de carbono (CO₂), peróxido de hidrogênio, diacetil, acetato e álcool são produzidos (De Vuyst; Van Kerrebroeck; Leroy, 2017), utilizando o cofator NADP (fosfato de adenina de nucleotídeo), de importância para as reações químicas (Abedi, Mohammad, Hashemi, 2020). Elas ainda podem utilizar co-substratos como o oxigênio

e a frutose para ajudar na fermentação. Isto leva a um aumento da produção de acetato, que pode melhorar o sabor e a textura do pão (Pérez-Alvarado, 2022; Gänzle, 2015).

Embora tais classificações (homo e heterofermentativo) tenham sido adotadas recentemente a partir das considerações fisiológicas, filogenéticas, e análises genômicas (Zheng *et al.*, 2020), a Tabela 1 abaixo elenca as BAL envolvidas no processo fermentativo considerando os termos anteriormente utilizados (heterofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas).

Quadro 1 - Bactérias ácido lácticas heterofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas, homofermentativas, e leveduras encontradas em diferentes tipos de massa fermentada.

Heterofermentativas obrigatórias	Heterofermentativas facultativas
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i> <i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> <i>Furfurilactobacillus rossiae</i> <i>Latilactobacillus curvatus</i> <i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Levilactobacillus acidifarinae</i> <i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Levilactobacillus hammesii</i> <i>Levilactobacillus koreensis</i> <i>Levilactobacillus namurensis</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> <i>Limosilactobacillus reuteri</i> <i>Limosilactobacillus frumenti</i> <i>Limosilactobacillus pontis</i> <i>Weissella cibaria</i> <i>Weissella confusa</i> <i>Weissella hellenica</i>	<i>Companilactobacillus alimentarius</i> <i>Companilactobacillus kimchii</i> <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> <i>Lactocaseibacillus casei</i> <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i> <i>Latilactobacillus sakei</i> <i>Levilactobacillus spicheri</i> <i>Limosilactobacillus coleohominis</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Schleiferilactobacillus perolens</i>
Homofermentativas	Leveduras
<i>Companilactobacillus farciminis</i> <i>Companilactobacillus nodensis</i> <i>Lactobacillus amylovorus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Ligilactobacillus salivarius</i> <i>Liquorilactobacillus nagelii</i> <i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida pelliculosa</i> <i>Kazachstania exigua</i> <i>Kazachstania humilis</i> <i>Kazachstania servazzi</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Saccharomyces bayanus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Yarrowia keelungensis</i>

Fonte: Adaptado de Pérez-Alvarado *et al.* (2022).

As BAL dominantes são consideradas heterofermentativas (Arora *et al.*, 2021) e atuam em sinergismo com leveduras, que são bem adaptadas ao ambiente ácido e capazes de se desenvolverem em concentrações de 10^7 UFC/g, pouco abaixo do apresentado pelas BAL (10^8 UFC/g) (De Vuyst *et al.*, 2014; Pérez-Alvarado *et al.*, 2022).

Um estudo conduzido por Zheng *et al.* (2020), que avaliou a taxonomia de *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* com base em sequências de genoma completo, detalhou as características de vários gêneros e espécies de microrganismos. O Quadro 2 abaixo

apresenta as propriedades dos microrganismos objetos dessa pesquisa.

Quadro 2 – Propriedades dos gêneros *Companilactobacillus* sp., *Lactiplantibacillus* sp., *Levilactobacillus* sp., e das espécies *Companilactobacillus paralimentarius*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Levilactobacillus brevis*.

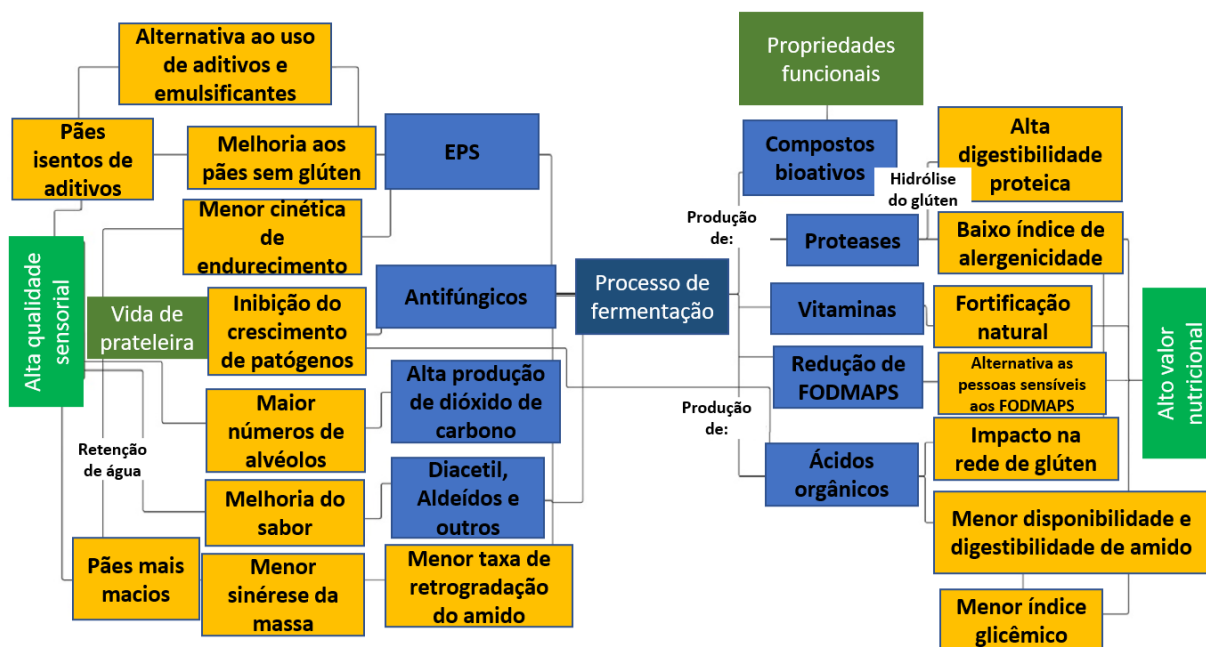
<i>Companilactobacillus</i> sp.	<i>Lactiplantibacillus</i> sp.	<i>Levilactobacillus</i> sp.
Procedência: isolado de vegetais fermentados e frutas, e também de massas fermentadas ou cereais selecionados. Ocorrência: Não expressa dominância em nenhuma dessas fermentações, mas ocorre consistentemente em massas fermentadas tipo I. Desempenho: Temperatura de crescimento é variável, crescendo entre 25 e 30 °C, assim como à 15 °C e 45 °C (limitada a algumas espécies). Informações sobre sua ecologia e estilo de vida são escassas. <i>Companilactobacillus paralimentarius</i>: isolada de fermento natural, da fermentação de outros cereais e de carne de aves.	Procedência: isolado de muitos alimentos fermentados diferentes, como vegetais fermentados, carnes, produtos lácteos e cereais fermentados, mas também se encontra em habitats associados a insetos ou como residentes temporários da microbiota intestinal dos vertebrados. Ocorrência: Utilizado como cultura <i>starter</i> para fermentações alimentares múltiplas e é aplicado como cultura probiótica. Desempenho: Fermenta uma vasta gama de hidratos de carbono. A maioria das espécies metaboliza ácidos fenólicos através de atividades de esterase, descarboxilase e redutase. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>: Algumas cepas reduzem o nitrato em concentração limitada de glicose e pH 6,0 ou superior. Requer pantotenato de cálcio e niacina para crescer. Algumas cepas apresentam atividade fitase-positiva. É considerada dominante da microbiota em fermentações espontâneas de vegetais e azeitonas, ocorrendo em massa fermentada, em fermentações de laticínios e carnes fermentadas. Contribui para a deterioração da cerveja e vinho. Faz parte da microbiota de insetos e é isolado do trato intestinal humano, cavidade oral. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>: isolado de produtos lácteos e ambientes lácteos, silagem, chucrute, legumes em conserva, massa fermentada, estrume de vaca, cavidade oral humana, trato intestinal e fezes, e de esgotos.	Procedência: isolado de insetos, leite, queijo, chucrute, fermentações vegetais relacionadas, massa fermentada, silagem, esterco de vaca, fezes e da boca e trato intestinal de humanos e ratos. Ocorre amplamente em vegetais e na fermentação de cereais. Considerado um microrganismo deteriorante em cervejas. É um lactobacilo com potencial de fermentação. Ocorrência: presente em muitas massas fermentadas do tipo I, como único agente de fermentação. Desempenho: cresce à 15 °C, mas não a 45 °C, toleram ambientes ácidos, crescendo bem com pH entre 4-7 e produzem ácido D-lático. Algumas cepas apresentam atividade fitase-positiva <i>Levilactobacillus brevis</i>: geralmente abriga genes que codificam para transaldolase/transcetolase que medeiam o metabolismo de pentoses para piruvato. Usado comercialmente como cultura inicial em aplicações de alimentos e rações. As cepas fermentam galactose, maltose, lactose, rafinose, sacarose, xilose e esculina. Consome fontes de carbono simultaneamente.

Fonte: Ibrahim (2016); Adaptado de Zheng *et al.* (2020)

A importância da compreensão sobre a origem e comportamento dos microrganismos, como as BAL, é oportuna ao auxiliar na construção do conhecimento sobre suas variáveis e relações nos modos de produção. O processo de fermentação apresenta um fluxo significativo

de ações que repercutem na qualidade sensorial e nutricional nos produtos de panificação, conforme ilustra a Figura 2, abaixo.

Figura 2 - Impacto do pão de fermentação natural na indústria de panificação.



Fonte: Traduzido de Lima *et al.* (2023)

Bactérias fermentativas como as BAL produzem compostos como ácidos orgânicos (lático, acético) que refletem na percepção de aroma (De Vuyst; Van Kerrebroeck; Leroy, 2017) e reduzem o pH do meio, inibindo microrganismos sensíveis ao ambiente ácido (Fekri *et al.*, 2024). Outros compostos presentes como álcoois, aldeídos e cetonas corroboram para as características sensoriais, como sabor e textura dos pães. Processos bioquímicos como a conversão de aminoácidos como a fenilalanina, a isoleucina (ácido), glicina, serina e alanina (vinagre/azedo) em aldeídos e cetonas, podem formar compostos aromatizantes adicionais relevantes (Limbad *et al.*, 2020).

As leveduras fazem parte do ecossistema da fermentação natural, atuam na produção de gás carbônico e contribuem como agentes fermentadores na panificação e na geração de compostos de aroma. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* prospera em ambientes ácidos produzidos por BAL. Tal relação mutualística é estabelecida na natureza e beneficia ambos os microrganismos (Han, *et al.*, 2024; Sieuwerts, Bron, Smid, 2018). A fermentação aumenta a síntese de compostos voláteis, fenólicos e a atividade da fitase (Palla *et al.*, 2019), essa última principalmente pelas cepas *L. brevis* LD656 e *L. plantarum* PB241 (De Vero, Iosca, Pulvirenti, 2021).

A literatura demonstra a dominância dos gêneros *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora* e *Pichia* (Carbonetto *et al.*, 2020), sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* uma das mais representativas (Chiva *et al.*, 2021; De Vuyst *et al.*, 2016). A espécie apresenta boa tolerância ao baixo pH, ao alto teor de carboidratos e a maior presença de BAL (Fekri *et al.*, 2024). Um estudo prévio demonstrou que o sinergismo de BAL com leveduras pode reduzir mais de 40% o conteúdo do ácido fítico, considerado um anti nutriente, em farinhas integrais pela fitase exógena produzida pelas leveduras (Karamam, Sagdic, Durak, 2018). As condições ácidas promovidas pela fermentação aumentam a atividade endógena da fitase do cereal, desta forma, o uso de massas fermentadas torna-se relevante para a redução do teor de fitato ao melhorar a biodisponibilidade de minerais (Alkay *et al.*, 2024; Samtiya, Aluko, Dhewa, 2020).

O estudo sobre a fermentação natural no que concerne a interação do ecossistema dos microrganismos se intensificou na década de 90, e apenas anos mais tarde, pesquisas com foco nos aspectos nutricionais de outras culturas foram desenvolvidas (Arora *et al.*, 2021). Desde então, questões relacionadas à tecnologia e nutrição e saúde que permeiam a fermentação natural buscam elucidar seu potencial (Paramithiotis, 2006; Corsetti e Settanni, 2007; Chavan, Chavan, 2011; Yazar e Tavman, 2012; Pétel, Onno e Prost, 2017; De Vuyst, Van Kerrebroeck e Leroy, 2017; Fernández-Peláez, Paesani, Gómez, 2020; Calvert *et al.*, 2021; Lau *et al.*, 2021; De Vuyst, Comasio, Kerrebroeck, 2021; Landis *et al.*, 2021; D'Amico *et al.*, 2023; Illueca *et al.*, 2023; Lima *et al.*, 2023; Islam e Islam, 2024; Alkay, 2024).

2.3 ASPECTOS TECNOLÓGICOS E NUTRICIONAIS NA FERMENTAÇÃO NATURAL

Os microrganismos da massa fermentada têm o potencial de influenciar as funções e processos ecossistêmicos das culturas iniciadoras, assim como em propriedades reológicas e sensoriais do pão (D'Amico *et al.*, 2023; Fujimoto *et al.*, 2019; Minervini *et al.*, 2014). Tal como no estudo de Çakir *et al.* (2020), que investigaram os efeitos da cultura iniciadora e parâmetros de qualidade do pão em massa produzida com farinha de trigo domesticado (*einkorn*, *Triticum monococcum* L ssp. *monococcum*.) e farinha de trigo comum, em diferentes proporções. Os pesquisadores identificaram que o pão de massa fermentada contendo 25% e 50% de farinha de *einkorn* apresentou volume específico superior e propriedades tecnológicas semelhantes ao do pão produzido exclusivamente com farinha de trigo comum.

Estudos que analisam o comportamento de cepas em co-cultura em produtos de panificação também são interessantes por promover o conhecimento da interação destes

microrganismos, como no estudo dos autores Li, Hu e Fu (2022), que avaliaram os efeitos de uma cepa selecionada de bactéria do ácido acético nas propriedades da massa fermentada e de um pão cozido no vapor, preparados a partir de cinco culturas iniciadoras diferentes. Os resultados mostraram maior elasticidade e viscosidade para a massa fermentada com levedura e BAL, e maior volume específico em comparação aos demais grupos e menores valores de dureza e mastigabilidade para os grupos de levedura e BAL, e levedura e bactéria do ácido acético, respectivamente.

Outro estudo em consórcio, conduzido por Korcari *et al.* (2021), investigou a utilização de culturas iniciadoras selecionadas para a obtenção de um pão de massa fermentada à base de espelta (trigo-vermelho), com melhores características tecnológicas e sensoriais. Dois consórcios foram elencados contendo uma cepa de levedura comercial e duas cepas de BAL. Os resultados apontaram para a ausência de inibições entre as BAL e as leveduras, que cresceram em proporções consideradas desejáveis para massas fermentadas. Neste mesmo estudo (Korcari *et al.*, 2021), o produto obtido apresentou textura de miolo superior e foi bem aceito pelos consumidores, além de apresentar melhor vida de prateleira quando confrontados com contaminantes comuns de cereais. Os dados mostraram que as culturas iniciadoras selecionadas têm um bom potencial na melhoria da qualidade dos produtos de panificação obtidos com farinhas que apresentam um fraco desempenho tecnológico, como a espelta, e ainda propriedades nutricionais interessantes e cultivo sustentável.

Um estudo de Montemurro *et al.* (2020) avaliou a adequação de quarenta cepas para serem utilizadas como microrganismos iniciadores. Dentre os resultados encontrados, as massas fermentadas de *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus sanfranciscensis* permitiram a produção de pães caracterizados com uma digestibilidade protéica *in vitro* superior à dos pães obtidos com cepas de *Lactobacillus* spp. ou levedura de panificação. Outro estudo, conduzido por Rizzello *et al.* (2019), identificou um aumento de 16% na digestibilidade do pão de fermentação natural e um aumento acima de 18% no teor proteico.

O efeito na digestibilidade do amido e índice glicêmico (IG), diretamente relacionados, também são relatados na literatura. A capacidade de fermentação do amido é dependente da expressão do gene *amyA*, responsável pela produção da enzima extracelular α -amilase, de forma que os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* são os mais eficientes (Tsafrakidou, Michalidou, Biliaderis, 2020; Chaves-López, *et al.*, 2020). A redução no IG é importante para o controle da hiperglicemia. O consumo de pães fermentados pode contribuir para a redução do IG pela indisponibilidade do amido, uma vez que a interação do amido e do glúten, e a ação dos ácidos orgânicos gerados pela fermentação, diminui a digestibilidade do

amido e a resposta glicêmica pós-prandial, com isso reduz os níveis de açúcar sanguíneos (Melini *et al.*, Gobbetti *et al.*, 2019; Alkay *et al.*, 2024; Canesin e Cazarin, 2021; Bo *et al.*, 2017).

A literatura traz relatos de pesquisas sobre o consumo de pães de fermentação natural e seus impactos na saúde gastrointestinal (Lau *et al.*, 2021; Martinez Tuppia *et al.*, 2024). Os FODMAPS (sigla para *fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols*), são carboidratos de cadeia curta, não facilmente digeríveis, que quando consumidos em excesso podem trazer efeitos deletérios em pessoas acometidas pela síndrome do intestino irritável (SII) ou com sensibilidade ao glúten não-celíaca (Menezes *et al.*, 2018; Fernández-Peláez, Paesani, Gómez, 2020). A fermentação natural pode auxiliar na redução dos níveis desses carboidratos, como os frutanos e α -galactooligosacarídeos (Laatikainen *et al.*, 2017). Os microrganismos da massa fermentada convertem a sacarose em glicose e frutose, que por sua vez convertem a frutose em manitol, sendo metabolizada pela microbiota intestinal (Menezes *et al.*, 2019; Pejcz, *et al.*, 2021; Zhural *et al.*, 2024; Loponen, Gänzle, 2018). Estudos apontam que a redução dos FODMAPS é diretamente relacionada ao tempo de fermentação (Laatikainen *et al.*, 2017; Siepmann *et al.*, 2019a).

Para além das culturas iniciadoras, o estudo do comportamento de múltiplas culturas auxilia no entendimento do impacto na saúde. Um estudo recente, que investigou o impacto da fermentação na redução do conteúdo do glúten, também buscou entender como as cepas *L. plantarum* BS, *L. brevis* 1269 e *L. sanfranciscensis* 20663, que degradam a gliadina, afetavam a imunogenicidade e a capacidade de inibir a conversão de angiotensina (relacionada a hipertensão arterial) e a α -amilase (relacionada a disfunções pancreáticas). Os autores concluíram que o pão de fermentação natural com teor reduzido de glúten impediu o aumento da alergenicidade e contribuiu para mitigar a hipertensão arterial (Bartos *et al.*, 2024).

De acordo com Menezes *et al.* (2018), as atividades enzimáticas microbianas das BAL e leveduras, através de culturas mistas, devem ser empregadas no sentido de produzir pães tanto com características nutricionais, quanto com características sensoriais desejáveis. Considerando a diversidade microbiana de BAL e levedura comercial, esperam-se ainda inúmeros estudos ensaiando as relações entre os microrganismos presentes nos pães de fermentação natural. A elaboração de pães *sourdough* beneficiar-se-á com o conhecimento das propriedades intrínsecas desses microrganismos (Sánchez-Adriá *et al.*, 2023).

2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NA FERMENTAÇÃO NATURAL

Por definição, metabólitos secundários são substâncias produzidas por microrganismos que desempenham diversas funções sistêmicas. As BAL produzem metabólitos secundários incluindo ácidos orgânicos, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, dipeptídeos cíclicos, peróxido de hidrogênio, reuterina, compostos proteicos e compostos antifúngicos (Abdel-Nasser *et al.*, 2023). A exemplo, em um ensaio conduzido por González-Alonso *et al.* (2023), descobriu-se a associação da produção simultânea de ácido láctico, etanol, manitol, ácido acético, glicerol, eritritol e lactato de etila pela cepa *Limosilactobacillus fermentum*.

Efeitos benéficos na saúde e na nutrição humana têm sido relacionados aos metabólitos produzidos por microrganismos durante a fermentação. Luti *et al.* (2021) usaram cepas de lactobacilos para produzir peptídeos com propriedades anti-inflamatórias e/ou antioxidantes, atividades mantidas após o cozimento do pão de massa fermentada. Já o estudo de İspirli *et al.* (2020), investigou o impacto do alfa-glucano produzido por *Limosilactobacillus reuteri* E81 (anteriormente denominado *Lactobacillus reuteri* E81) e identificou uma maior elasticidade da massa fermentada. Quando o mesmo foi adicionado, os ensaios revelaram menor dureza do pão..

O estudo de Colosimo *et al.* (2020) demonstrou que a fermentação de *Triticum urgidum* subsp. *dicoccum* proporcionou maior vida de prateleira do produto, relacionada à produção de ácidos orgânicos, melhora do sabor e da digestibilidade. Segundo os autores, a hidrólise da proteína resultante da atividade microbiana aumenta a biodisponibilidade potencial dos aminoácidos e pode facilitar a produção de peptídeos bioativos com possíveis benefícios à saúde. Além disso, a redução de determinados peptídeos associados à intolerância a cereais em humanos pode oferecer novas oportunidades para o desenvolvimento de produtos inovadores que atendam a pacientes com doença celíaca.

Outros metabólitos que se destacam, como os posbióticos (microrganismos não-vivos de células microbianas inanimadas), podem promover benefícios à saúde (Cuevas-González, Liceaga, Aguilar-Toalá, 2020). As células vivas não são uma condição necessária para exercer os efeitos terapêuticos benéficos sobre os consumidores. Metabólitos e estruturas celulares de microrganismos da massa fermentada são potenciais posbióticos, além dos componentes nutricionais essenciais do próprio pão (Păcularu-Burada *et al.*, 2020; Salminen *et al.*, 2021). As BAL são um dos principais grupos de microrganismos com várias cepas probióticas aplicáveis à fermentação de cereais. Durante o processo de cozimento, a lise celular (morte) dos microrganismos gera resíduos celulares que podem ter propriedades benéficas, funcionando como posbióticos (Nataraj *et al.*, 2020).

Exemplos de compostos posbióticos presentes no FN são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteínas/peptídeos secretados, bacteriocinas, biossurfactantes secretados, aminoácidos, flavonoides, vitaminas, ácidos e EPS – esse último a ser estudado nessa pesquisa. Ademais, estruturas celulares microbianas, como peptideoglicano de paredes celulares bacterianas, fímbrias, flagelos, proteínas associadas à superfície celular, biossurfactantes ligados à parede celular e sobrenadantes celulares também são componentes posbióticos com possíveis benefícios à saúde do hospedeiro (Nataraj *et al.*, 2020; Schlörmann *et al.*, 2022). Além das propriedades nutricionais, alimentos com posbióticos apresentam aumento em suas propriedades sensoriais e tecnológicas, maior vida de prateleira, reduzida contaminação microbiana em alguns processos de fabricação e durante o armazenamento (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018; Barros *et al.*, Shafipour *et al.*, 2020).

A partir do estudo do perfil das BAL, é possível compreender a importância dos metabólitos secundários para a fermentação natural e saúde. O estudo conduzido por Păcularu-Burada *et al.* (2020), isolou e selecionou cepas presuntivas de bactérias lácticas selvagens, que pudessem demonstrar propriedades funcionais importantes a serem usadas posteriormente em fermentações de massa fermentada rica em proteínas à base de plantas e sem glúten. Como resultados, as cepas apresentaram boas propriedades antimicrobianas, a exemplo da cepa de *Leuconostoc* spp., que ainda foi capaz de produzir grandes quantidades de exopolissacarídeos (EPS).

Os metabólitos secundários como os EPS são polímeros de carboidratos de cadeia longa, de natureza hidrocoloidal, sintetizados pelas BAL e classificados como heteropolissacarídeo ou homopolissacarídeo. Esse último produzido em maior quantidade está relacionado com a panificação por conferir características reológicas e sensoriais importantes como aumento da viscosidade da massa, da maciez do miolo e do volume específico do pão. Por outro lado, há a redução da taxa de envelhecimento e firmeza do produto (Lynch; Coffey, Arendt, 2018; Xu *et al.*, 2019; Korcz e Varga, 2021).

Um estudo de Abedfar *et al.* (2018), analisou a capacidade de produção de EPS em cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*, e os autores identificaram potenciais propriedades antioxidantes, revelando a contribuição do metabólito para a panificação. Além dos exopolissacarídeos, a literatura reporta outros metabólitos secundários capazes de contribuir para o caráter antioxidante de produtos fermentados, como os compostos bioativos, que favorecem as propriedades promotoras de saúde (Koistinen *et al.*, 2018; Akamine, Mansoldo e Vermelho, 2023).

2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS NA FERMENTAÇÃO NATURAL

Durante a produção do pão, ocorrem inúmeras reações químicas envolvendo seus principais componentes e fitoquímicos bioativos, como a desnaturação de proteínas, degradação de aminoácidos, açúcares, gelatinização do amido, e ainda novos compostos aparecem, com impacto sensorial e nas propriedades bioativas do alimento (Plessas *et al.*, 2023). A proteólise proporcionada pela fermentação libera peptídeos bioativos e aminoácidos que são absorvidos pelos enterócitos, trazendo benefícios à saúde (Canesin, Cazarin, 2021). Estudos voltados para melhoria do conteúdo de aminoácidos e da neurotransmissão são relacionados aos efeitos da fermentação natural na digestibilidade das proteínas (Alkay *et al.*, 2024).

Os compostos fenólicos também são investigados no âmbito na fermentação natural. Esses compostos podem ser definidos como componentes alimentares altamente valiosos devido a seu potencial utilização como moléculas bioativas e antioxidantes naturais para as indústrias alimentícia, cosmética, química e farmacêutica. Os compostos fenólicos são encontrados em quase todos os alimentos de origem vegetal como o trigo, e nos subprodutos resultantes do seu processamento (Lama-Muñoz; Contreras, 2022). O interesse no perfil fenólico bioativo em produtos de panificação se justifica por representar uma fonte valiosa de compostos promotores da saúde, pertencentes a flavonóides (com atividade antidiabética), lignanas e ácidos fenólicos (Omoba; Isah, 2018). A fermentação natural promove o aumento da bioacessibilidade dos ácidos fenólicos, aumenta a capacidade antioxidante, uma vez que a acidez do meio favorece a hidrólise dos ésteres de glicosídeos dos ácidos fenólicos (Angelino *et al.*, 2017).

Um estudo conduzido por Omoba e Isah (2018), avaliou a composição de aminoácidos, identificou e quantificou os compostos bioativos fenólicos presentes e as propriedades antioxidantes dos biscoitos de sorgo com e sem massa fermentada. Seis compostos fenólicos foram identificados e quantificados em ambos os biscoitos. O ácido ferúlico foi o composto fenólico mais proeminente, seguido pelo ácido clorogênico, de forma que os autores concluíram que a presença de compostos fenólicos bioativos e a sua eficácia antioxidante sugerem benefícios para a saúde na gestão do estresse oxidativo e das doenças degenerativas. Outro estudo, como de Plessas *et al.* (2023), utilizou um corante potencialmente probiótico com *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917 como iniciador na panificação de massa fermentada. Os autores evidenciaram que as cepas de *L. plantarum* puderam aumentar a capacidade antioxidante das massas fermentadas, afetando os níveis de componentes bioativos

através de atividades metabólicas que liberam compostos antioxidantes.

Conforme exposto, a literatura traz estudos que abordam a fermentação natural em pães por bactérias ácido lácticas e sua relação com potenciais benefícios à saúde, como estudos sobre atividade antioxidante e compostos bioativos, digestibilidade, imunomodulação. A utilização de culturas iniciadoras selecionadas por sua aptidão tecnológica, como as propostas para essa pesquisa, pode subsidiar informações para nortear e aprimorar os processos produtivos e melhorar as propriedades funcionais dos produtos. Compreende-se que a investigação do comportamento dessas bactérias na panificação pode incrementar a indústria, principalmente no cenário atual onde há uma crescente preocupação com o bem estar e a saudabilidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

Considerando o exposto por Gil (2022), que indica a pesquisa exploratória como descritiva ao buscar estabelecer bases para futuras pesquisas e descrever as características de um fenômeno, a metodologia adotada na pesquisa possui caráter experimental ao observar os efeitos das variáveis. Justifica-se como de natureza quantitativa ao averiguar fatos, analisar hipóteses e operacionalizar a construção do conhecimento a partir da lógica (De Sordi, 2017).

3.2 LOCAL DE EXECUÇÃO

A manutenção e preparação das culturas bacterianas, a determinação de exopolissacarídeos (EPS), o desenvolvimento dos fermentos naturais, a determinação do volume específico e a digestibilidade do amido *in vitro* foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LM), *Campus* I, em Mangabeira, no Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A elaboração dos pães de fermentação natural foi realizada no Laboratório de Cozinha Experimental e no Laboratório de Confeitaria, Panificação e Bebidas (LabCoze-LCPB-CTDR-UFPB).

As análises físico-químicas dos pães de fermentação natural, foram desenvolvidas no Laboratório de Análise Físico-Química (LAFQ-CTDR-UFPB). O ensaio da atividade antioxidante e de compostos fenólicos totais dos pães foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos (LMBA), do Centro de Ciências da Saúde-CCS, Departamento de Nutrição, *Campus* I, Cidade Universitária, UFPB. As análises de determinação dos açúcares e ácidos orgânicos dos pães de fermentação natural foram realizadas no Laboratório de Bebidas e Cromatografia Líquida (LBCL) do Instituto Federal do Sertão Pernambuco (IFSertãoPE), *Campus* Petrolina, PE.

3.3 MATERIAL

As culturas bacterianas utilizadas nesse estudo, *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), foram previamente isoladas de fermentos naturais de padarias de cidades paraibanas brasileiras.

Posteriormente foram identificadas através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF e selecionadas por seus desempenhos em ensaios tecnológicos, a saber: atividade antioxidante, proteolítica, capacidade de acidificação, produção de exopolissacarídeos, tolerância ao sal, sacarose, ácido e etanol. Brevemente, as análises apontaram um rápido crescimento e acidificação sob estresse fermentativo para as cepas Lp47 e Lb83, além de satisfatório aumento da atividade antioxidante. A cepa Lp47 apresentou tolerância às condições ácidas e à salinidade, enquanto Lb83 demonstrou tolerância à concentração elevada de etanol. Já a cepa Cp41 se destacou por apresentar tolerância ao etanol, ao sal e às condições ácidas (Medeiros, 2024). As cepas são pertencentes à Coleção de culturas do Laboratório de Confeitaria, Panificação e Bebidas, do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os insumos para a elaboração do fermento natural e dos pães foram adquiridos no comércio local de João Pessoa, Paraíba, Brasil, a saber: farinha de trigo branca Tipo 1 contendo (% p/p) 70,0% de carboidratos, 12,0% de proteínas, 2,0% de gorduras totais e 2,0% de fibras alimentares totais (Finna[®], Moinho Dias Branco, Natal, RN, Brasil), sal refinado (Miramar, Norsal, Areia Branca, RN, Brasil), levedura comercial [fermento biológico seco instantâneo *Saccharomyces cerevisiae*] (Dona Benta[®], J. Macêdo, Salvador, BA, Brasil).

Os reagentes utilizados nos experimentos físico-químicos são de grau de pureza analítico - P.A.) e foram fornecidos pelo Laboratório de Análise Físico-Química (CTDR-UFPB). O reagente químico *coomassie* Brilhante (Dinâmica Química Contemporânea[®]), utilizado na análise de digestibilidade da proteína *in vitro* dos pães de fermentação natural, foi fornecido gentilmente pelo Laboratório de Operações Unitárias (CTDR-UFPB).

Para os ensaios de atividade antioxidante e compostos fenólicos totais das amostras, os reagentes utilizados foram fornecidos gentilmente pelo Laboratório de Bromatologia e Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos (CCS-UFPB). São eles: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) [ABTS^{•+}] (Roche Diagnostics GmbH[®], Mannheim, Alemanha), ácido (±)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico [Trolox], 2,2-difenil-1-picril-hidrazil [DPPH^{•+}], 2,4,6-Tripiridil-s-triazina [TPTZ], e Folin e Ciocalteu Fenol 2N, estes últimos do fabricante Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, MO, EUA.

A água ultrapura obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q Millipore[®] (Merck[™], Darmstadt, Alemanha), utilizada nas análises de determinação de exopolissacarídeos (EPS) do fermento natural, digestibilidade da proteína *in vitro* e digestibilidade do amido *in vitro* dos pães de fermentação natural, foi fornecida gentilmente pelo Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA), do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

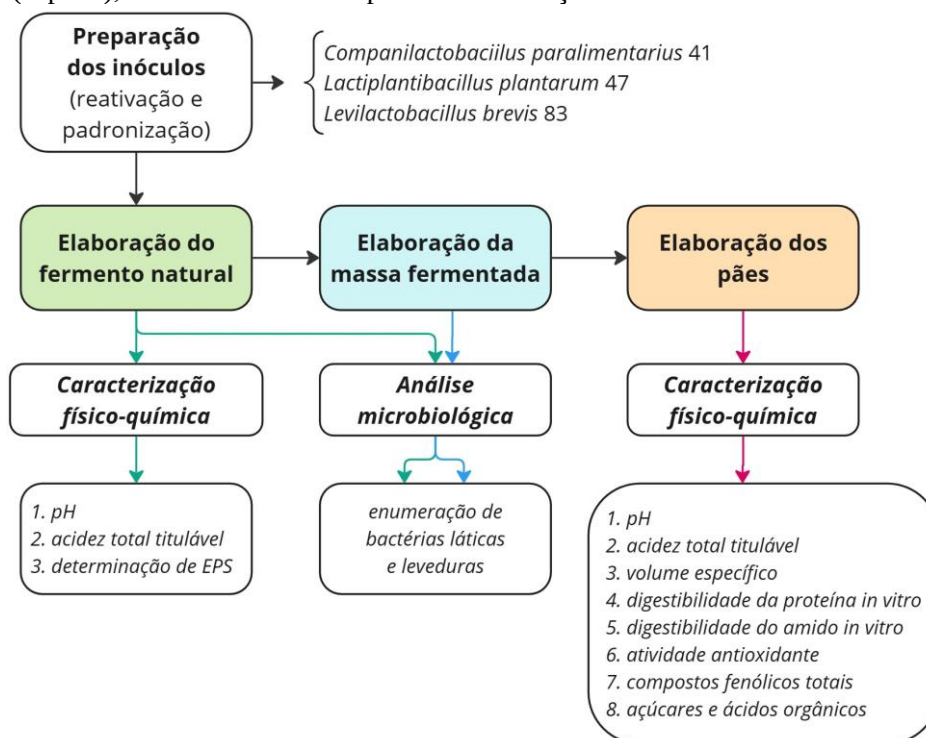
(IPeFarM), do *Campus I*, Cidade Universitária, UFPB.

As enzimas utilizadas para os ensaios físico-químicos de digestibilidade do amido *in vitro* e digestibilidade da proteína *in vitro*, assim como a proteína utilizada na curva-padrão deste último ensaio, foram adquiridas com recursos provenientes dos docentes da pesquisa: pepsina (P-7000), pancreatina (P-7545), α -amilase (86250), α -amilase (A3403), amiloglucosidase (A3260), invertase (I4504) e albumina bovina fração v em pó (BSA) (A9647) (Sigma-Aldrich®). O polissacarídeo goma guar utilizado na análise da digestibilidade do amido *in vitro* foi adquirido de um estabelecimento farmacêutico local (Roval Farmácia de Manipulação, João Pessoa/PB).

3.4 MÉTODOS

Na Figura 3 abaixo é apresentado o desenho experimental do trabalho e as subseções seguintes detalham cada um.

Figura 3 - Desenho experimental para elaboração e análise do fermento natural (Tipo II), massa fermentada e pão de fermentação natural



Fonte: elaborado pelo autor (2025)

3.4.1 Manutenção, enumeração e padronização dos isolados bacterianos

As culturas de trabalho dos isolados bacterianos Cp41, Lp47 e Lb83 foram mantidas armazenadas em criotubos de 2 mL em meio de cultivo líquido *De Man, Rogosa e Sharpe*

(MRS) (Neogen[®], NCM0079A, Manchester, Inglaterra), contendo 20% de solução de glicerol esterilizada, na concentração de 80%, os quais permaneceram em temperatura de congelamento (-20 °C) até o início dos ensaios.

Repiques foram realizados e os isolados foram reativados em caldo de cultivo MRS esterilizado, suplementado com glicose (2%, p/v), na proporção de 100 µL do inóculo para 5 mL do respectivo meio de cultura, e incubados em jarra de anaerobiose Permution[®] (modelo JA0400, Curitiba, PR, Brasil) com gerador de atmosfera específico Anaerobac[®] (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), em estufa para cultura bacteriológica Nova Ética (modelo 403/*D, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 35 ± 1 °C por 24 h (Ozgolet *et al.* 2022).

Em 24 h, após agitação em agitador vórtice Even[™] (modelo VX-38, Araucária, PR, Brasil), alíquotas de 100 µL dos respectivos isolados e 900 µL de água peptonada esterilizada (0,1%, p/v) usada como diluente foram tomadas para obtenção da concentração em espectrofotômetro Eppendorf[®] (modelo BioSpectrophotometer Kintetic, Barkhausenmeg, Alemanha), com densidade óptica (OD) definida de 0.75 e comprimento de onda de 595 nm. Para o branco analítico, utilizou-se o meio de cultura em substituição à alíquota dos isolados bacterianos.

No mesmo tempo (24 h), a enumeração das células viáveis foi realizada através da metodologia de Reale *et al.* (2016), utilizando a técnica do plaqueamento em superfície (em meio de cultivo esterilizado ágar MRS) através de diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-8}) em micro tubos para centrífuga, transferindo 100 µL do isolado (de mesmo tubo de cultivo preparado inicialmente para toda a metodologia) e 900 µL de água peptonada esterilizada (0,1%, p/v) como diluente. A técnica de semeio em micro gotas (10 µL) foi aplicada, em duplicata. As placas foram incubadas invertidas em anaerobiose, por 48 h, nas mesmas condições citadas anteriormente, e a contagem foi realizada selecionando as placas contendo de 25 a 250 colônias e os resultados expressos como *log* UFC/mL.

A padronização dos microrganismos foi realizada a partir da centrifugação dos isolados reativados a $4226 \times g$, a 4 °C, por 10 minutos, em centrífuga Eppendorf[®] (modelo 5430r, Barkhausenmeg, Alemanha), seguida de lavagem dupla com solução salina tamponada com fosfato esterilizado - PBS (pH 7,2, 8,0 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,42 g/L de Na₂HPO₄ e 0,24 g/L de KH₂PO₄), e ressuspensão com água destilada esterilizada até a obtenção da densidade celular de 10 *log* UFC/mL, medida em espectrofotômetro Eppendorf[®], com comprimento de onda de 595 nm, com densidade óptica definida de 0.75.

3.4.2 Desenvolvimento do fermento natural

Foram desenvolvidos fermentos naturais do tipo II com a metodologia adaptada de Ozgolet *et al.* (2022). Os isolados Cp41, Lp47 e Lb83 foram reativados em caldo de cultivo esterilizado MRS na proporção de 425 μ L do inóculo para 42,5 mL do meio de cultura, e incubados em jarra de anaerobiose Permution[®], com gerador de atmosfera específico da Anaerobac[®], em estufa para cultura bacteriológica Nova Ética[®] (modelo 403/*D, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 35 ± 1 °C por 24 h.

Após esse período, a suspensão de células de bactérias láticas foi centrifugada em centrífuga Solab[®] (modelo SL-701, São Paulo, SP, Brasil) a $4728 \times g$ por 10 minutos para precipitar o *pellet*, seguida de lavagem dupla com solução tampão PBS esterilizada, e o *pellet* de células foi ressuspensionado com água destilada esterilizada até a obtenção da densidade celular de 10 log UFC/mL, medida por espectrofotometria Eppendorf[®] com comprimento de onda de 595 nm.

Os fermentos naturais foram preparados incorporando farinha de trigo e água destilada esterilizada com o inóculo padronizado (1:0,8:0,2 p/v), correspondendo ao rendimento de massa de 200 (Equação 1). No experimento, 212,50 g de farinha de trigo foram homogeneizadas com 170 mL de água destilada esterilizada e 42,50 mL do inóculo padronizado. A mistura foi armazenada em frascos de vidro esterilizados tampados e acondicionados em uma incubadora para demanda bioquímica de oxigênio (DBO) Solab[®] (modelo SL-200, Piracicaba, SP, Brasil), a $30 \pm 0,1$ °C, durante 24 horas.

$$\text{Rendimento de massa: } \frac{\text{quantidade de farinha} + \text{quantidade de água}}{\text{quantidade de farinha}} \times 100 \quad (1)$$

3.4.3 Enumeração das células viáveis de bactérias láticas e leveduras do fermento natural e da massa fermentada

As contagens de bactérias láticas (BAL) e leveduras do fermento natural e das massas fermentadas foram realizadas em dois tempos distintos: 0 (T_0), assim que preparado e 24 (T_{24}), após o período de 24 horas de incubação na incubadora DBO.

Para a análise da viabilidade, 3 g do fermento natural e 3 g da massa fermentada foram tomados e homogeneizados em 27 g de água peptonada esterilizada (0,1%, p/v), cada, seguida de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em microtubos tipo Eppendorf[®], utilizando uma alíquota de 100 μ L. Para a enumeração de BAL, a técnica de semeio em meio sólido por microgotas (10 μ L) foi aplicada, em duplicata, utilizando placas com meio de cultura MRS (Neogen[®]), que posteriormente foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose Permution[®] com gerador

de atmosfera específico da Anaerobac[®], em estufa bacteriológica para microrganismos mesófilos Nova Ética[®] (modelo 403/*D, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 35 ± 1 °C por 24 h.

O meio de cultura de extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) com suplementação de glicose (2%, p/v) foi utilizado para a enumeração de leveduras (Merck KGaA[®], NutriSelect[™] Y1375, Darmstadt, Alemanha). O ensaio foi realizado em duplicata. A técnica de espalhamento *spread plate* foi realizada transferindo 10 µL dos respectivos tubos seriados para o meio sólido da placa de Petri e o volume foi espalhado uniformemente através de uma alça bacteriológica descartável esterilizada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica ACB Labor (Americana, SP, Brasil) a 25 ± 1 °C por 72 h.

3.4.4 Determinação de pH e acidez total titulável do fermento natural

As análises de pH e acidez total titulável foram determinadas no fermento natural antes e após a incubação (T_0 e T_{24}), de acordo com a metodologia proposta por Luti *et al.* (2020). O ensaio foi realizado em triplicata. O pH foi medido através de um potenciômetro digital MS Tecnon[®] (modelo LUCA mPA210, São Paulo, Brasil) previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0. O ensaio do pH e acidez foi realizado homogeneizando 10 g do fermento natural em 90 mL de água destilada, com auxílio de uma barra magnética em um agitador magnético Solab[®] (modelo SL-95, Piracicaba, SP, Brasil) por 3 minutos para homogeneização e dissolução do material. A acidez total titulável foi determinada pelo método titulométrico e a suspensão obtida pela análise do pH foi titulada com NaOH 0.1 mol/L utilizando uma solução indicadora de fenolftaleína (1%, p/v) até atingir um pH final de 8,3. Os resultados foram expressos em mL de solução molar (NaOH 0.1N) por cento (v/m).

3.4.5 Determinação de exopolissacarídeos (EPS) do fermento natural

A determinação de EPS foi realizada conforme a metodologia de Ketabi *et al.* (2008), adaptada por Zhang *et al.* (2023), com modificações. O ensaio foi realizado em triplicata. Foram diluídos 4 g de cada amostra de fermento natural em 8 mL de água ultrapura (1:2 p/v). A solução foi mantida resfriada a 4 °C e agitada manualmente em intervalos de 10 minutos, por 1 hora. Em seguida foi submetida a centrifugação em centrífuga Eppendorf[®], a 6000 rpm ($5631 \times g$), a 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante foi precipitado pela adição de etanol frio (95% v/v, 4 °C) em volume equivalente ao dobro do seu volume, seguido de armazenamento sob refrigeração

(4 °C) por 24 horas.

No dia seguinte, o precipitado foi coletado por centrifugação durante 30 minutos nas mesmas condições anteriores e o volume foi dissolvido em 800 µL de água ultrapura. Dois volumes de álcool etílico absoluto frio (95% v/v, 4 °C) foram adicionados e aplicada uma nova centrifugação. O precipitado foi submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar ACB Labor (modelo AC-033/180, Americana, SP, Brasil) a $55 \pm 0,5$ °C, até peso constante em balança de precisão analítica BEL Engineering® (modelo M214-A, Milano, Itália). A quantidade de polissacarídeos no fermento natural foi considerada como o EPS produzido pelas BAL e polissacarídeos da farinha de trigo (g/Kg de farinha de trigo).

3.4.6 Formulação dos pães de fermentação natural

Três formulações de pães foram desenvolvidas (Tabela 1), seguindo metodologia de Ozgolet *et al.* (2022) e Verdonick *et al.* (2023), com adaptação na proporção dos ingredientes e nos tempos de fermentação, respectivamente. Os pães foram elaborados adotando tempos distintos de fermentação da massa (2, 3 e 4 horas). Uma formulação controle sem a adição do fermento natural, contendo apenas a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, foi incluída nos experimentos. Os ensaios-piloto e os experimentos que definiram a formulação foram realizados em triplicata para cada tempo definido.

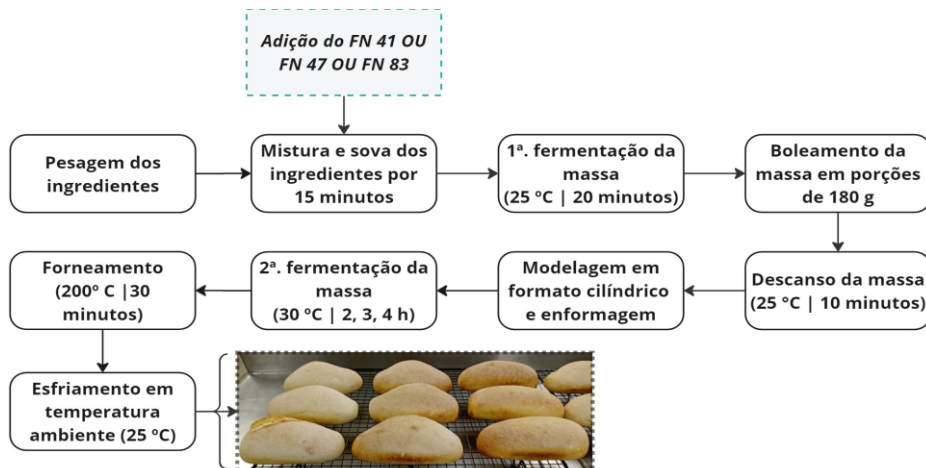
Tabela 1. Formulações dos pães inoculados com os isolados *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), e formulação controle (não inoculado), elaboradas em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.

Ingredientes	Formulações			
	Controle	SBCp41	SBLp47	SBLb83
Farinha de trigo branca	100 g	100 g	100 g	100 g
Água	62 g	52 g	52 g	52 g
Fermento natural	0	50 g	0	0
Fermento natural	0	0	50 g	0
Fermento natural	0	0	0	50 g
Fermento comercial	0,3 g	0,3 g	0,3 g	0,3 g
Sal refinado	2 g	2 g	2 g	2 g
Relação água/farinha	0,62	0,52	0,52	0,52

SB: sourdough bread (pão de fermentação natural). Fonte: elaborado pelo autor (2025).

A produção dos pães de fermentação natural está ilustrado na Figura 4. A produção do pão controle (não inoculado) obedeceu a mesma dinâmica das demais formulações que contém o fermento natural.

Figura 4 - Fluxograma da produção dos pães inoculados com Cp41, Lp47, Lb83 brevis 83 e formulação controle (não inculado), e fermentados em diferentes tempos (2, 3 e 4 horas).



FN41 (Fermento natural inoculado com *Companilactobacillus paralimentarius* 41), FN47 (Fermento natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47); FN83 (Fermento natural inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83). Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Na primeira etapa, os ingredientes farinha de trigo, sal, fermento biológico comercial, fermento natural e água gelada (4 °C) foram pesados em balança eletrônica Even™ (modelo B-15-110y, Araucária, PR, Brasil). Em seguida, os ingredientes foram misturados e sovados em sovadeira industrial Arke® (modelo SF-300, Caxias do Sul, RS, Brasil) por 15 minutos.

Na terceira etapa, as massas foram dobradas duas vezes e descansadas em temperatura ambiente a 25 °C por 20 minutos (primeira fermentação). Na quarta e quinta etapas, as massas fermentadas foram boleadas e descansadas novamente por 10 minutos. Na sexta e sétima etapas, as massas fermentadas foram modeladas em formato cilíndrico alongado, em porções de 180 gramas, acomodadas em formas de papel forneáveis Ecopack® (Indaiatuba, SP, Brasil) e incubadas para fermentação em uma incubadora DBO a $30 \pm 0,1$ °C pelos tempos distintos definidos de 2, 3 e 4 horas. Na oitava etapa, as massas foram forneadas em forno turbo à gás Venâncio (modelo FVT5D, Venâncio Aires, RS, Brasil), pré-aquecido, a 200 ± 1 °C por 30 minutos. Por fim, os pães foram resfriados em temperatura ambiente (25 °C) por 2 horas, e acondicionados e identificados em sacos plásticos de polietileno para alimentos Orleplast™ (Orleans, SC, Brasil) até o momento da realização das análises.

3.4.7 Determinação de pH e acidez total titulável dos pães de fermentação natural

Os pães produzidos foram submetidos às análises de pH e acidez total titulável de acordo com a metodologia descrita na subseção 3.4.4. O ensaio foi realizado homogeneizando 3 g de

pão moído manualmente em 27 mL de água destilada. Os resultados foram expressos em mL de solução molar (NaOH 0.1N) por cento (v/m).

3.4.8 Determinação do volume específico dos pães de fermentação natural

Após 2 horas de resfriamento em temperatura ambiente, os pães foram submetidos a determinação do volume específico através do método de deslocamento de sementes (AACCI, 2001), adaptado com a utilização de sementes de milho-painço (*Setaria italica* (L.) P.Beauv.) e de um cilindro graduado de 602,36 cm³ (Qualividros[®], Passos, MG, Brasil). O ensaio foi realizado em triplicata. As amostras foram pesadas em balança eletrônica Even (modelo B-15-110y, Araucária, PR, Brasil), com resolução de 0,5 g. O parâmetro foi calculado como a razão do volume (cm³) pela massa do pão (g), com o resultado expresso em cm³/g, conforme equação 2 abaixo:

$$\text{Volume específico: } \frac{\text{volume do pão (cm}^3\text{)}}{\text{massa do pão (g)}} \quad (2)$$

3.4.9 Digestibilidade da proteína *in vitro* dos pães de fermentação natural

Os valores da digestibilidade da proteína *in vitro* dos pães foram determinados de acordo com a metodologia de Rizzello *et al.* (2014), adaptada de Akeson e Stahmann (1964). O ensaio foi realizado em triplicata e engloba as etapas de digestão gástrica e intestinal. Uma amostra de 1 g do pão moído foi incubada com 1,5 mg da enzima pepsina e 15 mL de HCl a 0,1 M em banho-maria Solab[®] (modelo SL-154/10, São Paulo, SP, Brasil) por 3 horas a 37 °C. Em seguida, a amostra foi neutralizada com NaOH a 2 M, adicionada de 4 mg da enzima pancreatina e de 7,5 mL de solução tampão fosfato (pH 8,0).

O volume de 1 mL do reagente tolueno foi adicionado à solução da amostra para evitar o crescimento microbiano e a solução foi incubada em banho-maria novamente, por um período maior de 24 horas a 37 °C. A inativação enzimática da amostra foi realizada pela adição de 10 mL de ácido tricloroacético (20%, p/v) e volume foi completado com água destilada (até 100 mL). A solução foi centrifugada em centrífuga Eppendorf[®] a 5000 rpm (3916 × g) por 20 minutos e a concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976).

O preparo do reagente de Bradford foi realizado ao dissolver 20 mg de azul de Coomassie Brilhante G 250 em 10 mL de etanol (95%, v/v). Em seguida, a solução foi

homogeneizada com o auxílio de uma barra magnética em agitador Solab[®] por 1 hora protegida da luz. Por fim, a solução foi vertida em um balão volumétrico de 200 mL protegido da luz, seguido da adição de 20 mL de ácido fosfórico (85%, p/v) e o volume foi completado com água ultrapura. A solução foi filtrada com papel filtro qualitativo 80 g/m² Unifil[®] (Alvorada, RS, Brasil), armazenada em frasco âmbar protegida da luz e armazenada sob refrigeração (4 °C) até sua utilização.

Para compor a curva analítica (Tabela 2), em ambiente protegido da luz, tubos de ensaio seriados, em triplicata, foram adicionados de variadas concentrações de solução tampão (pH 8,0) (1000-550 µL) e de solução de albumina de soro bovino (BSA) (0-450 µL) (10 mg de BSA em 10 mL de água ultrapura, seguidos de agitação em vórtice Even[™] (modelo VX-38, Araucária, PR, Brasil).

Tabela 2 – Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica com albumina bovina como padrão para determinação da concentração proteica pelo método de Bradford (1976).

Tubos seriados	Concentração final de albumina (BSA) (mg/mL)	Solução de albumina (BSA) (µL/mL)	Solução tampão (pH 8,0) (µL)	Reagente de Bradford (µL)
Branco	0	0	1000	2500
1	0,10	100	900	2500
2	0,20	200	800	2500
3	0,25	250	750	2500
4	0,35	350	650	2500
5	0,45	450	550	2500

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

A concentração de proteína foi determinada após 5 minutos de repouso das diluições seriadas através de absorbância em espectrofotômetro Eppendorf[®] com comprimento de onda de 595 nm. A partir da curva-padrão foi possível calcular a equação da reta a ser utilizada nos cálculos das concentrações de proteína das amostras.

A determinação da concentração de proteína dos pães foi realizada em espectrofotômetro Eppendorf[®], segundo metodologia de Tallon, Bressollier e Urdaci (2003) e Abedfar *et al.* (2018). A análise foi realizada em triplicata. Em ambiente protegido da luz, uma alíquota de 100 µL de cada tubo amostral foi tomada e adicionado o volume de 2,5 mL do reagente de Bradford. A solução foi agitada em agitador vórtice Even[™]. Uma alíquota de 100 µL de água deionizada e 2,5 mL do reagente de Bradford foram tomados como o branco analítico amostral. A concentração de proteína foi determinada após 5 minutos através de absorbância em espectrofotômetro Eppendorf[®] com comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram expressos como a porcentagem da proteína total solubilizada após hidrólise enzimática, conforme a equação 3 abaixo:

$$\text{Digestibilidade da proteína in vitro (\%)} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde C_i é a concentração inicial de proteínas na amostra antes da hidrólise e C_f é a concentração final de proteínas na amostra após a hidrólise.

3.4.10 Digestibilidade do amido *in vitro* dos pães de fermentação natural

O ensaio da digestibilidade do amido *in vitro* foi realizado para quantificar a glicose liberada após 20 e 120 minutos, de acordo com a metodologia de Englyst, Hudson e Englyst (2006), adaptada por Yaman, Sargin e Mizrak (2019). Um grama da amostra de pão moída manualmente foi adicionada a 10 mL da solução enzimática de pepsina-goma guar, seguida de incubação em incubadora Lucadema (modelo Luca-223, São José do Rio Preto, SP, Brasil) a 37 °C por 30 minutos.

Posteriormente, 10 mL de uma solução de acetato de sódio 0,25 mol/L foi adicionado às amostras, juntamente com cinco esferas de vidro (1 cm de diâmetro) para auxiliar na homogeneização. Uma solução enzimática de pancreatina, amiloglucosidade e invertase (5 mL) foi adicionada, e as amostras foram incubadas em banho-maria Solab® (modelo SL-154/10, São Paulo, Brasil) com agitação a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Após 20 e 120 minutos, respectivamente, alíquotas de 0,5 mL de cada amostra foram tomadas, adicionadas de 20 mL de álcool etílico absoluto e centrifugadas em centrífuga Eppendorf® (modelo 5430r, Barkhausenmeg, Alemanha) a 4000 rpm ($2501 \times g$) por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria fervente Solab® por 10 minutos e submetidas a análise da glicose liberada através do método de açúcares redutores utilizando ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNSA), com metodologia proposta por Wood *et al.* (2012).

A determinação de açúcares redutores foi realizada tomando 50 µL de cada amostra hidrolizada em 1 mL da solução de DNSA (10 g/L), tartarato de sódio e potássio (30 g/L) e NaOH (16 g/L) e depois aquecida em banho-maria Solab® a 100 °C por 5 minutos. Posteriormente a amostra foi resfriada em banho de água fria, seguido de leitura em espectrofotômetro Eppendorf® com comprimento de onda de 540 nm. Para a calibração do equipamento foi utilizada água deionizada como branco analítico. Os valores das leituras obtidas foram utilizados para os cálculos da curva de hidrólise.

O índice glicêmico estimado (eGI) foi calculado a partir do valor do índice de hidrólise (HI) da amostra. O valor do HI foi obtido através de um modelo não-linear (Matthews *et al.*, 1990), sendo calculado a área sob a curva da hidrólise (AUC, entre 0-120 minutos) dividida pela área sob a curva do pão controle (não inoculado, contendo apenas o extrato de levedura

seca ativa comercial *Saccharomyces cerevisiae*). O eGI foi calculado baseado no HI e na equação 4 descrita por Goñi, Garcia-Alonso e Saura-Calixto (1997).

$$eGI (\%) = (0.549 \times HI) + 39,71 \quad (4)$$

Onde HI é o índice de hidrólise

3.4.11 Determinação da atividade antioxidante dos pães de fermentação natural

Os extratos da amostra dos pães para os ensaios da atividade antioxidante e compostos fenólicos totais foram preparados de acordo com Sagar e Pareek (2021), com adaptação no tempo de extração da amostra e utilizados assim que obtidos. Para a obtenção da solução, 1 g da amostra moída (pão) foi submetido à extração em uma solução aquosa de 10 mL de álcool metílico (80%, v/v) por 24 horas, sob refrigeração (4 °C), protegida da luz. A solução foi centrifugada em centrífuga MPW Med. instruments® (modelo MPW-351R, Varsóvia, Polônia) a $6000 \times g$, a 4 °C, por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado sob filtração em papel filtro qualitativo 80 g/m² Unifil® (Alvorada, RS, Brasil) em um novo tubo de centrífuga igualmente protegido da luz.

3.4.11.1 Atividade de eliminação do radical livre DPPH•

A capacidade de eliminação do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi determinada de acordo com a metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Krupa-Kozak *et al.* (2022), com adaptação nas alíquotas para leitura através de microplaca de poliestireno de 96 poços (300 µL) Global Plast (Jaboticabal, SP, Brasil), na concentração da curva-padrão (10-100 µM) e comprimento de onda de 515 nm. Uma solução-padrão de Trolox® a 2 mM (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) foi preparada avolumando 25 mg do reagente em 50 mL de álcool etílico absoluto. Em um ambiente escuro, soluções etanólicas de concentrações conhecidas do reagente Trolox® em meio de álcool etílico absoluto foram utilizadas para construir a curva-padrão analítica, com três replicatas em cada nível, em microtubos para centrífuga (Tabela 3).

Tabela 3. Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica para a análise da atividade de eliminação do radical livre DPPH^{*}, em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).

Microtubo	Concentração (µM)	Solução-padrão Trolox [®] (µL)	Álcool etílico absoluto (µL)	Volume final (µL)
1	10	5	995	1000
2	40	20	980	1000
3	60	30	970	1000
4	80	40	960	1000
5	100	50	950	1000

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Os microtubos foram homogeneizados em agitador de tubos Tecnal[®] (Phoenix Ap 56, Piracicaba, SP, Brasil) e alíquotas de 50 µL de cada concentração contendo o padrão Trolox[®] foram adicionadas a microplaca, seguidos de 250 µL da solução de trabalho do radical livre DPPH^{*} (0,06 mM) [2,4 mg do reagente em 100 mL de álcool etílico absoluto]. Para o branco analítico, foi utilizado 300 µL de álcool etílico absoluto e para o controle negativo, 50 µL de álcool etílico absoluto e 250 µL da solução de trabalho do radical DPPH^{*}. A microplaca foi incubada durante 6 minutos em temperatura ambiente (22 °C), protegida da luz e em seguida a absorbância foi medida em espectrofotômetro BioTek Instruments Inc., atualmente Agilent[®] (modelo EON, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) com comprimento de onda de 515 nm.

Para a realização dos ensaios com as amostras de pães, uma alíquota do extrato da amostra e de água destilada foram transferidas para microtubos de centrífuga em quatro concentrações distintas (Tabela 4) e agitados em agitador de tubos Tecnal[®] (Phoenix Ap 56, Piracicaba, SP, Brasil).

Tabela 4. Preparo das amostras para as análises da atividade de eliminação do radical livre DPPH^{*}, atividade de captura do radical livre ABTS^{*} e potencial antioxidante de redução de ferro FRAP em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).

Microtubo	Fator de diluição	Extrato da amostra (µL)	Água destilada (µL)	Volume final (µL)
1	4	250	750	1000
2	2	500	500	1000
3	1,3	750	250	1000
4	1	1000	0	1000

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

O ensaio com os pães foi realizado em três replicatas de cada amostra e em seus tempos de fermentação (2, 3 e 4 h). Em ambiente escuro, uma alíquota de 50 µL de cada concentração contendo o extrato de pão foi adicionada a microplaca (Global Plast, Jaboticabal, SP, Brasil), seguido do volume de 250 µL da solução de trabalho do radical livre DPPH^{*} (0,06 mM). Para o branco analítico, foi utilizado 300 µL de álcool metílico (80%, v/v) e para o controle negativo,

50 μL de álcool metílico (80%, v/v) e 250 μL da solução de trabalho do radical DPPH $\cdot$. A microplaca foi deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (22 °C), protegida da luz, antes de proceder com a leitura utilizando os mesmos parâmetros da curva-padrão. As absorvâncias obtidas de cada concentração foram ajustadas a equação da reta da regressão linear da curva-padrão, sendo os valores expressos em μmol de Equivalente Trolox $^{\text{®}}$ (ET) por 100 gramas da amostra ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ de amostra).

3.4.11.2 Atividade de captura do radical livre ABTS $\cdot$

A atividade de captura do radical livre ABTS $\cdot$ foi determinada de acordo com a metodologia de Re *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2022), com adaptação no tempo de incubação (6 minutos). O preparo do radical livre ABTS $\cdot$ foi realizado através da homogeneização de 5 mL da solução estoque de ABTS $\cdot$ 7 mM (3,84 g/L) com 88 μL de persulfato de potássio 140 mM (37,84 g/L), repousado em temperatura ambiente (22 °C), protegido da luz, por 16 h. A solução de trabalho ABTS $\cdot$ foi obtida tomando uma alíquota de 1 mL da solução estoque ABTS $\cdot$ e diluindo-a em álcool etílico absoluto até a leitura da absorvância de 0.700, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 734 nm (BioTek Instruments Inc., atualmente Agilent $^{\text{®}}$).

Em um ambiente escuro, alíquotas conhecidas de solução padrão de Trolox $^{\text{®}}$ (0,025 g em 50 mL de álcool etílico absoluto) foram utilizadas para construir a curva-padrão, com três replicatas em cada nível, em microtubos para centrífuga (Tabela 5).

Tabela 5. Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica para a atividade sequestradora do radical livre ABTS $\cdot$ em pães de fermentação natural e formulação controle (não inculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).

Microtubo	Concentração (μM)	Solução-padrão de Trolox $^{\text{®}}$ (μL)	Álcool etílico absoluto (μL)	Volume final (μL)
1	10	5	995	1000
2	20	10	990	1000
3	30	15	985	1000
4	40	20	980	1000
5	50	25	975	1000

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Para a realização dos ensaios com as amostras de pães, foi adotada a mesma concentração utilizada na análise da atividade de eliminação do radical livre DPPH $\cdot$. O ensaio foi realizado em três replicatas de cada amostra e em seus tempos de fermentação (2, 3 e 4 h). Uma alíquota de 50 μL de cada concentração dos microtubos para centrífuga (Tabela 5)

contendo o extrato de pão, foi adicionada a microplaca de 96 poços (Global Plast, Jaboticabal, SP, Brasil), seguida do volume de 250 μL da solução de trabalho do radical livre ABTS[•]. Para o branco analítico, foi utilizado 300 μL de álcool metílico (80%, v/v) e para o controle negativo, 50 μL de álcool metílico (80%, v/v) e 250 μL da solução de trabalho do radical livre ABTS[•]. A microplaca foi deixada em repouso por 6 minutos em temperatura ambiente (22 °C), protegida da luz, antes de proceder com a leitura utilizando os mesmos parâmetros da curva-padrão. As absorbâncias obtidas de cada concentração foram ajustadas a equação da reta da regressão linear da curva-padrão, sendo os valores expressos em μmol de Equivalente de Trolox[®] (ET) por 100 gramas de amostra ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ de amostra).

3.4.11.3 Potencial antioxidante de redução de ferro FRAP

O poder antioxidante redutor de íons férricos (FRAP) foi determinado de acordo com a metodologia de Benzie e Strain (1996) e Krupa-Kozak *et al.* (2022), com adaptação nas alíquotas para leitura através de microplaca de poliestireno de 96 poços (300 μL) (Global Plast, Jaboticabal, SP, Brasil), na concentração da curva-padrão (50-1000 μM), no tempo de incubação das amostras (30 minutos) e na densidade ótica (595 nm). A solução de trabalho FRAP corresponde a proporção de volume de 10:1:1 e foi preparada homogeneizando 25 mL de tampão de acetato de sódio a 0,3 M, pH 3,6 (0,310 g do reagente com 1,6 mL de ácido acético glacial avolumados em 100 mL de água destilada), 2,5 mL da solução aquosa de cloreto férrico III a 20 mM (0,540 g em 100 mL de água destilada) e 2,5 mL da solução de TPTZ a 10 mM (0,312 g em 100 mL de HCl a 40 mM).

Em um ambiente escuro, alíquotas conhecidas de solução padrão de sulfato ferroso a 2 mM (0,028 g em 50 mL de água destilada) em meio aquoso (1000-1950 μL), foram utilizadas para construir a curva-padrão analítica, com três replicatas em cada nível, em microtubos para centrífuga (Tabela 6).

Tabela 6. Dados utilizados para a construção da curva-padrão analítica para a análise do potencial redutor de ferro do radical livre FRAP em pães de fermentação natural e formulação controle (não inculado), elaborados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).

Microtubo	Concentração (μM)	Solução-padrão de sulfato ferroso (μL)	Água destilada (μL)	Volume final (μL)
1	50	50	1950	2000
2	250	250	1750	2000
3	500	500	1500	2000
4	1000	1000	1000	2000

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Os microtubos foram homogeneizados em agitador de tubos Tecnal[®], e em ambiente escuro, uma alíquota de 20 µL de cada concentração foi adicionada a microplaca, seguida do volume de 30 µL de água destilada e 250 µL do reagente FRAP. Para o branco analítico foi utilizado 300 µL de reagente FRAP. A microplaca foi incubada em banho-maria Kacil Ind., (modelo BM-02, Recife, PE, Brasil) por 30 minutos a $37 \pm 0,1$ °C, protegida da luz, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc., atualmente Agilent[®]), com comprimento de onda de 595 nm.

Para o ensaio com os pães, foram adotadas as mesmas concentrações do extrato da amostra e diluente utilizados para a análise da capacidade sequestradora dos radicais livres DPPH[•] e ABTS[•] (Tabela 5). O ensaio foi realizado em três replicatas de cada amostra e seus tempos de fermentação (2, 3 e 4 h). Em um ambiente escuro, uma alíquota de 20 µL de cada concentração contendo o extrato de pão foi adicionada a microplaca, seguida do volume de 30 µL de água destilada e 250 µL do reagente FRAP. Para o branco analítico foi utilizado 300 µL de reagente FRAP. A microplaca foi incubada em banho-maria Kacil Ind., por 30 minutos a $37 \pm 0,1$ °C, protegida da luz, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc., atualmente Agilent[®]), com comprimento de onda de 595 nm. As absorbâncias obtidas de cada concentração foram ajustadas a equação da reta da regressão linear da curva-padrão, sendo os valores expressos em µmol equivalentes de sulfato ferroso por 100 gramas de amostra (µmol/100 g de amostra).

3.4.12 Compostos fenólicos totais dos pães de fermentação natural

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado na determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) de acordo com metodologia de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), adaptada por Olojede *et al.* (2020), e também nas alíquotas para leitura através de microplaca de poliestireno de 96 poços, na concentração da curva-padrão (4-200 µg/mL) e no tempo de incubação das amostras (5 minutos). Foram preparadas soluções aquosas de Folin-Ciocalteu (10%, v/v), de carbonato de sódio (7,5%, p/v) e uma solução metanólica padrão de ácido gálico (500 µg/mL) para construir a curva-padrão analítica, utilizando microtubos para centrífuga (Tabela 7).

Tabela 7. Dados utilizados para a construção da curva-padrão de ácido gálico para a análise dos compostos fenólicos totais em pães de fermentação natural e formulação controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 h).

Microtubo	Concentração (µg/mL)	Solução estoque de Ácido gálico (µL)	Álcool metílico (µL)	Volume final (µL)
1	4	20	980	1000
2	6	30	970	1000
3	8	40	960	1000
4	10	50	950	1000
5	30	150	850	1000
6	40	200	800	1000
7	80	400	600	1000
8	120	600	400	1000
9	160	800	100	1000
10	200	1000	0	1000

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Para o ensaio com os pães, foram adotadas as mesmas concentrações do extrato da amostra e diluente utilizados para a determinação da atividade antioxidante (Tabela 5). O ensaio foi realizado em três replicatas de cada amostra e seus tempos de fermentação (2, 3 e 4 h). Em um ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL de cada concentração contendo o extrato de pão foi adicionada a microplaca, seguido do volume de 150 µL da solução de Folin-Ciocalteu. A mistura foi repousada por 6 minutos em temperatura ambiente (22 °C), protegida da luz, e em seguida 120 µL da solução de carbonato de sódio foram adicionados. Para o branco analítico, foi utilizado 300 µL de álcool metílico absoluto. A microplaca foi incubada em banho-maria Nova Técnica® (GQ, Piracicaba, SP, Brasil) por 5 minutos a $50 \pm 0,1$ °C, protegida da luz, e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc., atualmente Agilent®) com comprimento de onda de 765 nm. As absorbâncias obtidas de cada concentração foram ajustadas a equação da reta da regressão linear da curva-padrão, sendo os valores expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra (mg EAG/100 g).

3.4.13 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos dos pães de fermentação natural

A análise da concentração dos açúcares (maltose, glicose, frutose), álcoois (glicerol, etanol) e ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico, lático, fórmico e propiônico) das amostras de pães de fermentação natural, foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Drakula *et al.* (2021). Dez gramas de cada amostra de pão foram homogeneizados em 30 mL de água destilada por 30 minutos em um agitador magnético Even™. Em seguida, o volume foi reconstituído para 50 mL com água destilada e o conteúdo centrifugado em centrífuga

Eppendorf® a $4064 \times g$, por 5 minutos. Após o procedimento, 5 mL do sobrenadante foram coletados e 1 mL da solução aquosa de Carrez I (ferrocianeto de potássio 0,085 mol/L) e 1 mL da solução aquosa de Carrez II (sulfato de zinco 0,25 mol/L) foram adicionados. Uma nova centrifugação foi aplicada ($2501 \times g$ por 5 minutos), o extrato foi filtrado em filtro de seringa Analítica (PES, 25mm, Diadema, SP, Brasil) com poro de $0.45 \mu\text{m}$ e acondicionado sob congelamento (-18°C). As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Agilent Technologies (modelo 1260 Infinity LC, Santa Clara, CA, EUA), com equipamento acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de índice de refração (RID) e uma coluna Agilent (modelo Hi-Plex H, $7,7 \times 300 \text{ mm}$, $8 \mu\text{m}$). A eluição foi realizada a uma temperatura de 35°C , com uma solução de 5 mM de ácido sulfúrico como fase móvel, a uma vazão de 0,5 mL por minuto. Foram empregados os padrões da Sigma-Aldrich®, para a análise de açúcares e Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, para a análise dos ácidos orgânicos. Os dados foram tratados utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). Os resultados foram expressos em g/Kg.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o auxílio do *software* estatístico jamovi® (versão 2.3.28.0 Sidney, Austrália), com os resultados expressos através da estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão). A estatística inferencial foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) unidirecional para a análise da determinação de exopolissacarídeos do fermento natural. A ANOVA Fatorial de duas vias para medidas repetidas foi utilizada para comparar os três grupos independentes (grupos amostrais Cp41, Lp47 e Lb83, e quando aplicável, o grupo controle, configurando quatro grupos amostrais) avaliados através de variáveis dependentes/pareadas (tempos de fermentação dos pães – 2, 3 e 4 horas).

Os resultados das análises de viabilidade celular (contagem de BAL e leveduras), pH e acidez total titulável dos fermentos naturais nos tempos de fermentação inicial e final (T_0 e T_{24}) foram analisados por meio da ANOVA Fatorial de duas vias para medidas repetidas, a qual permite a avaliação de um fator intersujeitos (tipo de fermento, três níveis – Cp41, Lp47 e Lb83) e um fator intrasujeitos (tempo, dois níveis – T_0 e T_{24}). A escolha desse teste estatístico ao invés do teste *t* pareado de Student, justifica-se pela necessidade de comparar simultaneamente múltiplas formulações de fermentos naturais e dois tempos de fermentação, permitindo a análise dos efeitos principais de cada fator, bem como a interação entre eles, ou seja, se a variação ao longo do tempo é ou não dependente do tipo de fermento.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de homogeneidade das variâncias de Levene e, posteriormente, aplicado o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. As diferenças estatísticas foram analisadas ao nível de 5% de significância.

O grau de associação entre as variáveis quantitativas pH, acidez total titulável (TA), volume específico, digestibilidade da proteína *in vitro* (IVPD), índice glicêmico estimado (eGI), compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH[•], ABTS[•] e FRAP) foram verificados pela análise bivariada de correlação de Pearson. No tocante às variáveis de ácido orgânicos, não foram inclusos os valores de ácido málico, ácido cítrico e ácido propiônico, uma vez que tais ácidos foram quantificados em apenas uma amostra analisada, inviabilizando o teste estatístico. O tamanho do efeito da correlação foi relatado através do coeficiente de correlação (r), onde a direção da correlação foi expressa através de uma medida de força -1 e $+1$. Um valor igual a zero indica correlação nula entre as variáveis. Um coeficiente com valor igual a -1 (negativo) denota uma correlação perfeita negativa, onde quanto mais o *score* de uma variável aumenta, menos o *score* da outra variável aumenta. Quando o coeficiente resulta em um valor igual a $+1$ (positivo), denota uma correlação linear perfeita positiva, onde o aumento/diminuição do *score* de uma variável pressupõe o aumento/diminuição da outra variável. Desta forma, quanto mais os valores se aproximam de -1 ou $+1$, maior é a força/magnitude da correlação (Akoglu, 2018).

A estimativa da interação dos dados foi investigada através da Análise Multivariada de Componentes Principais (PCA), uma análise exploratória que busca reduzir a dimensionalidade dos conjuntos de dados, visando a manutenção das informações (Jolliffe, Cadima, 2016). As variáveis quantitativas analisadas foram, pH, acidez total titulável (TA), volume específico, digestibilidade da proteína *in vitro* (IVPD), índice glicêmico estimado (eGI), compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH[•], ABTS[•] e FRAP), considerando as cepas inoculadas e o controle amostral em seus tempos de fermentação, 2, 3 e 4 h. A PCA foi representada graficamente por um gráfico biplot, com dois componentes principais (PC1 e PC2), onde cada componente foi expresso em um percentual que explica a variância dos dados. O PC1 diz respeito à variância máxima (maior dispersão dos dados), abrangendo os dados mais importantes, enquanto o PC2 captura a direção seguinte, mas é menos significativo (Nowicka, Wojdyło, Laskowski, 2019). Os marcadores das variáveis quantitativas foram exibidos em vetores (setas), indicando a dispersão dos dados ao longo das diversas regiões, e os marcadores das variáveis qualitativas referentes aos pães produzidos com fermentos naturais e pão controle foram identificados com círculos pretos. Quanto maior o vetor, maior a contribuição dessa variável para a explicação da variância no eixo correspondente.

4 RESULTADOS

Seguindo as Normas do Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição (CCS-UFPB), os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de um artigo original, que aparece em Apêndice A, submetido para o periódico *International Journal of Gastronomy and Food Science*, fator de impacto 3.2.

O artigo apresentado no apêndice A “Produção inovadora de pães de fermentação natural: aproveitando bactérias láticas autóctones para otimizar a fermentação e aprimorar as propriedades funcionais” aborda o desenvolvimento de fermentos naturais do tipo II a partir de culturas iniciadoras (culturas *starters*) autóctones, no desenvolvimento de pães de fermentação natural produzidos em três tempos de fermentação distintos, 2, 3 e 4 horas, e assim investigar as propriedades funcionais desses pães.

Os resultados do trabalho apontaram que os tempos de fermentação impactaram nas características físico-químicas e funcionais das massas fermentadas e pães produzidos. As massas inoculadas apresentaram contagens elevadas de bactérias láticas e leveduras, ao final do período de quatro horas de fermentação. O desempenho da espécie *L. plantarum* 47 foi superior à *L. brevis* 83 e *C. paralimentarius* 41 quanto à produção de exopolissacarídeos no fermento natural. A fermentação reduziu a glicemia estimada para um valor próximo a um índice mediano ($73,78 \pm 0,91$) para o pão inoculado com *L. brevis* 83 após 3 horas de fermentação. Os pães inoculados com *L. plantarum* 47 e *L. brevis* 83 apresentaram maior acidez e alcançaram a maior digestibilidade protéica *in vitro*. A fermentação láctica promoveu a redução do conteúdo de açúcares, aumento da concentração de ácido láctico e consequente redução da concentração de ácido fórmico, em todos os pães de massa fermentada. Após 3 e 4 horas, o pão de massa fermentada por *L. brevis* 83 apresentou o teor mais elevado de compostos fenólicos, que se relacionou com o aumento da atividade antioxidante ao longo do processo fermentativo. A análise multivariada PCA demonstrou correlação entre a atividade antioxidante, compostos fenólicos, eGI e a digestibilidade protéica, para os pães fermentados por *L. plantarum* 47 e *L. brevis* 83, demonstrando a melhora no perfil do pão de fermentação natural. Essas espécies são consideradas culturas iniciadoras promissoras. Sugere-se o tempo de fermentação de três horas para alcançar melhores desfechos.



Confirm co-authorship of submission to International Journal of Gastronomy and Food Science

De International Journal of Gastronomy and Food Science <em@editorialmanager.com>

Data Seg, 27/01/2025 13:17

Para Tatiana Zanella Rodrigues <tatiana.zanella@academico.ufpb.br>

*This is an automated message. *

Journal: International Journal of Gastronomy and Food Science

Title: Innovative sourdough bread making: harnessing autochthonous lactic acid bacteria to optimize fermentation and enhance functional properties

Corresponding Author: Professor Estefânia Fernandes Garcia

Co-Authors: Tatiana Zanella Rodrigues, Master student; Ingrid Conceição Dantas Gonçalves, PhD; Ana Regina Simplicio de Medeiros, Master student; Maria Laysa Cirilo Barnabé, Graduate student; Gabriel Victor Pinheiro Barbosa, Graduate student; Patricia Pinheiro Fernandes Vieira, PhD; Jaelison Yandro Pereira da Silva, PhD student; Rene Pinto da Silva, PhD; Marcos dos Santos Lima, PhD; Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro, PhD; Evandro Leite de Souza, PhD; Maria Elieidy Gomes de Oliveira, PhD

Manuscript Number: **IJGFS-D-25-00110**

Dear Tatiana Zanella Rodrigues,

Professor Estefânia Fernandes Garcia submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission. Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship:

[Yes, I am affiliated.](#)

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in at <https://www.editorialmanager.com/ijgfs/>

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at estefaniafgarcia@yahoo.com.br

Thank you,

International Journal of Gastronomy and Food Science

More information and support

FAQ: What is Editorial Manager Co-Author registration?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/kw/co-author+editorial+manager/

REFERÊNCIAS

AACC. Associação Americana de Químicos de Cereais. Método 10-05.01. **Métodos de Qualidade de Cozimento. Diretrizes para Medição de Volume por Deslocamento de Colza**. 11 ed. Associação de Cereais e Grãos, Saint Paul, Minnesota, EUA, 2001. <http://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-10-05.01>.

ABEDFAR, A.; HOSSEININEZHADA, M.; SADEGHI, A.; RAEISI, M.; FEIZY, J. Investigation on “spontaneous fermentation” and the productivity of microbial exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 686-693, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.071>.

ABEDI, E; HASHEMI, S. M. B. Lactic acid production—producing microorganisms and substrates sources—state of art. **Heliyon**, v. 6, n. 10, e04974, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>.

ABDEL-NASSER, A.; HATHOUT, A. S.; BADR, A. N.; BARAKAT, O. S.; FATHY, H. M. Extraction and characterization of bioactive secondary metabolites from lactic acid bacteria and evaluating their antifungal and antiaflatoxigenic activity. **Biotechnology Reports**, v. 38, e00799, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00799>.

ABURAS, H.; İSPIRLI, H.; TAYLAN, O.; YILMAZ, M. T.; DERTLI, E.; Structural and physicochemical characterisation and antioxidant activity of an α -D-glucan produced by sourdough isolate *Weissella cibaria* MED17. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 161, p. 648–55, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.030>.

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; GARCIA-VARELA, R.; GARCIA, H. S.; MATA-HARO, V.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJOCORDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends and Food Science. Technology**. v. 75, p. 105–114, 2018. <https://doi.org/10.1517/hpp.2020.02>.

AKAMINE, I. T.; MANSOLDO, F. R. P.; VERMELHO, A. B. Probiotics in the sourdough bread fermentation: current status. **Fermentation**, v. 9, n. 2, p. 90, 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020090>.

AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964. <https://doi.org/10.1093/jn/83.3.257>.

AKOGLU, H. User's guide to correlation coefficients. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 3, p. 91-93, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>.

AKTEPE, Y.; AYDIN, F.; BOZOĞLU, T.; ÖZER, G.; ÇAKIR, İ. Molecular characterization and multifunctional evaluation of lactic acid bacteria isolated from traditional sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 423, 110845, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110845>.

ALBAGLI, G.; SCHWARTZ, I. D. M.; AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FINOTELLI, P. V. How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread. **LWT -**

Food Science and Technology, v. 149, e11188, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111888>.

ALBAGLI, G.; FINOTELLI, P. V.; FERREIRA, T. F.; AMARAL, P. F.F. Toward sourdough microbiome Data: a review of science and patents. **Foods**, 2023, v. 12, n. 420, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12020420>.

ALBERTSEN, L.; WIEDMANN, K. P.; SCHMIDT, S. The impact of innovation-related perception on consumer acceptance of food innovations–Development of an integrated framework of the consumer acceptance process. **Food Quality and Preference**, v. 84, e103958, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103958>.

ALKAY, Z. FALAH, F.; CANKURT, H, DERLI, E. Exploring the nutritional impact of sourdough fermentation: its mechanisms and functional potential. **Foods**, v. 13, n. 11, p. 1732, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13111732>.

ANGELINO, D.; COSSU, M.; MARTI, A.; ZANOLETTI, M.; CHIAVAROLI, L, BRIGHENTI, F.; DEL RIO, D.; MARTINI, D. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. **Food & Function**, v. 8, n. 7, p. 2368-2393, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7fo00574a>.

ANTOIGNONI, F.; MANDRIOLI, R.; POTENTE, G.; TANEYO SAA, D.L.; GIANOTTI, A. changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. **Food Chemistry**, v. 292, p. 211–216, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.061>.

ANUMUDU, C. K.; MIRI, T.; ONYEAKA, H. Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. **Foods**, v. 13, n. 23, 3714. <https://doi.org/10.3390/foods13233714>.

ARORA, K.; AMEUR, H.; POLO, A.; DI CAGNO, R.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: a systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 71-83, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>.

ARRANZ-OTAEGUI, A.; GONZALEZ CARRETERO, L.; RAMSEY, M. N.; FULLER, D. Q.; RICHTER, T. Archaeobotanical evidence reveals the origins of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, p. 7925–7930, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801071115>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA. ABIC. Indicadores da panificação e superação dos desafios, 2022. Disponível em: https://www.abip.org.br/site/wp-content/uploads/2022/09/EBOOK_-_IDEAL_-_INDICADORES_JANEIRO_A_MAIO_2022_-_BR.pdf. Acesso em: 03 out. 2023.

BANGAR, S. P.; SHARMA, N.; KUMAR, M.; OZOGUL, F.; PREWAL, S.S.; TRIF, M. Recent developments in applications of lactic acid bacteria against mycotoxin production and fungal contamination. **Food Bioscience**, v. 44, 101444, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101444>.

BARROS, C. P.; GUIMARÃES, J. T.; ESMERINO, E.A.; DUARTE, M. C. K.; SILVA, M.

C.; SILVA, R.; FERREIRA, B. M.; SANT'ANA, A. S.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. **Current Opinion Food Science**. v. 32, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>.

BARTKIENE E.; ÖZOGUL F.; ROCHA, J. M. Bread sourdough lactic acid bacteria technological, antimicrobial, toxin-degrading, immune system-, and faecal microbiota-modelling biological agents for the preparation of food, nutraceuticals and feed. **Foods**, v.11, n. 452, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11030452>.

BARTOS, A.; MALIK, A.; DIOWKSZ, A.; PODOLSKA, G.; LESZCZYŃSKA, J. Evaluation of sourdough bread and its potential use in support of the treatment of chronic non-communicable diseases. **Nutrients**. v. 16, n 15, 2485, 2024. <https://doi.org/10.3390/nu16152485>.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BO, S.; SELETTTO, M.; CHOC, A.; PONZO, V.; LEZO, A. Demagistris, A.; Gambino, R. The acute impact of the intake of four types of bread on satiety and blood concentrations of glucose, insulin, free fatty acids, triglyceride and acylated ghrelin. A randomized controlled cross-over trial. **Food Research International**, v. 92, p. 40-47, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.019>.

BOAKYE, P. G.; KOUGBLENOU, I.; MURAI, T.; OKYERE, A. Y.; ANDERSON, J., BAJGAIN, P.; ANNOR, G. A. Impact of sourdough fermentation on FODMAPs and amylase-trypsin inhibitor levels in wheat dough. **Journal of Cereal Science**, v. 108, e103574, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103574>.

BRADFORD, M. A Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

BRAND WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

BRANDT, M. J. Industrial production of sourdoughs for the baking branch—An overview. **Int. Journal Food Microbiology**, v. 302, p. 3-7, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.008>.

BRANDT, M. J. **Sourdough em um contexto regulatório**. In: Gobbetti, M., Gänzle, M. (eds) Handbook on sourdough biotechnology. Springer, Cham, 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_6.

BROWN, L.; PINGITORE, E.V., MOZZI, F.; SAAVEDRA, L.; VILLEGAS, J.M.; HEBERT, E.M. Lactic acid bacteria as cell factories for the generation of bioactive peptides. **Protein & Peptide Letter**, v. 24, p. 146-155, 2017. <https://doi.org/10.2174/0929866524666161123111333>.

- ÇAKIR, E.; ARICI, M.; DURAK, M. Z. The molecular and technological characterization of lactic acid bacteria in einkorn sourdough: effect on bread quality. **Food Measure**, v. 14, p. 1646–1655, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00412-5>.
- CALVERT, M. D.; MADDEN, A. A.; NICHOLS, L. M.; HADDAD, N. M.; LAHNE, J.; DUNN, R. R.; MCKENNEY, E. A. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. **PeerJ**, v. 9, e11389, 2021. <https://doi.org/10.7717/peerj.11389>.
- CAPPELLE, S.; GUYLAINE, L.; GÄNZLE, M.; GOBBETTI, M. History and social aspects of sourdough. In: Gobbetti, M., Gänzle, M. (eds) **Handbook on Sourdough Biotechnology**, Springer, Cham., p. 1-13, 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_1.
- CANESIN, M. R.; CAZARIN, C. B. B. Nutritional quality and nutrient bioaccessibility in sourdough bread. **Current Opinion in Food Science**, v. 40, p. 81-86, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.007>.
- CARBONETTO, B.; NIDELET, T.; GUEZENEC, S.; PEREZ, M.; SEGOND, D., SICARD, D. Interactions between *Kazachstania humilis* yeast species and lactic acid bacteria in sourdough. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 240, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020240>.
- CHAVAN, R. S.; CHAVAN, S. R. Sourdough technology - a traditional way for wholesome foods: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 169-182, 2011. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2011.00148.X>.
- CHAVES-LÓPEZ, C.; ROSSI, C.; MAGGIO, F.; PAPARELLA, A.; SERIO, A. Changes occurring in spontaneous maize fermentation: an Overview. **Fermentation**, v. 6, n. 36, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010036>.
- CHIVA, R.; CELADOR-LERA, L.; UÑA, J. A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, A.; ESPINOSA-ALCANTUD, M.; MATEOS-HORGANERO, E. Yeast biodiversity in fermented doughs and raw cereal matrices and the study of technological traits of selected strains isolated in Spain. **Microorganisms**, v. 9, n. 47, 2021. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9010047>.
- COLOSIMO, R., GABRIELE, M., CIFELLI, M., LONGO, V., DOMENICI, V., PUCCI, L. The effect of sourdough fermentation on *Triticum dicoccum* from garfagnana: 1H NMR characterization and analysis of the antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 305, e 125510, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125510>.
- COMASIO, A.; VERCE, M.; VAN KERREBROECK, S.; DE VUYST, L. Diverse microbial composition of sourdoughs from different origins. **Frontiers in Microbiology**, v.11, n. 1212, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01212>.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Análises do mercado agropecuário e extrativista**. Análises do mercado. Análise mensal. Trigo. Superintendência de Estudos de Mercado e Gestão da Oferta. Dezembro de 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-trigo>. Acesso em: 05 fev. 2025.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L. Lactobacilli in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p. 539-558, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001>.

CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; LICEAGA, A. M.; AGUILAR-TOALÁ, J. E. Postbiotics and paraprobiotics: from concepts to applications. **Food Research International**, v. 136, 109502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>.

D'AMICO, V.; GÄNZLE M.; CALL, L.; ZWIRZITZ, B.; GRAUSGRUBER, H.; D'AMICO, S.; BROUNS, F. Does sourdough bread provide clinically relevant health benefits? **Frontiers in Nutrition**, v. 20, n. 10, e1230043, 2023. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1230043>.

DAS, S.; PEGU, K.; ARYA, S. S. Functional sourdough millet bread rich in dietary fibre-an optimization study using fuzzy logic analysis. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 26, p. 100279, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2021.100279>.

DE VERO, L.; IOSCA, G.; GULLO, M.; PULVIRENTI, A. Functional and healthy features of conventional and non-conventional sourdoughs. **Applied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3694, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11083694>.

DE VUYST, L.; GONZÁLEZ-ALONSO, V.; WARDHANA, Y.R.; PRADAL, I. **Taxonomy and Species Diversity of Sourdough Lactic Acid Bacteria**. In: Gobbetti, M., Gänzle, M. (eds) Handbook on Sourdough Biotechnology. Springer, Cham, 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_6.

DE VUYST, L.; COMASIO, A.; KERREBROECK, S. V. Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 15, p. 2447-2479., 2021. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1976100>.

DE VUYST, L.; HARTH, H.; VAN KERREBROECK, S.; LEROY, F. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 26-34, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>.

DE VUYST, L.; VAN KERREBROECK, S.; LEROY, F. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 100, p. 49–160, 2017. <https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2017.02.003>.

DE SORDI, J. O. **Desenvolvimento de projeto de pesquisa**. 1 ed. São Paulo: Saraiva, 2017, 206p.

DEMIRBAŞ, F.; İSPIRLİ, H.; KURNAZ, A. A.; YILMAZ, M. T.; DERTLI, E. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 361-366, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.067>.

DEMIRKESEN-BİCAK, H.; ARICI, M.; YAMAN, M.; KARASU, S.; SAGDIC, O. Effect of

different fermentation condition on estimated glycemic index, *in vitro* starch digestibility, and textural and sensory properties of sourdough bread. **Foods**. v. 10, n. 3, p. 514, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10030514>.

DENTICE MAIDANA, S.; ARISTIMUÑO FICOSECO, C.; BASSI, D.; COCCONCELLI, P. S.; PUGLISI, E.; SAVOY, G.; VIGNOLO, G.; FONTANA, C. Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented chia sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 316, e08425, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108425>.

DIANA, M.; QUÍLEZ, J.; RAFECAS, M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 407-420, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.004>.

DIMIDI, E.; COS, S. R.; ROSSI, M.; WHELAN, K. Fermented Foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 8 p. 1806, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>.

DRAKULA, S.; NOVOTNI, D.; MUSTAČ, N. C.; VOUČKO, B.; KR PAN, M.; HRUŠKAR, M.; ČURIĆ, D. Alteration of phenolics and antioxidant capacity of gluten-free bread by yellow pea flour addition and sourdough fermentation. **Food Bioscience**, v. 44, p. 101424, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101424>.

ENGLYST, K. N.; HUDSON, G. J.; ENGLYST, H. N. **Starch Analysis in Food**. Englyst Carbohydrate Services, Eastleigh, UK. Encyclopedia of Analytical Chemistry, Online. 2006 John Wiley & Sons, Ltda. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1029>.

FALASCONI, I.; FONTANA, A.; PATRONE, V.; REBECCHI, A.; GARRIDO, G. D.; PRINCIPATO, L.; CALEGUARI, M. L.; SPIGNO, G.; MORELLI, L. Genome-assisted characterization of *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria*, and *Weissella confusa* strains isolated from sorghum as starters for sourdough fermentation. **Microorganisms**. v. 8, 1388, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091388>.

FEKRI, A.; ABEDINZADEH, S.; TORBATI, M.; AZADMARD-DAMIRCHI, S.; SAVAGE, G. P. Considering sourdough from a biochemical, organoleptic, and nutritional perspective. **Journal of Food Composition and Analysis**.v.125, e105853, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105853>.

FERNÁNDEZ-PELÁEZ, J.; PAESANI, C.; GÓMEZ, M. Sourdough technology as a tool for the development of healthier grain-based products: an update. **Agronomy** , v. 10, n. 12, 1962, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121962>.

FU, W.; XUE, W.; LIU, C.; TIAN, Y.; ZHANG, K.; ZHU, Z. Screening of lactic acid bacteria and yeasts from sourdough as starter cultures for reduced allergenicity wheat products. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 751. 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9060751>.

FUJIMOTO, A.; ITO K.; NARUSHIMA, N.; MIYAMOTO, T. Identification of lactic acid bacteria and yeasts, and characterization of food components of sourdoughs used in Japanese bakeries. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, p. 575-581, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.014>.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 37, p. 2-10, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007>.

GÄNZLE, M. G.; JINSHUI, Z. Lifestyles of sourdough lactobacilli - Do they matter for microbial ecology and bread quality? **International journal of food microbiology**, v. 302, p. 15-23, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.019>.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106-117, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.

GALLI, V.; VENTURI, M.; PINI, N.; GUERRINI, S.; GRANCHI, L.; VINCENZINI, M. Liquid and firm sourdough fermentation: microbial robustness and interactions during consecutive backslappings. **LWT - Food Science and Technology**, v. 105, p. 9-15, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.02.004>.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 7 ed. São Paulo: Atlas, 2022, 192p.

GIL-CARDOSO, K. et al. Consumption of sourdough bread improves postprandial glucose response and produces sourdough-specific effects on biochemical and inflammatory parameters and mineral absorption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 3044-3059, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07200>.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; PONTONIO, E.; DI CAGNO, R.; DE 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022>.

GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; CALASSO, M.; ARCHETTI, G.; RIZZELLO, C. G. Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 103-113, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018>.

GOÑI, I.; GARCIA-ALONSO, A.; SAURA-CALIXTO, F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. **Nutrition Research**, v. 17, n. 3, p. 427-437, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(97\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00010-9).

GONZÁLEZ-ALONSO, V.; PRADAL, I.; WARDHANA, Y. R.; CNOCKAERT, M.; WIEME, A. D.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L.. Microbial ecology and metabolite dynamics of backslapped triticale sourdough productions and the impact of scale. **International Journal of Food Microbiology**, v. 408, n. 2, e110445, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110445>.

GRAÇA, C.; LIMA, A.; RAYMUNDO, A.; SOUSA, I. Sourdough fermentation as a tool to improve the nutritional and health-promoting properties of its derived-products. **Fermentation**, v. 7, n. 246, 2021. <https://doi.org/10.3390/Fermentation7040246>.

GU, Y.; LUO, X.; QIAN, H.; LI, Y.; FAN, M.; WANG, L. Effects of freeze-dried pure strains to replace type II sourdough in bread production. **Food Bioscience**, v. 53, e102752, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102752>.

HAN, D.; YANG, Y.; GUO, Z.; DAI, S.; JIANG, M.; ZHU, Y.; WANG, Y.; YU, Z.; WANG, K.; RONG, C.; YU, Y. A review on the interaction of acetic acid bacteria and microbes in food fermentation: A microbial ecology perspective. **Foods**, v. 13, n. 16, 2534, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13162534>.

HAN, N. R.; YU, S.; BYUN, J. A.; YUN, E. J.; CHEON, S.; SONG, S.; SHIM, S.; CHOI, I.; LEE, S.; KIM, K. H. Evolution-aided improvement of the acid tolerance of *Levilactobacillus brevis* and its application in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 190, 114584, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114584>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA. Tabela 6588 - Série histórica da estimativa anual da produção. Trigo em grãos. Toneladas produzidas, 2024. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>. Acesso em: 04 fev. 2025.

IBRAHIM, S. A. Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: other species. 2016. In: **Food Science**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00857-X>.

FERNÁNDEZ-PELÁEZ, J.; PAESANI, C.; GÓMEZ, M. Sourdough technology as a tool for the development of healthier grain-based products: An update. **Agronomy**, v. 10, n. 12, p. 1962, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121962>.

ILLUECA, F.; MORENO, A.; CALPE, J.; NAZARETH, T. D. M.; DOPAZO, V.; MECA, G.; QUILES, J. M.; LUZ, C. Bread biopreservation through the addition of lactic acid bacteria in sourdough. **Foods**, v. 12, n. 4, 864, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12040864>.

ISLAM, M. D. A.; ISLAM, S. Sourdough bread quality: facts and factors. **Foods**, v. 13, n. 13, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13132132>.

İSPIRLI, H.; ÖZMEN, D.; YILMAZ, M. T.; SAĞDIÇ, O.; DERTLI, E. Impact of glucan type exopolysaccharide (EPS) production on technological characteristics of sourdough bread. **Food Control**, v. 107, p. 106812, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106812>.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of The Royal Society A Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 13, p. 374, 2016. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>.

KAMINSKI, M.; SKONIECZNA- ZYDECKA, K.; NOWAK, J.K.; STACHOWSKA, E. Global and local diet popularity rankings, their secular trends, and seasonal variation in Google Trends data. **Nutrition**, v. 79, e110759, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.055>.

KARAMAN, K.; SAGDIC, O.; DURAK, M. Zeki. Use of phytase active yeasts and lactic acid bacteria isolated from sourdough in the production of whole wheat bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 557-567, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.055>.

KETABI, A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; KADIVAR, M.; SHEIKH-ZEINODDIN, M. Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 948-951,

2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.009>.

KOISTINEN, V. M.; MATTILA, O.; KATINA, K.; POUTANEN, K.; AURA, A. M.; HANHINEVA, K. Metabolic profiling of sourdough fermented wheat and rye bread. **Scientific Reports**, v. 8, p. 5684, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24149-w>.

KORCARI, D.; SECCHIERO, R.; LAUREATI, M.; MARTI, A.; CARDONE, G.; RABITTI, N. S.; RICCI, G.; FORTIN, M. G. Technological properties, shelf life and consumer preference of spelt-based sourdough bread using novel, selected starter cultures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 151, e112097, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112097>.

KORCZ, E.; VARGA, L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 375–84, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>.

KRUPA-KOZAK, U.; BĄCZEK, N.; CAPRILES, V.D.; ŁOPUSIEWICZ, Ł. Novel gluten-free bread with an extract from flaxseed by-product: the relationship between water replacement level and nutritional value, antioxidant properties, and sensory quality. **Molecules**, v. 27, 2690, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27092690>.

LAATIKAINEN, R.; KOSKENPATO, J.; HONGISTO, S. M.; LOPONEN, J.; POUSSA, T.; HUANG, X.; KORPELA, R. Pilot study: Comparison of sourdough wheat bread and yeast-fermented wheat bread in individuals with wheat sensitivity and irritable bowel syndrome. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1215, 2017. <https://doi.org/10.3390/nu9111215>.

LAKRA, A. K.; DOMDI, L.; TILWANI, Y. M.; ARUL, V. Physicochemical and functional characterization of mannan exopolysaccharide from *Weissella confusa* MD1 with bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 797-805, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.139>.

LAMA-MUÑOZ, A.; CONTRERAS, M. D. M. Extraction systems and analytical techniques for food phenolic compounds: A Review. **Foods**, v. 11, n. 22, p. 3671. <https://doi.org/10.3390/foods11223671>, 2022.

LANDIS, E. A.; OLIVERIO, A. M.; MCKENNEY, E. A.; NICHOLS, L. M.; KFOURY, N.; BIANGO-DANIELS, M.; SHELL, L. K.; MADDEN, A. A.; SHAPIRO, L.; SAKUNALA, S.; DRAKE, K.; ROBBAT, A.; BOOKER, M.; DUNN, R. R.; FIERER, N.; WOLFE, B. E. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. **eLife**, v. 10, e61644, 2021. <https://doi.org/10.7554/eLife.61644>.

LAU, S. W.; CHONG, A. Q.; CHIN, N. L.; TALIB, R. A.; BASHA, R. K. Sourdough microbiome comparison and benefits. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1355, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355>.

LI, H.; HU, S.; FU, J. Effects of acetic acid bacteria in starter culture on the properties of sourdough and steamed bread. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 13-21, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.11.003>.

LI, J.; MA, D.; TIAN, J.; SUN, T.; MENG, Q.; LI, J.; SHAN, A. The responses of organic acid production and microbial community to different carbon source additions during the anaerobic fermentation of Chinese cabbage waste. **Bioresource Technology**, v. 371, 128624,

2023. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128624>.

LIMA, T. T. M.; DE OLIVEIRA HOSKEN, B.; LINDNER, J. D. D.; MENEZES, L. A. A.; PIROZZI, M. R.; MARTIN, J. G. P. How to deliver sourdough with appropriate characteristics for the bakery industry? The answer may be provided by microbiota. **Food Bioscience**, v. 56, e103072, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103072>.

LIMBAD, M.; MADDOX, N. G.; HAMID, N.; KANTONO, K. Sensory and physicochemical characterization of sourdough bread prepared with a coconut water kefir starter. **Foods**, v. 9, p.1165, 2020. <https://doi.org/10.3390/FOODS9091165>.

LITWINEK, D.; BORECZEK, J.; GAMBUŚ, H.; BUKSA, K.; BERSKI, W.; KOWALCZYK, M. Developing lactic acid bacteria starter cultures for wholemeal rye flour bread with improved functionality, nutritional value, taste, appearance and safety. **PLoS One**, v. 17, n. 1, e0261677, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261677>.

LOPONEN, J.; GÄNZLE, M. G. Use of Sourdough in Low FODMAP Baking. **Foods**, v. 7, n. 96, 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7070096>.

LUTI, S.; MAZZOLI, L.; RAMAZZOTTI, M.; GALLI, V.; VENTURI, M.; MARINO, G.; LEHMANN, M.; GUERRINI, S.; GRANCHI, L.; PAOLI, P.; PAZZAGLI, L. Antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdoughs containing selected Lactobacilli strains are retained in bread **Food Chemistry**, v. 322, n. 126710, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126710>.

LUTI, S.; GALLI, V.; VENTURI, M.; GRANCHI, L.; PAOLI, P.; PAZZAGLI, L. Bioactive properties of bread made with sourdough of hull-less barley or conventional and pigmented wheat flours. **Applied Sciences**, v. 11, n. 7, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11073291>.

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, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>.

MA, S.; WANG, Z.; GUO, X.; WANG, F.; HUANG, J.; SUN, B.; WANG, X. Sourdough improves the quality of whole-wheat flour products: Mechanisms and challenges-A review. **Food Chemistry**, v. 360, e130038, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130038>.

MARTINEZ TUPPIA, C.; REZAEI, M. N.; MACHURON, F.; DUYSBURGH, C.; GHYSELINCK, J.; MARZORATI, M.; KOPER, J.E.B.; MONNET, C.; BOSCO, N. *In vitro* human gastrointestinal digestibility and colonic fermentation of wheat sourdough and yeast breads. **Foods**, v. 13, 3014, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13183014>.

MARULO, S.; DE CARO, S.; NITRIDE, C.; DI RENZO, T.; DI STASIO, L.; FERRANTI, P.; REALE, A.; MAMONE, G. Bioactive peptides released by lactic acid bacteria fermented pistachio beverages. **Food Bioscience**, v. 59, 103988, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103988>.

MATTHEWS, J. N.; ALTMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J.; ROYSTON, P. Analysis of serial

measurements in medical research. **British Medical Journal**, v. 300, n. 6719, p. 230-235, 1990. <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6719.230>.

MCKENNEY, E. A.; NICHOLS, L. M.; ALVARADO, S.; HARDY, S.; KEMP, K.; POLMANTEER, R.; SHOEMAKER, A.; DUNN, R. R. Sourdough starters exhibit similar succession patterns but develop flour-specific climax communities. **PeerJ**, v. 11, e16163, 2023. <https://doi.org/10.7717/peerj.16163>.

MEDEIROS, A. R. S. de. **Identificação e seleção de cepas de fermentos naturais de diferentes regiões da Paraíba e estudo do potencial tecnológico e bioativo para panificação**. Orientadora: Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro. Coorientação: Estefânia Fernandes Garcia, 2024. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Agroalimentar) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2024.

MELINI, F.; MELINI, V.; LUZIATELLI, F.; FICCA, A. G.; RUZZI, M. Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1189, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11051189>.

MENEZES, L. A.; MINERVINI, F.; FILANNINO, P.; SARDARO, M. L.; GATTI, M.; LINDNER, J. D. D. Effects of sourdough on FODMAPs in bread and potential outcomes on irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1972, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01972>.

MENEZES, L. A. A.; MOLOGNONI, L.; DE SÁ PLOÊNCIO, L. A; COSTA, F. B. M.; DAGUER, H.; LINDER, J. D. D. Use of sourdough fermentation to reducing FODMAPs in breads. **European Food Research Technology**, 245, p. 11831195, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03239-7>.

MINERVINI, F.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.136–146, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicr>.

MONTEMURRO, M.; CELANO, G.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G.; PONTONIO, E. Selection of non-*Lactobacillus* strains to be used as starters for sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 90, e103491, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103491>.

MUÑOZ, R., DE LAS RIVAS, B., RODRÍGUEZ, H., ESTEBAN-TORRES, M., REVERÓN, I., SANTAMARÍA, L., Curiel, J. A. Food phenolics and *Lactiplantibacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 412, 110555, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110555>.

NATARAJ, B. H.; ALI, S. A.; BEHARE, P. V.; YADAV, H. Postbiotics-Parabiotics: The New Horizons in Microbial Biotherapy and Functional Foods. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 168, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>.

NOUSKA, C.; HATZIKAMARI, M.; MATSAKIDOU, A.; BILIADERIS, C. G.; LAZARIDOU, A. Enhancement of textural and sensory characteristics of wheat bread using a chickpea sourdough fermented with a selected autochthonous microorganism. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 12, n. 16, 3112, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12163112>.

NOWICKA, P.; WOJDYŁO, A.; LASKOWSKI, P. Principal component analysis (PCA) of physicochemical compounds' content in different cultivars of peach fruits, including qualification and quantification of sugars and organic acids by HPLC. **European Food Research and Technology**, v. 245, p. 929–938, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03233-z>.

OBAYOMI, O. V.; OLANIRAN, A. F.; OWA, S. O. Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. **Journal of Functional Foods**, 119, 106337, 2024. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2024.106337>.

OGUNREMI, O. R.; BANWO, K.; SANNNI, A. I. Starter-culture to improve the quality of cereal-based fermented foods: trends in selection and application. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 38-43, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.003>.

OLOJEDE, A. O.; SANNNI, A. I.; BANWO, K.; ADESULU-DAHUNSI, A.T. Sensory and antioxidant properties and in-vitro digestibility of gluten-free sourdough made with selected starter cultures, **LWT - Food Science and Technology**, v. 129, e109576, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109576>.

OMOBA, O. S.; ISAH, L. R. Influence of sourdough fermentation on amino acids composition, phenolic profile, and antioxidant properties of sorghum biscuits. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 23, 3, p. 220–227, 2018. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.220>.

OZGOLET, M.; YAMAN, M.; DURAK, M. Z.; KARASU, S. The effect of five different sourdough on the formation of glyoxal and methylglyoxal in bread and influence of *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v. 371, p. 131141, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131141>.

PĂCULARU-BURADA, B., GEORGESCU, L. A., VASILE, M. A., ROCHA, J. M., BAHIRM GE. Selection of wild lactic acid bacteria strains as promoters of postbiotics in gluten-free sourdoughs. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 643, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050643>.

PALLA, M., AGNOLUCCI, M., CALZONE, A., GIOVANNETTI, M., DI CAGNO, R., GOBBETTI, M., RIZZELLO, C. G.; PONTONIO, E. Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 59-68, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.004>.

PANEL, EFSA BIOHAZ. KOUTSOUMANIS, K; ALLENDE, A; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; BOLTON, D.; BOVER-CID, S.; CHEMALY, M.; DAVIES, R.; DE CESARE, A.; HILBERT, F.; LINDQVIST, R.; NAUTA, M.; PEIXE, L.; RU, G.; SIMMON, M.; SKANDAMIS, P.; SUFFREDINI, E.; COCCONCELLI, P.S.; FERNÁNDEZ ESCÁMEZ, P, S.; MARADONA, M. P.; QUEROL, A.; SUAREZ, J. E.; SUNDH I.; VLAK, J.; BARIZZONE, F.; HEMPEN, M.; HERMAN, L. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. **EFSA Journal**, v. 18, n. 7, p. e06174, 2020. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6174>.

- PARAKHINA, O.; LOKACHUK, M.; KUZNETSOVA, L.; SAVKINA, O.; PAVLOVSKAYA, E., GAVRILOVA, T. Evaluation of selected lactic acid bacteria as starter cultures for gluten-free sourdough bread production. **Agronomy Research**, v. 19, S3, p. 1260-1272, 2021. <https://doi.org/10.15159/AR.21.087>.
- PARAMITHIOTIS, S.; GIOULATOS, S.; TSAKALIDOU, E.; KALANTZOPOULOS, G. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2429-2433, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.001>.
- PEJ CZ, E.; LACHOWICZ-WI' SNIEWSKA, S.; NOWICKA, P.; WOJCIECHOWICZ-BUDZISZ, A.; SPYCHAJ, R.; GIL, Z. Effect of inoculated lactic acid fermentation on the fermentable saccharides and polyols, polyphenols and antioxidant activity changes in wheat sourdough. **Molecules**, v. 26, 4193, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26144193>.
- PÉREZ-ALVARADO, O.; ZEPEDA-HERNÁNDEZ, A.; GARCIA-AMEZQUITA, L. E.; REQUENA, T.; VINDEROLA, G.; GARCÍA-CAYUELA, T. Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: evaluation of postbiotic-like components and health benefits. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, e969460, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969460>.
- PÉTEL, C.; ONNO, B.; PROST, C. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 105-123, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>.
- PLESSAS, S.; MANTZOURANI, I.; ALEXOPOULOS, A.; ALEXANDRI, M.; KOPSAHELIS, N.; ADAMOPOULOU, V.; BEKATOROU, A. Nutritional Improvements of Sourdough Bread Made with Freeze-Dried Functional Adjuncts Based on Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* and pomegranate juice. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1113, 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12051113>.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p.1231–1237, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- REALE, A.; DI RENZO, T.; ZOTTA, T.; PREZIUSO, M.; BOSCAINO, F.; IANNIELLO, R.; STORTI, L. V.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R. Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 622–629, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.065>.
- REPORTLINKER. Global bread market overview 2024-2028. October 2024. Disponível em: <https://member.reportlinker.com/next/search?date=3y&query=bread&viewedItem=document:8ab2a80479f874c4838365aef5fbe12c>. Acesso em: 30 out 2024.
- RIBET, L.; DESSALLES, R.; LESENS, C.; BRUSSELAERS, N.; DURAND-DUBIEF, M. Nutritional benefits of sourdoughs: a systematic review. **Advances in Nutrition**, v. 14, p. 22-29, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2>.
- RIZZELLO, C. G.; CURIEL, J. A.; NIONELLI, L.; VINCENTINI, O.; DI CAGNO, R.; SILANO, M.; GOBBETTI, M.; CODA, R. Use of fungal proteases and selected sourdough

lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. **Food Microbiology**, v. 37, p. 59-68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.017>.

RIZZELLO, C. G.; PORTINCASA, P.; MONTEMURRO, M.; DI PALO, D. M.; LORUSSO, M. P.; DE ANGELIS, M. Sourdough fermented bread are more digestible than those started with baker's yeast alone: an in vivo challenge dissecting distinct gastrointestinal responses. **Nutrientes**, v. 11, n. 295, 2019. <https://doi.org/10.3390/NU11122954>.

RODRIGUES, M., COELHO, C. Desempenho das empresas de Panificação e Confeitaria em 2022 e Perspectivas para 2023. Instituto Tecnológico da Alimentação, Panificação e Confeitaria (ITPC), 2023. Disponível em: <http://institutoitpc.org.br/indicadores-do-setor>. Acesso em: 04 out. 2024.

SADEGHI, A.; EBRAHIMI, M.; HAJINIA, F.; KHARAZMI, M. S.; JAFARI, S. M. FoodOmics as a promising strategy to study the effects of sourdough on human health and nutrition, as well as product quality and safety; back to the future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 136, p. 24-47, 2023a. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.026>.

SADEGHI, A.; EBRAHIMI, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Recent advances in probiotic breads; a market trend in the functional bakery products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 33, p. 13163-13174, 2023b. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2261056>.

SAGAR N. A.; PAREEK, S. Fortification of multigrain flour with onion skin powder as a natural preservative: effect on quality and shelf life of the bread. **Food Bioscience**, v. 41, e100992, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100992>.

SALMINEN, S.; COLLADO, M. C.; ENDO, A.; HILL, C.; LEBEER, S.; QUIGLEY, E. M. M., et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, p. 649–667, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41575021-00440-6>.

SAMTIYA, M.; ALUKO, R. E.; DHEWA, T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 2, p. 1-14, 2020. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>.

SÁNCHEZ-ADRIÁ, I. E.; SANMARTÍN, G.; PRIETO, J. A.; ESTRUCH, F.; FORTIS, E., RANDEZ-GIL, F. Adaptive laboratory evolution for acetic acid-tolerance matches sourdough challenges with yeast phenotypes. **Microbiological Research**, v. 277, e127487. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127487>.

SCHLÖRMANN, W.; BOCKWOLDT, J. A.; HÜBNER, S. M.; WITTWER, E.; REINERS, S.; LORKOWSKI, S.; DAWCZYNSKI, C.; EHRMANN, M. A.; GLEI, M. use of the β -glucan-producing lactic acid bacteria strains *Levilactobacillus brevis* and *Pediococcus clausenii* for sourdough fermentation - chemical characterization and chemopreventive potential of in situ-enriched wheat and rye sourdoughs and bread. **Nutrients**, v. 14, p. 1510, 2022. <https://doi.org/10.3390/2Fnu14071510>.

SHAFIPOUR YORDSHAHI, A.; MORADI, M.; TAJIK, H.; MOLAEI, R. Design and

preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, e108561, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108561>.

SIDARI R.; MARTORANA A.; ZAPPIA C.; MINCIONE A.; GIUFFRÈ A. M. Persistence and effect of a multistrain starter culture on antioxidant and rheological properties of novel wheat sourdoughs and bread. **Foods**, v. 9, n.9, 1258, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9091258>.

SIEPMANN, F. B.; DE ALMEIDA, B. S., RIPARI, V., DA SILVA, B. J., PERALTA-ZAMORA, P. G.. Brazilian sourdough: microbiological, structural, and technological evolution. **European Food Research and Technology**, v. 245, p. 1583-1594, 2019a. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03254-8>.

SIEPMANN, F. B.; RIPARI, V.; WASZCZYNSKYJ, N.; SPIER M. R.; Overview of sourdough technology: from production to marketing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 242–270, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1968-2>.

SIEPMANN, F. B.; SOUSA DE ALMEIDA B.; WASZCZYNSKYJ, N.; SPIER, M. R. Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 199–206, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.065>.

SIEUWERTS, S.; BRON, P. A.; SMID, E. J. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 201-206, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.022>.

SILVA, A. F.; MONTEIRO, M.; NUNES, R.; BAIÃO, A.; BRAGA, S. S.; SARMENTO, B.; COIMBRA, M. A.; SILVA, A. M.; CARDOSO, S. M. Bread enriched with resveratrol: Influence of the delivery vehicles on its bioactivity. **Food Bioscience**, v. 49, 101887, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101887>.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

STATISTA. Bread & Cereal Products: market data & analysis. 2024. Disponível em: <https://proxy.parisjc.edu:8293/study/48830/bread-and-cereal-products-market-data-and-analysis/>. Acesso em: 30 out 2024.

STEPHEN, J. M.; SALEH, A. M. Homofermentative Lactobacilli isolated from organic sources exhibit potential ability of lactic acid production **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1297036>.

SUBAŞI, A. S.; ERCAN, R. The effects of wheat variety, sourdough treatment and sourdough level on nutritional characteristics of whole wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 110, e103637, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2023.103637>.

TALLON, R.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M. C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. **Research in Microbiology**,

v.154, p. 705-712, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>.

THOMAS, R. M.; FALEGAN, C. R.; OLOJEDE, A. O.; OLUDEPE, E. O.; AWARUN, O. D.; DAODU, G. O. Nutritional and sensory quality of Ofada rice sourdough bread made with selected lactic acid bacteria strains. **Heliyon**, v. 9, n. 10, e20828, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20828>.

TSAFRAKIDOU, P.; MICHAELIDOU, A. M.; G. BILIADERIS, C. Fermented cereal-based products: Nutritional aspects, possible impact on gut microbiota and health implications. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 734, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9060734>.

VAN KERREBROECK, S.; CASANOVA C. BASTOS, F.; HARTH, H.; DE VUYST, L. A low pH does not determine the community dynamics of spontaneously developed backslopped liquid wheat sourdoughs but does influence their metabolite kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 54-64, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.019>.

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**, 51, 57–68, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.011>.

VERDONCK, C.; DE BONDT, Y.; PRADAL, I.; BAUTIL, A.; LANGENAEKEN, N. A.; BRIJS, K.; GOOS, P.; DE VUYST, L.; COURTIN, C. M. Impact of process parameters on the specific volume of whole meal wheat bread made using sourdough-and baker's yeast-based leavening strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 396, e110193, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110193>.

WANG, Z.; WANG, L. Impact of sourdough fermentation on nutrient transformations in cereal-based foods: Mechanisms, practical applications, and health implications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 7, n. 2, 2024, p. 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2024.03.001>.

WHITNEY, K.; SIMSEK, S. Reduced gelatinization, hydrolysis, and digestibility in whole wheat bread in comparison to white bread. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 6, p. 993–1000, 2017. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-17-0116-R>.

WOOD, I. P.; ELLISTON, A.; RYDEN, P.; BANCROFT, I.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, p. 117-121, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>.

WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GÄNGLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.

YAMAN, M.; SARGIN, H. S.; MIZRAK, Ö. F. Free sugar content, *in vitro* starch

digestibility and predicted glycemic index of ready-to-eat breakfast cereals commonly consumed in Turkey: An evaluation of nutritional quality. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 1082-1087, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.037>.

YAZAR, G.; TAVMAN, Ş. Functional and Technological Aspects of Sourdough Fermentation with *Lactobacillus sanfranciscensis*. **Food Engineering Reviews**, v. 4, p. 171–190, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9052-1>.

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

YUAN, Y.; YANG Y.; XIAO, L.; QU, L.; ZHANG, X.; WEI, Y. Advancing insights into probiotics during vegetable fermentation. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 3789, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12203789>.

XU, Y.; CUI, Y.; YUE, F.; LIU, L.; SHAN, Y.; LIU, B.; ZHOU, Y.; LÜ, X. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 475–99, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>.

ZAHRA, A.; FAROOQ, U.; SAEED, M. T.; QUDDOOS, M. Y.; HAMEED, A.; IFTIKHAR, M.; Madiha Iftikhar, M.; Noreen, A.; Zahra, S. M.; Hussain, A.; Bukhari, S. R.; Rafique, A.; NAQVI, S. N.; CHAUDHRY, F. Enhancement of sensory attributes and mineral content of sourdough bread by means of microbial culture and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Food Chemistry Advances**, v. 1, 100094, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100094>.

ZAPAŚNIK, A.; SOKOŁOWSKA, B.; BRYŁA, M. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. **Foods**, 11, 1283, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>.

ZHANG, J.; YAO, Y.; LI, J.; JU, X.; WANG, L. Impact of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria on the chemical, rheological properties of buckwheat sourdough and the quality of buckwheat bread. **Food Chemistry**, v. 425, e136369, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136369>.

ZHANG, Y.; DAI, X.; JIN, H.; MAN, C.; JIANG, Y. The effect of optimized carbon source on the synthesis and composition of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus paracasei*. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4023–4032, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19448>.

ZHOU, Y.; CUI, Y.; QU, X. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 317–332, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093>.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo

Produção inovadora de pães de fermentação natural: aproveitando bactérias lácticas autóctones para otimizar a fermentação e aprimorar as propriedades funcionais

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver fermentos naturais com culturas iniciadoras autóctones *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), produzir pães de fermentação natural (SB) com 2, 3 e 4 horas de fermentação, e uma formulação Controle (não inoculada). Houve maior acidez nas formulações SBLp47 ($5,07 \pm 0,10$ g/100g) e SBLb83 ($5,02 \pm 0,05$ g/100g) após 4 horas,. O fermento natural com a cepa Lp47 se destacou pela produção de exopolissacarídeos. As leveduras dos fermentos mostraram adaptação e as BAL das massas fermentadas exibiram viabilidade celular entre 8,74-8,94 *log* UFC/g após 4 horas. Os pães inoculados apresentaram volume específico superior a partir de 3 horas (2,41-2,74 cm³/g). A formulação SBLb83 apresentou o menor índice glicêmico após 3 horas ($73,78 \pm 0,91$), e SBLp47 e SBLb83 demonstraram a maior digestibilidade da proteína ($99,70\% \pm 0,01$; $99,30\% \pm 0,01$, respectivamente) com 4 horas. O ácido lático aumentou nas formulações SBLp47 ($0,76$ - $1,35 \pm 0,02$ g/Kg) e SBLb83 ($0,63$ - $1,07 \pm 0,00$ g/Kg), e houve redução da frutose e glicose. Após 3 horas, a formulação SBLb83 apresentou um teor de fenólicos de $28,19 \pm 0,95$ mg EAG/100g) Após 4 horas, todas as formulações inoculadas aumentaram sua atividade antioxidante, em comparação ao Controle, exceto para o método FRAP. Houve aumento após 3 horas para SBLp47 (FRAP), sem diferenças significativas entre 3 e 4 horas para SBCp41 e SBLp47. As cepas Lp47 e Lb83 mostraram ser culturas iniciadoras promissoras, sugerindo o tempo de fermentação de três horas como o resultado mais favorável.

Palavras-chaves: bactérias ácido lácticas; fermento natural; bioatividade; nutrição; digestibilidade *in vitro*

1 Introdução

Como um dos alimentos mais consumidos no mundo, o pão ganhou destaque por meio do chamado *sourdough* (Cappelli e Cini, 2021). Conceitualmente, a mistura tradicional de farinha e água é fermentada por microrganismos autóctones ou culturas iniciadoras (De Vuyst, et al., 2021; Parakhina *et al.*, 2021; Thomas *et al.*, 2023), como bactérias ácido lácticas (BAL), que promovem maior vida útil, melhoram a qualidade nutricional e agregam valor (Păcularu-Burada et al., 2020).

A origem da matéria-prima e as espécies inoculadas influenciam o resultado da massa fermentada e do pão (Comasio *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2021). O fermento natural tem propriedades e características diferentes e requer um mínimo de conhecimento técnico, dedicação e manutenção frequente para garantir a sobrevivência de sua microbiota para uma produção consistente (Ogunremi, Banwo Sanni, 2017, Lau *et al.*, 2021).

Os esforços para manter o perfil do fermento natural são desafiados pela falta de padronização (Wang e Wang, 2024). A ampla gama de microrganismos e técnicas de propagação (técnica de *backslopping*) e cultivo relatadas na literatura têm sido um desafio para o setor de panificação (Comasio *et al.*, 2020; Lau *et al.*, 2021; Calvert *et al.*, 2021).

Os processos de produção dos produtos de panificação otimizados e melhorados no contexto da fermentação natural podem contribuir para corrigir essa lacuna. Assim, o uso de culturas iniciadoras surgiu para permitir a reprodutibilidade e manutenção da qualidade do pão de fermentação natural (Sidari *et al.*, 2020, Subaşı e Ercan, 2023). A presença desses microrganismos favorece o desenvolvimento de pão com características desejáveis em comparação à fermentação convencional (Boakye *et al.*, 2022). Essa característica é indicativa do interesse do consumidor em produtos de panificação considerados benéficos à saúde (Cappelli e Cini, 2021).

O potencial do pão de fermentação natural foi estabelecido em estudos que investigam seu potencial tecnológico (Calvert *et al.*, 2021; Canesin e Cazarin, 2021; Lau *et al.*, 2021; Ribet *et al.*, 2023; Alkay *et al.*, 2024), e mais estudos estão analisando seus benefícios à saúde (Bartkiene; Özogul; Rocha, 2022; Calvert *et al.*, 2021; Lau *et al.*, 2021; Sadeghi *et al.*, 2023). Vários estudos já foram conduzidos demonstrando melhorias na digestibilidade, redução do potencial alergênico e diminuição do índice glicêmico (Costantini *et al.*, 2022; Fu *et al.*, 2020; Demirkesen-Bicak *et al.*, 2021; Gobbetti *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2021; Graça *et al.*, 2021). Outros

benefícios foram alcançados pela fermentação natural, como a produção de metabólitos secundários, polissacarídeos, ácidos orgânicos e compostos com propriedades bioativas (Galli *et al.*, 2020; Salminen *et al.*, 2021; Sidari *et al.*, 2020; Pejcz *et al.*, 2023).

O estudo da fermentação natural com culturas microbianas isoladas pode contribuir para o aprimoramento dos processos tecnológicos na área, bem como fornecer informações relevantes sobre a qualidade nutricional. Em consonância com o exposto, o objetivo geral deste estudo foi desenvolver fermentos naturais (S) e pães de fermentação natural (SB) inoculados com as bactérias lácticas autóctones *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83).

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

Os ingredientes foram obtidos de um mercado local em João Pessoa, Brasil. A composição da farinha de trigo branca tipo I (Finna®, Moinho Dias Branco, Natal, RN, Brasil) correspondeu a: carboidratos (70%), proteínas (12%), gorduras totais (2%) e fibras alimentares totais (2%) nas proporções fornecidas; fermento seco de padeiro *Saccharomyces cerevisiae* (Dona Benta, J. Macêdo, Salvador, BA, Brasil) e sal (Miramar, Norsal, Areia Branca, RN, Brasil). As cepas de BAL utilizadas foram *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), fornecidas pela Coleção de Culturas do Laboratório de Confeitaria, Panificação e Bebidas da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), todas isoladas de fermento natural. Todos os padrões eram de grau analítico (pureza mínima de 98%). As enzimas utilizadas para análise de digestibilidade do amido *in vitro* e de digestibilidade da proteína *in vitro* foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (Merck Group, Saint Louis, MO, EUA).

2.2 Condições de crescimento das cepas e preparação do fermento natural

As cepas Cp41, Lp47 e Lb83 foram reativadas em caldo de cultura estéril MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) (Neogen®, NCM0079A, Manchester, Reino Unido) e incubadas (Nova Ética®, Piracicaba, SP, Brasil) em um frasco de anaerobiose (Anaerobac®, São Paulo, SP, Brasil), a 35 °C / 24 horas. A biomassa obtida foi centrifugada a $4226 \times g$, 4 °C / 10 minutos (Eppendorf®, modelo 5430r, Barkhausenmeg, Alemanha), duplamente lavada com solução salina tamponada com fosfato estéril - PBS (pH 7,2, 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,42 g/L

Na₂HPO₄ e 0,24 g/L KH₂PO₄), e a biomassa foi ressuspensa com água destilada esterilizada até a concentração aproximada de 10 log UFC/mL (densidade óptica a 595 nm, OD₅₉₅ = 0,75).

O fermento natural tipo II foi produzido de acordo com a metodologia de Ozgolet *et al.* (2022), com modificações. Farinha de trigo comercial, água destilada esterilizada e o inóculo foram incorporados para produzir uma massa com rendimento de 200 (DY 200) [(quantidade de farinha + quantidade de água) / quantidade de farinha x 100]. A mistura foi fermentada (Solab®, modelo SL-200, Piracicaba, SP, Brasil) a 30 °C, por 24 h. Um total de três formulações de pão foram desenvolvidas, adaptadas de Ozgolet *et al.* (2022) e Verdonick *et al.* (2023), em diferentes tempos de fermentação da massa (2, 3 e 4 horas). Uma formulação não inoculada, contendo apenas o fermento de padeiro seco *Saccharomyces cerevisiae*, foi incluída como amostra controle. A formulação de massa fermentada é fornecida na Tabela Suplementar S1.

2.3 Processo de produção dos pães

O pão foi preparado amassando todos os ingredientes em uma amassadeira industrial (Arke®, modelo SF-300, Caxias do Sul, RS, Brasil) por 15 minutos. Após dobradas e descansadas (25 °C / 20 minutos), as massas foram modeladas em bolas e descansadas novamente (10 minutos). As massas foram porcionadas em formas cilíndricas em porções de 180 g e fermentadas em uma incubadora (Solab®, modelo SL-200) a 30 ± 0,1 °C, com diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 horas). Todas as massas foram assadas em um forno turbo à gás pré-aquecido (Venâncio, modelo FVT5D, Venâncio Aires, RS, Brasil) (200 °C / 30 minutos). O pão foi deixado esfriar a 25 °C por 2 horas antes de ser embalado. O pão controle (não inoculado) foi preparado seguindo as mesmas etapas de produção do pão de fermentação natural. A formulação do pão é dada na Tabela Suplementar S2.

2.4 Avaliação do volume específico do pão de fermentação natural

Duas horas após o cozimento, o pão de fermentação natural foi avaliado quanto ao volume específico pelo método de deslocamento de sementes (*American Association of Cereals Chemists International* [AACC], 2001), adaptado com sementes de milheto (*Setaria italica* (L.) *P.Beauv.*). O volume específico foi calculado como a razão entre o volume (cm³) e a massa do pão (g), e o resultado expresso em cm³/g.

2.5 Enumeração de bactérias ácido lácticas e leveduras viáveis no fermento natural e no pão de fermentação natural

Bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras foram contadas de acordo com Reale *et al.* (2016), usando o método de microgota, imediatamente (T_0) e após a preparação (T_{24}) para o fermento natural, e após 2, 3 e 4 horas, para pão de fermentação natural. A amostra foi homogeneizada em água peptonada esterilizada (0,1%, p/v), seguida de diluições seriadas (até 10^{-8}). As placas de BAL foram incubadas em atmosfera anaeróbica a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ / 48 horas. Para contagem total de leveduras, foi usado extrato de levedura, peptona e meio dextrose, suplementado com glicose (2%, p/v) (Merck KGaA[®], NutriSelect[™] Y1375, Darmstadt, Alemanha). As placas foram incubadas aerobicamente a 25°C / 72 horas.

2.6 Medição de pH e acidez titulável total do fermento natural e do pão de fermentação natural

As amostras do fermento natural (T_0 ; T_{24}) e do pão de fermentação natural (2, 3 e 4 horas) foram coletadas para análise de pH e acidez titulável total (TA) seguindo a metodologia proposta por Luti *et al.* (2020). O pH foi determinado usando um pHmetro digital (MS Tecnon[®], modelo mPA210, São Paulo, SP, Brasil). A acidez foi titulada com o indicador fenolftaleína 1% (p/v) e os resultados foram expressos em mL de solução molar por cento (v/m).

2.7 Determinação de exopolissacarídeos (EPS) em fermento natural

O conteúdo de polissacarídeos do fermento natural foi determinado de acordo com a metodologia de Ketabi *et al.* (2008), adaptado por Zhang *et al.* (2023), com modificações. A amostra foi diluída (1:2 p/v), mantida refrigerada (4°C) e agitada manualmente em intervalos de 10 minutos por 1 hora. Após centrifugação em centrífuga (Eppendorf[®]) a $4226 \times g$ / 4°C / 20 minutos, o sobrenadante foi precipitado [duas vezes seu volume de etanol frio (95% v/v, 4°C)] e armazenado (4°C / 24 horas). O precipitado foi coletado por centrifugação (Eppendorf[®]) após 30 minutos, e o volume foi dissolvido em água ultrapura (800 μL). Foram adicionados dois volumes de etanol frio e centrifugado (Eppendorf[®]) mais uma vez. O precipitado foi seco em estufa de ar forçado (ACB Labor, modelo AC-033/180, Americana, SP, Brasil) a 55°C até atingir peso constante. A quantidade de polissacarídeos no fermento natural foi considerada como o EPS total produzido pelo BAL e os polissacarídeos na farinha de trigo (g/Kg de farinha).

2.8 Digestibilidade proteica *in vitro* dos pães de fermentação natural

A digestibilidade proteica *in vitro* (DIV) do pão foi determinada de acordo com a metodologia de Rizzello *et al.* (2014) e Akesson e Stahmann (1964). Uma fase de digestão gástrica e intestinal foram realizadas. A amostra (1 g) foi incubada com 1,5 mg de enzima

pepsina (P-7000, 250 U/mg) e HCl 0,1 M (15 mL) em banho-maria (Solab[®], modelo SL-154/10, São Paulo, SP, Brasil) (37°C / 3 horas), e após neutralizada com NaOH 2 M, foram adicionados 4 mg de enzima pancreatina (P7545, 8 x USP) juntamente com tampão fosfato (pH 8,0) (7,5 mL). O tolueno (1 mL) e a solução foram incubados novamente em banho-maria (Solab[®]) por 24 horas. Uma alíquota de 10 mL de ácido tricloroacético (20%, p/v) foi adicionado, e o volume final foi ajustado para 100 mL utilizando água destilada. Após centrifugação (Eppendorf[®]) a $4226 \times g$ / 20 minutos, a concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976), segundo a metodologia de Tallon, Bressollier e Urdaci (2003) e Abedfar et al. (2018). Resumidamente, em ambiente protegido da luz, uma alíquota (100 µL) foi retirada e misturada com reagente de Bradford (2,5 mL). Após a amostra ser agitada em vórtice (Even, modelo VX-38, Araucária, PR, Brasil) e deixada em repouso por 5 minutos, a amostra foi lida em espectrofotômetro a 595 nm (Eppendorf[®]). Os resultados foram expressos como porcentagem de proteína total solubilizada após hidrólise enzimática.

2.9 Digestibilidade *in vitro* do amido dos pães de fermentação natural

O ensaio de digestibilidade do amido *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia de Englyst, Hudson e Englyst (2006) e Yaman, Sargin, Mizrak (2019), com ajustes na metodologia para determinação de glicose, usando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA), de acordo com a metodologia de Wood *et al.* (2012). A glicose total nas amostras foi determinada usando o método dos açúcares redutores. Os açúcares redutores foram determinados misturando 50 µL de cada amostra hidrolisada com 1 mL de solução de DNSA (10 g/L), tartarato de sódio-potássio (30 g/L) e NaOH (16 g/L), e aquecidos em banho-maria (Solab[®]) a 100 °C / 5 minutos. Após o resfriamento, a absorbância foi medida (Eppendorf[®]) a 540 nm. Uma concentração de glicose foi calculada com base na equação linear derivada de uma curva de calibração (0 a 100 mg/mL).

A taxa de hidrólise da amostra em diferentes momentos (0-120 minutos) foi calculada. A glicose foi convertida em amido multiplicando a glicose liberada por um fator de 0,9. O índice glicêmico estimado (eGI) foi calculado a partir do índice de hidrólise (HI) da amostra. O valor do HI foi obtido por meio de um modelo não linear (Matthews *et al.*, 1990), calculado como a área sob a curva de hidrólise (AUC, de 0-120 minutos) dividida pela área sob a curva para o pão controle (não inoculado). O eGI foi calculado com base no HI e na equação descrita por Goñi, Garcia-Alonso e Saura-Calixto (1997), $eGI (\%) = (0,549 \times HI) + 39,71$.

2.10 Atividade de eliminação de radicais

2.10.1 Ensaio DPPH^{*}

Os extratos de amostra de pão para ensaios de atividade antioxidante e compostos fenólicos totais foram preparados de acordo com a metodologia de Sagar e Pareek (2021). A amostra de pão moído à mão foi extraída em uma solução aquosa de metanol 80% v/v, (1:10 p/v), (4 °C / 24 horas), protegida da luz. A solução foi centrifugada em centrífuga (MPW Med. Instruments[®], modelo MPW-351R, Varsóvia, Polônia) a $6000 \times g$ / 4 °C / 5 minutos, e o sobrenadante foi coletado por filtragem em papel de filtro qualitativo (Unifil[®], Alvorada, RS, Brasil).

A capacidade de eliminação do radical livre DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi determinada de acordo com as metodologias de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Krupa-Kozak *et al.* (2022). Em um ambiente escura, 50 µL de extrato de pão foram colocados em uma microplaca de 96 poços, e a solução de trabalho DPPH^{*} (250 µL) (0,06 mM) foi adicionada. Após repouso (25 °C / 30 minutos), a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc., agora Agilent[®], modelo EON, Santa Clara, Califórnia, EUA) a 515 nm. Os resultados foram expressos em µmol de Equivalente de Trolox[®] (ET) por 100 gramas de amostra (µmol ET/100 g).

2.10.2 Ensaio ABTS^{*}

A atividade de eliminação de radicais livres ABTS^{*} foi determinada de acordo com as metodologias de Re *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2022), com ajustes no tempo de incubação (6 minutos). Uma alíquota de 50 µL de extrato de pão foi colocada em uma microplaca de 96 poços, e a solução de trabalho ABTS^{*} (250 µL) foi adicionada. Após repouso (25 °C / 6 minutos), a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc.) a 734 nm. Os resultados foram expressos em µmol de ET por 100 gramas de amostra (µmol ET/100 g).

2.10.3 Ensaio de Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)

O ensaio FRAP foi determinado de acordo com as metodologias de Benzie e Strain (1996) e Krupa-Kozak *et al.* (2022), com ajustes em alíquotas para leitura através de uma microplaca de poliestireno de 96 poços. Uma alíquota de 20 µL do extrato de pão foi colocada em uma microplaca de 96 poços, e foram adicionados água destilada (30 µL) e reagente FRAP (250 µL). Após incubação em banho-maria (Kacil Ind., modelo BM-02, Recife, PE, Brasil) a

37 °C / 30 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc.) a 595 nm. Os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de sulfato ferroso por 100 gramas de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4/100 \text{ g}$).

2.11 Ensaio de Compostos Fenólicos Totais

O método Folin-Ciocalteu foi realizado de acordo com as metodologias de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) e Olojede *et al.* (2020), com ajustes na alíquota e na temperatura de incubação. Uma alíquota de 30 μL do extrato de pão foi colocada em uma microplaca de 96 poços, em seguida o reagente Folin-Ciocalteu (150 μL) e a solução de carbonato de sódio anidro foram adicionados (120 μL). Após incubação em banho-maria (Nova Técnica[®], GQ, Piracicaba, SP, Brasil) a 50 °C / 5 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc.) a 765 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra (mg EAG/100 g).

2.12 Ácidos orgânicos e teor de açúcares

A concentração de açúcares (maltose, glicose, frutose), álcoois (glicerol, etanol) e ácidos orgânicos (ácidos cítrico, málico, láctico, fórmico, propiônico) foi realizada no pão (2 e 4 horas de tempo de fermentação) de acordo com a metodologia de Drakula *et al.* (2021). O pão foi homogeneizado em água destilada (1:3 p/v) em agitador magnético (Solab[®], modelo SL-95, São Paulo, SP, Brasil) por 30 minutos. O volume foi reconstituído com água destilada (50 mL). Após centrifugação ($4064 \times g$ / 5 minutos), o sobrenadante (5 mL) foi coletado, uma solução de Carrez I e II (1 mL) (Carrez, 1908) foi adicionada e o extrato foi centrifugado (Eppendorf[®]) a $2501 \times g$ / 5 minutos. O extrato foi filtrado (0,45 μm , filtro de membrana de polietersulfona, Analítica, Diadema, SP, Brasil) e armazenado congelado (-18 °C). O extrato foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity LC, Santa Clara, CA, EUA), equipada com detector de diodos, detector de índice de refração e coluna Hi-Plex H ($7,7 \times 300 \text{ mm}$, 8 μm , Agilent Technologies). A eluição foi realizada (35 °C), com solução de ácido sulfúrico (5 mM) como fase móvel de vazão de 0,5 mL/minuto. Todos os compostos foram detectados por comparação com padrões externos (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA, para açúcares, e Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, para análise de ácidos orgânicos). Os dados foram processados usando o *software OpenLAB CDS ChemStation Edition* (Agilent Technologies).

2.13 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata com três experimentos independentes. Todos os dados foram analisados usando o *software* estatístico jamovi® (versão 2.6.23.0, Sidney, Austrália) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão. Foi usada uma análise de variância (ANOVA) fatorial de duas vias para medidas repetidas para comparar os tempos de fermentação dos pães (2, 3 e 4 horas). Para a determinação do EPS, foi aplicada uma ANOVA unidirecional. Os resultados das análises de viabilidade celular (contagens de BAL e levedura), pH e acidez titulável total do fermento natural nos tempos de fermentação inicial e final (T_0 e T_{24}) foram analisados usando ANOVA fatorial de duas vias para medidas repetidas, que permite a avaliação de um fator intersujeito (tipo de fermento natural, três níveis – Cp41, Lp47 e Lb83) e um fator intrasujeito (tempo, dois níveis – T_0 e T_{24}). A homogeneidade das variâncias foi avaliada usando o teste de Levene e múltiplas comparações de médias pelo teste de *Tukey* em um nível de significância com valor de $p \leq 0,05$. A relação entre o teor de açúcares foi verificada através da correlação de Pearson, e a interação dos dados foi investigada através da Análise de Componentes Principais (PCA).

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação da contagem de células viáveis no fermento natural e na massa fermentada

O perfil de contagem das células viáveis de BAL e levedura do fermento natural no início e no final do tempo de fermentação (T_0 e T_{24}), e da massa fermentada após 2, 3 e 4 horas de fermentação são expressos na Tabela 3. As contagens de células de BAL e leveduras no fermento natural variaram entre 8,08 e 9,21 *log* UFC/g, e 6,11 e 7,10 *log* UFC/g em T_0 , respectivamente. Após 24 horas de fermentação, os fermentos inoculados com Lp47 e Lb83 exibiram um aumento nas contagens BAL ($p \leq 0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nas contagens de células de BAL entre as formulações no final do tempo de fermentação ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Contagem de células viáveis durante a fermentação do fermento natural (T_0 , T_{24} horas) e na massa de pão (2, 3, 4 horas) inoculada com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83) a $30 \pm 0,1$ °C.

Contagem de células viáveis - Fermento (log CFU/g)						
Cepas	Bactérias ácido láticas			Leveduras		
	T_0	T_{24}		T_0	T_{24}	
Cp41	9.21 ± 0.09 ^{aA}	9.37 ± 0.12 ^{aA}		6.11 ± 0.01 ^{cB}	6.60 ± 0.01 ^{cA}	
Lp47	8.08 ± 0.05 ^{cB}	9.43 ± 0.22 ^{aA}		6.60 ± 0.01 ^{bA}	6.84 ± 0.08 ^{bA}	
Lb83	8.56 ± 0.14 ^{bB}	9.48 ± 0.08 ^{aA}		7.10 ± 0.02 ^{aB}	8.48 ± 0.07 ^{aA}	

Contagem de células viáveis – Massa de pão fermentada (log CFU/g)						
Cepas	Bactérias ácido láticas			Leveduras		
	2 h	3 h	4 h	2 h	3 h	4 h
Cp41	8.48 ± 0.02 ^{bB}	8.75 ± 0.05 ^{bA}	8.74 ± 0.01 ^{bA}	6.36 ± 0.08 ^{cA}	6.26 ± 0.14 ^{cB}	6.15 ± 0.15 ^{bAB}
Lp47	8.92 ± 0.02 ^{aA}	8.92 ± 0.01 ^{aA}	8.94 ± 0.05 ^{aA}	8.56 ± 0.10 ^{aA}	8.12 ± 0.11 ^{aB}	8.69 ± 0.05 ^{aAB}
Lb83	8.86 ± 0.02 ^{aA}	8.87 ± 0.00 ^{aA}	8.85 ± 0.03 ^{aA}	8.04 ± 0.07 ^{bA}	7.82 ± 0.12 ^{bB}	8.18 ± 0.26 ^{aAB}

Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). ^{a-c}Diferentes letras minúsculas na mesma coluna representam diferenças entre as cepas ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey). ^{A-C}Diferentes letras maiúsculas na mesma linha representam a diferença estatística entre T_0 e T_{24} da contagem de células viáveis do fermento natural e representam a diferença estatística entre 2, 3 e 4 horas de fermentação da massa de pão fermentada ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey).

O ambiente de condições de fermentação foi favorável para todas as cepas, que permaneceram acima de 9 log UFC/g após 24 horas de fermentação. Após 24 horas de tempo de fermentação, a contagem de leveduras (cepa Lb83) apresentou o maior valor no fermento natural quando comparada às cepas Cp41 e Lp47. Conforme observado por Rizzello *et al.* (2019) e Arora *et al.* (2021), espera-se que as densidades de células de BAL e leveduras permaneçam acima de 8,0 UFC/g e 6,0 log UFC/g no fermento maduro, respectivamente. Este resultado é corroborado pelas análises físico-químicas (Tabela 4), que mostram uma diminuição significativa no pH ($p \leq 0,05$) e um aumento na acidez total ($p \leq 0,05$). Esses padrões são característicos de fermentações dominadas por BAL.

As cepas exibiram um comportamento padrão durante o processo de fermentação (Ozgolet *et al.* 2022). Essa resposta está associada à tolerância da leveduras a ambientes ácidos e demonstra variação de acordo com o tempo de fermentação (Pérez-Alvarado *et al.*, 2022). A contagem de células viáveis de BAL da massa de pão permaneceu constante, mantendo um valor acima de 8 log UFC/g. A massa de pão inoculada com Cp41 demonstrou a menor contagem de células viáveis de leveduras. Durante a fermentação do fermento natural (T_0 - T_{24}), sugere-se que as leveduras nativas se adaptam às condições ácidas do ambiente, bem como à presença de BAL e outros metabólitos de seu metabolismo secundário. Essa adaptação promove sua multiplicação quando incorporada ao pão de fermentação natural, contribuindo para o aumento da produção de CO₂ e um maior volume de pão observado. As espécies de BAL e leveduras trabalham em um consórcio, e as leveduras produzem dióxido de carbono e fonte de carbono, como glicose. Esses produtos estimulam o crescimento de BAL no fermento natural,

ajudando a manter seus altos níveis (Sieuwert *et al.*, 2018, Sevgili, Erkmen, Koçaslan., 2021). Além disso, pode haver diferentes proporções entre BAL e leveduras, como 2:1 (Mannino *et al.*, 2022) e 10:1 a 100:1 (Comasio *et al.*, 2020).

3.2 pH e acidez titulável total no fermento natural e no pão de fermentação natural

O pH e a acidez titulável total (TA) do fermento natural após o tempo de fermentação zero (T_0) e 24 horas (T_{24}), bem como os valores do pão de fermentação natural (SB) durante 2, 3 e 4 horas de fermentação, são apresentados na Tabela 4. No fermento natural, todas as amostras apresentaram uma diminuição ($p \leq 0,05$) no pH e um aumento ($p \leq 0,05$) no TA após 24 h. Os valores de pH e TA são indicadores de atividade microbiana, variação na produção de ácidos orgânicos e são cepa-específica (Gül, Gül e Çon, 2022; De Luca *et al.*, 2021). O estresse ácido no fermento natural é alto como resultado do baixo pH durante o processo de fermentação. (Ramos *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2023).

Durante os tempos de fermentação observados, nenhuma alteração no pH ou acidez foi detectada nas amostras de controle. No entanto, o pão contendo fermento natural apresentou uma redução no pH e um aumento na acidez após 4 horas de fermentação, com um efeito significativamente maior ($p \leq 0,05$) nas amostras de pão SBLp47 e SBLb83. O tipo de cepa e a capacidade de degradar o substrato podem influenciar a acidificação do fermento natural e do pão (De Vuyst *et al.*, 2017; Sahin *et al.*, 2024). Esse processo é impulsionado pela intensa atividade metabólica, que é facilitada por microrganismos do fermento natural, farinha de trigo e condições ambientais.

Tabela 4 - pH e acidez titulável total do fermento natural e de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), e do pão controle (não inoculado), durante T_0 e T_{24} horas e 2, 3, 4 horas, respectivamente, a $30 \pm 0,1$ °C.

		Fermento natural		Pão de fermentação natural		
Parâmetros/ Formulações		T_0	T_{24}	2 h	3 h	4 h
pH	Controle ¹	n/a	n/a	5.56 ± 0.03 ^{aA}	5.52 ± 0.02 ^{aA}	5.56 ± 0.03 ^{aA}
	Cp41	5.52 ± 0.01 ^{aA}	3.76 ± 0.04 ^{aB}	4.12 ± 0.01 ^{bA}	4.02 ± 0.02 ^{bB}	3.95 ± 0.01 ^{bB}
	Lp47	5.39 ± 0.02 ^{bA}	3.75 ± 0.01 ^{aB}	4.09 ± 0.02 ^{bcB}	4.99 ± 0.02 ^{bcA}	3.91 ± 0.02 ^{bcC}
	Lb83	5.53 ± 0.03 ^{aA}	3.73 ± 0.04 ^{aB}	4.04 ± 0.01 ^{cA}	3.94 ± 0.01 ^{cB}	3.85 ± 0.02 ^{cC}
TA ²	Controle	n/a	n/a	1.39 ± 0.20 ^{bA}	1.44 ± 0.05 ^{bA}	1.54 ± 0.05 ^{cA}
	Cp41	3.95 ± 0.04 ^{bB}	8.90 ± 0.02 ^{cA}	3.68 ± 0.60 ^{aB}	4.23 ± 0.05 ^{aA}	4.42 ± 0.05 ^{bA}
	Lp47	4.30 ± 0.02 ^{aB}	9.32 ± 0.02 ^{aA}	4.08 ± 0.01 ^{aB}	4.33 ± 0.05 ^{aB}	5.17 ± 0.10 ^{aA}
	Lb83	4.18 ± 0.04 ^{abB}	9.08 ± 0.02 ^{bA}	3.98 ± 0.01 ^{aB}	4.38 ± 0.01 ^{aB}	5.02 ± 0.05 ^{aA}

¹não inoculado. ²acidez total: g/100 g de amostra. n/a, não aplicável. Dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). ^{a-c}Diferentes letras minúsculas na mesma coluna e ensaio representam a diferença estatística dentro de cada tempo de fermentação ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey). ^{A-B}Letras maiúsculas diferentes dentro da mesma linha representam a diferença estatística entre T_0 e T_{24} do pH e do fermento natural de TA em cada cepa, e representam a diferença estatística entre 2, 3 e 4 horas de fermentação do pão de fermentação natural em cada formulação ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey).

Durante a fermentação, o perfil das BAL sofre uma série de mudanças, começando com cepas que apresentam maior capacidade de acidificação e gradualmente mudando para aquelas mais bem adaptadas ao ambiente da massa (Huys *et al.*, 2013; Syrokou *et al.*, 2020).

3.3 Determinação de exopolissacarídeos (EPS) no fermento natural

O fermento inoculado com a cepa Lp47 apresentou um valor de EPS maior ($13,80 \pm 1,35$ g/kg) ($p \leq 0,05$) do que o fermento Cp41 ($5,76 \pm 0,74$ g/kg) e o fermento Lb83 ($5,72 \pm 0,56$ g/kg). Ambas as espécies *L. plantarum* e *L. brevis* são reconhecidas por sua capacidade de produzir EPS (Bachtarzi *et al.*, 2020; Bouzaiane *et al.*, 2024). Os efeitos do pH e do tempo de incubação são cepas-específicas, e diferentes cepas exibem preferências por fontes específicas de carbono durante a síntese de EPS (Zehir, Dertli e Erten, 2020). Os EPS têm sido relacionados a benefícios à saúde, efeitos anticarcinogênicos e prebióticos (Lynch *et al.*, 2018; Stephany, 2022), propriedades imunomoduladoras (Caggianiello *et al.*, 2016; Yılmaz e Şimşek, 2020), propriedades antioxidantes, redutoras de colesterol (Jurášková, Ribeiro e Silva, 2022), antimicrobianas, neuroprotetoras (Bouzaiane *et al.*, 2024; Sirin e Aslim, 2021). O EPS é considerado um ingrediente pósbiótico funcional ao fornecer propriedades probióticas de alimentos fermentados (Werning *et al.*, 2022; Abdul Hakim *et al.*, 2023).

3.4 Volume específico dos pães de fermentação natural

O volume específico dos pães de fermentação natural (SB) é apresentando na Tabela 5. A Figura 1 ilustra as amostras após diferentes tempos de fermentação. O pão controle apresentou menor volume ($p \leq 0,05$) em comparação ao pão de fermentação natural. Após 3 horas de fermentação, os pães de fermentação natural apresentaram aumento significativo de volume ($p \leq 0,05$). O volume permaneceu estável após 4 horas, exceto para o pão de fermentação natural SBLp47 que aumentou.

Tabela 5 - Valores de volume específico (cm^3/g) de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), e o pão controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.

Parâmetro	Formulações	Tempo de fermentação (horas)		
		2 h	3 h	4 h
Volume específico (cm^3/g)	Pão controle ¹	1.52 ± 0.01 ^{cB}	1.75 ± 0.00 ^{bA}	1.77 ± 0.09 ^{bA}
	SBCp41	2.03 ± 0.03 ^{bB}	2.51 ± 0.04 ^{aA}	2.58 ± 0.01 ^{aA}
	SBLp47	2.21 ± 0.08 ^{aC}	2.46 ± 0.08 ^{aB}	2.74 ± 0.07 ^{aA}
	SBLb83	2.20 ± 0.03 ^{aB}	2.41 ± 0.03 ^{aA}	2.56 ± 0.03 ^{aA}

¹não inoculado. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). ^{a-c}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre formulações ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey). ^{A-C}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam as diferenças entre os tempos de fermentação ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey). SBCp41: pão de fermentação natural inoculado com *Companilactobacillus paralimentarius* 41,

SBLp47: pão de fermentação natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e SBLb83: pão de fermentação natural inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83

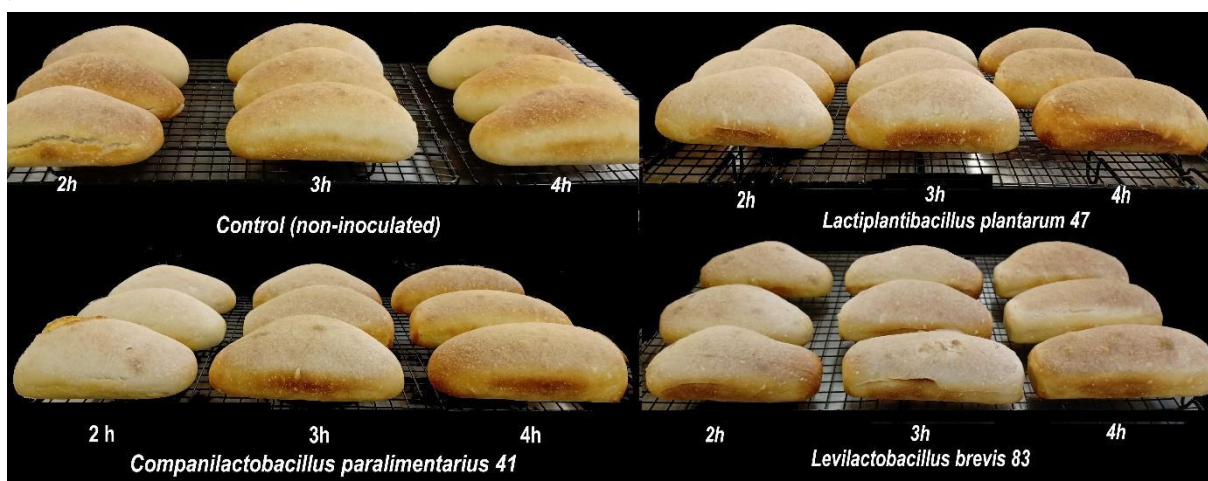


Figura 1 - Pães de fermentação natural inoculados com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), e o pão controle (não inoculado), produzidos em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) à $30 \pm 0,1$ °C. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

A acidificação da massa, a produção de CO₂ e a retenção de gás pela rede de glúten são fatores-chave que influenciam o volume específico, pois afetam a flexibilidade e a viscoelasticidade da massa (Sha, Wang e Li, 2023; Menezes *et al.*, 2021). Embora a exposição prolongada ao ácido possa enfraquecer a rede de glúten e reduzir a retenção de CO₂ (Lynch *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2018), isso não foi observado nas amostras de massa fermentada. A fermentação anterior a 24 horas provavelmente permitiu que leveduras tolerantes a ácidos se multiplicassem, garantindo um bom desempenho da massa. As cepas de BAL criam um ambiente favorável para leveduras convertendo açúcares em ácido lático. Na presença de BAL heterofermentativa, *Saccharomyces cerevisiae* produz CO₂ e etanol, contribuindo para a expansão da massa (Sahin *et al.*, 2024).

3.5 Digestibilidade da proteína in vitro de pães de fermentação natural

Os resultados de IVPD para os pães de fermentação natural (SB) são mostrados na Tabela 6. Após 4 horas de fermentação, as amostras SBLp47 ($99,70 \pm 0,01\%$) e SBLb83 ($99,30 \pm 0,01\%$) exibiram valores de IVPD mais altos ($p \leq 0,05$) em comparação com a amostra controle ($94,40 \pm 0,01\%$). As cepas-específicas de BAL no fermento natural aumentam o IVPD, provavelmente devido ao aumento da atividade proteolítica e acidificação durante a fermentação (Kieliszek *et al.*, 2021). O SBCp41 mostrou uma redução no IVPD ($p \leq 0,05$) após 4 horas de fermentação, resultando no menor valor entre todos os pães de fermentação natural. O uso das cepas Lp47 e Lb83 em pão com um processo de fermentação por 4 horas resultou em IVPD aprimorado após 3 horas. As descobertas também demonstram que a combinação de cepas específicas com tempo de fermentação ideal pode melhorar ainda mais o IVPD.

Tabela 6 - Digestibilidade da proteína *in vitro* (IVPD) de pães de fermentação natural (SB) inoculados com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83) e o pão de controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.

Formulações	Digestibilidade da proteína <i>in vitro</i> , IVPD (%)		
	2 h	3 h	4 h
Pão controle ¹	97.50 $\pm$ 0.68 ^{abAB}	97.90 $\pm$ 0.12 ^{bA}	94.40 $\pm$ 0.01 ^{cB}
SBCp41	95.50 $\pm$ 0.49 ^{abA}	96.10 $\pm$ 0.59 ^{cA}	89.50 $\pm$ 0.01 ^{dB}
SBLp47	94.84 $\pm$ 2.36 ^{bB}	99.60 $\pm$ 0.01 ^{aA}	99.70 $\pm$ 0.01 ^{aA}
SBLb83	99.40 $\pm$ 0.01 ^{aAB}	97.30 $\pm$ 0.01 ^{bA}	99.30 $\pm$ 0.01 ^{bB}

¹não inoculado. SBCp41: pão de fermentação natural inoculado com *Companilactobacillus paralimentarius* 41, SBLp47: pão de fermentação natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e SBLb83: pão de fermentação inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). ^{a-d}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre amostras (p $\leq$ 0,05, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey). ^{A-C}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças entre amostras (p $\leq$ 0,05, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey).

Constantino *et al.* (2022) demonstraram que leveduras inoculadas com BAL, como *L. plantarum*, e um maior tempo de fermentação estão associados a maior IVPD, enquanto pães elaborados com levedura de padreiro apresentam valores menores. Espécies de BAL diferem na atividade da peptidase, afetando a degradação de proteínas e peptídeos, o que melhora a digestibilidade (Kulathunga *et al.*, 2023; Gobbetti *et al.*, 2014; Rizello *et al.*, 2019).

3.6 Índice de hidrólise do amido (HI) e índice glicêmico estimado (eGI) do pão de fermentação natural

O índice de hidrólise (HI) e o índice glicêmico estimado (eGI) são apresentados na Tabela 7. O HI dos pães variou entre $63,48 \pm 0,01$ a $125,80 \pm 0,01$, e o eGI variou entre $74,56 \pm 0,01$ a $108,77 \pm 0,98$. Em 3 e 4 horas de fermentação, a formulação SBLb83 demonstrou o menor valor de eGI ($73,78 \pm 1,68$) (p $\leq$ 0,05) em comparação com o pães SBCp41 e SBLp47. Sobre isso, em 4 horas, tanto o pão SBLp47 quanto o SBLb83 apresentaram os menores valores de HI. O HI aumentou entre a 2^a e a 4^a hora em todos os pães de fermentação natural (p $\leq$ 0,05).

Tabela 7 - Índice de hidrólise (HI) e índice glicêmico estimado (eGI) do pão de fermentação natural (SB) inoculado com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a $30 \pm 0,1$ °C.

Formulações	HI ¹ (%)			eGI		
	2 h	3 h	4 h	2 h	3 h	4 h
SBCp41	63.48 $\pm$ 5.34 ^{cC}	85.71 $\pm$ 10.42 ^{aB}	125.80 $\pm$ 1.12 ^{aA}	74.56 $\pm$ 2.39 ^{cC}	86.77 $\pm$ 4.05 ^{aB}	108.77 $\pm$ 0.43 ^{aA}
SBLp47	73.64 $\pm$ 2.95 ^{bC}	79.32 $\pm$ 3.00 ^{bB}	98.73 $\pm$ 5.74 ^{bA}	80.14 $\pm$ 1.62 ^{bC}	83.25 $\pm$ 1.50 ^{bB}	93.91 $\pm$ 3.95 ^{bA}
SBLb83	79.53 $\pm$ 6.14 ^{aB}	62.05 $\pm$ 1.68 ^{cC}	96.82 $\pm$ 13.51 ^{cA}	83.37 $\pm$ 3.37 ^{aB}	73.78 $\pm$ 0.91 ^{cC}	92.86 $\pm$ 7.42 ^{cA}

¹Pão controle (não inoculado) usado como referência, SBCp41: pão de fermentação natural inoculado com *Companilactobacillus paralimentarius* 41, SBLp47: pão de fermentação natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e SBLb83: pão de fermentação natural inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83. ^{a-c}Diferentes letras minúsculas na mesma coluna representam diferenças (p $\leq$ 0,05, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey) entre as formulações. ^{A-C}Diferentes letras maiúsculas dentro da mesma linha representam diferenças entre os tempos de fermentação (p $\leq$ 0,05, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey).

A variabilidade observada ao longo dos tempos de fermentação sugere que tanto o perfil HI quanto o eGI podem ser modulados pelas cepas específicas usadas, duração da fermentação

e composição do amido. Todas as variáveis influenciam a digestibilidade do amido *in vitro* e contribuem para um menor índice glicêmico (De Angelis *et al.*, 2007; Temkov *et al.*, 2024) e remodelação da microbiota intestinal, proporcionando benefícios à saúde (Swieca *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2021). Um estudo anterior demonstrou que o fermento natural tipo II atinge uma redução maior no índice glicêmico em comparação ao pão branco convencional (Demirkesen-Bicak *et al.*, 2021).

A proteólise conduzida por bactérias do ácido láctico (BAL) no fermento natural reduz o conteúdo nativo de glúten (Gänzle *et al.*, 2008; Gobbetti *et al.*, 2019), enquanto o consumo de açúcares pelo BAL pode diminuir o conteúdo total de carboidratos. Além disso, a hidrólise do amido, promovida pelo aumento da atividade da alfa-amilase, leva à conversão de produtos de hidrólise em ácidos orgânicos (Siepmann *et al.*, 2019). A acidificação do fermento natural também aumenta a atividade da fitase endógena, o que facilita a liberação de aminoácidos livres e aumenta o conteúdo de amido resistente (Leenhardt *et al.*, 2005; Scazzina *et al.*, 2009). O amido resistente, sendo uma fração não digerível, não contribui para a resposta glicêmica do produto assado final. Neste estudo, o pão de fermentação natural SBLb83 exibiu um eGI reduzido após 3 horas de fermentação. Um ambiente mais ácido desempenha um papel significativo na redução desse valor.

3.7 Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante no pão de fermentação natural

O teor de compostos fenólicos do pão analisado foi demonstrado na Tabela 8. O pão controle apresentou a menor concentração de compostos fenólicos entre as formulações após 3 horas de fermentação e não demonstrou diferenças estatisticamente significativas durante os tempos de fermentação ($p > 0,05$). O pão de fermentação natural SBCp41 não diferiu na concentração total de compostos fenólicos entre 2, 3 e 4 horas de fermentação, enquanto o pão de fermentação natural SBLb83 e SBLp47 promoveram maior concentração de compostos, especialmente após 3 e 4 horas de tempo de fermentação em comparação ao período de fermentação de 2 horas. Essa observação está alinhada com a forte capacidade de acidificação exibida por essas cepas (Sha *et al.*, 2023).

Tabela 8 - Conteúdo de fenólicos totais, atividade de eliminação de radicais DPPH^{*} e ABTS^{*}, ensaio do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) de pães de fermentação natural (SB) inoculado com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), e o pão controle (não inoculado), em diferentes tempos de fermentação (2, 3, 4 horas) a 30 ± 0,1 °C.

Ensaio antioxidantes					
Formulações	Tempo ⁴	Fenólicos totais ¹	DPPH ²	ABTS ²	FRAP ³
Pão controle ⁵	2 h	15.45 ± 0.84 ^{bA}	95.62 ± 2.92 ^{aB}	34.35 ± 0.58 ^{bA}	68.80 ± 6.25 ^{aA}
	3 h	13.53 ± 0.82 ^{cA}	104.37 ± 3.03 ^{aA}	26.21 ± 1.51 ^{cB}	52.50 ± 1.67 ^{bB}
	4 h	17.09 ± 0.24 ^{cA}	99.32 ± 5.25 ^{cAB}	22.72 ± 0.81 ^{cB}	77.08 ± 2.09 ^{aA}
SBCp41	2 h	19.71 ± 0.28 ^{aA}	97.97 ± 2.10 ^{aB}	74.00 ± 0.47 ^{aA}	67.92 ± 1.25 ^{aA}
	3 h	19.21 ± 0.42 ^{bA}	97.81 ± 2.53 ^{abB}	76.67 ± 1.05 ^{aA}	55.00 ± 6.67 ^{bAB}
	4 h	18.95 ± 0.37 ^{bcA}	120.02 ± 5.56 ^{abA}	38.07 ± 0.12 ^{aB}	46.25 ± 2.08 ^{bB}
SBLp47	2 h	17.66 ± 1.12 ^{abB}	104.37 ± 2.02 ^{aA}	32.26 ± 1.28 ^{bB}	68.33 ± 6.67 ^{aB}
	3 h	20.46 ± 1.11 ^{bA}	95.79 ± 3.54 ^{abB}	38.42 ± 0.24 ^{bA}	86.25 ± 2.92 ^{aA}
	4 h	21.33 ± 2.15 ^{abA}	106.89 ± 0.51 ^{cAB}	33.88 ± 0.81 ^{bB}	78.34 ± 0.02 ^{aAB}
SBLb83	2 h	18.01 ± 0.82 ^{abC}	95.28 ± 4.04 ^{aB}	27.84 ± 0.81 ^{cB}	41.25 ± 7.08 ^{bB}
	3 h	28.19 ± 0.95 ^{aA}	86.70 ± 4.55 ^{bC}	25.63 ± 1.40 ^{cB}	65.00 ± 0.83 ^{bA}
	4 h	24.70 ± 0.65 ^{aB}	124.06 ± 3.54 ^{aA}	31.91 ± 1.00 ^{bA}	45.42 ± 0.41 ^{bB}

¹(mg EAG/100 g); ²(μmol TE/100 g); ³(μmol FeSO₄/100 g); ⁴tempo de fermentação (horas); ⁵não inoculado. SBCp41: pão de fermentação natural inoculado com *Companilactobacillus paralimentarius* 41, SBLp47: pão de fermentação natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e SBLb83: pão de fermentação natural inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). ^{a-c}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre cada formulação dentro de cada tempo de fermentação (p ≤ 0,05, ANOVA de medidas repetidas de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey). ^{A-C}Letras maiúsculas diferentes dentro do mesmo ensaio antioxidante representam diferenças entre formulações individuais em tempos de fermentação (p ≤ 0,05, ANOVA de medidas repetidas de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey). Abreviação: μmol, micromol; ET, equivalente de Trolox[®] por 100 g de amostra. EAG, equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra.

O processo de acidificação promovido pelas BAL hidrolisa compostos complexos e glicosilados, aumentando a expressão fenólica e a atividade antioxidante (Colosimo *et al.*, 2020; Muñoz *et al.*, 2024). Isso explica por que o pão inoculado com cepas de *Lactobacillus* normalmente apresenta níveis mais altos de compostos fenólicos. O pão de fermentação natural pode conter maiores quantidades de compostos fenólicos, contribuindo para sua atividade antioxidante (Fang *et al.*, 2023). Os grãos de cereais (espécies, variedades utilizadas e composição da farinha), o tratamento ao qual as cepas foram submetidas, a concentração da cepa, as diferentes fontes, o processo de moagem e as condições ambientais (Sidari *et al.*, 2020; Parmar *et al.*, 2017) desempenham um papel importante no conteúdo de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos parecem ser preservados mesmo após o cozimento, o que pode promover benefícios à saúde (Calinoiu e Vodnar, 2018; Lu *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2021). Esse efeito é atribuído a fermentação de massa fermentada, onde enzimas de cereais e BAL, particularmente *L. plantarum*, hidrolisam e liberam compostos fenólicos, aumentando sua solubilidade por meio da acidificação (Gänzle, 2014; Nionelli *et al.*, 2014; Ripari *et al.*, 2019).

Em relação à atividade antioxidante, as formulações SBCp41 e SBLb83 exibiram valores mais altos usando o método DPPH^{*} em comparação com SBLp47 e a formulação controle (p ≤ 0,05) após 4 horas de fermentação. O pão de massa fermentada SBLp47

permaneceu estável entre 2 e 4 horas de tempo de fermentação. A capacidade antioxidante usando o método ABTS[•] demonstrou o maior nível para o pão de fermentação natural SBCp41 e SBLp47, seguido pelo SBLb83 e o pão controle em três horas de fermentação. No método FRAP, o pão de fermentação natural SBCp41 e SBLb83 mostrou a menor capacidade de reduzir íons Fe⁺ em quatro horas, enquanto o pão de fermentação natural SBLp47 e o pão controle demonstraram o maior valor em quatro horas. Após três horas, as formulações SBCp41 e SBLp47 permaneceram estáveis até o final do tempo de fermentação ($p > 0,05$). Entre os pães de fermento natural, o SBLp47 apresentou os maiores valores no método FRAP. *L. plantarum*, conhecido por suas atividades enzimáticas multifuncionais, pode biotransformar compostos em formas solúveis com alta capacidade antioxidante, potencialmente melhorando a qualidade nutricional de produtos de panificação (Muñoz *et al.*, 2017; Plessas, 2022; Plessas *et al.*, 2023; Pejcz *et al.*, 2021).

3.8 Ácidos orgânicos e concentração de açúcares em pão de fermentação natural

Os teores de açúcares e ácidos orgânicos são apresentados na Tabela 9. Durante os estágios inicial e final de fermentação (2-4 horas), a formulação do pão controle apresentou um aumento no teor de ácido cítrico e málico, mas não foi detectado nos pães de fermentação natural. O ácido lático foi detectado apenas nos pães de fermentação natural (SBCp41, SBLp47 e SBLb83), cujos valores aumentaram em mais de 65% ao longo do tempo. Em relação ao ácido fórmico, houve um aumento na formulação do pão controle e uma diminuição em todas as amostras com fermento natural.

O ácido propiônico foi identificado apenas no pão de fermentação natural SBLb83. No pão controle, as concentrações de etanol e açúcar, incluindo frutose, aumentaram durante o processo de fermentação, o que foi mais notado quando comparado a todos os pães de fermentação natural ($p \leq 0,05$). A medida que ocorria o processo de fermentação, um aumento na concentração de glicerol foi observado em todos os pães, incluindo o pão controle, que apresentou valores menores em comparação ao pão de fermentação natural ($p \leq 0,05$). O ácido propiônico, conhecido por suas propriedades antimicrobianas em alimentos, é o ácido mais abundante produzido por cepas BAL, embora sua produção seja dependente da cepa (Ozcelik, Kuley e Özogul, 2016). A levedura metaboliza açúcares no pão pela via Embden-Meyerhof-Parnas, levando à produção de piruvato, que é posteriormente convertido em etanol e dióxido de carbono. O álcool é produzido pela via Ehrlich, que envolve a conversão de aminoácidos de cadeia ramificada (Pico, Bernal e Gómez, 2015). Esses subprodutos da fermentação contribuem

para as propriedades reológicas da massa (De Vuyst *et al.*, 2016; De Vuyst, Van Kerrebroeck e Leroy, 2017; Su *et al.*, 2019).

Tabela 9 - Perfil de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois do pão de fermentação natural (SB) inoculado com as linhagens *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47), *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83) e o pão controle (não inoculado), preparado com 2 e 4 horas de fermentação ($30 \pm 0,1$ °C).

Ácidos orgânicos (g/kg)	Tempos de fermentação (h)	Formulações			
		Pão Controle ¹	SBCp41	SBLp47	SBLb83
Ácido cítrico	2 h	0.0086 ± 0.01 ^B	<LOD	<LOD	<LOD
	4 h	0.02 ± 0.03 ^A	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido málico	2 h	0.07 ± 0.02 ^B	<LOD	<LOD	<LOD
	4 h	0.10 ± 0.03 ^A	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido láctico	2 h	<LOD	0.56 ± 0.00 ^{cB}	0.76 ± 0.02 ^{aB}	0.63 ± 0.01 ^{bB}
	4 h	<LOD	0.93 ± 0.01 ^{cA}	1.35 ± 0.02 ^{aA}	1.07 ± 0.00 ^{bA}
Ácido fórmico	2 h	0.83 ± 0.00 ^{aB}	0.42 ± 0.02 ^{dA}	0.52 ± 0.00 ^{bA}	0.42 ± 0.00 ^{cA}
	4 h	0.99 ± 0.03 ^{aA}	0.27 ± 0.01 ^{dB}	0.32 ± 0.01 ^{bB}	0.31 ± 0.00 ^{cB}
Ácido propiônico	2 h	<LOD	<LOD	<LOD	0.137 ± 0.02 ^B
	4 h	<LOD	<LOD	<LOD	0.144 ± 0.02 ^A
Açúcares e Álcoois (g/kg)	Tempos de fermentação (h)	Formulações			
		Pão Controle ¹	SBCp41	SBLp47	SBLb83
Maltose	2 h	7.75 ± 0.01 ^{bB}	4.41 ± 0.02 ^{dA}	6.06 ± 0.04 ^{bA}	4.58 ± 0.01 ^{cB}
	4 h	9.16 ± 0.03 ^{aA}	3.59 ± 0.02 ^{dB}	5.23 ± 0.02 ^{bB}	5.14 ± 0.02 ^{cA}
Glucose	2 h	0.51 ± 0.02 ^{aA}	0.06 ± 0.01 ^{bA}	0.05 ± 0.03 ^{cA}	0.03 ± 0.02 ^{dA}
	4 h	0.52 ± 0.01 ^{aA}	0.00 ± 0.00 ^{bB}	0.00598 ± 0.00 ^{bB}	0.00742 ± 0.00 ^{bB}
Frutose	2 h	1.45 ± 0.02 ^{aB}	0.55 ± 0.02 ^{cA}	0.67 ± 0.01 ^{bA}	0.53 ± 0.01 ^{dA}
	4 h	1.59 ± 0.03 ^{aA}	0.15 ± 0.02 ^{dB}	0.20 ± 0.01 ^{bB}	0.18 ± 0.02 ^{cB}
Glicerol	2 h	0.11 ± 0.03 ^{dA}	0.18 ± 0.05 ^{cB}	0.23 ± 0.04 ^{aB}	0.20 ± 0.02 ^{bB}
	4 h	0.18 ± 0.04 ^{dA}	0.29 ± 0.04 ^{cA}	0.39 ± 0.05 ^{aA}	0.38 ± 0.01 ^{bA}
Etanol	2 h	0.00 ± 0.03 ^{bB}	0.00 ± 0.02 ^{bB}	0.07 ± 0.04 ^{aA}	0.00085 ± 0.01 ^{bB}
	4 h	0.06 ± 0.02 ^{aA}	0.04 ± 0.03 ^{bA}	0.05 ± 0.03 ^{abB}	0.07 ± 0.02 ^{aA}

¹não inoculado. SBCp41: pão de fermentação natural inoculado com *Companilactobacillus paralimentarius* 41, SBLp47: pão de fermentação natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e SBLb83: pão de fermentação natural inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83. <LOD: abaixo do limite de detecção. ^{A-B}Médias seguidas por uma letra comum não são significativamente diferentes entre os tratamentos (2 e 4 horas de fermentação) em cada variável ($p > 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey). ^{a-d} Médias sem nenhuma letra em comum (linha) são significativamente diferentes entre as formulações ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey).

A análise de correlação de Pearson em açúcares e álcoois, e ácido láctico e ácido fórmico é mostrada na Figura S1B do material suplementar. O ensaio revelou que a concentração de etanol estava fracamente correlacionada com a glicose (coeficiente de determinação de Pearson $r = -0,17$). Por outro lado, frutose e maltose mostraram uma forte correlação positiva com a glicose ($r = 0,96$, $p < 0,001$ e $r = 0,91$, $p = < 0,01$, respectivamente). Houve uma forte correlação positiva entre o ácido fórmico e a produção de açúcares (maltose, glicose e frutose) ($r = 0,94$, $p < 0,001$, $r = 0,96$, $p = < 0,001$ e $r = 0,92$, $p = < 0,01$, respectivamente), sugerida pela atividade da piruvato formato liase, que também permite a síntese de ácido fórmico (Bintsis, 2018). Uma concentração muito baixa de glicose foi identificada em todos os pães de fermentação natural, o que pode ser atribuído ao metabolismo das BAL (Pérez-Alvarado *et al.*, 2022).

Uma forte correlação positiva ($r = 0,96$, $p < 0,01$) foi identificada entre o ácido láctico e o glicerol. As BAL diferem na regeneração de cofatores como o nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). A conversão em ácido láctico pelas BAL através da glicólise, uma via onde as hexoses são convertidas em ácido láctico, resulta em um aumento significativo da concentração ao longo do tempo (Stephen e Saleh, 2023), como foi sugerido nos pães de fermentação natural SBCp41 e SBLb83. A conversão do glicerol ocorre para permitir a produção contínua de ácido láctico, uma vez que o glicerol é um osmoprotetor (De Vuyst, Comasio, Kerrebroeck, 2021). Uma correlação negativa foi identificada tanto no glicerol e frutose, quanto no glicerol e ácido fórmico (ambas correlações de $r = -0,71$, $p < 0,05$), como mostrado para todos os pães de fermentação natural durante o período de fermentação.

3.9 Análise de componentes principais e correlação de Pearson das propriedades físico-químicas

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para investigar as variáveis e reduzir a dimensionalidade, incluindo o pH, acidez total (TA), IVPD, eGI, volume específico, compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante (DPPH^{*}, ABTS^{*} e FRAP), em pães em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 horas), conforme mostrado na Figura 2A e 2B. Os dois componentes principais (PCI) explicaram as variâncias da seguinte forma: PC1 (39,7%) e PC2 (24,8%), totalizando 64,50%.

Os pães de fermentação natural SBCp41, SBLp47 e SBLb83 fermentados por 2 horas, agrupados no quadrante inferior direito, foram associados à maior concentração de ABTS^{*}. No quadrante inferior direito, o pão de fermentação natural SBLp47 fermentado por 2 horas apresentou um pH mais alto. Uma digestibilidade aumentada e capacidade antioxidante FRAP aprimorada foram encontradas no pão de fermentação natural SBLp47 fermentado por 3 horas. Isso pode sugerir que a atividade proteolítica das BAL e a inativação dos inibidores de protease ocorreram durante a fermentação do fermento natural e favoreceram os valores mais altos identificados (Espinosa-Ramírez, *et al.*, 2018).

Conforme demonstrado em estudos anteriores, há uma correlação positiva entre a liberação de aminoácidos livres totais e os valores de digestibilidade da proteína *in vitro* em pães de fermentação natural. Essa correlação destaca a bioacessibilidade desses nutrientes (Ney *et al.*, 2023; Martinez e Tuppia, *et al.*, 2024).

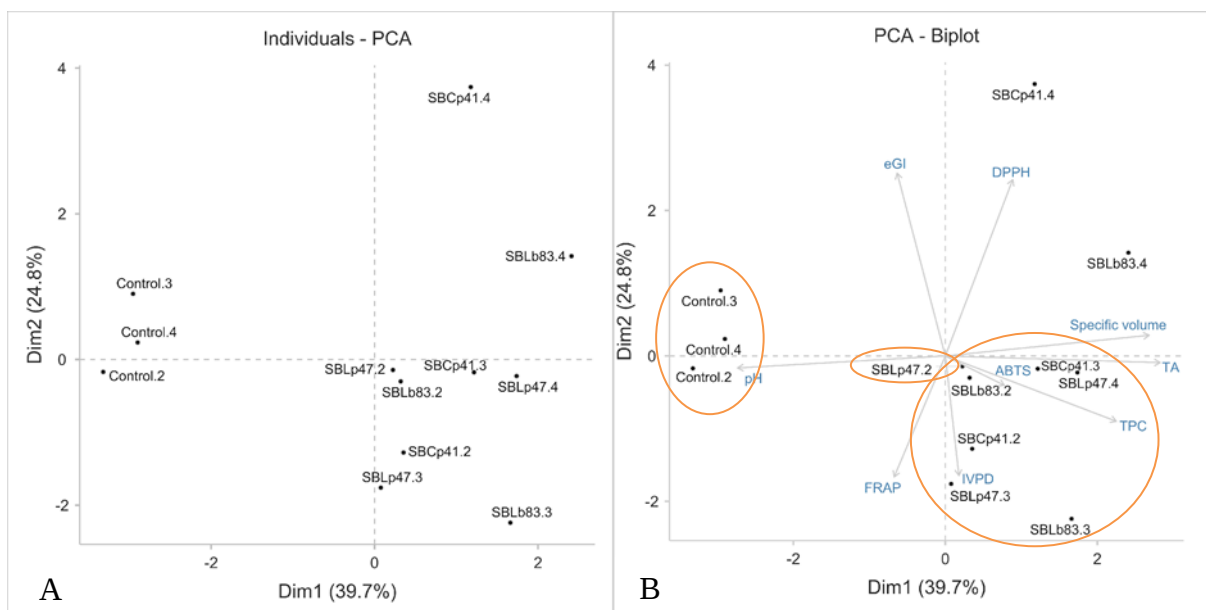


Figura. 2. Gráficos score plot (2-A) e loading plot (2-B) da análise de componentes principais do pão. O gráfico de pontuação mostra os pães de fermentação natural: SBCp41: pão de fermentação natural inoculado com *Companilactobacillus paralimentarius* 41, SBLp47: pão de fermentação natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e SBLb83: pão de fermentação natural inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83, em diferentes tempos de fermentação (.2, .3 e .4 horas). Múltiplas variáveis de pH, acidez total (TA), volume específico, digestibilidade da proteína *in vitro* (IVPD), índice glicêmico estimado (eGI), conteúdo total de fenólicos (TPC), atividade de eliminação de radicais DPPH*, ABTS*, ensaio de poder antioxidante redutor de ferro (FRAP), são analisadas no gráfico de carga. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

No lado superior oposto, o pão SBCp41 fermentado por 4 horas exibiu uma correlação positiva com a atividade antioxidante DPPH* e eGI, com uma correlação negativa com a variável IVPD. A relação trófica entre BAL pode causar mudanças na intensidade da acidificação e afetar a diminuição do eGI em produtos assados fermentados com massa fermentada (De Angelis *et al.*, 2009). Após 4 horas de fermentação, os pães SBLb83 e SBLp47 demonstraram volume específico ideal, consistente com os resultados de acidez. Além disso, foi observado que o pão de fermentação natural fermentado por 3 horas foi mais fortemente associado aos compostos fenólicos totais. Isso é atribuído às propriedades físico-químicas e antioxidantes, que são influenciadas e aprimoradas pelas enzimas e ácidos orgânicos produzidos pelas BAL e leveduras durante o processo de fermentação (Adebo *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2023).

A matriz de correlação de Pearson é fornecida no material suplementar, Figura S1A. A matriz de correlação de Pearson demonstrou que o pH apresentou forte correlação negativa com a acidez total (TA) ($r = -0,90$, $p < 0,001$), confirmando assim o comportamento antagônico das variáveis durante o processo de fermentação. O volume específico ($r = -0,81$, $p < 0,01$) também apresentou correlação negativa, o que é consistente com a hipótese de que um aumento nos níveis de acidez (menor pH) leva a mudanças na qualidade do pão (Siepmann *et al.*, 2019), aumentando o volume específico do pão. O pH apresentou diminuição ao longo dos tempos de fermentação, pela presença de ácidos orgânicos (Hernández-Figueroa *et al.*, 2024), que

diminuem o pH, promovendo um volume específico do pão aumentado durante este período. Esta explicação é apoiada pela forte correlação positiva entre a acidez e o parâmetro volume específico ($r = 0,95$, $p < 0,001$), uma vez que houve aumento nos parâmetros de acidez durante os tempos de fermentação. Foi observada uma correlação negativa entre pH e compostos fenólicos totais (TPC) ($r = -0,64$, $p < 0,05$), indicando que a presença de compostos fenólicos é maior em pães mais ácidos. Isso sugere a atividade metabólica das BAL influenciando compostos fenólicos no pão (Drakula *et al.*, 2021). Como esperado, a acidez e TPC mostraram uma correlação positiva ($r = 0,71$, $p < 0,01$). Isso sugere que um ambiente mais ácido ajuda na liberação de compostos fenólicos (Dapčević-Hadnadev *et al.*, 2022). Como pode ser visto, mais uma vez o processo de fermentação desempenha um papel significativo, mostrando que a correlação entre TPC *versus* volume específico, $r = 0,66$, $p < 0,05$) pode se beneficiar do processo de fermentação. A matriz de correlação revelou ainda uma associação entre o índice glicêmico estimado (eGI) e a capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH* ($r = 0,67$, $p < 0,05$). O aumento do eGI do pão refletiu em uma maior capacidade antioxidante (método DPPH*), como evidenciado no pão de fermentação natural SBLb83 submetido a um processo de fermentação durante 4 horas. A fermentação melhora a atividade antioxidante (Alkay *et al.*, 2024). Enquanto a variável eGI apresentou aumento após 2 e 4 horas de tempo de fermentação, o aumento da atividade antioxidante (método DPPH*) foi observado após 3 horas de fermentação. Esse comportamento pode ser justificado pela força demonstrada na análise de correlação.

4 Conclusão

Este estudo demonstrou que as propriedades funcionais do pão de fermentação natural são significativamente influenciadas tanto pelo tempo de fermentação quanto pelas cepas específicas de bactérias do ácido láctico usadas. Entre as cepas testadas, *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83 apresentaram desempenho superior na maioria das análises. A fermentação por 3 horas demonstrou ser um tempo ótimo, proporcionando atividade antioxidante aprimorada, estabilidade do composto fenólico e melhor digestibilidade da proteína, juntamente com um volume específico favorável e índice glicêmico reduzido no pão inoculado com *Levilactobacillus brevis* 83. Essas descobertas ressaltam o potencial das BAL na fabricação de pão de fermentação natural para aprimorar atributos tecnológicos e funcionais. Pesquisas futuras devem se concentrar em elucidar ainda mais os mecanismos por trás desses benefícios e traduzi-los em aplicações para promoção da saúde.

Referências

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTRY. AACC Approved Methods of Analysis. Method 10-05.01. **Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement**. 11 ed., St. Paul: Cereals & Grains Association, 2001. Disponível em: <http://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-10-05.01>.

ABDUL HAKIM, B. N.; XUAN, N. J.; OSLAN, S. N. H. A comprehensive review of bioactive compounds from lactic acid bacteria: potential functions as functional food in dietetics and the food industry. **Foods**, v. 12, n. 15, p. 2850, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12152850>.

ABEDFAR, A. *et al.* Investigation on “spontaneous fermentation” and the productivity of microbial exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran sourdough. **Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]**, v. 96, p. 686–693, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.071>.

ADEBO, O. A.; GABRIELA MEDINA-MEZA, I. Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 927, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25040927>.

AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/83.3.257>.

ALKAY, Z. *et al.* Exploring the nutritional impact of sourdough fermentation: Its mechanisms and functional potential. **Foods**, v. 13, n. 11, p. 1732, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods13111732>.

ARORA, K. *et al.* Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 71-83, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>.

BACHTARZI, N. *et al.* Selection of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) isolated from Algerian fermented foods for the manufacture of skim-milk fermented products. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1101, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081101>.

BARTKIENE, E.; ÖZOGUL, F.; ROCHA, J. M. Bread sourdough lactic acid bacteria technological, antimicrobial, toxin-degrading, immune system-, and faecal microbiota-modelling biological agents for the preparation of food, nutraceuticals and feed. **Foods**, v. 11, p. 452, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11030452>.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 665, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>.

BOAKYE, P. G. *et al.* A. Impact of sourdough fermentation on FODMAPS and amylase-trypsin inhibitor levels in wheat dough. **Journal of Cereal Science**, v. 108, e103574, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103574>.

BOUZAIENE, T. *et al.* H. Exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* C7 exhibited antibacterial, antioxidant, anti-enzymatic, and prebiotic activities. **Fermentation**, v. 10, n. 7, p. 339, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation10070339>.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technology**, v. 28, n. 25-30, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3877-3886, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7471-2>.

CĂLINOIU, L. F.; VODNAR, D. C. Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1615, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10111615>.

CALVERT, M. D. *et al.* A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. **PeerJ**, v. 9, e11389, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.11389>.

CANESIN, M. R.; CAZARIN, C. B. B. Nutritional quality and nutrient bioaccessibility in sourdough bread. **Current Opinion in Food Science**, v. 40, p. 81-86, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.007>.

CAPPELLI, A.; CINI, E. Challenges and opportunities in wheat flour, pasta, bread, and bakery product production chains: A systematic review of innovations and improvement strategies to increase sustainability, productivity, and product quality. **Sustainability**, v. 13, n. 5, p. 2608, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su13052608>.

CARBONETTO, B. *et al.* Interactions between *Kazachstania humilis* yeast species and lactic acid bacteria in sourdough. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 240, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020240>.

CARREZ, M. C. Le ferrocyanure de potassium et l'acétate de zinc comme agents de défécation des urines. *Annales de Chimie Analytique*, v. 13, p. 97-101, 1908.

CHAVAN, R. S.; CHAVAN, S. R. Sourdough technology - a traditional way for wholesome foods: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 169–182, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2011.00148.X>.

COLOSIMO, R. *et al.* The effect of sourdough fermentation on *Triticum dicoccum* from Garfagnana: ¹H NMR characterization and analysis of the antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 305, p. 125510, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125510>.

COMASIO, A. *et al.* Diverse microbial composition of sourdoughs from different origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1212, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01212>.

COSTANTINI, A. *et al.* How cereal flours, starters, enzymes, and process parameters affect the in vitro digestibility of sourdough bread. **Food Research International**, v. 159, p. 111614, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111614>.

DAPČEVIĆ-HADNADEV, T. *et al.* Ancient wheat varieties and sourdough fermentation as a tool to increase bioaccessibility of phenolics and antioxidant capacity of bread. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 3985, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11243985>.

DE ANGELIS, M.; DAMIANO, N.; RIZZELLO, C. G. Sourdough fermentation as a tool for the manufacture of low-glycemic index white wheat bread enriched in dietary fibre. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 593–601, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1085-1>.

DE ANGELIS, M. *et al.* Use of sourdough lactobacilli and oat fibre to decrease the glycaemic index of white wheat bread. **The British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1196–1205, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114507772689>.

DE LUCA, L. *et al.* Volatile organic compounds in bread prepared with different sourdoughs. **Applied Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1330, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app11031330>.

DE VUYST, L.; COMASIO, A.; VAN KERREBROECK, S. Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 15, p. 2447–2479, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1976100>.

DE VUYST, L. *et al.* Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 26–34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>.

DE VUYST, L.; VAN KERREBROECK, S.; LEROY, F. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 100, p. 49–160, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2017.02.003>.

DEMIRKESEN-BICAK, H. *et al.* Effect of different fermentation conditions on estimated glycemic index, in vitro starch digestibility, and textural and sensory properties of sourdough bread. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 514, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10030514>.

DRAKULA, S. *et al.* Alteration of phenolics and antioxidant capacity of gluten-free bread by yellow pea flour addition and sourdough fermentation. **Food Bioscience**, v. 44, p. 101424, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101424>.

ENGLYST, K. N.; HUDSON, G. J.; ENGLYST, H. N. **Starch analysis in food**. Englyst Carbohydrate Services, Eastleigh, UK. Encyclopedia of Analytical Chemistry, Online. John Wiley & Sons, Ltd., 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1029>.

ESPINOSA-RAMÍREZ, J. *et al.* Functional and nutritional replacement of gluten in gluten-free yeast-leavened bread by using β -conglycinin concentrate extracted from soybean flour. **Food Hydrocolloids**, v. 84, p. 353-360, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.021>.

FANG, L. *et al.* Effects of mixed fermentation of different lactic acid bacteria and yeast on phytic acid degradation and flavor compounds in sourdough. **Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]**, v. 174, p. 114438, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114438>.

FU, W. *et al.* Screening of lactic acid bacteria and yeasts from sourdough as starter cultures for reduced allergenicity wheat products. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 751, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9060751>.

GALLI, V. *et al.* Isolation and characterization of indigenous *Weissella confusa* for in situ bacterial exopolysaccharides (EPS) production in chickpea sourdough. **Food Research International** (Ottawa, Ont.), v. 138, p. 109785, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109785>.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 37, p. 2-10, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007>.

GÄNZLE, M. G.; LOPONEN, J.; GOBBETTI, M. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 10, p. 513-521, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.04.002>.

GOBBETTI, M. *et al.* Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 103-113, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018>.

GOBBETTI, M. *et al.* How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. **Food Microbiology**, v. 37, p. 30-40, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.012>.

GOÑI, I.; GARCIA-ALONSO, A.; SAURA-CALIXTO, F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. **Nutrition Research**, v. 17, n. 3, p. 427-437, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(97\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00010-9).

GRAÇA, C. *et al.* Sourdough fermentation as a tool to improve the nutritional and health-promoting properties of its derived-products. **Fermentation**, v. 7, p. 246, 2021. <https://doi.org/10.3390/Fermentation7040246>.

GÜL, L. B.; GÜL, O.; ÇON, A. H. Potential of three different lactic acid bacteria to use as starter culture for production of type II sourdough bread making. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 5, p. 3998-4008, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01493-0>.

HERNÁNDEZ-FIGUEROA, R. H. et al. Assessment of antifungal activity of aqueous extracts and protein fractions from sourdough fermented by *Lactiplantibacillus plantarum*. **Future Foods**, v. 9, p. 100314, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100314>.

HUYS, G.; DANIEL, H.-M.; DE VUYST, L. **Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria**. In: Handbook on Sourdough Biotechnology. Springer US, p. 105–154, 2013.

JURÁŠKOVÁ, D.; RIBEIRO, S. C.; SILVA, C. C. G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. **Foods**, v. 11, n. 2, p. 156, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>.

KETABI, A. et al. Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 948-951, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.009>.

KIELISZEK, M. et al. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 26, n. 7, p. 1858, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>.

KRUPA-KOZAK, U. et al. Novel gluten-free bread with an extract from flaxseed by-product: The relationship between water replacement level and nutritional value, antioxidant properties, and sensory quality. **Molecules**, v. 27, p. 2690, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27092690>.

KULATHUNGA, J.; WHITNEY, K.; SIMSEK, S. Impact of starter culture on biochemical properties of sourdough bread related to composition and macronutrient digestibility. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102640, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102640>.

LAU, S. W. et al. Sourdough microbiome comparison and benefits. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1355, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355>.

LEENHARDT, F. et al. Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 98–102, 2005. <https://doi.org/10.1021/JF049193Q>.

LIN, S. et al. Impact of supplement of Qingke flours on physicochemical properties, sensory and in vitro starch digestibility of wheat bread and its enhancement by bread quality improvers. **Food Chemistry: X**, v. 19, p. 100855, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100855>.

LU, Y. et al. Effect of processing on phenolic composition of dough and bread fractions made from refined and whole wheat flour of three wheat varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, n. 43, p. 10431-10436, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf501941r>.

LUTI, S. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdoughs containing selected Lactobacilli strains are retained in bread. **Food Chemistry**, v. 322, p. 126710, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126710>.

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, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>.

MA, S. *et al.* Sourdough improves the quality of whole-wheat flour products: Mechanisms and challenges - A review. **Food Chemistry**, v. 360, p. 130038, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130038>.

MANNINO, G. *et al.* Preliminary investigation of biogenic amines in type I sourdoughs produced at home and bakery level. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 293, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins14050293>.

MARTINEZ TUPPIA, C. *et al.* *In vitro* human gastrointestinal digestibility and colonic fermentation of wheat sourdough and yeast bread. **Foods**, v. 13, n. 18, p. 3014, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods13183014>.

MATTHEWS, J. N. *et al.* Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v. 300, p. 6719, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6719.230>.

MENEZES, L. A. A. *et al.* Reducing FODMAPs and improving bread quality using type II sourdough with selected starter cultures. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 72, n. 7, p. 912-922, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1892603>. Acesso em: 13 mar. 2025.

MUNCH-ANDERSEN, C. B. *et al.* The impact of fermentation length and dough composition on the stability of liquid sourdough starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 426, p. 110932, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110932>. Acesso em: 13 mar. 2025.

MUÑOZ, R. *et al.* Biotransformation of phenolics by *Lactobacillus plantarum* in fermented foods. In: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. **Fermented foods in health and disease prevention**. Elsevier, 2017. p. 63-83.

MUÑOZ, R. *et al.* Food phenolics and *Lactiplantibacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 412, p. 110555, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110555>.

NEY, L. M. *et al.* Short chain fatty acids: key regulators of the local and systemic immune response in inflammatory diseases and infections. **Open Biology**, v. 13, n. 3, p. 230014, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsob.230014>.

NIONELLI, L. *et al.* Exploitation of Albanian wheat cultivars: Characterization of the flours and lactic acid bacteria microbiota, and selection of starters for sourdough fermentation. **Food**

Microbiology, v. 44, p. 96-107, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.011>.

OGUNREMI, O. R.; BANWO, K.; SANNI, A. I. Starter-culture to improve the quality of cereal-based fermented foods: trends in selection and application. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 38-43, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.003>.

OLOJEDE, A. O. *et al.* Sensory and antioxidant properties and *in-vitro* digestibility of gluten-free sourdough made with selected starter cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 129, p. 109576, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109576>.

ÖZCELIK, S.; KULEY, E.; ÖZOGUL, F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 73, p. 536-542, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.066>.

OZGOLET, M. *et al.* The effect of five different sourdough on the formation of glyoxal and methylglyoxal in bread and influence of *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v. 371, p. 131141, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131141>.

PĂCULARU-BURADA, B. *et al.* **Current approaches in sourdough production with valuable characteristics for technological and functional applications.** In: The Annals of the University “Dunărea de Jos” of Galați, 2020, 44, 1, p. 132-148. Disponível em: <https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2020.1.08>.

PARAKHINA, O. *et al.* Evaluation of selected lactic acid bacteria as starter cultures for gluten-free sourdough bread production. **Agronomy Research**, v. 19, n. S3, p. 1260-1272, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/AR.21.087>.

PARMAR, N.; DAHIYA, S.; KUMA, S. Changes in polyphenol content of newly released varieties of wheat during different processing methods. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000575>.

PEJCZ, E. *et al.* Enhancing bread's benefits: investigating the influence of boosted native sourdough on FODMAP modulation and antioxidant potential in wheat bread. **Foods**, v. 12, n. 19, p. 3552, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12193552>.

PEJCZ, E. *et al.* Effect of inoculated lactic acid fermentation on the fermentable saccharides and polyols, polyphenols and antioxidant activity changes in wheat sourdough. **Molecules**, v. 26, p. 4193, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26144193>.

PÉREZ-ALVARADO, O. *et al.* Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits. **Frontiers of Microbiology**, v. 13, e969460, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969460>.

PICO, J.; BERNAL, J.; GÓMEZ, M. Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: a review. **Food Research International**, v. 75, p. 200-215, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.051>.

PLESSAS, S. Advancements in the use of fermented fruit juices by lactic acid bacteria as functional foods: Prospects and challenges of *Lactiplantibacillus* (Lpb.) *plantarum* subsp. *plantarum* application. **Fermentation**, v. 8, n. 6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation8010006>.

PLESSAS, S. *et al.* Nutritional improvements of sourdough bread made with freeze-dried functional adjuncts based on probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* and pomegranate juice. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1113, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox12051113>.

RAHMAN, M. M. *et al.* Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 27, p. 233, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>.

RAMOS, C. L. *et al.* Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. **Food Microbiology**, v. 36, p. 22-29, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.010>.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).

REALE, A. *et al.* Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (Food Science and Technology)**, v. 73, p. 622-629, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.065>.

RIBET, L. *et al.* Nutritional benefits of sourdoughs: A systematic review. **Advances in Nutrition**, v. 14, p. 22-29, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2023.01.022>.

RIPARI, V.; BAI, Y.; GÄNZLE, M. G. Metabolism of phenolic acids in whole wheat and rye malt sourdoughs. **Food Microbiology**, v. 77, p. 43-51, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.009>.

RIZZELLO, C. G. *et al.* Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. **Food Microbiology**, v. 37, p. 59-68, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.017>.

RIZZELLO, C. G. *et al.* Sourdough fermented bread are more digestible than those started with baker's yeast alone: an in vivo challenge dissecting distinct gastrointestinal responses. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2954, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11122954>.

SADEGHI, A. *et al.* FoodOmics as a promising strategy to study the effects of sourdough on human health and nutrition, as well as product quality and safety; back to the future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 136, p. 24-47, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.026>.

SAGAR, N. A.; PAREEK, S. Fortification of multigrain flour with onion skin powder as a natural preservative: Effect on quality and shelf life of the bread. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100992, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100992>.

SAHIN, M. *et al.* Harnessing the role of three lactic acid bacteria (Lab) strains for type II sourdough production and influence of sourdoughs on bread quality and maillard reaction products. **Foods**, v. 13, n. 12, p. 1801, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods13121801>.

SALMINEN, S. *et al.* The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, p. 649-667, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>.

SCAZZINA, F. *et al.* Sourdough bread: starch digestibility and postprandial glycemic response. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 419-421, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.12.008>.

SEVGILI, A.; ERKMEN, O.; KOÇASLAN, S. Identification of lactic acid bacteria and yeasts from traditional sourdoughs and sourdough production by enrichment. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 39, n. 4, p. 312-318, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/56/2021-CJFS>.

SHA, H. Y.; WANG, Q. Q.; LI, Z. J. Comparison of the effect of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from sourdough on dough characteristics and steamed bread quality. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 58, n. 1, p. 378-386, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.15881>.

SIDARI, R. *et al.* Persistence and effect of a multistrain starter culture on antioxidant and rheological properties of novel wheat sourdoughs and bread. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1258, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9091258>.

SIEPMANN, F. B. *et al.* Brazilian sourdough: Microbiological, structural, and technological evolution. **European Food Research Technology**, v. 245, p. 1583-1594, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03254-8>.

SIEUWERTS, S.; BRON, P. A.; SMID, E. J. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (Food Science and Technology)**, v. 90, p. 201-206, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.022>.

SILVA, A. F. *et al.* Bread enriched with resveratrol: Influence of the delivery vehicles on its bioactivity. **Food Bioscience**, v. 49, p. 101887, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101887>.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152-178, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

- SIRIN, S.; ASLIM, B. Protective effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria against amyloid beta1-42 induced oxidative stress in SH-SY5Y cells: Involvement of the AKT, MAPK, and NF- κ B signaling pathway. **Process Biochemistry**, v. 106, p. 50-59, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.04.003>.
- STEPHANY, T. Structural characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* Ts. **Acta Scientifica Naturalis**, v. 9, n. 3, p. 71-83, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/asn-2022-0022>.
- STEPHEN, J. M.; SALEH, A. M. Homofermentative Lactobacilli isolated from organic sources exhibit potential ability of lactic acid production. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1297036, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1297036>.
- SU, X. *et al.* Effect of organic acids on bread quality improvement. **Food Chemistry**, v. 278, p. 267-275, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.011>.
- SUBAŞI, A. S.; ERCAN, R. The effects of wheat variety, sourdough treatment and sourdough level on nutritional characteristics of whole wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 110, p. 103637, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2023.103637>.
- SWIECA, M. *et al.* Nutritional and pro-health quality of lentil and adzuki bean sprouts enriched with probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (Food Science and Technology)**, v. 100, p. 220-226, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.081>.
- SYROKOU, M. K. *et al.* Microbial ecology of Greek wheat sourdoughs, identified by a culture-dependent and a culture-independent approach. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1603, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9111603>.
- TALLON, R.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M. C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 705-712, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>.
- TEMKOV, M. *et al.* Influence of baking time and formulation of part-baked wheat sourdough bread on the physical characteristics, sensory quality, glycaemic index and appetite sensations. **Frontiers in Nutrition**, v. 11, p. 1370086, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1370086>.
- THE JAMOVİ PROJECT. Jamovi (Version 2.6.23) [Computer Software], 2024. Disponível em: <https://www.jamovi.org>.
- THOMAS, R. M. *et al.* Nutritional and sensory quality of Ofada rice sourdough bread made with selected lactic acid bacteria strains. **Heliyon**, v. 9, n. 10, e20828, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20828>.
- VERDONICK, C. *et al.* Impact of process parameters on the specific volume of whole meal wheat bread made using sourdough-and baker's yeast-based leavening strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 396, p. 110193, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110193>.

WANG, Z.; WANG, L. Impact of sourdough fermentation on nutrient transformations in cereal-based foods: Mechanisms, practical applications, and health implications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 7, n. 2, p. 124-132, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2024.03.001>.

WEN, J. J. *et al.* Resistant starches and gut microbiota. **Food Chemistry**, v. 387, p. 132895, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132895>.

WERNING, M. L. *et al.* Biological functions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their potential benefits for humans and farmed animals. **Foods**, v. 11, n. 9, p. 1284, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11091284>.

WOO, S. H. *et al.* Characterization of lactic acid bacteria and yeast from grains as starter cultures for gluten-free sourdough. **Foods**, v. 12, n. 23, p. 4367, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12234367>.

WOOD, I. P. *et al.* Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, p. 117-121, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>.

YAMAN, M.; SARGIN, H. S.; MIZRAK, Ö. F. Free sugar content, in vitro starch digestibility and predicted glycemic index of ready-to-eat breakfast cereals commonly consumed in Turkey: An evaluation of nutritional quality. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 1082–1087, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.037>.

YILMAZ, T.; ŞİMŞEK, Ö. Potential health benefits of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3293, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25143293>.

YU, Y. *et al.* Contribution of spontaneously-fermented sourdoughs with pear and navel orange for the bread-making. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food Science and Technology]**, v. 89, p. 336–343, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.001>.

ZEHİR ŞENTÜRK, D.; DERTLİ, E.; ERTEN, H. Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. **Food Science Biotechnology**, v. 29, p. 121–129, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00641-5>.

ZHANG, J. *et al.* Impact of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria on the chemical, rheological properties of buckwheat sourdough and the quality of buckwheat bread. **Food Chemistry**, v. 425, p. 136369, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136369>.

ZHOU, D.; MA, Z.; HU, X. Isolated pea resistant starch substrates with different structural features modulate the production of short-chain fatty acids and metabolism of microbiota in anaerobic fermentation *in vitro*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 69, n. 18, p. 5392-5404, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c08197>.

Material suplementar

Tabela S1

Formulações de fermento natural inoculados com cepas de *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47) e *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83), a 30 ± 0.1 °C.

Ingredients	Fermento natural		
	Cp41	Lp47	Lb83
Farinha de trigo branca	100 g	100 g	100 g
Água	80 g	80 g	80 g
Cultura Cp41	20 g	-	-
Cultura Lp47	-	20 g	-
Cultura Lb83	-	-	20 g
Total de água/total de farinha	0,8	0,8	0,8

Tabela S2

Formulações de pães inoculados (SB) com as cepas *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47), *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83) e o pão controle (não inoculado), preparados em diferentes tempos de fermentação (2, 3 e 4 horas), a $30 \pm 0,1$ °C.

Ingredients	Formulações (g)			
	Pão controle	SBCp41	SBLp47	SBLb83
Farinha de trigo branca	100 g	100 g	100 g	100 g
Água	62 g	52 g	52 g	52 g
Fermento natural	-	50 g	-	-
Fermento natural	-	-	50 g	-
Fermento natural	-	-	-	50 g
Levedura	0.3 g	0.3 g	0.3 g	0.3 g
Sal	2 g	2 g	2 g	2 g
Total de água/total de farinha	0,62	0,52	0,52	0,52

SB: pão de fermentação natural

Figura S1A

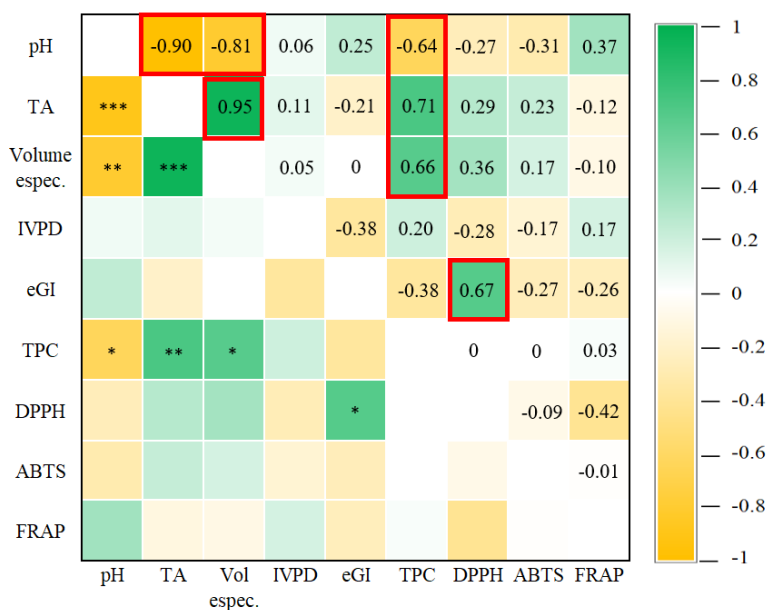


Figura S1B

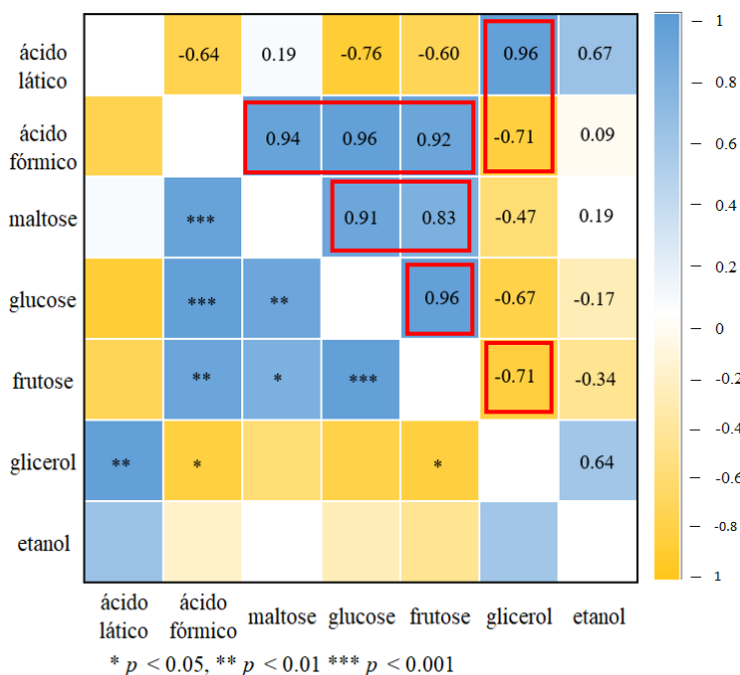


Figura S1A e S1B

(A) Mapa de calor do coeficiente de correlação de Pearson entre pH, acidez total (TA), volume específico, digestibilidade *in vitro* de proteínas (IVPD), índice glicêmico estimado (eGI), compostos fenólicos totais (TPC) e conteúdo antioxidante (DPPH*, ABTS* e FRAP). (B) Mapa de calor do coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis açúcar, álcoois, ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido fórmico) do pão de fermentação natural inoculado (SB) com *Companilactobacillus paralimentarius* 41 (Cp41), *Lactiplantibacillus plantarum* 47 (Lp47), *Levilactobacillus brevis* 83 (Lb83) e pão controle (não inoculado). O asterisco (*) denota $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.