

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Fernanda Nunes Ferreira

**Aptidão de agentes protetores na preservação da viabilidade celular de Bactérias Ácido  
Láticas em *Sourdough* tipo III seco por *spray-drying* e liofilização, e sua influência na  
produção de pães**

Florianópolis

2023

Fernanda Nunes Ferreira

**Aptidão de agentes protetores na preservação da viabilidade celular de Bactérias Ácido Láticas em *Sourdough* tipo III seco por *spray-drying* e liofilização, e sua influência na produção de pães**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner

Florianópolis

2023

Ficha de Identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Fernanda Nunes

Aptidão de agentes protetores na preservação da viabilidade celular de Bactérias Ácido Láticas em Sourdough tipo III seco por spray-drying e liofilização, e sua influência na produção de pães / Fernanda Nunes Ferreira ; orientador, Juliano De Dea Lindner, 2023.

73 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Sourdough tipo III. 3. Agentes Protetores. 4. Spray-drying e Liofilização. 5. Panificação. I. Lindner, Juliano De Dea. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Fernanda Nunes Ferreira

**Aptidão de agentes protetores na preservação da viabilidade celular de Bactérias Ácido Láticas em *Sourdough* tipo III seco por *spray-drying* e liofilização, e sua influência na produção de pães**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos” e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, 19 de junho de 2023.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina de Oliveira Costa  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Maisonnave Arisi  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu pai Obaluaê por toda força e coragem dada a mim durante esta longa caminhada.

Gostaria de expressar a minha gratidão aos meus pais Ademir e Renata, ao meu irmão Luiz Fernando, à minha companheira Elisa, à minha madrinha Josete, à minha cunhada Karol, aos meus sogros Eliege e Valdecyr, que são a minha segunda família, e a todos os familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado, dando todo o suporte, amor e acolhimento possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano pela assistência e orientação durante a pesquisa. Às colegas de laboratório Ana e Luiza, pelo coleguismo e auxílio nas análises, sem vocês este caminho seria mais árduo. Aos doutorandos Ivan, Igor e Suliana, sou muito grata por todos os momentos que tivemos, obrigada pelos conselhos, ajudas e risadas, vocês são brilhantes.

À Universidade Federal de Santa Catarina, a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial à Profa. Carmen e à Profa. Silvani, mulheres fortes, cientistas, e altamente profissionais, as quais me inspiram, cada vez mais, a ser a profissional que sou hoje. Grata pelo carinho, pelos conselhos, orientações e às boas risadas, sou imensamente grata.

E a todos aqueles que contribuíram, de certa forma, para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

Conhecido pela sua origem antiga e sabor característico, o *sourdough* é um fermento natural utilizado para produção de panificados. Provido apenas da mistura de farinha e água, esse *starter* é fermentado espontaneamente por bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras autóctones da matéria-prima e do ambiente. O fermento *sourdough* pode ser dividido em quatro classes, entre estas, vale destacar os tipos II e III. Para o *sourdough* tipo II, há a inoculação de culturas *starters*, pré-selecionadas, à mistura de farinha e água, permitindo, assim, a padronização e redução do tempo necessário para a fermentação. Quando este fermento passa pelo processo de secagem, usualmente por liofilização ou *spray-drying*, obtém-se o *sourdough* tipo III. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a aptidão protetora da goma arábica e da maltodextrina (DE 20) frente à viabilidade celular das BAL após o processo de secagem e durante o armazenamento. Avaliou-se, também, as características do pó, como: capacidade fermentativa, pH, acidez total titulável (ATT), superfície das partículas e a sua influência quando adicionado na formulação de pães. A secagem por liofilização apresentou uma maior preservação das BAL quando comparado ao *spray-drying*, porém, ambos os processos dispuseram de perdas logarítmicas significativas após a secagem. Para o método de *spray-drying*, a incorporação de 7% de goma arábica apresentou o maior efeito protetivo no T<sub>0</sub> e nos 30 dias de armazenamento. Por sua vez, para a liofilização, a adição de 10% de maltodextrina, demonstrou uma maior preservação na viabilidade das BAL, porém, não desempenhou uma boa conservação durante a vida de prateleira. Majoritariamente, os valores de atividade de água, umidade, pH e ATT para os fermentos em pó, não diferiram significativamente ao decorrer do tempo de armazenamento. Os efeitos protetivos gerados pelo recobrimento dos agentes às partículas foram visualizados em micrografias por microscopia eletrônica de varredura, corroborando as contagens obtidas durante a vida de prateleira. Ambos os métodos de secagem proveram fermentos cultiváveis e aptos ao processo de refermentação, sendo capazes de acidificar o meio e produzir ácidos orgânicos. A incorporação destes fermentos tipo III em formulações de pães promoveram a diminuição de pH e aumento de ATT, quando comparados à formulação controle (com adição de *Saccharomyces cerevisiae*). Quando avaliado o perfil de textura após 12 horas de armazenamento, constatou-se mudanças significativas apenas no parâmetro de coesividade.

**Palavras-chave:** Bioprocessos. Panificação. Processo Fermentativo. *Sourdough* tipo III. Goma arábica. Maltodextrina.

## ABSTRACT

The sourdough, known for its ancient origins and distinctive flavor, is a natural starter used for baking. This starter is derived from a mixture of flour and water and is spontaneously fermented by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts from the raw material and the environment. Sourdough can be classified into four classes; among them, types II and III are highlighted. For type II sourdough, pre-selected starter cultures are inoculated into the mixture of flour and water, allowing for standardization and reduction of the required fermentation time. When this dough undergoes the drying process, usually by freeze-drying or spray-drying, type III sourdough is obtained. The present work aimed to evaluate the protective ability of arabic gum and maltodextrin (DE 20) on the cell viability of LAB after drying and during storage time. The characteristics of the powder were also assessed, embracing the fermentative capacity, pH, total titratable acidity (TTA), particle surface, and their influence when added to bread formulations. Freeze-drying stated major preservation of LAB compared to spray-drying, although both methods disposed of significant logarithmic losses after drying. For the spray-drying technique, the incorporation of 7% arabic gum showed the highest protective effect at T0 and after 30 days of storage. In contrast, adding 10% maltodextrin for freeze-drying demonstrated better preservation of LAB but did not provide satisfactory preservation during shelf-life. In general, the powders; water activity ( $a_w$ ), moisture, pH, and TTA values did not differ significantly over the storage period. The protective effects generated by the coating action of the agents on the particles were observed in scanning electron microscopy images, supporting the colony counts obtained during the shelf-life. Both drying methods provided cultivable and suitable sourdough powders for the refermentation process, capable of acidifying the medium and producing organic acids. Incorporating these type III sourdough in bread formulations decreased pH and increased TTA values compared to the control formulation (added only *Saccharomyces cerevisiae*). Significant changes were observed only in the cohesivity parameter when evaluating the texture profile after 12 hours of storage.

**Keywords:** Bioprocess. Bread making. Fermentation processes. *Sourdough* type III. Arabic gum. Maltodextrin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma dos processos de produção de *sourdoughs* tipo I, II, III e IV.....18
- Figura 2 - Desenho esquematizando os eventos físicos às células a partir da taxa de congelamento.....25
- Figura 3 - Curva de acidificação do *sourdough* tipo II durante 24 h de fermentação, indicando pH (■), acidez total titulável (ATT) (□) em ml de NaOH, Bolores (●) e bactérias ácido lácticas (BAL) (●) em log UFC/g.....41
- Figura 4 - Capacidade fermentativa do *sourdough* tipo III adicionado de goma arábica seco por *spray-drying* (SD) e liofilização (LF) durante o período de 20h de fermentação, indicando pH (■), acidez total titulável (ATT) (□) em ml de NaOH, leveduras (●) e bactérias ácido lácticas (BAL) (●) em log UFC/g.....49
- Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura do *sourdough* tipo III controle (A), com adição de goma arábica (B) e maltodextrina (C), secos por *spray dryer*.....52
- Figura 6 - Pães formulados com adição de fermento *sourdough* tipo III seco por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PL), de *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC) após forneamento.....54
- Figura 7 - Fatias dos pães formulados com adição de fermento *sourdough* tipo III seco por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PL), de *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC) após 6 horas de forneamento.....54



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Cepas selecionadas para a elaboração do *sourdough*, sua origem, classificação fermentativa, capacidade de acidificação e produção de CO<sub>2</sub>.....35
- Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) (log UFC/g) em *sourdough* tipo III seco por liofilização nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento.....43
- Tabela 3 - Propriedades físico-químicas e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) (log UFC/g) em *sourdough* tipo III seco por *spray-drying* nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento.....46
- Tabela 4 - Capacidade fermentativa do *sourdough* tipo III seco por *spray-drying* (FSD) e liofilização (FL), indicando o pH, acidez total titulável (ATT) e bactérias ácido lácticas (BAL) durante o período de 20 horas de fermentação.....49
- Tabela 5 - Parâmetros da textura de pães formulados com adição de *sourdough* tipo III, seco por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PLF), *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC).....56
- Tabela 6 - Valores de pH e acidez total titulável (ATT) de massas cruas (após fermentação) e pães (após forneamento) formulados com adição de *sourdough* tipo III, seco por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PLF), *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC).....58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACC - Associação Americana de Química Clínica

ATT - Acidez Total Titulável

$a_w$  - Atividade de Água

BAL - Bactéria Ácido Láctica

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

DE - Dextrose Equivalente

EPS - Exopolissacarídeos

FODMAPS - Oligo-, Di-, Monossacarídeos e polióis fermentáveis

IG - Índice Glicêmico

ISO - Organização Internacional para Padronização

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

NaCl - Cloreto de Sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SII - Síndrome do Intestino Irritável

Tg - Transição Vítrea

T<sub>0</sub> - Tempo inicial da fermentação

T<sub>12</sub> - Tempo de 12 horas de fermentação

T<sub>24</sub> - Tempo de 24 horas de fermentação

T<sub>m</sub> - Temperatura de Fase da Membrana

UFC - Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
3.1 <i>SOURDOUGH</i> .....	17
<b>3.1.1 Aspectos Nutricionais .....</b>	<b>20</b>
3.2 MÉTODOS DE DESIDRATAÇÃO .....	21
<b>3.2.1 Liofilização .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2 <i>Spray-drying</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3 Viabilidade Celular.....</b>	<b>24</b>
3.1.3.1 <i>Crioinjúria</i> .....	25
3.1.3.2 <i>Inativação por altas temperaturas</i> .....	26
3.1.3.3 <i>Inativação por desidratação</i> .....	28
3.1.3.4 <i>Inativação durante armazenamento</i> .....	29
3.3 AGENTES PROTETORES.....	31
3.4 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DO PÃO FORMULADO COM <i>SOURDOUGH</i> .....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1 MICRORGANISMOS.....	35
4.2 PREPARO DO <i>SOURDOUGH</i> .....	36
<b>4.2.1 Análises do sourdough durante a fermentação.....</b>	<b>36</b>
4.3 SECAGEM DO <i>SOURDOUGH</i> .....	37
<b>4.3.1 Liofilização .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.2 <i>Spray dryer</i> .....</b>	<b>38</b>
4.4 ANÁLISE DO <i>SOURDOUGH</i> SECO .....	38
<b>4.4.1 Umidade e <i>aw</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.2 Viabilidade celular .....</b>	<b>38</b>

4.4.3 pH e ATT .....	39
4.4.4 Capacidade fermentativa .....	39
4.4.5 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV).....	39
4.5 PRODUÇÃO DE PÃES A PARTIR DO FERMENTO EM PÓ.....	39
4.5.1 Análises de propriedades físicas .....	40
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
5.1 RESULTADOS .....	41
5.1.1 Curva de acidificação .....	41
5.1.2 Secagem por liofilização .....	42
5.1.3 Secagem por <i>spray-drying</i> .....	45
5.1.4 Capacidade fermentativa .....	48
5.1.5 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV).....	49
5.1.6 Análise dos pães .....	51
5.1.6.1 Perfil de Textura (TPA) .....	51
5.1.6.1 pH e ATT.....	55
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fermentação e a panificação tem sido, desde os primórdios, um dos elementos centrais da história, o qual construiu e reflete a civilização que temos hoje (ARORA *et al.*, 2020). Também conhecido como massa madre ou *levain*, o *sourdough* é um fermento natural para panificação obtido a partir da atividade metabólica das bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras autóctones presentes na farinha, bem como no ambiente de produção (ARENDR; RYAN; DAL BELLO, 2007). A adição de água à matéria-prima, em temperatura próxima a 25°C, resulta em um ambiente propício para o desenvolvimento dos microrganismos ali presentes, caracterizando no final do processo um ecossistema biológico complexo com características singulares, apropriado para uso como inóculo na produção de panificados (CHAVAN; CHAVAN, 2011).

Entre os diferentes processos fermentativos, o *sourdough* tipo I ainda é muito utilizado por produtores locais e padarias de pequeno porte, porém, a tradição das longas fermentações com constantes períodos de realimentação resulta em produtos não padronizados e inviáveis para aplicação em escala industrial (DECOCK; CAPPELLE, 2005). O fermento *sourdough* tipo II, por outro lado, tem uma maior aplicabilidade industrial e é padronizável. Apesar do fácil escalonamento, a obtenção de um produto estável e com um baixo custo de armazenamento torna-se dificultoso quando em consistência líquida, para isto, técnicas de desidratação podem ser aplicadas a fim de obter um produto seco denominado *sourdough* tipo III, este, porém, majoritariamente exclusivo de grandes padarias e indústrias (GUL *et al.*, 2023). Durante o processo de desidratação, diferentes parâmetros podem acarretar injúrias celulares, podendo ser elas térmicas - por congelamento ou altas temperaturas - ou decorrente a outros estresses gerados nos microrganismos, comprometendo a viabilidade celular e consequentemente a qualidade do produto final (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). A incorporação de agentes protetores previamente à secagem possibilita a potencial proteção das células, promovendo a preservação da viabilidade celular do produto já seco, como já demonstrado em estudos recentes (GUL *et al.*, 2020; MANTZOURANI *et al.*, 2019; STEFANELLO *et al.*, 2019).

O emprego do fermento *sourdough* na formulação de panificados influencia positivamente suas propriedades tecnológicas, essas mudanças podem ser observadas na textura, no aumento da concentração de compostos fenólicos e na diminuição do pH, no qual

auxiliará no prolongamento da vida útil. Além disso, é notável uma superioridade nos atributos nutricionais quando comparado a panificados obtidos a partir da fermentação por leveduras industriais, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (ARIAS *et al.*, 2017; HAMMES *et al.*, 2005; KATINA *et al.*, 2005). Nas primeiras décadas do século XX, a denominada levedura de padeiro (*S. cerevisiae*) desempenhou papel importante no mercado de panificação. Devido a industrialização e a crescente demanda produtiva para um consumo em larga escala, fazia-se necessário um processo fermentativo com um tempo reduzido, sendo inviável manter uma fermentação por 12 horas quando a carência produtiva exigida consistia, em média, duas horas. Assim, o fermento *sourdough* foi gradualmente substituído pela levedura de padeiro. No entanto, o desuso de um *starter* que dispõe de características sensoriais e tecnológicas complexas resultou em produtos panificados inferiores em termos nutricionais e sensoriais (ALBAGLI *et al.*, 2021).

Atualmente, no Brasil, a produção e comercialização do *sourdough* ainda é escassa e seu uso encontra-se limitado, abrange majoritariamente comércios locais e tradicionais de grande porte, os quais empregam apenas as versões tipo I e II do *sourdough* (SIEPMANN *et al.*, 2018). A partir da RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005, o qual especifica regulamentos técnicos para produtos obtidos da farinha, pode-se certificar que os pães de fermentação natural - cujo processo se dá a partir do uso exclusivo de culturas típicas de *sourdough*, desconsiderando o uso de levedura comercial, como *S. cerevisiae* - enquadram-se na definição de "pães". Porém, no Brasil não há legislação específica que defina o pão produzido com *sourdough*. Por outro lado, as legislações francesa (França, Décret n. 93-1074, 1993) e espanhola (Espanha, Real Decreto 308/2019) já possuem diretrizes para categorizar os pães de fermentação natural, bem como delimitam o uso máximo de 0,2% (base farinha total) de levedura de padeiro na massa final do pão. Além disso, a legislação francesa contempla, também, o fermento *sourdough* desidratado, o qual institui a necessidade de uma microbiota ativa na ordem de  $10^9$  (um bilhão) de bactérias e  $10^7$  (dez milhões) de leveduras por grama de fermento em pó após o processo de secagem. Entende-se por ativa, BAL que estão capacitadas à executar as suas funções originais; já a legislação espanhola, delibera que o *sourdough* pode ser seco se, depois de hidratado, possuir uma biota viva capaz de fermentar a massa do pão.

O objetivo do presente trabalho consiste na avaliação do efeito protetivo de diferentes agentes (goma arábica e maltodextrina), a fim de obter um fermento *sourdough* tipo III com alta viabilidade celular, complexidade sensorial e padronização de produto, permitindo a globalização do consumo de pães de fermentação natural de forma prática e acessível.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial protetivo da goma arábica e maltodextrina quando adicionadas em *sourdough* tipo II, produzidos pelas cepas *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* e *Weisella minor*, e submetido à secagem pelas técnicas de liofilização e *spray-drying*, visando garantir um *sourdough* tipo III com uma maior viabilidade celular, capacidade fermentativa e complexidade sensorial de pães produzidos com o produto em pó.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar fermento *sourdough* tipo II adicionado de agentes protetores goma arábica e maltodextrina;
- Realizar curva de acidificação, avaliando contagem de BAL, pH e acidez total titulável (ATT) durante o período de fermentação;
- Secar o *sourdough* por liofilização e *spray-drying*;
- Avaliar a viabilidade celular e capacidade de fermentação durante o armazenamento do fermento *sourdough* tipo III;
- Avaliar a superfície das partículas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Produzir pães adicionados do fermento *sourdough* tipo III que possuir a melhor capacidade protetiva e avaliar a sua influência no pH, ATT e perfil de textura dos pães.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SOURDOUGH

O fermento *sourdough* pode ser considerado o método mais antigo de fermentação espontânea adotado pelo homem, estimando-se o uso deste *starter* natural na produção de panificados por volta de 1.500 a.C. no antigo Egito (CATZEDDU, 2019). Com o aperfeiçoamento dos processos produtivos e fermentativos, atualmente, os diferentes tipos de *sourdough* são categorizados de acordo com seus respectivos métodos de fermentação e as culturas responsáveis pelo processo, podendo ser classificados em quatro tipos. O tipo I, o tradicional, é provido de uma fermentação longa e espontânea a partir da mistura de farinha e água. Por depender dos microrganismos presentes na matéria-prima e no ambiente de produção, segue um processo contínuo de realimentação (do inglês *backslopping*) a cada 12 ou 24 horas. Neste processo, ocorre a adição de uma fração de massa pré-fermentada em porções de farinha e água, com o intuito de fornecer nutrientes para a microbiota originária e controlar a acidez da massa, favorecendo, assim, a seleção das bactérias desejáveis para o produto final. Em até dez dias, com o fermento *sourdough* "maduro", a microbiota estará estabilizada e apta para uso como inóculo na produção de panificados (ARENDDT; RYAN; DAL BELLO, 2007).

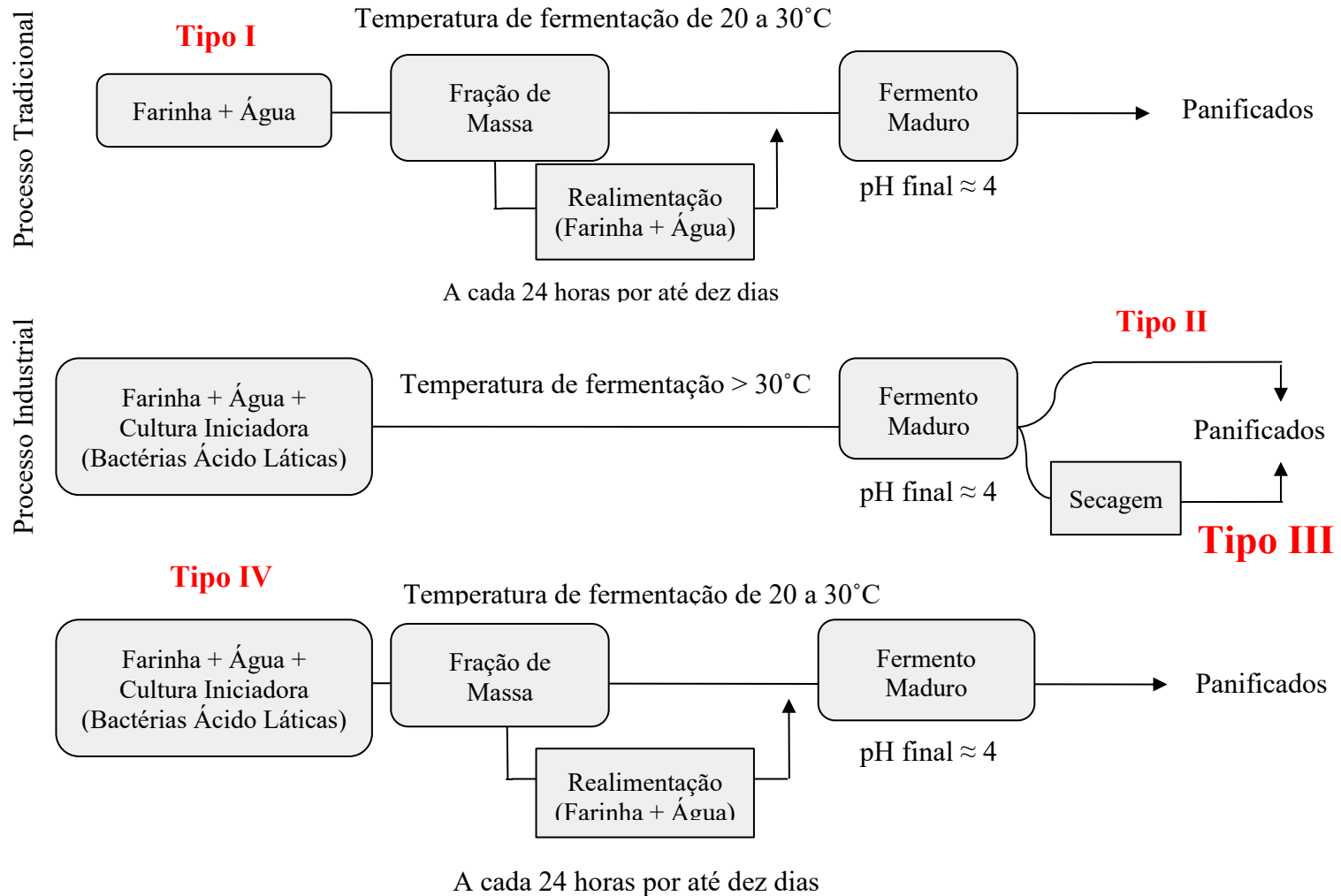
O fermento *sourdough* tipo II emprega o uso de culturas iniciadoras (do inglês *starters*) pré-selecionadas a partir das suas características tecnológicas, acrescentadas à mistura de farinha e água, o que permite a padronização do fermento, e conseqüentemente, do produto final. O processo de fermentação ocorre em uma única etapa, durando de 12 a 24 horas, sem a realização de *backslopping*, comumente utilizado pela indústria alimentícia devido sua rápida fermentação e conveniente padronização. Além disso, ocorre uma melhora na acidez e em vários compostos que aumentam a qualidade sensorial dos produtos (DE MARCO *et al.*, 2022). As BAL frequentemente usadas para a fermentação do tipo II são: *Companilactobacillus farciminis*, *Limosilactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Weisella minor* (DE VUYST; COMASIO; KERREBROECK, 2021; GÄNZLE; ZHENG, 2019). Devido ao tempo reduzido de fermentação, faz-se necessário o uso de cepas microbianas que possuam tolerância a meios ácidos (DE VUYST *et al.*, 2016). De consistência líquida e padronizável, o *sourdough* tipo II é viável para produção e comercialização em escala industrial (REALE *et al.*, 2019), porém, pode apresentar desvantagens quanto à sua estabilidade



a longo prazo e ao custo de distribuição (logística em cadeia de frio) e armazenamento. A fim de suprir essas demandas, o *sourdough* tipo II pode ser submetido à um processo de desidratação, originando o *sourdough* tipo III, um pó estável obtido a partir de secagem por liofilização, *spray-drying*, *drum-drying* ou até leiteo fluidizado (BRANDT, 2019; CHAVAN; CHAVAN, 2011). Este tipo de fermento pode apresentar microbiota ativa - quando a BAL presente na massa resiste à secagem e encontra-se apta para realizar uma nova fermentação, necessitando de uma realimentação antes do uso com o propósito de reativá-las - ou inativa, neste caso é caracterizado como coadjuvante tecnológico, uma vez que amplia a vida útil do produto, por conta do aumento da acidez da massa e carrega compostos aromáticos para o panificado (BRANDT, 2007; DECOCK; CAPPELLE, 2005).

Recentemente, uma nova categoria foi proposta e, até o momento, é empregada majoritariamente em estudos laboratoriais e padarias artesanais. O fermento *sourdough* tipo IV é definido pela incorporação de cultura iniciadora, assim como o tipo II, porém segue o método de realimentação e parâmetros de fermentação característicos do tipo I, portanto, pode ser igualmente nomeado como *sourdough* misto (SIEPMANN *et al.*, 2018; SIRAGUSA *et al.*, 2009). Neste tipo de massa, a microbiota originária da farinha compete com a cultura iniciadora inoculada no início do processo, ocasionando uma seleção natural entre as espécies mais apropriadas ao ecossistema. Devido a este fator, faz-se necessário o uso de culturas iniciadoras altamente competitivas e adaptáveis (RIZZELLO *et al.*, 2011). A obtenção dos diferentes tipos de *sourdough* mencionados são demonstrados pelo fluxograma da Figura 1.

**Figura 1:** Fluxograma dos processos de produção dos *sourdough* tipo I, II, III e IV.



Fonte: Adaptado de DE MARCO *et al.* (2022).

### 3.1.1 Aspectos Nutricionais

Com o passar do tempo, o fermento *sourdough* vem ganhando destaque e espaço na rotina alimentar de consumidores que desejam reinventar seus hábitos e preconizar práticas benéficas à saúde, ao passo que é notório o crescimento do número de pesquisas neste campo, as quais possuem o intuito de compreender as características e atributos nutricionais e funcionais promovidos àqueles que o consumam (ARORA *et al.*, 2020).

Um dos aspectos nutricionais do uso do *sourdough* está relacionado a redução do índice glicêmico (IG), o qual corresponde a velocidade com que o açúcar presente no alimento consumido chega à corrente sanguínea e altera os níveis de glicemia do corpo. Com o intuito de reduzir os riscos de doenças crônicas, se preconiza o controle das elevações pós-prandiais da glicemia e insulina por meio de dietas com baixo IG (TOH; KOH; KIM, 2020). Segundo o estudo realizado por Novotni *et al.* (2012), a adição de 15 a 22,5% de fermento *sourdough* na formulação de pão sem glúten proporciona um menor valor de IG quando comparado ao controle (sem adição do fermento), visto que a presença de ácidos orgânicos provenientes da fermentação do *sourdough* afetam demasiadamente a resposta glicêmica após o consumo de pão. O ácido lático produzido na fermentação desacelera a digestão do amido no estômago, enquanto os ácidos acético e propiônico prolongam a taxa de esvaziamento gástrico, ademais, as modificações químicas que ocorrem durante a fermentação atenuam o grau de gelatinização do amido, promovendo a formação de amido resistente, que possui uma menor digestibilidade (GOBBETTI *et al.*, 2014).

A síntese de exopolissacarídeos (EPS) é responsável pelo aumento do valor nutricional de pães desenvolvidos com fermento *sourdough*, estes polissacarídeos produzidos por determinadas bactérias são responsáveis por estimular a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que auxiliam na redução do risco de distúrbios gastrointestinais, câncer e doenças cardiovasculares no cólon. Os EPS não são digeridos no intestino delgado, o que lhes dispõe a função prebiótica, portanto, há o aumento do número de células de microrganismos benéficos na microbiota intestinal e a redução da colonização de enteropatógenos no intestino. Esta função prebiótica foi confirmada por Arias *et al.* (2017), o qual demonstrou o predomínio de bactérias benéficas quando consumidos pães desenvolvidos com fermento *sourdough*, ao passo que, quando comparado a pães fermentados por “levedura industrial” (*S. cerevisiae*) em um menor tempo, há a proliferação de microrganismos indesejáveis e efeito inflamatório no organismo.

A fermentação *sourdough* tem potencial, também, na redução dos FODMAPs (Oligo-, Di-, Monossacarídeos e polióis fermentáveis), os quais são uma classe de carboidratos não digeríveis pelo trato digestivo humano, em sua maioria de cadeia curta, que, ao serem consumidos por portadores da Síndrome do Intestino Irritável (SII), podem desencadear sintomas como desconforto abdominal, dores e alterações na microbiota intestinal (BÖHN et al., 2015). O estudo recente realizado por Menezes *et al.* (2021) demonstrou o efeito da fermentação do *sourdough* na redução de FODMAPs em pães. O resultado obtido a partir do uso do *sourdough* tipo II, fermentado por 6 horas, mostrou a redução expressiva de até 90%. Esta particularidade demonstra que o fermento é eficiente em reduzir a concentração de FODMAPs a níveis seguros para o consumo por portadores de SII, evitando os sintomas gastrointestinais.

### 3.2 MÉTODOS DE DESIDRATAÇÃO

Há décadas, a técnica de secagem vem sendo utilizada para a preservação de alimentos a longo prazo. Este método diminui o espaço necessário para armazenamento em diferentes condições ambientais, facilitando o transporte dos produtos (ALVES *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2017). A aptidão de produtos para submissão a longos períodos de estocagem deve-se às reduções de atividade de água ( $a_w$ ) a  $< 0,3$  e de umidade a  $< 7\%$ , resultantes do processo de desidratação, que são capazes de inibir as atividades enzimáticas e de microrganismos, assim como reações químicas não enzimáticas, as quais serão responsáveis pelo aumento da vida útil e estabilidade do produto (ERMIS, 2022; DE MARCO *et al.*, 2022).

Quando aplicado em culturas microbianas, o sucesso do processo de secagem depende da preservação da viabilidade celular e conservação de um número suficiente de células que garantam a replicação, mantendo as características que as cepas originárias. O baixo teor de umidade impacta na diminuição dos processos metabólicos e na preservação das estruturas celulares, implicando na taxa de células viáveis durante o armazenamento (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008).

### 3.2.1 Liofilização

A liofilização (do inglês *freeze-drying*), é uma tecnologia de secagem caracterizada pela remoção da água presente na amostra através da sublimação. O processo ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, o qual possibilita a transformação direta da água - previamente congelada - do estado sólido para o estado gasoso (STEFANELLO *et al.*, 2018). A partir do emprego de vácuo e baixas temperaturas, garante-se a conservação dos compostos aromáticos voláteis - uma vez que não são absorvidos pelo vapor d'água, permanecem presos na matriz, contribuindo, então, para a conservação do aroma no produto final já seco - evita-se reações de oxidação e mantém-se a qualidade nutricional (CAGLAR; ERMIS; DURAK, 2021).

O pré-tratamento da amostra se dá pelo congelamento, o qual é responsável pela maior parte da inativação celular durante o processo de secagem e dita a qualidade do produto final. A variação na taxa de congelamento ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) possibilita a formação de diferentes tamanhos de cristais de gelo e a formação de poros na superfície da amostra, os quais influenciam na reidratação do pó e na viabilidade celular. Uma taxa lenta de congelamento forma cristais de maior tamanho, localizados no meio extracelular, que promovem uma rápida saída da água, uma vez que se formam canais e poros na superfície que facilitam o escape de vapor durante a secagem. Em contrapartida, o aumento da taxa de congelamento resulta na formação de cristais menores e amorfos, os quais se dispõem na região intracelular, indicado para amostras que preconizam a preservação da viabilidade celular, uma vez que cristais maiores podem causar danos à membrana celular dos microrganismos (BHATTA; STEVANOVIC JANEZIC; RATTI, 2020; ERMIS, 2022; MORGAN *et al.*, 2006).

O ciclo de secagem pode ser dividido em duas etapas. Na primeira etapa, cerca de 90% da água é eliminada por sublimação, os cristais de gelo são removidos ao reduzir a pressão da câmara - a um valor inferior ao da pressão de vapor do gelo presente no produto - e adiciona-se calor, podendo ser este por convecção, condução ou radiação. O primeiro estágio de desidratação se encerra com o aumento da temperatura do produto a um valor próximo à temperatura ambiente ou pela observação visual da ausência da interface entre camada congelada e camada seca (ORDÓÑEZ, 2005; STEFANELLO *et al.*, 2018). A segunda etapa caracteriza-se pela remoção da água que está fortemente ligada à matriz sólida, visando a estabilização do produto final. Esta dessorção é realizada pela permanência do alimento parcialmente seco no liofilizador até atingir a umidade requerida para o produto, preservação do vácuo e conseqüente igualação da temperatura ao da placa (20 a 60  $^{\circ}\text{C}$ ) ou à temperatura ambiente (MORGAN *et al.*, 2006; ORDÓÑEZ, 2005).

A liofilização é o método de secagem mais utilizado quando visada a preservação da viabilidade celular. No ensaio conduzido por Caglar; Ermis; Durak (2021), o autor obteve um *sourdough* em pó com contagem de 8 log UFC/g, um ciclo logarítmico menor quando comparado ao produto fresco (9,7 log UFC/g). Assim como o prolongamento da vida útil e garantia de qualidade do produto final, este método despense alto custo de fabricação quando comparado a outros, uma vez que a demanda de energia é exacerbada para a manutenção das baixas temperaturas e do vácuo por longos períodos de tempo (DE MARCO *et al.*, 2022).

### 3.2.2 *Spray-drying*

A secagem por atomização (do inglês *spray-drying*), é uma técnica predominante na indústria de alimentos por propiciar produções em larga escala, com uma versatilidade operacional, mantém a alta eficiência com um menor custo quando comparada a secagem por liofilização (MORGAN *et al.*, 2006; PEIGHAMBARDOUST; GOLSHAN TAFTI; HESARI, 2011).

Os parâmetros de processo são pré-estabelecidos baseando-se nas características de secagem de diferentes matérias-primas e nas propriedades que se deseja obter no pó (PEIGHAMBARDOUST; GOLSHAN TAFTI; HESARI, 2011). Taxa de alimentação, vazão de ar, temperaturas de entrada e saída, assim como o teor de umidade final e uso de protetores são variáveis que influenciam diretamente a qualidade da secagem e do produto final, especialmente quando o intuito é a preservação da viabilidade celular (ALVES *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2018). Secagens realizadas fora do parâmetro ideal podem acarretar alterações sensoriais indesejadas, como perda de compostos voláteis, mudança de coloração e sabor do produto final (MARTINS *et al.*, 2020).

A mistura líquida contendo sólidos em solução, suspensão ou emulsão é bombeada a alta pressão e ejetada por um bico ou disco atomizador. Decorrente da alta pressão em uma pequena área, a mistura é atomizada em gotículas na ordem de 10 - 200  $\mu\text{m}$  na câmara de secagem a pressão reduzida, as quais vão de encontro com um fluxo de ar quente, entre 150 a 200°C, podendo ser um sistema corrente, contra-corrente ou misto. O aumento expressivo da área superficial da gotícula permite a transferência de calor - do ar para a partícula - com uma subsequente transferência de massa (água) - da partícula para o ar - em aproximadamente 30 segundos, a evaporação instantânea do solvente presente na camada externa da molécula evita a degradação térmica do produto. Após a retirada da umidade do interior da partícula, há a

separação ultrarrápida dos solúveis e dos sólidos em um ciclone, este sistema de separação retém o pó em um compartimento ao passo que elimina o ar para a atmosfera (MOREIRA *et al.*, 2021; REALE *et al.*, 2019; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008; TAN; POH; CHIN, 2018).

Segundo o estudo realizado por Fu *et al.* (2018), o consumo energético empregado pelo *spray dryer* é aproximadamente 70% menor quando comparado a liofilização. Quando analisado pela perspectiva produtiva - a depender dos equipamentos, demanda de mercado e escala de produção - o estudo mostra que o *spray dryer*, processo contínuo, produz cerca de 50.000 toneladas ao ano, enquanto a liofilização, processo definido por batelada, possibilita a produção média de 10.000 toneladas ao ano. Entretanto, segundo trabalhos realizados com secagem de *sourdough* pelo método de *spray dryer*, este processo de desidratação resulta na diminuição do número de células viáveis no produto final, como evidenciado por Caglar; Ermis; Durak (2021), o qual relatou uma queda de 4,7 log UFC.g<sup>-1</sup> após a secagem; assim como foi reportada, também, a queda de 9 log para 5 log UFC.g<sup>-1</sup>, por TAFTI *et al.* (2013). Portanto, é de suma importância pré-estabelecer parâmetros de secagem que reduzam a perda de viabilidade durante a secagem, como a variação da temperatura de saída, por exemplo, em que a redução de 31,5°C pode aumentar em 84% a taxa de sobrevivência das células como observado por Behboudi-jobbehdar *et al.* (2013).

### 3.2.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular refere-se à capacidade de reprodução da célula, esta multiplicação resultará no aumento de UFC durante os períodos de fermentação. Fatores intrínsecos, como, estresses osmótico, oxidativo e térmico podem influenciar na perda de viabilidade, assim como o aquecimento e a desidratação da célula (FU; CHEN, 2011). Parâmetros de secagem são fatores extrínsecos que devem ser pré-estabelecidos a fim de minimizar mecanismos de inativação celular durante o processo, estes estão correlacionados com a variação de umidade e temperatura relativa, tempo de retenção durante a secagem, ou até mesmo a taxa de alimentação da amostra no equipamento, fatores determinantes para a diminuição da viabilidade celular (GONG *et al.*, 2014).

### 3.1.3.1 Crioinjúria

O tratamento prévio aplicado na amostra que é submetida ao processo de liofilização se dá pelo congelamento a temperaturas abaixo de 0°C e posterior aumento até atingir a temperatura ambiente - segunda etapa do processo - fazendo com que a amostra transpasse duas vezes a zona intermediária de temperatura (-15°C a -60°C), o qual oferece grande letalidade às células. A inativação celular se dá majoritariamente durante este pré-tratamento. A taxa de congelamento é considerada um parâmetro importante a ser controlado, uma vez que, durante este processo, a água presente no meio intracelular desempenhará o papel na manutenção do equilíbrio osmótico entre a célula e o meio externo. Esta velocidade de congelamento resultará em diferentes conformações de cristais de gelo, podendo acarretar danos mecânicos à membrana celular (GAO; CRITSER, 2000).

O super-congelamento (do inglês *supercooling*), é o fenômeno no qual um líquido é mantido em temperaturas abaixo do seu ponto de fusão sem que ele passe para estado sólido (WILSON, 2012). De acordo com a hipótese dos dois fatores, proposta por Mazur e colaboradores (MAZUR; LEIBO; CHU, 1972), em congelamentos suficientemente lentos, a célula terá uma rápida perda de água por osmose a fim de eliminar a água super resfriada do interior e manter o equilíbrio osmótico entre os meios interno e externo - uma vez que a água super resfriada tem maior potencial químico quando comparado a água parcialmente congelada da parte externa - resultando na desidratação da célula e no não congelamento do meio intracelular. Quando realizado um congelamento excessivamente lento, há o encolhimento severo do volume, obtendo uma célula desidratada e não congelada internamente. Caso a taxa de congelamento seja acelerada, ela não será capaz de perder água na velocidade suficiente para manter o equilíbrio osmótico, o qual resultará na formação de cristais de gelo intracelulares. Uma taxa ótima de congelamento, deve ser, então, suficientemente lenta para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, e suficientemente rápida para minimizar os efeitos das soluções retratados previamente. A Figura 2 exemplifica os efeitos à célula decorrente das taxas de congelamento.



**Figura 2:** Representação gráfica dos eventos físicos às células a partir da taxa de congelamento.



(a) Em congelamento lento, a taxa de crescimento do cristal e o gradiente de concentração entre as células e arredores é baixo. A água tem tempo suficiente para se difundir das células para manter o equilíbrio osmótico, sendo congelada fora das células. (b) Em congelamento ideal, a taxa de crescimento do cristal e o gradiente de concentração são maiores, porém, a difusão da água é retardada pelo aumento da viscosidade devido à concentração e redução da temperatura. (c) Em um congelamento muito rápido, a redução acentuada da temperatura restringe a difusão da água, apesar do alto gradiente de concentração, portanto, os cristais de gelo se formam no interior da célula.

**Fonte:** Santivarangkna; Kulozik; Foerst (2008).

### 3.1.3.2 Inativação por altas temperaturas

Em secagem por *spray dryer*, as amostras são atomizadas para a câmara de secagem em alta pressão, formando gotículas, esta intensa tensão de cisalhamento pode causar danos à parede celular pela desnaturação irreversível da proteína, além disso, submete as células à exposição demasiada ao oxigênio, fator degradante para bactérias microaerófilas, como as BAL (TAN; POH; CHIN, 2018). O oxigênio pode acelerar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o contato prolongado ocasiona estresse oxidativo à célula, acarretando a ruptura celular, encolhimento da célula e oxidação lipídica (ERMIS, 2022).

Na primeira etapa do processo, há uma taxa de secagem constante, em que a temperatura é limitada à temperatura de bulbo úmido, devido ao efeito de resfriamento evaporativo, o grau de resfriamento é determinado pela velocidade da evaporação, sendo assim, quanto mais lento o processo evaporativo, menor será a queda de temperatura da partícula. Na segunda etapa, o

período de taxa de secagem encontra-se decrescente, diversos parâmetros influenciam o decaimento da viabilidade celular (ERMIS, 2022; MOREIRA *et al.*, 2021).

Diferentes parâmetros de secagem podem ser pré-estabelecidos a fim de aumentar a sobrevivência e estabilidade celular durante a secagem, fatores como temperaturas de entrada e saída, o tempo de secagem, o tamanho das partículas e o teor de sólidos solúveis são as condições majoritariamente impactantes na viabilidade do produto final (TAN; POH; CHIN, 2018). Vale destacar, também, que o tipo de espécie/cepa que passa pelo processo de desidratação pode apresentar resistências diferentes ao processo de secagem, em razão dos seus valores de Z, intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de morte, em que valores maiores de Z geralmente levam a taxas de sobrevivência mais altas (FORSYTHE, 2013), como apresentado no trabalho de TO; Etzel (1997), que sob as mesmas condições de temperatura de saída (65°C) a taxa de sobrevivência do *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* D11 e o *Lp. plantarum* UL137 foram de 2,95% e 14,7%, respectivamente.

Segundo a Teoria da inativação por calor, apresentada por Gould em 1989, temperaturas altas são responsáveis pela inativação de componentes críticos e componentes não críticos - estes estão em maior quantidade, comumente - simultaneamente. A degradação de componentes não críticos não acarreta na morte celular, até que a célula seja submetida a um nível severo de estresse e/ou estes componentes estejam em níveis muito reduzidos (GOULD, 1989; MACKAY, 2000). O ribossomo, constituinte celular responsável pela síntese de proteínas, é considerado um componente crítico para a inativação térmica, pois quando inativado, é irreversivelmente prejudicial à ela, além disso, componentes celulares críticos induzem a inativação de outros componentes (LEE; KALETUNÇ, 2002; OBUCHI *et al.*, 2000). Temperaturas abaixo de 64 °C danificam estruturas contidas ou constituintes da membrana celular, 65°C e acima, ocorre a desnaturação das proteínas e danificação de ribossomos, bem como danos à parede celular, os quais podem ser responsáveis pela morte térmica (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008). Temperaturas de saída maiores que 85°C são letais para secagem de células probióticas, como evidenciado nos trabalhos de Zhang; Lin; Zhong, (2016) o qual obteve um aumento na viabilidade de 2,4 log UFC.g<sup>-1</sup> a partir da redução de 30°C na temperatura de saída, decaindo de 100 para 70°C.

A uso de altas temperaturas levam a uma taxa de secagem mais rápida, consequentemente, propicia a rigidez superficial do material que está sendo seco, o que dificulta a saída da água do interior da célula. Um curto tempo de retenção acarreta mudanças drásticas na temperatura e no teor de umidade da célula, implicando em uma maior inativação celular (GONG *et al.*, 2014).

O tamanho das partículas é considerado, também, um fator crucial para a viabilidade celular durante o processo de secagem, pois influencia significativamente o gradiente de temperatura e umidade tanto dentro das partículas quanto no sistema como um todo (ERBAY; HEPBASLI, 2013). A variação na dimensão pode ser ajustada pelo tipo de bico e a pressão de atomização aplicada, bicos com aberturas maiores associados a baixas pressões originam partículas grandes, a recíproca também é válida. A variação da velocidade de secagem é obtida conforme a dimensão exposta para secagem, devido ao aumento ou diminuição da área de superfície (ERATTE *et al.*, 2016; RANADHEERA *et al.*, 2015). Viscosidade, densidade e tensão superficial são propriedades físicas que afetam igualmente o tamanho da partícula (LIEVENSE; VAN'T RIET, 1993).

A fim de evitar uma inativação térmica significativa durante o processo de secagem, pode-se definir uma proporção adequada de líquido - umidade - para ar, garantindo que a quantidade de calor transferido do ar quente para o líquido seja suficiente para que ocorra a evaporação da umidade sem comprometer a qualidade do produto final. Esta relação pode ser ajustada a partir do teor de sólidos solúveis da amostra (TAN; POH; CHIN, 2018). Este fenômeno pode ser observado pelos resultados obtidos por Reale *et al.* (2019), em que a variação da temperatura do ar de saída associado ao teor de sólidos solúveis, em secagem por *spray dryer*, influenciaram na sobrevivência de BAL e leveduras; o tratamento diluído na razão 1:2 (*sourdough*:água destilada) apresentou uma perda de 2 ciclos logarítmicos para BAL e leveduras, por sua vez, quando diluído em 1:5 (*sourdough*:água destilada) apresentou a queda de apenas um ciclo logarítmico.

### 3.1.3.3 Inativação por desidratação

Diferentes métodos de secagem são utilizados com o intuito de reduzir o teor de água e, assim, retardar processos metabólicos durante o armazenamento. Células bacterianas contêm entre 70 - 95% de água, este soluto contribui para a estrutura celular, bem como confere estabilidade às proteínas, DNA e lipídios (POTTS, 1994). O teor de água necessário para a BAL desempenhar suas funções fisiológicas é de cerca de 0,5 g H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> de peso seco, caso a umidade ao final do processo de secagem esteja abaixo do teor de água da monocamada, as células se tornam instáveis ou até mesmo inviáveis (AGUILERA; KAREL, 1997; ZAYED; ROOS, 2004). A membrana celular e o citoplasma são os locais majoritariamente danificados pelo estresse causado pela desidratação; índices de  $a_w$  inferiores a 0,82 acarretam a inativação das células

(GONG *et al.*, 2014). A integridade da membrana celular é afetada proporcionalmente à redução da  $a_w$  e aos teores de umidade menores que 40%, causando danos irreversíveis à célula - inativação celular - quando abaixo de 20%, como relatado no estudo conduzido por Bauer *et al.* (2012).

A estabilidade da bicamada lipídica depende da atração de Van der Waals e das forças repulsivas, em um processo de secagem, onde há remoção da água, reforça a interação entre Van der Waals e a cadeia de hidrocarbonetos, fazendo com que a membrana transite do estado líquido cristalino para uma fase de gel. O aumento gradual da temperatura de fase da membrana ( $T_m$ ) ocorre à medida que o teor de água diminui (JACOBSON; PAPAHADJOPOULOS, 1975). As estruturas da bicamada lipídica são termodinamicamente instáveis e facilmente perturbadas, tornando-se um alvo primário para danos induzidos por desidratação (COX, 1993). Tem-se conhecimento que as funções das membranas e proteínas são mantidas pela fluidez das membranas, alterações provocadas na fluidez devido a desidratação influenciam na modificação da função de algumas enzimas ou proteínas (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005; SPECTOR; YOREK, 1985). Após o processo de secagem, as células lesadas tornam-se mais sensíveis, especialmente à alta concentração de NaCl, há perda parcial de alguns materiais citoplasmáticos, incapacidade de remover os ROS - células não desidratadas abstraem por meio de um sistema auto-regulador - por reações químicas normais, devido ao aumento na concentração do citoplasma, mudanças no pH e alterações na fluidez da membrana (SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008; TEIXEIRA; CASTRO; KIRBY, 1995).

#### *3.1.3.4 Inativação durante armazenamento*

Assegurar a estabilidade do produto no decorrer do período de armazenamento é primordial para a garantia da sua qualidade, a preservação da viabilidade celular dependerá dos parâmetros designados na secagem - temperatura de secagem, tempo de retenção, uso de agentes protetores - assim como as condições de armazenamento que são empregadas, tendo a umidade controlada e a temperatura ótima de armazenamento como fatores fundamentais. Além disso, a variação na tolerância própria de cada microrganismo deve ser avaliada conjuntamente (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008). De modo geral, a contagem de células viáveis pode cair até 75% quando passados 50 dias do processo de secagem, e até 90% após 200 dias de armazenamento (TAN; POH; CHIN, 2018).

Conforme atestado por (ZAYED; ROOS, 2004), a quantidade de água restante após a secagem, além de impactar a viabilidade celular no tempo zero, implica na inativação durante o período de armazenamento, portanto, os teores de umidade devem ser baixos o suficiente para as partículas permanecerem secas em estado vítreo. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), fator determinante do estado vítreo, tem uma dependência significativa na temperatura e no teor de água, este indica a estabilidade e taxas de mudanças físicas, químicas e biológicas da partícula (AGUILERA; KAREL, 1997; OYINLOYE; YOON, 2020). Durante o armazenamento, o emprego de temperaturas abaixo da  $T_g$  resulta em um produto estável, em contrapartida, quando em temperaturas altas ou próximas à  $T_g$ , causam uma maior movimentação das moléculas de água e provocam mudanças na estrutura da matriz vítrea, (BEHBOUDI-JOBBEHDAR *et al.*, 2013; SAVEDBOWORN *et al.*, 2017), acarretando no decréscimo de contagem celular, este parâmetro foi estudado por Gul *et al.* (2020), o qual verificou uma maior contagem de BAL ao armazenar o *sourdough* - seco por *spray dryer* - a 4°C quando comparado ao armazenamento a 25°C, fator atrelado a possíveis reações prejudiciais à célula.

Danos durante o período de armazenamento se dão, também, pela mudança no perfil de ácidos graxos das BAL, o aumento da proporção de ácido graxo saturado esterificado está fortemente atrelado à morte celular, uma vez que a mudança dos lipídios da membrana - de líquido para uma fase mais cristalina - aumenta a  $T_m$ , acarretando na diminuição da fluidez da membrana (CASTRO; TEIXEIRA; KIRBY, 1996). Após a secagem por *spray dryer*, há diminuição na razão entre os ácidos graxos saturado/insaturado, demonstrando, assim, os possíveis danos causados pela oxidação lipídica às estruturas celulares com esta molécula em sua composição (TEIXEIRA; CASTRO; KIRBY, 1995). A lipólise dá-se quando apresentado baixa  $a_w$ , valores inferiores a 0,1 g.H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> de peso seco se faz necessário quando efetuado longos períodos de armazenamento, visto que esta fração aquosa contribui para a estrutura celular, estabilização e reações bioquímicas nas células (GAO; CRITSER, 2000).

Controle da umidade, temperatura, presença de oxigênio e incidência direta de luz são fatores críticos para a preservação da viabilidade (FU; CHEN, 2011), à vista disso, faz-se uso de embalagens com barreira protetora a estes agentes reativos, como bolsas laminadas, blister ou vidro cor âmbar, a fim de minimizar os efeitos degradantes (MORGAN *et al.*, 2006).

### 3.3 AGENTES PROTETORES

Diante dos variados mecanismos de inativação celular, diferentes métodos de preservação são implementados com o intuito de reduzir as perdas durante o processo de secagem e garantir uma alta estabilidade durante o período de armazenamento (STEFANELLO *et al.*, 2019). Agentes crioprotetores, como por exemplo a sacarose, maltose, lactose, proteína do soro do leite e caseína auxiliam na diminuição da letalidade ocasionada pela formação dos cristais de gelo durante a etapa de congelamento, protegem as proteínas termossensíveis e estabilizam a membrana celular (SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008). A trealose, por exemplo, é comumente aplicada em secagem por liofilização devido a sua ação crioprotetora, sendo capaz de penetrar na membrana celular e formar pontes de hidrogênio com os grupos carbonila dos fosfolipídios (DIAZ *et al.*, 1999; LUZARDO *et al.*, 2000), impedindo a passagem da fase fluida para a fase gel da membrana, mantendo a sua integridade e fluidez. Além disso, a ligação deste dissacarídeo não permite a alteração do espaçamento entre os fosfolipídios, evitando, assim, as separações dos componentes da membrana (PANEK; MANSURE; ELEUTHERIO, 1993). Esta ação crioprotetora foi avaliada por Stefanello *et al.* (2018) durante a secagem por liofilização de *sourdough* tipo I, o qual demonstrou uma redução de 2,0 log UFC.g<sup>-1</sup> de BAL nas amostras controle (sem adição de agentes), ao passo que as amostras que continham a inclusão de 15% de trealose mantiveram a contagem inicial.

Protetores como glicose, frutose e manose também são empregadas em secagens. A adição desses solutos tem a capacidade de manter o equilíbrio osmótico e estabilizar as proteínas e a membrana a medida que há a evaporação da água (WEN *et al.*, 2019), assim como o sorbitol e o manitol reduzem a oxidação dos ácidos graxos da membrana durante a secagem e ao posterior armazenamento. Estudos reportaram o efeito protetivo dos carboidratos, também, injúrias térmicas causadas pela secagem em *spray dryer*. (TYMCZYSZYN; GÓMEZ-ZAVAGLIA; DISALVO, 2007) obtiveram alta viabilidade celular de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* quando incorporados carboidratos (trealose, sacarose ou maltose) seca a 70 °C a vácuo.

A maltodextrina, carboidrato produzido a partir da hidrólise do amido de forma enzimática ou físico-química, é um agente protetor comumente empregado na secagem por *spray dryer*, devido a sua baixa higroscopicidade, alta solubilidade e baixo custo (BHANDARI; DATTA; HOWES, 1997). Este possui diferentes graus de dextrose equivalente (DE), o qual pode ser relacionado ao grau de polimerização, portanto, o valor de DE equivale a sua capacidade redutora com relação a dextrose pura (D-glicose), indicando, assim, variação na sua

higroscopicidade e solubilidade (BEMILLER; WHISTLER, 1996). Durante a secagem em atomização, a maltodextrina possibilita a dispersão, evitando aglomerações e uma granulação homogênea. Quando aplicado no processo de liofilização, previne a cristalização e controla o congelamento auxiliando na dispersibilidade (ALEXANDER, 1996).

A goma arábica, também conhecida como goma acácia, é um polissacarídeo de origem natural com grande uso industrial como estabilizador, espessante e aditivo tecnológico (PRASAD *et al.*, 2022). Durante a secagem e armazenamento auxilia na manutenção da viscosidade e no impedimento de transformações estruturais, como colapso e cristalização. Além disso, tem atividade antioxidante - pela redução de radicais livres - e contribui, também, para a retenção de compostos voláteis (RIGHETTO; NETTO, 2005; RISCH; REINECCIUS, 1995). Alguns estudos indicam que a goma arábica possui valores de Tg maiores que a maltodextrina, portanto, sugere-se que o emprego da goma como agente protetor pode ser mais eficiente à maltodextrina (MCNAMEE; O'RIORDA; O'SULLIVAN, 1998; PRASAD *et al.*, 2022).

A formação vítrea é um fator primordial para a estabilização das culturas durante o armazenamento, agentes que possuem o maior Tg são considerados mais eficientes para a estabilidade da matriz (BRYANT; KOSTER; WOLFE, 2001). Determinados agentes protetores induzem o aumento da viscosidade - ao redor ou abaixo da Tg - estabilizando os componentes celulares e retardando a mobilidade molecular, assim, retardando as reações de deterioração (BUITINK *et al.*, 2000; KAWAI; SUZUKI, 2007). HIGL *et al.* (2007) analisou os efeitos das matrizes da lactose em estado vítreo e não vítreo na inativação do microrganismo *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* durante o armazenamento, diante de um rigoroso controle das condições do experimento, foi conclusivo que a taxa de inativação é menor quando em estado vítreo, havendo uma ampla inativação celular sob estado não vítreo, frente a temperatura de armazenamento e a  $a_w$ . Contudo, foi considerado pelo autor a possível presença de outros mecanismos causadores de inativação durante o experimento, sendo assim, não categoriza o estado vítreo como um limiar absoluto de inativação. Ao longo da remoção contínua da água durante a secagem, a membrana celular torna-se um local crítico para injúrias, decorrente do vazamento na membrana celular devido à Tm. Os carboidratos assumem a função protetiva à membrana, a partir da diminuição da Tm, possibilitando, assim, a retenção da fase líquida cristalina perante certas condições de secagem (SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008).

O uso de agentes é notavelmente vantajoso para a preservação da viabilidade celular, todavia, um elevado teor de sólidos implica no decaimento da preservação dos microrganismos.

Uma dimensão maior da partícula reduz a taxa de secagem, exigindo um tempo de processo prolongado, o qual pode desencadear a morte celular antes da secagem completa (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). A permanência dos agentes na superfície da membrana é considerada um fator decisivo para a garantia do efeito protetivo. Além disso, polímeros com alto peso molecular não possuem tamanho ou estrutura capazes de introduzir-lhes entre as superfícies - principalmente quando há a diminuição no espaço da bicamada desidratada - sendo incapaz de realizar as ligações. Desta forma, o agente vitrifica no exterior da membrana e não realiza a diminuição na  $T_m$ , não exercendo a proteção das células durante a secagem (KOSTER *et al.*, 2000; KOSTER; MADDOCKS; BRYANT, 2003).

### 3.4 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DO PÃO FORMULADO COM *SOURDOUGH*

As BAL predominantes no *sourdough* podem ser agrupadas em homofermentativas, produtoras de ácido lático como principal produto da fermentação, ou heterofermentativas, produtoras de ácido lático, dióxido de carbono ( $CO_2$ ), ácido acético e etanol (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). A produção de ácidos orgânicos oferece uma complexidade sensorial, extensão da vida útil, e uma caracterização ácida aos pães formulados com o fermento *sourdough*. A acidificação da massa contribui para a hidrólise parcial do amido e proteólise controlada das proteínas do glúten (gliadina e glutenina), resultando em uma massa mais extensível e menos elástica (CLARKE *et al.*, 2004). A proteólise parcial resulta em uma maior absorção de água pelo glúten, produzindo assim, miolos macios e com retardamento do endurecimento (HAMMES; GÄNZLE, 1998), estas propriedades à textura são igualmente observadas pelo EPS, que se liga à água presente no meio, diminuindo a água livre para a retrogradação do amido (GOBBETTI *et al.*, 2014; TIEKING; GÄNZLE, 2005). Segundo o estudo realizado por Tafti *et al.* (2013), quanto maior o percentual de *sourdough* tipo III adicionado à formulação de pão, maior a absorção de água e o grau de amolecimento da massa.

Além do aperfeiçoamento da textura do panificado, a diminuição do pH dificulta o crescimento de bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de esporos capazes de sobreviver ao processo de forneamento (ROSENKVIST, 1995), ocasionando a produção de metabólitos tóxicos ao consumidor e responsáveis pela *rope spoilage*, deterioração do pão caracterizado pela descoloração do miolo e odor doce de fruta (DE BELLIS *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2020). Os ácidos lático, acético e valérico produzidos durante a fermentação do *sourdough* possuem ação antifúngica, retardando o aparecimento de fungos filamentosos, como



evidenciado por Rizello *et al.* (2011), em que expôs fatias de pão feito com adição de 4% de fermento *sourdough* (*Lp. plantarum* e *Furfurilactobacillus rossiae*) liofilizado, armazenadas em saco de polietileno em temperatura ambiente, após 28 dias foi notável a contaminação por fungos. Diante da atividade sinérgica dos metabólitos produzidos pelas BAL e leveduras durante a fermentação, nota-se uma potencial solução ao uso exacerbado de conservantes e aditivos químicos pela indústria de panificação (QUATTRINI *et al.*, 2019; RIZZELLO *et al.*, 2011).

Durante a fermentação, aminoácidos fornecidos pela proteólise são convertidos em compostos aromáticos (GÄNZLE; LOPONEN; GOBBETTI, 2008), podendo, também, haver a sua formação pela oxidação dos lipídios, reações enzimáticas e metabolismo de BAL e leveduras, trazendo complexidade ao produto final (HADIYANTO *et al.*, 2007). Cerca de 196 compostos voláteis são provenientes da fermentação, podendo ser divididos em diferentes grupos químicos: aldeídos, álcoois, ésteres, cetonas, ácidos, furanos, entre outros (PÉTEL; ONNO; PROST, 2017). Ao analisar pães formulados com *sourdough* tipo III, Mantzourani *et al.* (2019) identificaram compostos como etanol, acetato de etila e butirolactona, além disso, os autores salientaram que o pão feito com o *sourdough* tipo II (*L. paracasei* K5 liofilizado e imobilizado) foi mais resistente à deterioração por bolor e *rope spoilage*, devido a sua maior carga de ácidos orgânicos. Parâmetros como temperatura, rendimento da massa, tempo de fermentação e o tipo de farinha podem afetar de forma variada a produção de compostos voláteis e produção de ácidos orgânicos (GOBBETTI *et al.*, 1995).

Durante o forneamento, com o uso de temperaturas acima de 150°C, ocorre a caramelização do açúcar e liberação de compostos voláteis (BIANCHI *et al.*, 2008). A reação de Maillard é uma reação não enzimática que ocorre entre o açúcar redutor - liberado pelo metabolismo da BAL - e os aminoácidos, formando as melanoidinas (pigmento amarronzado) e liberando aromas durante o assamento (GOBBETTI *et al.*, 1995; PURLIS; SALVADORI, 2009).

A obtenção de pães com maior volume decorre da produção de CO<sub>2</sub> pelas BAL e leveduras autóctones da farinha. Propriedades atreladas ao volume e redução de dureza foram relatadas por Katina *et al.*, (2006), onde houve um aumento de 0,2 - 0,5 ml/g de volume específico e a diminuição da dureza após quatro dias de armazenamento, quando incorporado 20g de *sourdough* tipo II (*Lb. brevis*) /100g de farinha.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS

A partir do estudo realizado por Menezes *et al.* (2021), o qual relacionou a aptidão tecnológica de diferentes espécies de BAL, parâmetros como produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), potencial de acidificação, preferência metabólica por carboidratos e produção de EPS, foram utilizados como critério para a seleção das culturas iniciadoras. Para a realização deste trabalho, foram selecionadas três diferentes espécies de BAL pertencentes ao cepário do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo elas *Lactiplantibacillus plantarum*, *Weisella minor* e *Levilactobacillus brevis* conforme demonstrado na Tabela 1. Estas foram mantidas sob congelamento a - 20°C em tubos tipo *ependorf* contendo caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e glicerol 20% (Quimibrás AS, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil).

Para a recuperação das cepas, foram realizadas duas reativações consecutivas em caldo MRS adicionado de maltose 1% a 36°C por 24h em jarra hermética com sistema gerador de anaerobiose (Anaerocult, Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha). Em seguida, os caldos foram centrifugados a 4.500 rpm por 5 min, as células lavadas duas vezes em solução de Ringer (Oxoid) e ressuspensas na mesma solução, obtendo uma concentração final de 10<sup>9</sup> UCF/ml. O combo utilizado como cultura iniciadora foi formado, então, pela junção das três cepas de BAL nas mesmas concentrações celulares (Tabela 1).

**Tabela 1:** Cepas selecionadas para a elaboração do *sourdough*, origem, classificação fermentativa, capacidade de acidificação e produção de CO<sub>2</sub>.

Microrganismo	Cepa	Origem	Classificação*	Capacidade de acidificação	Produção de CO <sub>2</sub>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	LBP UFSC 21	Desconhecida	HeteF	pH < 4,15**	-
<i>Levilactobacillus brevis</i>	LBP UFSC 4901	<i>Sourdough</i>	HeteO	pH < 4,50**	+
<i>Weissella minor</i>	LBP UFSC 4451	<i>Sourdough</i>	HeteO	pH < 4,30***	-

\*HeteF: heterofermentativo facultativo; HeteO: heterofermentativo obrigatório;

\*\*24h de fermentação em meio adicionado de leite desnatado (Molico, Nestle, São Paulo, São Paulo, Brazil);

\*\*\*24h de fermentação em meio adicionado de farinha de trigo (Ecobio, Coronel Bicaco, Rio Grande do Sul, Brazil);

+ capacidade de produção de CO<sub>2</sub> em 48h de fermentação em massa de farinha de trigo; - ausência de produção de CO<sub>2</sub> em 48h de fermentação em massa de farinha de trigo.

Fonte: Menezes *et al.* (2021).

## 4.2 PREPARO DO SOURDOUGH

O fermento *sourdough* foi elaborado a partir da incorporação da farinha de trigo branca tipo 1 (Nita, Santos, São Paulo, Brasil), o qual possui composição centesimal de 72% de carboidratos totais, 12% de proteína, 1,6% lipídios, 0,4% de cinzas e 12% de umidade, água filtrada estéril e as culturas iniciadoras (Tabela 1). O rendimento utilizado para a massa foi de 200 (RM = peso da massa x 100/peso da farinha seca). A homogeneização dos componentes foi feita por agitação mecânica e posterior incubação a 36°C por 24h. Ao final da fermentação, o fermento *sourdough* foi fracionado e os agentes protetores foram misturados com auxílio de agitação mecânica. Os testes foram divididos em três tratamentos: controle (*sourdough* sem adição de agentes), *sourdough* com adição de 7% de goma arábica (Brás, São Paulo, Brasil) (m/m) e *sourdough* com adição de 10% de maltodextrina (DE 20) (Brás, São Paulo, Brasil) (m/m).

### 4.2.1 Análises do *sourdough* durante a fermentação

A curva de acidificação e o acompanhamento do crescimento microbiano foram realizados durante a fermentação nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24h e avaliados o pH, a ATT, a

enumeração de BAL e bolores e leveduras. Alíquotas de 1g de fermento *sourdough* foram coletadas e diluídas em 10 ml de água destilada para a medição do pH, determinado em potenciômetro (Hanna Edge, Woonsocket, Rhode Island, EUA), seguida da determinação da acidez total titulável, expressa como a quantidade (mL) necessária de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N para atingir a faixa de pH entre 8,40 e 8,60 (AACC, 2010). As análises foram conduzidas em triplicata. Para a determinação de BAL e leveduras, alíquotas de 10 g de fermento *sourdough* adicionadas de 90 ml de água peptonada (0,1%) foram homogeneizadas por 2 minutos em equipamento tipo *stomacher* (Marconi, modelo MA 440/CF, São Paulo, São Paulo, Brasil). O plaqueamento para enumeração de BAL foi realizado em ágar MRS, incubado a 36°C por 72h em jarra com gerador Anaerocult, ao passo que o cultivo de bolores e leveduras foi efetuado em ágar YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose, Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha) sob condições de aerobiose a 25°C por 48h (MENEZES *et al.*, 2019). Ambos os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g<sup>1</sup>) seguindo a metodologia ISO 6611 (ISO 6611, 2004). Para isso foram coletadas cinco alíquotas nos tempos 0, 6, 12, 16, 18 e 24h e avaliados o pH, a ATT, a enumeração de BAL e bolores e leveduras.

### 4.3 SECAGEM DO SOURDOUGH

#### 4.3.1 Liofilização

A secagem por liofilização foi realizada em um liofilizador de bancada (Terroni \* Fauvel - LT 1000/8, São Carlos, São Paulo, Brasil). As amostras foram submetidas a secagem por 22 h até completa sublimação da água, usando como parâmetro a redução da  $a_w$  (< 0,3). Os fermentos *sourdough* frescos foram fracionados e congelados a - 80°C em copos para liofilização, que são acoplados aos *manifolds* do equipamento e secos à 15 Pa (CAGLAR; ERMIS; DURAK, 2021). Depois de secos, foram triturados em moinho de facas e envasados em embalagens tipo *pouch* metalizadas seladas à vácuo, armazenadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e sem controle de umidade, simulando um ambiente de comercialização.

### 4.3.2 *Spray dryer*

A secagem foi realizada em um *spray dryer* de escala piloto (mini *spray dryer* B-290, Büchi, Flawil, Switzerland) e as condições de secagem foram: temperatura de entrada de  $150 \pm 3^\circ\text{C}$  e temperatura de saída de  $85 \pm 3^\circ\text{C}$ . A solução de alimentação contendo o fermento *sourdough* fresco foi diluída com água filtrada estéril para a obtenção de 20% de sólidos solúveis e mantida em agitação magnética em temperatura ambiente. A solução foi atomizada, no sentido concorrente, para a câmara de secagem, a pressão reduzida, por meio de uma bomba peristáltica com uma taxa de alimentação de 13 mL/min, com pressão de atomização de 0.7 MPa e vazão de ar de  $35 \text{ m}^3/\text{h}$ , metodologia adaptada de Perdana *et al.* (2014). O fermento em pó foi coletado e envasado em embalagens metalizadas seladas à vácuo como descrito na seção 4.3.1.

## 4.4 ANÁLISE DO *SOURDOUGH* SECO

A fim de avaliar a vida útil do produto seco, foram realizadas em triplicata, análises de umidade,  $a_w$  e viabilidade celular de BAL pelo período de 30 dias, sendo o tempo 0 a amostra recém produzida, e as seguintes análises seguindo o intervalo de 15 dias. Além disso, análises de MEV e capacidade de fermentação do *sourdough* seco foram realizadas.

### 4.4.1 Umidade e $a_w$

Os teores de umidade das amostras foram determinados em triplicata, pelo método gravimétrico em estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 24 h, conforme o método da AOAC (2005). A  $a_w$  foi determinada por um higrômetro digital (Aqualab, Series 3 TE, Decagon Device, Inc., Pullman, EUA) pela medida do ponto de orvalho a  $25^\circ\text{C}$ .

#### 4.4.2 Viabilidade celular

As análises de viabilidade celular foram determinadas no *sourdough* fresco após 24h de fermentação e, quando secos, foram avaliadas nos dias 15 e 30 de armazenamento como descrito na seção 4.2.1. Os resultados foram expressos  $\log \text{UFC/g}^{-1}$ .

#### 4.4.3 pH e ATT

A homogeneização de 10 g de *sourdough* em 90 mL de água destilada será utilizado para determinar o pH das amostras e, em seguida, a ATT expressa como a quantidade (mL) de NaOH 0,1 N necessária para atingir o valor de pH entre 8,4 a 8,6 (AACC, 2010).

#### 4.4.4 Capacidade fermentativa

A análise de capacidade fermentativa foi realizada com os fermentos *sourdough* tipo III adicionado de goma arábica, após 15 dias de armazenamento. A partir do fermento seco por *spray-drying* e liofilização, elaborou-se a mistura de 50% de farinha, 50% de fermento em pó, 1% de sacarose e 60% de solução salina 0,9% (em relação à fração seca), incubadas por 20h a 30°C (REALE *et al.*, 2019). As análises de pH, ATT e BAL foram determinadas nos tempos 0, 12 e 20 horas de incubação. O  $\Delta\text{pH}$  foi calculado como a diferença entre os valores de pH no início e ao final das 20 horas de fermentação.

#### 4.4.5 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)

O preparo e análise das amostras foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. A morfologia do fermento *sourdough* em pó foi observada a partir de micrografias obtidas por um microscópio de varredura convencional com filamento de tungstênio do modelo JEOL JSM-6390LV, operando à voltagem de aceleração de 8kV sob vácuo. Os pós, após sete dias de armazenamento, foram aderidos em uma fita de carbono fixada em um *stub* de alumínio e pulverizados com ouro previamente à análise (ARICI *et al.*, 2018).

#### 4.5 PRODUÇÃO DE PÃES A PARTIR DO FERMENTO EM PÓ

A reativação do fermento foi conduzida pela reidratação dos pós na mesma proporção de farinha de trigo (1:1), 60% de solução fisiológica 0,9% e 1% de sacarose, sendo incubados a 30°C por 24 h. Quatro massas foram formuladas a partir de 300g de farinha de trigo branca tipo 1, 213g de água mineral, 6g de NaCl e 6g de levedura *S. cerevisiae* (Fleischmann, São Paulo, São Paulo, Brazil). Às massas MSD e ML foram incorporadas com 150g das misturas reativadas do *Sourdough* tipo III com adição de goma arábica, seco por *spray-drying* e liofilização, respectivamente. A massada MFR foi adicionada de 150g do *Sourdough* tipo II e a MC foi formulada apenas com levedura, caracterizada como tratamento controle.

Foi conduzida a autólise de 45 minutos na mistura de farinha e água, a fim de solubilizar as proteínas e ativar as enzimas da farinha. O restante dos ingredientes foram incorporados e a massa foi sovada em batedeira (Batedeira planetária OBAT912 1000w, Oster, Boca Raton, Flórida, EUA) utilizando um batedor no formato gancho, por 10 min. Após 30 min de descanso, foram feitas duas dobras na massa - sobre ela mesmo - este processo foi repetido quatro vezes, até atingir o ponto de véu da massa. Em seguida foram moldadas e fermentadas por 1 hora e 30 minutos em uma câmara climática de fermentação a 30°C. O forneamento foi feito em forno com circulação de ar forçado com injeção de vapor (Venâncio, Venâncio Aires, Rio Grande do Sul, Brazil) a 180°C por 30 min (REALE *et al.*, 2019). Após o resfriamento em temperatura ambiente, foram realizadas as avaliações do pH, ATT e perfil de textura. Os pães foram armazenados em sacos plásticos de poliestileno em temperatura ambiente.

##### 4.5.1 Análises de propriedades físicas

A análise de perfil de textura (TPA) foi conduzida em um texturômetro modelo TA-XT plus (Stable Micro Systems, Texture Exponent software, Surrey, UK) para avaliação das propriedades de coesividade, dureza, elasticidade e mastigabilidade das diferentes formulações de pães. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Seis horas após o forneamento, cinco fatias de cada tratamento foram coletadas e padronizadas para obtenção de amostras com dimensões de 4,0 x 4,0 x 2,5 cm. Para a análise, cada amostra foi submetida a duas compressões consecutivas, o qual foi aplicado 40% de força de compressão máxima com o auxílio de uma sonda cilíndrica de 36 mm de diâmetro (APLEVICS *et al.*, 2014).

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises deste trabalho foram realizadas em triplicata, sendo calculado seus respectivos valores de média e desvio padrão. O software STATISTICA<sup>®</sup> versão 13.0 foi utilizado para a realização da análise de variância (ANOVA), a fim de determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias (teste de Tukey).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RESULTADOS

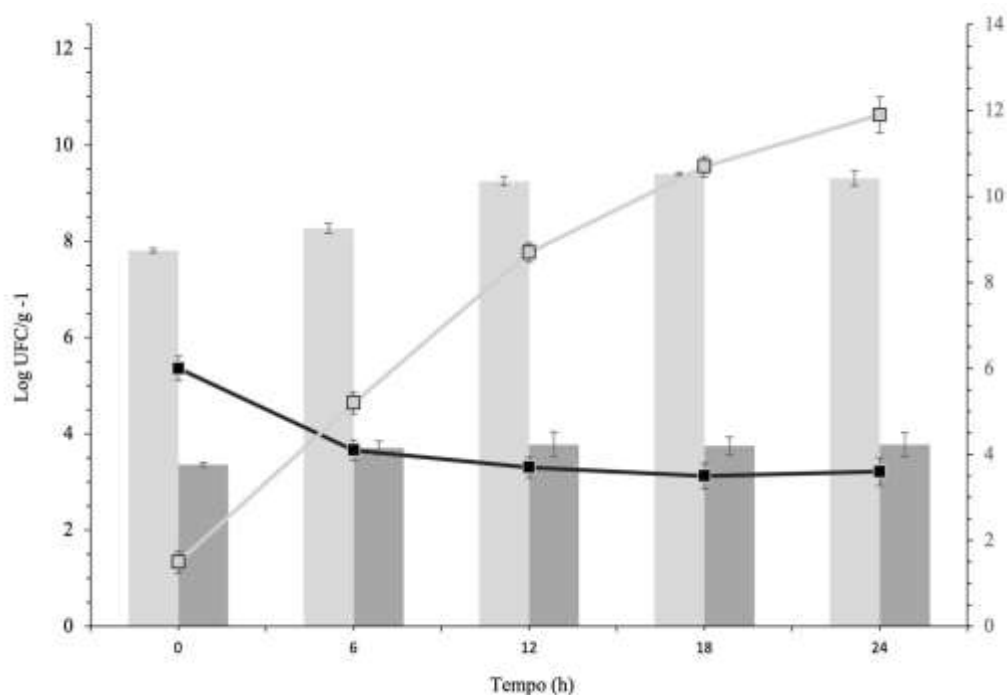
#### 5.1.1 Curva de acidificação

A partir do gráfico apresentado na Figura 3, após 24 horas de fermentação, houve o aumento da ATT de 1,37 para 11,86 ml de NaOH (0,1N) gastos e diminuição do pH de 5,94 para 3,60. Após 18 horas de fermentação, ocorreu a estabilização do pH, não havendo mudança estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) em seus valores, adequando-se à faixa entendida como ideal para *sourdough* de 3,5 a 4,5 para a prevenção do crescimento de microrganismos patogênicos (BRANDT, 2007; KATINA *et al.*, 2005). Portanto, as cepas inoculadas acidificaram o *sourdough* à uma faixa ideal de pH em um tempo satisfatório, como esperado. A produção de ácidos orgânicos manteve-se em aumento contínuo ( $p < 0,05$ ) durante as 24 horas.

Em 12 horas de fermentação, a contagem de BAL foi estabilizada ( $p > 0,05$ ) em 9,49 log UFC/g<sup>-1</sup>, decorrente do estresse ácido causado pelo efeito de auto acidificação, o qual o acúmulo de ácido lático proveniente da fermentação gera um estresse à célula, inibindo o seu crescimento (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016). Por outro lado, a contagem de leveduras não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) quando comparados todos os tempos, mantendo o valor médio de 3,59 log UFC/g<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes nas variações de pH, ATT e contagem de BAL foram demonstrados, também, nos estudos realizado pelos autores Menezes *et al.* (2021), Perri *et al.* (2022), corroborando os valores encontrados no presente trabalho.



**Figura 3:** Curva de acidificação do *sourdough* tipo II durante 24h de fermentação, indicando pH (■), acidez total titulável (ATT) (□) em ml de NaOH, leveduras (●) e bactérias ácido lácticas (BAL) (●) em log UFC/g.



Fonte: A autora (2023).

### 5.1.2 Secagem por liofilização

O tempo de secagem foi determinado até que as amostras atingissem  $a_w < 0,3$ . O fermento *sourdough* tipo II controle submetido à liofilização apresentou umidade (%) de  $55,5 \pm 0,07$  e valor de  $a_w$  de  $0,994 \pm 0,07$ . O fermento *Sourdough* com adição de goma arábica apresentou valores de umidade (%) de  $52 \pm 0,07$  e  $a_w$  de  $0,993 \pm 0,07$ . O fermento *sourdough* com adição de maltodextrina possuía valores de umidade (%) de  $50,5 \pm 0,21$  e  $a_w$  de  $0,991 \pm 0,08$ . Para os tratamentos com adição de maltodextrina e controle, a contagem de BAL foi de 8,40 log UFC/g, valor de pH de 3,5 e ATT de 11,37 mL gastos de NaOH. Para a formulação do fermento *sourdough* adicionado de goma arábica, a contagem de BAL foi de 9,12 log UFC/g, valor de pH de 3,5 e ATT de 11,20 mL gastos de NaOH.

Conforme demonstrado na Tabela 2, quando avaliado o tempo zero, o tratamento controle sofreu perda de 1,08 ciclo logarítmico, ao passo que os tratamentos adicionados de goma arábica e maltodextrina decaíram 0,91 e 0,89 ciclo logarítmico, respectivamente. Esta ação crioprotetora também foi constatada por Gul *et al.* (2020) o qual verificou o aumento de 94% na sobrevivência da cepa de *Levilactobacillus brevis* ED25 - quando adicionado de

crioprotetores, neste caso, usado leite desnatado, lactose e sacarose - desidratada por liofilização.

**Tabela 2:** Propriedades físico-químicas e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) (log UFC/g) em *sourdough* tipo III seco por liofilização nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento. *Sourdough* Controle sem adição de agente protetor.

	Controle	Goma Arábica	Maltodextrina
<b>Umidade (%)</b>			
T <sub>0</sub>	4,81 ± 0,007 <sup>a</sup>	3,45 ± 0,198 <sup>a</sup>	6,91 ± 0,064 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	4,72 ± 0,042 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,057 <sup>a</sup>	6,75 ± 0,205 <sup>a</sup>
T <sub>30</sub>	6,77 ± 0,205 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,141 <sup>a</sup>	6,83 ± 0,127 <sup>a</sup>
<b>pH</b>			
T <sub>0</sub>	3,58 ± 0,007 <sup>b</sup>	3,73 ± 0,021 <sup>a</sup>	3,51 ± 0,007 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	3,48 ± 0,007 <sup>c</sup>	3,72 ± 0,007 <sup>a</sup>	3,51 ± 0,007 <sup>a</sup>
T <sub>30</sub>	3,74 ± 0,014 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,035 <sup>a</sup>	3,64 ± 0,085 <sup>a</sup>
<b>ATT (ml)</b>			
T <sub>0</sub>	22,99 ± 0,141 <sup>b</sup>	17,97 ± 0,332 <sup>a</sup>	18,37 ± 0,134 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	23,51 ± 0,014 <sup>b</sup>	17,64 ± 0,721 <sup>a</sup>	18,02 ± 0,021 <sup>a</sup>
T <sub>30</sub>	26,03 ± 0,354 <sup>a</sup>	21,39 ± 1,541 <sup>a</sup>	17,88 ± 2,192 <sup>a</sup>
<b>BAL (log UFC/g)</b>			
T <sub>0</sub>	7,32 ± 0,138 <sup>a</sup>	8,21 ± 0,078 <sup>a</sup>	7,51 ± 0,179 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	6,65 ± 0,121 <sup>b</sup>	7,96 ± 0,196 <sup>a</sup>	6,88 ± 0,134 <sup>b</sup>
T <sub>30</sub>	6,51 ± 0,173 <sup>b</sup>	7,80 ± 0,196 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,037 <sup>b</sup>
<b>a<sub>w</sub></b>			
T <sub>0</sub>	0,0393 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,0892 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,2959 ± 0,026 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	0,0419 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,0880 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,3551 ± 0,001 <sup>a</sup>
T <sub>30</sub>	0,0379 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,0844 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,3089 ± 0,045 <sup>a</sup>

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras diferentes (<sup>a,b,c</sup>) na mesma coluna, diferem entre si estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

**Fonte:** A autora (2023).

Os resultados obtidos durante o armazenamento dos fermentos *sourdough* tipo III controle e com adição de maltodextrina indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o  $T_0$  e os tempos 15 e 30, porém, após 15 dias de armazenamento, não apresentaram perda logarítmica estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). O uso de embalagem com barreira à oxigênio e incidência de luz aliado ao uso de vácuo auxiliaram na preservação das BAL. As perdas logarítmicas decorreram, eventualmente, devido às injúrias acarretadas pelo processo de secagem e armazenamento sem refrigeração (GUL *et al.*, 2020). Para o tratamento com adição de goma arábica, os valores médios das contagens de BAL permaneceram invariáveis estatisticamente ( $p > 0,05$ ) durante todo o período de armazenamento, classificando-o como potencial para uma vida de prateleira ensaiada de 30 dias. Não foram encontrados trabalhos relacionados à utilização de agentes protetores (goma arábica e maltodextrina) ou as culturas *starters* utilizadas no presente trabalho quanto à secagem e avaliação durante o tempo de armazenamento, entretanto, de forma geral, de acordo com o estudo realizado pelos colaboradores Stefanello *et al.* (2019), os melhores resultados obtidos nas taxas de sobrevivência de *Limosilactobacillus fermentum* e *Wickerhamomyces anomalus* secos por liofilização, foram atingidos pelo uso de crioprotetores (leite em pó desnatado combinado com 87% de glutamato monossódico e 74% de leite em pó desnatado), avaliados durante 12 meses à temperatura ambiente.

Os valores médios de pH dos tratamentos no  $T_0$  apresentaram-se semelhantes aos valores dos seus respectivos fermentos antes da secagem, não havendo diferença estatística ( $p > 0,05$ ), porém, o aumento dos valores de ATT foram notáveis em todos os tratamentos ( $p < 0,05$ ), atingindo o acréscimo de até 11,62 ml de NaOH após a secagem. Resultados similares foram obtidos nos estudos realizados por Reale *et al.* (2019) e Caglar; Ermis; Durak (2021), em que o ATT dos fermentos *sourdough* tipo III secos por liofilização apresentaram-se maiores quando comparados aos frescos.

Os valores de pH e ATT dos tratamentos com adição de goma arábica e maltodextrina não apresentaram variação estatística ( $p > 0,05$ ) durante os três tempos avaliados. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH e ATT evidenciados entre o  $T_0$  e os tempos 15 e 30, no tratamento controle, deu-se possivelmente pela pós-acidificação, condição na qual o microrganismo exerce pequenas atividades metabólicas na matriz alimentícia, não sendo relevante tecnologicamente, porém com significância verificada no tratamento estatístico dos dados obtidos.

A umidade e  $a_w$  não alteraram significativamente ( $p > 0,05$ ) durante os 30 dias de armazenamento para todos os tratamentos, estando de acordo com o estudo realizado por Reale

*et al.* (2019), em que se manteve estabilizado durante seis meses de armazenamento. Compreende-se que o método de conservação empregado, a partir dos controles de umidade,  $a_w$  e impedimento à exposição demasiada ao oxigênio tenha influenciado na estabilização destes parâmetros (HUANG *et al.*, 2017).

### 5.1.3 Secagem por *spray-drying*

O fermento *sourdough* tipo II controle submetido à secagem em *spray-dryer* foi caracterizado com valores de umidade (%) de  $55,5 \pm 0,07$ ,  $a_w$  de  $0,994 \pm 0,06$ , contagem de  $8,70 \log$  UFC/g de BAL, pH de 3,46 e 11,12 ml de NaOH 0,1N gastos. Para o tratamento com adição de goma arábica, a amostra apresentou valores de umidade (%) de  $52 \pm 0,07$ ,  $a_w$  de  $0,993 \pm 0,07$ , contagem de  $8,88 \log$  UFC/g de BAL, pH de 3,49 e 11,37 ml de NaOH 0,1N gastos. O fermento *sourdough* com adição de maltodextrina possuía valores de umidade (%) de  $50,5 \pm 0,21$ ,  $a_w$  de  $0,991 \pm 0,08$ , contagem de  $8,73 \log$  UFC/g de BAL, pH de 3,46 e 11,12 ml de NaOH 0,1N gastos na titulação.

Como demonstrado na Tabela 3, após a secagem por *spray-drying*, houve o decaimento de 2,27 logs para o tratamento controle, 2,06 para o *sourdough* adicionado de goma arábica e 3,27 quando formulado com maltodextrina. Tafti *et al.* (2013) ao secar *sourdough* tipo I em *spray dryer* sob a temperatura de saída de  $90^\circ\text{C}$ , observou a perda de aproximadamente quatro logarítmicos, assim como os autores Caglar; Ermis; Durak (2021) e Wieschebrock; Seitter; Hertel (2011), registraram uma redução significativa na contagem de BAL quando secos pelo mesmo método citado. Mohd roby *et al.* (2020) ao secar *sourdough* tipo I adicionado de 7% de goma arábica, com temperatura de saída de  $100^\circ\text{C}$ , observaram o decaimento de apenas 1,07 log, valor inferior ao encontrados neste trabalho.

**Tabela 3:** Propriedades físico-químicas e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) em *sourdough* tipo III seco por *spray-drying* nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento. *Sourdough* Controle sem adição de agente protetor.

	Controle	Goma Arábica	Maltodextrina
<b>Umidade (%)</b>			
T <sub>0</sub>	5,44 ± 0,251a	4,04 ± 0,409a	4,42 ± 0,285a
T <sub>15</sub>	5,19 ± 0,272a	4,37 ± 0,054a	4,64 ± 0,104a
T <sub>30</sub>	5,32 ± 0,099a	4,27 ± 0,079a	4,45 ± 0,091a
<b>pH</b>			
T <sub>0</sub>	3,59 ± 0,014a	3,74 ± 0,007a	3,74 ± 0,028a
T <sub>15</sub>	3,53 ± 0,014a	4,02 ± 0,014a	3,74 ± 0,035a
T <sub>30</sub>	3,57 ± 0,040a	3,77 ± 0,021a	3,65 ± 0,042a
<b>ATT (ml)</b>			
T <sub>0</sub>	24,89 ± 0,439 <sup>a</sup>	20,45 ± 0,064 <sup>a</sup>	20,68 ± 0,028 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	25,26 ± 0,856 <sup>a</sup>	20,53 ± 0,007 <sup>a</sup>	20,76 ± 0,064 <sup>a</sup>
T <sub>30</sub>	26,17 ± 0,590 <sup>a</sup>	21,60 ± 0,760 <sup>a</sup>	20,14 ± 0,955 <sup>a</sup>
<b>BAL (log UFC/g)</b>			
T <sub>0</sub>	6,43 ± 0,398 <sup>a</sup>	6,82 ± 0,843 <sup>a</sup>	5,46 ± 0,971 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	5,41 ± 0,397 <sup>b</sup>	6,08 ± 0,894 <sup>ab</sup>	4,54 ± 0,088 <sup>ab</sup>
T <sub>30</sub>	3,53 ± 0,681 <sup>c</sup>	5,04 ± 0,539 <sup>b</sup>	3,15 ± 0,212 <sup>b</sup>
<b>a<sub>w</sub></b>			
T <sub>0</sub>	0,1988 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,1526 ± 0,0004 <sup>a</sup>	0,1954 ± 0,009 <sup>a</sup>
T <sub>15</sub>	0,2131 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,1566 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,1959 ± 0,004 <sup>a</sup>
T <sub>30</sub>	0,1860 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,1678 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,2129 ± 0,020 <sup>a</sup>

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras diferentes (<sup>a,b,c</sup>) na mesma coluna, diferem entre si estatisticamente (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: A autora (2023).

O alto índice de decaimento na contagem de BAL quando adicionado de maltodextrina decorre, possivelmente, das condições da secagem. O aumento da densidade, proveniente da adição de 10% do agente ao fermento, pode influenciar na formação de gotículas grandes no momento de secagem, as quais requerem um maior tempo de retenção para a completa secagem da partícula, conseqüentemente, esta exposição demasiada às altas temperaturas promoveram a injúria celular e até letalidade à célula (TAN; POH; CHIN, 2018). Entre os agentes protetores aplicados no presente trabalho, portanto, se pode inferir que a goma arábica possui um maior efeito protetivo às BAL em secagens à altas temperaturas.

Quando avaliado o armazenamento durante o período de 30 dias (Tabela 3), à vácuo e em temperatura ambiente com variações de até 5°C, é observada a diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade das BAL para todos os tratamentos.

Apesar do tratamento adicionado de goma arábica diferir estatisticamente ( $p < 0,05$ ) nos tempos zero e 30, ele se mostrou o mais eficaz no efeito protetivo às BAL frente aos demais, visto que sofreu um decaimento de apenas 1,7 log quando passados 30 dias de armazenamento. Os tratamentos com adição de maltodextrina e controle sofreram a perda de 2,2 e 2,8 logs, respectivamente. As perdas logarítmicas possivelmente decorrem das prováveis injúrias acarretadas pelas altas temperaturas durante a secagem ou até mesmo pelas condições ambientais durante o armazenamento. Estudos afirmam que o armazenamento em altas temperaturas induzem o decaimento do número de células viáveis, quando comparado ao armazenamento perto de 0°C, a tendência da sobrevivência insatisfatória em ambientes com temperaturas elevadas é favorecido pelo aumento da taxa metabólica e reação químicas e enzimáticas - como a oxidação lipídica - tornando-se desfavoráveis para a sobrevivência da célula (BEHBOUDI-JOBBEHDAR *et al.*, 2013; GUL *et al.*, 2020; SAVEDBOWORN *et al.*, 2017; SHU *et al.*, 2018). O autor Gul *et al.* (2020) constatou em sua pesquisa, porém em cepas secas pelo método de liofilização, o decaimento de 0,14 log quando armazenado a 4°C e 1,17 log para armazenamento a 25°C.

Em todos os tratamentos os valores de ATT no tempo zero diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) após o processo de secagem, este aumento decorre possivelmente, da diminuição da umidade da amostra, concentrando os ácidos orgânicos presentes. Em um estudo realizado por Reale *et al.* (2019), os autores observaram o aumento nos valores de ATT ao secar *sourdough* tipo I por *spray-drying*, corroborando os resultados obtidos. Por sua vez, percebe-se que, para os valores de pH no T<sub>0</sub>, apenas o tratamento controle não diferiu ( $p > 0,05$ ) do seu valor quando

fresco, uma vez que os tratamentos com adição de goma arábica e maltodextrina adquiriram um aumento de apenas 0,25 e 0,28 de pH, respectivamente. No mesmo trabalho, Reale *et al.* (2019) atingiu valores de pH para os pós relativamente similares aos frescos, mesmo havendo diferença estatística entre os tratamentos.

Durante o período de 30 dias, os valores de  $a_w$ , umidade, pH e ATT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Segundo Reale *et al.* (2019), a fim de uma armazenagem segura, os valores de  $a_w$  e umidade para produtos em pó, devem estar abaixo de 0,25 e 5%, respectivamente. Apesar dos valores de  $a_w$  apresentados para o tratamento controle estarem de acordo com o limite mencionado pelos autores, demonstrando que a secagem foi bem conduzida, o teor de umidade apresentou-se acima do limite adequado para uma estocagem segura.

#### **5.1.4 Capacidade fermentativa**

O processo de reidratação do pó é de suma importância para a recuperação das células que passaram pelo processo de secagem (MORGAN *et al.*, 2006). Segundo Caglar; Ermis; Du (2021), o inóculo direto do fermento à massa, sem passar pelo processo de reidratação, é passível de redução da contagem microbiana decorrente das possíveis injúrias e estresses metabólicos. A integridade celular e capacidade fermentativa pode ser analisada pelas medições de pH, ATT e contagem de BAL durante o processo fermentativo. Os valores obtidos para estes parâmetros em fermentos *sourdough* tipo III com adição de goma arábica secos por *spray dryer* (FSD) e liofilização (FL) nos tempos 0, 12 e 20 estão demonstrados na Tabela 4.



**Tabela 4:** Capacidade fermentativa do *sourdough* tipo III adicionado de goma arábica seco por *spray-drying* (FSD) e liofilização (FL) durante o período de 20 horas de fermentação.

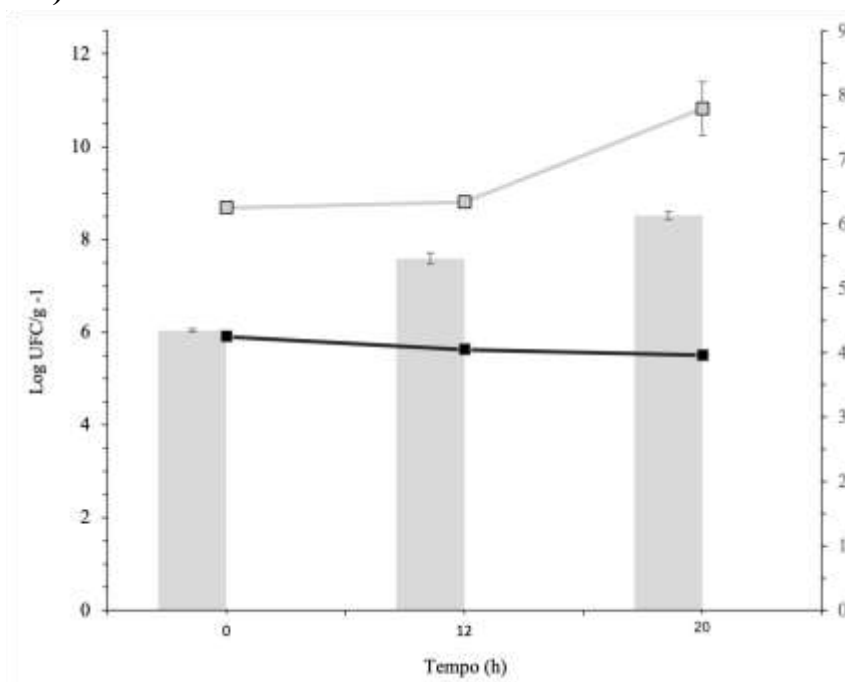
	pH	ATT (ml)	BAL (log UFC/g)	$\Delta$ pH
FL T <sub>0</sub>	4,13 ± 0,007 <sup>a</sup>	5,32 ± 0,396 <sup>b</sup>	7,93 ± 0035 <sup>b</sup>	
FL T <sub>12</sub>	3,91 ± 0,014 <sup>b</sup>	6,29 ± 0,346 <sup>b</sup>	8,37 ± 0,120 <sup>a</sup>	0,37
FL T <sub>20</sub>	3,74 ± 0,028 <sup>c</sup>	8,24 ± 0,559 <sup>a</sup>	8,82 ± 0,518 <sup>a</sup>	
FSD T <sub>0</sub>	4,25 ± 0,071 <sup>a</sup>	6,25 ± 0,042 <sup>b</sup>	6,04 ± 0,029 <sup>b</sup>	
FSD T <sub>12</sub>	4,05 ± 0,021 <sup>b</sup>	6,34 ± 0,028 <sup>b</sup>	7,59 ± 0,017 <sup>ab</sup>	0,27
FSD T <sub>20</sub>	3,96 ± 0,014 <sup>b</sup>	7,79 ± 0,417 <sup>a</sup>	8,86 ± 0,808 <sup>a</sup>	

Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão. Valores seguidos de letras diferentes (<sup>a,b,c</sup>) na mesma coluna, diferem entre si estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

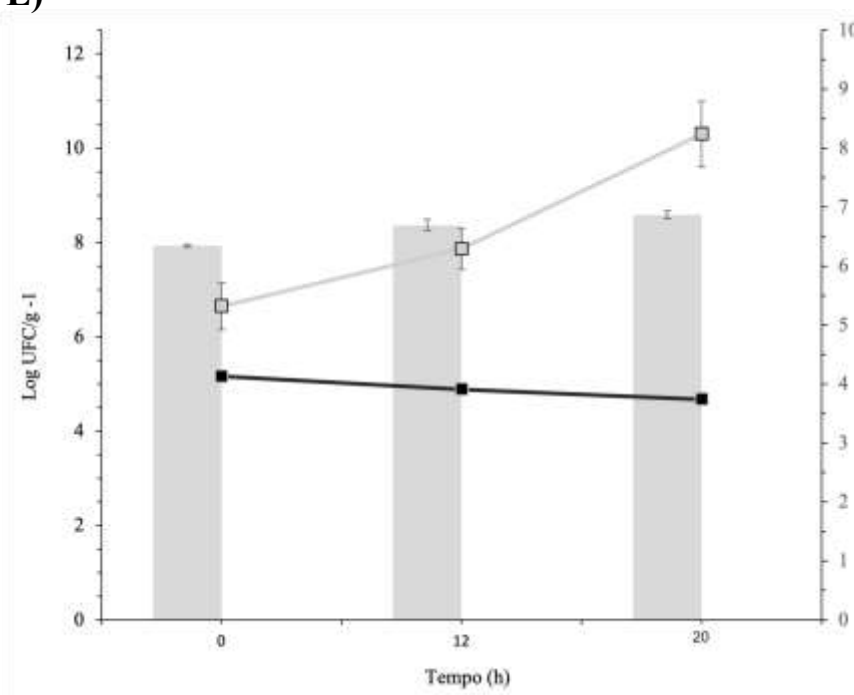
Fonte: A autora (2023).

**Figura 4:** Capacidade fermentativa do *sourdough* tipo III adicionado de goma arábica seco por *spray-drying* (FSD) e liofilização (FL) durante o período de 20h de fermentação, indicando pH (■), acidez total titulável (ATT) (□) em ml de NaOH, leveduras (●) e bactérias ácido lácticas (BAL) (●) em log UFC/g.

### (FSD)



(FL)



Pode-se observar que o fermento obtido pelo método de liofilização possui valores de pH diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) quando comparados  $T_0$ ,  $T_{12}$  e  $T_{20}$ . Estes valores indicam que as BAL foram capazes de fermentar os carboidratos disponíveis no meio durante todo o período da análise, produzindo ácidos orgânicos responsáveis por abaixar o pH da mistura (DE VUYST; COMASIO; KERREBROECK, 2021; THIELE; GÄNZLE; VOGEL, 2002). O aumento da ATT, por sua vez, foi visível ao final do processo para ambos os tratamentos por meio da diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado o  $T_{20}$  ao  $T_0$  e  $T_{12}$ , ocasionado, igualmente, pelo metabolismo e produtos originados da fermentação. Todavia, é notável a presença de valores superiores na produção de ATT pelo tratamento FL, isto decorre das injúrias celulares presentes no *sourdough* seco por *spray dryer*, o uso de altas temperaturas acarreta no aumento da fase *lag* e na diminuição da produção de ácidos orgânicos na refermentação (HUANG *et al.*, 2017).

A capacidade fermentativa do *sourdough* tipo III pode ser avaliada, também, pela contagem de BAL ao decorrer das 20 horas. A multiplicação celular neste processo de refermentação indica que estas estão em um estado cultivável, portanto, houve a preservação da estrutura da célula, não influenciando no desempenho das suas funções metabólicas. Conforme demonstrado na Tabela 4, houve a estabilização da contagem de BAL após 12 horas de fermentação ( $p > 0,05$ ), com o aumento de apenas 0,44 ciclo logarítmico quando comparado ao tempo zero ( $p < 0,05$ ). Quando seco por *spray-drying*, as BAL crescem progressivamente,

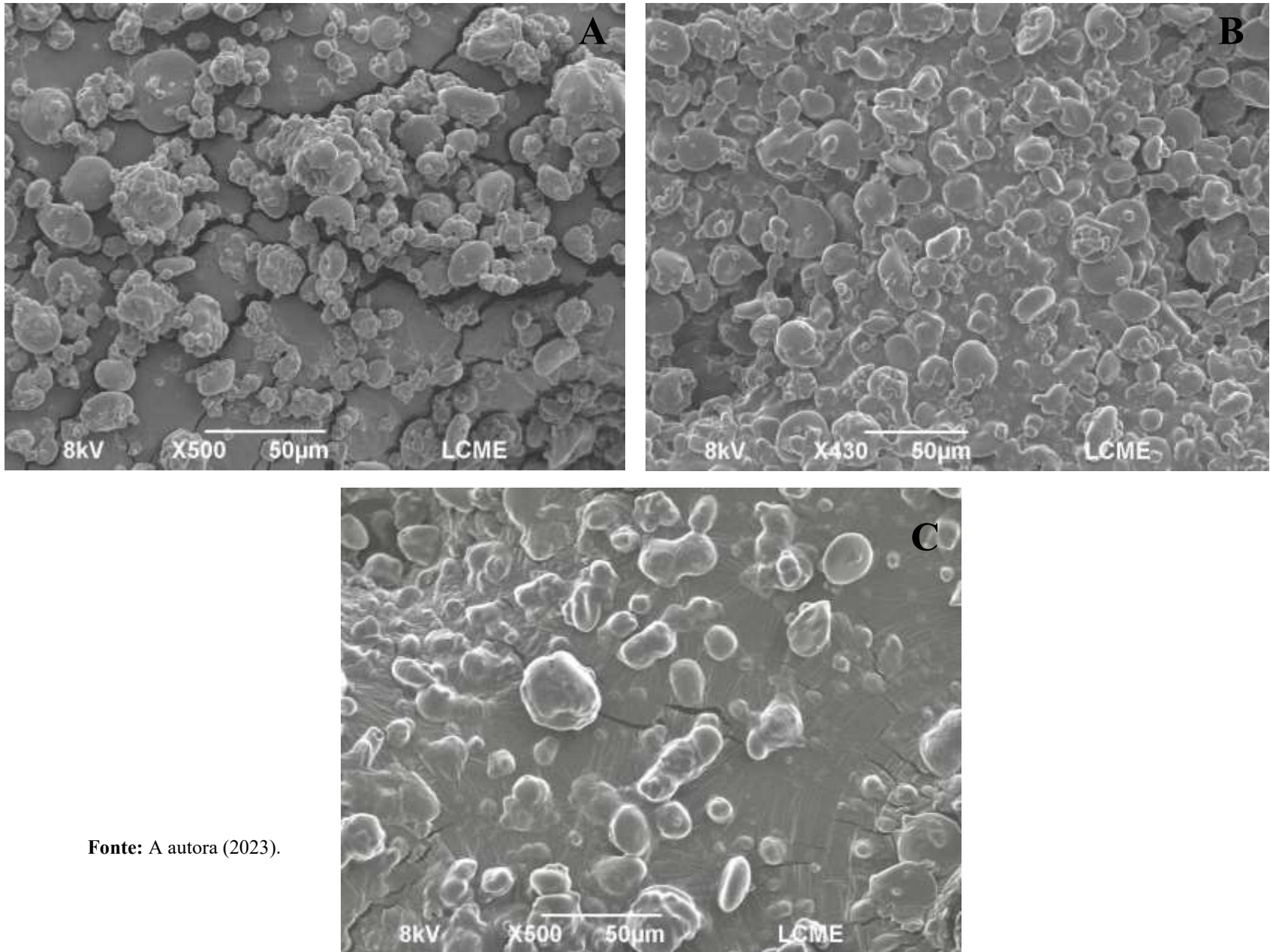
em que o  $T_{12}$  não difere estatisticamente dos tempos zero e 20, porém, as contagens ao início ( $T_0$ ) e ao final ( $T_{24}$ ) da fermentação são diferentes ( $p < 0,05$ ), promovido o acréscimo de 2,82 logarítmicos.

Estes valores indicam que as células se encontram em estado cultivável, igualmente. Apesar de haver lentidão quando disposto à fermentação, possivelmente ocasionado por fatores decorrente às injúrias durante o processo de secagem. Caglar *et. al* (2021), Huang *et al.* (2017) e Reale *et al.* (2019) observaram que os processos de secagem acarretam o retardamento das atividades metabólicas dos microrganismos, chamado de fase *lag*, reforçando, assim, a necessidade de uma etapa de reidratação e reativação.

### **5.1.5 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)**

A partir das micrografias obtidas pela microscopia eletrônica de varredura na Figura 4, foi possível avaliar e caracterizar a superfície das partículas dos sourdoughs. A partir das imagens geradas pelo MEV é possível avaliar a função da forma de acondicionamento do produto, assim como verificar o efeito protetivo desejado foi eficiente.

**Figura 5:** MEV da estrutura do *sourdough* tipo III controle (A), com adição de goma arábica (B) e maltodextrina (C), secos por *spray dryer*.



**Fonte:** A autora (2023).

Como demonstrado na Figura 5A, o tratamento controle exibiu partículas com superfícies irregulares, em formato esférico levemente deformado, diferentes dimensões e bordas arredondadas. Além disso, é relevante salientar a presença de fissuras, as quais podem resultar pela exposição demasiada ao oxigênio, gerando indiretamente letalidade via oxidação às culturas microbianas. Este fator pode ser evidenciado pela diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos logarítmicos durante os 30 dias de armazenamento demonstrados na Tabela 3.

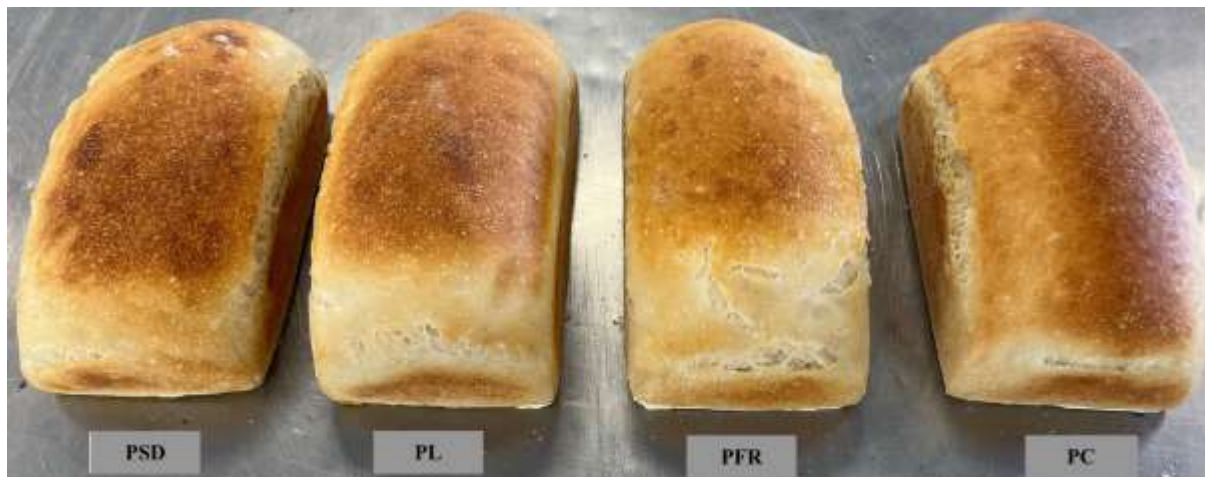
A partir da Figura 5B e 5C, observa-se o recobrimento dos agentes às partículas, sendo este responsável pela ação protetora prevista, corroborando à preservação logarítmica em 15 dias de armazenamento observadas na Tabela 3. O tratamento adicionado de goma arábica apresentou partículas com superfície lisa, dimensões variadas e conformações geométricas diversificadas. Por sua vez, o tratamento com adição de maltodextrina apresentou partículas com irregularidades superficiais, maior dimensão e diferentes conformações geométricas.

Para todos os tratamentos, é notável a coalescência entre as partículas, fenômeno ocorrido a partir da agregação das partículas menores. A higroscopicidade, capacidade de um material de absorver umidade do ar, atua na coalescência das partículas do pó, a partir do aglutinamento e formação de aglomerados, acarretando a diminuição da qualidade do produto (ZHOU *et al.*, 2020).

A partir das micrografias capturadas em MEV por Caglar; Ermis; Durak (2021), os autores descreveram a superfície do *sourdough* tipo III, seco pelo método de *spray dryer*, como partículas esféricas, em uma grande porção havia bordas arredondadas, algumas apresentaram superfícies rugosas, corroborando o resultado obtido neste trabalho.

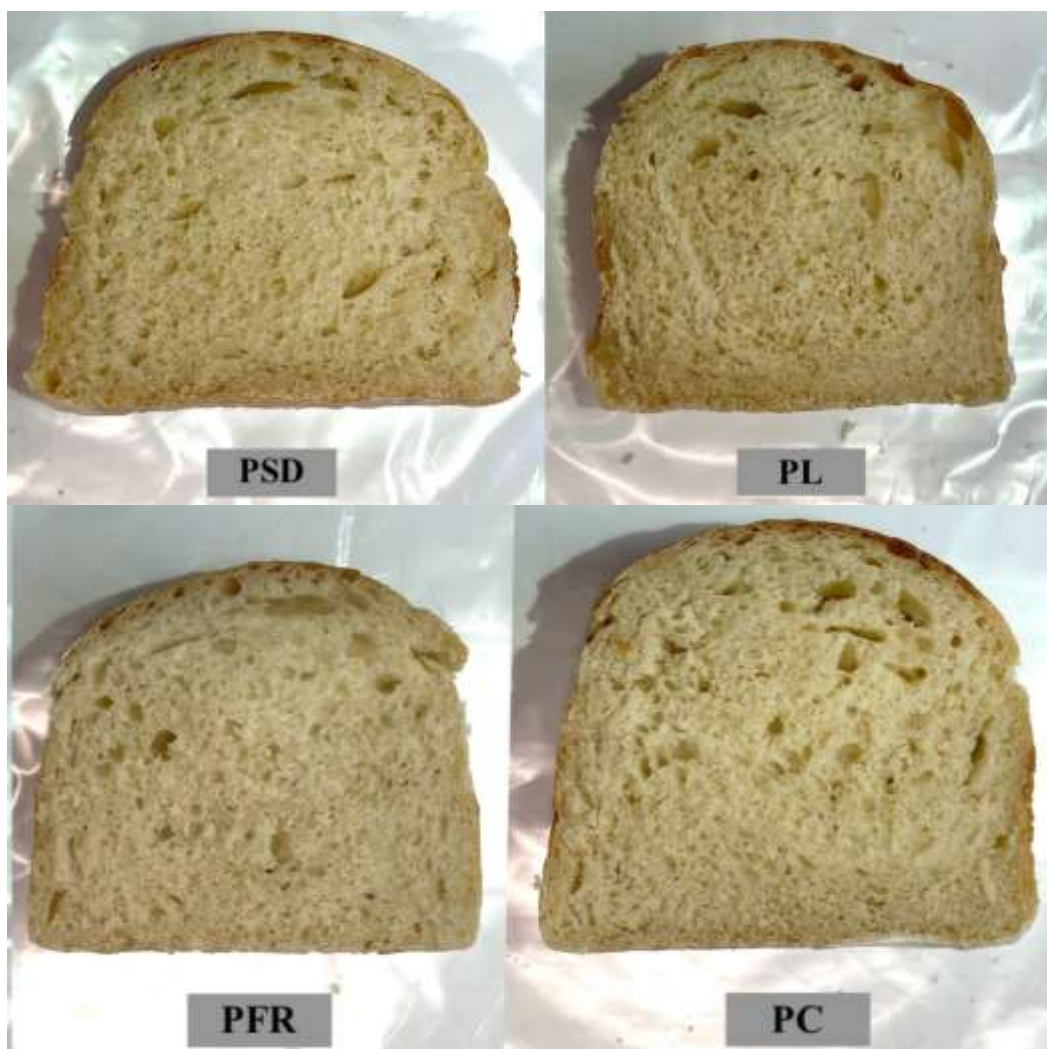
### 5.1.6 Análise dos pães

**Figura 6:** Pães formulados com adição de fermento *sourdough* tipo III seco por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PL), de *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC) após forneamento.



Fonte: A autora (2023).

**Figura 7:** Fatias dos pães formulados com adição de fermento *sourdough* tipo III seco por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PL), de *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC) após 6 horas de forneamento.



**Fonte:** A autora (2023).

#### 5.1.6.1 Perfil de Textura (TPA)

A textura é um atributo advindo da integralidade das características físicas do alimento e das sensações percebidas - tato, visão e audição - pelo consumidor, sendo nomeados de propriedades primárias e secundárias, respectivamente. Mediante toda a sua complexidade, é um fator primordial para a aceitabilidade do consumidor frente a um produto.

O perfil de textura (TPA) refere-se aos pães formulados com *sourdough* tipo III secos por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PL), com adição de *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC) apenas com incorporação de *S. cerevisiae*. Os resultados da análise de perfil de textura estão demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Parâmetros da textura de pães formulados com adição de *sourdough* tipo III, seco por *spray-drying* (PSD) e liofilização (PLF), *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC).

	<b>Coesividade*</b>	<b>Dureza (N)</b>	<b>Elasticidade (%)</b>	<b>Mastigabilidade (N)</b>
PSD	0,80 ± 0,025 <sup>ab</sup>	7,36 ± 1,074 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,017 <sup>a</sup>	5,51 ± 0,746 <sup>a</sup>
PL	0,77 ± 0,041 <sup>b</sup>	5,35 ± 0,755 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,014 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,299 <sup>b</sup>
PFR	0,83 ± 0,014 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,253 <sup>ab</sup>	0,95 ± 0,021 <sup>a</sup>	4,55 ± 0,305 <sup>ab</sup>
PC	0,80 ± 0,028 <sup>b</sup>	6,54 ± 0,650 <sup>ab</sup>	0,93 ± 0,012 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,580 <sup>ab</sup>

\*Não possui unidade de medida, devido a sua característica adimensional.

Tratamento controle formulado apenas com *S. cerevisiae*.

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras diferentes (<sup>a,b,c</sup>) na mesma coluna, diferem entre si estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

**Fonte:** A autora (2023).



A mastigabilidade, refere-se a força e energia necessárias para tornar um alimento sólido em consistência apropriada para a deglutição (SAHIN; SUMNU, 2006). Para ambos os parâmetros, PSD foi o tratamento com o maior valor obtido, não possuindo diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos PFR e PC. PL dispôs do menor índice entre todos os tratamentos, porém, não difere ( $p > 0,05$ ) dos tratamentos PFR e PC. Menezes *et al.* (2021) não constataram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na mastigabilidade de pães formulados com *sourdough* tipo I comparados ao controle (com adição de *S. cerevisiae*), corroborando os resultados demonstrados na Tabela 5.

A dureza é uma propriedade primária relacionada à força necessária para cortar o alimento, uma vez que este oferece uma resistência à pressão efetuada ao morder e mastigar (SAHIN; SUMNU, 2006). Neste parâmetro, PSD foi o tratamento que obteve maior dureza, não diferindo estatisticamente ( $p > 0,05$ ) do PFR e PC após seis horas de armazenamento. Por outro lado, PL apresentou o menor valor quando comparado a todos os tratamentos, mas não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) dos tratamentos PFR e PC. Resultados apresentados por Caglar *et al.* (2021) apontam que todas as amostras de pães adicionadas de *sourdough* tipo III seco por *spray dryer* e liofilização - desprovido de reidratação - causaram aumento na dureza dos pães após 2 horas de armazenamento, quando comparados ao controle. Entretanto, em um estudo realizado por Codinã; Sarion; Dabija (2021), a adição de porcentagens progressivas de *sourdough* à massa acarretaram a diminuição significativamente ( $p < 0,05$ ) gradativa da dureza do pão, o que segundo os autores, ocorre devido à diminuição na retrogradação do amido. Ambos os resultados obtidos pelos autores contrapõem os resultados obtidos no presente trabalho.

Quando aplicada uma força externa sobre um alimento à ponto de deformá-lo, a altura de retorno à sua forma original, durante o intervalo que decorre entre o final da primeira mordida e início da segunda, indicará a sua elasticidade (SAHIN; SUMNU, 2006). Esta é considerada uma propriedade primária. Os valores de elasticidade não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Segundo Menezes *et al.* (2021), ao adicionar *sourdough* tipo I nas formulações de pães, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, corroborando os valores obtidos no presente trabalho.

A coesividade refere-se à capacidade do alimento de manter-se unido e coeso quando aplicado uma força. Esta propriedade primária indica a preservação da estrutura interna durante o processo de mastigação, indicando à qual extensibilidade o alimento pode ser deformado antes que ocorra a sua ruptura (SAHIN; SUMNU, 2006). O tratamento PFR dispôs do maior valor

médio, não diferindo estatisticamente ( $p > 0,05$ ) do tratamento PSD. Em PC, amostra que apresentou a menor coesividade, não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) dos tratamentos PSD e PL. Em um estudo realizado por Codinã; Sarion; Dabija (2021), os autores obtiveram valores sem diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) quanto à coesividade de pães adicionados de 1 a 2% de fermento *sourdough*, contudo, para adições de até 4%, houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ), contestando o resultado obtido no presente trabalho.

#### 5.1.6.1 pH e ATT

A massa controle demonstrou ter um maior pH quando comparado aos demais tratamentos, haja vista a discrepância do pH da farinha de trigo branca (6,0) em comparação ao *sourdough* fresco (3,6) e seco (3,7). Nos estudos realizados pelos autores Menezes et al. (2021) e Caglar; Ermis; Durak (2021), os valores de pH obtido nos pães formulados apenas com adição de *S. cerevisiae* foram de 5,59 e 5,4, respectivamente, corroborando o resultado do presente trabalho.

**Tabela 6:** Valores de pH e ATT de massas cruas (após fermentação) e pães (após forneamento) formulados com adição de *sourdough* tipo III, seco por *spray drying* (PSD) e liofilização (PLF), *sourdough* tipo II (PFR) e tratamento controle (PC).

	pH	ATT (ml)
PSD <sub>MASSA CRUA</sub>	4,6 ± 0,099 <sup>bB</sup>	9,16 ± 0,231 <sup>aA</sup>
PL <sub>MASSA CRUA</sub>	4,05 ± 0,021 <sup>bB</sup>	9,03 ± 0,412 <sup>aA</sup>
PFR <sub>MASSA CRUA</sub>	4,29 ± 0,064 <sup>bB</sup>	7,20 ± 0,318 <sup>abA</sup>
PC <sub>MASSA CRUA</sub>	5,50 ± 0,071 <sup>aB</sup>	5,83 ± 0,821 <sup>bA</sup>
PSD <sub>PÃO</sub>	4,59 ± 0,408 <sup>cA</sup>	7,07 ± 0,024 <sup>aB</sup>
PL <sub>PÃO</sub>	4,47 ± 0,876 <sup>cA</sup>	6,96 ± 0,120 <sup>aB</sup>
PFR <sub>PÃO</sub>	4,89 ± 0,135 <sup>bA</sup>	5,55 ± 0,041 <sup>bB</sup>
PC <sub>PÃO</sub>	6,05 ± 0,353 <sup>aA</sup>	4,64 ± 0,179 <sup>cA</sup>

Tratamento controle formulado apenas com *S. cerevisiae*.

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras (<sup>a,b,c</sup>) na mesma coluna comparam os tratamentos entre si nas duas condições demonstradas. Valores seguidos de letras (<sup>A,B,C</sup>) na mesma coluna comparam os valores do mesmo tratamento na condição de massa crua *versus* pão após forneamento.

Valores seguidos de letras diferentes, diferem entre si estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

**Fonte:** A autora (2023).

As formulações PSD<sub>MASSA CRUA</sub> e PL<sub>MASSA CRUA</sub>, demonstradas na Tabela 6, apresentaram valores de pH significativamente ( $p < 0,05$ ) baixos e ATT significativamente ( $p < 0,05$ ) altos quando comparados ao tratamento controle. Por sua vez, o PFR<sub>MASSA CRUA</sub> apresenta o pH significativamente ( $p < 0,05$ ) baixo e ATT sem diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle. A distinção nos valores de pH e ATT entre as massas com e sem adição do fermento *sourdough* tipo III estão correlacionados às características dos pós após o processo de secagem, como demonstrado na Tabela 2 e 3. Esta diminuição significativa no pH da massa devido à incorporação de *sourdough* tipo III também foi observada pelos autores Clarke *et al.* (2004) e Tafti *et al.* (2013).

A partir da Tabela 6, observa-se a diminuição nos valores médios de ATT nos tratamentos PSD<sub>PÃO</sub>, PL<sub>PÃO</sub> e PFR<sub>PÃO</sub> ( $p < 0,05$ ). As altas temperaturas empregadas no cozimento propiciam a volatilização dos ácidos graxos de cadeia curta presentes na massa, relatada no estudo realizado por Tafti *et al.* (2013). Os autores evidenciaram a diminuição de até 2,8 ml de NaOH em pães formulados com adição de diferentes porcentagens de *sourdough* tipo III secos por *spray-drying* após o assamento. Portanto, os valores obtidos no presente trabalho encontram-se em concordância aos estudos de outros autores.

## 6 CONCLUSÃO

Por meio do presente trabalho se pode observar que o desenvolvimento de um fermento *sourdough* a partir de cepas pré-selecionadas e secos por diferentes métodos de desidratação permitem um melhor custo-benefício, quanto ao armazenamento e produção, preservam a padronização e as características tecnológicas semelhante ao *sourdough* tipo II.

A secagem por liofilização, como esperado, apresentou uma maior preservação das BAL quando comparado ao *spray-drying*. Em relação aos agentes protetores, a adição de 10% de maltodextrina maior preservou a viabilidade celular, na secagem por liofilização, frente a atomização, porém, este agente não colaborou na preservação durante o armazenamento. Quando o *sourdough* seco em *spray dryer*, a incorporação de 7% de goma arábica apresentou um maior efeito protetivo no tempo inicial e ao decorrer do armazenamento. Foi possível visualizar pelas micrografias por MEV, o efeito protetivo dos agentes a partir do recobrimento das partículas, inibindo o contato demasiado ao oxigênio. Este efeito protetor, para ambos os

métodos de secagem, preservou as características fisiológicas da microbiota, apresentando-se em estado cultivável e apta à refermentação.

Vista a importância da obtenção de um produto *shelf-stable*, a estabilidade celular do fermento ao decorrer do tempo de armazenamento é um fator determinante para a consolidação do produto enquanto mercadoria. O uso de goma arábica, para ambos os processos de secagem, atendeu a demanda requisitada, uma vez que diminuiu a letalidade no pós secagem e ao decorrer da vida de prateleira ensaiada de 30 dias, tornando-se o agente protetor ideal.

Os fermentos secos quando adicionados à massa de pães, foram capazes de diminuir o pH e aumentar os valores de acidez, trazendo complexidade sensorial e tecnológica para pães os desenvolvidos da forma tradicional e simplista.

Haja vista o cenário carecido de pesquisas sobre *sourdough* tipo III, quando visto sua potencial aplicabilidade e contribuição à área de panificação, torna-se essencial a continuidade de estudos para aprimoramento. Pesquisas sobre aplicação de diferentes agentes protetores e sua incorporação em variadas porcentagens, a fim de retardar e/ou inibir o decaimento na concentração de BAL viáveis são de suma importância. De maneira geral, a obtenção do *sourdough* tipo III potencialmente atende a demanda produtiva e tecnológica, possuindo qualificação para aplicabilidade em produtos de panificação para além de pães.

## REFERÊNCIAS

AACC. **Approved methods of analysis of the american association of aereal ahemistry**. 11. ed. St. Paul, MN: AACC International, 2010.

AGUILERA, J. M.; KAREL, M. Preservation of biological materials under desiccation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 287–309, abr. 1997.

ALBAGLI, G. *et al.* How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread. **LWT**, v. 149, p. 111888, set. 2021.

ALEXANDER, R. J. Maltodextrins: production, properties, and applications. In: SCHENCK, F. W.; HEBEDA, R. E. Starch hydrolysis products: worldwide technology, production and applications. New York: **VCH Publishers**, p. 233-275, 1996.

ALVES, N. N. *et al.* Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 45–54, nov. 2016.

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p. 399–409, abr. 2005.

ARICI, M., OZULKU, G., YILDIRIM, R. M., SAGDIC, O., DURAK, M.Z. Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. **Food Sci. Biotechnol.** 27, p. 499–508, 2018.

ARORA, K.; AMEUR, H.; POLO, A.; DI CAGNO, R.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, 108, 71–83, 2021.

ARENDRT, E. K.; RYAN, L. A. M.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of bread. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 165–174, abr. 2007.

ARIAS, M. *et al.* Gut microbiota and systemic inflammation changes after bread consumption: The ingredients and the processing influence. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 98–105, maio 2017.

BAUER, S. A. W. *et al.* Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low-temperature vacuum drying. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 351–357, jun. 2012.

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S. *et al.* Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology**, v. 31, n. 11, p. 1274–1283, 18 ago. 2013.

BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, p.157-224, 1996.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, n. 2, p. 671–684, jan. 1997.

BHATTA, S.; STEVANOVIC JANEZIC, T.; RATTI, C. Freeze-drying of plant-based foods. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 87, 13 jan. 2020.

BIANCHI, F. *et al.* Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of the Italian Protected Designation of Origin “Altamura” bread volatile profile. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 787–793, out. 2008.

BÖHN, L. *et al.* Diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome as well as traditional dietary advice: A randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1399- 1407.e2, nov. 2015.

BRANDT, M. J. Sourdough products for convenient use in baking. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 161–164, abr. 2007.

BRANDT, M. J. Industrial production of sourdoughs for the baking branch – An overview.

**International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 3–7, ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263\\_22\\_09\\_2005.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html)> Acesso em: 28 mar. 2023.

BRYANT, G.; KOSTER, K. L.; WOLFE, J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. **Seed Science Research**, v. 11, n. 01, p. 17–25, mar. 2001.

BUITINK, J. *et al.* High critical temperature above T<sub>g</sub> may contribute to the stability of biological systems. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 2, p. 1119–1128, ago. 2000.

CAGLAR, N.; ERMIS, E.; DURAK, M. Z. Spray-dried and freeze-dried sourdough powders: Properties and evaluation of their use in breadmaking. **Journal of Food Engineering**, v. 292, p. 110355, mar. 2021.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, jan. 2002.

CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 1, p. 99–104, jan. 1996.

CATZEDDU, P. Sourdough breads. Flour and breads and their fortification in health and disease prevention, [S.L.], p. 177-188, 2019.

CHAVAN, R. S.; CHAVAN, S. R. Sourdough technology-A traditional way for wholesome foods: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 169–182, maio 2011.

CLARKE, C. I. *et al.* Wheat sourdough fermentation: Effects of time and acidification on fundamental rheological properties. **Cereal Chemistry Journal**, v. 81, n. 3, p. 409–417, maio

2004.

CODINĂ, G. G.; SARION, C.; DABIJA, A. effects of dry sourdough on bread-making quality and acrylamide content. **Agronomy**, v. 11, n. 10, p. 1977, 30 set. 2021.

COX, C. S. Roles of water molecules in bacteria and viruses. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 23, n. 1, p. 29–36, fev. 1993.

DE BELLIS, P. *et al.* Toxigenic potential and heat survival of spore-forming bacteria isolated from bread and ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 30–39, 16 mar. 2015.

DE VUYST, L. *et al.* Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 26–34, dez. 2016.

DE VUYST, L.; COMASIO, A.; KERREBROECK, S. V. Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–33, 15 set. 2021.

DECOCK, P.; CAPPELLE, S. Bread technology and sourdough technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 113–120, jan. 2005.

DIAZ, *et al.* Effect of water polarized at the carbonyl groups of phosphatidylcholines on the dipole potential of lipid bilayers. **Langmuir**, v. 15, n. 15, p. 5179–5182, 1 jul. 1999.

ERATTE, D. *et al.* Survival, oxidative stability, and surface characteristics of spray dried co-microcapsules containing omega-3 fatty acids and probiotic bacteria. **Drying Technology**, v. 34, n. 16, p. 1926–1935, 9 dez. 2016.

ERBAY, Z.; HEPBASLI, A. Advanced exergy analysis of a heat pump drying system used in food drying. **Drying Technology**, v. 31, n. 7, p. 802–810, 19 maio 2013.

ERMIS, E. A review of drying methods for improving the quality of probiotic powders and characterization. **Drying Technology**, v. 40, n. 11, p. 2199–2216, 1 ago. 2022.



Espanha, Ministerio De La Presidencia, Relaciones Con Las Cortes E Igualdad, 6994 Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan. Boletín Oficial del Estado, Núm. 113, 11 de mayo de 2019, Sec. I. Pág. 50168.

França, Décret n°93-1074 du 13 septembre 1993 pris pour l’application de la loi du 1er août 1905 en ce qui concerne certaines catégories de pains. NOR: ECOC9300130D. Version consolidée au 28 mar 2023.

FORSYTHE, Stephen J. Microbiologia da segurança dos alimentos.. 2.ed. PORTO ALEGRE: **Artmed**, 2013., p. 103.

FU, N. *et al.* Producing powders containing active dry probiotics with the aid of spray drying. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 85p. 211–262.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1127–1149, jun. 2011.

GÄNZLE, M. G.; ZHENG, J. Lifestyles of sourdough lactobacilli – Do they matter for microbial ecology and bread quality? **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 15–23, ago. 2019.

GÄNZLE, M. G.; LOPONEN, J.; GOBBETTI, M. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 10, p. 513–521, out. 2008.

GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. **ILAR Journal**, v. 41, n. 4, p. 187–196, 1 jan. 2000.

GOBBETTI, M. *et al.* Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. **Food Microbiology**, v. 12, p. 497–507, fev. 1995.

GOBBETTI, M. *et al.* How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. **Food Microbiology**, v. 37, p. 30–40, fev. 2014.

GONG, P. *et al.* Injury mechanisms of lactic acid bacteria starter cultures during spray drying: A review. **Drying Technology**, v. 32, n. 7, p. 793–800, 19 maio 2014.

GOULD, G.W. Heat-induced injury and inactivation. *In*: Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. New York: **Elsevier Applied Science**, 1989. p. 11–42

GUL, L. B. *et al.* Optimization of cryoprotectant formulation to enhance the viability of *Lactobacillus brevis* ED25: Determination of storage stability and acidification kinetics in sourdough. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 4, abr. 2020.

GUL, L. B.; CON, A. H.; GUL, O. Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. **Cryobiology**, 96, 122–129. 23 July 2023.

HADIYANTO *et al.* Quality prediction of bakery products in the initial phase of process design. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 285–298, jun. 2007.

HAMMES, W. P. *et al.* Microbial ecology of cereal fermentations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 4–11, jan. 2005.

HAMMES, W. P.; GÄNZLE, M. G. Sourdough breads and related products. *In*: WOOD, B. J. B. (Ed.). **Microbiology of Fermented Foods**. Boston, MA: Springer US, 1998. p. 199–216.

HIGL, B. *et al.* Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 4, p. 794–800, 2007.

HUANG, S. *et al.* Spray-drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 1–17, maio 2017.

JACOBSON, K.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. **Biochemistry**, v. 14, n. 1, p. 152–161, 14 jan. 1975.

KATINA, K. *et al.* Potential of sourdough for healthier cereal products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 104–112, jan. 2005.

KAWAI, K.; SUZUKI, T. Stabilizing effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: step by step evaluation from freezing to storage. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 10, p. 1883–1890, out. 2007.

KOSTER, K. L. *et al.* Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 4, p. 1932–1946, abr. 2000.

KOSTER, K. L.; MADDOCKS, K. J.; BRYANT, G. Exclusion of maltodextrins from phosphatidylcholine multilayers during dehydration: effects on membrane phase behaviour. **European Biophysics Journal**, v. 32, n. 2, p. 96–105, maio 2003.

LEE, J.; KALETUNÇ, G. Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5379–5386, nov. 2002.

LIEVENSE, L. C.; VAN 'T RIET, K. Convective drying of bacteria. *In*: FIECHTER, A. (ed.). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin: **Springer**, 1993. p. 45-63

LUZARDO, M. DEL C. *et al.* Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole Potential of lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 5, p. 2452–2458, maio 2000.

MACKEY, B. M. Injured bacteria. *In*: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. (ed.) *The Microbiological safety and Quality of Food: Volume 1*. Maryland: **Aspen Publishers**, 2000. p. 315–341

MANTZOURANI, I. *et al.* Assessment of ready-to-use freeze-dried immobilized biocatalysts

as innovative starter cultures in sourdough bread making. **Foods**, v. 8, n. 1, p. 40, 21 jan. 2019.

MARCO, I. D. *et al.* A systematic review of drying methods and their impact on technological characteristics of sourdough type III. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 6, n. 1, p. e2022003, 2022.

MARTINS, F. P. *et al.* Secagem: uma revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 4, p. 0600–0607i, 20 out. 2020.

MASTERS, K. Spray drying handbook. 3 Ed. **Longman Scientific & Technical**, 1997

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Experimental cell research**, 1972. v. 71, n. 2, p. 345-355.

MCNAMEE, B. F.; O'RIORDA, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4551–4555, 1 nov. 1998.

MENEZES, L. A. A. *et al.* Reducing FODMAPs and improving bread quality using type II sourdough with selected starter cultures. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 72, n. 7, p. 912–922, 3 out. 2021.

MENEZES, L. A. A. *et al.* Microbiologia e produção de pães de fermentação natural. *In*: MARTIN, J. G. P.; LINDNER, J. D. D. Microbiologia de alimentos fermentados. São Paulo: **Blucher**, 2022. p. 413-459

MOHD ROBY, B. H. *et al.* Physical properties, storage stability, and consumer acceptability for sourdough bread produced using encapsulated kombucha sourdough starter culture. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 8, p. 2286–2295, ago. 2020.

MOREIRA, M. T. C. *et al.* Challenges associated with spray-drying of lactic acid bacteria: Understanding cell viability loss. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 4, p. 3267–3283, jul. 2021.

MORGAN, C. A. *et al.* Preservation of micro-organisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 2, p. 183–193, ago. 2006.

NOVOTNI, D. *et al.* Glycemic index and firming kinetics of partially baked frozen gluten-free bread with sourdough. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 2, p. 120–125, mar. 2012.

OBUCHI, K. *et al.* Calorimetric characterization of critical targets for killing and acquired thermotolerance in yeast. **Yeast**, v. 16, n. 2, p. 111–119, 30 jan. 2000.

ORDÓÑEZ, J. A. Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos. **Artmed**, v. 1, p. 294, nov. 2005.

OYINLOYE, T. M.; YOON, W. B. Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 354, 20 mar. 2020.

PANEK, A. D.; MANSURE, J. J. C.; ELEUTHERIO, C. A. The role of trehalose in yeast cell under stress. **Cryobiology**, v. 30 p. 238-9, 1993.

PAPADIMITRIOU, K. *et al.* Stress physiology of lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 837–890, set. 2016.

PEIGHAMBARDOUST, S. H.; GOLSHAN TAFTI, A.; HESARI, J. Application of spray-drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 5, p. 215–224, maio 2011.

PEREIRA, A. P. M. *et al.* Occurrence and enumeration of rope-producing spore forming bacteria in flour and their spoilage potential in different bread formulations. **LWT**, v. 133, p. 110108, nov. 2020.

PERRI, G. *et al.* Defatted durum wheat germ to produce type-II and III sourdoughs: Characterization and use as bread ingredient. **LWT**, v. 163, p. 113566, jun. 2022.

PERDANA, J. *et al.* Interactions between formulation and spray drying conditions related to

survival of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Food Research International**, v. 56, p. 9–17, fev. 2014.

PÉTEL, C.; ONNO, B.; PROST, C. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 105–123, jan. 2017.

POTTS, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 755–805, dez. 1994.

PRASAD, N. et al. Gum arabic – A versatile natural gum: A review on production, processing, properties and applications. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115304, nov. 2022.

PURLIS, E.; SALVADORI, V. O. Modelling the browning of bread during baking. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 865–870, ago. 2009.

QUATTRINI, M. *et al.* Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 8–14, 2 ago. 2019.

RANADHEERA, C. S. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 155–159, jan. 2015.

REALE, A. *et al.* Stabilization of sourdough starter by spray-drying technique: New breadmaking perspective. **LWT**, v. 99, p. 468–475, jan. 2019.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M. Effect of Encapsulating Materials on Water Sorption, Glass Transition and Stability of Juice From Immature Acerola. **International Journal of Food Properties**, v. 8, n. 2, p. 337–346, 1 maio 2005.

RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. (EDS.). Encapsulation and controlled release of food ingredients. **American Chemical Society**, 1995. v. 590

RIZZELLO, C. G. et al. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an

ingredient for bread making. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 952–959, ago. 2011.

ROSENKVIST, H. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 353–363, ago. 1995.

SAHIN, S.; SUMNU, S. G. Physical properties of foods. **Springer**, 2006.

SANTIVARANGKNA, C.; HIGL, B.; FOERST, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 429–441, maio 2008.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 302–315, 9 abr. 2007.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 1–13, jul. 2008.

SAVEDBOWORN, W. *et al.* Impact of inulin on viability and storage stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in fermented rice extract. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 6, p. 463–469, dez. 2017.

SHU, G. *et al.* Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. **LWT**, v. 90, p. 70–76, abr. 2018.

SIEPMANN, F. B. *et al.* Overview of sourdough technology: from production to marketing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 2, p. 242–270, fev. 2018.

SIRAGUSA, S. *et al.* Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* Starters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1099–

1109, 15 fev. 2009.

SPECTOR, A. A.; YOREK, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **Journal of Lipid Research**, v. 26, n. 9, p. 1015–1035, set. 1985.

STEFANELLO, R. F. et al. Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. **LWT**, v. 89, p. 510–517, mar. 2018.

STEFANELLO, R. F. et al. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalous* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. **Food Research International**, v. 115, p. 90–94, jan. 2019.

TAFTI, A. G. et al. Physico-chemical and functional properties of spray-dried sourdough in breadmaking. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 3, p. 271–278, jun. 2013.

TAN, D. T.; POH, P. E.; CHIN, S. K. Microorganism preservation by convective air-drying—A review. **Drying Technology**, v. 36, n. 7, p. 764–779, 19 maio 2018.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 4, p. 456–462, abr. 1995.

THIELE, C.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Contribution of sourdough *Lactobacilli*, Yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread Flavor. **Cereal Chemistry Journal**, v. 79, n. 1, p. 45–51, jan. 2002.

TIEKING, M.; GÄNZLE, M. G. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 79–84, jan. 2005.

TO, B. C. S.; ETZEL, M. R. Spray-drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, p. 576–578, maio 1997.

TOH, D. W. K.; KOH, E. S.; KIM, J. E. Lowering breakfast glycemic index and glycemic load attenuates postprandial glycemic response: A systematically searched meta-analysis of



randomized controlled trials. **Nutrition**, v. 71, p. 110634, mar. 2020.

TYMCZYSZYN, E. E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; DISALVO, E. A. Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 845–851, mar. 2007.

WEN, D.-M. *et al.* Use of thermal imaging and Fourier transform infrared spectroscopy for the pre-symptomatic detection of cucumber downy mildew. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 2, p. 405–416, out. 2019.

WILSON, P. (ed.). Supercooling. Rijeka: **IntechOpen**, 2012. p. 76

Wieschebrock, M., Seitter, M. & Hertel, C. Quantitative detection of lactic acid bacteria in dried sourdoughs using real-time PCR. **Eur Food Res Technol** 233, 617–624 (2011).

ZAYED, G.; ROOS, Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1081–1086, maio 2004.

ZHANG, Y.; LIN, J.; ZHONG, Q. Effects of media, heat adaptation, and outlet temperature on the survival of *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 after spray drying and subsequent storage. **LWT**, v. 74, p. 441–447, dez. 2016.

ZHOU, X. *et al.* Typical reactive carbonyl compounds in food products: Formation, influence on food quality, and detection methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 503–529, mar. 2020.