



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, SOCIAIS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
AGROALIMENTAR

**IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE CEPAS DE
FERMENTOS NATURAIS DE DIFERENTES REGIÕES DA
PARAÍBA E ESTUDO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E
BIOATIVO PARA PANIFICAÇÃO**

Ana Regina Simplício de Medeiros

Bacharela em Gastronomia



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, SOCIAIS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
AGROALIMENTAR

**IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE CEPAS DE
FERMENTOS NATURAIS DE DIFERENTES REGIÕES DA
PARAÍBA E ESTUDO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E
BIOATIVO PARA PANIFICAÇÃO**

Ana Regina Simpício de Medeiros

Orientadora: **Profa. Dra. Angela Maria Tribuzy De Magalhães Cordeiro**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Estefânia Fernandes Garcia**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias - CCHSA, Campus de Bananeiras, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Agroalimentar

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M488i Medeiros, Ana Regina Simplicio de.

Identificação e seleção de cepas de fermentos naturais de diferentes regiões da Paraíba e estudo do potencial tecnológico e bioativo para panificação / Ana Regina Simplicio de Medeiros. - Bananeiras, 2024.
119 f. : il.

Orientação: Angela Maria Tribuzy De Magalhães Cordeiro.

Coorientação: Estefânia Fernandes Garcia.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHSA.

1. Compostos bioativos. 2. Bactéria láctica. 3. Fermentação. 4. Sourdough. 5. Lactobacillus spp. I. Cordeiro, Angela Maria Tribuzy De Magalhães. II. Garcia, Estefânia Fernandes. III. Título.

UFPB/CHÃ CCHSA

CDU 631(042.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, SOCIAIS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AGROALIMENTAR

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: Identificação e seleção de cepas de fermentos naturais de diferentes regiões da Paraíba e estudo do potencial tecnológico e bioativo para panificação.


AUTOR: Ana Regina Simplício de Medeiros

ORIENTADORA: Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro


JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO


EXAMINADORES:

Documento assinado digitalmente
 ANGELA MARIA TRIBUZY DE MAGALHAES CORDI
Data: 27/12/2024 16:56:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro
Orientadora
Universidade Federal da Paraíba/UFPB

Documento assinado digitalmente
 INGRID CONCEICAO DANTAS GONCALVES
Data: 20/01/2025 09:07:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ingrid Conceição Dantas Guerra
1º Examinadora
Universidade Federal da Paraíba/UFPB

Documento assinado digitalmente
 NOADIA PRISCILA ARAUJO RODRIGUES
Data: 19/01/2025 19:53:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Noádia Priscila Araújo Rodrigues
2º Examinadora
Universidade Federal da Paraíba/UFPB

Bananeiras, 30 de julho de 2024

Informações curriculares do autor

Eu, Ana Regina Simplício de Medeiros, filha de Maria de Fátima Simplício e Luiz Alves de Medeiros, nasci no décimo nono dia de fevereiro de 1988, na cidade de Patos, sertão paraibano. Lá, dei meus primeiros passos na vida acadêmica e, no ano de 2015, conclui minha primeira graduação em Tecnologia em Segurança no Trabalho, pelo Instituto Federal da Paraíba. Não satisfeita, em 2017 redirecionei o meu caminho e comecei a cursar o bacharelado em Gastronomia, pela Universidade Federal da Paraíba, na cidade de João Pessoa, PB. Adentrei o ensino, a pesquisa e a extensão, passando pelos três pilares e uma pandemia, me formei em 2022, com láurea acadêmica. Neste mesmo ano, participei do processo seletivo para o Programa de Pós Graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA/UFPB), na cidade de Bananeiras, PB. No ano de 2024, este em que vos escrevo, defendi minha dissertação e dei mais um dos muitos passos que pretendo dar nessa corrida e satisfatória vida acadêmica.

O mundo era tão recente que muitas coisas careciam de nome, e para mencioná-las era preciso apontar com o dedo.

Gabriel García Márquez

Se sou, é porque eles são.

Maria de Fátima Simplício e Luiz Alves Medeiros,

Diante de tanta força, generosidade e amor, vos dedico.

AGRADECIMENTOS

A pós-graduação me chegou cheia de expectativas, entre elas, o peso que sua fama possui. No entanto, esse peso não se abateu sobre mim. Trabalhar com o que me instiga teve sua responsabilidade, mas ter comigo nessa caminhada pessoas tão queridas e generosas foi o verdadeiro motivo de tamanha leveza. Sou grata,

À minha orientadora, Angela Tribuzy que, com sua gentileza, acolheu a mim e ao projeto com entusiasmo e afeição. Agradeço a orientação atenta e o voto de confiança diante de temas ainda desconhecidos.

À Estefânia Garcia que, com sua generosidade, me presenteou com um projeto muito bonito. Seu acolhimento, desde a graduação, e o prazer pelo ensino me permitiu ser uma pesquisadora curiosa e competente. Boa parte de quem sou, enquanto pesquisadora, devo a ela.

Às queridas professoras, Ingrid Dantas e Noádia Priscila, que me auxiliaram ao longo da vida acadêmica e fizeram contribuições valiosas e necessárias como membros da banca examinadora. Agradeço o carinho e o zelo.

Às técnicas do laboratório de Microbiologia, Cláudia Gouveia e Karoliny Sampaio, que, além de partilharem pacientemente seus conhecimentos, tornaram os dias mais leves entre conversações e histórias.

À professora Ana Braga e os técnicos do laboratório de Análise Físico-química, Maristela Alcântara e Renê Silva, que me apresentaram o desconhecido com paciência e dedicação.

À Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA) e ao seu comprometido corpo docente, responsáveis em grande parte pela minha formação acadêmica e profissional.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (Fapesq-PB), por proporcionar aos pesquisadores condições de se manterem em seus ofícios.

A Fabrício Moraes, pelo amor, companheirismo e ternura ao longo desses anos. Quem, cotidianamente, me incentiva, inspira e faz com que os meus dias sejam sempre melhores. Agradeço a paciência e a extrema generosidade.

Aos meus tão afetuosos pais, Fátima Simplício e Luiz Medeiros, pela cumplicidade e cuidado, que, mesmo longe, nunca estiveram distantes. A eles, serei eternamente grata. A eles, todo o meu amor.

Às minhas irmãs, Jacqueline e Luiza, e aos meus irmãos, Marcelo e João Luiz, por partilharem comigo a delicadeza da vida em suas mais diversas facetas.

Ao meu sobrinho, Eberth Filho, que me encanta com sua inocência, gentileza e alegria.

Às queridas amigas de todas as horas, Dchirmeine Carmen e Rilávia Rocha, que nunca me deixaram faltar afetos, nas alegrias e tristezas, dessa longa caminhada.

À família de Sousa Moraes, em especial à Irusa e Lourival - *in memoriam* -, por terem me acolhido com tanto carinho.

À Caroline Brasil, Malu Soares e Mayslane Gomes, por todo o amor que partilhamos mesmo quando estamos distantes.

Aos meus companheiros de pesquisa, Gabriel Barbosa e Marcus Couto, que quebraram a barreira acadêmica e se tornaram amigos queridos. Dos responsáveis pela leveza nas exaustivas e instigantes horas laboratoriais.

À Tatiana Zanella que mais uma vez, incansável e pacientemente, me auxiliou nas análises, leituras e interpretações estatísticas. O seu prazer em compartilhar é admirável.

Àqueles que de alguma maneira contribuíram para que essa pesquisa fosse realizada, meu mais sincero agradecimento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. Fermento Natural e Bactérias Ácido Láticas	16
2.2. BAL: Potencial Tecnológico e Bioativo Aplicado à Panificação	19
2.3. Fatores Ambientais	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Materiais	25
3.2. Locais de Execução	26
3.3. Isolamento e Pré-Identificação	27
3.4. Identificação dos Isolados pela técnica de MALDI-TOF – “MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT”	27
3.5. Manutenção dos Isolados e Ativação das Cepas	29
3.6. Testes Tecnológicos e de Seleção de Cepas	29
3.6.1. Acidificação e Crescimento	29
3.6.2. Produção de exopolissacarídeo (EPS)	29
3.6.3. Atividade proteolítica	30
3.6.4. Testes de Tolerância a diferentes concentrações de Ácido, Sal, Sacarose e Etanol	30
3.7. Elaboração Dos Fermentos Naturais	31
3.8. Estudo das Características Físico-Químicas, Microbiológicas, Bioativas e Tecnológicas dos Fermentos Naturais Inoculados com <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83	32
3.8.1. pH e Acidez Titulável Total	32
3.8.2. Quantificação e Perfil de Fenólicos	32
3.8.3. Atividade Antioxidante	33
3.8.4. Viabilidade das BAL	33
3.8.5. Perfil de Ácidos Orgânicos e Açúcares	34
3.8.6. Aumento de Volume e Geração de CO ₂ durante a Fermentação....	34
3.8.7. Propriedades Reológicas dos Fermentos Inoculados com <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 47 e <i>Levilactobacillus brevis</i> 83	34

3.8.8. Textura Instrumental	35
3.9. Análises Estatísticas	35
4. RESULTADOS	37
4.1. Isolamento e Pré-Identificação	37
4.2. Identificação dos Isolados por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF-MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT)	37
4.3. Testes Tecnológicos e de Seleção	39
4.4. Testes de Tolerância a Estresse Ácido, Sal, Sacarose e Etanol	41
4.4.1. Teste de Tolerância a NaCl (OD _{595nm}) em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.....	42
4.4.2. Teste de Tolerância a Sacarose (OD _{595nm}) em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.	44
4.4.3. Teste de Tolerância a Diferentes pHs (OD _{595nm}) após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.	47
4.4.4. Teste de Tolerância a Etanol (OD _{595nm}) em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.....	48
4.4.5. Seleção de Cepas Tolerantes a Diferentes Condições de Estresse	50
4.6. Caracterização Físico-química do Fermento	51
4.7. Caracterização Bioativa do Fermento.....	53
4.8. Caracterização Tecnológica do Fermento	57
5. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE A.....	76
APÊNDICE B.....	81

IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE CEPAS DE FERMENTOS NATURAIS DE DIFERENTES REGIÕES DA PARAÍBA E ESTUDO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E BIOATIVO PARA PANIFICAÇÃO

RESUMO - Esse trabalho teve como objetivo desenvolver um fermento natural dominante, com características controladas, a partir de cepas de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) isoladas das diferentes regiões climáticas da Paraíba, com potencial tecnológico e bioativo. A princípio, foram coletados quatro fermentos naturais em municípios pertencentes às regiões úmida, subúmida e semiárida. A microbiota desses fermentos foi isolada e pré-identificada. Dos 129 isolados obtidos, 24 apresentaram características típicas de BAL e foram identificados por espectrometria de massa (MALDI-TOF) como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Companilactobacillus paralimentarius* e *Levilactobacillus brevis*. *C. paralimentarius* predominou na região úmida, enquanto *L. plantarum* dominou nas demais. Por meio da análise de componentes principais (PCA), foram selecionadas 17 cepas que apresentaram os melhores resultados quanto ao potencial tecnológico. Elas foram testadas quanto à tolerância a estresse em ácido, sal, sacarose e etanol em diferentes concentrações. *L. plantarum* 47 (Lp47) e *L. brevis* 83 (Lb83) foram selecionadas pela PCA em virtude de seu melhor desempenho para serem utilizadas como cultura iniciadora. Lp47 foi a mais tolerante nas condições ácidas e salinas, enquanto Lb83 se destacou pela maior sobrevivência em altas concentrações de etanol. Essas cepas foram selecionadas para o desenvolvimento do fermento natural e apresentaram bom desempenho físico-químico, bioativo e tecnológico. O rápido crescimento e acidificação de Lp47 e Lb83 estão associados diretamente à sua origem autóctone e à adaptação aos meios estressores do fermento natural. No entanto, Lp47 acidificou o meio mais rapidamente, mantendo-se estabilizado na contagem de células viáveis após 4 horas de fermentação, enquanto Lb83 estabilizou contagem após 6 horas. Ambos os fermentos apresentaram atividade antioxidante e aumento nos compostos fenólicos durante a fermentação, não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Em relação à reologia, a rigidez das amostras após 8 horas de fermentação foi aproximadamente 10 vezes maior do que nas amostras fermentadas por 24 horas. Os resultados demonstraram a viabilidade de usar Lp47 ou Lb83 como culturas iniciadoras de fermento natural, reforçando que as cepas autóctones se destacam pelo bom desenvolvimento tecnológico em processos de panificação, sendo indicadas para iniciar esse processo de forma rápida, controlada e segura.

Palavras-chave: Compostos bioativos, bactéria láctica, fermentação, sourdough, *Lactobacillus spp.*

IDENTIFICATION AND SELECTION OF NATURAL STARTER STRAINS FROM DIFFERENT REGIONS OF PARAÍBA AND STUDY OF THEIR TECHNOLOGICAL AND BIOACTIVE POTENTIAL FOR BAKING

ABSTRACT - This study aimed to develop a dominant sourdough starter with controlled characteristics, derived from strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from different climatic regions of Paraíba, with technological and bioactive potential. Initially, four sourdough starters were collected from municipalities within the humid, subhumid, and semi-arid regions. The microbiota of these starters was isolated and preliminarily identified. Out of 129 isolates obtained, 24 exhibited typical LAB characteristics and were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF) as *Lactiplantibacillus plantarum*, *Companilactobacillus paralimentarius*, and *Levilactobacillus brevis*. *C. paralimentarius* predominated in the humid region, while *L. plantarum* dominated in the other regions. Through principal component analysis (PCA), 17 strains were selected for their superior technological potential. These strains were tested for stress tolerance to acid, salt, sucrose, and ethanol at various concentrations. *L. plantarum* 47 (Lp47) and *L. brevis* 83 (Lb83) were selected by PCA due to their superior performance for use as starter cultures. Lp47 was the most tolerant under acidic and saline conditions, while Lb83 stood out for its higher survival at high ethanol concentrations. These strains were selected for the development of the sourdough starter and demonstrated good physicochemical, bioactive, and technological performance. The rapid growth and acidification of Lp47 and Lb83 are directly associated with their autochthonous origin and adaptation to the stressful conditions of the sourdough. However, Lp47 acidified the medium more quickly, stabilizing its viable cell count after 4 hours of fermentation, while Lb83 stabilized its count after 6 hours. Both starters exhibited antioxidant activity and an increase in phenolic compounds during fermentation, with no significant difference between them ($p>0.05$). In terms of rheology, the rigidity of the samples after 8 hours of fermentation was approximately 10 times greater than that of the samples fermented for 24 hours. The results demonstrated the feasibility of using Lp47 or Lb83 as starter cultures for sourdough, highlighting that autochthonous strains excel in technological development in baking processes and are recommended for initiating this process in a rapid, controlled, and safe manner.

Keywords: Bioactive compounds, lactic bacteria, fermentation, sourdough, *Lactobacillus spp.*

1. INTRODUÇÃO

A fermentação, uma das técnicas mais antigas no processamento de alimentos, é amplamente reconhecida por suas propriedades funcionais, capacidade de alterar o sabor e por melhorar a biodisponibilidade dos nutrientes (Fan et al., 2024). Na panificação, a principal mudança causada pela fermentação é a transformação de uma massa densa em uma massa levedada. Isso ocorre devido à geração de CO₂, resultante do metabolismo dos microrganismos (De Vuyst et al., 2017).

Comumente, dois tipos de agentes de fermentação são usados na fabricação de pães: fermento biológico instantâneo, que são preparações comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, e/ou fermento natural. O fermento natural é composto de uma mistura de farinha de cereais e água em que uma população heterogênea de bactérias, principalmente bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras realizam a fermentação (De Vusyt et al., 2021; Fekri et al., 2024).

O uso de fermento biológico ainda é dominante em produtos industrializados, enquanto os fermentos naturais são mais comuns entre os produtores artesanais (Rizzello et al., 2019; Albagli et al., 2021). No entanto, o uso de fermento natural em produções de larga escala vem aumentando (Paucean et al., 2024), devido à crescente demanda por produtos saudáveis e naturais (Albagli et al., 2021; Fekri et al., 2024). Diversos estudos (Papadimitriou et al., 2019; Fang et al., 2023; Sanmartín et al., 2024; Viola et al., 2024) têm demonstrado os efeitos positivos da fermentação natural na qualidade tecnológica e nutricional do pão.

O mercado global de produtos de fermentação natural foi avaliado em US\$2.19 bilhões em 2020, com taxa de crescimento anual prevista em 8% até 2030 (Lima et al, 2023). A Europa é a maior consumidora destes produtos, seguida da América do Norte, com projeções futuras apontando o forte crescimento no continente asiático (Albagli et al, 2021; Lima et al, 2023). Nos últimos anos, grandes empresas de panificação, como a Bauducco (Brasil), Marilan (Brasil), IREKS GmbH (Alemanha), Knead Love (EUA), incorporaram

produtos de fermentação natural ao seu portfólio (Lima et al, 2023), reforçando à demanda por este tipo de alimento.

Atualmente destacam-se quatro tipos de fermentos naturais que podem ser inoculados ou não com culturas iniciadoras, melhorando assim seu desempenho tecnológico e funcional. No entanto, dependendo do tipo de fermentação utilizada, é necessário tempo e profissionais qualificados para a sua correta manutenção (Reale et al, 2020), tornando o processo caro e de difícil padronização. Deste modo, o uso de fermento natural de culturas iniciadoras é uma alternativa viável, pois guiam o processo fermentativo de maneira controlada (Siepmann et al, 2019).

Quanto às cepas iniciadoras do fermento o ideal é utilizar aquelas que se adaptem bem às condições empregadas na panificação e que sejam resistentes a microbiota dos ingredientes, ambiente e utensílios utilizados. A literatura (Suo et al., 2020) tem sugerido que a localização geográfica é determinante nos tipos de microrganismos encontrados nas massas fermentadas, juntamente com a temperatura e outros fatores ambientais.

Deste modo identifica-se um potencial a ser investigado, trazendo essa realidade para a Paraíba, tendo em vista as distintas regiões climáticas que o estado possui. É provável que a microbiota observada em massas fermentadas nas cidades de clima úmido seja distinta de cidades de clima semiárido, por exemplo. Não existem estudos que avaliaram essa diversidade de microbiota ou que tenham identificado quais espécies predominam nas diferentes regiões.

Não só a identificação e caracterização desses microrganismos seriam importantes, como também a seleção de cepas predominantes com potenciais tecnológicos e bioativos seria o ponto chave para o desenvolvimento de um fermento natural da Paraíba que se adapte à região com características controladas. Diante do exposto, esse trabalho teve por objetivo desenvolver um fermento natural a partir de cepas de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) isoladas das diferentes regiões climáticas da Paraíba com potencial tecnológico e bioativo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fermento Natural e Bactérias Ácido Láticas

O fermento natural é composto de uma mistura de farinha de cereais e água, em que uma população heterogênea de bactérias, principalmente Bactérias Ácido Láticas (BAL) e leveduras, realizam a fermentação (De Vusyt et al, 2021). As leveduras estão diretamente ligadas à formação de dióxido de carbono (CO₂), enquanto as BAL produzem principalmente ácidos orgânicos e outros compostos aromáticos (Catzeddu, 2019). Quando comparado ao “fermento de padeiro” (*Saccharomyces cerevisiae*) as BAL apresentam diversas vantagens em termos sensoriais, nutricionais, tecnológicos e de biossegurança (Papadimitriou et al, 2019; Viola, 2024).

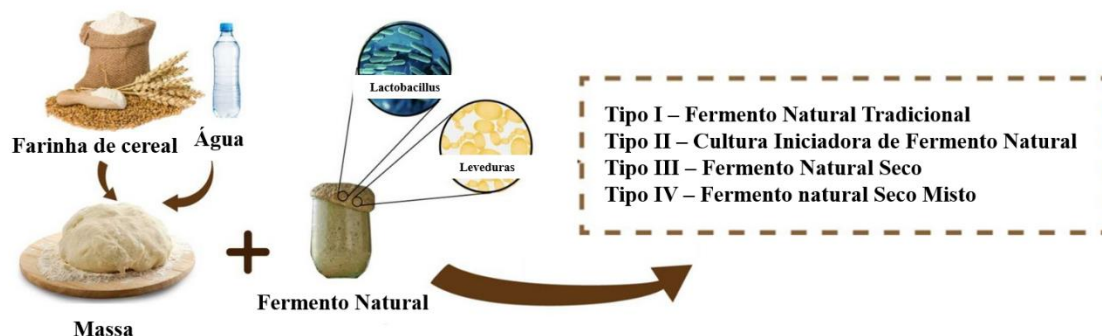
Existem quatro tipos de fermentos naturais que são classificados de acordo com o inóculo e a tecnologia utilizada para iniciar a fermentação (Stefanello et al., 2018; Catzeddu, 2019; Papadimitriou et al, 2019; De Vuyst et al, 2021). O primeiro, Tipo I, é obtido através da fermentação espontânea das BAL e leveduras presentes na farinha, na água, nos utensílios e no ambiente. A sua alimentação é feita diariamente através da propagação, técnica que consiste em uma reinoculação da massa anterior (massa mãe) com farinha e água, até atingir a estabilização e o amadurecimento das BAL, por volta de uma semana, quando poderá ser utilizada na produção de fermentados.

Durante os primeiros dias de fermentação a microbiota do fermento natural se modifica em sua composição com redução de espécies gram-negativas e aumento das gram-positivas. O amadurecimento do fermento é marcado, entre as BAL, pela predominância de lactobacilos heterofermentativos. A medida em que os processos de propagação ocorrem, predominam espécies que se adaptam melhor às condições desse ecossistema criado (Ventimiglia et al., 2015; Gobetti et al., 2016; De Vuyst et al, 2021).

O fermento tipo II foi pensado para o uso industrial e consiste na adição de uma cultura iniciadora, em altas concentrações, à mistura de farinha e água, sem a necessidade da técnica de propagação, no intuito de acidificar o meio de forma rápida e conferir atributos de sabor. Utiliza-se nesse tipo de fermento BAL isoladas que tenham por característica a tolerância à pHs mais baixos. A forte

acidificação, no entanto, pode inibir o desenvolvimento das leveduras naturais, sendo necessário o uso de fermento de padeiro na fase final do processo de fermentação (De Vuyst, 2017; Catzeddu, 2019; Papadimitriou et al, 2019; De Vuyst et al, 2021).

Figura 01 – Infográfico Sobre os Tipos de Fermentos Naturais



Fonte: Fekri et al (2024), com adaptações.

Semelhante ao tipo II, o fermento Tipo III recebe a adição de uma cultura iniciadora, no entanto esse fermento natural passa por um processo de desidratação, sendo os mais comuns a liofilização e o spray-drying (Stefanello et al., 2018; Papadimitriou et al, 2019) por garantirem a viabilidade celular após o processo (Albagli et al, 2021; Caglar et al, 2021). Por fim o fermento tipo IV, que é caracterizado pela inoculação de uma cultura iniciadora seguida do processo de propagação, sendo uma junção do tipo II com o tipo I (Catzeddu, 2019; Papadimitriou et al, 2019). A adição deliberada de uma cepa específica permite direcionar a fermentação, garantindo a obtenção de características sensoriais, tecnológicas, funcionais e nutricionais daquele isolado aos produtos finais da panificação (Montemurro et al., 2020).

Os microrganismos encontrados no fermento natural derivam de diversos fatores, entre eles podemos citar os ingredientes utilizados, os utensílios, a forma de inoculação e as condições geográficas (Suo et al., 2020; De Vusyt, 2017, De Vusyt et al, 2021; Gunduz et al, 2022). Em se tratando das BAL o gênero frequentemente observado em seu isolamento é o *Lactobacillus*, no entanto pode haver a presença de outros gêneros, como o *Pediococcus*, *Leuconostoc* e

Weissella, comumente citados na literatura (Reale, et al, 2020; Sevgili et al, 2023).

Embora mais de 60 espécies de *Lactobacillus* tenham sido isoladas e identificadas em fermentos naturais, apenas uma pequena parte pode ser considerada específica deste habitat, como é o caso dos *Fructilactobacillus sanfranciscensis* e *Companilactobacillus alimentarius*. Isso acontece porque diversas outras espécies, como o *Lactiplantibacillus plantarum* e *Levilactobacillus brevis*, por exemplo, são encontrados em diferentes matrizes alimentares (Catzeddu, 2019), não sendo exclusivas de fermentos. Esta capacidade adaptativa em diferentes nichos se dá devido a sua diversidade metabólica (Mozzi, 2016).

As BAL são um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas, catalase-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbicas (aerotolerantes), obrigatoriamente fermentativas que desempenham papel importante na produção de alimentos fermentados e podem se apresentar morfológicamente em forma de cocos (esféricas) ou de bacilos (bastonetes) (Mozzi, 2016; Gopal, 2020; De Vuyst et al, 2021). Não costumam ser patogênicas, com exceção de algumas espécies pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Carnobacterium*. Devido à sua utilização segura em produtos alimentares e por estar presente em uma diversidade de alimentos as BAL possuem o status de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e de qualidade alimentar (Mozzi, 2016; Gopal, 2020).

Em relação ao metabolismo, as BAL podem ser classificadas em dois grupos a depender da via utilizada para fermentar os carboidratos, são eles: i) homofermentativos, que utilizam a glicose, pela via Embden-Meyerhof, para produzir lactato como o produto final, a exemplo das espécies *Lactobacillus amylovorus* e *Comanilactobacillus heilongjiangensis*. encontradas na microbiota do fermento natural; e o grupo ii) heterofermentativos, que utilizam os carboidratos, principalmente a maltose, pela via do 6-fosfogluconato/fosfocetolase, para produzir etanol, acetato e dióxido de carbono, além de lactato. As espécies *Fructilactobacillus sanfranciscensis* e *Levilactobacillus brevis* são cepas heterofermentativas obrigatórias e *Lactiplantibacillus plantarum* e *Companilactobacillus alimentarius* são cepas

heterofermentativas facultativas, comuns ao fermento natural. Este grupo é o mais adaptado ao ecossistema desse fermento (Mozzi, 2016; Gopal, 2020; De Vuyst et al, 2021; Pérez-Alvarado et al, 2022).

Esses microrganismos contribuem de forma significativa nos alimentos fermentados, não só influenciando no desenvolvimento das características sensoriais desejáveis, mas também garantindo sua estabilidade microbiológica (Stefanello, 2018). A alta concentração de BAL na massa de pães elaborados com fermento natural, por exemplo, resulta da produção de ácidos orgânicos que reduzem significativamente o pH da massa e representa inúmeras vantagens (Papadimitriou et al, 2019). O baixo pH promove a ativação de proteases dos cereais envolvidos, com liberação de peptídeos que são então hidrolisados em aminoácidos pelas peptidases intracelulares das BAL, liberando aminoácidos na massa, os quais contribuem para o aroma do produto, além de conferir melhor digestibilidade, contribuindo também para uma rede de glúten mais elástica (Rossel et al, 2016; Catzeddu, 2019). Os tópicos seguintes descrevem de forma mais aprofundada sobre os potenciais tecnológicos e bioativos das BAL nos produtos de panificação

2.2. BAL: Potencial Tecnológico e Bioativo Aplicado à Panificação

As mudanças bioquímicas que acontecem em um pão de fermentação natural devido a ação enzimática (endógenas ou microbianas) influenciam diretamente em sua qualidade. Essas enzimas são ativadas devido à ação das BAL: a rápida acidificação é uma de suas principais características tecnológicas, resultante do seu metabolismo (Gunduz et al, 2022). Os fatores endógenos e exógenos, como o tipo de microrganismo e a temperatura de fermentação, vão fazer com que o pH do fermento natural maduro oscile entre 3,5 e 4,4 (Catzeddu, 2019; Reale et al, 2020). Essas alterações que ocorrem durante o processo fermentativo podem ser percebidas sensorialmente na textura e no sabor dos produtos de panificação, mas também de forma indireta no aumento da vida de prateleira, de volume e melhoria de valor nutricional (Siepmann et al., 2017; Catzeddu, 2019).

A ativação das proteases e amilases como consequência da acidificação favorece a maciez e a extensibilidade da massa. O glúten é um complexo

proteico formado por duas frações de proteínas, a gliadina e glutenina, responsáveis pela viscosidade e elasticidade, respectivamente. A hidrólise dessas proteínas pela ação das proteases vai resultar em uma emulsão mais estável, com maior extensibilidade e menor elasticidade (Siepmann et al., 2017), permitindo a expansão da massa enquanto retém o dióxido de carbono produzido na fermentação, melhorando o volume e a maciez do pão (Catzeddu, 2019; Papadimitriou et al, 2019; Siepmann et al 2019). A perda de maciez, aroma e crocância dos produtos de panificação se dá devido ao seu envelhecimento, causado pela retrogradação do amido. Nas farinhas integrais, as enzimas xilanase e endoxilanase retardam essa retrogradação (Siepmann et al., 2017). No mais, a casca mais grossa dos pães preparados com fermento natural dificulta a evaporação da água, garantindo retenção da umidade.

Algumas BAL, além de alterarem a rede de glúten, produzem polissacarídeos de alto peso molecular, os Exopolissacarídeos (EPS). Esses polímeros influenciam nas características reológicas, texturais e sensoriais de diversos alimentos, atuando na viscosidade, estabilização e emulsificação (Reale et al, 2020). O EPS produzido pelas BAL vai ligar-se à água disponível nesses produtos, evitando que ela seja exsudada, o que impacta principalmente o retardo do envelhecimento desse produto (Pérez-Alvarado et al, 2022). A produção de EPS não apenas contribui para a textura e reologia das massas fermentadas, mas contribui diretamente na saúde de seus consumidores, estimulando a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) através da fermentação dos carboidratos, com potencial para prevenir inflamações e infecções intestinais (Gill et al, 2018; Pérez-Alvarado et al, 2022).

Além do envelhecimento outro fator afeta a vida útil dos produtos de panificação, a deterioração microbiana, por fungos e algumas espécies de *Bacillus* (Catzeddu, 2019). Na indústria, para se evitar perdas econômicas, é feito o uso de aditivos químicos para conservar estes alimentos. No entanto, diversos estudos já demonstraram a capacidade antifúngica das BAL. Entre os metabólitos que exercem essa função, temos: ácido láctico, acético e fórmico, dióxido de carbono, diacetil, peróxido de hidrogênio, ácido capróico, ácidos graxos 3-hidroxi, ácido fenilático, dipeptídeos cíclicos, reuterina e fungicinas, além das bacteriocinas, que tem como função matar ou inibir o crescimento de

bactérias patogênicas ou deteriorantes (Ganzle, 2015; Siepmann et al., 2017; Catzeddu, 2019; Papadimitriou et al, 2019; Pérez-Alvarado et al, 2022). Estes compostos permitem que os pães e produtos de panificação fermentados não necessitem da adição de aditivos químicos como conservantes, ressaltando o seu potencial de bioatividade.

Estudos recentes têm evidenciado que o fermento natural pode ser uma fonte rica de compostos bioativos. Estes compostos não apenas contribuem para o sabor, aroma e textura dos produtos fabricados com fermento natural, mas também conferem benefícios à saúde quando consumidos. A capacidade metabólica de BAL de produzir uma ampla gama de compostos bioativos são influenciadas por diversos fatores, incluindo pH, tempo e temperatura da fermentação (Pérez-Alvarado et al, 2022). Neste contexto, explorar os potenciais bioativos do fermento natural não só amplia nosso entendimento sobre os processos fermentativos, mas também abre novas perspectivas para o desenvolvimento de produtos com propriedades salutares e funcionais (Papadimitriou et al, 2019).

Dentre os ácidos graxos sintetizados pelas BAL estão o acetato, propionato e butirato, que possuem propriedades terapêuticas potenciais em transtornos como depressão, estresse, autismo, esquizofrenia e ansiedade (Păcularu-Burada et al, 2020; Pérez-Alvarado et al, 2022). As BAL também agem em relação à biodisponibilidade de minerais essenciais, como o cálcio, potássio, ferro, e zinco, principalmente em pães integrais. As farinhas integrais são ricas em ácido fítico, um composto antinutricional insolúvel presente naturalmente em cereais, que se liga aos minerais e impede a sua absorção. A ativação das fitases (enzimas que quebram o ácido fítico) pelos ácidos orgânicos da fermentação aumentam a biodisponibilidade desses micronutrientes (Siepmann et al, 2017; Catzeddu, 2019; De Vuyst et al, 2021).

O índice glicêmico (IG) é uma medida que classifica os alimentos com base em seu potencial para aumentar os níveis de glicose no sangue após sua ingestão. Ele pode ser classificado como baixo, moderado e alto. Arora et al, (2021) fizeram um levantamento na literatura e os resultados indicam a redução desse índice, de alto para moderado, em pães fermentados com o fermento natural. Quando adicionados de fibra dietética (entre 5 a 10%) a diminuição é

mais pronunciada, resultando em um valor glicêmico baixo. Rizello et al (2019) correlacionaram a redução do IG com a acidificação das BAL nos produtos fermentados. O pH ácido dessas massas aumenta a densidade dos pães (Gobbetti et al., 2014; Siepmann et al, 2017), retardando sua absorção, devido a formação de amido resistente (Rizello et al, 2019; Arora et al, 2021).

Em relação à digestibilidade, os pães adicionados de fermento natural apresentam melhores resultados quando comparados aos pães tradicionais: A síntese de ácidos orgânicos, especialmente o ácido láctico, reduz a digestibilidade do amido; o ácido acético e o ácido propiônico retardam o esvaziamento gástrico (Siepmann et al, 2017). Outro ponto importante no consumo de produtos com fermento natural é a diminuição da alergenicidade das farinhas de trigo e centeio (Păcularu-Burada et al, 2020; Pérez-Alvarado et al, 2022). A atividade proteolítica promove hidrólise da rede de glúten e suas frações proteicas, sendo as responsáveis pelas reações alérgicas. Além das alergias, algumas pessoas desenvolvem doença celíaca, uma intolerância ao glúten, através de um mecanismo autoimune, que resulta em inflamações e danos à mucosa do intestino delgado (Di Cagno et al., 2010). Ensaio clínicos, realizados por Di Cagno et al., (2010); Greco et al., (2011) e Mandile et al., (2017), demonstraram que a proteólise realizada pelas BAL, de forma controlada, degrada totalmente esses complexos proteicos, tornando seguro o consumo destes produtos por pacientes celíacos sendo uma alternativa *glúten free*.

Uma característica comum na origem de muitas doenças inflamatórias crônicas é o desenvolvimento do estresse oxidativo, que está relacionado à geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Galli et al, 2018). Os antioxidantes presentes nos alimentos desempenham papel importante na neutralização dessas EROs. Pesquisas revelaram que as BAL presentes em produtos fermentados têm a capacidade de gerar peptídeos bioativos, que são fragmentos proteicos, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Galli et al, 2018; Luti et al, 2020). Os peptídeos resultantes da fermentação de cereais possuem uma relevância potencial significativa, uma vez que são elementos essenciais na dieta diária de várias culturas ao redor do mundo (Luti et al, 2020). A acidificação decorrente dos ácidos orgânicos tem a capacidade de aumentar

a extração do fenol, do mesmo modo que consegue promover a hidrólise de formas fenólicas complexas, influenciando o perfil fenólico de uma matriz alimentar e sua capacidade antioxidante (Sidari et al, 2020). Por serem antioxidantes os compostos fenólicos possuem, conseqüentemente, propriedades anticancerígenas (Călinoiu e Vodnar, 2018).

2.3. Fatores Ambientais

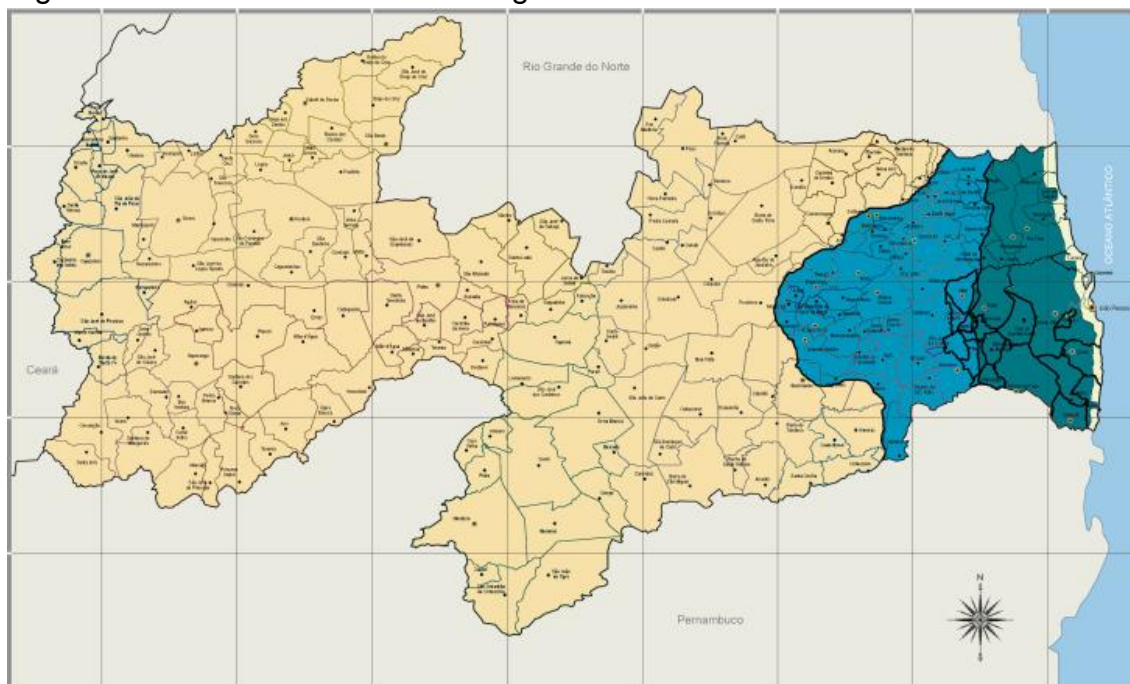
A literatura (Pontonio et al., 2015; Liu et al, 2018; Suo et al., 2020; Gunduz et al, 2022) tem descrito que, além da influência da microbiota presente nos ingredientes e também nos utensílios das padarias, a localização geográfica contribui com a diversidade de microrganismos encontrados nas massas fermentadas. Há predominância de diferentes espécies de LAB em diferentes países e regiões ao redor do mundo (De Vuyst, 2017; Comasio et al, 2020).

No entanto, não é consenso entre os pesquisadores de que essas diferenças geográficas sejam determinantes na microbiota do fermento natural. Landis et al., (2021) fizeram um extenso trabalho de identificação da comunidade inicial de fermentos naturais e concluíram que a microbiota destes depende mais de como ele é produzido e de sua propagação do que, necessariamente, de sua localização. Já Comasio et al (2020) creditam aos produtores dos fermentos e à microbiota doméstica a diversidades das espécies encontradas.

Sabemos que a temperatura regula a microbiota, por isto é importante conhecer os fatores ambientais da produção destes fermentos. É preciso ressaltar que nos extensos trabalhos citados acima, nenhum deles observaram o comportamento de cepas na América do Sul. No Brasil, especificamente no estado da Paraíba, não existem estudos sobre a microbiota dos fermentos naturais em suas diferentes regiões climáticas, havendo a necessidade de desenvolver pesquisas sobre essa temática.

Localizado na parte oriental do Nordeste, a Paraíba faz divisa com o Rio Grande do Norte, ao Norte; Pernambuco, ao Sul; Ceará, a Oeste e, com o Oceano Atlântico, ao leste. Em sua extensão o estado da Paraíba tem características distintas e é dividida em 4 ecossistemas ou zonas naturais de paisagens: Planícies litorâneas (ou Terras baixas), Floresta, Áreas de Transição e Caatinga (Figura 02) (Francisco e Santos, 2017).

Figura 02. Zonas Naturais de Paisagem da Paraíba



Fonte: Paraíba, 2020.

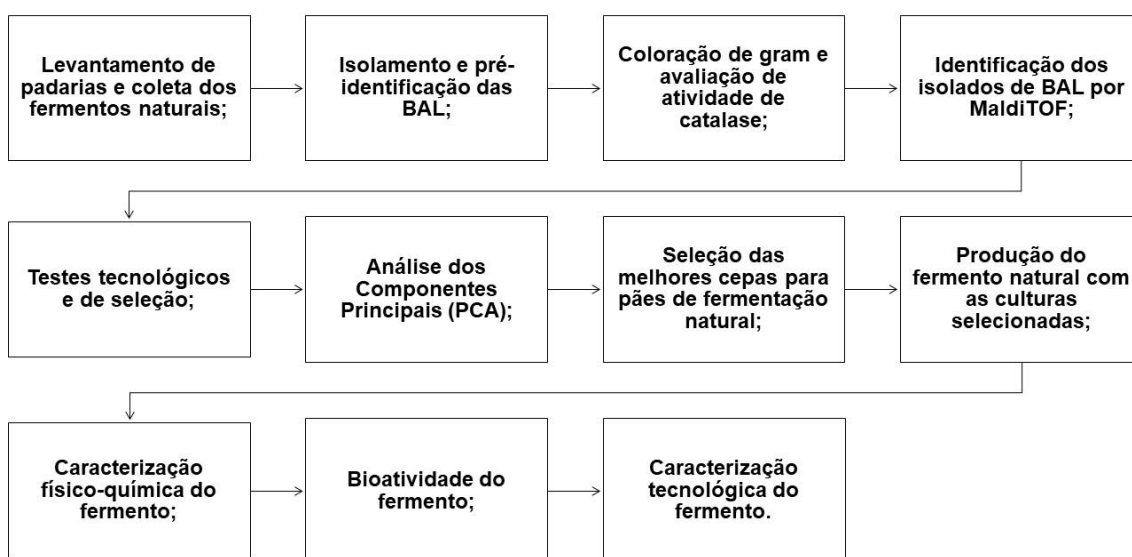
Quanto ao regime de chuvas, existem dois, de fevereiro a maio nas Áreas de Transição e Caatinga e de abril a julho nas Zonas de Planícies Litorâneas e Florestas. Em relação ao clima o estado se divide em três grupos climáticos: úmido, subúmido e semiárido, distribuídos pelas Zonas Naturais. As temperaturas médias variam entre 22°C na Floresta e Áreas de Transição e 28°C nas Planícies Litorâneas e Caatinga, influenciados pelas altas e baixas altitudes, respectivamente (Francisco e Santos, 2017).

Os meses de junho, julho e agosto são os que possuem a temperatura mais amena e contrastam com os meses de outubro, novembro e dezembro, considerados quentes em todo o estado. Estes últimos se caracterizam pelos menores índices pluviométricos, representando o período mais seco da região (Governo da Paraíba, 2008; AESA, 2016; Francisco e Santos, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais e os procedimentos metodológicos utilizados para a realização da pesquisa. A sequência das atividades realizadas está demonstrada no fluxograma a seguir (Figura 03).

Figura 03. Fluxograma dos procedimentos metodológicos apresentados na pesquisa.



Fonte: Autoria própria (2024).

3.1. Materiais

Com o objetivo de identificar a microbiota dos fermentos naturais e observar se o clima interfere em sua composição, foi realizado um levantamento de padarias artesanais que trabalham com fermentação natural, nas diferentes regiões climáticas da Paraíba. O estado é dividido em três grupos climáticos, úmido, subúmido e semiárido, distribuídos pelas suas zonas naturais, com temperaturas médias variando entre 22 °C e 28°C (Francisco e Santos, 2017). Deste modo, foram selecionados estabelecimentos em três municípios, pertencentes à essas regiões.

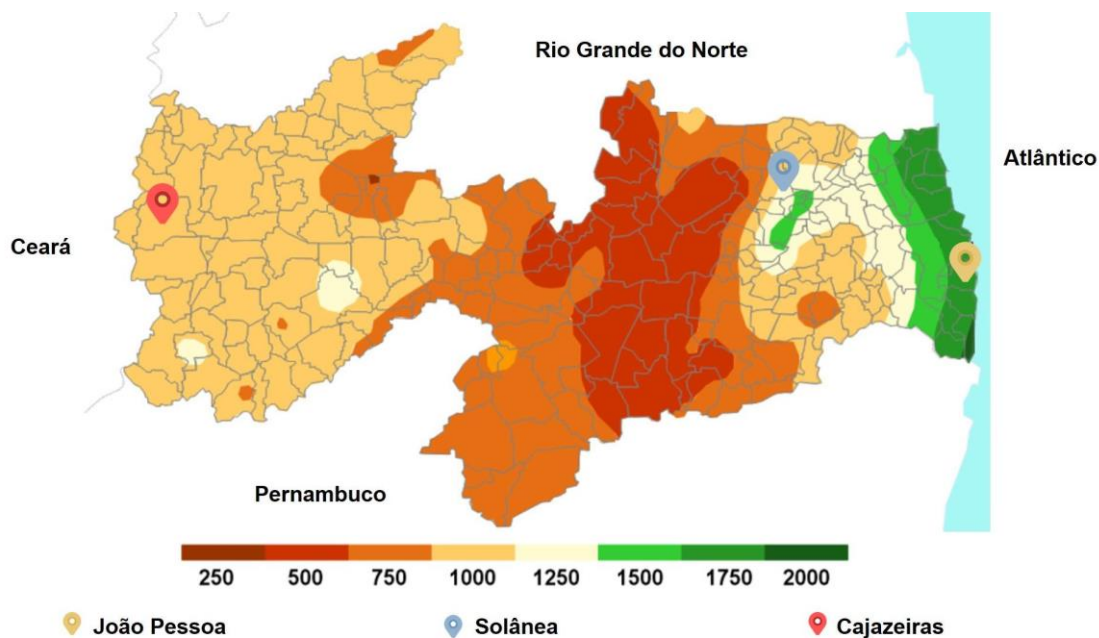
Foram identificadas 4 (quatro) padarias artesanais, duas delas localizadas na capital do estado, a cidade de João Pessoa, referente ao clima úmido. Uma no município de Solânea, na região subúmida e, a última, em Cajazeiras,

localizada na região semiárida. As cidades estão dispostas na Figura 4. Embora a fermentação natural seja um processo biotecnológico ancestral, a sua manutenção é complexa (Catzeddu, 2019), requer tempo, altos custos e trabalhadores especializados. Por este motivo, esses estabelecimentos no estado da Paraíba ainda são escassos.

As coletas das amostras ocorreram durante os meses de novembro e dezembro, que apresentam os menores índices pluviométricos, considerado o período mais seco do estado (Francisco e Santos, 2017). Aproximadamente 100g de fermento ativo foram coletados (em duplicata) em cada município, em embalagens plásticas transparentes. Os fermentos acondicionados em caixas isotérmicas com gelo foram transportados para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Figura 4. Coleta dos Fermentos Naturais: Mapa das cidades da Paraíba e as suas respectivas Regiões Climáticas.

Fonte: Governo da Paraíba (2008), adaptado.



• Úmida: 1.500 a 2.000 mm/ano • Subúmida: 1.000 a 1.500 mm/ano • Semiárida: 300 e 1.000 mm/ano

3.2. Locais de Execução

As análises microbiológicas e de potencial tecnológico foram realizadas nos Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As análises físico-químicas e de bioatividade foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-químicas do CTDR/UFPB. A identificação dos isolados por espectrometria de massa MALDI-TOF foi realizada no Laboratório Multiusuário vinculado ao Centro de Ciências da Saúde (CCS), da UFPB. O perfil de fenólicos e a determinação de açúcares e ácidos orgânicos foi realizada no Laboratório de Análise de Águas e Bebida, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) do Instituto Federal do Sertão de Pernambuco (IFSertãoPE).

3.3. Isolamento e Pré-Identificação

A metodologia adotada foi proposta por Garcia et al. (2016) para isolamento de BAL. À princípio 25g gramas das amostras coletadas foram pesadas e diluídas em 225 mL de água peptonada (0,01% v/v) estéril, seguidas de diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}). Pelo método de spread plate, alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar De Man, Rogosa and Shape (MRS) (HiMedia, Mumbai, India) para o isolamento de BAL e ágar YPD (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de glicose) para o isolamento de leveduras. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (ACB 80 labor, Americanas, Brasil) a 37 ± 5 °C e 25 ± 5 °C, respectivamente.

As placas foram avaliadas quanto as morfologias das colônias presentes. Cinco a dez colônias de cada morfologia foram coletadas e isoladas no meio de cultura correspondente ao original. Após o isolamento, as colônias foram incubadas sob as mesmas condições já descritas para BAL e leveduras. Posteriormente, as amostras foram submetidas aos testes fenotípicos de pré-identificação. Cada isolado foi submetido ao teste de coloração de gram e avaliação da atividade de catalase, conforme descrito por Garcia et al. (2016). As cepas de BAL pré-identificadas como gram-positivas e catalase negativas em formato de cocos, cocobacilos e/ou bacilos foram selecionadas. Os isolados de BAL foram mantidos a -18 ± 5 °C, em criotubos com caldo MRS, adicionados de 20% (v/v) de solução de glicerol (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) a 80% (v/v).

3.4. Identificação dos Isolados pela técnica de MALDI-TOF – “MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT”

A partir dos testes fenotípicos de pré-identificação das bactérias os

isolados foram mantidos sob temperatura de congelamento (-18 ± 5 °C), em criotubos com caldo MRS (HiMedia, Mumbai, Índia) adicionados de 20% (v/v) de solução de glicerol (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil), e devidamente identificados (Sevgili *et al.*, 2023). Os isolados foram submetidos à identificação por meio da técnica de MALDI-TOF, seguindo a metodologia adaptada por Freiwald e Sauer (2009).

A partir de cada criotubo de isolados das bactérias uma alíquota de cerca de 10 µL foi coletada e inoculada em caldo MRS, incubados a 37 °C (± 5 °C) por 48 horas e, posteriormente, 100 µL do caldo foi inoculado em placa contendo ágar MRS seguindo-se de incubação a 37 °C (± 5 °C) por 48 horas. Para o emprego da técnica, com o auxílio de um palito de dente, foi coletada uma pequena alíquota de biomassa fresca de colônia isolada e, em seguida, a biomassa foi transferida para um poço da placa de aço inox do equipamento. Após transferência de cada amostra, foi adicionado em cada poço 1 µL de solução de ácido fórmico. Após a secagem das amostras na placa, adicionou-se em cada poço 1 µL de solução de ácido alfa-ciano-4- hidroxicinâmico em mistura de acetonitrila:água:ácido trifluoroacético (1:1:1) (TFA) (10 mg/mL; Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

A análise das amostras foi realizada em espectrômetro de massa MALDI-TOF Bruker Biotyper 4.1. O equipamento foi previamente calibrado usando padrão Bruker BTS (Bruker Bacterial Test Standard). Os espectros de massa obtidos após análise foram processados usando software MALDI Biotyper TM 4.1 (Bruker Biotyper 4.1, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os resultados foram expressos pela identificação de log BioTyper (pontuações), indicando a similaridade do perfil de espectro de massa MALDI-TOF desconhecido para as entradas do banco de dados disponíveis. Na análise dos resultados, valores de Log BioTyper (score) superior a 2,0 indicavam identificação de alta probabilidade de confirmação de espécies; valores de Log BioTyper (score) entre 1,7 e 1,99 indicavam apenas em provável identificação de gênero. Valores de Log BioTyper (score) menores ou iguais 1,69 indicavam perfil não identificado quando comparado com as entradas do banco de dados. Os espectros de identificação gerados foram automaticamente comparados com a biblioteca de referência do software

MALDI Biotyper TM 4.1 (Bruker Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.5. Manutenção dos Isolados e Ativação das Cepas

As cepas pré-identificadas foram selecionadas e mantidas em caldo MRS suplementado com 200 μ L de solução de glicerol (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) a 80% (v/v) sob congelamento (-18 ± 5 °C). A cada necessidade de utilização uma alíquota de 100 μ L foi tomada dos respectivos criotubos contendo as amostras, posteriormente foram inoculadas em 5mL de caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e incubadas à 37 ± 5 °C até formação visível de biomassa (Garcia et al, 2016; 2018).

3.6. Testes Tecnológicos e de Seleção de Cepas

3.6.1. Acidificação e Crescimento

As cepas de BAL foram cultivadas em caldo MRS com pH ajustado (6,8) por 48h a 35 ± 5 °C. Os pellets foram colhidos por centrifugação e lavados duas vezes em NaCl estéril, depois foram inoculados em caldo MRS com a concentração final de 6 - 7 logUFC/mL. Os valores de pH e densidade óptica (OD_{595nm}) foram medidos usando pHmetro e espectrofotômetro, respectivamente, nos tempos 0, 2, 4, 6 e 18h. As cepas continuaram incubadas na temperatura supracitada nos intervalos entre os tempos (Reale et al, 2020), com adaptações. Para todos os tratamentos, os resultados foram expressos como a diferença entre a OD_{595nm} no tempo 2, 4, 6 e 18h subtraído do tempo zero (0).

3.6.2. Produção de exopolissacarídeo (EPS)

Para avaliar a produção de EPS, utilizou-se a metodologia descrita por Rodrigues et al (2021), com adaptações. Os isolados foram cultivados anaerobicamente em caldo MRS suplementado com glicose durante 72h a 37 ± 5 °C. As culturas foram lavadas em solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) por meio de centrifugação. Após a centrifugação 1ml do sobrenadante foi adicionado a 2ml de etanol (95%) e mantido sob refrigeração por 24h para induzir a precipitação do EPS. Os precipitados foram colhidos por centrifugação e em

seguida lavados com água destilada estéril. Os grânulos foram secos a $55 \pm 5^\circ\text{C}$ até obter peso constante. A quantidade de EPS produzido foi determinada medindo o peso seco, sendo expresso em mg/L.

3.6.3. Atividade proteolítica

Na avaliação da atividade proteolítica os isolados foram cultivados anaerobicamente em caldo MRS por 24h a $37 \pm 5^\circ\text{C}$. Uma alíquota de cada cultura foi incubada em placas de Petri, por micro-gotas, contendo ágar MRS suplementado com leite desnatado sem lactose. Em seguida as placas foram incubadas sob as mesmas condições já citadas por 48h. Terminado o período de incubação as placas foram lavadas com HCl e a presença de uma zona clara (Figura 3) ao redor das colônias indicaram a atividade proteolítica (Domingos-Lopes et al., 2017).

3.6.4. Testes de Tolerância a diferentes concentrações de Ácido, Sal, Sacarose e Etanol

A metodologia utilizada na pesquisa foi descrita por Reale et al (2020), com modificações. As BAL foram cultivadas em caldo MRS com o pH ajustado a 6,5 por 24h a $35 \pm 5^\circ\text{C}$. Os pellets foram colhidos por centrifugação ($7.000 \times g$ por 15 min) e lavados duas vezes em solução salina tamponada (PBS pH 7,0), depois foram padronizados em $OD_{595\text{nm}} = 0,6$ e inoculados (10% v/v) em 1,8mL de caldo MRS, devidamente modificado para atingir as seguintes condições de estresse: tratamento ácido, em caldo MRS pH 3,5, 4,5, e 6,5; tratamento com cloreto de sódio, em caldo MRS pH 6,5 com 2, 4 e 6% (p/v) de NaCl; tratamento com sacarose, em caldo MRS pH 6,5 com 20 e 30% (p/v) de sacarose; tratamento com etanol, em caldo MRS pH 6,5 com 2,0; 4,0 e 6,0% (v/v) de etanol. As amostras foram incubadas por 24h, a $35 \pm 5^\circ\text{C}$ sob anaerobiose. A densidade óptica ($OD_{595\text{nm}}$) foi medida usando espectrofotômetro no tempo 0, 6 e 24h de incubação. Para todos os tratamentos, os resultados foram expressos como a diferença entre a $OD_{595\text{nm}}$ no tempo 6 ou 24h subtraído do tempo zero (0).

3.7. Elaboração Dos Fermentos Naturais

Com base nos resultados dos testes descritos no item 3.6, foi realizada uma PCA (descrita no item 3.9) para a seleção das cepas que seriam aplicadas nesta etapa.

A elaboração do fermento foi realizada seguindo protocolo descrito por Minervini et al., (2010). Para o preparo dos inóculos as cepas selecionadas de BAL (*Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83) foram inoculadas em caldo MRS e incubadas a $37 \pm 5^\circ\text{C}$ até a fase exponencial. Posteriormente as células foram centrifugadas a $5500 \times g / 4^\circ\text{C} / 10$ minutos, lavadas duas vezes com 10 ml de tampão PBS (pH 7,2) e ressuspensas em 10ml de solução salina (0,1%) estéril.

Para a produção dos fermentos naturais foi utilizado 100g de farinha de trigo tipo 1 (Finna. Lote: 102023), 50 ml de água potável e 10ml das culturas isoladas de BAL ressuspensas. Demonstrada na Figura 5. Os ingredientes foram adicionados em um bécker estéril, e os fermentos foram misturados com o auxílio de bastões de vidro estéreis até ficarem homogêneos. Imediatamente após o preparo dos fermentos (Tempo 0), as amostras foram incubadas em B.O.D. ($30 \pm 5^\circ\text{C}$) até o horário das análises subsequentes.

Figura 5 – Produção dos Fermentos Naturais



Fonte: Autoria própria (2024)

3.8. Estudo das Características Físico-Químicas, Microbiológicas, Bioativas e Tecnológicas dos Fermentos Naturais Inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83

Após a elaboração do fermento natural inoculados (ou não) da cultura iniciadora foram realizadas as análises físico-químicas das amostras. As análises de pH e acidez titulável total foram realizadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24h, para observar o comportamento do fermento ao longo dos tempos. As análises de perfil de fenólicos e atividade antioxidante foram realizadas nos tempos 0, 8 e 24h.

3.8.1. pH e Acidez Titulável Total

O pH foi medido utilizando-se potenciômetro acoplado a um eletrodo de vidro em triplicata (Modelo Q400AS, Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil). A acidez titulável total (g/100 g) foi medida por titulação com NaOH 0,1 N e solução de fenoftaleína como indicador (AOAC, 2016), em intervalos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas.

3.8.2. Quantificação e Perfil de Fenólicos

Foi preparado um extrato etanólico de 100 g/kg de massa fermentada para as análises de quantificação e perfil de fenólicos. A metodologia dos extratos e da quantificação foi descrita por Fang et al (2023). Para a quantificação, 0,5mL do extrato foi colocado em um balão volumétrico de 10mL; depois foi adicionado ao balão 1mL de Folin - agente cromogênico fenol, 2 mL de solução de Na₂CO₃ a 15% e o volume foi fixo para 10 mL com água destilada. A mistura reagiu em temperatura ambiente por 2h. O valor foi da absorbância foi determinado a OD_{765nm}. As leituras das amostras aconteceram nos tempos 0, 8 e 24h. Foi construída uma curva padrão com solução padrão de ácido gálico e uma mistura de água e reagente foi utilizada como branco. Os resultados foram expressos em: Equivalente de Ácido Gálico (GAE) por g de amostra.

O perfil de compostos fenólicos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguindo a metodologia descrita por Lima et al. (2024). Utilizou-se um cromatógrafo líquido Agilent 1260 (Santa Clara, EUA), equipado com uma bomba de solvente quaternário e desgaseificação em linha (modelo

G1311C), compartimento termostático para colunas (modelo G1316A), amostrador automático (modelo G1329B) e Detector de Arranjo de Diodos (DAD, modelo G1315D). A coleta e o processamento dos dados foram realizados por meio do software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Para a análise, foi empregada uma coluna ultrarrápida Eclipse Plus RRHT RP-C18 (50 × 4,6 mm, 1,8 µm; Zorbax, SC, EUA). A fase móvel consistiu em uma solução de ácido fosfórico a 0,5% v/v (solvente A) e metanol acidificado com 0,5% v/v de ácido fosfórico (solvente B). Os compostos foram identificados e quantificados por meio da comparação com padrões externos, utilizando tempo de retenção, curvas de calibração e similaridade espectral.

3.8.3. Atividade Antioxidante

Foi preparado um extrato etanólico de 100 g/kg de massa fermentada para as análises de atividade antioxidante. A metodologia foi descrita por Fang et al (2023), com adaptações. 0,1mL do extrato foi misturado com 3,9mL de solução de trabalho ABTS+, a mistura ficou sem o contato com a luz por 10 minutos, em seguida foi determinada a absorbância um espectrofotômetro (Eppendorf BioSpectrometer basic) com leitura da densidade óptica em OD_{734nm}. As leituras das amostras aconteceram nos tempos 0, 8 e 24h. Uma mistura de etanol a 15% e reagente foi utilizado como branco. Foi construída a curva padrão com solução padrão Trolox. Os resultados foram expressos em: Equivalente de Trolox por g de amostra.

3.8.4. Viabilidade das BAL

Foram realizadas avaliações das amostras de fermento para determinar a contagem de células viáveis de BAL em intervalos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Para cada análise, 3g da amostra foram diluídas em 30mL de solução de água peptonada 0,1% (p/v) e diluídas serialmente (1:9, v/v) no mesmo diluente (10^{-2} - 10^{-6}). Alíquotas de 20µL de cada diluição seriada foram inoculadas (usando o método de microgota) (Liu et al., 2018) em placas contendo ágar MRS e incubadas a 37 ± 5 °C por 48 h. Após o período de incubação, as células viáveis de BAL foram enumeradas e os resultados foram expressos como log UFC/g.

3.8.5. Perfil de Ácidos Orgânicos e Açúcares

Maltose, sacarose, glicose, frutose, etanol, ácido láctico e acético, glicerol e manitol foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência composto por um detector de índice de refração. As análises foram descritas por Paramithiotis et al, (2006) e Gunduz et al, (2023), com adaptações. 10g de amostra foram homogeneizadas com 90mL de tampão fosfato (25mM e pH 5,6) e centrifugada a 12.000rpm por 10 minutos a 4 ± 5 °C. 1mL do sobrenadante foi misturado com 50 μ L de ácido perclórico (70% v/v) a 30 ± 5 °C e mantido sob refrigeração (4°C) por 24h. Os aglomerados de proteínas foram removidos por centrifugação (5000rpm, 60 min) a 4 ± 5 °C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de seringa de 0,45 μ m. 10 μ L do sobrenadante foi injetado em uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 \times 300 mm, 8 μ m, Santa Clara, EUA) conectado a um detector de índice de refração. A eluição foi realizada a 35 ± 5 °C com H₂SO₄ a 5mM a uma vazão de 0,5 ml/min.

3.8.6. Aumento de Volume e Geração de CO₂ durante a Fermentação.

A fermentação da massa foi acompanhada através da determinação do aumento de volume e formação de CO₂. A metodologia foi descrita por Alfonzo et al, (2021) com adaptações. Para a análise de volume, as massas foram boleadas e acomodadas em provetas, tampadas, para evitar que ficassem ressecadas. As amostras foram incubadas à temperatura de 35 ± 5 °C e as medições do volume foram observadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas, durante a fermentação. O desenvolvimento de CO₂ foi estimado indiretamente medindo a perda de peso antes e depois da fermentação e expresso em g de CO₂ nos tempos acima citados.

3.8.7. Propriedades Reológicas dos Fermentos Inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83

Para a realização das análises, foi utilizado um reômetro MARS III Haake (Karlsruhe, Alemanha), contendo um sistema de placas paralelas lisas de aço inox com diâmetro de 3,5 cm (T35TIL) e uma distância entre as placas (“gap”) de 1 mm, em temperatura de 30 °C. Os experimentos foram realizados em

triplicata após 8h e 24 de fermentação. A fim de determinar a região de viscoelasticidade linear, realizou-se um escaneamento de tensão (1-100 Pa) na frequência de 1 Hz. Posteriormente, espectros mecânicos foram obtidos através de varreduras de frequência entre 0,1 e 10 Hz, mantendo-se a tensão fixa dentro do intervalo linear de viscoelasticidade (Amaral et al., 2022).

O módulo complexo (G^*) e a tangente de delta, foram calculados utilizando, respectivamente as Equações (1) e (2).

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (1)$$

$$\text{Tan}(\delta) = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (2)$$

A média e o desvio padrão dos valores dos módulos elástico e viscoso foram graficados, enquanto a média e o desvio dos valores do módulo complexo e tangente de delta, na frequência de 1 Hz foram tabulados e analisados estatisticamente.

3.8.8. Textura Instrumental

Os testes de perfil de textura foram realizados após 8 e 24h de fermentação, em triplicata, seguindo a metodologia descrita por Amaral et al (2022). Dois parâmetros foram analisados, a dureza e a adesividade, sob medidas de compressão. Para tal, foi utilizado um texturômetro (Texture Analyzer CT3 - Brookfield Engineering Labs, Middleboro, EUA), equipado com uma geometria cilíndrica acrílica (TA10) com 12,5 mm de diâmetro. Os resultados foram obtidos pelo programa próprio do equipamento (Texture Expert for Windows, versão 1.19). As amostras foram comprimidas em dois ciclos, com deformação de 50%, velocidade de teste de 1 mm/s.

3.9. Análises Estatísticas

Todos os ensaios serão realizados em triplicata apresentando média e desvio padrão. A análise estatística será realizada para determinar diferenças

significativas ($p < 0,05$) utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste Tukey. Para o cálculo dos dados, será utilizado o software Jamovi versão 2.3.28. O conjunto de dados obtidos com os testes de seleção e tolerância foram avaliados e categorizados pela Análise de Componentes Principais (PCA), que separa os grupos em quartis. Estes indicaram quais as cepas que apresentaram as melhores características tecnológicas e de tolerância para a produção de um fermento natural adaptado.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e Pré-Identificação

Cerca de 129 isolados foram obtidos a partir das amostras de fermento coletadas no Estado da Paraíba, dos quais 24 destes foram caracterizados como bactérias gram-positiva, catalase negativa apresentando morfologia de cocos, bacilos e coco-bacilos. Estas características, típicas das bactérias ácido lácticas (Gopal et al, 2020; De Vuyst et al, 2021; Sevgilii et al, 2023), foram utilizadas inicialmente como forma de selecionar esse grupo bacteriano.

Nos fermentos naturais maduros há a predominância das BAL em relação às leveduras (Pérez-Alvarado et al, 2022; Fu et al, 2024; Sanmartín et al, 2024), devido as condições adversas e estressantes do meio (Fekri et al, 2024). Destacam-se as seguintes espécies: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus pentosus* e *Companilactobacillus paralimentarius* (De Vuyst et al, 2017; Arora et al, 2021).

4.2. Identificação dos Isolados por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF-MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT)

Foram identificadas 24 BAL através da espectrometria de massa. 12 delas foram provenientes da cidade de João Pessoa, 6 da cidade de Solânea e 6 da cidade de Cajazeiras, representando os climas úmidos, subúmidos e semiáridos, respectivamente. As identificações podem ser observadas na Tabela 01, a seguir.

Tabela 01. Identificação de BAL de diferentes regiões climáticas da Paraíba por espectrometria de massa MALDI-TOF

Fermento	Nº Total dos Isolados	Identificação	Nº Isolados Identificados
JP-U	12	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	5
		<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>	7
SL-SU	6	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	4
		<i>Levilactobacillus brevis</i>	2
CJ-SA	6	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3
		<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>	1
		<i>Levilactobacillus brevis</i>	2

JP-U: João Pessoa (Úmida); SL – SU: Solânea (Subúmida); CJ-SA: Cajazeiras (Seminárida).
Fonte: Dados da pesquisa (2024).

A microbiota do fermento natural é um ecossistema complexo e dinâmico, cuja composição e funcionalidade são fortemente influenciadas por fatores exógenos (Gunduz et al, 2022; Pérez-Alvarado et al, 2022). Ao observar a identificação dos isolados percebe-se três grupos microbianos distintos em cada região climática, com a presença de *Lactiplantibacillus plantarum* em todos eles. *Companilactobacillus paralimentarius* predominou na região úmida e *Lactiplantibacillus plantarum* nas demais. De Vuyst et al (2017) e Comasio et al (2020) relataram que o consórcio restrito de microrganismos em um único fermento é comum, especialmente em fermentos maduros, devido à alta competitividade entre as bactérias, o que explica a pouca variedade destas.

Landis et al (2021), ao investigar 500 fermentos naturais, encontraram *Lactiplantibacillus plantarum* e *Levilactobacillus brevis* como o grupo coexistente mais frequente. Comasio et al (2020) identificaram cepas de 17 fermentos naturais de diferentes países, dentre as BAL, *Fructilactobacillus sanfranciscensis* foi a cepa dominante nos fermentos franceses e estadunidenses, *Lactocaseibacillus paracasei* nos britânicos e *Companilactobacillus paralimentarius* e *Levilactobacillus brevis*, em consórcio, nos belgas. Dos 73 isolados identificados por Reale et al (2020), em fermentos italianos, *Lactiplantibacillus plantarum* apareceu em maior incidência, seguido de *Furfurilactobacillus rossiae*. Estes estudos demonstram que, apesar do mutualismo existentes entre as espécies, não são os mesmos grupos que dominam as diversas regiões do Globo.

Para além da localização geográfica, De Vuyst et al (2017) acreditam que as variações metodológicas de isolamento e identificação impactam nas interpretações sobre a microbiota dos fermentos naturais. Do mesmo modo, Landis et al (2021) chegaram à conclusão de que o mutualismo, a forma de produção e o cultivo desses fermentos são os responsáveis pela diversidade microbiológica. Para Ganzle e Ripari (2016) essa diversidade advém de fatores relacionados às matérias-primas, condições de processo ou práticas locais.

A temperatura é outro fator limitante, por exemplo, *Lactiplantibacillus plantarum* não costumam ser encontrados em temperaturas inferiores a 30 °C, o oposto acontece com *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (De Vuyst et al, 2017). Menezes et al (2020) propagaram o mesmo fermento em temperaturas distintas

e encontraram variedade na microbiota. Outra característica dos fermentos é a mudança ao longo do tempo: os jovens tendem a ser dominados por *Lactiplantibacillus plantarum* e *Levilactobacillus brevis* enquanto nos maduros predominam a presença de *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (Landis et al, 2021) em circunstâncias ambientais adequadas (De Vuyst et al, 2017).

Diante do que foi exposto é possível perceber a complexidade que envolve os fermentos naturais, o seu consórcio de microrganismos e a manutenção destes. Portanto, é importante conhecer as cepas que melhor se adaptam a região estudada para o desenvolvimento de um iniciadora de fermento natural, com características desejáveis e controladas. Este direcionamento inicial é imprescindível quando se pensa na produção em escala industrial e na padronização do produto final. Nos próximos tópicos serão apresentados os resultados de testes tecnológicos e de tolerância das 24 cepas isoladas e identificadas, para a seleção de culturas iniciadoras de fermento natural tipo II.

4.3. Testes Tecnológicos e de Seleção

Foram realizados testes tecnológicos e de seleção para avaliar a capacidade de acidificação e crescimento de cada cepa em diferentes tempos de fermentação, produção de EPS e atividade proteolítica. Os resultados completos das análises estão dispostos na Tabela 02 do Apêndice A.

No início do teste, as amostras apresentavam pH em torno de 7,00. Durante o período observado (0, 2, 4, 6 e 18 horas), esses valores variaram de $7,94 \pm 0,01$ a $4,00 \pm 0,01$. Das 24 cepas analisadas, após 18 horas de fermentação, 19 cepas apresentaram pH entre 4 e 5, e cerca de 13 foram capazes de manter $\text{pH} < 4,5$. Dentre estas, destacam-se *C. paralimentarius* 55 e *L. plantarum* 113, nas quais o pH foi de 4 nesse período.

Na avaliação do crescimento em caldo MRS (OD_{595}) durante 18 horas de fermentação, as cepas partiram de $\text{OD}_{595} = 0$ (padronização definida no espectrofotômetro) até $3,74 \pm 0,04$. Após 6 horas, *L. brevis* 83 e *L. plantarum* 113 apresentaram valores de OD_{595} iguais a 2,51 e 2,48, respectivamente. Uma densidade óptica superior a 0,6 nas primeiras 8 horas de fermentação é desejável para cepas que se pretende utilizar como cultura iniciadora em

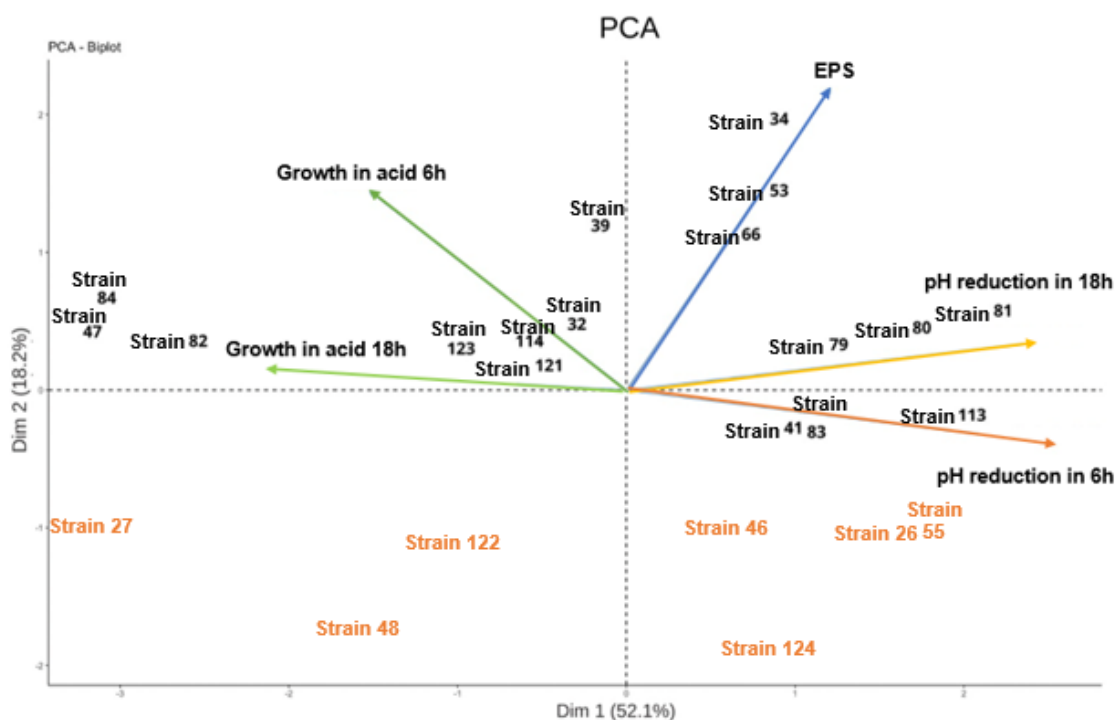
fermento natural (Reale et al., 2020). Deste modo, das 24 cepas analisadas, 17 apresentaram essa propriedade.

O rápido crescimento das BAL e a consequente acidificação da massa são importantes características tecnológicas, principalmente em escala industrial, pois aceleram a fermentação e proporcionam atributos artesanais desejáveis aos produtos em um menor espaço de tempo (Arora et al, 2021; Gunduz et al, 2022).

Em relação à capacidade de síntese de EPS, todas as cepas foram capazes de produzir esse exopolissacarídeo, com valores variando de 0,1 a 5,7 mg/L. *L. plantarum* 27, 48, 124 e *C. paralimentarius* 122 alcançaram os menores valores, com 0,1 mg/L. *C. paralimentarius* 39 e 34 produziram os maiores valores, com 5,7 mg/L e 4,7 mg/L, respectivamente. Nos produtos de panificação, a presença de EPS está diretamente associada a melhorias nas características tecnológicas e funcionais, como estabilidade da massa, textura e volume do pão (Abedfar et al., 2020; Reale et al., 2020; Zhang et al., 2023). E, por último, todos os isolados apresentaram atividade proteolítica, que contribui para a qualidade geral das massas de fermento natural (Fu et al, 2024), liberando aminoácidos como precursores de aroma e sabor (Catzeddu, 2019), e permitindo maior extensibilidade e volume nos pães (Santos et al, 2024).

A partir dos resultados acima descritos, foi realizada a Análise dos Componentes Principais (PCA), que consiste em combinar os dados obtidos para ordená-los de acordo com as características desejáveis ao produto, demonstrando a variação entre as amostras. O resultado pode ser observado na Figura 06. A PCA permitiu a triagem das cepas, identificando aquelas com melhor desempenho nas características esperadas de um fermento natural para dar continuidade às análises subsequentes, como tolerância a estresse de ácidos, sal, sacarose e etanol. As cepas selecionadas foram aquelas que apresentaram maior força nos testes realizados, estando mais próximas às setas das variáveis no gráfico da PCA. Foram excluídas sete cepas: 27, 48, 122, 46, 124, 26 e 55.

Figura 06. Análise dos Componentes Principais em Relação aos Testes Tecnológicos



Fonte: Dados da pesquisa (2024)

4.4. Testes de Tolerância a Estresse Ácido, Sal, Sacarose e Etanol

Geralmente os testes atribuídos à seleção de culturas iniciadoras estão limitados à capacidade de acidificação da massa e ao seu rápido crescimento, fatores importantes como a aclimação das cepas em ambientes estressores são negligenciados (Reale et al, 2020). Esses testes são necessários para garantir a robustez e a eficiência dessas culturas durante a fermentação, já que a atividade metabólica desses microrganismos pode ser prejudicada. Ao analisar a tolerância dessas BAL em ambiente ácido, na presença de sal, sacarose e etanol, comuns na fermentação natural de pães doces e salgados, pode-se selecionar cepas versáteis, capazes de iniciar uma fermentação consistente e de qualidade sob diversas condições ambientais.

Os testes de tolerância foram aplicados nas dezessete cepas selecionadas, em 6 e 24h de incubação, em caldo MRS controle e sob diferentes concentrações de NaCl (2%, 4% e 6%), sacarose (20% e 30%), etanol (2%, 4% e 6%) e acidez (pH 3,5, 4,5 e 5,5). Os resultados completos estão presentes nas Tabelas 03, 04, 05, 06 (Apêndice A).

4.4.1. Teste de Tolerância a NaCl (OD_{595nm}) em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.

Os pães de fermento natural geralmente utilizam como ingredientes básicos a farinha, a água, o fermento e o sal. O sal possui diversas propriedades, além de realçar o sabor, melhora a coesão e a elasticidade da massa, fortalece a rede de glúten e regula o processo de fermentação (Canella-Rawls, 2009), no entanto, dependendo de sua quantidade, pode afetar o desenvolvimento das BAL através do estresse osmótico (DeVuyst et al, 2017; Reale et al, 2020). Deste modo, é necessário que se observe a resposta das cepas a um ambiente estressante, para selecionar aquelas que apresentam maior capacidade de adaptação.

No presente estudo, as 17 cepas cresceram na presença de NaCl em todas as concentrações. Os resultados estão presentes na Tabela 03 do Apêndice A. Em 6h de incubação os valores do controle (sem adição de NaCl) são semelhantes aos encontrados em concentrações de 2% de cloreto de sódio, com os valores (OD_{595}) mínimos e máximos variando entre 0,59 – 2,61 e 0,50 – 2,0, respectivamente. O aumento da concentração para 4% e 6% de NaCl afetou a atividade metabólica das BAL, apresentando as menores absorvâncias (OD_{595}), variando entre 0,17 – 0,84 (4%) e 0,00 – 0,15 (6%). Estes resultados indicam que em 6h de incubação as BAL ainda estão se adaptando ao ambiente estressor.

Em 24h as cepas de BAL apresentaram o mesmo comportamento demonstrado em 6h de incubação, com o controle crescendo semelhante às amostras adicionadas de 2% de NaCl, com valor máximo (OD_{595}) de 12,75 para *L. plantarum* 53 e 81. Com duas exceções a esse comportamento: em condições salinas a cepa *C. paralimentarius* 32 obteve maior absorvância (OD_{595} 7,31) quando comparada ao controle (OD_{595} 4,99); o mesmo aconteceu com *L. brevis* 123, que obteve maior valor na presença de cloreto de sódio (OD_{595} 9,73) em relação ao controle (OD_{595} 7,74) no mesmo tempo. De Vuys et al (2017) apontam que algumas espécies de BAL são favorecidas na presença de baixas concentrações de sal.

Após 24h, as cepas incubadas nas maiores concentrações de cloreto de sódio tiveram crescimento expressivo, reforçando a ideia da fase adaptativa nas horas iniciais. Para as amostras em caldo salino a 4%, foram encontrados valores (OD_{595}) mínimos de 5,02 e máximos de 12,64. Para as amostras sob condições salinas de 6%, os valores (OD_{595}) mínimos de 3,64 e máximos de 11,69 foram registrados. Embora o aumento da concentração de NaCl tenha reduzido a ação das BAL, as cepas mantiveram-se viáveis.

Os produtos de panificação geralmente utilizam até 2 a 2,5% de sal em suas formulações (Reale et al, 2020), a concentração de 6% é utilizada para distinguir a cepa mais tolerante. O desempenho e a identificação das 17 cepas de BAL após 24h estão dispostas na Figura 7 (A). Destacam-se positivamente as cepas de *L. plantarum* 81 e *L. plantarum* 47 nas concentrações de 4% e 6%, respectivamente. *L. plantarum* 82 obteve os resultados mais baixos, mas todas as BAL se mostraram tolerantes a elevadas concentrações de sal ($OD_{595} > 3$). Valores de densidade óptica (OD_{595}) $< 0,6$ são considerados baixos, $> 0,6$ altos e $\cong 0,6$ moderados (Reale et al, 2020).

Ganzle et al. (1998) observaram que o crescimento de *F. sanfranciscensis* foi inibido em concentrações de 4% de NaCl, destacando a sensibilidade da cepa ao estresse osmótico. Os estudos de D'Angelo et al. (2017) demonstraram boa resistência do gênero *Leuconostoc* spp. na mesma concentração. *Limosilactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus acidilactici* apresentaram tolerância a concentrações de 6,5% de NaCl em estudo conduzido por Reuben et al. (2019). No entanto, as BAL analisadas por Reale et al. (2015) a 6% de NaCl não apresentaram maior viabilidade ($OD_{595} < 0,6$) após 24 horas, com exceção de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*. Em um estudo posterior, Reale et al. (2020) identificaram que as cepas mais tolerantes à mesma concentração de NaCl foram *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis* e *Furfuralibacterium rossiae*.

Esses dados indicam que a resistência ao NaCl varia significativamente entre as diferentes espécies analisadas. Essa diversidade de respostas ao estresse osmótico destaca a importância de selecionar cepas robustas para garantir a eficácia das culturas iniciadoras na produção de alimentos fermentados. A escolha criteriosa dessas cepas é fundamental para assegurar

que as culturas mantenham a viabilidade e a funcionalidade em condições adversas, garantindo a qualidade e a consistência dos produtos finais.

4.4.2. Teste de Tolerância a Sacarose (OD_{595nm}) em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.

A sacarose é o açúcar mais utilizado na panificação para a produção de pães doces e bolos fermentados (Reale et al, 2020), e está diretamente envolvida no metabolismo de algumas BAL heterofermentativas (DeVuys et al, 2017). Quando metabolizada libera glicose, substrato essencial para a formação de ácido lático pelas BAL homofermentativas (Pérez-Alvarado et al, 2022). Quando adicionada à massa, auxilia no sabor e favorece a coloração da casca, sua quantidade pode variar de acordo com a receita específica e o tipo de pão que se deseja preparar, podendo chegar a 30% em relação à farinha (Reale et al, 2020). Essas concentrações mais elevadas podem levar ao estresse osmótico e inibir o crescimento de algumas BAL durante a fermentação (Ge et al, 2011), diminuindo a atividade enzimática destes microrganismos (Zhang et al, 2016; Struyf et al, 2017). Deste modo é necessário selecionar cepas que possuam boa capacidade osmotolerante.

Todas as cepas de BAL apresentaram aumento no número de células viáveis em soluções com diferentes concentrações de sacarose. Os resultados estão dispostos na Tabela 04 do Apêndice A. Em 6h de incubação os valores mínimos e máximos foram de 0,15 – 1,99 no caldo contendo MRS controle (sem adição de sacarose). Sob concentrações de 20%, esses valores variaram entre 0,09 – 0,93. Em caldo MRS concentrado com 30%, as cepas apresentaram as menores absorvâncias (OD_{595}), com valores mínimos e máximos entre 0,04 – 0,65. Deste modo, após 6h de incubação as cepas tiveram aumento do número de células viáveis variando nas duas concentrações de açúcar. Uma menor viabilidade nas horas iniciais é indicativo de adaptação às condições estressantes.

A adição de sacarose não inibiu a multiplicação das BAL em 24h de incubação. A concentração de 20% está associada à sua utilização em massas doces fermentadas; os 30%, embora utilizados também nestas massas, indica as cepas mais tolerantes ao estresse osmótico. Os valores mínimos e máximos

do caldo MRS controle variaram entre 4,87 – 11,68. Sob a concentração de 20% de sacarose o crescimento (OD_{595}) das BAL variou entre 4,30 – 12,01, com algumas cepas apresentando melhor desempenho em relação ao controle. Em concentrações de 30% os valores mínimos e máximos foram de 4,01 – 11,02, respectivamente.

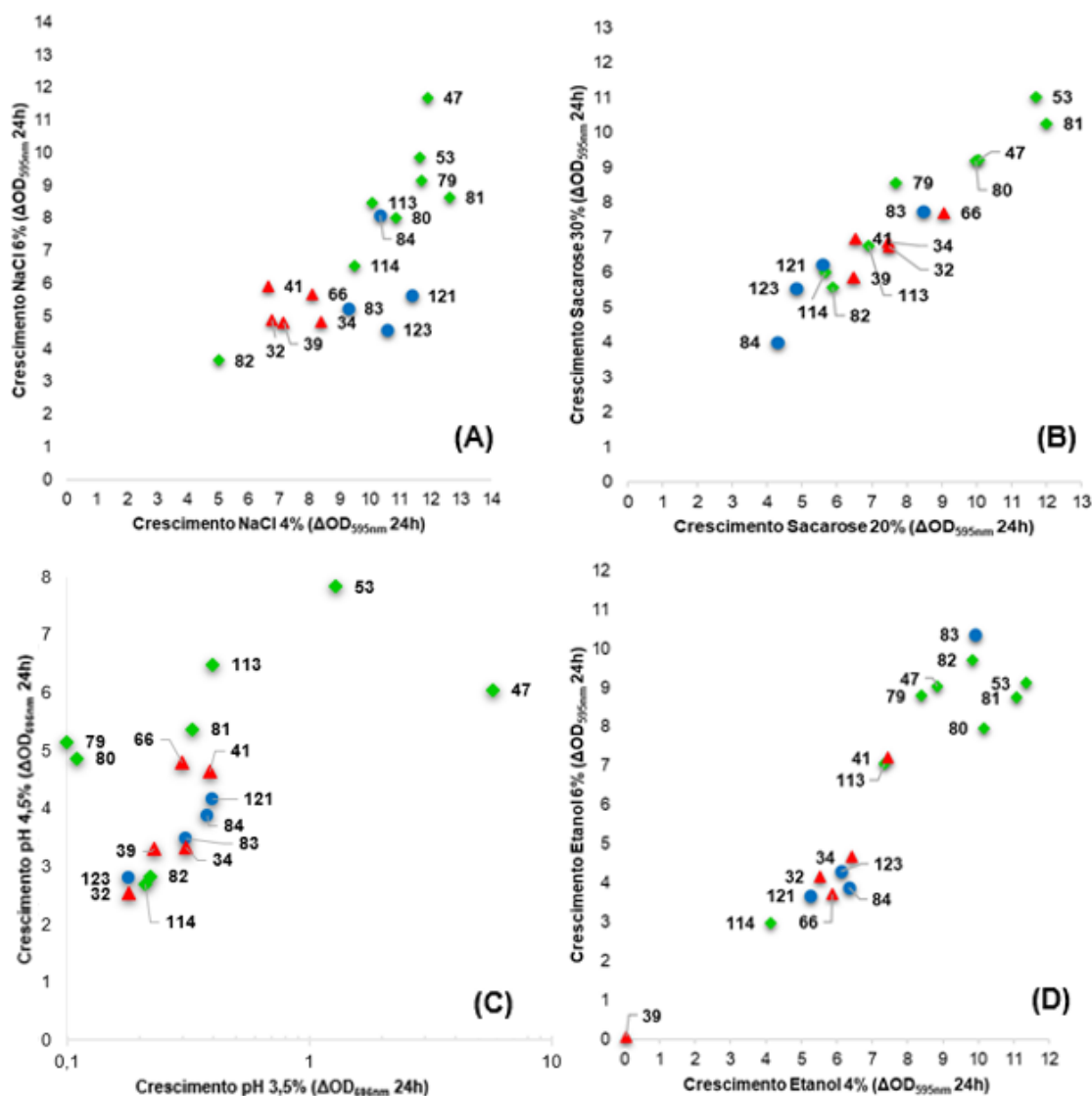
A identificação e o desempenho das dezessete cepas de BAL nas diferentes concentrações de sacarose após 24h estão dispostas na Figura 7 (B). Destacam-se positivamente as cepas de *L. plantarum* 81, 53 e 47 sob as concentrações de 20% e 30%. *L. brevis* 84 obteve os resultados mais baixos em ambas as concentrações. Todas as BAL analisadas demonstraram excelente capacidade de crescimento ($OD_{595} > 4,00$) e são resistentes à altas concentrações de açúcar, podendo ser utilizadas como culturas iniciadoras de massas doces fermentadas.

Em experimento semelhante, Reale *et al* (2020) encontraram resultados distintos nas cepas examinadas, com médias de crescimento moderada e alta em 20% e 30% de sacarose, respectivamente, a espécie mais tolerante foi *Leuc. pseudomesenteroides*, enquanto *Coml. paralimentarius* e *Lacp. paraplantarum* foram as mais sensíveis. Já as cepas de *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. lactis* sobreviveram em elevadas concentrações de sacarose (Gu *et al*, 2024). Ao investigar o crescimento de diferentes BAL, Vilanova *et al* (2015) perceberam que *Leuconostoc mesenteroides* foram beneficiados com a adição de açúcar. Diferentes espécies de BAL apresentam comportamentos distintos, de acordo com as condições do meio. Por isso a importância de obter cepas que se adaptem e se desenvolvam adequadamente em condições adversas.

As massas suplementadas com açúcar ou acrescidas de frutas secas promovem a seleção dos microrganismos dominantes durante a fermentação. Panetone e Colomba são exemplos de pães doces, difundidos e consumidos pelo mundo (Lattanzi *et al*, 2013), com alta concentração de açúcar. Em suas formulações, a quantidade pode variar entre 16% e 30% (Raimondi *et al*, 2017; Stefanello *et al*, 2019). Culturas iniciadoras tolerantes ao açúcar são de fundamental importância, não apenas na produção de pães doces fermentados, mas também no início do processo de propagação. No Brasil, por exemplo, o

uso de sucos de frutas e de cana-de-açúcar é amplamente empregado com esse propósito (Aplevicz et al, 2014).

Figura 07. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição das 17 cepas BAL com base na capacidade de crescimento (OD_{595nm}) em MRS suplementado com: **A:** NaCl a 4% (p/v) e 6% (p/v) após 24h de incubação. **B:** Sacarose a 20% (p/v) e 30% (p/v) após 24 h de incubação. **C:** pH acidificado a 3,5 e 4,5 após 24 h de incubação. **D:** etanol a 4% (p/v) e 6% (p/v) após 24 h de incubação.



Lactiplantibacillus plantarum (\blacklozenge); *Companilactobacillus paralimentarius* (\blacktriangle); *Levilactobacillus brevis* (\bullet).

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

4.4.3. Teste de Tolerância a Diferentes pHs (OD_{595nm}) após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.

A acidificação é uma das principais características das BAL e um importante atributo tecnológico dos fermentos naturais (Reale et al, 2020; Arora et al, 2021; Gunduz et al, 2022). Em um fermento maduro o pH pode variar entre 3,8 e 4,5, dependendo de alguns fatores, como a composição da microbiota, o tempo e a temperatura da fermentação (Catzeddu, 2019). Ao longo das propagações essa microbiota vai sendo modificada, sobrevivendo àquele ambiente ácido as cepas de BAL melhores adaptadas. Por este motivo, conhecer o comportamento das BAL em diferentes pHs é essencial para a seleção de uma cultura iniciadora competitiva e dominante.

Os baixos valores de pH afetaram o desenvolvimento das BAL nas primeiras 6h de incubação. Na Tabela 05 do Apêndice A estão dispostos os resultados. As amostras do caldo MRS controle (pH 6,5) variaram entre 0,59 – 2,73, apresentando os melhores resultados nesse tempo. Os valores do pH a 5,5 foram semelhantes ao controle. A redução do pH para 3,5 e 4,5 fez com que as cepas tivessem baixo crescimento ($OD_{595} < 0,6$), com exceção ($OD_{595} > 0,6$) de *L. plantarum* 53 e *L. brevis* 123 em pH 4,5.

Após 24h as cepas resistentes ao pH de 3,5 foram *L. plantarum* 47 e 53, com valores de densidade óptica (OD_{595}) de 5,73 e 1,29, respectivamente. As demais amostras tiveram baixo crescimento ($OD_{595} < 0,6$) nesse parâmetro. Na condição ácida de 4,5, todas as cepas apresentaram alta viabilidade com $OD_{595} > 2,00$. *L. plantarum* 47 e 53 também foram as mais tolerantes, no entanto o aumento do pH favoreceu o crescimento da *L. plantarum* 53 mais do que da *L. plantarum* 47. É possível observar a identificação e o desempenho das 17 BAL em 24h de incubação na Figura 7(C).

Das 184 cepas analisadas por Reale et al (2015), 20% não cresceram em pH de 3,5, e a maioria apresentaram baixa atividade metabólica ($OD_{595} < 0,4$), com exceção das estirpes de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. paracasei*. Em pH 4,5, todas as cepas tiveram suas densidades ópticas inferiores a 1. Gu et al (2024) perceberam que as cepas de *Lp. plantarum*, *Lb. fermentum* e *Lc. lactis* tiveram taxas de sobrevivência melhores que as de *Ec. Hirae*, *Le. mesenteroides* e *Ws. cibaria* em ambientes ácidos. Enquanto o *L. plantarum* cresceu em pH 3,5, *F.*

sanfranciscensis não sobreviveu na mesma condição, em comparação realizada por Gunduz et al (2022).

Dessa forma, a identificação e seleção de cepas de BAL com elevada tolerância a baixos valores de pH torna-se crucial para garantir a viabilidade e o desempenho das culturas iniciadoras em processos fermentativos. As cepas de *L. plantarum* 47 e 53, apresentam essa característica. A inoculação dessas culturas garante uma acidificação mais rápida, assegurando a reprodutibilidade e a estabilidade nas produções industriais (Gunduz et al, 2022), com inúmeros benefícios sensoriais, nutricionais e tecnológicos (Papadimitriou et al, 2019; Viola et al, 2024).

4.4.4. Teste de Tolerância a Etanol (OD_{595nm}) em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas.

As BAL heterofermentativas utilizam carboidratos, principalmente maltose, para produzir outros substratos além do ácido láctico, como o ácido acético, CO₂ e etanol (Gopal et al, 2020; Sevgili et al, 2023). O etanol também é produzido durante a fermentação pela ação metabólica das leveduras (De Vuyst et al, 2017; Fu et al, 2024), sendo estas responsáveis pelas maiores concentrações desse composto (Pradal et al, 2024). Durante a fermentação e propagação do fermento natural, o etanol produzido se acumula na massa. Esse acúmulo pode limitar o metabolismo das BAL, tornando necessária a seleção de cepas adaptadas a essas condições adversas.

Os testes de tolerância foram aplicados em caldo MRS controle (sem adição de etanol), e com diferentes concentrações de etanol durante 6 e 24h de incubação. Os resultados estão expressos na Tabela 06 do Apêndice A. Para parâmetros de comparação, os valores (OD₅₉₅) do MRS controle em 6h de incubação variaram entre 0,01 – 2,49. O aumento da concentração de etanol no meio fez com que o metabolismo das BAL diminuísse. Sob concentrações de 2%, 13 cepas de BAL apresentaram alta viabilidade (OD₅₉₅ > 0,6) nas primeiras 6h, destacando-se *L. plantarum* 47 com OD₅₉₅ de 2,13. Sob 4% e 6%, houve uma diminuição no número de cepas com alta viabilidade (OD₅₉₅ > 0,6), os valores foram de 7 e 4, respectivamente. *L. plantarum* 47 continuou sendo a mais ativa nesse tempo.

Com exceção de *C. paralimentarius* 39, todas as cepas apresentaram alta viabilidade ($OD_{595} > 2$) após 24h de incubação nas três concentrações de etanol. As amostras controle em meio MRS apresentaram valores de densidade óptica mínimos e máximos de 3,42 e 11,59, respectivamente. A identificação das cepas e seu desempenho após 24 horas podem ser observados na Figura 7(D). Entre as cepas submetidas a 6% de etanol, *L. brevis* 83 mostrou-se a mais tolerante (OD_{595} 10,38), enquanto *L. plantarum* 53 foi a mais tolerante (OD_{595} 11,35) sob concentração de 4% de etanol.

Em pesquisa conduzida por Reale et al. (2020), observou-se que as espécies *Leuc. pseudomesenteroides* e *C. paralimentarius* demonstraram maior sensibilidade a altas concentrações de etanol em comparação com as espécies *Furl. rossiae*, *L. plantarum* e *F. sanfranciscensis*. Em concentrações de 6%, Gu et al (2024) relataram alta taxa de sobrevivência para as cepas de *L. plantarum* e *L. fermentum*. De acordo com Pittet et al (2011), BAL dos gêneros *Lactobacillus* (antiga classificação) *Pediococcus* e *Leuconostoc* são mais tolerantes ao etanol do que outras bactérias.

Em um estudo realizado por Gunduz et al. (2022), foi observado um acúmulo médio de 2,55g/Kg de etanol no primeiro dia de propagação do fermento natural. Resultados semelhantes foram encontrados por Pradal et al. (2024), que registraram 3g/Kg de etanol após 48 horas de fermentação, com um aumento para 8,6g/Kg após 12 semanas de refrigeração. Apesar dessas concentrações não estarem presentes nos produtos de panificação, devido à evaporação durante o cozimento (Arora et al, 2021), o acúmulo de etanol na fermentação pode alterar o metabolismo das BAL.

Deste modo, é necessário a seleção de cepas que tenham essa capacidade adaptativa para dominar o processo fermentativo. No presente estudo, *L. plantarum* 47 teve alto crescimento ($OD_{595} > 1$) nas primeiras 6h de incubação a 6% de etanol, sendo candidata à fermentação em escala industrial, pela rápida adaptação. *L. brevis* 83 foi a que apresentou a maior tolerância em 24h, apresentando densidade óptica (OD_{595}) de 10,38.

4.4.5. Seleção de Cepas Tolerantes a Diferentes Condições de Estresse

Após os Testes de Tolerância, as cepas de BAL foram submetidas a uma Análise de Componentes Principais para identificar cepas robustas e dominantes no processo de fermentação. Observou-se a capacidade de crescimento em pH 3,5, 6% de NaCl, 30% de sacarose e 6% de etanol, por serem as condições mais adversas e indicativas das BAL mais tolerantes.

Deste modo, as cepas selecionadas de acordo com a Análise de Componentes Principais (Figura 01 do Apêndice A) foram *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, por serem espécies distintas e apresentarem as características desejadas para uma cultura iniciadora. As cepas Lp47 e Lb83 estão localizadas nos quadrantes superior e inferior do lado direito, respectivamente, onde há um forte agrupamento dos atributos desejados.

A estirpe *L. plantarum* 47 foi a mais tolerante nas condições ácidas e salinas, ficando entre as cinco mais resistentes nos demais parâmetros analisados. Na concentração de sacarose, *L. plantarum* 53 apresentou a maior resistência, listando entre as cinco melhores nos outros atributos. *L. brevis* 83 se destacou na maior concentração de etanol e obteve ótimos resultados nos outros testes, sendo o único parâmetro em que a espécie *L. plantarum* não foi superior.

Nesse momento, é importante ressaltar o excelente desempenho que todas as cepas analisadas apresentaram ao longo dos testes de tolerância. Supõe-se que o sucesso do experimento se dá devido a capacidade de adaptação que essas cepas possuem. Cepas autóctones estão habituadas ao meio estressante dos fermentos naturais, portanto, estão aclimatadas a condições ambientais específicas, apresentando maior resistência e eficácia no processo fermentativo.

Nos tópicos a seguir, será apresentada a caracterização físico-química, bioativa, microbiológica e tecnológica dos fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, garantindo uma compreensão abrangente de suas propriedades e desempenho. É reconhecido que o uso de cepas autóctones como culturas iniciadoras favorece o desempenho destes atributos durante a fermentação (Di Cagno et al, 2013; Ruiz et al, 2019; Munch-Andersen et al, 2024).

4.6. Caracterização Físico-química do Fermento

Foram avaliados os parâmetros físico-químicos dos fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83 durante a fermentação em diferentes tempos. Os valores de pHs e Acidez Titulável Total (ATT), em 0h, 2h, 4h, 6h, 8h e 24h de fermentação, estão dispostos na Tabela 02. O conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos, em 0h, 8h e 24h de fermentação, estão presentes na Tabela 03.

Tabela 02. Avaliação do pH e da Acidez Titulável Total de fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, isoladamente, durante a fermentação (0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas)

		pH					
	0h	2h	4h	6h	8h	24h	
Lp47	5,48±0,01 ^{Aa}	5,43±0,05 ^{Aa}	4,24±0,03 ^{Ab}	3,87±0,03 ^{Abc}	3,79±0,03 ^{Ac}	3,47±0,02 ^{Ac}	
Lb83	5,52±0,03 ^{Aa}	5,54±0,01 ^{Aa}	5,09±0,01 ^{Bb}	4,55±0,19 ^{Bc}	4,11±0,02 ^{Bd}	3,57±0,02 ^{Ae}	
		Acidez Titulável Total (mg/100g)					
	0h	2h	4h	6h	8h	24h	
Lp47	0,47±0,06 ^{Aa}	0,63±0,06 ^{Aa}	1,37±0,15 ^{Ab}	2,00±0,17 ^{Ac}	2,53±0,15 ^{Ad}	3,30±0,10 ^{Ae}	
Lb83	0,40±0,00 ^{Aa}	0,60±0,00 ^{Aab}	0,83±0,06 ^{Bb}	1,43±0,06 ^{Bc}	1,90±0,10 ^{Bd}	3,13±0,06 ^{Ae}	

A-C Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si. a-e Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si. Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

O pH das amostras variou de 3,47±0,02 a 5,54±0,01. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) após a inoculação (0h). No entanto, depois de 4h de fermentação o pH de Lp47 caiu para 4,24±0,03 e para 3,87 após 6 horas, sem diferença significativa até as 24 horas. Os valores finais foram de 3,47±0,02 e 3,57±0,02 para Lp47 e Lb83, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Gunduz et al (2020) e Ventimiglia et al (2015) em fermentos inoculados com *L. plantarum* e *F. sanfranciscensis*. Em ambos os experimentos os valores do fermento controle (sem inoculação) foram acima de 5.

A rápida acidificação da massa por culturas iniciadoras é essencial em escala industrial porque garante uma fermentação mais curta (Arora et al, 2021). Este atributo é potencializado quando culturas autóctones são utilizadas (Gunduz et al, 2020). Os valores da ATT variaram entre 0,40±0,00 e 3,30±0,10. O seu comportamento foi inversamente proporcional ao do pH, aumentando com o passar do tempo. Isto acontece porque os ácidos orgânicos vão se acumulando

na massa durante a fermentação devido ao metabolismo das BAL (De Vuyst et al, 2017).

Tabela 03. Conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos em fermento natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83 em diferentes tempos de fermentação.

Tempo	Cepas	Açúcares (g/kg)			Ácidos Orgânicos (g/kg)		
		Maltose	Glicose	Frutose	Cítrico	Láctico	Fórmico
0h	Lp47	N/D	0,08	0,57	N/D	N/D	0,22
	Lb83	1,72	0,37	0,81	N/D	9,09	0,74
8h	Lp47	0,09	0,08	0,42	N/D	0,98	0,30
	Lb83	1,48	0,13	0,57	N/D	N/D	0,17
24h	Lp47	2,50	0,09	0,53	N/D	1,21	0,22
	Lb83	3,23	0,21	0,58	17,22	N/D	0,50

N/D – Não detectado. Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.
Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Maltose, glicose e frutose foram os açúcares identificados por HPLC. Após a inoculação não foi possível detectar a presença de maltose em Lp47, no entanto, a ativação das amilases durante a fermentação resultou em um aumento progressivo deste composto ao longo do tempo (Fu et al, 2024). Os baixos valores dos açúcares indicam a alta atividade metabólica das BAL, que esgotam as fontes de carboidratos para produzir ácidos orgânicos (De Vuyst et al, 2017), confirmando os dados encontrados na ATT.

Nas culturas heterofermentativas obrigatórias e facultativas, a glicose é utilizada pela via da fosfocetolase na produção de ácido láctico e etanol, enquanto a frutose é utilizada como aceptor de elétron alternativo na produção de ácido acético (Galle et al, 2011; Ganzle, 2015) e manitol (Paramithiotis et al, 2006; Galle et al, 2011). O comportamento adaptativo de *L. Plantarum* está atrelado ao seu vasto metabolismo, refletido pela presença de diversos sistemas de transporte de açúcar (Corsetti et al, 2016), dentre eles a produção de proteína de estresse, para se proteger de condições adversas (De Vuyst et al, 2017).

Os ácidos orgânicos são importantes nos sistemas de fermentação natural, influenciando a estrutura do produto, as propriedades sensoriais e a sua durabilidade (Fang et al, 2023). O ácido cítrico, produzido por algumas espécies de BAL, pode ser convertido em succinato na regeneração de cofatores reduzidos, ou em ácido láctico, acético ou etanol (Ganzle, 2015). Entre as cepas

avaliadas, apenas Lb83 produziu o citrato, apresentando 17,22 g/L após 24 horas.

O ácido láctico é o principal produto das BAL, ele pode seguir diferentes rotas metabólicas dependendo da espécie bacteriana e das condições do processo. A maior concentração deste composto foi encontrada em Lb83 após a inoculação (0h), estando ausente nos tempos subsequentes. Comportamento inverso foi observado em Lp47, que não possuía o metabólito após a inoculação (0h), mas que foi acumulando progressivamente.

De acordo com Ganzle (2015) e Zhang et al (2010), o ácido láctico pode ser oxidado a ácido acético, com formação concomitante de ATP, fornecendo energia para o crescimento bacteriano. Essa conversão é catalisada pela enzima lactato desidrogenase. Dependendo da cepa bacteriana, o ácido láctico pode ser metabolizado em uma variedade de produtos finais além do ácido acético, como etanol, ácido fórmico e CO₂ (De Angelis e Gobbetti, 2011).

Em relação ao ácido fórmico, os valores variaram de 0,17 a 0,74. Foi o único composto presente em ambas as cepas, independente do tempo de fermentação. Este ácido destaca-se por sua ação antimicrobiana, atuando sinergicamente com outros ácidos como o láctico e o acético para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (De Vuyst et al, 2017). Quanto à sua metabolização, pode ser produto da degradação do ácido láctico (De Angelis e Gobbetti, 2011) ou como metabólito de rotas alternativas do ácido cítrico (Ganzle, 2015).

4.7. Caracterização Bioativa do Fermento

Foram avaliadas as características bioativas dos fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83 durante a fermentação em diferentes tempos. Na Tabela 04 estão dispostos os Teores Totais dos Compostos Fenólicos e a Atividade Antioxidante.

Tabela 04. Atividade antioxidantes e teor dos compostos fenólicos totais de fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, isoladamente, durante 0, 8 e 24 horas de fermentação

	ABTS corr (µmol Tx/g)			g Fenolicos/100g amostra		
	0h	8h	24h	0h	8h	24h
Lp47	8,57±0,85 ^{Aa}	9,33±0,60 ^{Aa}	11,37±0,76 ^{Ab}	29,85±0,31 ^{Aa}	30,90±0,37 ^{Aa}	36,17±1,40 ^{Ab}
Lb83	8,47±1,05 ^{Aa}	9,87±1,26 ^{Aa}	11,77±0,06 ^{Ab}	29,38±0,62 ^{Aa}	31,75±0,58 ^{Ab}	35,16±1,07 ^{Ac}

A-B Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si.

a-c Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si.

Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

A fermentação teve impacto positivo na produção dos compostos fenólicos totais. Os maiores teores foram registrados após 24h. Os valores variaram entre 29,38 e 36,17g/100g, apresentando aumento progressivo ($p<0,05$) ao longo da fermentação. Lp47 teve aumento de 21,2%, em relação ao tempo 0h, enquanto o crescimento de Lb83 foi de 19,8%. Em estudo realizado por Graça et al (2022), o teor de compostos fenólicos em fermento natural de trigo após 24h foi de 8,6%, a adição de farinha integral ao fermento impulsionou o crescimento para 38%.

A produção de compostos fenólicos traz diversos benefícios funcionais, com atividade antioxidantes devido à presença de um anel fenólico aromático (Calinoiu et al, 2018) e anti-inflamatórias (Fekri et al, 2024). Nas farinhas de trigo branca estes compostos são considerados secundários, no entanto algumas espécies de BAL conseguem liberar os ácidos fenólicos que estão ligados à farinha e em maior quantidade nas farinhas integrais (De Vuyst et al, 2017; Rizzello et al, 2019; Fekri et al, 2024). Estes ácidos posteriormente podem ser convertidos em precursores de sabor (Pérez-Alvarado et al, 2024).

Paucean et al (2024) registraram o crescimento médio de compostos fenólicos de 7,8% em pães de trigo fermentados por 24h, enquanto em pães de farinha de espelta o crescimento foi de 11,8%. Percebe-se que a fermentação natural potencializa a disponibilidade destes compostos nas massas fermentadas e em seus produtos finais. Este comportamento é devido a capacidade das BAL de liberar esses compostos que estão ligados à farinha. Embora os valores apresentados possam variar, devido ao tipo de farinha e à metodologia utilizada, o padrão de aumento durante a fermentação é o mesmo.

A concentração de fenólicos pode afetar diretamente a viabilidade das BAL: Enquanto as baixas concentrações estimulam o seu crescimento, as altas podem retardar o seu metabolismo. Entretanto, os metabólitos resultantes das ações das BAL possuem atividade antimicrobiana inferior às dos seus precursores (Filannino et al, 2018), não atrapalhando a fermentação. Por isto, a importância de espécies adaptadas e capazes de degradar estes compostos, como é o caso de *L. plantarum* e *L. brevis* (De Vuyst et al, 2017; Filannino et al, 2018).

A análise de eliminação do radical ABTS•+ foi realizada para avaliar as propriedades antioxidantes dos fermentos inoculados. Os valores mínimos e máximos encontrados foram de $8,47 \pm 1,05$ e $11,77 \pm 0,06$, com diferenças significativas ($p < 0,05$) em 24h de fermentação. Lb83 e Lp47 apresentaram atividade antioxidante de 39% e 32% em relação ao início da fermentação (0h), respectivamente. As cepas apresentaram comportamento semelhante ($p > 0,05$) entre si. Do mesmo modo que a fermentação potencializou os teores de fenólicos disponíveis no fermento natural, aumentou a atividade antioxidante desses fermentos. Este comportamento era esperado.

A acidificação que ocorre durante a fermentação das BAL pode beneficiar a formação de peptídeos com potencial antioxidante (Fang et al, 2024; Pejcz et al, 2024), além de aumentar a disponibilidade dos compostos fenólicos, como observado no experimento. Estudos anteriores em diferentes tipos de farinhas (Fang et al, 2024; Li et al, 2024; Liu et al, 2024) mostraram a tendência de aumento da atividade antioxidante em pães de fermentos naturais inoculados com BAL, corroborando com os resultados encontrados na pesquisa. Diante do exposto pode-se afirmar que as cepas estudadas, Lp47 e Lb83, aumentam a disponibilidade de compostos bioativos.

O perfil de fenólicos dos fermentos naturais inoculados está disposto na Tabela 05. O ácido fumárico foi encontrado em Lp47 após a inoculação (0h), entretanto ele foi degradado ao longo da fermentação. A Epigallocatequina Galato (EGCG) foi detectada após a inoculação em Lp47, e foi aumentando ao longo do tempo de fermentação. Em Lb83, este composto apareceu inicialmente em 8h de fermentação e foi acumulando até 24h.

Tabela 05. Perfil de compostos fenólicos em fermento natural inoculado com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83 em diferentes tempos de fermentação.

Compostos (μ /g amostra)	Cepas					
	Lp47			Lb83		
	0h	8h	24h	0h	8h	24h
Ácido Fumárico	2,68	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Epigallocatequina Galato	2,74	2,66	3,07	N/D	3,64	4,03

N/D – Não detectado. Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.
Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

A epigallocatequina galato é um flavonoide pertencente ao grupo das catequinas e é reconhecida por suas propriedades antioxidantes (Silva Júnior et al, 2021). Ela atua na proteção de doenças cardiovasculares, síndromes metabólicas, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e câncer (Thanikachalam et al, 2020). Cepas de *L. plantarum* e *L. brevis* são conhecidas por aumentar as concentrações de catequina durante a fermentação (Gaur e Ganzle, 2023).

Estima-se que as enzimas esterases são uma das responsáveis pela conversão de EGCG durante a fermentação. No entanto, esses dados são quantificados considerando a diminuição dos compostos e o aumento subsequente dos metabólitos esperados (Gaur e Ganzle, 2023), necessitando de mais estudos sobre as vias metabólicas. Estes autores relataram que as revisões recentes sobre o metabolismo dos compostos fenólicos durante a fermentação de alimentos por lactobacilos ainda são escassas, corroborando com a pouca literatura encontrada sobre o assunto.

A Caracterização Microbiológica está presente na Tabela 06. A contagem de células viáveis de BAL (log UFC/g) nos fermentos inoculados com Lp47 e Lb83 foi consistente com os valores observados para pH e ATT. Os fermentos estabilizaram-se ao atingir um pH médio de 4,4. Para o Lp47, essa estabilização ocorreu após 4 horas de fermentação, enquanto para o Lb83, ocorreu após 6 horas. Isso demonstra, mais uma vez, a alta capacidade de adaptação que *L. plantarum* 47 possui em pouco tempo de fermentação. Após 8h, os fermentos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si. Cepas de BAL

isoladas de fermento natural tiveram o mesmo comportamento de viabilidade em experimento realizado por Ventimiglia et al (2015) e Gunduz et al (2022).

Tabela 06. Número de células viáveis de BAL (log UFC/g) dos fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, isoladamente, durante a fermentação após 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas

Amostra	BAL (UFC/g)					
	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Lp47	7,63±0,21 ^{Aa}	7,98±0,03 ^{Aa}	8,49±0,09 ^{Ab}	8,85±0,00 ^{Ab}	8,85±0,00 ^{Ab}	8,86±0,01 ^{Ab}
Lb83	7,57±0,04 ^{Aac}	6,85±0,21 ^{Ba}	8,01±0,19 ^{Bc}	8,72±0,06 ^{Bbd}	8,68±0,004 ^{Ad}	8,71±0,13 ^{Ad}

A-C Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si.

a-d Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si.

Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Em pesquisa semelhante, Fang et al (2024) inocularam cepas isoladas de diferentes matrizes alimentares em fermentos naturais, no entanto, *L. plantarum* só conseguiu a estabilização (8,5 log UFC/g) após 12h. No estudo de Santos et al (2024), a contagem de *L. pentosus* e *L. fermentum* isolados de fruta foi em média 6.66 (log UFC/g), após 24h de fermentação, aumentando um ciclo logarítmico nesse tempo. O rápido crescimento e acidificação de *L. plantarum* 47 e *L. brevis* 83 pode estar associado diretamente à sua origem autóctone e à sua capacidade de adaptação aos meios estressores do fermento natural.

Cepas autóctones destacam-se pelo bom desenvolvimento tecnológico em processos fermentativos. Devido às condições adversas, as cepas desenvolvem características que lhes permitem crescer rapidamente e estabilizar o pH em períodos curtos, garantindo uma fermentação eficiente, direcionada e estável. Como foi visto anteriormente, estes atributos são necessários à uma cultura iniciadora de fermento natural para uso em escala industrial.

4.8. Caracterização Tecnológica do Fermento

Foram avaliadas as características tecnológicas dos fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83 durante a fermentação em diferentes tempos. Na Tabela 07 estão dispostos os parâmetros de volume.

Tabela 07. Parâmetro de fermentação da massa (Volume) dos fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, isoladamente, durante 24h a fermentação

	Volume (mL)					
	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Lp47	16,7±0,58 ^{Aa}	16,7±0,58 ^{Aa}	16,7±0,58 ^{Aa}	17,3±0,58 ^{Aa}	17,3±1,15 ^{Aa}	17,7±0,58 ^{Aa}
Lb83	17,3±0,58 ^{Aa}	17,3±0,58 ^{Aa}	17,3±0,58 ^{Aa}	19,0±0,00 ^{Ab}	22,7±0,58 ^{Bc}	21,3±5,03 ^{Bc}

A-B Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.
a-c Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Quanto ao aumento do volume nos fermentos, os valores variaram entre 16,7±0,58 e 22,7±0,58. Os resultados mais expressivos estão associados à Lb83 em 8h de fermentação. *L. brevis* é uma BAL heterofermentativa obrigatória capaz de produzir CO₂ por diversas vias metabólicas (Ganzle, 2015). Além de *L. brevis*, a farinha possui leveduras nativas que auxiliam no processo de fermentação. No entanto, a rápida acidificação pode inibir o desenvolvimento dessas leveduras (Catzeddu, 2019; Papadimitriou et al, 2019; De Vuyst et al, 2021).

O desenvolvimento das leveduras nativas foi prejudicado pelos baixos valores do pH no início da fermentação, diminuindo sua atividade metabólica. Percebe-se em Lp47 um aumento sutil no aumento do volume, porém não é significativo ($p > 0,05$). Em condições de estresse ácido, as leveduras aumentam a produção de glicerol para se proteger (De Vuyst et al, 2017; 2021). Este fato justifica o aumento do glicerol em Lp47 em 8h de fermentação, quando comparado com Lb83 (Cromatograma - Apêndice). O glicerol atua na levedura como agente osmoprotetor.

Em relação à geração de CO₂ (Tabela 08), as cepas mantiveram o mesmo comportamento apresentado no volume em 8h de fermentação, quando passaram a se diferenciar estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. A principal característica das BAL é a produção de ácidos orgânicos e a acidificação da massa, enquanto cabe às leveduras atuarem como agentes fermentadores (Catzeddu, 2019; Fekri et al, 2024). Dessa forma, é compreensível que os valores obtidos de CO₂ não sejam tão expressivos, considerando que o ambiente apresenta condições desfavoráveis para as leveduras nativas, que no caso do produto testado, estão em baixas concentrações em comparação com o inóculo bacteriano utilizado no teste.

Tabela 08. Parâmetro de fermentação da massa (Geração de CO₂) dos fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, isoladamente, durante 24h a fermentação

	Geração de CO ₂ (mg)				
	2h	4h	6h	8h	24h
Lp47	0±1,53 ^{Aa}	-0,01±1,52 ^{Aa}	0±1,51 ^{Aa}	-0,02±1,51 ^{Aa}	0±1,51 ^{Aa}
Lb83	0±1,18 ^{Aac}	-0,01±1,18 ^{Aa}	0,01±1,18 ^{Ab}	0,01±1,19 ^{Bb}	-0,01±1,19 ^{Aab}

A-B Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si.

a-c Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) entre si.

Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

É possível caracterizar materiais sem danificar sua estrutura utilizando medições reológicas dinâmicas dentro do intervalo de viscoelasticidade linear (Abedfar et al, 2020). A Figura 8A apresenta os resultados do comportamento dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da tensão para fermentos inoculados com *L. plantarum* 47 e *L. brevis* 83 após 8 h e 24h de fermentação. A região viscoelástica linear das amostras fermentadas por 24h foi inferior a 2 Pa de tensão. Khatkar e Schofield (2002a) observaram um decréscimo contínuo de G' para massas de trigo em tensão entre 20-100 Pa, caracterizando ausência de região linear. Os mesmos autores indicam que a região linear destas massas é de difícil caracterização. O cruzamento das curvas do módulo elástico e viscoso em alta tensão demonstra o início do escoamento do material. Observou-se que, para amostras de 24h, a cepa Lp47 começa a fluir em 50 Pa, enquanto o fermento com a cepa Lb83 apresenta-se mais estruturado, tendo início de escoamento a aproximadamente 75 Pa (Figura 8A).

No entanto, para 8 h de fermentação observou-se um comportamento linear de G' até 100 Pa (Figura 8A). Este comportamento é reportado anteriormente por Khatkar e Schofield (2002a) para massas produzidas com glúten puro. Gerez et al (2008) e Yildirim-Mavis (2019) relatam que as características reológicas das massas podem ser significativamente alteradas diante de mudanças em seus perfis físico-químicos. Alguns fatores, como a quebra de grandes agregados proteicos em frações menores, explicam essa alteração ao longo da fermentação. Essa quebra se dá devido à capacidade proteolítica que as BAL possuem (Di Cagno et al, 2002) e ao enfraquecimento das ligações dissulfetos, que desestabilizam as estruturas proteicas (Tomic et al, 2023).

Os baixos níveis de pH e o aumento significativo da ATT durante a fermentação ativam diversas enzimas presentes nas farinhas, além das proteases, tem-se as amilases e hemicelulases (Yildirim-Mavis, 2019). A acidez também altera a estrutura do glúten como resultado da repulsão eletrostática intramolecular e a consequente exposição dos grupos hidrofóbicos (Aprodu et al, 2019). Deste modo, é possível compreender a mudança estrutural e reológica que acontece nos fermentos inoculados com Lp47 e Lb83 durante a fermentação, sabendo que em 24h eles atingiram pH 3,47 e 3,57 e ATT de 3,30 e 3,13, respectivamente (Tabela 02).

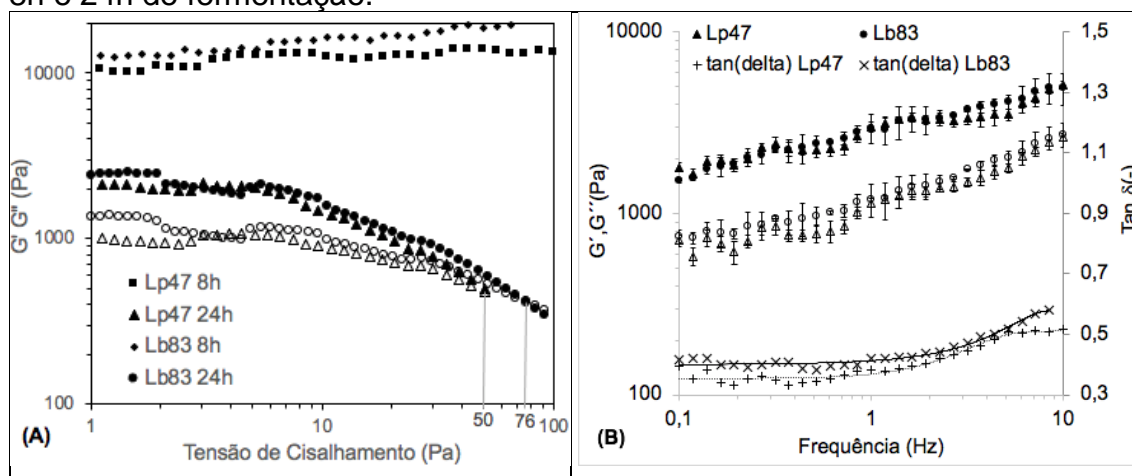
Os resultados de varredura de tensão indicam que o fermento após 8 h de inoculação ainda mantém a rede de glúten, e possivelmente os grânulos de amido estão ligados a matriz contínua da rede protéica, como observado microscopicamente por Mironeasa e Codinã (2019). Li e colaboradores (2020) propõem modelos que explicam a adsorção das proteínas do glúten sobre os grânulos de amido. A rigidez da amostra de 8h é aproximadamente 10 vezes maior que para amostra de 24h (Figura 8A). Khatkar e Schofield (2002a) observaram que o aumento da concentração de amido nas massas de glúten causou maior elasticidade, em amplitudes de tensão inferiores a 20 Pa. Para os fermentos inoculados Lb83 e Lp47, não há diferença de concentração de amido ao longo do tempo de fermentação. O que possivelmente explicaria a maior rigidez observada nas amostras com 8h de fermentação é a maior capacidade de retenção de água do glúten em relação ao amido, causando um aumento relativo da concentração de amido (Li et al., 2020).

Após 24h de inoculação, com a estrutura protéica alterada pela ação enzimática e microbiana, a reologia passa a ser governada pelas interações amido-amido e amido-proteína, ao invés das interações proteína-proteína, causando uma redução do intervalo de viscoelasticidade linear (Khatkar e Schofield, 2002a). O espectro mecânico dos fermentos em 24h é apresentado na Figura 8B. Para ambas as cepas, o módulo de armazenamento (G') foi maior que o módulo de perda (G''), independente do tempo de fermentação. Este resultado caracteriza estruturas semelhantes a gel e, portanto, demonstra um comportamento prioritariamente elástico das amostras (Galle et al, 2011; Abedfar et al, 2020; Li et al, 2022).

Winter e Chambon (1986) definem o ponto de gel quando os módulos dinâmicos seguem um comportamento de lei da potência ao longo da frequência com igualdade de expoente, ou seja, quando $\tan \delta$ torna-se constante ao longo da frequência. Este comportamento, foi observado para as amostras com 24h de fermentação (tabela 8B), sendo até 2 Hz para Lb83 e até 1 Hz para Lp47. Observou-se um aumento $\tan \delta$ para frequências maiores que 2 Hz, similar ao apresentado anteriormente para massas de farinha e água (Dongdong et al., 2023).

O fator de perda ($\tan \delta$) retrata o comportamento de deformação viscoelástica através da razão entre os componentes viscosos (G'') e elásticos (G'). O fermento se comportou mais como líquido quando a deformação ocorreu mais rapidamente (Yu et al., 2019). Géis físicos tipicamente podem se quebrar e fluir dependendo da tensão e da taxa de deformação. A estrutura molecular no ponto de gel é frágil e com certo grau de mobilidade, devido a conexão dos largos agregados moleculares estarem se formando. A maioria dos constituintes ainda são de agregados de pequeno tamanho molecular (Winter, 2016). Desta forma, provavelmente o fermento com 24h apresenta pequenos agregados de glúten hidrolisado ligado aos grânulos de amido, que podem se conectar e quebrar suas ligações físicas.

Figura 08 – Variação dos Módulos de Elasticidade e de perda em função da tensão de cisalhamento (A) e da frequência (B) de fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, isoladamente, após 8h e 24h de fermentação.



Símbolo fechado (G') e símbolo aberto (G'').

Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

O módulo complexo (G^*) e o fator de perda ($\tan \delta$), obtidos na região do intervalo linear e a 1 Hz, estão apresentados na Tabela 09. Não houve diferença significativa no valor de $\tan \delta$ a 1 Hz entre as amostras, com valores entre 0,34 - 0,4. Khatkar e Schofield (2002b) relataram valores de do módulo de perda entre 0,33 – 0,58 para diversas farinhas de trigo analisadas. Quando $\tan \delta$ é inferior a 1 (um) denota um comportamento mais sólido/elástico do que viscoso nas amostras (Li et al, 2022; Vela et al, 2023). Em relação ao tempo de fermentação notou-se uma diminuição significativa de G^* em 24h, decrescendo de aproximadamente 180 kPa para 3,2 kPa. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao tipo de cepa inoculada.

Van Bockstaele e colaboradores (2008) estabeleceram uma relação inversamente proporcional entre G^* e o volume de pães preparados com farinhas de diferentes cultivares de trigo. Os autores descrevem que quando $G^* < 15$ kPa o volume dos pães aumenta, chegando a 650 cm³/100g farinha com G^* igual a 7 kPa. Desta forma, os fermentos Lp47 e Lb83 após 24h de inoculação apresentam valores de módulo complexo na faixa adequada para obtenção de pães com maior volume.

Tabela 09. Propriedades reológicas sob cisalhamento (a 1Hz) e compressão de fermentos inoculados com *Lactiplantibacillus plantarum* 47 e *Levilactobacillus brevis* 83, isoladamente, após 8h e 24h de fermentação.

Cepas	Medidas sob Cisalhamento			
	Módulo Complexo – G^* (kPa)		Tan δ (-)	
	8h	24h	8h	24h
Lp47	155,3 ± 31,9 ^{Aa}	3,2 ± 0,2 ^{Ab}	0,34 ± 0,07 ^{Aa}	0,38 ± 0,00 ^{Aa}
L83	180,8 ± 45,8 ^{Aa}	3,2 ± 0,6 ^{Ab}	0,38 ± 0,05 ^{Aa}	0,40 ± 0,00 ^{Aa}
Cepas	Medidas sob Compressão			
	Dureza (N)		Adesividade (mJ)	
	8h	24h	8h	24h
Lp47	0,48 ± 0,04 ^{Aa}	0,60 ± 0,08 ^{Aa}	2,87 ± 0,50 ^{Aa}	1,43 ± 0,15 ^{Ab}
Lb83	0,42 ± 0,06 ^{Aa}	0,40 ± 0,04 ^{Aa}	4,37 ± 0,61 ^{Ba}	1,07 ± 0,20 ^{Ab}

^A Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

^{a-b} Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

Lp47: *Lactiplantibacillus plantarum* 47; Lb83: *Levilactobacillus brevis* 83.

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Em compressão, foram analisados a dureza e a adesividade dos fermentos nos tempos de 8h e 24h (Tabela 09). A dureza, corresponde a força (N) máxima aplicada durante a deformação (Ndjang et al, 2024). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na dureza dos fermentos Lp47 e Lb83, tendo

variado entre 0,4-0,6 N nos tempos analisados. A adesividade, que se refere à tendência de um material se aderir a uma superfície quando entra em contato com ela, pode ser definida como a energia necessária para separar superfícies aderidas (Amaral et al, 2022).

O fermento Lb83 apresentou comportamento significativamente ($p < 0,05$) mais adesivo do que Lp47 em 8h de fermentação. Após 24h de fermentação, a adesividade de Lp47 diminuiu pela metade e de LB83 reduziu quatro vezes, mas neste tempo não houve diferença significativa entre as formulações. Amidos apresentam comportamento mais adesivos após o processo de gelatinização, o que não ocorreu durante a fermentação. Yildiz e colaboradores (2012) relatam que o aumento da concentração de glúten causa maior adesividade a massa de farinha. Desta forma, a menor adesividade entre os tempos de fermentação das amostras Lp47 e Lb83 pode ser explicada pela hidrólise parcial da rede de glúten.

Os resultados reológicos sob compressão ou cisalhamento, a altas ou baixas deformações, sugerem que os fermentos após 24h de inoculação apresentam características mais adequadas para utilização em massas de panificação, pois são menos adesivos, elásticos e possuem maior fluência a altas deformações, possibilitando um processo de mistura mais homogêneo com os demais ingredientes da massa e com menor gasto energético.

5. CONCLUSÃO

Esse trabalho teve por objetivo desenvolver um fermento natural a partir de cepas de BAL isoladas das diferentes regiões climáticas da Paraíba com potencial tecnológico e bioativo. A identificação das BAL revelou que o consórcio microbiano é afetado pelas características climáticas de onde o fermento é produzido, gerando diferentes grupos de microrganismos. *Lactiplantibacillus plantarum* foi a única espécie presente nas três regiões. De modo geral, os resultados demonstraram a viabilidade de usar Lp47 ou Lb83 como culturas iniciadoras de fermento natural. A inoculação das cepas nos fermentos resultou em boas características físico-química, bioativa e tecnológica. Os fermentos apresentaram rápida acidificação e crescimento das células viáveis, garantindo a estabilidade e a reprodução em escala industrial. O uso das culturas iniciadoras nos fermentos aumentou o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante durante a fermentação. Os resultados reforçam que cepas autóctones de fermento natural se destacam pelo bom desenvolvimento tecnológico em processos de panificação, sendo indicadas para iniciar esse processo de forma rápida, controlada e segura.

REFERÊNCIAS

- Abedfar, A., Hosseini-zhad, M., Rafe, A. (2020). Effect of microbial exopolysaccharide on wheat bran sourdough: Rheological, thermal and microstructural characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, 154, 371–379. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.019
- AESA. Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. (2016). **Caracterização topográfica e da geomorfologia**
- Albagli, G., do Monte Schwartz, I., Amaral, P. F., Ferreira, T. F., & Finotelli, P. V. (2021). How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread. **LWT**, 149, 111888
- Alfonzo, A., Sicard, D., Di Miceli, G., Guezenec, S., Settanni, L. (2021). Ecology of yeasts associated with kernels of several durum wheat genotypes and their role in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* during dough leavening. **Food Microbiology**, 94, doi: 10.1016/j.fm.2020.103666
- Amaral, J. B. S., Grisi, C. V. B., Vieira, E. A., Ferreira, P. S., Rodrigues, C. G., Diniz, N. C. M., Vieira, P. P. F., Santos, N. A., Gonçalves, M. C., Braga, A. L. M., Cordeiro, A. M. T. M. (2022). Light cream cheese spread of goat milk enriched with phytosterols: Physicochemical, rheological, and microbiological characterization. **LWT - Food Science and Technology**, 157, 113103. doi: 10.1016/j.lwt.2021.113103
- Aplevicz, K. S., Mazo, J. Z., Ilha, E. C., Dinon, A. Z., & Sant'Anna, E. S. (2014). Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the Brazilian grape sourdough. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 50(2), 257-266. doi: 10.1590/S1984-82502014000200011
- Aprodu, I., Vasilean, I., Muntenită, C., Patrascu, L. (2019). Impact of broad beans addition on rheological and thermal properties of wheat flour based sourdoughs. **Food Chemistry**, 293, 520-528. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.007
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., and Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: a systematic review. **Trends in Food Science e Technology**, 108, 71–83. doi: 10.1016/J.TIFS.2020.12.008
- Association Of Official Analytical Chemists International - AOAC. **Official methods of analysis**. 20th ed. AOAC Internacional, Washington, 2016
- Caglar, N., Ermis, E., & Durak, M. Z. (2021). Spray-dried and freeze-dried sourdough powders: Properties and evaluation of their use in breadmaking. **Journal of Food Engineering**, 292, 110355

Călinoiu, L.F., Vodnar, D.C., (2018). Whole grains and phenolic acids: a review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. **Nutrients**, 10:11, 1615. doi: 10.1155/2019/3685264

Canella-Rawls, S. **Pão: Arte e ciência**. 3 ed. São Paulo: Editora Senac, 2009.

Catzeddu, P. **Sourdough Breads**. (2019). p. 177-188. In: Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention. Elsevier Inc, doi: 10.1016/B978-0-12-814639-2.00014-9

Comasio A., Verce M., Van Kerrebroeck, S., De Vuyst, L. (2020). Diverse microbial composition of sourdoughs from different origins. **Frontiers in Microbiology**, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.01212

Corsetti, A., Valmorri, S. (2011). Lactic Acid Bacteria | Lactobacillus spp.: Lactobacillus plantarum. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (2nd ed., pp. 111-118). doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00263-6

D'Angelo, L., Cicotello, J., Zago, M., Guglielmotti, D., Quiberoni, A., Suarez, V. (2017). Leuconostoc strains isolated from dairy products: Response against food stress conditions. **Food Microbiology**, 66, 28–39. doi: 10.1016/j.fm.2017.04.004

De Angelis, M., Gobbetti, M. (2011). Lactobacillus spp.: General characteristics. **In Encyclopedia of Dairy Sciences** (2nd ed., pp. 1479–1484).

De Vuyst, L., Comasio, A., Van Kerrebroeck, S. (2021). Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Critical**, 63:15, 2447-2479

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., and Leroy, F. (2017). **Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation**. *Advances In Applied Microbiology* 100, 49–160. doi: 10.1016/bs.aambs.2017.02.003

Di Cagno, R., Barbato, M., Di Camillo, C., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Giuliani, G., De Vincenzi, M., Gobbetti, M., Cucchiara, S. (2010). Gluten-free Sourdough Wheat Baked Goods Appear Safe for Young Celiac Patients: A Pilot Study. **The Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 51:6. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181f22ba4

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, 33(1), 1-10. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.003

Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., Gobbetti, M. (2002). Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(2), 623–633.

Domingos-Lopes, M. F. P.; et al. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, 63, 178-190

Dongdong, X., Xing, L., Yingqi, S., & Shuncheng, R. (2023). Effect of different producing methods on physicochemical and fermentation properties of refrigerated dough. **Journal of Food Composition and Analysis**, 119, 105268. doi: 10.1016/j.jfca.2023.105268

Ercolinl, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Stora, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R. (2013). Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. **Applied and Environmental Microbiology**, 79, 7827–7836

Fan, L., Ma, S., Li, L., & Huang, J. (2024). Fermentation biotechnology applied to wheat bran for the degradation of cell wall fiber and its potential health benefits: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 275 (Part 1), 133529. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133529

Fang, L., Wang, W., Dou, Z., et al., (2023). Effects of mixed fermentation of different lactic acid bacteria and yeast on phytic acid degradation and flavor compounds in sourdough. **LWT**, 174. doi: 10.1016/j.lwt.2023.114438

Fekri, A., Abedinzadeh, S., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S., e Savage, G. P. (2024). Considering sourdough from a biochemical, organoleptic, and nutritional perspective. **Journal of Food Composition and Analysis**, 125, 105853. doi: 10.1016/j.jfca.2023.105853

Filannino, P., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth. **Current Opinion in Biotechnology**, 49, 64-72. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.016

Francisco, P. R. M., Santos, D. (2017). **Climatologia do Estado da Paraíba**. 1. Edição, EDUFPG, Campina Grande-PB. 75 p.

Freiwald, A.; Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and indentificacion of bacteria by mass spectrometry. **Natural protocols**, 4, 732-742. doi: 10.1038/nprot.2009.37

Fu, W., & Wang, S., Xue, W. (2024). Mechanism of carbohydrate and protein conversion during sourdough fermentation: An analysis based on representative Chinese sourdough microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, 410, 110487. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110487

Fu, W., Wang, S., & Xue, W. (2024). Mechanism of carbohydrate and protein conversion during sourdough fermentation: An analysis based on representative Chinese sourdough microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, 410, 110487. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110487

Fu, W., Wang, S., & Xue, W. (2024). Mechanism of carbohydrate and protein conversion during sourdough fermentation: An analysis based on representative Chinese sourdough microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, 410, 110487. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110487

Galle, S., Schwab, C., Arendt, E. K., & Gänzle, M. G. (2011). Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. **Food Microbiology**, 28(3), 547-553. doi: 10.1016/j.fm.2010.11.006

Galli, V., Mazzoli, L., Luti, S., Venturi, M., Guerrini, S., Paoli, P., Vincenzini, M., Granchi, L., Pazzagli, L., (2018). Effect of selected strains of lactobacilli on the antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdough. **International Journal of Food Microbiology**. 286, 55–65. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.018

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, 2, 106–117. doi: 10.1016/j.cofs.2015.03.001

Gänzle, M. G., Ripari, V. (2016). Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. **International Journal of Food Microbiology**, 239, 19–25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.015

Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Luciano, W. A., de Albuquerque, T. M. R., de Oliveira Arcanjo, N. M., Madruga, M. S., et al., (2018). The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98,13, 5000-5010.

Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C., de Sousa Oliveira, K., Franco, O., et al., (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in microbiology**, 7, 1371.

Gaur, G., Gänzle, M. G. (2023). Conversion of (poly)phenolic compounds in food fermentations by lactic acid bacteria: Novel insights into metabolic pathways and functional metabolites. **Current Research in Food Science**, 6, 100448. doi: 10.1016/j.crf.2023.100448

Gerez, C. L., Font de Valdez, G., & Rollán, G. C. (2008). Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. **Letters in Applied Microbiology**, 47(5), 427–432. 10.1111/j.1472-765X.2008.02448.x

Gill, P., A., Zelm, M. C., Muir, J. G., Gibson, P. R. (2018). Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 48, 15-34. doi: 10.1111/apt.14689

Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2016). Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. **International journal of food microbiology**, 239, 3-18.

Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2014). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. **Food Microbiology**, 37, 30–40. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.012

Gopal, P., K. (2020). Lactic Acid Bacteria: An Overview. **Nutrition and Health**, The New Zealand Institute for Plant and Food Research, Palmerston North, ManawatuWhanganui, New Zealand. doi: 10.1016/B978-0-12-818766-1.00018-0

Governo da Paraíba. (2008). **Plano Estratégico de Desenvolvimento**. João Pessoa, PB

Graça, C., Edelmann, M., Raymundo, A., Sousa, I., Coda, R., Sontag-Strohm, T., & Huang, X. (2022). Yoghurt as a starter in sourdough fermentation to improve the technological and functional properties of sourdough-wheat bread. **Journal of Functional Foods**, 88, 104877. doi: 10.1016/j.jff.2021.104877

Greco, L., Gobbetti, M., Auricchio, R., Di Mase, R., Landolfo, F., Paparo, F., Di Cagno, R., De Angelis, M., Rizzello, C. G., Cassone, A., Terrone, G., Timpone, L., D'Aniello, M., Maglio, M., Troncone, R., Auricchio, S. (2020). Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour Hydrolyzed During Food Processing. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**.9, 24-29

Gu, Q., Li, Y., Lou, Y., Zhao, Y., Feng, X., Li, P., Laaksonen, O., Yang, B., Capozzi, V., Liu, S. (2024). Selecting autochthonous lactic acid bacteria for co-inoculation in Chinese bayberry wine production: Stress response, starter cultures application and volatilomic study. **Food Research International**, 178, 113976. doi: 10.1016/j.foodres.2024.113976

Gunduz, C. P. B., Agirman, B. Gaglio, R., Franciosi, E., et al.,(2022) Evaluation of the variations in chemical and microbiological properties of the sourdoughs produced with selected lactic acid bacteria strains during fermentation. **Food Chemistry: X**. 14: 100357. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100357

Khatkar, B. S., & Schofield, J. D. (2002b). Dynamic rheology of wheat flour dough. II. Assessment of dough strength and bread-making quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82(8), 823-826. doi: 10.1002/jsfa.1111

Khatkar, B. S., Schofield, J. D. (2002a). Dynamic rheology of wheat flour dough. II. Assessment of dough strength and bread-making quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82(8), 823-826. doi: 10.1002/jsfa.1111

Landis, E. A., Oliverio, A. M., McKenney, E. A., Nichols, L. M., Kfoury, N., Biango-Daniels, M., et al. (2021). The diversity and function of sourdough starter microbiomes. **eLife**, 10, 1–24. doi: 10.7554/ELIFE.61644

Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional

Italian sweet leavened baked goods. **International Journal of Food Microbiology**, 163(2–3), 71–79. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.010

Li, H., Hu, S., Fu, J. (2022). Effects of acetic acid bacteria in starter culture on the properties of sourdough and steamed bread. **Grain & Oil Science and Technology**, 5(1), 13-21. doi: 10.1016/j.gaost.2021.11.003

Li, M., Yue, Q., Liu, C., Zheng, X., Hong, J., Li, L., Bian, K. (2020). Effect of gliadin/glutenin ratio on pasting, thermal, and structural properties of wheat starch. **Journal of Cereal Science**, 93, 102973. doi: 10.1016/j.jcs.2020.102973

Li, S., Zhang, A., Zhao, W., Li, P., Si, X., Liu, J., & Yi, H. (2024). Physicochemical properties of whole grain foxtail millet sourdough and steamed bread quality: Co-fermentation of lactic acid bacteria and yeast in whole grain fermented foods. **Food Bioscience**, 103, 103581. doi: 10.1016/j.fbio.2024.103581

Lima, T. T. M., Hosken, B. de O., Lindner, J. D. D., Menezes, L. A. A., Pirozi, M. R., & Martin, J. G. P. (2023). How to deliver sourdough with appropriate characteristics for the bakery industry? The answer may be provided by microbiota. **Food Bioscience**, 56, 103072. doi: 10.1016/j.fbio.2023.103072

Lima, M. S., Dantas, B. S., Carvalho, A. J. B. A., Pereira, G. E., Pimentel, T. C., e Magnani, M. (2024). A novel method for ultra-fast determination of phenolics with performance comparable to UPLC/DAD: Method development and validation on analysis of seedless table grapes. **Journal of Food Composition and Analysis**, 134. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106511>

Liu, A., Jia, Y., Zhao, L., Gao, Y., Liu, G., Chen, Y., Zhao, G., Xu, L., Shen, L., Liu, Y., Chen, H., Wu, W., Li, C., & Liu, S. (2018). Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics. **LWT**, 95, 17–22. doi: 10.1016/j.lwt.2018.04.061

Liu, J., Zhao, W., Zhang, A., Li, P., Liu, J. (2024). Dynamics and functionalities of bacterial community during foxtail millet dough fermentation by metagenomic analysis. **Journal of Future Foods**, 4(4), 343-352. doi: 10.1016/j.jfutfo.2023.11.006

Liu, X., Zhou, M., Jiabin, C., Luo, Y., Ye, F., Jiao, S., Hu, X., Zhang, J., & Lü, X. (2018). Bacterial diversity in traditional sourdough from different regions in China. **LWT**, 96, 251–259. doi: 10.1016/j.lwt.2018.05.023

Luti, S., Mazzoli, L., Ramazzotti, M., Galli, V., et al, (2020). Antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdoughs containing selected Lactobacilli strains are retained in breads. **Food Chemistry**, 322. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126710

Mandile, R., Picascia, S., Parrella, C., Camarca, A., Gobbetti, M., Greco, L., et al. (2017). Lack of immunogenicity of hydrolysed wheat flour in patients with coeliac disease after a short-term oral challenge. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 46, 440–446. doi: 10.1111/apt.14175

- Menezes, L. A. A., Savo Sardar, M. L., Duarte, R. T. D., Mazzon, R. R., Nevia, E., Gatti, M., & De Dea Lindner, J. (2020). Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil. **Food Microbiology**, 85, 103302. doi: 10.1016/j.fm.2019.103302
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010). Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. **Food Microbiology**, 27,7, 897-908.
- Mironeasa, S., Codina, G. G. (2019). Dough rheological behavior and microstructure characterization of composite dough with wheat and tomato seed flours. **Foods**, 8(12), 626. doi: 10.3390/foods8120626
- Montemurro, M., Celano, G., De Angelis, M., Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Pontonio, E. (2020). Selection of non-*Lactobacillus* strains to be used as starters for sourdough fermentation. **Food Microbiology**, 90, 103491
- Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria. **Encyclopedia of Food and Health**. Centro de Referencia para Lactobacilos, San Miguel de Tucumán, Argentina. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1
- Munch-Andersen, C. B., Porcellato, D., Devold, T. G., Østlie, H. M. (2024). Isolation, identification, and stability of sourdough microbiota from spontaneously fermented Norwegian legumes. **International Journal of Food Microbiology**, 410, 110505. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110505
- Păcularu-Burada, B., Georgescu, L. A., and Bahrim, G. E. (2020). Current approaches in sourdough production with valuable characteristics for technological and functional applications. The annals of the university Dunarea de Jos of Galati. **Fascicle VI Food Technology**, 44, 132–148. doi: 10.35219/foodtechnology.2020.1.08
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Georgalaki, M., Alexandraki, V., Kazou, M., Anastasiou, R., et al. (2019). **Sourdough Bread**. Innovations in Traditional Foods, 127–158. doi: 10.1016/B978-0-12-814887-7.00006-X
- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. **Process Biochemistry**, 41,12, 2429–2433. doi: 10.1016/j.procbio.2006.07.001
- Paucean, A., Șerban, L. R., Chiș, M. S., Mureșan, V., Pușcaș, A., Man, S. M., Pop, C. R., Socaci, S. A., Igual, M., Ranga, F., Alexa, E., Berbecea, A., & Pop, A. (2024). Nutritional composition, in vitro carbohydrates digestibility, textural and sensory characteristics of bread as affected by ancient wheat flour type and sourdough fermentation time. **Food Chemistry: X**, 22, 101298. doi: 10.1016/j.fochx.2024.101298

Pejcz, E., Lachowicz-Wiśniewska, S., Nowicka, P., Wojciechowicz-Budzisz, A., & Harasym, J. (2024). Enhancing antioxidant activity and modulating FODMAPs levels in inoculated sourdough rye bread. **LWT**, 197, 115905. doi: 10.1016/j.lwt.2024.115905

Pérez-Alvarado, O., Zepeda-Hernández, A., Garcia-Amezquita, L.E., Requena T., Vinderola, G., García-Cayuela T. (2022) Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits. **Frontiers in Microbiology**. 13,969460. doi: 10.3389/fmicb.2022.969460

Pittet, V., Morrow, K., Ziola, B. (2011). Ethanol tolerance of lactic acid bacteria, including relevance of the exopolysaccharide gene Gtf. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 69(1), 57-61. 10.1094/ASBCJ-2011-0124-01

Pontonio, E., Nionelli, L., Curiel, J.A., Sadeghi, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Rizzello, C.G. (2015). Iranian wheat flours from rural and industrial mills: exploitation of the chemical and technology features, and selection of autochthonous sourdough starters for making breads. **Food Microbiology**, 47, 99–110. doi: 10.1016/j.fm.2014.10.011

Pradal, I., González-Alonso, V., Wardhana, Y. R., Cnockaert, M., Wieme, A. D., Vandamme, P., De Vuyst, L. (2024). Various cold storage-backslopping cycles show the robustness of *Limosilactobacillus fermentum* IMDO 130101 as starter culture for Type 3 sourdough production. **International Journal of Food Microbiology**, 411, 110522. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110522

Raimondi, S., Amaretti, A., Rossi, M., Fall, P. A., Tabanelli, G., Gardini, F., & Montanari, C. (2017). Evolution of microbial community and chemical properties of a sourdough during the production of Colomba, an Italian sweet leavened baked product. **LWT - Food Science and Technology**, 86, 31–39.

Reale, A., Zotta, T., Ianniello, R. G., Mamone, G., Di Renzo, T. (2020). Selection criteria of lactic acid bacteria to be used as starter for sweet and salty leavened baked products. **LWT**, 133. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110092

Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., Parente, E., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2015). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, 60, 721–728. doi: 10.1016/j.lwt.2014.11.046

Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R.-U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. **BMC Microbiology**, 19, 253. doi: 10.1186/s12866-019-1626-0

Rizzello, C. G.; Portincasa, P.; Montemurro, M.; Di Palo, D. M.; Lorusso, M.; Angelis, M.; Bonfrate, L.; Genot, B.; Gobbetti, M. (2019) Sourdough Fermented Breads are More Digestible than Those Started with Baker's Yeast Alone: An In

Vivo Challenge Dissecting Distinct Gastrointestinal Responses. **Nutrients**, 11, 2954

Rodrigues, N. P. A., Garcia, E. F., & de Souza, E. L. (2021). Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, 52(4), 2257–2269. doi: 10.1007/s42770-021-00543-x

Rodríguez, L. G. R., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. **Frontiers in Microbiology**, 10, Article 1091. doi: 10.3389/fmicb.2019.01091

Rossell, C. M. (2016). Bread: Chemistry of Baking. **Encyclopedia of Food and Health**. Institute of Agrochemistry and Food Technology, Valencia, Spain. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00088-X

Sanmartín, G., Sanchez-Adrià, I. E., Prieto, J. A., Estruch, F., & Randez, F. (2024). Bioprospecting of sourdough microbial species from artisan bakeries in the city of Valencia. **Food Microbiology**, 120, 104474. doi: 10.1016/j.fm.2024.104474

Santos, J. G., Souza, E. L., Couto, M. V. de S., Rodrigues, T. Z., Medeiros, A. R. S. de, Cordeiro, A. M. T. M., Lima, M. dos S., Oliveira, M. E. G. de, Lima, M. da C., Araújo, N. P. R. de, Gonçalves, I. C. D., & Garcia, E. F. (2024). Exploring the effects of freeze-dried sourdoughs with *Lactiplantibacillus pentosus* 129 and *Limosilactobacillus fermentum* 139 on the quality of long-fermentation bread. **Microorganisms**, 12(6), 1199. doi: 10.3390/microorganisms12061199

Sevgili, A., Can, C. Ceyhan, D. I., Erkmen, O. (2023). Molecular identification of LAB and yeasts from traditional sourdoughs and their impacts on the sourdough bread quality characteristics. **Current Research in Food Science**, 6: 100479. doi: 10.1016/j.crfs.2023.100479

Sidari, R., Martorana, A., Zappia, C., et al (2020). Persistence and Effect of a Multistrain Starter Culture on Antioxidant and Rheological Properties of Novel Wheat Sourdoughs and Bread. **Foods**, 9. doi: 10.3390/foods9091258

Siepmann, F.B., De Almeida, B., S., Waszczynskyja, N., Spier, M., N. (2019). Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds Evolution on type II sourdough and wheat bread. **LWT**. 108, 199–206. doi: 10.1016/j.lwt.2019.03.065

Siepmann, F.B., Ripari, V., Waszczynskyj, N., Spier, M.R., (2018). Overview of sourdough technology: from production to marketing. **Food Bioprocess Technology**, 11, 242–270. doi: 10.1007/s11947-017-1968-2

Silva Júnior, J. C., Magnani, M., Almeida da Costa, W. K., Madruga, M. S., Olegário, L. S., Borges, G. S. C., Dantas, A. M., Lima, M. S., de Lima, L. C., de Lima Brito, I., Cordeiro, A. M. T. M. (2021). Traditional and flavored kombuchas

with pitanga and umbu-cajá pulps: Chemical properties, antioxidants, and bioactive compounds. **Food Bioscience**, 44, 101380. doi: 10.1016/j.fbio.2021.101380

Stefanello, R. F., Machado, A. A. R., Cavalheiro, C. P., Santos, M. L. B., Nabeshimae, E. H.; Copettia, M. V.; Friesa, L. L. M. (2018) Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. **LWT**, 89, 510–517. doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.011

Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Garcia, A. de O., Heck, R. T., Garcia, M. V., Friese, L. L. M., & Copetti, M. V. (2019). Stability, sensory attributes and acceptance of panettones elaborated with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 and *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533. **Food Research International**, 116, 973–984.

Struyf, N., Van der Maelen, E., Hemdane, S., Verspreet, J., Verstrepen, K. J., & Courtin, C. M. (2017). Bread dough and baker's yeast: An uplifting synergy. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 16(5), 850–867. doi: /10.1111/1541-4337.12282

Sun, X., Bu, Z., Qiao, B., Drawbridge, P., Fang, Y. The effects of wheat cultivar, flour particle size and bran content on the rheology and microstructure of dough and the texture of whole wheat breads and noodles. **Food Chemistry**, 410. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135447

Suo, B., Chen, X., Wang, Y. (2020). Recent research advances of lactic acid bacteria in sourdough: Origin, diversity, and function. **Current Opinion in Food Science**. doi: 10.1016/j.cofs.2020.09.007

Thanikachalam, P. V., Ramamurthy, S., Kumar, A., Gupta, M., Bansal, G. (2020). Protective role of epigallocatechin gallate, a dietary antioxidant against oxidative stress in various diseases. **Pathology: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants** (pp. 213-223). doi: 10.1016/B978-0-12-815972-9.00021-4

Tomić, J., Dapčević-Hadnađev, T., Škrobot, D., Maravić, N., Popović, N., Stevanović, D., Hadnađev, M. (2023). Spontaneously fermented ancient wheat sourdoughs in breadmaking: Impact of flour quality on sourdough and bread physico-chemical properties. **LWT**, 175, 114482. doi: 10.1016/j.lwt.2023.114482

Van Bockstaele, F., De Leyn, I., Eeckhout, M., & Dewettinck, K. (2008). Rheological properties of wheat flour dough and their relationship with bread volume. II. Dynamic oscillation measurements. **Cereal Chemistry**, 85(6), 762–768.

Vela, A. J., Villanueva, M., & Ronda, F. (2023). Physical modification caused by acoustic cavitation improves rice flour bread-making performance. **LWT**, 183, 114950. doi: 10.1016/j.lwt.2023.114950

Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., Moschetti, G., Settanni, L. (2015). Codominance of *Lactobacillus plantarum*

and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, 51, .57-68

Vilanova, M. G., Díez, C., Quirino, B., & Álavan, J. I. (2015). Microbiota distribution in sourdough: Influence of high sucrose resistant strains. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, 2(1), 98–102.

Viola E., Garofalo, G., Busetta, G., et al.,. (2024). election of lactic acid bacteria from home-made sourdoughs for resistance to the main almond skin polyphenols. **Journal of Agriculture and Food Research**. 15, 10095. doi: 10.1016/j.jafr.2023.100951

Winter, H. H. (2016). Gel point. In **Encyclopedia of Polymer Science and Technology** (pp. 1-15). John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/0471440264.pst476.pub2

Winter, H. H., & Chambon, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. **Journal of Rheology**, 30(2), 367–382.

Yildirim-Mavis, C., Yilmaz, M. T., Dertli, E., Arici, M., Ozmen, D. (2019). Non-linear rheological (LAOS) behavior of sourdough-based dough. **Food Hydrocolloids**, 96, 481-492. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.05.055

Yildiz, O., Meral, R., & Dogan, I. S. (2012). Determination of stickiness values of different flour combinations. **International Journal of Food Engineering**, 8(3). doi: 10.1515/1556-3758.2412

Yu, W., Xu, D., Li, D., Guo, L., Su, X., Zhang, Y., Wu, F., & Xu, X. (2019). Effect of pigskin-originated gelatin on properties of wheat flour dough and bread. **Food Hydrocolloids**, 94, 183–190. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.02.017

Zhang, C. Y., Lin, X., Feng, B., Liu, X. E., Bai, X. W., Xu, J., Pi, L., Xiao, D. G. (2016). Enhanced leavening properties of baker's yeast by reducing sucrase activity in sweet dough. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100(15), 6811–6821. doi: 10.1007/s00253-016-7449-0

Zhang, C., Brandt, M. J., Schwab, C., & Gänzle, M. G. (2010). Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. **Food Microbiology**, 27(3), 390-395. doi: 10.1016/j.fm.2009.11.019

Zhang, J., Yao, Y., Li, J., Ju, X., Wang, L. (2023). Impact of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria on the chemical, rheological properties of buckwheat sourdough and the quality of buckwheat bread. **Food Chemistry**, 425, 136369. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136369

APÊNDICE A

Tabelas e Figuras

Tabela 01 - Características morfológicas e seleção dos isolados dos fermentos naturais de diferentes regiões climáticas da Paraíba

Amostra	Cidades	Característica da colônia	Característica microscópica
26	João Pessoa (Úmida)	Pequeno, centro branco e halo leitoso	Bactéria G(+)
27	João Pessoa (Úmida)	Pequeno, centro branco e halo leitoso	Bactéria G(+)
32	João Pessoa (Úmida)	Grande, halo leitoso e centro branco	Bactéria G(+)
34	João Pessoa (Úmida)	Centro branco irregular, halo transparente irregular	Bactéria G(+)
39	João Pessoa (Úmida)	Muito grande, leitosa, irregular e borda irregular	Bactéria G(+)
41	João Pessoa (Úmida)	Média, leitosa e redonda	Bactéria G(+)
46	João Pessoa (Úmida)	Centro pequeno e branco, halo grande e transparente	Bactéria G(+)
47	João Pessoa (Úmida)	Muito grande, amarela e redonda	Bactéria G(+)
48	João Pessoa (Úmida)	Muito grande, amarela e redonda	Bactéria G(+)
53	João Pessoa (Úmida)	Médio, leitosa, bege, irregular com bico	Bactéria G(+)
55	João Pessoa (Úmida)	Médio, leitosa, bege, irregular com bico	Bactéria G(+)
66	João Pessoa (Úmida)	Bem pequena, transparente, redonda e leitosa	Bactéria G(+)
79	Solânea (Subúmida)	Redonda, bege, leitosa, pequena, brilhante	Bactéria G(+)
80	Solânea (Subúmida)	Redonda, bege, leitosa, pequena, brilhante	Bactéria G(+)
81	Solânea (Subúmida)	Redonda, bege, leitosa, pequena, brilhante	Bactéria G(+)
82	Solânea (Subúmida)	Disforme, branca, translúcida, grande	Bactéria G(+)
83	Solânea (Subúmida)	Disforme, branca, translúcida, grande	Bactéria G(+)
84	Solânea (Subúmida)	Disforme, branca, translúcida, grande	Bactéria G(+)
113	Cajazeiras (Semiárida)	Disforme, áspera, translúcida	Bactéria G(+)
114	Cajazeiras (Semiárida)	Disforme, áspera, translúcida	Bactéria G(+)
121	Cajazeiras (Semiárida)	Redonda, círculos brancos, bordas transparentes	Bactéria G(+)
122	Cajazeiras (Semiárida)	Pequena, branca, translúcida, brilhante	Bactéria G(+)
123	Cajazeiras (Semiárida)	Pequena, branca, translúcida, brilhante	Bactéria G(+)
124	Cajazeiras (Semiárida)	Redonda, branca, pequena, brilhante, achatada	Bactéria G(+)

Tabela 02- Produção de EPS (mg), acidificação e crescimento celular (OD_{595nm}), número de células viáveis (log UFC/g) e atividade proteolítica de BAL isoladas de fermentos naturais do estado da Paraíba

Cepas	Acidificação (pH)					EPS (mg)	Atividade proteolítica	BAL (UFC/g)	Crescimento (OD_{595nm})				
	0h	2h	4h	6h	18h				0h	2h	4h	6h	18h
26	7,60±0,02	6,87±0,03	6,03±0,03	5,13±0,04	4,10±0,04	0,8	+	8,78±0,04	0	1,00±0,02	0,06	2,39±0,01	3,05±0,02
27	7,61±0,03	7,56±0,04	7,56±0,04	7,50±0,02	7,42±0,03	0,1	+	8,61±0,01	0	0,31±0,02	0,03	0,35±0,01	0,43±0,01
32	7,42±0,02	7,29±0,02	7,12±0,01	7,11±0,03	4,91±0,03	1,2	+	8,50±0,01	0	0,07±0,01	0,01	0,49±0,01	0,52±0,03
34	7,40±0,02	6,71±0,04	6,41±0,03	6,31±0,01	4,22±0,01	4,7	+	8,37±0,00	0	0,71±0,01	0,02	1,22±0,01	1,72±0,03
39	7,41±0,02	7,39±0,04	7,20±0,02	7,17±0,01	4,91±0,01	5,7	+	8,50±0,02	0	0,31±0,04	0,04	0,45±0,03	0,52±0,02
41	7,23±0,01	7,11±0,01	6,69±0,01	5,72±0,02	4,19±0,02	0,9	+	8,83±0,01	0	0,09±0,01	0,01	0,71±0,01	1,05±0,01
46	7,23±0,01	6,71±0,01	5,59±0,01	4,97±0,02	4,32±0,02	0,2	+	8,76±0,02	0	0,82±0,02	0,04	1,65±0,02	2,48±0,03
47	7,72±0,01	7,74±0,01	7,81±0,01	7,81±0,01	6,22±0,02	0,2	+	6,44±0,06	0	0,01±0,01	0,03	1,00±0,01	1,99±0,01
48	7,73±0,01	7,75±0,02	7,86±0,01	7,89±0,02	7,94±0,01	0,1	+	8,83±0,01	0	0,01±0,01	0,01	0,12±0,01	0,12±0,01
53	7,50±0,01	6,96±0,02	6,97±0,01	6,94±0,02	4,12±0,01	3,6	+	8,72±0,00	0	0,04±0,01	0,01	0,13±0,02	0,29±0,01
55	7,31±0,01	6,58±0,02	5,30±0,03	4,51±0,01	4,00±0,01	0,5	+	8,60±0,01	0	0,97±0,03	0,02	1,89±0,03	2,84±0,01
66	7,69±0,01	7,63±0,01	6,98±0,01	6,75±0,02	4,42±0,02	1,5	+	8,64±0,01	0	0,45±0,01	0,24	0,74±0,01	0,93±0,02
79	6,85±0,02	5,68±0,02	4,73±0,03	4,48±0,02	4,08±0,01	1,8	+	8,81±0,04	0	0,43±0,01	0,02	0,87±0,03	1,30±0,03
80	6,87±0,03	5,53±0,01	4,71±0,01	4,49±0,02	4,03±0,01	2,4	+	8,32±0,02	0	0,52±0,01	0,01	1,04±0,02	1,60±0,03
81	7,26±0,03	5,81±0,02	4,68±0,02	4,37±0,02	4,05±0,02	3,2	+	8,69±0,01	0	0,53±0,02	0,01	1,02±0,02	1,59±0,02
82	7,21±0,02	7,25±0,02	7,47±0,02	7,56±0,01	7,60±0,02	0,2	+	8,66±0,03	0	0,54±0,01	0,03	0,65±0,02	0,72±0,02
83	7,21±0,02	6,84±0,01	6,20±0,02	5,27±0,02	4,21±0,04	1,4	+	8,89±0,03	0	1,28±0,03	0,01	2,51±0,04	3,74±0,04
84	7,12±0,01	7,13±0,01	7,21±0,01	7,35±0,02	6,65±0,01	1,6	+	8,47±0,04	0	0,14±0,01	0,03	0,51±0,01	0,64±0,01
113	7,21±0,02	6,37±0,01	5,02±0,03	4,48±0,04	4,00±0,03	1,7	+	8,72±0,01	0	1,25±0,03	0,03	2,48±0,02	3,61±0,02
114	6,97±0,02	6,66±0,02	6,49±0,02	6,33±0,02	4,15±0,03	0,5	+	7,39±0,02	0	0,24±0,03	0,02	0,37±0,02	0,83±0,04
121	6,95±0,02	6,42±0,03	6,16±0,03	5,96±0,02	4,87±0,02	0,4	+	8,70±0,01	0	0,26±0,04	0,05	0,61±0,01	0,82±0,02
122	7,12±0,01	6,66±0,02	6,38±0,01	6,21±0,02	4,73±0,02	0,1	+	8,00±0,06	0	0,47±0,01	0,05	0,69±0,02	1,38±0,01
123	7,19±0,01	7,12±0,02	6,71±0,02	6,35±0,02	4,54±0,01	0,8	+	8,73±0,02	0	0,48±0,01	0,02	1,03±0,03	1,58±0,03
124	7,13±0,02	6,57±0,05	5,15±0,02	4,71±0,03	4,02±0,01	0,1	+	8,69±0,05	0	1,19±0,01	0,02	2,39±0,02	3,58±0,02

Tabela 03. Testes de tolerância a NaCl (OD_{595nm}), em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas, isoladas de fermentos naturais do estado da Paraíba.

Cepas	2%		4%		6%		Controle	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
32	1,51	7,31	0,51	6,76	0,11	4,90	1,67	4,99
34	0,99	6,92	0,31	8,40	0,05	4,82	1,53	6,32
39	1,15	7,76	0,32	7,17	0,05	4,80	1,67	7,30
41	1,18	7,76	0,49	6,65	0,15	5,92	1,59	8,10
47	1,22	11,81	0,45	11,90	0,11	11,70	1,77	11,91
53	1,19	12,18	0,55	11,64	0,10	9,87	1,77	12,76
66	0,68	9,97	0,22	8,12	0,01	5,68	1,04	8,83
79	0,50	11,39	0,22	11,70	0,06	9,16	0,87	11,73
80	1,25	10,15	0,39	10,87	0,05	8,01	1,58	10,19
81	1,94	12,75	0,84	12,65	0,00	8,64	2,19	12,18
82	0,56	6,29	0,26	5,03	0,00	3,65	0,59	7,34
83	0,53	10,15	0,36	9,30	0,03	5,25	0,69	10,79
84	0,71	10,99	0,31	10,35	0,03	8,08	0,72	11,12
113	2,01	10,62	0,64	10,07	0,06	8,49	2,61	10,99
114	1,82	10,20	0,66	9,51	0,06	6,55	1,91	10,63
121	1,71	10,13	0,52	11,38	0,00	5,64	1,81	9,45
123	1,10	9,73	0,17	10,57	0,04	4,60	1,30	7,75

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Tabela 04. Testes de tolerância à sacarose (OD_{595nm}), em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas, isoladas de fermentos naturais do estado da Paraíba.

Cepas	20%		30%		Controle	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h
32	0,85	7,51	0,65	6,73	1,82	5,20
34	0,53	7,48	0,18	6,88	1,22	6,97
39	0,93	6,48	0,55	5,84	1,99	5,59
41	0,34	6,53	0,18	6,97	1,04	9,01
47	0,39	10,05	0,23	9,23	1,44	10,08
53	0,21	11,69	0,11	11,02	0,58	11,68
66	0,33	9,06	0,15	7,71	0,67	6,25
79	0,45	7,68	0,24	8,57	1,27	9,96
80	0,09	9,97	0,04	9,19	0,15	9,47
81	0,12	12,01	0,06	10,27	0,28	11,56
82	0,60	5,89	0,28	5,58	0,83	7,99
83	0,42	8,48	0,21	7,76	0,76	10,30
84	0,43	4,30	0,22	4,01	0,70	6,45
113	0,47	6,91	0,27	6,78	1,42	6,74
114	0,53	5,66	0,32	6,02	1,12	6,26
121	0,41	5,59	0,24	6,23	1,00	5,23
123	0,11	4,82	0,12	5,56	0,20	4,87

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Tabela 05. Testes de tolerância a diferentes pHs (OD_{595nm}), após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas, isoladas de fermentos naturais do estado da Paraíba.

Cepas	3,5%		4,5%		5,5%		Controle	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
32	0,10	0,18	0,30	2,53	1,09	2,90	1,36	4,54
34	0,19	0,31	0,36	3,32	1,11	3,42	1,25	5,94
39	0,18	0,23	0,43	3,31	1,32	4,81	1,54	6,36
41	0,22	0,39	0,55	4,65	1,85	6,52	2,05	6,56
47	0,12	5,73	0,41	6,05	1,40	9,11	1,60	8,53
53	0,17	1,29	0,80	7,83	2,18	9,87	2,55	8,74
66	0,14	0,30	0,50	4,80	1,23	5,15	1,58	6,19
79	0,10	0,10	0,21	5,15	0,57	7,74	0,59	7,70
80	0,11	0,11	0,25	4,87	0,73	7,25	0,83	8,91
81	0,08	0,33	0,47	5,37	0,97	7,87	1,61	12,03
82	0,07	0,22	0,29	2,82	0,46	4,76	0,73	6,28
83	0,11	0,31	0,34	3,49	0,56	6,55	0,74	8,08
84	0,10	0,38	0,33	3,87	0,53	6,48	0,81	7,93
113	0,07	0,40	0,59	6,48	1,52	7,77	2,73	7,76
114	0,09	0,21	0,57	2,68	1,05	2,72	1,92	4,19
121	0,10	0,40	0,58	4,16	1,24	5,52	1,89	4,63
123	0,09	0,18	0,70	2,79	1,23	3,37	1,86	4,10

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Tabela 06. Testes de tolerância a etanol (OD_{595nm}), em diferentes concentrações após 6h e 24h de incubação de BAL selecionadas, isoladas de fermentos naturais do estado da Paraíba.

Cepas	2%		4%		6%		Controle	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
32	0,98	5,27	0,68	5,53	0,49	4,16	1,53	4,69
34	1,92	5,32	1,41	6,42	1,00	4,67	2,49	6,41
39	0,09	0,17	0,02	0,06	0,02	0,05	0,01	3,42
41	1,91	7,71	1,00	7,44	0,65	7,21	2,26	9,30
47	2,13	9,38	1,39	8,84	1,01	9,03	2,18	10,34
53	0,70	10,82	0,92	11,35	0,31	9,12	0,59	8,54
66	0,88	7,41	0,21	5,88	0,10	3,72	1,03	7,78
79	1,66	7,22	0,95	8,39	0,67	8,79	1,85	8,67
80	0,22	9,62	0,25	10,17	0,10	7,97	0,34	9,09
81	0,40	11,00	0,47	11,09	0,17	8,75	0,47	10,81
82	1,00	10,22	0,62	9,84	0,42	9,71	1,20	10,58
83	0,81	10,40	0,43	9,92	0,27	10,38	0,88	11,59
84	0,68	8,61	0,40	6,36	0,26	3,89	0,66	9,08
113	1,01	8,18	0,49	7,34	0,33	7,04	1,59	9,47
114	1,11	6,25	0,03	4,14	0,01	2,98	0,02	7,15
121	1,12	5,82	0,43	5,26	0,28	3,69	1,26	6,20
123	0,24	7,53	0,07	6,12	0,06	4,30	0,35	9,30

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Figura 01. Análise dos Componentes Principais das cepas BAL em Função dos Testes de Tolerância

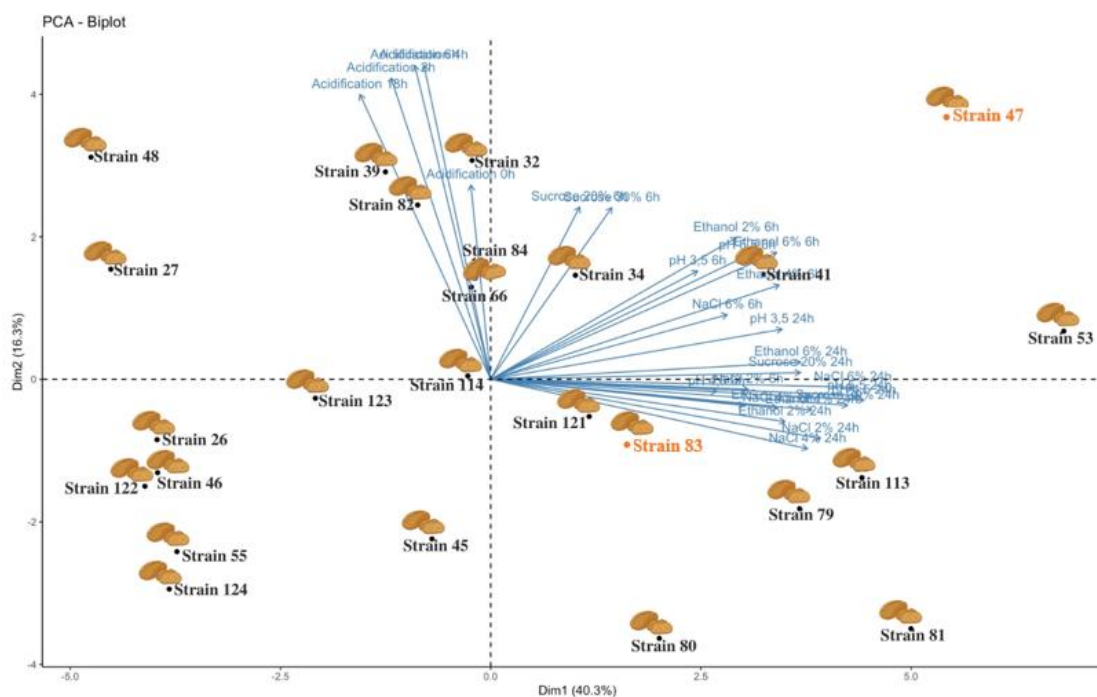
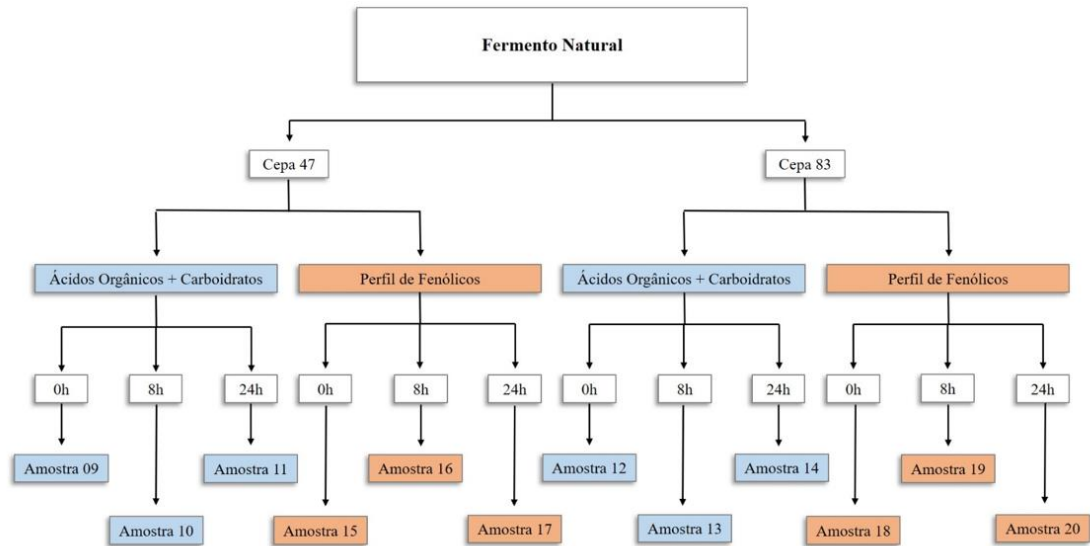


Tabela 07. Identificação de BAL de diferentes regiões climáticas da Paraíba por espectrometria de massa MALDI-TOF

Cepas	Amostra	Identificação
26	João Pessoa (Úmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
27	João Pessoa (Úmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
32	João Pessoa (Úmida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
34	João Pessoa (Úmida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
39	João Pessoa (Úmida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
41	João Pessoa (Úmida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
46	João Pessoa (Úmida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
47	João Pessoa (Úmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
48	João Pessoa (Úmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
53	João Pessoa (Úmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
55	João Pessoa (Úmida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
66	João Pessoa (Úmida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
79	Solânea (Subúmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
80	Solânea (Subúmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
81	Solânea (Subúmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
82	Solânea (Subúmida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
83	Solânea (Subúmida)	<i>Levilactobacillus brevis</i>
84	Solânea (Subúmida)	<i>Levilactobacillus brevis</i>
113	Cajazeiras (Semiárida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
114	Cajazeiras (Semiárida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
121	Cajazeiras (Semiárida)	<i>Levilactobacillus brevis</i>
122	Cajazeiras (Semiárida)	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
123	Cajazeiras (Semiárida)	<i>Levilactobacillus brevis</i>
124	Cajazeiras (Semiárida)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

APÊNDICE B

Imagem 02 – Fluxograma das amostras de Fermento Natural – Cromatogramas



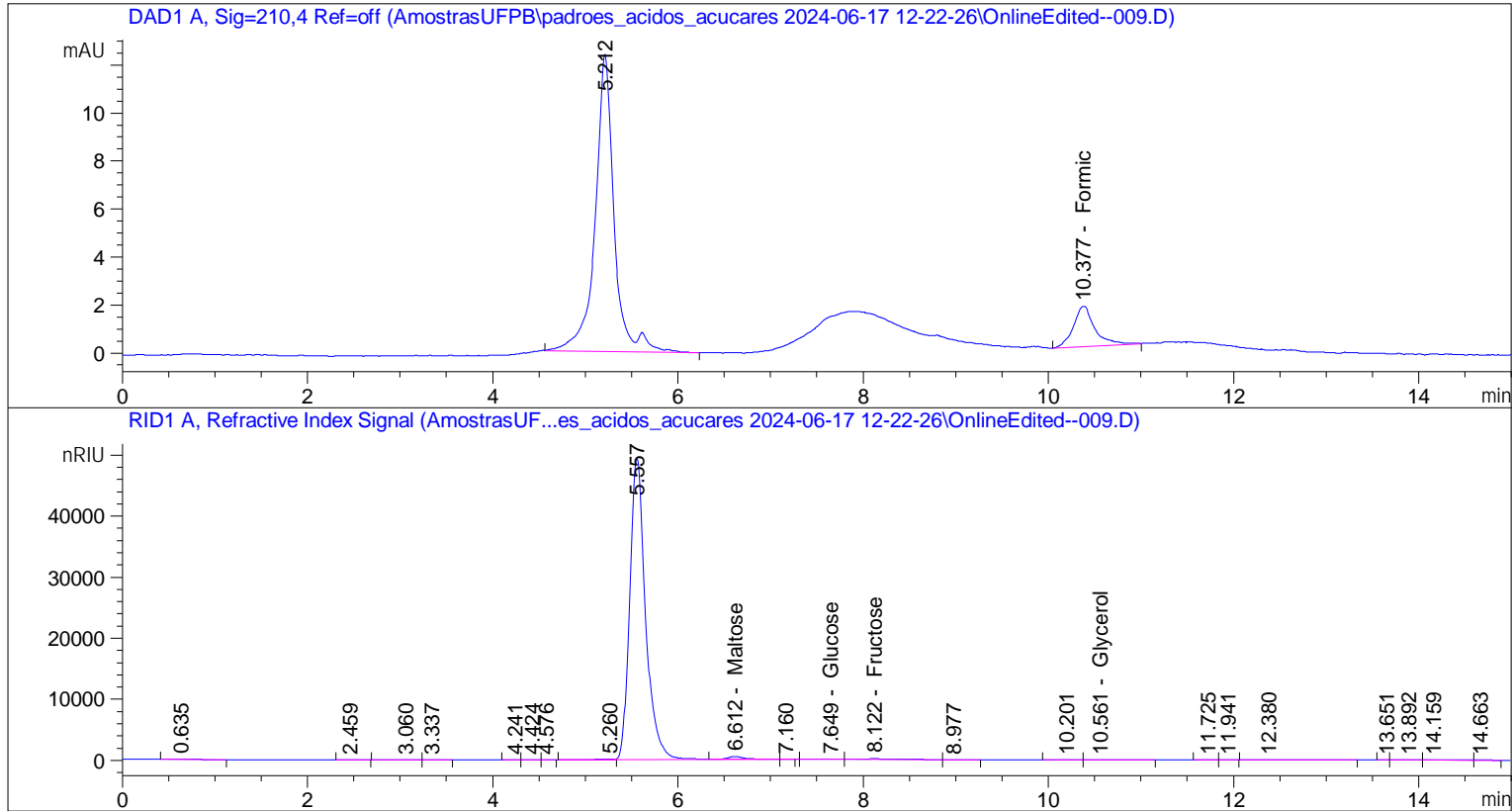
Fonte: Autoria própria (2024)

Sample Name: 9

```

=====
Acq. Operator   : Marcos Santos                Seq. Line :    9
Acq. Instrument : HPLC-DAD-RID                 Location  :    9
Injection Date  : 6/17/2024 2:52:26 PM        Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucares 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M
Last changed    : 6/17/2024 2:37:32 PM by Marcos Santos
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucares 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M (Sequence Method)
Last changed    : 6/17/2024 5:50:57 PM by Marcos Santos
                  (modified after Loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/17/2024 5:50:56 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=210,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.660	-	-	-	-	-	Citric
6.986	-	-	-	-	-	Tartaric
7.690	-	-	-	-	-	Malic
9.156	-	-	-	-	-	Succinic
9.944	-	-	-	-	-	Lactic
10.377	BB	27.05752	8.24303e-4	2.23036e-2	-	Formic

Sample Name: 9

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
11.510		-	-	-		Acetic
13.594		-	-	-		Propionic
16.624		-	-	-		Butyric

Totals : 2.23036e-2

Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.612	VVE	6118.11768	0.00000	0.00000		Maltose
7.649	BV	984.13849	8.08662e-6	7.95836e-3		Glucose
8.122	VB	2720.92236	2.08818e-5	5.68177e-2		Fructose
8.590		-	-	-		Rhamnose
10.561	VB	409.65244	1.92260e-5	7.87597e-3		Glycerol
16.824		-	-	-		Ethanol

Totals : 7.26520e-2

4 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

Warning : Elution order of calibrated compounds may have changed

Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Maltose)

```

=====
*** End of Report ***

```

Sample Name: 10

```

=====
Acq. Operator   : Marcos Santos                Seq. Line :   10
Acq. Instrument : HPLC-DAD-RID                 Location  :   10
Injection Date  : 6/17/2024 3:08:25 PM        Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.000 µl

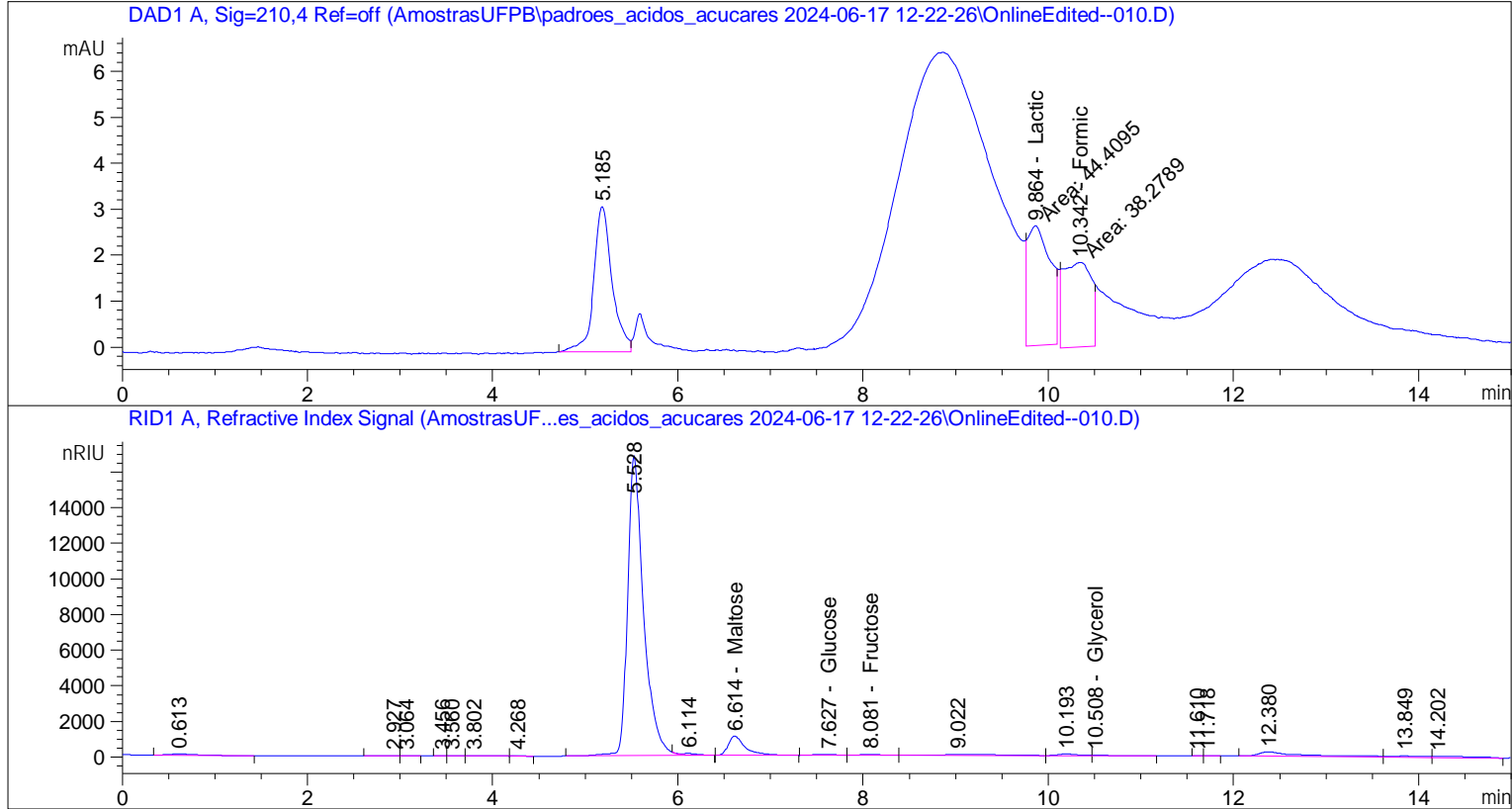
Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_aci dos_acucare 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M

Last changed    : 6/17/2024 2:37:32 PM by Marcos Santos

Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_aci dos_acucare 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M (Sequence Method)

Last changed    : 6/17/2024 5:50:57 PM by Marcos Santos
                  (modified after loading)

Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/17/2024 5:50:56 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=210,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.660	-	-	-	-	-	Citric
6.986	-	-	-	-	-	Tartaric
7.690	-	-	-	-	-	Malic
9.156	-	-	-	-	-	Succinic
9.864	MM T	44.40947	2.20435e-3	9.78939e-2	-	Lactic

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
10.342	MM T	38.27892	7.89359e-4	3.02158e-2		Formic
11.510		-	-	-		Acetic
13.594		-	-	-		Propionic
16.624		-	-	-		Butyric
Totals :				1.28110e-1		

Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.614	BB	1.38879e4	6.55653e-7	9.10564e-3		Maltose
7.627	BV	976.86780	8.06973e-6	7.88306e-3		Glucose
8.081	VB	934.77362	4.47923e-5	4.18707e-2		Fructose
8.590		-	-	-		Rhamnose
10.508	VB	394.79254	1.96017e-5	7.73860e-3		Glycerol
16.824		-	-	-		Ethanol
Totals :				6.65979e-2		

3 Warnings or Errors :

- Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
- Warning : Calibrated compound(s) not found
- Warning : Elution order of calibrated compounds may have changed

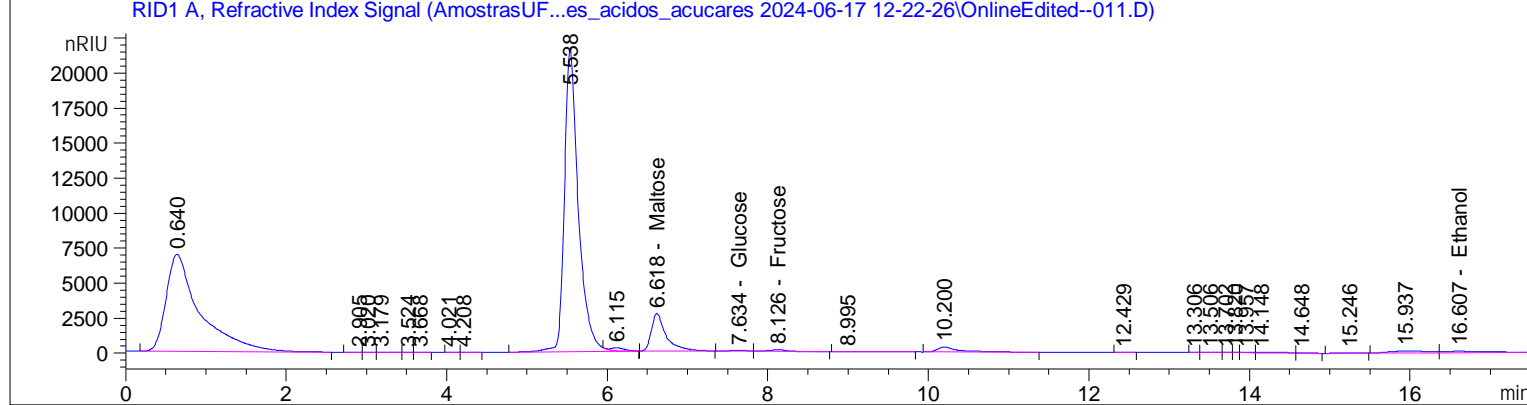
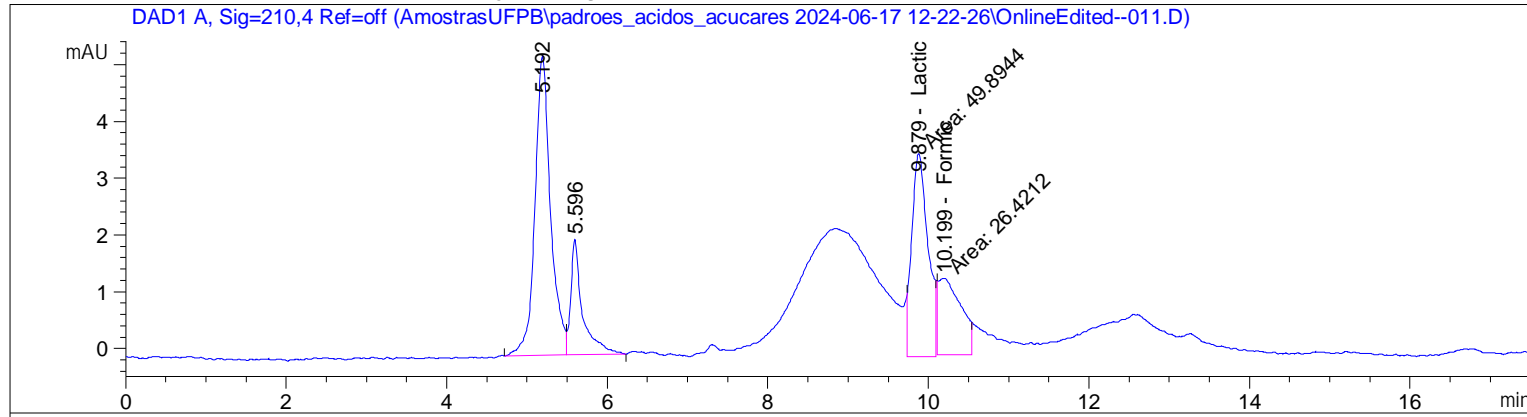
=====
*** End of Report ***

Sample Name: 11

```

=====
Acq. Operator   : Marcos Santos                Seq. Line :   11
Acq. Instrument : HPLC-DAD-RID                Location  :   11
Injection Date  : 6/17/2024 3:24:23 PM        Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucares_2024-06-17_12-22-26
                  \Acids-UFPB.M
Last changed    : 6/17/2024 3:35:35 PM by Marcos Santos
                  (modified after Loading)
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucares_2024-06-17_12-22-26
                  \Acids-UFPB.M (Sequence Method)
Last changed    : 6/17/2024 5:50:57 PM by Marcos Santos
                  (modified after Loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/17/2024 5:50:56 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=210,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.660	-	-	-	-	-	Citric
6.986	-	-	-	-	-	Tartaric
7.690	-	-	-	-	-	Malic
9.156	-	-	-	-	-	Succinic

RetTime [mi n]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
9.879	MM T	49.89435	2.42424e-3	1.20956e-1		Lacti c
10.199	MM T	26.42119	8.27173e-4	2.18549e-2		Formi c
11.510		-	-	-		Aceti c
13.594		-	-	-		Propi oni c
16.624		-	-	-		Butyri c

Totals : 1.42811e-1

Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [mi n]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.618	BB	3.42918e4	7.28850e-6	2.49936e-1		Mal tose
7.634	BV	1092.39099	8.31158e-6	9.07950e-3		Glucose
8.126	VB	2243.39600	2.35454e-5	5.28216e-2		Fructose
8.590		-	-	-		Rhamnose
10.606		-	-	-		Glycerol
16.607	VBA	3217.14429	0.00000	0.00000		Ethanol

Totals : 3.11837e-1

4 Warnings or Errors :

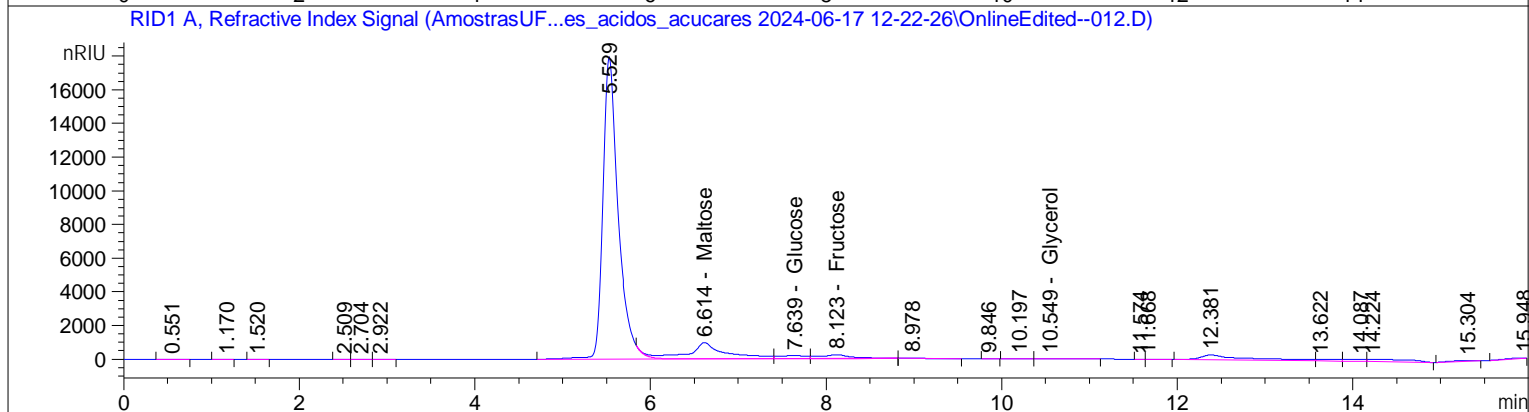
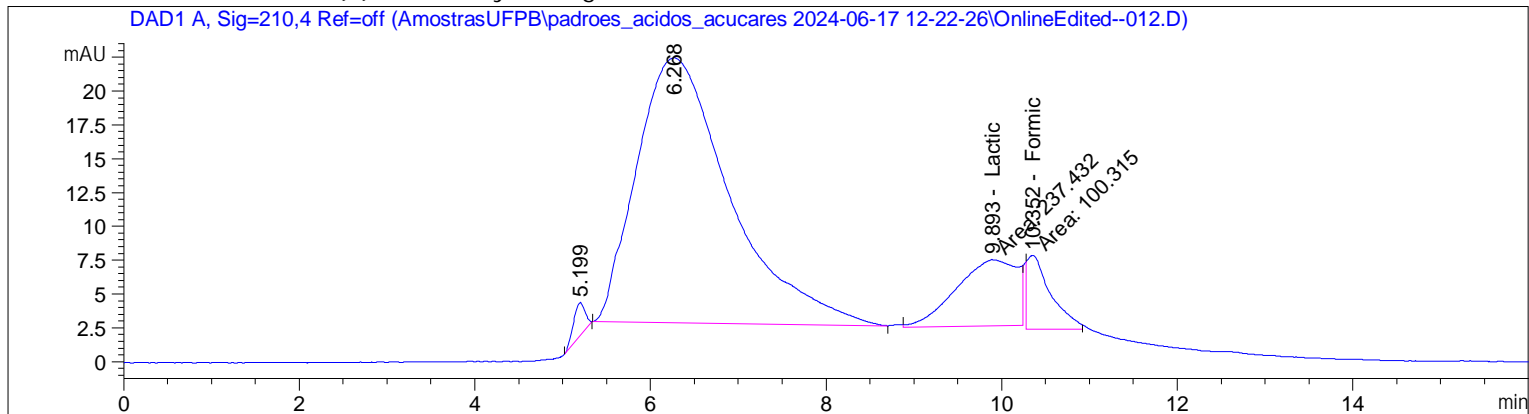
- Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
- Warning : Calibrated compound(s) not found
- Warning : Elution order of calibrated compounds may have changed
- Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Ethanol)

=====
*** End of Report ***

```

=====
Acq. Operator   : Marcos Santos                Seq. Line :   12
Acq. Instrument : HPLC-DAD-RID                Location  :   12
Injection Date  : 6/17/2024 3:42:50 PM        Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucars 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M
Last changed    : 6/17/2024 3:50:04 PM by Marcos Santos
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucars 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M (Sequence Method)
Last changed    : 6/17/2024 5:50:57 PM by Marcos Santos
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/17/2024 5:50:56 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=210,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.660	-	-	-	-	-	Citric
6.986	-	-	-	-	-	Tartaric
7.690	-	-	-	-	-	Malic
9.156	-	-	-	-	-	Succinic

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
9.893	MM T	237.43173	3.83053e-3	9.09490e-1		Lactic
10.352	MM T	100.31541	7.37254e-4	7.39579e-2		Formic
11.510		-	-	-		Acetic
13.594		-	-	-		Propionic
16.624		-	-	-		Butyric

Totals : 9.83448e-1

Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.614	VV E	2.76567e4	6.20539e-6	1.71620e-1		Maltose
7.639	VV E	3817.57007	9.77153e-6	3.73035e-2		Glucose
8.123	VB E	5576.41260	1.44740e-5	8.07132e-2		Fructose
8.590		-	-	-		Rhamnose
10.549	VB	474.19986	1.78673e-5	8.47268e-3		Glycerol
16.824		-	-	-		Ethanol

Totals : 2.98110e-1

3 Warnings or Errors :

- Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
- Warning : Calibrated compound(s) not found
- Warning : Elution order of calibrated compounds may have changed

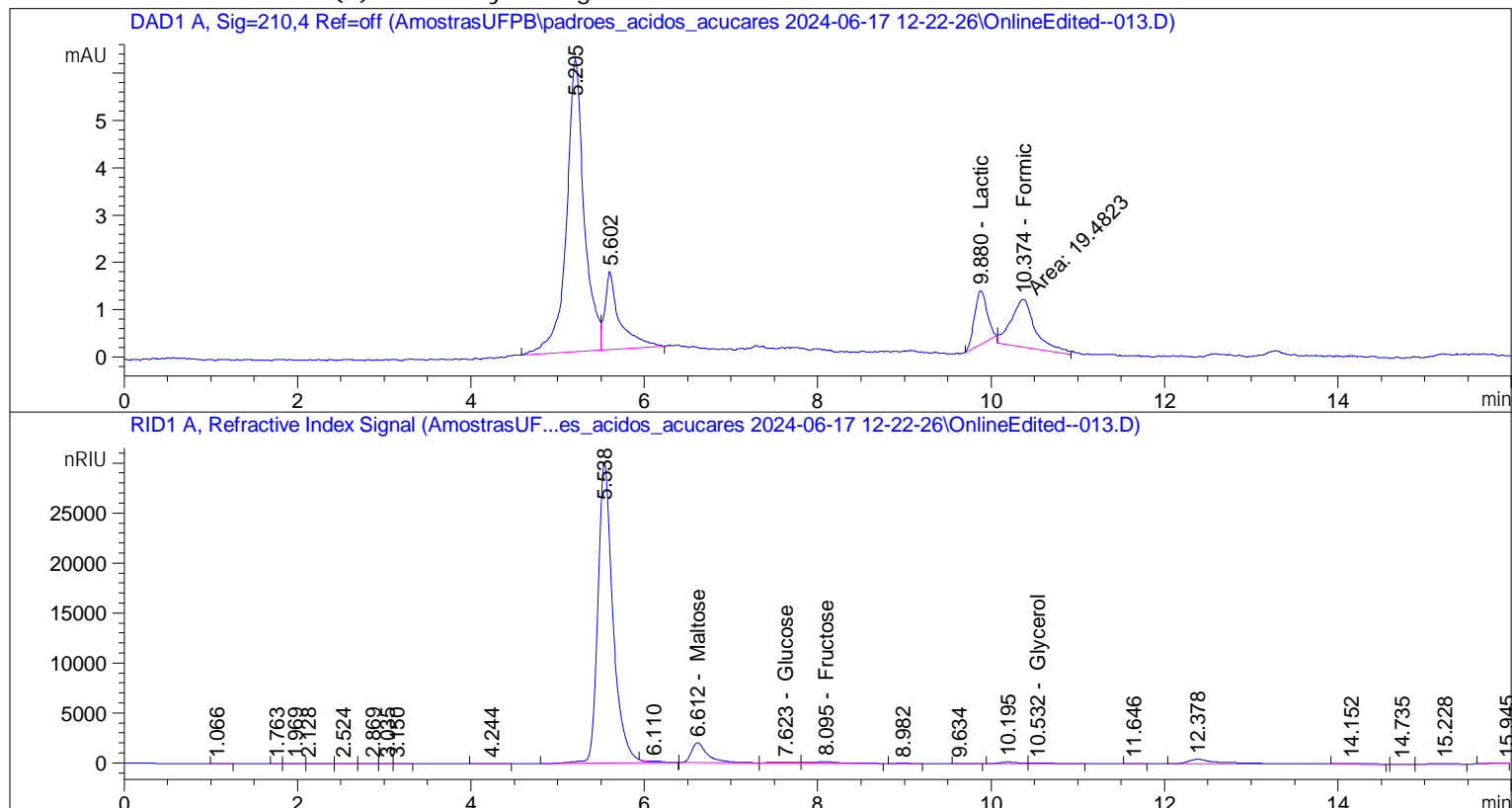
=====
*** End of Report ***

```

=====
Acq. Operator   : Marcos Santos                Seq. Line :   13
Acq. Instrument : HPLC-DAD-RID                Location  :   13
Injection Date  : 6/17/2024 3:59:47 PM        Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucars 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M
Last changed    : 6/17/2024 3:50:04 PM by Marcos Santos
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucars 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M (Sequence Method)
Last changed    : 6/17/2024 5:50:57 PM by Marcos Santos
                  (modified after loading)

Additional Info : Peak(s) manually integrated
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/17/2024 5:50:56 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=210, 4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.660	-	-	-	-	-	Citric
6.986	-	-	-	-	-	Tartaric
7.690	-	-	-	-	-	Malic
9.156	-	-	-	-	-	Succinic
9.880	BB	11.18812	0.00000	0.00000	-	Lactic

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
10.374	MM T	19.48226	8.70651e-4	1.69622e-2		Formic
11.510		-	-	-		Acetic
13.594		-	-	-		Propionic
16.624		-	-	-		Butyric

Totals : 1.69622e-2

Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.612	BB	2.56376e4	5.76455e-6	1.47789e-1		Maltose
7.623	BV	1438.25867	8.80340e-6	1.26616e-2		Glucose
8.095	VB	2702.44043	2.09673e-5	5.66630e-2		Fructose
8.590		-	-	-		Rhamnose
10.532	VB	1056.63354	1.31143e-5	1.38570e-2		Glycerol
16.824		-	-	-		Ethanol

Totals : 2.30971e-1

4 Warnings or Errors :

- Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
- Warning : Calibrated compound(s) not found
- Warning : Elution order of calibrated compounds may have changed
- Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Lactic)

=====
*** End of Report ***

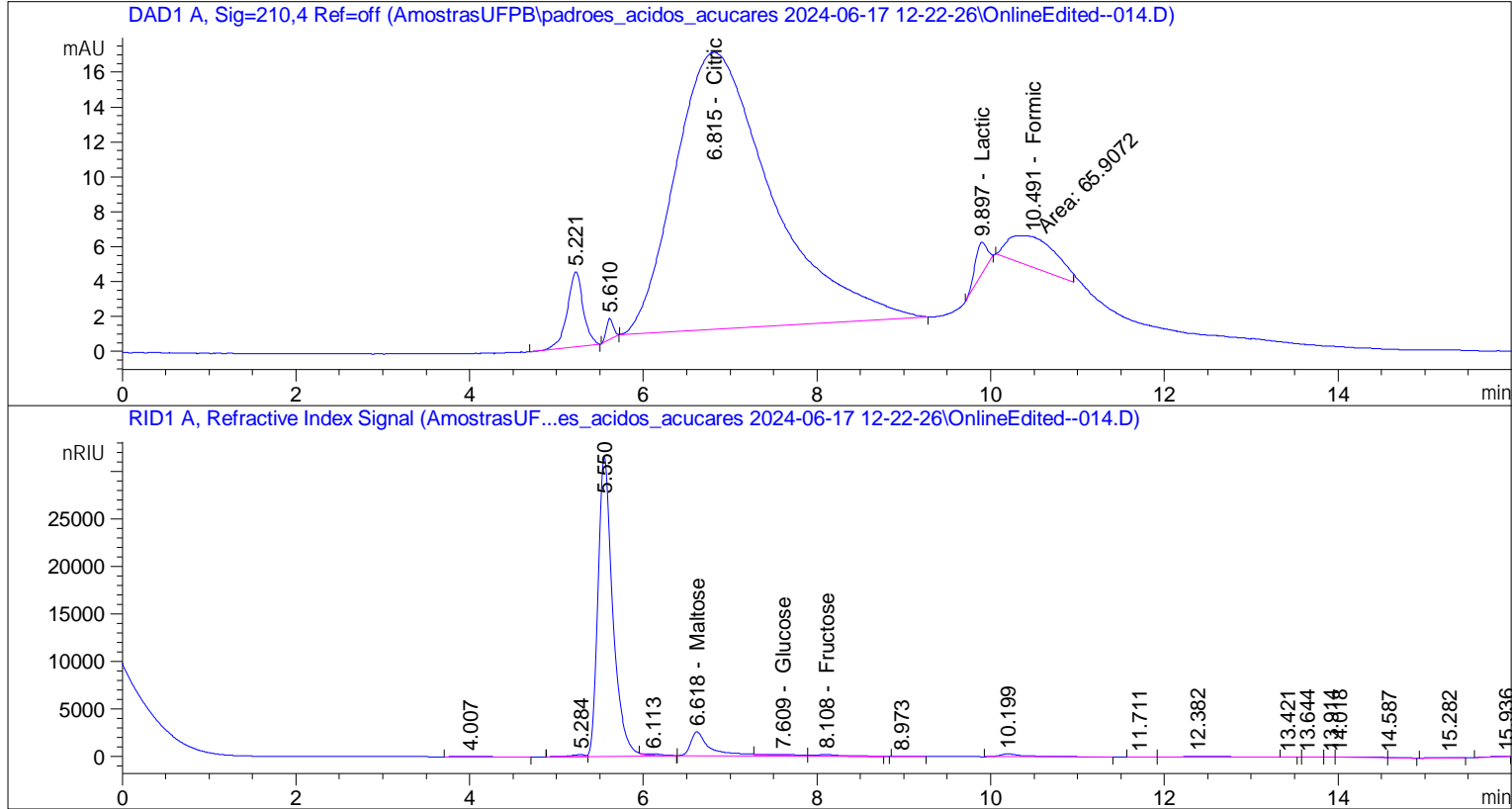
Sample Name: 14

```

=====
Acq. Operator   : Marcos Santos           Seq. Line :   14
Acq. Instrument : HPLC-DAD-RID           Location  :   14
Injection Date  : 6/17/2024 4:16:43 PM   Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucares 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M
Last changed    : 6/17/2024 3:50:04 PM by Marcos Santos
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\AmostrasUFPB\padroes_acidos_acucares 2024-06-17 12-22-26
                  \Acids-UFPB.M (Sequence Method)
Last changed    : 6/17/2024 5:50:57 PM by Marcos Santos
                  (modified after loading)

Additional Info  : Peak(s) manually integrated
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/17/2024 5:50:56 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=210,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.815	BB	1223.10950	1.40792e-3	1.72203		Citric
6.986		-	-	-		Tartaric
7.690		-	-	-		Malic
9.156		-	-	-		Succinic
9.897	BB	17.56010	0.00000	0.00000		Lactic

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
10.491	MM T	65.90716	7.54039e-4	4.96966e-2		Formic
11.510		-	-	-		Acetic
13.594		-	-	-		Propionic
16.624		-	-	-		Butyric
Totals :				1.77173		

Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal

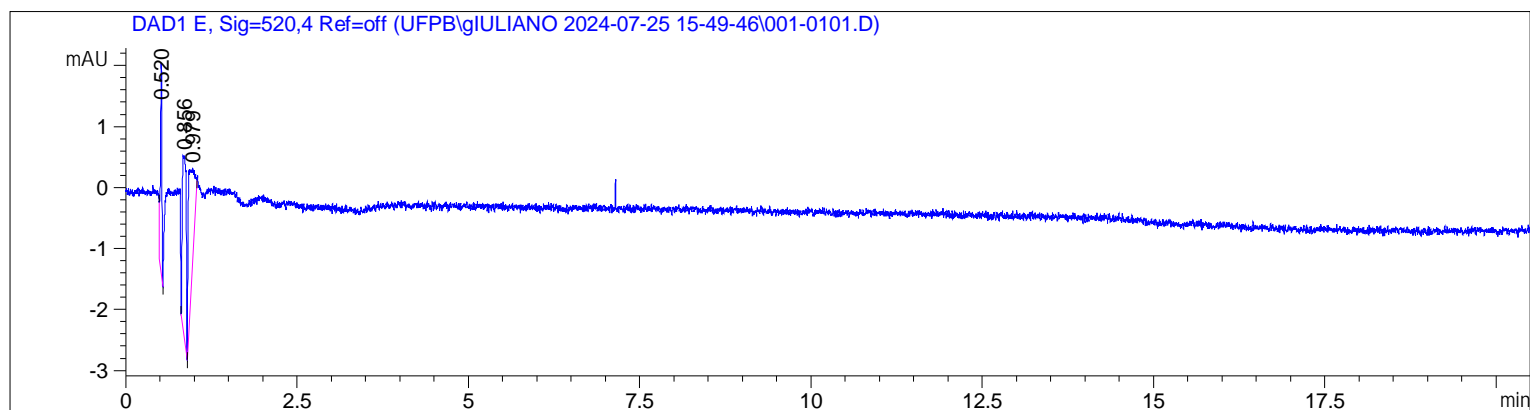
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
6.618	BV R	4.04826e4	7.97890e-6	3.23007e-1		Maltose
7.609	VV E	2277.65161	9.37586e-6	2.13549e-2		Glucose
8.108	VB E	2820.59839	2.04396e-5	5.76518e-2		Fructose
8.590		-	-	-		Rhamnose
10.606		-	-	-		Glycerol
16.824		-	-	-		Ethanol
Totals :				4.02013e-1		

4 Warnings or Errors :

- Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
- Warning : Calibrated compound(s) not found
- Warning : Elution order of calibrated compounds may have changed
- Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (Lactic)

=====
*** End of Report ***

Sample Name: 15



=====
 External Standard Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 7/26/2024 4:29:56 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
2.170	-	-	-	-	-	Gall ic aci d
3.351	-	-	-	-	-	3,4-di hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	4-hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	Vani lli c aci d
8.180	-	-	-	-	-	Syri ngi c aci d
16.760	-	-	-	-	-	Nari ngi n
17.330	-	-	-	-	-	Hesperi di n
17.850	-	-	-	-	-	t-ci nnami c aci d
18.040	-	-	-	-	-	ci s-Resveratrol
19.230	-	-	-	-	-	Nari ngeni n
20.070	-	-	-	-	-	Hesperi ti n

Totals : 0.00000

Signal 2: DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
1.483	BB	3.90247	6.86696e-2	2.67981e-1	-	Fumari c aci d
5.080	-	-	-	-	-	Procyani di n B1
5.513	BB	1.86096	1.47059e-1	2.73670e-1	-	Epi gal locatechi n gal late
5.790	-	-	-	-	-	Catechi n
7.170	-	-	-	-	-	Procyani di n B2
8.820	-	-	-	-	-	Epi catechi n
11.870	-	-	-	-	-	Epi catehi n gal late
12.890	-	-	-	-	-	Procyani di n A2

Sample Name: 15

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
Totals :				5.41651e-1		

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
5.060		-	-	-		Caftaric acid
6.770		-	-	-		Caffeic acid
6.850		-	-	-		Chlorogenic acid
7.770		-	-	-		Vanillin
9.380		-	-	-		p-coumaric acid
11.470		-	-	-		Ferulic acid
16.210		-	-	-		t-Resveratrol
Totals :				0.00000		

Signal 4: DAD1 D, Sig=360,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
10.450		-	-	-		O-Vanillin
14.020		-	-	-		Myricetin
16.420		-	-	-		Quercetin 3-glucoside
16.580		-	-	-		Rutin
17.870		-	-	-		Kaempferol 3-glucoside
18.230		-	-	-		Isorhamnetin
19.250		-	-	-		Quercetin hydrate
Totals :				0.00000		

Signal 5: DAD1 E, Sig=520,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
8.720		-	-	-		Cyanidin 3,5-di-glucoside
9.920		-	-	-		Pelargonidin 3,5-di-glucoside
10.130		-	-	-		Delphinidin 3-glucoside
11.510		-	-	-		Cyanidin 3-glucoside
12.260		-	-	-		Malvidin 3,5-di-glucoside
12.880		-	-	-		Pelargonidin 3-glucoside
14.260		-	-	-		Peonidin 3-glucoside
15.260		-	-	-		Malvidin 3-glucoside
Totals :				0.00000		

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

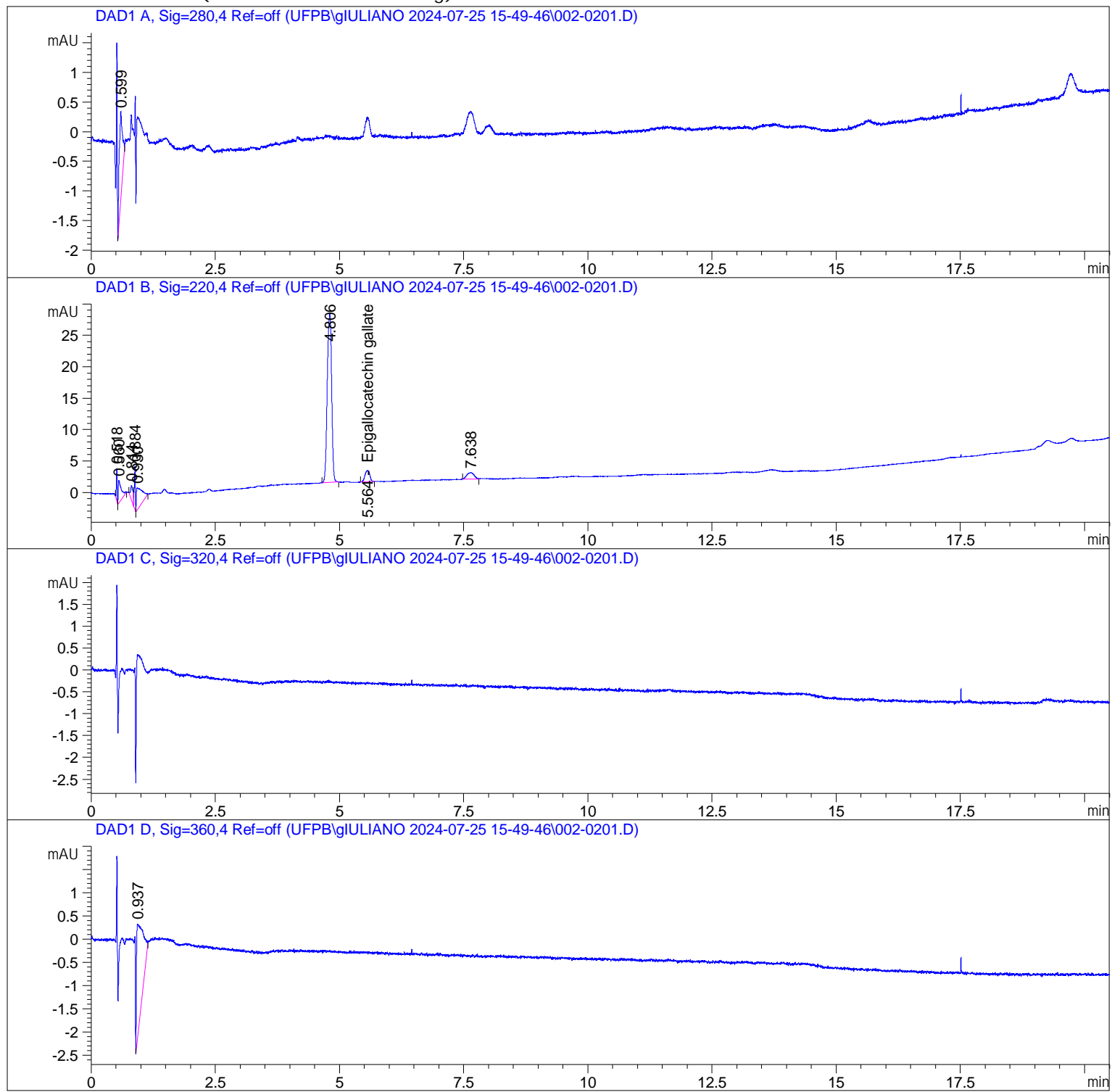
Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

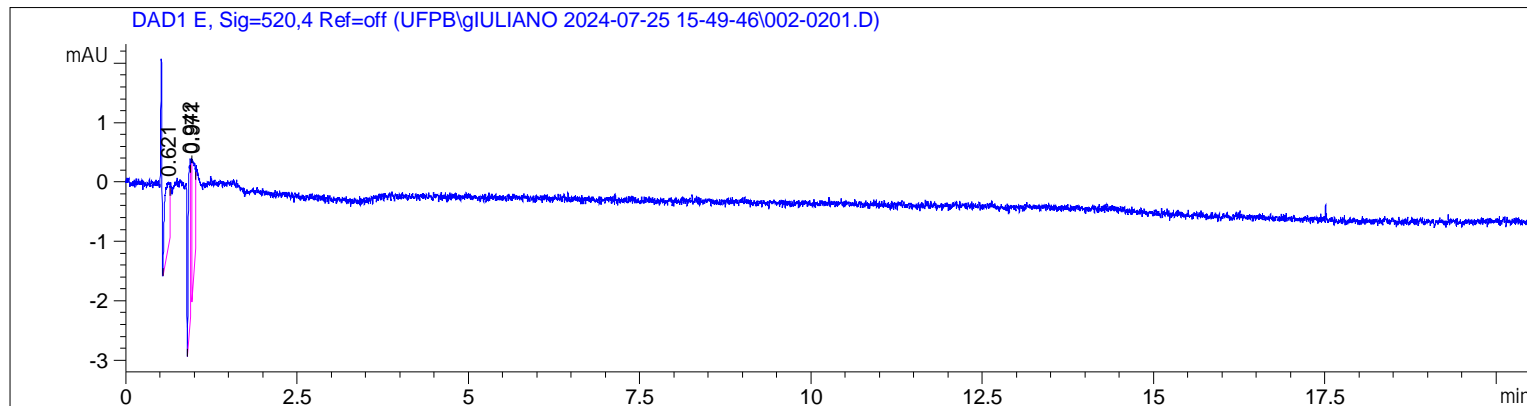
Sample Name: 16

=====

Acq. Operator	: Marcos Santos	Seq. Line	: 2
Acq. Instrument	: HPLC-DAD	Location	: 2
Injection Date	: 7/25/2024 4:17:27 PM	Inj	: 1
		Inj Volume	: 10.000 µl
Acq. Method	: C:\Chem32\2\Data\UFPB\gIULIANO 2024-07-25 15-49-46\Phenolics 3.M		
Last changed	: 7/25/2024 3:53:23 PM by Marcos Santos		
Analysis Method	: C:\Chem32\2\Data\UFPB\gIULIANO 2024-07-25 15-49-46\Phenolics 3.M (Sequence Method)		
Last changed	: 7/26/2024 4:31:24 PM by Marcos Santos (modified after loading)		



Sample Name: 16



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 7/26/2024 4:31:24 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
2.170	-	-	-	-	-	Gall ic aci d
3.351	-	-	-	-	-	3,4-di hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	4-hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	Vani lli c aci d
8.180	-	-	-	-	-	Syri ngi c aci d
16.760	-	-	-	-	-	Nari ngi n
17.330	-	-	-	-	-	Hesperi di n
17.850	-	-	-	-	-	t-ci nnami c aci d
18.040	-	-	-	-	-	ci s-Resveratrol
19.230	-	-	-	-	-	Nari ngeni n
20.070	-	-	-	-	-	Hesperi ti n

Totals : 0.00000

Signal 2: DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
1.480	-	-	-	-	-	Fumari c aci d
5.080	-	-	-	-	-	Procyani di n B1
5.564	BB	1.80586	1.47059e-1	2.65568e-1	-	Epi gal locatechi n gal late
5.790	-	-	-	-	-	Catechi n
7.170	-	-	-	-	-	Procyani di n B2
8.820	-	-	-	-	-	Epi catechi n
11.870	-	-	-	-	-	Epi catechi n gal late
12.890	-	-	-	-	-	Procyani di n A2

Sample Name: 16

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
Totals :				2.65568e-1		

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
5.060	-	-	-	-		Caftaric acid
6.770	-	-	-	-		Caffeic acid
6.850	-	-	-	-		Chlorogenic acid
7.770	-	-	-	-		Vanillin
9.380	-	-	-	-		p-coumaric acid
11.470	-	-	-	-		Ferulic acid
16.210	-	-	-	-		t-Resveratrol
Totals :				0.00000		

Signal 4: DAD1 D, Sig=360,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
10.450	-	-	-	-		O-Vanillin
14.020	-	-	-	-		Myricetin
16.420	-	-	-	-		Quercetin 3-glucoside
16.580	-	-	-	-		Rutin
17.870	-	-	-	-		Kaempferol 3-glucoside
18.230	-	-	-	-		Isorhamnetin
19.250	-	-	-	-		Quercetin hydrate
Totals :				0.00000		

Signal 5: DAD1 E, Sig=520,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
8.720	-	-	-	-		Cyanidin 3,5-diglucoside
9.920	-	-	-	-		Pelargonidin 3,5-diglucoside
10.130	-	-	-	-		Delphinidin 3-glucoside
11.510	-	-	-	-		Cyanidin 3-glucoside
12.260	-	-	-	-		Malvidin 3,5-diglucoside
12.880	-	-	-	-		Pelargonidin 3-glucoside
14.260	-	-	-	-		Peonidin 3-glucoside
15.260	-	-	-	-		Malvidin 3-glucoside
Totals :				0.00000		

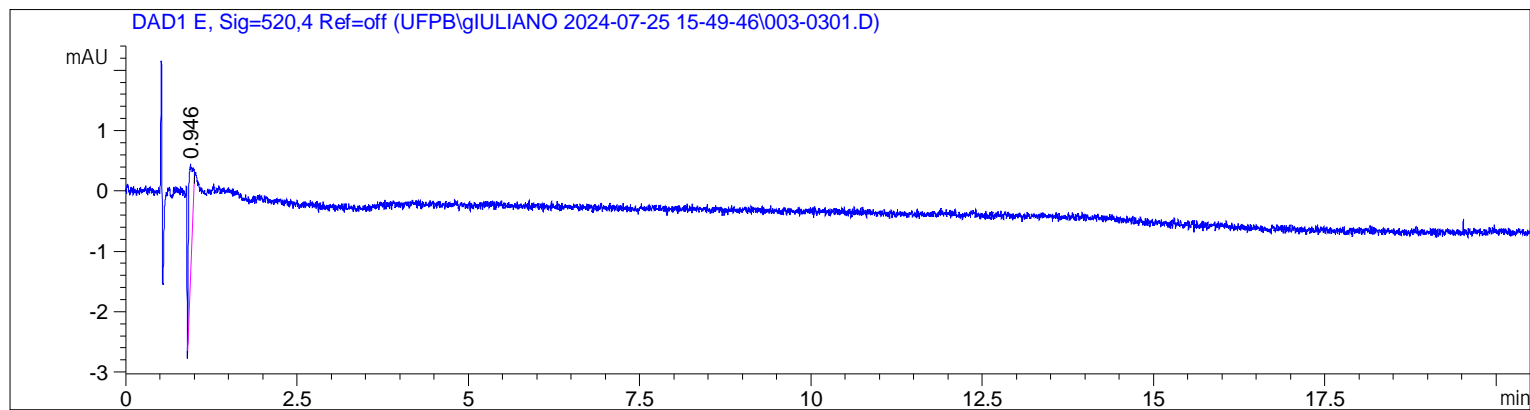
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

Sample Name: 17



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 7/26/2024 4:31:24 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
2.170	-	-	-	-	-	Gall ic aci d
3.351	-	-	-	-	-	3,4-di hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	4-hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	Vani lli c aci d
8.180	-	-	-	-	-	Syri ngi c aci d
16.760	-	-	-	-	-	Nari ngi n
17.330	-	-	-	-	-	Hesperi di n
17.850	-	-	-	-	-	t-ci nnami c aci d
18.040	-	-	-	-	-	ci s-Resveratrol
19.230	-	-	-	-	-	Nari ngeni n
20.070	-	-	-	-	-	Hesperi ti n

Totals : 0.00000

Signal 2: DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
1.480	-	-	-	-	-	Fumari c aci d
5.080	-	-	-	-	-	Procyani di n B1
5.570	BB	2.08624	1.47059e-1	3.06799e-1	-	Epi gal locatechi n gal late
5.790	-	-	-	-	-	Catechi n
7.170	-	-	-	-	-	Procyani di n B2
8.820	-	-	-	-	-	Epi catechi n
11.870	-	-	-	-	-	Epi catechi n gal late
12.890	-	-	-	-	-	Procyani di n A2

Sample Name: 17

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		3.06799e-1

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
5.060		-	-	-		Caftaric acid
6.770		-	-	-		Caffeic acid
6.850		-	-	-		Chlorogenic acid
7.770		-	-	-		Vanillin
9.380		-	-	-		p-coumaric acid
11.470		-	-	-		Ferulic acid
16.210		-	-	-		t-Resveratrol
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		0.00000

Signal 4: DAD1 D, Sig=360,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
10.450		-	-	-		O-Vanillin
14.020		-	-	-		Myricetin
16.420		-	-	-		Quercetin 3-glucoside
16.580		-	-	-		Rutin
17.870		-	-	-		Kaempferol 3-glucoside
18.230		-	-	-		Isorhamnetin
19.250		-	-	-		Quercetin hydrate
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		0.00000

Signal 5: DAD1 E, Sig=520,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
8.720		-	-	-		Cyanidin 3,5-diglucoside
9.920		-	-	-		Pelargonidin 3,5-diglucoside
10.130		-	-	-		Delphinidin 3-glucoside
11.510		-	-	-		Cyanidin 3-glucoside
12.260		-	-	-		Malvidin 3,5-diglucoside
12.880		-	-	-		Pelargonidin 3-glucoside
14.260		-	-	-		Peonidin 3-glucoside
15.260		-	-	-		Malvidin 3-glucoside
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		0.00000

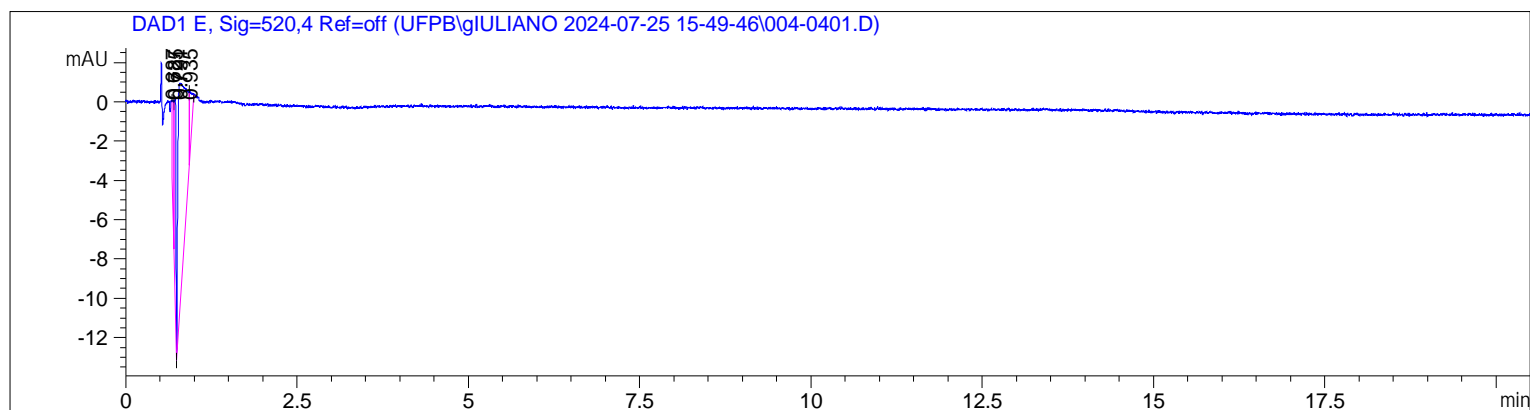
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

Sample Name: 18



=====
 External Standard Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 7/26/2024 4:31:24 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
2.170	-	-	-	-	-	Gall ic aci d
3.351	-	-	-	-	-	3,4-di hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	4-hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	Vani lli c aci d
8.180	-	-	-	-	-	Syri ngi c aci d
16.760	-	-	-	-	-	Nari ngi n
17.330	-	-	-	-	-	Hesperi di n
17.850	-	-	-	-	-	t-ci nnami c aci d
18.040	-	-	-	-	-	ci s-Resveratrol
19.230	-	-	-	-	-	Nari ngeni n
20.070	-	-	-	-	-	Hesperi ti n

Totals : 0.00000

Signal 2: DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
1.480	-	-	-	-	-	Fumari c aci d
5.080	-	-	-	-	-	Procyani di n B1
5.510	-	-	-	-	-	Epi gal locatechi n gal late
5.790	-	-	-	-	-	Catechi n
7.170	-	-	-	-	-	Procyani di n B2
8.820	-	-	-	-	-	Epi catechi n
11.870	-	-	-	-	-	Epi catehi n gal late
12.890	-	-	-	-	-	Procyani di n A2

Sample Name: 18

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
Totals :				0.00000		

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
5.060		-	-	-		Caftaric acid
6.770		-	-	-		Caffeic acid
6.850		-	-	-		Chlorogenic acid
7.770		-	-	-		Vanillin
9.380		-	-	-		p-coumaric acid
11.470		-	-	-		Ferulic acid
16.210		-	-	-		t-Resveratrol
Totals :				0.00000		

Signal 4: DAD1 D, Sig=360,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
10.450		-	-	-		O-Vanillin
14.020		-	-	-		Myricetin
16.420		-	-	-		Quercetin 3-glucoside
16.580		-	-	-		Rutin
17.870		-	-	-		Kaempferol 3-glucoside
18.230		-	-	-		Isorhamnetin
19.250		-	-	-		Quercetin hydrate
Totals :				0.00000		

Signal 5: DAD1 E, Sig=520,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
8.720		-	-	-		Cyanidin 3,5-di-glucoside
9.920		-	-	-		Pelargonidin 3,5-di-glucoside
10.130		-	-	-		Delphinidin 3-glucoside
11.510		-	-	-		Cyanidin 3-glucoside
12.260		-	-	-		Malvidin 3,5-di-glucoside
12.880		-	-	-		Pelargonidin 3-glucoside
14.260		-	-	-		Peonidin 3-glucoside
15.260		-	-	-		Malvidin 3-glucoside
Totals :				0.00000		

Sample Name: 18

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

```

=====
=====
                        Height Percent Report
=====

```

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 7/26/2024 4:31:24 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	0.730	BB	0.0184	8.63927	6.2883	?
2	0.778	BB	0.1150	9.86336	7.1793	?
3	2.170		0.0000	0.00000	0.0000	Gall ic acid
4	3.351		0.0000	0.00000	0.0000	3,4-di hydroxybenzoi c aci d
5	6.550		0.0000	0.00000	0.0000	4-hydroxybenzoi c aci d
6	6.550		0.0000	0.00000	0.0000	Vani lli c acid
7	8.180		0.0000	0.00000	0.0000	Syri ngi c acid
8	16.760		0.0000	0.00000	0.0000	Nari ngi n
9	17.330		0.0000	0.00000	0.0000	Hesperi di n
10	17.850		0.0000	0.00000	0.0000	t-ci nnami c aci d
11	18.040		0.0000	0.00000	0.0000	ci s-Resveratrol
12	19.230		0.0000	0.00000	0.0000	Nari ngeni n
13	20.070		0.0000	0.00000	0.0000	Hesperi ti n
14	21.803	VB	0.0563	1.53421	1.1167	?
15	22.458	BB	0.0419	9.81651	7.1452	?
16	22.560	BV	0.0216	71.44925	52.0059	?
17	22.598	VV	0.0200	16.77397	12.2093	?
18	22.630	VB	0.0194	4.80569	3.4979	?
19	22.699	BB	0.0251	7.30325	5.3158	?
20	22.809	BV	0.0274	7.20126	5.2416	?

Totals : 137.38676

Signal 2: DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	0.553	VV R	0.0314	7.45372	2.2458	?
2	0.662	BV	0.0503	3.84924	1.1598	?
3	0.710	VV	0.0198	14.73178	4.4386	?
4	0.729	VB	0.0149	20.23395	6.0964	?
5	0.776	BB	0.1482	22.20703	6.6909	?

Sample Name: 18

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
6	1.480		0.0000	0.00000	0.0000	Fumari c aci d
7	4.788	BV R	0.1123	24.82351	7.4792	?
8	5.080		0.0000	0.00000	0.0000	Procyani di n B1
9	5.510		0.0000	0.00000	0.0000	Epi gal locatechi n gallate
10	5.790		0.0000	0.00000	0.0000	Catechi n
11	7.170		0.0000	0.00000	0.0000	Procyani di n B2
12	8.820		0.0000	0.00000	0.0000	Epi catechi n
13	11.870		0.0000	0.00000	0.0000	Epi catehi n gallate
14	12.890		0.0000	0.00000	0.0000	Procyani di n A2
15	19.743	BB	0.1498	1.44133	0.4343	?
16	21.808	BB	0.3524	2.04324	0.6156	?
17	22.222	BV	0.0545	4.84671	1.4603	?
18	22.257	VB	0.0366	4.87545	1.4690	?
19	22.459	VV R	0.0345	32.47738	9.7853	?
20	22.560	VV	0.0228	91.96790	27.7096	?
21	22.598	VB	0.0196	19.76659	5.9556	?
22	22.633	BV	0.0162	5.21661	1.5717	?
23	22.662	VV	0.0213	13.88865	4.1846	?
24	22.697	VB	0.0230	16.10403	4.8521	?
25	22.739	BV	0.0250	19.27687	5.8080	?
26	22.821	VB	0.0323	23.12710	6.9681	?
27	23.011	VV	0.0310	3.56819	1.0751	?

Totals : 331.89927

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	0.616	BV	0.0566	5.15812	13.0688	?
2	0.666	VV	0.0535	7.95244	20.1486	?
3	0.725	VB	0.0183	11.12415	28.1845	?
4	0.785	BB	0.0697	10.01727	25.3801	?
5	5.060		0.0000	0.00000	0.0000	Caftaric acid
6	6.770		0.0000	0.00000	0.0000	Caffeic acid
7	6.850		0.0000	0.00000	0.0000	Chlorogeni c acid
8	7.770		0.0000	0.00000	0.0000	Vanillin
9	9.380		0.0000	0.00000	0.0000	p-coumaric acid
10	11.470		0.0000	0.00000	0.0000	Ferulic acid
11	16.210		0.0000	0.00000	0.0000	t-Resveratrol
12	22.408	BV	0.0651	2.76813	7.0134	?
13	22.478	VV	0.0611	2.44886	6.2045	?

Totals : 39.46897

Sample Name: 18

Signal 4: DAD1 D, Sig=360,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	0.630	BV	0.0534	5.63352	16.5790	?
2	0.669	VV	0.0570	7.78517	22.9111	?
3	0.727	VB	0.0164	10.98713	32.3342	?
4	0.790	BB	0.0753	9.57409	28.1757	?
5	10.450		0.0000	0.00000	0.0000	0-Vanillin
6	14.020		0.0000	0.00000	0.0000	Myricetin
7	16.420		0.0000	0.00000	0.0000	Quercetin 3-glucoside
8	16.580		0.0000	0.00000	0.0000	Rutin
9	17.870		0.0000	0.00000	0.0000	Kaempferol 3-glucoside
10	18.230		0.0000	0.00000	0.0000	Isorhamnetin
11	19.250		0.0000	0.00000	0.0000	Quercetin hydrate

Totals : 33.97991

Signal 5: DAD1 E, Sig=520,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Height [mAU]	Height %	Name
1	0.687	VV	0.0217	5.71144	16.8088	?
2	0.725	VB	0.0270	10.74667	31.6275	?
3	0.791	BV	0.0991	11.61188	34.1738	?
4	0.935	VB	0.0270	3.36131	9.8923	?
5	8.720		0.0000	0.00000	0.0000	Cyanidin 3,5-diglucoside
6	9.920		0.0000	0.00000	0.0000	Pelargonidin 3,5-diglucoside
7	10.130		0.0000	0.00000	0.0000	Delphinidin 3-glucoside
8	11.510		0.0000	0.00000	0.0000	Cyanidin 3-glucoside
9	12.260		0.0000	0.00000	0.0000	Malvidin 3,5-diglucoside
10	12.880		0.0000	0.00000	0.0000	Pelargonidin 3-glucoside
11	14.260		0.0000	0.00000	0.0000	Peonidin 3-glucoside
12	15.260		0.0000	0.00000	0.0000	Malvidin 3-glucoside
13	22.513	BV	0.1434	2.54759	7.4976	?

Totals : 33.97888

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

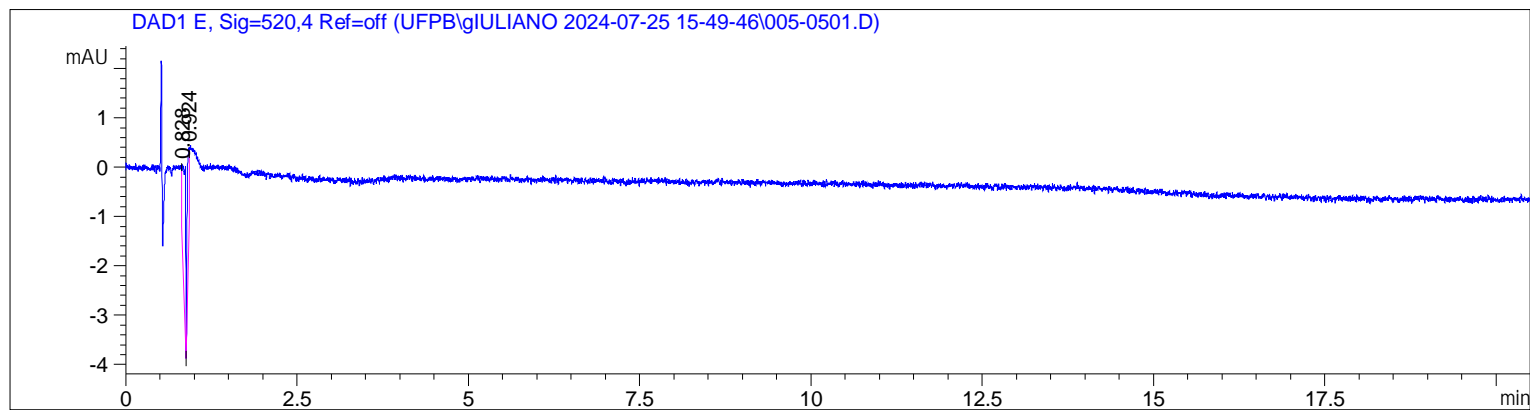
Warning : Calibrated compound(s) not found

```

=====
*** End of Report ***

```


Sample Name: 19



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 7/26/2024 4:31:24 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
2.170	-	-	-	-	-	Gall ic aci d
3.351	-	-	-	-	-	3,4-di hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	4-hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	Vani lli c aci d
8.180	-	-	-	-	-	Syri ngi c aci d
16.760	-	-	-	-	-	Nari ngi n
17.330	-	-	-	-	-	Hesperi di n
17.850	-	-	-	-	-	t-ci nnami c aci d
18.040	-	-	-	-	-	ci s-Resveratrol
19.230	-	-	-	-	-	Nari ngeni n
20.070	-	-	-	-	-	Hesperi ti n

Totals : 0.00000

Signal 2: DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
1.480	-	-	-	-	-	Fumari c aci d
5.080	-	-	-	-	-	Procyani di n B1
5.620	BB	2.47446	1.47059e-1	3.63891e-1	-	Epi gal locatechi n gal late
5.790	-	-	-	-	-	Catechi n
7.170	-	-	-	-	-	Procyani di n B2
8.820	-	-	-	-	-	Epi catechi n
11.870	-	-	-	-	-	Epi catechi n gal late
12.890	-	-	-	-	-	Procyani di n A2

Sample Name: 19

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- --- -----						
Totals :				3.63891e-1		

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- --- -----						
5.060		-	-	-		Caftaric acid
6.770		-	-	-		Caffeic acid
6.850		-	-	-		Chlorogenic acid
7.770		-	-	-		Vanillin
9.380		-	-	-		p-coumaric acid
11.470		-	-	-		Ferulic acid
16.210		-	-	-		t-Resveratrol
Totals :				0.00000		

Signal 4: DAD1 D, Sig=360,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- --- -----						
10.450		-	-	-		O-Vanillin
14.020		-	-	-		Myricetin
16.420		-	-	-		Quercetin 3-glucoside
16.580		-	-	-		Rutin
17.870		-	-	-		Kaempferol 3-glucoside
18.230		-	-	-		Isorhamnetin
19.250		-	-	-		Quercetin hydrate
Totals :				0.00000		

Signal 5: DAD1 E, Sig=520,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- --- -----						
8.720		-	-	-		Cyanidin 3,5-di-glucoside
9.920		-	-	-		Pelargonidin 3,5-di-glucoside
10.130		-	-	-		Delphinidin 3-glucoside
11.510		-	-	-		Cyanidin 3-glucoside
12.260		-	-	-		Malvidin 3,5-di-glucoside
12.880		-	-	-		Pelargonidin 3-glucoside
14.260		-	-	-		Peonidin 3-glucoside
15.260		-	-	-		Malvidin 3-glucoside
Totals :				0.00000		

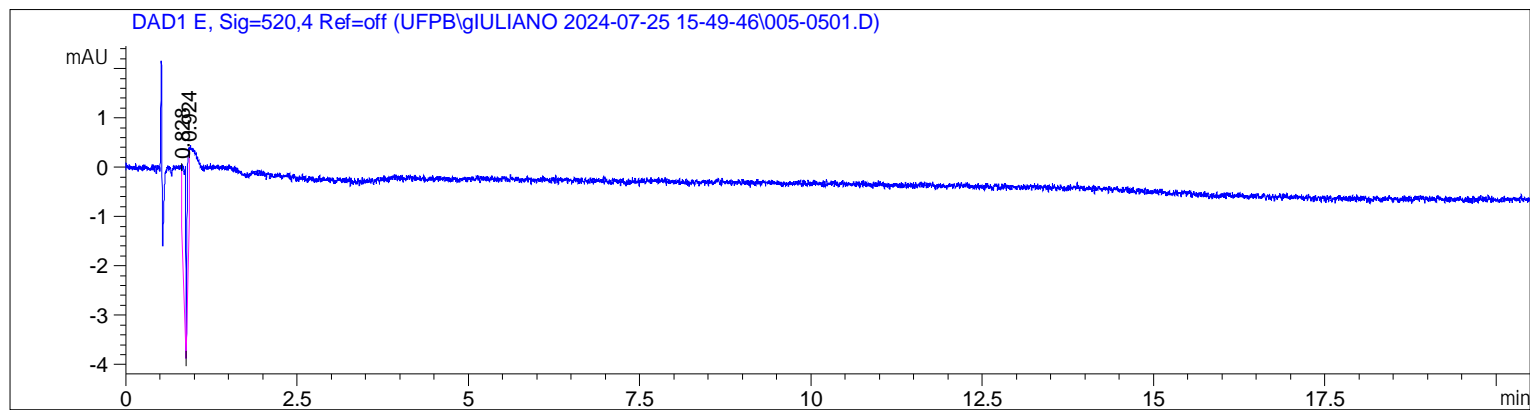
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

Sample Name: 19



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 7/26/2024 4:33:05 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
2.170	-	-	-	-	-	Gall ic aci d
3.351	-	-	-	-	-	3,4-di hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	4-hydroxybenzoi c aci d
6.550	-	-	-	-	-	Vani lli c aci d
8.180	-	-	-	-	-	Syri ngi c aci d
16.760	-	-	-	-	-	Nari ngi n
17.330	-	-	-	-	-	Hesperi di n
17.850	-	-	-	-	-	t-ci nnami c aci d
18.040	-	-	-	-	-	ci s-Resveratrol
19.230	-	-	-	-	-	Nari ngeni n
20.070	-	-	-	-	-	Hesperi ti n

Totals : 0.00000

Signal 2: DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
1.480	-	-	-	-	-	Fumari c aci d
5.080	-	-	-	-	-	Procyani di n B1
5.620	MM T	2.73845	1.47059e-1	4.02713e-1	-	Epi gal locatechi n gal late
5.790	-	-	-	-	-	Catechi n
7.170	-	-	-	-	-	Procyani di n B2
8.820	-	-	-	-	-	Epi catechi n
11.870	-	-	-	-	-	Epi catechi n gal late
12.890	-	-	-	-	-	Procyani di n A2

Sample Name: 19

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		4.02713e-1

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
5.060		-	-	-		Caftaric acid
6.770		-	-	-		Caffeic acid
6.850		-	-	-		Chlorogenic acid
7.770		-	-	-		Vanillin
9.380		-	-	-		p-coumaric acid
11.470		-	-	-		Ferulic acid
16.210		-	-	-		t-Resveratrol
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		0.00000

Signal 4: DAD1 D, Sig=360,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
10.450		-	-	-		O-Vanillin
14.020		-	-	-		Myricetin
16.420		-	-	-		Quercetin 3-glucoside
16.580		-	-	-		Rutin
17.870		-	-	-		Kaempferol 3-glucoside
18.230		-	-	-		Isorhamnetin
19.250		-	-	-		Quercetin hydrate
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		0.00000

Signal 5: DAD1 E, Sig=520,4 Ref=off

RetTime [mi n]	Type	Height [mAU]	Amt/Height	Amount [mg/L]	Grp	Name
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
8.720		-	-	-		Cyanidin 3,5-diglucoside
9.920		-	-	-		Pelargonidin 3,5-diglucoside
10.130		-	-	-		Delphinidin 3-glucoside
11.510		-	-	-		Cyanidin 3-glucoside
12.260		-	-	-		Malvidin 3,5-diglucoside
12.880		-	-	-		Pelargonidin 3-glucoside
14.260		-	-	-		Peonidin 3-glucoside
15.260		-	-	-		Malvidin 3-glucoside
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				Totals :		0.00000

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***