



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
(PPGCTA)

FERNANDA MARTINBIANCO

**DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA PARA A PRODUÇÃO DE PÃO
SOURDOUGH: ASPECTOS DA PRODUÇÃO DE INÓCULO E QUALIDADE
SENSORIAL DE PÃES**

PORTO ALEGRE
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
(PPGCTA)

**DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA PARA A PRODUÇÃO DE PÃO
SOURDOUGH: ASPECTOS DA PRODUÇÃO DE INÓCULO E QUALIDADE
SENSORIAL DE PÃES**

Fernanda Martinbianco

(Engenheira de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Marco Antônio Zachia Ayub
Co-orientador: Dr^a. Simone Hickmann Flôres

PORTO ALEGRE

2011

CIP – Catalogação na Publicação

Martinbianco, Fernanda
M379 Desenvolvimento da tecnologia para a produção de pão *sourdough*: aspectos da produção de inóculo e qualidade sensorial de pães. / Fernanda Martinbianco . – – Porto Alegre, 2012.

55f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Coorientador: Profª Drª Simone Hickmann Flôres

Bibliografia

1.Análise sensorial de alimentos 2. Pão 3.Fermentação de alimentos I. Título. II. Ayub, Marco Antônio Záchia (orient.) III. Flores, Simone Hickmann (coorient.)

CDU 664:001.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Fernanda Martinbianco
(Engenheira de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

**DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA PARA A PRODUÇÃO DE PÃO
SOURDOUGH: ASPECTOS DA PRODUÇÃO DE INÓCULO E QUALIDADE
SENSORIAL DE PÃES**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Aprovado em:

Homologada por:

Pela banca examinadora:

Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. José Maria Wiest
Coordenador do Programa de

Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Prof.^a Dr.^a. Simone Hickmann Flôres
Co-orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof.^a Dr.^a. Erna Vogt de Jong
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência
e Tecnologia de Alimentos
ICTA/UFRGS

Prof.^a Dr.^a. Suse Botelho Silva
UNISINOS

Prof.^a Dr.^a. Cristina Simões da Costa
Panificação e Confeitaria/IFRS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo apoio que me deram ao longo dessa jornada. Ao meu noivo Marcus Vinicius por todo carinho e compreensão pelas horas em que não pude estar presente. As minhas colegas do mestrado pelo apoio. Agradeço também ao grupo do Bioteclab em especial a Nicole. A minha bolsista de iniciação científica Camila pela importante e providencial ajuda. Aos professores Marco Antônio Z. Ayub, Rosane Rech, Simone Flores e André Rosa Martins pela orientação. Também um agradecimento especial aos professores e alunos do curso técnico de Panificação e Confeitaria do Instituto Federal do Rio Grande do Sul. Enfim a todos que de uma maneira ao de outra tornaram este trabalho possível.

RESUMO

Neste trabalho, foi realizado um estudo sobre a produção de pães de fermentação natural ou “sourdough”, baseado na hipótese que este processo possa apresentar papel bem definido na melhoria do sabor, da estrutura de pão, na estabilização ou aumento dos níveis de vários compostos bioativos, retardamento da biodisponibilidade do amido (baixo índice glicêmico) e no aumento da biodisponibilidade de minerais.. Elaborou-se pães que foram produzidos via fermentação “sourdough” utilizando os microrganismos *Kluyveromyces marxianus*, *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus plantarum* como cultura de partida. A partir de sete amostras resultantes de um delineamento de mistura Simplex-Centróide, determinou-se o volume específico dos pães e o pH, acidez e as células viáveis durante a fermentação “sourdough”. Observou-se que pão produzido com *Lactobacillus plantarum* foi o que apresentou o menor volume específico e a mistura entre *K.marxianus* e *L. plantarum* exerceu influência positiva, acarretando o maior volume específico. Durante a fermentação “sourdough” houve redução dos valores de pH e aumento da acidez. Através da análise sensorial verificou-se a boa aceitabilidade para os pães produzidos com a mistura entre *D.bruxellensis* e *K.marxianus* e para a mistura entre os três micro-organismos. Estes resultados indicam que o tipo de cultura de partida influencia nos parâmetros de qualidade dos pães avaliados. No entanto, novos estudos, envolvendo outras variáveis do processo de fermentação “sourdough” devem ser feitos para melhor avaliação.

Palavras-chave: Fermentação “sourdough”. Pão. Análise sensorial.

ABSTRACT

In this work it was studied the formulation and production of natural-fermentation breads, also known as “sourdough”, based upon the fact that this process may play a well-defined role in the improvement of flavor, the structure of bread, in the stabilization or increase of the levels of several bioactive compounds, the bioavailability of slow starch (low glycemic index products), and in improving the bioavailability of minerals in this highly consumed product. Breads were produced by fermentation "sourdough" using *Kluyveromyces marxianus*, *Dekkera bruxellensis*, and *Lactobacillus plantarum* as starting cultures. The seven samples derived from a design mix-Simplex Centroid determined the specific volume of breads and pH, acidity, and viable cells during fermentation "sourdough." It was observed that bread produced with *Lactobacillus plantarum* presented the lowest specific volume, while the mix of *K.marxianus* and *L.plantarum* exerted positive influence, leading to the high specific volume. During fermentation "sourdough" there was a reduction in the pH and an increase in acidity. For the sensorial analysis, there was high acceptability for the bread produced with the mixture of *D. bruxellensis* and *K. marxianus* and the mix between the three microorganisms. These results indicate that the type of starting culture have strong influence on the quality of bread parameters evaluated. However, further studies involving other process variables fermentation "sourdough" must be carried out in order to better understand this technical product.

Keywords: Fermentation "sourdough". Bread. Sensory analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Os sete pontos do delineamento experimental, Simplex-centróide, para o efeito da biomassa de *K.marxianus* (X_1), *D.bruxellensis* (X_2) e *L.plantarum* (X_3)..... 30
- Figura 2** - Diagrama triangular dos parâmetros atributo avaliação global, atributo sabor, volume específico resultantes do delineamento experimental 35
- Figura 3** - Foto das formulações dos pães. **B** (mistura com 100% de *L. plantarum*) amostra com a menor nota nos dois atributos avaliados na análise sensorial. **F** (mistura com 50% de *K. marxianus* e *D. Bruxellensis*) nota mais alta no atributo avaliação global e **I** (mistura com 33,33% de *K.marxianus*, *D.bruxellensis* e *L.plantarum*) nota mais alta no atributo sabor 37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Proporção dos componentes *Kluyveromyces marxianus* (X1), *Dekkera bruxellensis* (X2) e *Lactobacillus plantarum* (X3) que compõe o projeto de mistura Simplex-centróide..... 29
- Tabela 2** - Formulação base dos pães elaborados para avaliar o efeito da composição da biomassa. 30
- Tabela 3** - Modelos previstos para o delineamento experimental, Simplex-centróide, utilizado para avaliar o efeito da biomassa de *K.marxianus* (X₁), *D.bruxellensis* (X₂) e *L.plantarum* (X₃) sobre o volume específico, atributo sabor e aceitação global dos pães. 33
- Tabela 4** - Média e desvio padrão resultantes do delineamento experimental, Simplex-centróide, utilizado para avaliar o efeito da biomassa de *K.marxianus* (X₁), *D.bruxellensis* (X₂) e *L.plantarum* (X₃) sobre o volume específico, o atributo sabor e aceitação global dos pães..... 34
- Tabela 5** - Valores do pH, acidez (TTA) e células viáveis durante a fermentação “sourdough” nas diferentes misturas resultantes do delineamento Simplex-centróide..... 39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
3.1	Objetivos gerais	12
3.2	Objetivos específicos	12
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4.1	Pão	13
4.2	Características e funções dos ingredientes	13
4.2.1	<i>Farinha de trigo</i>	13
4.2.2	<i>Água</i>	14
4.2.3	<i>Fermento biológico</i>	15
4.2.4	<i>Açúcares</i>	15
4.2.5	<i>Gordura</i>	15
4.2.6	<i>Sal</i>	16
4.2.7	<i>Leite</i>	16
4.3	Fluxograma de processamento	16
4.3.1	<i>Método direto</i>	16
4.3.2	<i>Método indireto utilizando massa mãe</i>	17
4.3.2.1	<i>Produção e fermentação da massa mãe</i>	17
4.3.2.2	<i>Mistura e processamento da massa</i>	17
4.3.2.3	<i>Boleamento</i>	18
4.3.2.4	<i>Descanso</i>	18
4.3.2.5	<i>Divisão</i>	18
4.3.2.6	<i>Fermentação</i>	18
4.3.2.7	<i>Cocção ou forneamento</i>	19
4.3.2.8	<i>Resfriamento</i>	19
4.4	A Fermentação “Sourdough”	19
4.4.1	<i>Definição</i>	19
4.4.2	<i>Potencial da fermentação “sourdough” em produtos ricos ou enriquecidos em fibra</i>	21
4.4.3	<i>Influência da fermentação “sourdough” nos níveis e na estabilidade de compostos biativos</i>	22
4.4.4	<i>Influência da fermentação “sourdough” na digestibilidade do amido</i>	23
4.4.5	<i>“Sourdough” e a biodisponibilidade de minerais</i>	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1	Micro-organismos e condições de crescimento	25

5.2 Delineamento experimental	25
5.3 Produção e propagação do “sourdough” em laboratório	26
5.4 Produção dos pães	27
5.5 Determinações analíticas	28
5.5.1 <i>pH</i>	28
5.5.2 <i>Acidez total titulável (TTA)</i>	28
5.5.3 <i>Contagem total dos micro-organismos</i>	28
5.5.4 <i>Volume específico</i>	29
5.5.5 <i>Análise sensorial</i>	29
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1 <i>Volume específico</i>	30
6.2 <i>Análise sensorial</i>	32
6.3 <i>Valores de pH, acidez (TTA) e UFC durante a fermentação “sourdough”</i>	35
7 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÊNDICE A – Cultivo dos microrganismos utilizados na fermentação “sourdough” .	44
APÊNDICE B – Ficha da avaliação sensorial	52
APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido	53

INTRODUÇÃO

A indústria de panificação vivencia uma revolução ao longo dos últimos 150 anos. Pequenas padarias artesanais deram lugar a padarias industriais. A produtividade tornou-se a chave do sucesso. Diferentes tecnologias de panificação foram desenvolvidas para responder melhor às exigências do novo mercado. A principal consequência desta evolução foi redução do interesse pelo pão produzido com processos de longa fermentação.

O renascimento da aplicação da fermentação “sourdough” na fabricação de pães é motivada pelos efeitos benéficos deste tipo de fermentação no sabor, textura, vida útil e propriedades nutritivas do pão e de outros produtos assados (GÄNZLE et al., 2007).

O “sourdough” uma mistura de farinha e água fermentada com leveduras e bactérias lácticas, é a base para a produção de pão “sourdough”. As bactérias lácticas causam acidificação através da produção de ácido láctico que aumenta a vida útil do pão, impedindo o crescimento de micro-organismos indesejáveis e afetando no seu valor nutritivo através do aumento da disponibilidade de sais minerais e outros compostos bioativos. Além destas vantagens, os efeitos estruturais do “sourdough” na massa do pão podem ser devidos à influência direta do pH baixo na estrutura de formação dos componentes da massa tais como o glúten, amido e arabinoxilanos. Tem sido observado também que, quando o “sourdough” é adicionado, ocorre mudanças nas propriedades reológicas fundamentais de massa, tornando-a mais macia, menos elástica e, portanto, facilmente extensível (CLARKE, SCHOBBER & ARENDT, 2002). Os micro-organismos podem ser oriundos de contaminantes naturais selecionados na farinha ou de culturas “*starter*” contendo uma ou mais espécies conhecidas de bactérias lácticas e leveduras.

As propriedades do “sourdough” dependem de vários fatores, tais como o processo do “sourdough” e dos micro-organismos envolvidos (LONNER; PREVE-AKESSON, 1989). A fermentação “sourdough” tem sido amplamente estudada devido à sua natureza complexa, pois ainda não é um processo bem compreendido. Os micro-organismos envolvidos na fermentação “sourdough”, tradicionalmente, desenvolvem-se naturalmente, mas a fim de controlar o processo fermentativo e otimizar os benefícios da fermentação, há grande interesse no uso de novas e definidas culturas “starters”.

JUSTIFICATIVA

O processo tradicional de produção de pão “sourdough” tem obtido sucesso nos últimos anos, devido à crescente demanda dos consumidores por alimentos naturais, saborosos e saudáveis (BRUMMER; LORENZ, 1991; THIELE et al, 2002;. LOPEZ et al, 2003).

A fermentação “sourdough” tem papel bem definido na melhoria do sabor e da estrutura de pão. No entanto, o potencial desta fermentação em melhorar as propriedades nutricionais dos produtos a base de aveia, centeio e trigo, somente nos últimos anos vem ganhando destaque. A fermentação “sourdough” pode modificar as propriedades nutricionais dos cereais de várias maneiras: melhorando a textura e a palatabilidade dos grãos integrais, ricos em fibras ou produtos sem glúten, estabilizando ou aumentando os níveis de vários compostos bioativos, retardando a biodisponibilidade do amido (baixo índice glicêmico) e aumentando a biodisponibilidade de minerais. Novas aplicações interessantes para o “sourdough” continuam ainda sendo exploradas, tais como o uso de culturas “starters” prebióticas ou a produção de novos tipos de compostos bioativos (KATINA et al., 2005).

OBJETIVOS

1.1 Objetivos gerais

Estudar a viabilidade de transformar o processo “sourdough” em um sistema padronizado, com condições de fermentação controladas utilizando cepas conhecidas de leveduras e bactérias lácticas.

1.2 Objetivos específicos

- a) Produzir de biomassa dos microrganismos selecionados para serem utilizados na produção dos pães;
- b) formular pães baseadas nas condições de fermentação, quantidade e tipo de cepas usadas;
- c) analisar sensorialmente estes produtos, através de testes de aceitação de atributos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3 Pão

Segundo a Resolução RDC n.º 263 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2005) o pão “[...] é o produto obtido da farinha de trigo e/ou outras farinhas, adicionado de líquido, resultantes do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto, e pode apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos”.

1.4 Características e funções dos ingredientes

Os principais ingredientes em panificação dividem-se em dois grandes grupos: essenciais (farinha de trigo, água, fermento biológico e sal) e não essenciais (açúcar, gordura, leite, enzimas e outros) (CANELLA-RAWLS, 2005).

1.4.1 Farinha de trigo

A farinha de trigo é definida como um produto obtido da moagem do grão de trigo *Triticum aestivum*, ou de outras espécies do gênero *Triticum* (OSÓRIO; WENDT, 1995).

Os componentes da farinha de trigo (base seca) podem ser classificados em seis grupos: amido; proteínas armazenadas (glúten); polissacarídeos não-amiláceos (pentosas); lipídeos; proteínas solúveis em água (albumina e globulina) e cinzas (CAUVAIN, 2009).

O amido, que constituiu 65% da farinha comum (base de 14% umidade) possui influência decisiva no processo de assamento, quando gelatiniza, e durante o subsequente armazenamento, quando a retrogradação é a principal responsável pelo envelhecimento do pão. A proteína armazenada encontrada na farinha não é, no sentido exato, o glúten: este termo designa as glutelinas hidratadas (glutenina) e as prolaminas (gliadinas) formadas quando a massa (farinha e água) é misturada. Da proteína total na farinha de trigo, cerca de um sexto é proteína solúvel (albuminas e globulinas), portanto uma farinha com 12% de proteína contém cerca de 10% de glúten (CAUVAIN, 2009).

Para o mesmo autor, os polissacarídeos não-amiláceos (insolúveis em água – xilanas; solúveis em água – arabinóxilanas e arabinogalactanas) representam apenas 2-2,5% da

farinha, mas possuem grande influência sobre as propriedades da massa. As pentosas são gomas; absorvem diversas vezes seu peso em água, formando soluções altamente viscosas. A propriedade de absorção de água das pentosas exerce influência nas massas de farinha de trigo, e a viscosidade, devido as pentosas solúveis em água influencia o comportamento viscoelástico da massa.

A farinha de trigo contém cerca de 2,5% de lipídios, que durante o processo de mistura formam complexo com o glúten. Exercem influência importante sobre o desempenho no assamento, principalmente em relação ao salto de forno (volume do produto). O conteúdo de cinzas varia na farinha em torno de 0,5% (conforme a extração, durante processo de moagem), este material inorgânico possui pouca influência sobre a formação da massa (CAUVAIN, 2009).

A qualidade do grão de trigo pode ser definida como resultado da interação que a cultura sofre no campo, as condições do solo, clima, incidência de pragas e moléstias, manejo da cultura, cultivar, bem como das operações de colheita, secagem, armazenamento, moagem e das características genéticas (POMERANZ, 1987). As avaliações físicas, reológicas e funcionais de trigos são de vital importância para a indústria de panificação, pois permitem definir a proporção a ser utilizada nas mesclas de trigos e de farinhas (RAO; RAO, 1993).

1.4.2 Água

A água é um ingrediente diluente que interfere diretamente nas características do produto final. A água deve ser potável ou mineral com dureza média, pH neutro ou ligeiramente ácido (QUAGLIA, 1991; CANELLA-RAWLS, 2005). A água tem importância na formação da massa, hidrata a farinha, assegura a união das proteínas que dão origem ao glúten e ao mesmo tempo fornece meio propício ao desenvolvimento da atividade enzimática e, conseqüentemente, à fermentação do pão (VITTI, 2001). Ainda, a água permite que durante o processo de cozimento do pão ocorra o fenômeno de gelatinização do amido, além de controlar a maciez e palatabilidade do pão (BENNION, 1970).

A quantidade, qualidade e temperatura da água a ser adicionada nas formulações de panificação têm importância fundamental no transcorrer do processo e influência direta sobre os produtos obtidos (GRANOTEC DO BRASIL, 1998).

1.4.3 Fermento biológico

Segundo a ANVISA (BRASIL, 1977) “fermento biológico” ou “levedura ativa” é o produto obtido de culturas puras de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) por procedimento tecnológico e empregado para dar sabor próprio, aumentar o volume e a porosidade dos produtos forneados.

No processo de panificação, sua principal função é a de provocar a fermentação dos açúcares, produzindo gás carbônico, que ao mesmo tempo é responsável pela formação dos alvéolos internos e pelo crescimento da massa (VITTI, 2001).

O fermento também exerce influência sobre as propriedades reológicas da massa, tornando-a mais elástica e macia (PAVANELLI, 2000), e ainda, produz um conjunto de compostos químicos responsáveis pelo sabor característico do pão (QUAGLIA, 1991).

1.4.4 Açúcares

Embora outros adoçantes possam ser utilizados na elaboração de produtos de panificação o açúcar comum ou sacarose é o mais versátil e capaz de desempenhar funções específicas de maneira controlada. Os açúcares têm a função de melhorar a cor da crosta, sabor e aroma do pão, além de contribuir para a textura e aumentar a retenção de umidade e maciez (PYLER, 1988). Porém, seu uso em excesso retarda a ação do fermento, devendo ser balanceado com os demais ingredientes.

1.4.5 Gordura

A gordura tem a função de lubrificar o glúten, o que contribui para melhorar as propriedades de expansão da massa, e gerar pães com volumes maiores. Contribui para miolo com textura mais suave e sedosa, além de retardar o envelhecimento do pão por formar complexo com o amido diminuindo a sua taxa de retrogradação. Ainda auxilia na retenção dos gases da massa, e produz crosta mais fina e macia (EL-DASH; CAMPOS; GERMANI, 1994).

1.4.6 Sal

O sal desempenha diversas funções, não apenas a de dar sabor à massa; de maneira geral, atua durante a fermentação, no período de crescimento e na própria finalização do pão, trabalhando particularmente na crosta; afeta as características de conservação do pão, devido às suas propriedades higroscópicas (CANELLA-RAWLS, 2005) e controla a ação do fermento, pois é bacteriostático (EL-DASH; CAMPOS; GERMANI, 1994). A porcentagem mais indicada de sal em uma massa é de 1,5 % a 2,0 % no máximo (QUAGLIA, 1991).

1.4.7 Leite

Apresenta alta potencialidade aglutinadora das proteínas da farinha, o que aumenta a rigidez da massa. Além disso, o leite produz miolo mais macio e de farelo suave, crosta mais dourada e prolonga a capacidade de armazenagem do produto. A lactose controla a coloração da crosta (reação de Maillard). Juntamente com as proteínas, adiciona valor nutricional ao alimento e sabor à mistura, e auxilia na retenção de umidade da massa (CANELLA-RAWSS, 2005).

1.5 Fluxograma de processamento

São vários os métodos de processamento do pão. Esses métodos podem ser agrupados em dois tipos principais: método direto (todos os ingredientes são misturados ao mesmo tempo em uma única etapa) e indireto (utilizando esponja ou massa mãe, processo com duas etapas) (CANELLA-RAWLS, 2005).

1.5.1 Método direto

O método direto de fabricação de pães consiste basicamente em adicionar todos os ingredientes no início ou durante a etapa da mistura, e não adicionar massa previamente fermentada (CANELLA-RAWLS, 2005).

1.5.2 Método indireto utilizando massa mãe

O método indireto utilizando massa mãe baseia-se na utilização de pedaços de massa, que haviam fermentado devido à presença de fermentos naturais ou culturas “starter” inoculadas na massa (HUY, 2006).

1.5.2.1 Produção e fermentação da massa mãe

Nesta etapa, a cultura starter (um único micro-organismo ou uma mistura de micro-organismo definido para o inóculo da massa mãe) é misturada à farinha de trigo e a água. Após a formação de uma massa lisa e homogênea, a mesma é levada a câmara de fermentação com temperatura controlada, por 24 h ou mais (HUY, 2006).

Caso, a massa mãe permaneça na câmara de fermentação por mais de 24 h, a cada período de tempo, que varia dependendo do tempo total de fermentação da massa mãe, uma quantidade específica de massa é retirada e acrescentam-se farinha de trigo e água (HUY, 2006).

1.5.2.2 Mistura e processamento da massa

Nesta etapa, utilizando uma masseira, os ingredientes secos são misturados com a água, após uma parte da massa mãe é acrescentada a esta mistura até a obtenção de uma massa homogênea e, por fim gordura é acrescentada.

A mistura consiste simplesmente na homogeneização dos ingredientes, enquanto o amassamento representa o desenvolvimento da estrutura da massa (glúten). Assim os requisitos básicos do processo de mistura são: dispersar uniformemente os ingredientes na formulação; estimular a dissolução e a hidratação desses ingredientes, em especial as proteínas da farinha; fornecer energia para o desenvolvimento da estrutura do glúten da massa; incorporar bolhas de ar na massa, proporcionando núcleos gasosos para o dióxido de carbono gerado da fermentação e o oxigênio da oxidação e da atividade do fermento e prover a massa com uma forma apropriada para o processo subsequente (CAUVAIN, 2009).

1.5.2.3 Boleamento

Nesta etapa, a massa é amassada mediante um movimento giratório sobre a mesa, produzindo uma peça em forma de bola (CANELLA-RAWLS, 2005).

1.5.2.4 Descanso

A massa deve repousar para haver o relaxamento da rede de glúten a fim de recuperar parte de sua resistência perdida durante o amassamento (OWENS, 2001).

Nesta etapa, a atividade do fermento começa a gerar dióxido de carbono. O grau de atividade depende do tempo de descanso e da temperatura da massa. Além disso, esta etapa intensifica o processo de fermentação. Outro aspecto importante desta etapa é impedir a desidratação da massa (CAUVAIN, 2009).

1.5.2.5 Divisão

Para gerar o formato e o tamanho do produto final, deve-se primeiro dividir a massa em porções individuais e depois modelá-las para formar a base do produto final depois da fermentação e do assamento (CAUVAIN, 2009).

1.5.2.6 Fermentação

Fermentação é o nome dado ao período de descanso da massa, depois de as peças modeladas terem sido colocadas em formas, durante o qual a fermentação ocorre com temperatura e umidade controlada.

Influenciam na capacidade de fermentação fatores externos – temperatura e umidade; fatores internos – qualidade da farinha, taxa de extração, granulometria (QUAGLIA, 1991).

Nesta etapa, o amido é transformado em açúcares pela ação enzimática. Os açúcares constituem o substrato para o fermento, e os produtos decompostos são o dióxido de carbono e o álcool. À medida que o dióxido de carbono é produzido, ele é retido nas células formadas na matriz protéica durante o processo de mistura, fazendo as células crescerem e a massa se expandir (CAUVAIN, 2009).

O tempo ótimo de fermentação da massa é quando esta atinge o ponto ótimo de retenção dos gases, e é determinado por fatores como: método de fabricação empregado, quantidade de fermento, temperatura da fermentação e a qualidade da farinha e dos ingredientes (EL-DASH; CAMPOS; GERMANI, 1994).

1.5.2.7 Cocção ou forneamento

O processo de cocção da massa consiste em uma série de transformações físicas, químicas e biológicas, que permitem obter no final do processo um produto comestível e de excelentes características organolépticas e nutritivas (QUAGLIA, 1991). A temperatura do forno e o tempo de cocção variam segundo o tamanho e o tipo de pão.

No forno, o volume da massa ainda aumenta devido à produção contínua de gás até o término da atividade das enzimas e da levedura. O amido gelatiniza e o glúten sofre coagulação, retendo bolhas de ar e formando a textura do miolo (ELDASH; CAMARGO; DIAZ, 1982).

1.5.2.8 Resfriamento

Após a cocção os pães conservam alguma umidade. Assim, não podem ser embalados imediatamente, antes devem sofrer o processo de resfriamento à temperatura ambiente ou em câmara de resfriamento até que tenham condições ideais para serem embalados (CANELLA-RAWLS, 2005).

1.6 A Fermentação “Sourdough”

1.6.1 Definição

“Sourdough” é uma massa ácida utilizada para fazer pão, elaborada através da fermentação espontânea da farinha de cereais umedecida (LONNER; PREVE-AKESSON, 1989). A maioria dos pães são produzidos através do método direto, significando que todos os ingredientes são combinados em uma única etapa. Alternativamente, o pão pode ser feito de “sourdough” com ou sem adição de uma cultura de partida de linhagens puras de microrganismos ou pedaços de massa previamente fermentados (reinóculo). A produção do “sourdough” envolve a mistura de farinha, água e o agente de fermentação. No dia do

preparo do pão, o restante dos ingredientes é adicionado, e o restante do processo é o mesmo do método direto (LONNER et al., 1986; DE VUYST et al., 2002).

Três tipos (I, II e III) de “sourdough” são distinguidos com base no protocolo de propagação e atividade metabólica da principal bactéria ácido láctica. O “sourdough” tipo II é propagado em altas temperaturas ($> 30^{\circ}\text{C}$), com longo tempo de fermentação (até 5 dias) e alto teor de água, e é usado principalmente como agente aromatizante e para acifigar o meio. O tipo III corresponde a um “sourdough” seco utilizado como agente aromatizante (HAMMES; GÄNZLE, 1998). O tipo I tem maior aplicação e assemelha-se a processos tradicionais. É caracterizado por contínuas propagações (diárias) para manter os microorganismos em estado ativo, indicado pela alta atividade metabólica. O processo é realizado à temperatura ambiente ($20\text{-}30^{\circ}\text{C}$) e o pH é cerca de 4,0. O “sourdough” tipo I engloba cultura pura desenvolvida espontaneamente, culturas misturadas a partir de trigo e centeio ou misturas preparadas através de múltiplos estágios do processo de fermentação, e ainda “sourdough” produzido em regiões tropicais e fermentado a temperaturas elevadas (STOLZ, 1999). Poucos estudos têm considerado o uso de culturas starters durante a propagação do “sourdough” tipo I (SIRAGUSA et al., 2009; VOGELMANN et al., 2009).

O “sourdough” pode ser produzido nas padarias ou pode ser obtido de fornecedores comerciais. Exemplos de “sourdough” comerciais: para a produção de pão de trigo ácido, um processo que vem sendo realizado na Baía de San Francisco (EUA) por mais de 130 anos (KLINE; SUGIHARA, 1971) e no Bock-Reinzucht-Sauer (BRS) para a produção de pão de centeio (BOCKER; VOGEL; HAMMES, 1990). No entanto, muitas padarias na Europa ainda usam tradicionalmente a fermentação “sourdough” para produzir pães de centeio, a massa é mantida metabolicamente ativa ao longo de décadas através da adição de farinha e água em intervalos regulares de tempo. Na Itália, um grande número de padarias utiliza este tipo de fermentação para produzir produtos (ex. Panettone), que exigem longo tempo de fermentação e resultam em produtos com características sensoriais típicas e com maior vida de prateleira (DE VUYST; NEYSENS, 2005).

Para preparar os pães, a seleção funcional de cepas é o principal requisito (STOLTZ; BÖCKER, 1996). A escolha dos “starters” é baseada principalmente nas propriedades de acidificação e proteólise e síntese de compostos voláteis durante a fermentação “sourdough” (COLLAR, 1996; HAMMES; GÄNZLE, 1998; GOBBETTI et al., 2005). No entanto, “starters” funcionais também devem se adaptar ao ambiente e ao processo de fermentação

“sourdough” para garantir sua permanência estável na massa (DE VUYST; NEYSENS, 2005). Apesar de espécies pertencentes a Gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* ou *Weissella* tenham sido isoladas, a maioria das cepas autóctones no “sourdough” pertence ao gênero *Lactobacillus*. Entre mais de 150 espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, um grande número foi isolado pela primeira vez no “sourdough” ou a partir de fermentação espontânea de cereais (DE VUYST; NEYSENS, 2005; EHRMANN; VOGEL, 2005). Portanto, para potenciais culturas “starter” para o “sourdough” é mais conveniente a seleção dentro do gênero dos *Lactobacillus*. Em particular, no “sourdough” tipo I são freqüentemente selecionados *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L.pontis*, *L.brevis*, *L.fermentum*, *L.paralimentarius* e *L. plantarum* (DE VUYST; VANCANNEYT, 2007).

Mais de 20 espécies de leveduras foram encontradas no “sourdough” (ROSSI, 1996). *S. cerevisiae* está freqüentemente presente (ou adicionada), devido ao seu uso na panificação em geral. Em particular, *Sacharomyces exiguus* e *Candida humilis* são leveduras associadas a bactérias ácido láctica no “sourdough”. No entanto, uma maior variedade de espécies de leveduras adicionais foram isoladas do “sourdough” (HAMMES et al., 2004.; ROSSI, 1996). A grande variabilidade do número e do tipo de espécies encontradas depende de vários fatores, incluindo a grau de hidratação da massa, o tipo de cereal usado, a temperatura de fermentação, e a temperatura de manutenção do “sourdough” (GOBBETTI; CORSETTI; ROSSI, 1994). Por exemplo, um “sourdough” italiano que é geralmente utilizado para a produção de pão com farinha de farelo de trigo *durum* mais de 95% das leveduras pertence à espécie *C. humilis*, cujo domínio é estável no tempo (GULLO et al., 2003).

1.6.2 Potencial da fermentação “sourdough” em produtos ricos ou enriquecidos em fibra

Um pouco diferente da massa de trigo é a massa produzida a partir do centeio, que depende da redução do pH para alcançar a sua adequação para a cocção. Esta necessidade resulta da escassez de glúten, que, no trigo fornece as propriedades de ligação da água e da retenção de gás. No centeio, estas funções são assumidas pelas pentosas, cuja solubilidade e inchaço, aumentam com a diminuição do pH e torna-se ótima em pH 4.9. Além disso, com a acidificação, a atividade de amilase do centeio é inibida, sendo este um efeito importante, já que a gelatinização do amido de centeio (55-58⁰C) ocorre no mesmo intervalo da temperatura ótima da atividade da amilase (50-52⁰C). A acidificação também exerce efeitos positivos

sobre a estrutura dos grânulos de amido, levando ao aumento da capacidade da ligação da água (HAMMES; GANZLE, 1998).

De acordo com Seibel (1983) a adição de fibras causa as seguintes mudanças tecnológicas: (i) massa menor e mais úmida; (ii) diminui a tolerância a fermentação (habilidade da massa em atingir ótimo volume em um curto período de cocção), (iii) diminui o volume do pão; (iv) miolo denso e não elástico; e (v) ocorrem mudanças de sabor dependendo do tipo de fibra e do tipo de pão. Assim, a pré-fermentação do farelo de trigo com fermento ou em particular, com leveduras e bactérias lácticas aumenta volume do pão e o miolo permanece macio durante o armazenamento (SALMENKALLIO-MARTTILA; KATINA; AUTIO, 2001). Portanto, a fermentação “sourdough” pode ser utilizada de forma eficaz também em produtos com alta quantidade de fibra. A eficácia da fermentação é devido à atividade das enzimas endógenas da farinha, especialmente as amilases e proteases (BOSKOV-HANSEN et al., 2002). Os ácidos produzidos durante a fermentação baixam o pH da massa, afetando a atividade da enzima e as características do glúten. Lopez et al. (2001), descreveram também outros efeitos benéficos da fermentação do farelo de trigo, em seu estudo a pré-fermentação do farelo de trigo com bactérias do ácido láctico melhorou hidrólise do fitato (até 90%) e do magnésio aumentando a solubilidade do fósforo.

1.6.3 Influência da fermentação “sourdough” nos níveis e na estabilidade de compostos bioativos

A fermentação “sourdough” pode ser usada para modificar os níveis dos compostos bioativos. No entanto, não há muitos dados disponíveis. Alguns estudos relatam o aumento de conteúdo de folato (KARILUOTO et al., 2004; LIUKKONEN et al., 2003), a diminuição do conteúdo de tocoferol e tocotrienol (LIUKKONEN et al., 2003), e a diminuição ou aumento do conteúdo de tiamina, dependendo o processo (TERNES; FREUND, 1988). Assim, a fermentação pode tanto aumentar ou diminuir os níveis de compostos bioativos, dependendo da natureza do composto e do tipo do processo do “sourdough”.

Flander et al. (2003), otimizaram o processo de cozimento da aveia, tanto em termos de qualidade do pão, como da funcionalidade fisiológica da β -glucana da aveia no pão. Os pães foram produzidos com farinha de aveia integral (51%) e de farinha de trigo branca (49%). O volume específico, a concentração molecular da β -glucana no pão, entre outros testes foram realizados. Durante o cozimento da massa, cerca de 30% do β -glucana foi degradada. No cozimento do pão produzido com fermentação “sourdough”, a β -glucana foi

preservada (0,8g/porção), os autores concluíram que a acidez foi um fator protetor para a β -glucana no pão.

1.6.4 Influência da fermentação “sourdough” na digestibilidade do amido

A fermentação “sourdough” do pão de centeio produz efeitos benéficos sobre as respostas pós-prandiais de insulina em relação ao pão de trigo branco ou de trigo integral e pães de aveia, tanto em pessoas saudáveis (JUNTUNEN et al., 2003) quanto em pessoas com a síndrome metabólica (KALLIO et al., 2008). Estes estudos sugerem que a resposta à insulina pós-prandial após a ingestão do pão de centeio pode ser resultado da estrutura de pão. Além disso, este tipo de fermentação aumenta o conteúdo de arabinoxilano solúvel no pão, assim melhorando a glicose pós-prandial e a resposta de insulina em uma forma dose-dependente (LU et al., 2000).

Em outras pesquisas, a fermentação “sourdough” do pão também resultou na diminuição da glicose pós-prandial e da resposta de insulina (DE ANGELIS et al., 2007; LILJEBERG et al., 1995; SCAZZINA et al., 2009). De Angelis et al. (2007) e Liljeberg et al. (1995), relataram o retardo da taxa de hidrólise do amido em pães produzidos com fermentação “sourdough” medidos “in vitro”, mas Scazzina et al. (2009) usando um método similar “in vivo”, não encontrou qualquer diferença na taxa de digestão do amido entre os pães produzidos com fermentação “sourdough” e fermentação com *S.cerevisiae*, apesar da reduzida resposta pós-prandial de glicose após a ingestão dos pães “sourdough”.

Uma explicação para a redução da resposta pós-prandial pode ser a adiada taxa de esvaziamento gástrico, devido aos ácidos orgânicos ou ácido láctico produzidos pela microbiota “sourdough” (LILJEBERG; BJORCK, 1998). No entanto, Najjar et al. (2009), não detectaram qualquer diferença na taxa de esvaziamento gástrico entre o pão de trigo branco e pão semelhante produzido com fermentação “sourdough”.

Lappi et al. (2010) produziram pães de trigo integral feito com “kernels” e fermentação “sourdough”, os pães apresentaram baixa glicose pós-prandial e resposta de insulina em comparação com pães branco de trigo. A proteólise que ocorre na fermentação “sourdough” pode ser um fator contributivo, mas mais estudos são necessários para estabelecer o real mecanismo subjacente.

1.6.5 “Sourdough” e a biodisponibilidade de minerais

A redução do teor de ácido fítico durante a fabricação de pão depende da ação da fitase. Tal como acontece em outras reações enzimáticas, vários fatores contribuem para a degradação do fitato em pães, incluindo a atividade da fitase, pH, temperatura, teor de água, e o tempo de fermentação (ANGELIS et al., 2003; FRETZDORFF; BRUMMER, 1992).

Em geral, o pH baixo favorece a degradação de ácido fítico, valor do pH ótimo para hidrólise é 4,5 nas massas de trigo e de centeio, segundo Fretzdorff e Brummer (1992). Assim, o uso da fermentação “sourdough” pode ser ajustado para melhorar a biodisponibilidade de minerais, aumentando a hidrólise de ácido fítico. Lopez et al. (2001) estudaram a influência das diferentes fermentações: convencional, e a “sourdough” com e sem levedura, estes foram comparados em relação a degradação do ácido fítico. Seus resultados mostram que os dois tipos de fermentação “sourdough” reduziram o teor de ácido fítico em até 62%, ao passo que a fermentação convencional reduziu apenas 38%. Além disso, a acidificação formada durante a fermentação “sourdough” também aumentou a solubilidade do magnésio e do fósforo em 20-30%. Este efeito foi ainda mais pronunciado quando a fração farelo de trigo (rico em ácido fítico) foi fermentada com bactéria do ácido láctico, o percentual de hidrólise o ácido fítico foi cerca de 90%.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.7 Micro-organismos e condições de crescimento

Nesse trabalho foram testadas as cepas de microrganismos - *Lactobacillus plantarum* BL011, isolado de queijo serrano, conforme metodologia de De Souza, Dalla Rosa e Ayub (2003). Para a utilização no “sourdough”, a cepa foi resuspendida em meio MRS por 24 h a 37 °C e inoculada (1:10; DO 1.0) em meio de cultivo, adaptado de Brinques, Peralba e Ayub (2010), contendo (g/L) lactose, 100; peptona, 15; extrato de levedura, 5; MgSO₄·7H₂O/L, 0,2; MnSO₄·H₂O, 0,04, por 18 h (fase log; 1,8.10⁸ UFC/mL); *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961), doada pelo Center for Agricultural Utilization Research (USA); foi crescida em meio cultivo de cultivo, adaptado de Uscanga, Delie e Ayub (2000), contendo (g/L) glicose, 50; peptona, 5; KH₂PO₄, 5; MgSO₄·7H₂O, 0,4; extrato de levedura, 1, por 12 h (fase log; 1,9.10⁷ UFC/mL); *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, proveniente do Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda) e fornecida pelo Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (SC, Brasil); foi crescida em meio de cultivo, adaptado de Lukondeh, Ashbolt e Rogers (2005), contendo (g/L) lactose, 70; peptona, 20; extrato de levedura, 10; KH₂PO₄, 4; MgSO₄·7H₂O, 2., por 12 h (fase Log; 1,5.10⁷). Após o crescimento, a biomassa foi obtida com a centrifugação do meio de cultivo (3000 g por 15 min a 4 °C). O estudo da cinética de crescimento dos micro-organismos citados acima, bem como os meios e condições de cultivo testadas estão apresentadas no Apêndice A.

1.8 Delineamento experimental

O projeto de mistura Simplex-centróide foi utilizado para avaliar o efeito da composição da biomassa de *Kluyveromyces marxianus* (X1), *Dekkera bruxellensis* (X2) e *Lactobacillus plantarum* (X3) no volume específico e nas características sensoriais das amostras. A concentração de biomassa foi estipulada em 10 % sobre o peso da farinha de trigo. As proporções de componentes foram expressas como frações da mistura com soma (X1+X2+X3) igual a um. Esses três fatores: biomassa de *Kluyveromyces marxianus*, *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus plantarum*, níveis e delineamento experimental, são apresentados na **Tabela 1**. Dos 7 pontos, 3 foram misturas puras, 3 foram de mistura binária e 1 ponto foi de mistura ternária em partes iguais (**Figura 1**). Os dados também foram submetidos análise

de variância (one-way ANOVA); a comparação das médias dos tratamentos foi submetida ao Teste de Tukey a $P < 0,05$, usando o software, Statistica 7.0 para Windows.

Tabela 1 – Proporção dos componentes *Kluyveromyces marxianus* (X1), *Dekkera bruxellensis* (X2) e *Lactobacillus plantarum* (X3) que compõe o projeto de mistura Simplex-centróide

Mistura	Proporção de biomassa			<i>K. marxianus</i> (%)	<i>D. bruxellensis</i> (%)	<i>L. plantarum</i> (%)
	X ₁	X ₂	X ₃			
1	1	0	0	100	0	0
2	0	1	0	0	100	0
3	0	0	1	0	0	100
4	0,33	0,33	0,33	33,33	33,33	33,33
5	0	0,5	0,5	0	50	50
6	0,5	0	0,5	50	0	50
7	0,5	0,5	0	50	50	0

1.9 Produção e propagação do “sourdough” em laboratório

A produção e propagação do “sourdough” foram adaptadas da metodologia de Minervivi et al. (2007). Farinha de trigo (500 g), água deionizada (275 mL) e inóculo (50 mL), foram utilizados para preparar 825 g de massa. O rendimento da massa (peso da massa x 100/peso da farinha) foi 165 para todas as massas. O “sourdough” foi incubado em um recipiente plástico de polipropileno estéril a 28 °C por doze dias (288 h). A cada 48 h, retirou-se 165 g de massa, e adicionou-se 110 g de farinha de trigo e 55 mL de água deionizada.

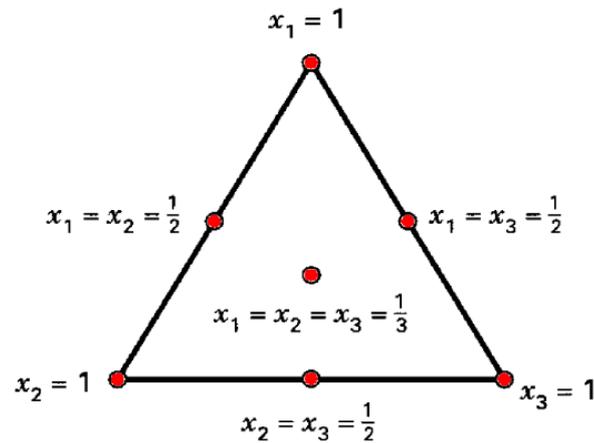


Figura 1 - Os sete pontos do delineamento experimental, Simplex-centróide, para o efeito da biomassa de *K.marxianus* (X_1), *D.bruxellensis* (X_2) e *L.plantarum*(X_3).

1.10 Produção dos pães

A formulação base adotada, para a preparação do pão, está apresentada na **Tabela 2** e foi adaptada de Angiolini et al. (2006).

Em uma masseira (G-PANI, modelo AE-15) acrescentou-se a farinha de trigo, açúcar, sal e o leite em pó que foram misturados à velocidade 108 rpm por 2 minutos, em seguida aumentou-se a velocidade para 245 rpm e acrescentou-se o “sourdough”, após adicionou-se a gordura. A massa foi misturada até seu ponto ótimo de desenvolvimento, em torno de 8 minutos, o que representa massa homogênea e macia. A massa foi então sovada, boleada e coberta com papel filme por 50 minutos.

Tabela 2 - Formulação base dos pães elaborados para avaliar o efeito da composição da biomassa.

INGREDIENTES	Quantidade
Farinha de trigo	1000
Sourdough	300
Açúcar demerara	200
Leite em pó	50
Gordura	50
Sal	20
Água	500

Após o descanso a massa foi dividida em 4 partes iguais (500 g) que foram modeladas e colocadas em formas (25 x 6 x 12,5) cm³, e levadas para fermentar por 18 h a 28 °C, em câmara climática digital (PROGÁS, modelo PRCL 200).

Após a fermentação, a massa foi assada em forno de lastro (modelo FLV-2003, TEDESCO), por 20 min a 190 °C. O resfriamento ocorreu em temperatura ambiente. Os pães com 500 g foram embalados em sacos de polietileno e armazenados para a avaliação das características sensoriais e de volume.

1.11 Determinações analíticas

As análises de pH, acidez total titulável e contagem total dos micro-organismos, ocorridas durante a fermentação, foram estimadas imediatamente após o preparo do sourdough e a cada 96 h durante o período de fermentação.

1.11.1 pH

Dez gramas de sourdough foram adicionados a 100 ml de água destilada e foram homogeneizados com um misturador (SIMONSON; SALAVAARA; KORHOLA, 2003). O pH foi determinado através de um medidor de pH - pHtec modelo phs_3b.

1.11.2 Acidez total titulável (TTA)

Dez gramas de sourdough foram adicionados a 100 ml de água destilada e homogeneizado com o auxílio de um misturador. O valor de TTA foi expressa como a quantidade (ml) de 0,1 mol NaOH/L necessário para atingir um pH final de 8,5, conforme metodologia de Spicher e Stephan (1993). O equivalente ácido é a quantidade de NAOH consumida em mL.

1.11.3 Contagem total dos micro-organismos

A contagem total dos micro-organismos durante a fermentação “sourdough”, seguiu metodologia adaptada de Simonson, Salavaara e Korhola (2003), e foi estimada imediatamente após o preparo e a cada 96 h de fermentação. Dez gramas de massa foram adicionados a 90 ml de solução salina 0,85 % estéril e homogeneizado. Diluições seriadas foram feitas e semeadas em agar YEPD para contagem superficial dos micro-organismos. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h.

1.11.4 Volume específico

O volume específico foi calculado pela relação entre o volume do pão assado, determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (HALLEN et al., 2004), e o seu peso, obtido pelo emprego de balança semi-analítica. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados expressos em $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$.

1.11.5 Análise sensorial

Os pães obtidos foram submetidos ao teste sensorial de aceitação (DUTCOSKI, 2007), com 40 provadores, para os atributos sabor e avaliação global utilizando escala hedônica com nove pontos. Os testes foram realizados em duas sessões. Em cada sessão foram avaliadas 4 formulações diferentes selecionadas aleatoriamente. As fatias (com aproximadamente 25 g) foram oferecidas aos provadores codificadas com 3 dígitos aleatórios. Também foi fornecida água mineral para ser ingerida entre as amostras a fim de realizar a limpeza das papilas. Os testes sensoriais foram realizados pela manhã do dia seguinte a produção dos pães. A ficha da avaliação sensorial e o termo de consentimento estão apresentados em Apêndice B e Apêndice C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O melhor ajuste dos dados para o volume específico e para a análise sensorial ocorreu com o modelo cúbico especial. Os coeficientes do modelo, o R^2 e a análise de variância do modelo para os parâmetros estudados estão mostrados na **Tabela 3**, respectivamente.

Tabela 3 - Modelos previstos para o delineamento experimental, Simplex-centróide, utilizado para avaliar o efeito da biomassa de *K.marxianus* (X_1), *D.bruxellensis* (X_2) e *L.plantarum* (X_3) sobre o volume específico, atributo sabor e aceitação global dos pães.

Parâmetros	Modelo previsto	R^2	F_{cal}	F_{tab}
Volume específico	$Y = 2,56X_1^* + 2,89X_2^* + 1,28X_3^{**} + 7,93X_1X_3^{***} + 2,99X_2X_3^{***} - 22,65X_1X_2X_3^{***}$	0,9997	479,93 ^{a1}	234
Sabor	$Y = 7,12X_1^{**} + 6,8X_2^{**} + 6,52X_3^{**} + 1,55X_1X_2^{***} + 11,73X_1X_2X_3^{***}$	0,9997	547,79 ^{a1}	234
Avaliação global	$Y = 7,1X_1^{***} + 6,85X_2^{***} + 6,53X_3^{***}$	0,9977	71,4 ^{a2}	58

* $p < 0,01$ $\alpha_1 = 5\%$
 ** $p < 0,02$ $\alpha_2 = 10\%$
 *** $p < 0,03$

1.12 Volume específico

O volume específico do pão depende, à princípio, de dois fatores: da quantidade de gás produzido e da capacidade de retenção do gás no sistema de massa (CLARKE et al., 2003). A tecnologia aplicada a massa e o tipo de cultura “starter” acarretam efeitos diferentes sobre a produção global de gás, assim as propriedades específicas da cultura inicial devem ser consideradas (HAMMES; GANZLE, 1998).

Através do delineamento experimental de mistura foram produzidos pães com diferentes culturas “starters” que apresentaram volumes específicos com diferença estatística, com excessão entre as misturas 5 e 1 (**Tabela 4**). O pão produzido somente com *Lactobacillus plantarum* foi o que apresentou o menor volume específico ($1,29 \pm 0,11 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$), possivelmente ocasionado pelo metabolismo homofermentativo da bactéria, pois esta cepa, conforme a literatura, possui metabolismo heterofermentativo facultivo (GOBBETTI et al., 2005). É possível que o longo tempo de fermentação (288 h) tenha favorecido o metabolismo homofermentativo, no qual não há produção de gás carbônico. Clarke, Schober e Arendt (2002), produzindo pães com fermentação “sourdough” de 20 h com *Lactobacillus plantarum* L2-1 obtiveram volume específico de $4,56 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Já Komlenic et al. (2010),

produziram pães “sourdough” com *Lactobacillus brevis*, heterofermentativo, e com 20 h de fermentação obtendo pães com volume específico entre 2,75-3,2 cm³.g⁻¹ dependendo da farinha utilizada. Já Edema (2009) utilizando farinha de milho e *Lactobacillus plantarum*, obteve pães com volume específico de 0,95 cm³.g⁻¹.

O volume específico obtido da composição pura dos micro-organismos variou entre 2,57- 1,29 cm³.g⁻¹, para a mistura dos três micro-organismos foi de 2,87 cm³.g⁻¹ e o volume obtido para as misturas binárias variaram entre 2,84 - 3,91 cm³.g⁻¹ Plessas et al. (2008), produziram pães “sourdough” com 16 h de fermentação e diferentes combinações e quantidades de *K. marxianus* e *L. bulgaricus* e *L. helveticus* obtendo volume específico que variaram entre 2,0-2,3 cm³.g⁻¹.

Tabela 4 - Média e desvio padrão resultantes do delineamento experimental, Simplex-centróide, utilizado para avaliar o efeito da biomassa de *K.marxianus* (X₁), *D.bruxellensis* (X₂) e *L.plantarum* (X₃) sobre o volume específico, o atributo sabor e aceitação global dos pães.

Mistura	<i>K.marxianus</i> (%)	<i>D.bruxellensis</i> (%)	<i>L.plantarum</i> (%)	Análise sensorial		
				Sabor	Avaliação global	Volume específico(cm ³ .g ⁻¹)
1	100	0	0	7,13 ± 1,8 ^a	7,1 ± 1,58 ^a	2,57 ± 0,04 ^d
2	0	100	0	6,8 ± 1,45 ^a	6,85 ± 1,51 ^a	2,90 ± 0,01 ^c
3	0	0	100	6,53 ± 1,88 ^a	6,53 ± 1,7 ^a	1,29±0,11 ^e
4	33,33	33,33	33,33	7,36 ± 1,04 ^a	7,15 ± 0,96 ^a	2,87 ± 0,22 ^c
5	0	50	50	6,4 ± 1,75 ^a	6,58 ± 1,5 ^a	2,84 ± 0,04 ^{cd}
6	50	0	50	6,95 ± 1,53 ^a	6,83 ± 1,5 ^a	3,91 ± 0,06 ^a
7	50	50	0	7,35 ± 1,23 ^a	7,3 ± 1,12 ^a	3,22 ± 0,08 ^b

Nota: Letras iguais na mesma coluna não possuem diferença estatística (P< 0.05)

Quanto ao modelo estatístico aplicado, o cúbico especial é altamente significativo com coeficiente de ajuste ($R^2 = 0,997$). No presente estudo, o ajuste de terceira ordem para o volume específico indicou que os componentes puros influenciaram nessa característica. A interação entre *K. marxianus* e *D. bruxellensis* não foi significativa para o volume específico do pão. De acordo com a **Tabela 4**, sistema binário *K. marxianus* e *L. plantarum* exerceu influência positiva acarretando o maior volume específico do pão, já a mistura ternária produziu pão com volume médio entre as amostras. Os valores mais altos foram obtidos na direção do vértice inferior esquerdo da **Figura 2**, que corresponde a misturas mais ricas em *K. marxianus*, pode-se argumentar que tanto a retenção como a produção de gás na massa foram influenciadas pelas diferentes culturas starter utilizadas para fermentar a massa. As equações

demonstradas na **Tabela 3** foram usadas para gerar o diagrama triangular mostrado na **Figura 2**.

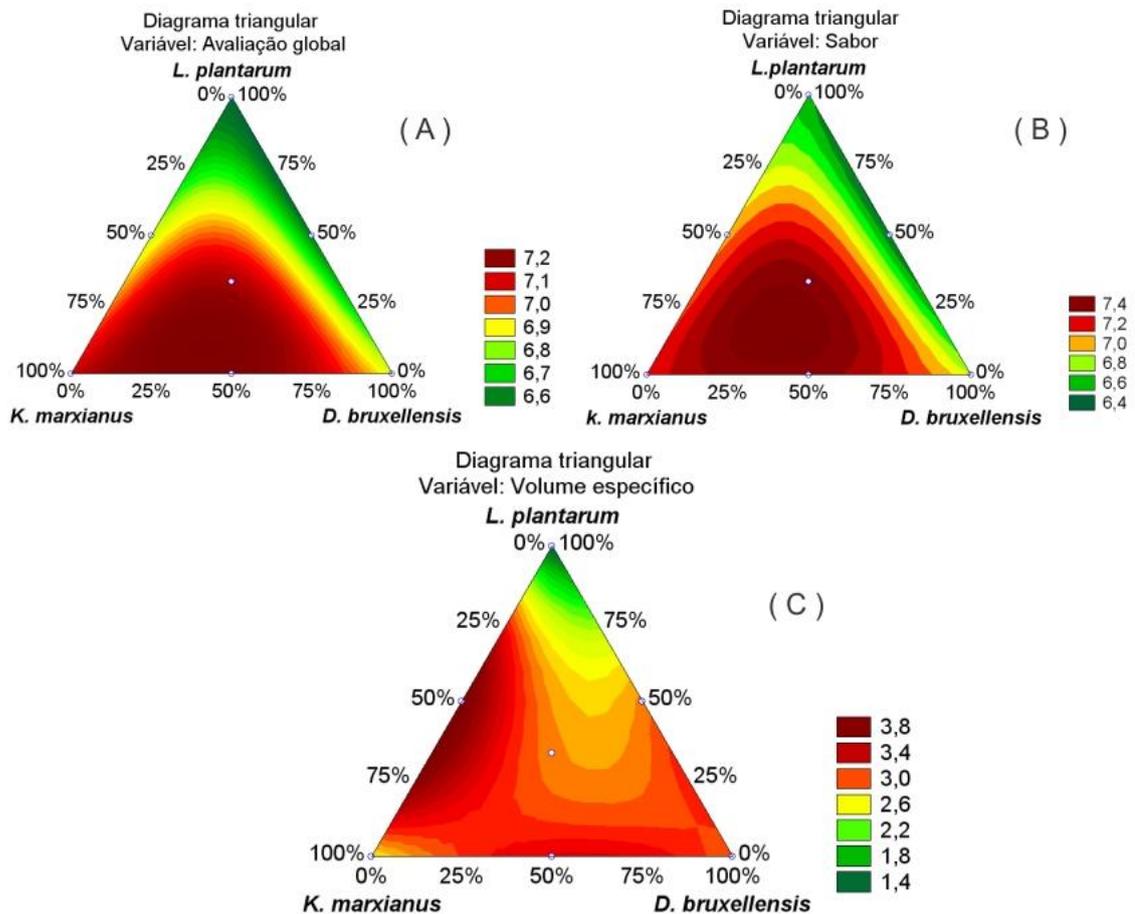


Figura 2 - Diagrama triangular dos parâmetros (A) atributo avaliação global, (B) atributo sabor, (C) volume específico resultantes do delineamento experimental

1.13 Análise sensorial

Os pães produzidos com o delineamento estatístico de mistura foram submetidos ao teste de aceitação para dois atributos: sabor e avaliação global. Conforme mostrado na **Tabela 4** não houve diferença estatística entre os tratamentos para os dois atributos.

Em relação ao modelo cúbico especial tanto para o atributo sabor como para a avaliação global, foi significativo com R^2 de 0,9997 e 0,9977, respectivamente. Em relação

aos coeficientes, conforme mostrado na **Tabela 3**, para o sabor os componentes puros, a interação entre *K. marxianus* e *D. bruxellensis* e a mistura ternária foram significativa.

Para a avaliação global, somente os componentes puros foram significativos. As maiores notas de aceitação, para ambos os atributos sabor e avaliação global, foram obtidas na direção central do vértice inferior, que corresponde a misturas mais ricas em *K. marxianus* e *D. bruxellensis*. As equações demonstradas na **Tabela 3** foram usadas para gerar o diagrama triangular mostrado na **Figura 2**. Para os dois atributos avaliados a mistura entre *K. marxianus* e *D. bruxellensis* foi a que obteve nota mais alta, sugerindo que a presença dos dois micro-organismos afeta positivamente as características do pão.

Rizzello et al. (2010), trabalhando com *L. plantarum* e *L. rossiae*, e, “sourdough” a base de gérmen de trigo e com 24 h de fermentação obteve nota média 6,8 para o atributo sabor em escala de 9 pontos. Mojisola (2011), com “sourdough” a base de farinha de milho, tempo de fermentação de 24 h e utilizando uma mistura de *L. plantarum*, *L. brevis* e *L. mesenteroides* obteve na avaliação sensorial dos atributos sabor e avaliação global nota 4,8 (escala hedônica de 5 pontos). Em outro trabalho Plessas et al. (2008), também obtiveram notas superiores para estes atributos que variam entre 7,7-8,9 em escala de 9 pontos.

De modo geral os pães produzidos, neste trabalho, obtiveram boa aparência - vide **Figura 3** - porém alguns provadores constataram no sabor do pão acidez elevada, o que pode ter contribuído para as avaliações do sabor e do atributo avaliação global, não terem ultrapassado a média 7,4 (**Tabela 4**) Esta acidez elevada, de certa forma era esperada, visto o longo tempo de fermentação e também pelos microorganismos presentes. Além disso, o sabor ácido não é freqüente na dieta brasileira, o que também pode ter contribuído para redução das notas de aceitação.

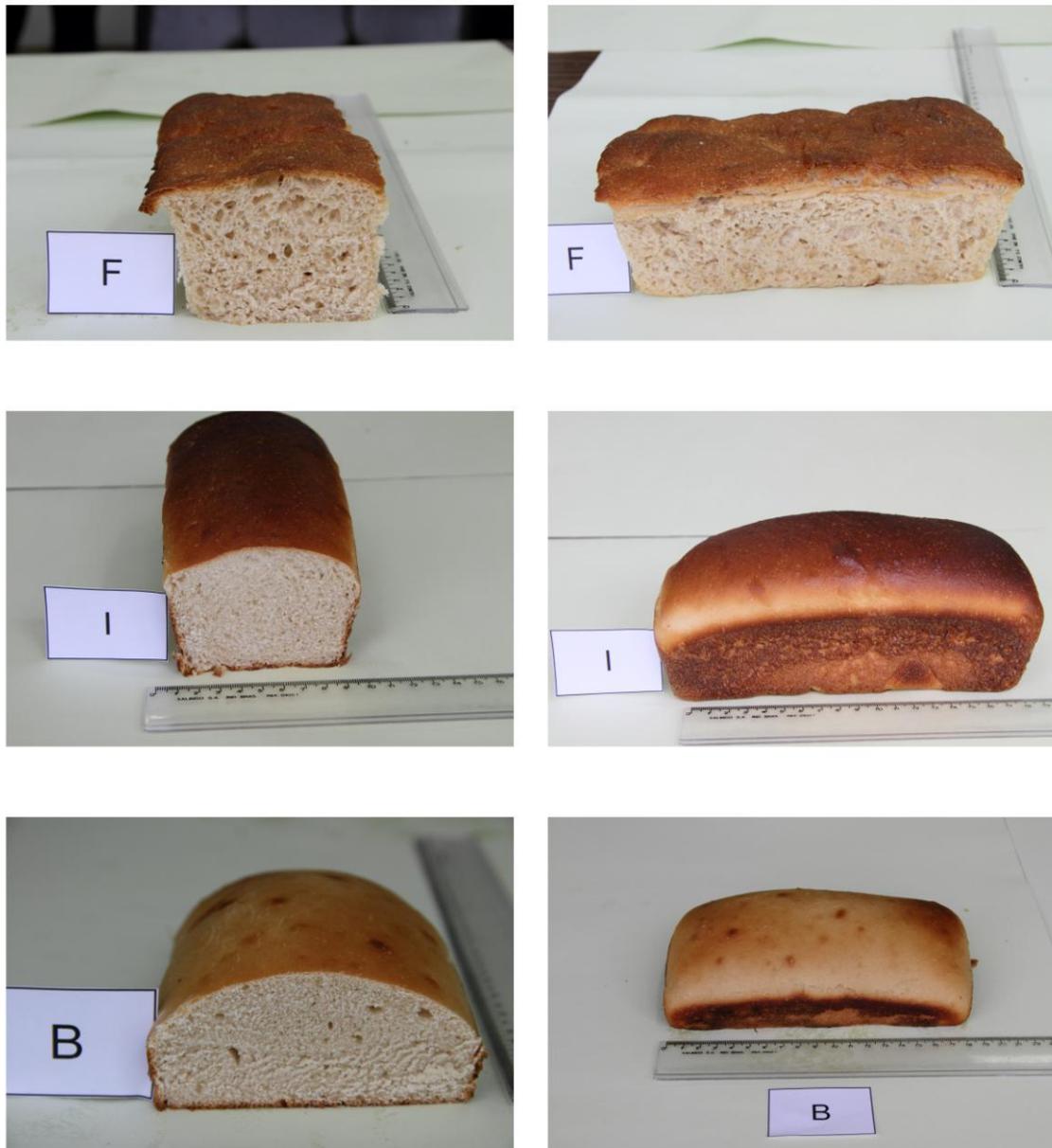


Figura 3 – Foto das formulações dos pães. **B** (mistura com 100% de *L. plantarum*) amostra com a menor nota nos dois atributos avaliados na análise sensorial. **F** (mistura com 50% de *K. marxianus* e *D. Bruxellensis*) nota mais alta no atributo avaliação global e **I** (mistura com 33,33% de *K.marxianus*, *D.bruxellensis* e *L.plantarum*) nota mais alta no atributo sabor

1.14 Valores de pH, acidez (TTA) e UFC durante a fermentação “sourdough”

O efeito dos micro-organismos, utilizados para a fermentação “sourdough” sobre os valores do pH e da acidez (TTA), foi monitorado durante o tempo total da fermentação. Houve redução dos valores de pH medido e um aumento da acidez (**Tabela 5**).

A maioria dos trabalhos realizados com pães “sourdough” citam a redução do pH como responsável pelas mudanças tecnológicas da massa e nutricionais e de conservação do pão (CLARKE et al., 2002; KOMLENIC, et al., 2010). Além disso, os pães produzidos neste trabalho apresentaram forte sabor ácido. Conforme Rocken e Voysey (1995), a produção de ácido acético é favorecida com a diminuição do rendimento da massa (neste trabalho o rendimento da massa foi de 152, sendo que os valores elevados para este parâmetro chegam a 220) sendo mais pronunciado em altas temperaturas. Estes mesmos autores compararam o efeito dos diferentes níveis de frutose (% sobre o peso da farinha), temperatura e rendimento da massa na produção de acetato e lactato utilizando *L. brevis*, concluíram que a frutose foi o fator que mais afetou a produção de ácido acético.

Quando a sacarose é hidrolisada, pela invertase das leveduras, a frutose é então disponibilizada para as bactérias ácido lácticas e é usada em co-fermentação com maltose. Neste caso, a frutose como acceptor de hidrogênio desloca a rota de formação do etanol para a rota de energia mais favorável do acetato (ROCKEN; RICK; REINKEMEIER, 1992).

As células viáveis, que foram analisadas durante a fermentação “sourdough”, se mantiveram praticamente constante ($2 \cdot 10^7$ ufc.g⁻¹), indicando que o longo tempo de fermentação não altera a quantidade de células no “sourdough”, dados mostrados na **Tabela 5**. Para Simonson, Salovaara e Korhola (2003), variando a quantidade de sal, açúcar e a temperatura o valor encontrado para as células viáveis das leveduras foi de $7,8 \cdot 10^6$ ufc.g⁻¹ e para a bactéria ácido láctica $3,5 \cdot 10^7$ cfu.g⁻¹ após 16 h de fermentação.

Tabela 5 – Valores do pH, acidez (TTA) e células viáveis durante a fermentação “sourdough” nas diferentes misturas resultantes do delineamento Simplex-centróide

Mistura	0 hora			96 horas			192 horas			288 horas		
	pH	TTA (mL)	UFC	pH	TTA (mL)	UFC	pH	TTA (mL)	UFC	pH	TTA (mL)	UFC
100% <i>K. marxianus</i>	5,08	9,5	1,60x10 ⁷	3,72	12	8,00x10 ⁷	3,9	9	1,00x10 ⁷	4	9,5	1,00x10 ⁶
100% <i>D. bruxellensis</i>	5,06	9,5	1,65x10 ⁷	3,9	12,5	5,00x10 ⁷	4	11	1,00x10 ⁷	4,02	8	1,00x10 ⁷
100% <i>L. plantarum</i>	5,12	10,5	1,43x10 ⁷	3,8	12	2,00x10 ⁶	3,75	12	2,00x10 ⁷	3,75	6	3,00x10 ⁷
33,33% <i>K.marxianus</i> /33,33% <i>D. bruxellensis</i> /33,33% <i>L. plantarum</i>	5,24	7,5	1,50x10 ⁷	4,13	13,5	9,00x10 ⁷	3,88	11,5	3,00x10 ⁷	3,85	11	1,50x10 ⁷
50% <i>D. bruxellensis</i> /50% <i>L. plantarum</i>	5,3	10,5	1,30x10 ⁷	3,88	11	2,00x10 ⁶	3,98	12	3,30x10 ⁷	4,1	11	3,00x10 ⁷
50% <i>K. marxianus</i> /50% <i>L. plantarum</i>	5,01	11,5	1,15x10 ⁷	3,8	11	5,00x10 ⁶	3,9	11	1,00x10 ⁷	3,9	11,5	1,00x10 ⁷
50% <i>K. marxianus</i> /50% <i>D.bruxellensis</i>	5,8	7	1,00x10 ⁷	3,74	11	9,50x10 ⁷	3,8	10,5	7,00x10 ⁶	3,95	9,5	4,00x10 ⁶

CONCLUSÕES

Baseado nos modelos obtidos, através da aplicação do delineamento experimental de mistura, observou-se a influência significativa, dos componentes puros, para atributo sabor, aceitação global e para o volume específico do pão. A mistura dos três micro-organismos foi significativa para o volume específico e para o sabor. E as misturas binárias de *K. marxianus*/*L. plantarum* e *D. bruxellensis*/*L. plantarum* foram significativas apenas para o volume específico. Além disso, através dos dados obtidos conclui-se que a tendência, para obter pães com melhor qualidade, é para misturas com maiores quantidades de *k. marxianus*. Assim, é possível projetar novas misturas de cepas que possam ser utilizadas como culturas de partida para a fermentação “sourdough” visando melhorar o volume, o sabor ou a aceitação do pão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELIS, M. et al. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 87, p. 259-570, 2003.
- BENNION, E. B. **Fabricación de pan**. Acribia: Zaragoza, 1970.
- BÖCKER, G.; VOGEL, R. F.; HAMMES, W. P. *Lactobacillus sanfrancisco* als stabiles element in einem Reinzucht-Sauerteig-Präparat. **Getreide Mehl und Brot**, Bochum, v. 44, p. 269-278, 1990.
- BOSKOV-HANSEN, H. et al. Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread making. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 214, p. 33-42, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 263, 09/2005. Aprova o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA PRODUTOS DE CEREAIS, AMIDOS, FARINHAS E FARELOS", constante do Anexo desta Resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 10 nov. 2011.
- BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA. Resolução nº 38 de 1977. Aprova como coadjuvantes da tecnologia de fabricação as substâncias constantes dos anexos I, II, III e IV, destinadas ao fabrico de produtos forneados, tais como: pão, broa, biscoito, bolacha, bolo, torta e demais produtos afins de confeitaria. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 dez. 1977. Seção 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/index_ato.htm>. Acesso em: 08 nov. 2011.
- BRINQUES, G. B.; PERALBA, M. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, n. 2, p. 205-212, 2010.
- BRUMMER, J.-M.; LORENZ, K. European developments in wheat sourdoughs. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 36, p. 310-314, 1991.
- CANELLA-RAWLS, S. **Pão: arte e ciência**. São Paulo: SENAC, 2005. 320 p.
- CAUVAIN, S. **Tecnologia da panificação**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2009. 418 p.
- CLARKE, C. I. et al. Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat bread quality. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 217, p. 23-33, 2003.
- CLARKE, C. I.; SCHOBER, T. J.; ARENDT, E. K. Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 640-647, 2002.

COLLAR, C. Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking applications. **Food Science and Technology International**, London, v. 2, n. 6, p. 349-367, 1996.

DE ANGELIS, M. et al. Use of sourdough lactobacilli and oat fibre to decrease the glycaemic index of whitewheat bread. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 98, p. 1196–1205, 2007.

DE SOUZA, C. F. V.; DALLA ROSA, T.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003.

DE VUYST, L. et al. The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 6059-6069, 2002.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 16, n. 1, 43-56, 2005.

DE VUYST, L.; VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 24, p. 120-127, 2007.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 2007. 210 p.

EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 31-42, 2005.

EDEMA, M. O. A modified sourdough procedure for non-wheat bread from maize meal. **Food Bioprocess Technology**. New York, v. 4, n. 7, p. 1264-1272, 2011.

EL-DASH, A.; CAMARGO, C. O.; DIAZ, N. M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982.

EL-DASH, A.; CAMPOS, J. E.; GERMANI, R. **Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinha mista de trigo e sorgo na produção de pães**. Brasília: Embrapa, 1994. v. 4.

FLANDER, L. et al. Effect of baking method on b-glucan properties of whole grain oat bread. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SOURDOUGH, 2., 2003, Brussels. **Proceedings...** Saint Paul: American Association of Cereal Chemistry, 2003. p. 8-11.

FRETZDORFF, B.; BRUMMER, J.-M. Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal breads. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 69, p. 226–270, 1992.

GÄNZLE, M. G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**, London, v. 24, p. 128-138, 2007.

GOBBETTI, M. et al. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 1, p. 57-69, 2005.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J. The sourdough microflora. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 41, p. 456-460, 1994.

GRANOTEC DO BRASIL. **Formuladores de pré-misturas e panificação**. Curitiba: Granotec do Brasil, 1998. Apostila.

GULLO, M. et al. *Candida humilis* - dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 55-59, 2003.

HAMMES, W. P. et al. Microbial ecology of cereal fermentations. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 16, n. 1-3, p. 4-11, 2004.

HAMMES, W. P.; GANZLE, M. G. Sourdough breads and related products. In: Wood, Brian J. B. (Ed.). **Microbiology of fermented foods**. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 199-216. v. 1.

HALLEN, E.; IBANOGLU, S.; AINSWORTH, P. Effect of fermented/ germinated cowpea flour addition on the rheological and baking properties of wheat flour. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 63, n. 2, p. 177-184, 2004.

HUY, Y.H. **Bakery Products, Science and Technology**. Blackwell Publishing, USA. 571p, 2006.

JUNTUNEN, K. S. et al. Structural differences between rye and wheat bread but not total fiber content may explain the lower postprandial insulin response to rye bread. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 78, p. 957-964, 2003.

KALLIO, P. et al. Inflammation markers are modulated by responses to diets differing in postprandial insulin responses in individuals with the metabolic syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 87, p. 1497-1503, 2008.

KARILUOTO, S. et al. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 81, p. 134-139, 2004.

KATINA, K. et al. Potential of sourdough for healthier cereal products. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 104-112, 2005.

KLINE, L.; SUGIHRA, T. F. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for souring activity. **Applied Microbiology**, Washington, v. 21, p. 102-110, 1971.

KOMLENIC, D. K. et al. Wheat dough rheology and bread quality effected by *Lactobacillus brevis* preferment, dry sourdough and lactic acid addition. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 45, p. 1417-1425, 2010.

- LAPPI, J. et al. Sourdough fermentation of wholemeal wheat bread increases solubility of arabinoxylan and protein and decreases postprandial glucose and insulin responses. **Journal of Cereal Science**, London, v. 51, n. 1, p. 152-158, 2010.
- LILJEBERG, H. G. M. et al. Sourdough fermentation or addition of organic acids or corresponding salts to bread improves nutritional properties of starch in healthy humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, p. 1503-1511, 1995.
- LILJEBERG, H.; BJORCK, I. Delayed gastric emptying rate may explain improved glycaemia in healthy subjects to a starchy meal with added vinegar. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 52, p. 368-371, 1998.
- LIUKKONEN, K.-H. et al. Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 62, p. 117-122, 2003.
- LONNER, C. et al. The micro-flora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. **Food Microbiology**, London, v. 3, p. 3-12, 1986.
- LONNER, C.; PREVE-AKESSON, K. Effect of LAB on the properties of sour dough bread. **Food Microbiology**, London, v. 6, n. 1, p. 19-28, 1989.
- LOPEZ, H. et al. Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 2657-2662, 2001.
- LOPEZ, H. W. et al. Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. **Nutrition**, New York, v. 19, p. 524-530, 2003.
- LU, Z. X. et al. Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 71, p. 1123-1128, 2000.
- LUKONDEH, T; ASHBOLT, J. A.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 32, p. 284-288, 2005.
- MAJISOLA, O. E. A modified sourdough procedure for non-wheat bread from maize meal. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 4, n. 7, p. 1264-1272, 2011.
- MINERVINI, F. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 7, p. 897-908, 2007.
- NAJJAR, A. M. et al. The acute impact of ingestion of breads of varying composition on blood glucose, insulin and incretins following first and second meals. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 101, p. 391-398, 2009.
- OSÓRIO, E. A.; WENDT, W. Duração do período de formação do grão de trigo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 395-398, 1995.

OWENS, W. G. **Cereals processings technology**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. 256 p.

PAVANELLI, A. P. **Aditivos para panificação: conceitos e funcionalidade**. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Aditivos e Melhoradores para Alimentos e Bebidas, 2000. Artigo Técnico.

PLESSAS, S. et al. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. **Food Chemistry**, London, v. 106, p. 985-990, 2008.

POMERANZ, Y. **Modern cereal science and technology**. New York: VHC, 1987. 486 p.

PYLER, E. J. **Baking science and technology**. 3rd ed. Merrian: Sosland, 1988. 1300 p.

QUAGLIA, G. **Ciência y tecnología de la panificación**. Zaragoza: Acribia, 1991.

RAO, G. V.; RAO, P. H. Methods for determining rheological characteristics of doughs: a critical evaluation. **Journal of Science Technology**, Peshawar, v. 30, n. 2, p. 77-87, 1993.

RIZZELLO, C. G. et al. Use of sourdough fermented wheat germ for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of the white bread. **European Food research Technology**, London, v. 230, p. 645-654, 2010.

ROCKEN, W.; RICK, M.; REINKEMEIER, M. Controlled production of acetic acid in wheat sour doughs. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 195, p. 259-263, 1992.

RÖCKEN, W.; VOYSEY, P. A. Sourdough fermentation in bread making. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, Oxford, v. 79, p. 38S-48S, 1995.

ROSSI, J. The yeasts in sourdough. **Advances in Food Science**, Freising, v. 18, p. 201-211, 1996.

SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; KATINA, K.; AUTIO, K. Effect of bran fermentation on quality and microstructure of high-fibre wheat bread. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 78, p. 429-435, 2001.

SCAZZINA, F. et al. Sourdough bread: starch digestibility and postprandial glycemic response. **Journal of Cereal Science**, London, v. 49, p. 419-421, 2009.

SEIBEL, W. Anrechnung von brot und backverhalten. **Getreide Mehl und Brot**, Bochum, v. 12, p. 377-379, 1983.

SIMONSON, L.; SALOVAARA, H.; KORHOLA, M. Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. **Food Microbiology**, London, v. 20, p. 193-199, 2003.

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**, Washington, v. 75, p. 1099-1109, 2009.

SPICHER, G.; STEPHAN, H. **Handbuch sauerteig**: biologie, biochemie, technologie. Hamburg: Behr's Verlag, 1993.

STOLTZ, P.; BÖCKER, G. Technology, properties and application of sourdoughs products. **Advances in Food Sciences**, Freising, v. 18, p. 160-162, 1996.

STOLZ, P. Mikrobiologie des sauerteiges. In: SPICHER, G.; STEPHAN, H. (Ed.). **Handbuch sauerteig**: biologie, biochemie, technologie. 5th ed. Hamburg: Behr's Verlag, 1999. p. 35-60.

TERNES, W.; FREUND, W. Effects of different doughmaking techniques on thiamin content of bread. **Getreide Mehl und Brot**, Bochum, v. 42, p. 293-297, 1988.

THIELE, C.; GANZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast and cereal enzymes to the generation amino acids in dough relevant for bread flavour. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 79, p. 45-51, 2002.

USCANGA M. G. A.; DELIE M.; STREHAIANO P. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. **Canadian Journal Microbiology/Revue Canadienne de Microbiologie**, Ottawa, v. 46, n. 11, p.1046-1050, 2000.

VITTI, P. Pão. In: AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 4, cap. 13, p. 365-386.

VOGELMANN, S. A. et al. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudo-cereals and cassava and use of competitive strains as starters. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 205-212, 2009.

APÊNDICE A – Cultivo dos microrganismos utilizados na fermentação “sourdough”

Neste apêndice serão abordados tópicos que descrevem o meio e as condições de cultivo aplicadas para o estudo do crescimento (obtenção de biomassa) dos microrganismos que foram escolhidos como culturas iniciadoras da fermentação “sourdough”.

1 Introdução

A fermentação “sourdough” se caracteriza, entre outros aspectos, por uma microbiota variada. Inúmeras espécies de bactérias ácido lácticas, principalmente pertencente ao gênero *Lactobacillus*, foram identificados e isoladas do “sourdough”. Estudos apontam o *Lactobacillus plantarum*, como o principal agente, seguido das espécies heterofermentativas *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermenti* que produzem etanol, CO₂ e também ácido acético e glicerina, que conferem às massas ácidas aromas característicos (JAGNOW; DAWID, 1991). As leveduras freqüentemente encontradas são *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* e *Candida holmii* (WOOD, 1998).

Os microorganismos envolvidos na fermentação “sourdough”, tradicionalmente, desenvolvem-se naturalmente, mas a fim de controlar o processo fermentativo e otimizar os benefícios da fermentação, há um grande interesse no uso de novas e definidas culturas “starter”. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biomassa, em biorreator em estado submerso, das cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Dekkera bruxellensis* e *Kluyveromyces marxianus*.

2. Materiais e métodos

2.1. Micro-organismos utilizados e manutenção das culturas

Lactobacillus plantarum BL011 isolado de queijo serrano, conforme metodologia de De Souza et al. (2003), foi conservado em glicerol através da transferência de 0,6 mL das culturas (preparadas nas condições adequadas de temperatura e agitação) para frascos contendo 0,4 mL de glicerol previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos (Phoenix Equipamentos, modelo AV.75, Brasil), sendo em seguida armazenados a -18°C. *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y-12961), foi doada pelo Center for Agricultural Utilization Research (USA), *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, proveniente do Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda) e foi fornecida pelo Centro de Desenvolvimento Biotecnológico

(SC, Brasil). As leveduras foram mantidas em placa de Petri contendo meio de manutenção MYPD (Meio de Armazenamento para Leveduras), composto por ágar-ágar (20 gL^{-1}), extrato de levedura (3 gL^{-1}), extrato de malte (3 gL^{-1}), peptona bacteriológica (5 gL^{-1}) e glicose anidra (10 gL^{-1}), conforme descrito por Furlan et al., 1995. Em períodos de curta armazenagem foi utilizado meio YEPD (Meio de Crescimento Complexo para Leveduras), composto de ágar-ágar (20 gL^{-1}), extrato de levedura (10 gL^{-1}), peptona bacteriológica (20 gL^{-1}) e glicose anidra (20 gL^{-1}) com pH ajustado para 7,0. As cepas de *D. bruxellensis* e *K. marxianus* foram conservados em glicerol através da transferência de 0,6 mL das culturas (preparadas nas condições adequadas de temperatura e agitação) para frascos contendo 0,4 mL de glicerol.

2.2 Meio e condições de cultivo

2.2.1 Meio e condições de cultivo para a levedura *D. bruxellensis*

Para o crescimento do micro-organismo em agitador horizontal utilizou-se metodologia adaptada de USCANGA; DELIE; STREHAIANO (2000). Meio de cultivo contendo (g/L): glicose, 50; peptona, 5; KH_2PO_4 , 5; extrato de levedura, 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4. Após a preparação dos pré-inóculos, em Erlenmeyers de 100 mL mantidos em agitador horizontal por 12 h a 100 rpm e 28 °C, procedeu-se o inóculo, que foi composto por 10 % (v/v) de pré-inóculo. As culturas foram mantidas por 27 h, a 100 rpm e 28 °C. Amostras foram coletadas a cada 3 h. Em cada coleta retirou-se 10 mL de meio que foi transferido para tubo Falcon e após centrifugados por 15 min a 3500 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi pipetado para um tubo de vidro e conservado em geladeira, por 48 h, para determinação do açúcar redutor e as células sedimentadas no tubo Falcon foram para estufa a 70 °C para o cálculo do peso seco. Para cálculo do açúcar consumido utilizou-se método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS, conforme a metodologia de CHAPLIN (1986). O experimento ocorreu em triplicata.

Para o crescimento do micro-organismo em biorreator de 2 L utilizou-se o mesmo meio do crescimento em agitador horizontal. O pré-inóculo foi feito em Erlenmeyer de 200 mL e após 12 h de crescimento em agitador horizontal a 100 rpm e 28 °C, procedeu-se o inóculo do biorreator. Foram testados os seguintes parâmetros de aeração e agitação: 2 vvm e 300 rpm, 3 vvm e 400 rpm e um experimento ocorreu em anaerobiose. O pH 5,5, temperatura 28°C e a concentração de glicose 50 g.L^{-1} foram mantidos constantes nos testes. O tempo do

experimento foi de 27 h e a coleta das amostras ocorreu a cada 3 h. Em cada ponto coletou-se 10 mL de meio de crescimento em tubo Falcon que foi centrifugado por 15 min a 3500 rpm, o sobrenadante foi pipetado em tubo de vidro e conservado em geladeira, para o cálculo do açúcar redutor, e a biomassa sedimentada foi seca em estufa a 70 °C para o cálculo do peso seco. Para cálculo do açúcar consumido utilizou-se método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS, conforme a metodologia de CHAPLIN (1986). Os experimentos ocorreram em duplicata.

2.2.2 Meio e condições de cultivo para a levedura *Kluyveromyces marxianus*

Para o crescimento do microorganismo em biorreator de 2 L utilizou-se, num primeiro teste, meio contendo (g/L): lactose, 70; peptona, 20; extrato de levedura, 10; KH_2PO_4 , 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2. No outro teste a fonte de carboidrato foi 50 g.L⁻¹ de glicose. O pré-inóculo foi feito em Erlenmeyer de 200 mL e após 12 h de crescimento em agitador horizontal a 100 rpm e 30°C, procedeu-se o inóculo do biorreator. Os parâmetros de crescimento foram: 400 rpm, pH 5.5, temperatura 30°C. O tempo total do experimento foi de 27 h e a coleta das amostras ocorreu a cada 3 h. Em cada ponto coletou-se 10 mL de meio de crescimento em tubo falcon que foi centrifugado por 15 minutos a 3500 rpm, o sobrenadante foi pipetado em tubo de vidro e conservado em geladeira, para o cálculo do açúcar redutor, e a biomassa sedimentada foi seca em estufa a 70 °C para o cálculo do peso seco. Para cálculo do açúcar consumido utilizou-se método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS, conforme a metodologia de CHAPLIN (1986). Os experimentos ocorreram em duplicata.

2.2.3 Meio e condições de cultivo para a bactéria *Lactobacillus plantarum*

As células foram resuspendidas em meio MRS por 24h a 37 °C e inoculada (1:10; DO 1.0) em meio de cultivo contendo (g/L): lactose, 100; peptona, 15; extrato de levedura, 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.04 (BRINQUES; PERALBA; AYUB, 2009). Após a preparação dos pré-inóculos, em Erlenmeyers de 100 mL mantidos em agitador horizontal por 24 h a 150 rpm e 34°C, procedeu-se o inóculo, que foi composto por 10 % (v/v). As culturas foram mantidas por 27 h, a 150 rpm e 34 °C. Amostras foram coletadas a cada 3 h. Em cada coleta retirou-se 10 mL de meio que foi transferido para tubo Falcon e após centrifugados por

15 min a 3500 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi pipetado em tubo de vidro e conservado em geladeira, por 48 h, para determinação do açúcar redutor e as células sedimentadas no tubo falcon foram para estufa a 70 °C para o cálculo do peso seco. Para cálculo do açúcar consumido utilizou-se método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS, conforme a metodologia de CHAPLIN (1986). O experimento ocorreu em triplicata.

Para o crescimento do microorganismo em biorreator de 2 L utilizou-se o mesmo meio do crescimento em agitador horizontal. O pré-inóculo foi feito em Erlenmeyer de 200 mL e após 24 h de crescimento em agitador horizontal a 150 rpm e 34 °C, procedeu-se o inóculo do biorreator. Os parâmetros para o cultivo foram: pH 5,2, concentração de lactose 100 g/L, 2 vvm, 200 rpm e 34 °C. O tempo total do experimento foi de 27 h e a coleta das amostras ocorreu a cada 3 h. Em cada ponto coletou-se 10 mL de meio de crescimento em tubo falcon que foi centrifugado por 15 minutos a 3500 rpm, o sobrenadante foi pipetado em tubo de vidro e conservado em geladeira, para o cálculo do açúcar redutor, e a biomassa sedimentada foi seca em estufa à 70 °C para o cálculo do peso seco. Para cálculo do açúcar consumido utilizou-se método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS, conforme a metodologia de CHAPLIN (1986). Os experimentos ocorreram em duplicata.

3. Resultados e discussões

3.1 Cinética de crescimento da levedura *D. Bruxellensis*

Em agitador horizontal, **Figura 1**, a produção de biomassa após 27 h foi 9,33 g.L⁻¹, o melhor crescimento em biorreator, **Figura 2-B**, ocorreu em condições mais aeradas 17,12 g.L⁻¹. Em aneroiose, **Figura 2-C**, a produção de biomassa foi 2,06 g.L⁻¹, o açúcar foi praticamente consumido, pois houve a produção de etanol (dados não mostrados). USCANGA et al.,(2000) obteve em torno de 7 g.L⁻¹ de biomassa seca. Utilizou meio fermentativo com (g/L): glicose, 50; (NH₄)₂SO₄, 2; KH₂PO₄, 5; MgSO₄·7H₂O, 0,4; extrato de levedura, 1. Em cada experimento utilizou este meio básico, sem um dos componentes, a fim de determinar o componente essencial do meio de cultivo. Os parâmetros utilizados durante o crescimento foram: temperatura, 30 °C; agitação 250 rpm e 0,10 vvm de aeração.

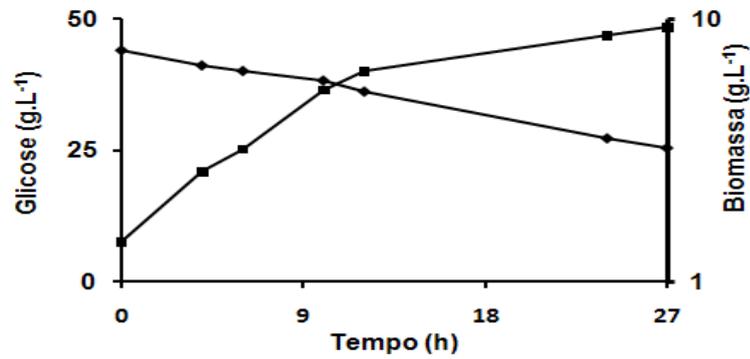


Figura 1 - Cinética de crescimento de *D. bruxellensis* em agitador horizontal, Temperatura: 28 °C, 100 rpm. Quadrado: crescimento celular; losango: glicose residual

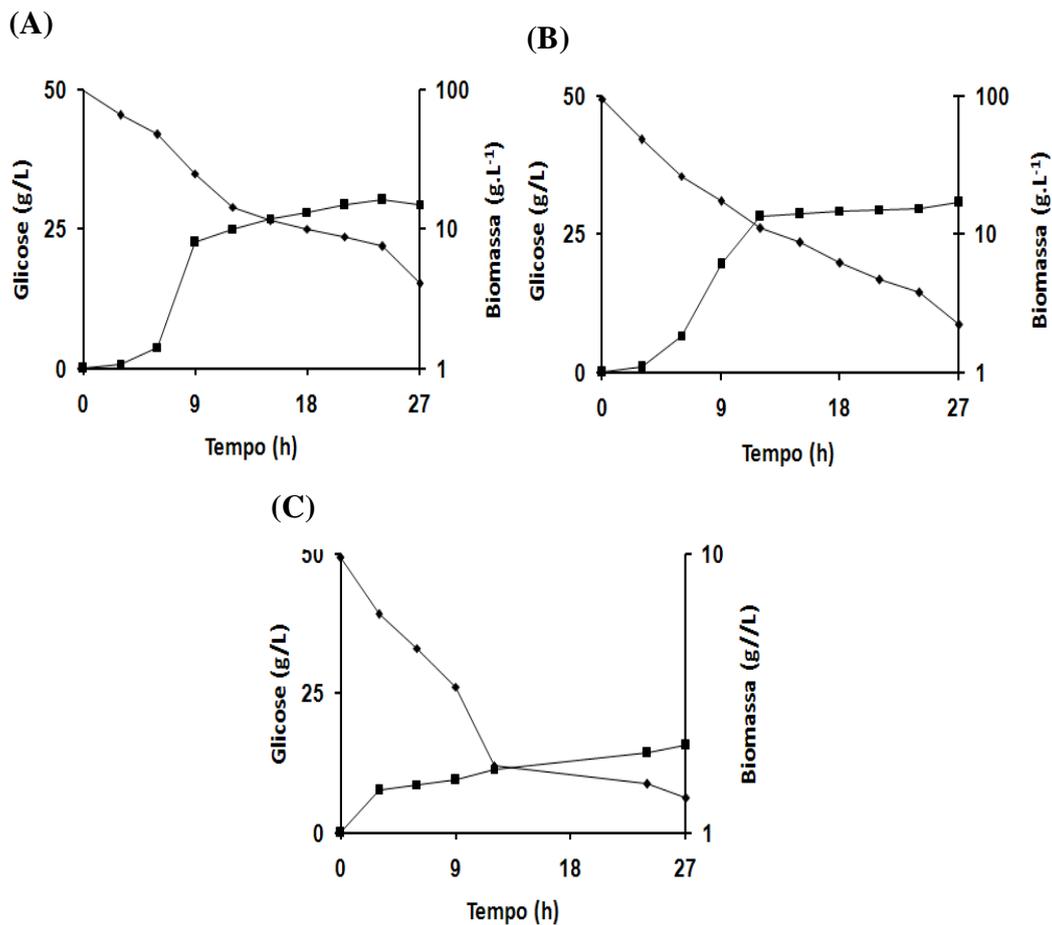


Figura 2 - Cinética de crescimento de *D. bruxellensis*. A) biorreator 2L, Temperatura: 28 °C, 300 rpm, pH: 5,5. Quadrado: crescimento celular; losango: glicose residual; B) biorreator 2L, Temperatura: 28 °C, 400 rpm, pH: 5,5. Quadrado: crescimento celular; losango: glicose residual; C) biorreator 2L, Temperatura: 28 °C, pH: 5,5, anaerobiose

3.2 Cinética de crescimento da levedura *K. marxianus*

O crescimento da levedura *K. marxianus* praticamente quadruplicou, quando a glicose foi substituída por lactose no meio de cultivo, **Figura 3**. No meio de cultivo contendo lactose após 27 h de crescimento a produção de biomassa foi $23,98 \text{ g.L}^{-1}$, com glicose como fonte de açúcar a produção não alcançou 7 g.L^{-1} .

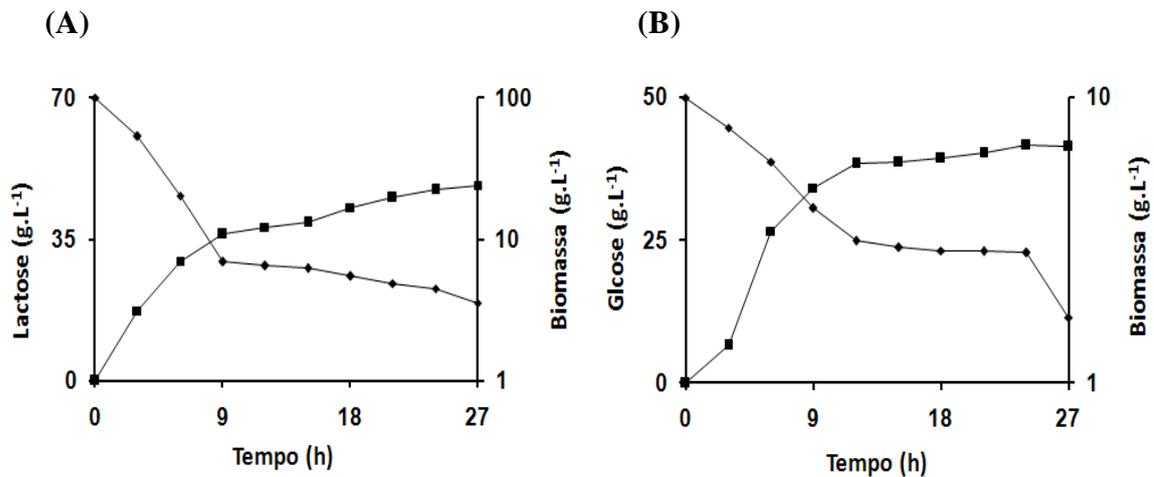


Figura 3 - Cinética de crescimento de *K.marxianus*. A) biorreator 2L, T: 30 °C, 5 vvm, pH: 5,5. Quadrado: crescimento celular; losango: lactose residual; B) biorreator 2L, T: 30 °C, 5 vvm, pH: 5,5. Quadrado: crescimento celular; losango: glicose residual

3.3 Cinética de crescimento da bactéria *L. plantarum*

Em agitador horizontal a produção de biomassa foi $5,02 \text{ g.L}^{-1}$, **Figura 4-A**. Este resultado pode ser atribuído a toxicidade do ácido lático produzido durante o crescimento da bactéria. A produção de biomassa, após 27 h de crescimento do *Lactobacillus plantarum* em biorreator, foi $10,63 \text{ g.L}^{-1}$, **Figura 4-B**. Resultado similar com um dos experimentos de BRINQUES et al., (2010) que obteve $10,35 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Os parâmetros de crescimento utilizados e o meio de cultivo foram os mesmos, deste trabalho, porém a concentração inicial de glicose foi de 140 g.L^{-1} .

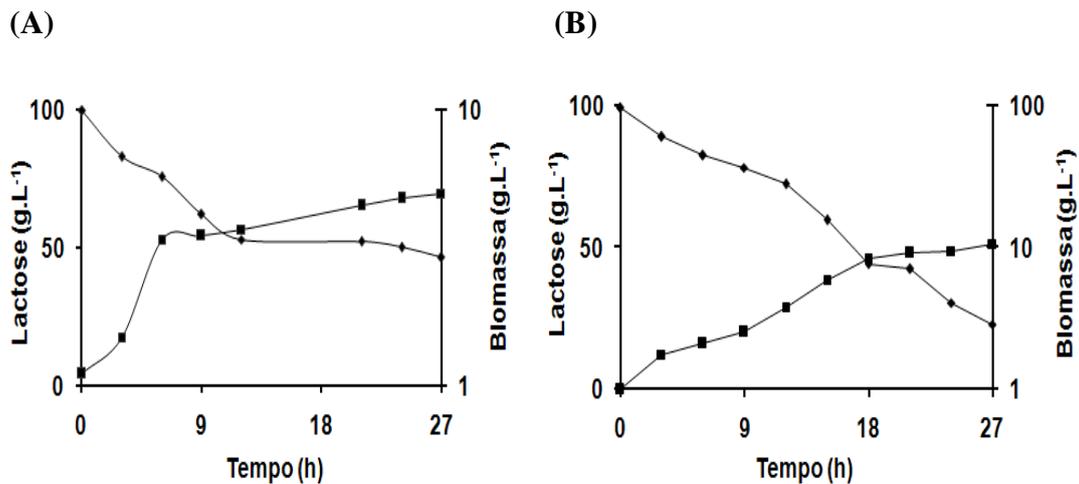


Figura 4 - Cinética de crescimento de *L. plantarum*. A) agitador horizontal, T: 34 °C, 150 rpm. Quadrado: crescimento celular; losango: lactose residual; B) biorreator 2L, T: 34 °C, 200 rpm, pH: 5,2. Quadrado: crescimento celular; losango: lactose residual

Em agitador horizontal a produção de biomassa foi 5,02 g.L⁻¹, este resultado pode ser atribuído a toxicidade do ácido láctico produzido durante o crescimento da bactéria. A produção de biomassa, após 27 h de crescimento do *Lactobacillus plantarum* em biorreator, foi 10,63 g.L⁻¹. Resultado similar com um dos experimentos de BRINQUES et al., (2010) que obteve 10,35 g.L⁻¹ de biomassa. Os parâmetros de crescimento utilizados e o meio de cultivo foram os mesmos, deste trabalho, porém a concentração inicial de glicose foi de 140 g.L⁻¹.

4 Conclusões

Com o estudo da cinética de crescimento das cepas selecionadas para a fermentação “sourdough” observou-se a fase Log e a quantidade de biomassa formada durante o crescimento dos microrganismos, e assim foi possível planejar o tempo ideal de crescimento das cepas como também a quantidade de bateladas, de biorreator, necessárias para o inóculo da massa mãe com a biomassa obtida. A melhor condição obtida foi com a levedura *K. marxianus* 23,98 g.L⁻¹ de biomassa com a condição de cultivo mais aerada e com lactose como fonte de carbono. Para trabalhos futuros a opção seria tentar meios alternativos aos sintéticos em razão dos custos.

5 Referências Bibliográficas

BRINQUES, G. B.; PERALBA, M. C ; AYUB, M. A. Z. . Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, n. 2. p. 205-212, 2010.

CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: CHAPLIN M. F.; KENNEDY, J. F. (Ed.). **Carbohydrate analysis**. Oxford: IRL Press, 1986. p. 1-3.

DE SOUZA, C. F. V.; DALLA ROSA, T.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003.

JAGNOW, G.; DAWID, W. **Biotechnología: introducción con experimentos modelo**. Zaragoza: Acribia, 1991.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 32, n. 7, p. 284-288, 2005.

USCANGA M. G. A.; DELIE M.; STREHAIANO P. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures. **Canadian Journal Microbiology/Revue Canadienne de Microbiologie**, Ottawa, v. 46, n. 11, p. 1046-1050, 2000.

WOOD, J. B. **Microbiology of fermented foods**. 2nd ed. London: Blackie Academic e Professional, 1998.

APÊNDICE B – Ficha da avaliação sensorial

Nome: _____ Data: _____

ANÁLISE SENSORIAL DE PÃO

De acordo com a escala abaixo, expresse seu grau de gostar e desgostar de cada amostra, em relação aos atributos sabor e avaliação global.

- 1 – Desgostei muitíssimo
- 2 – Desgostei muito
- 3 – Desgostei regularmente
- 4 – Desgostei ligeiramente
- 5 – Indiferente
- 6 – Gostei ligeiramente
- 7 – Gostei regularmente
- 8 – Gostei muito
- 9 – Gostei muitíssimo

Amostra	425	613	197	342
Sabor				
Avaliação Global				

Observações:

APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, RG _____, declaro que fui informado e devidamente esclarecido sobre a natureza da pesquisa, o objetivo do experimento, as hipóteses à serem testadas, os materiais e os métodos necessários, o Estado da Arte atualizado do tema de pesquisa em pauta, e que obtive capacitação em relação as análises a serem realizadas, em relação a qualidade do processo produtivo dos pães. Em relação aos ingredientes utilizados nas formulações, obtive igual oportunidade quanto a sua qualidade sanitária e tecnológica, para a realização da Análise Sensorial.

Declaro minha participação voluntária na pesquisa, livre de simulação, fraude, erro, dependência, subordinação ou intimidação.

Porto Alegre, de de 2011.

Assinatura _____