

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS  
ALIMENTOS**

LÍLIAN BORGES TEIXEIRA

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FERMENTO SOURDOUGH PARA  
ELABORAÇÃO DE BIOCONSERVANTE DE PANIFICAÇÃO**

PORTO ALEGRE

2023

LÍLIAN BORGES TEIXEIRA

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FERMENTO *SOURDOUGH* PARA  
ELABORAÇÃO DE BIOCONSERVANTE DE PANIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre(a).

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Cruz Silveira Thys

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Coorientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

PORTO ALEGRE

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Teixeira, Lilian Borges  
ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FERMENTO  
SOURDOUGH PARA ELABORAÇÃO DE BIOCONSERVANTE DE  
PANIFICAÇÃO / Lilian Borges Teixeira. -- 2023.  
104 f.  
Orientadores: Roberta Cruz Silveira Thys, Jeverson  
Frazzon.

Coorientador: Eliseu Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Bactéria ácido láctica. 2. Sourdough. 3.  
Atividade antifúngica. 4. Produtos de panificação com  
microbiota. 5. Vida útil. I. Thys, Roberta Cruz  
Silveira, orient. II. Frazzon, Jeverson, orient. III.  
Rodrigues, Eliseu, coorient. IV. Título.

LÍLIAN BORGES TEIXEIRA

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FERMENTO SOURDOUGH PARA  
ELABORAÇÃO DE BIOCONSERVANTE DE PANIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre(a).

Aprovado em: Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Roberta Cruz Silveira Thys  
PPGCTA /UFRGS  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliane Elisa Welke  
UFRGS  
Examinadora

---

Prof. Dr. Jeverson Frazzon  
PPGCTA /UFRGS  
Orientador

---

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner  
UFSC  
Examinador

---

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
PPGCTA /UFRGS  
Co-orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Poliana Deyse Gurak  
UFCSPA  
Examinadora

## AGRADECIMENTOS

Desde pequena sempre fui encantada pela produção de alimentos, minha avó materna, Vilma Nascimento Borges, foi um grande exemplo para mim. Com poucos e singelos ingredientes produzia verdadeiros “banquetes” para a família e amigos. A sua comida era afeto, carinho, generosidade, doação. E assim, cresci com esse exemplo que despertou em mim o desejo de conexão com os alimentos.

Anos após a faculdade de Nutrição, me formei técnica em panificação e confeitaria e ali descobri uma paixão: produção de pães e fermentação *sourdough*.

Essa foi a minha motivação para viver a experiência de realização de um mestrado após 13 anos de formação, o desejo de aprender mais sobre fermentação *sourdough*. A descoberta da linha de pesquisa da professora Roberta Cruz Silveira Thys foi a porta de entrada para iniciar essa grande aventura.

Contudo, muitos foram os caminhos percorridos até a conclusão da dissertação e muito mais foram as pessoas que me acompanharam por essa jornada, seja apontando uma direção, compartilhando seus conhecimentos, ou simplesmente estando ao meu lado durante o percurso.

E para seguir esse caminho, agradeço o incentivo do grande amor da minha vida Felipe da Silva Rodrigues que embarcou nessa comigo e também realizou um mestrado. A cumplicidade, apoio, sede de aprender e viver tudo que a vida nos reserva é o que nos une.

Minha família sempre esteve do meu lado, com eles aprendi desde cedo que o único caminho para avançar é o conhecimento, ele é a chave para nossa evolução pessoal. Por isso, agradeço à minha mãe, Eliana Borges, e ao meu pai, Osvaldo Brasil Teixeira, pelo apoio incondicional e incentivo em qualquer dos caminhos que eu escolhesse seguir; não interessando as dificuldades que pudessem aparecer.

Dedico este trabalho à minha irmã, Aline Borges Teixeira, que é a minha fortaleza, tenho orgulho imenso da mulher que é, do carinho com que passa adiante todo o seu aprendizado. O apoio que tive de todas as formas dela foi enorme!

Esse caminho foi muito mais leve através da orientação da professora Roberta Cruz Silveira Thys, com sua amorosidade, presteza e incentivo, que nos momentos de felizes descobertas vibrou comigo e nos momentos difíceis me fez enxergar uma saída.

Agradeço ao meu orientador, professor Jeverson Frazzon por todo o incentivo, sabedoria e conselhos, e, principalmente por ser atencioso ao partilhar seus conhecimentos. Sou grata por não me deixar desistir de elaborar um fermento perfeito!

Ao meu coorientador professor Eliseu Rodrigues pela dedicação, pelo incentivo e estar junto nas propostas e nas ideias. Sua disponibilidade em me ouvir e me ensinar com paciência foram fundamentais.

Aos colegas que passaram pelo PPGCTA, pelos laços e trocas criados mesmo através das carinhas no computador nas aulas não presenciais, pelas trocas de referências e angústias, além do incentivo às pesquisas uns dos outros, em especial à Isabela Jaeger, à Rafaela Diogo Silveira e ao Gabriel Siqueira Galvão Novo.

Aos dedicados técnicos dos laboratórios, meu agradecimento especial, sem vocês a execução do trabalho não seria possível: Rodrigo, Tiago, Ana, Luana, Michele e Andressa.

Aos colegas do Centro Estadual de Vigilância em Saúde, agradeço imensamente pelo apoio. Principalmente à colega Vanda Garibotti pelas palavras de incentivo e Amanda Brito de Freitas pelas revisões e por estar sempre disposta a me ouvir.

Agradeço ao meu mentor na panificação professor Odoaldo Ivo Rochefort Neto por ser uma inspiração profissional e continuar contribuindo na carreira dos seus ex-alunos.

Obrigada também às marcas Maria Inês e Motasa por apoiarem pesquisadores como eu.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

A todas as professoras e os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA), vocês foram muito importantes para a minha formação.

E, por fim, aos mestres padeiros do passado que perpetuaram a arte de produção de pães de fermentação *sourdough* durante os séculos.

*“Forjar no trigo o milagre do pão.”*  
(Chico Buarque de Holanda e Milton Nascimento)

## RESUMO

O mercado pungente por produtos fermentados, como os pães de fermentação natural, sem a adição de conservantes, que contempla um público mais seletivo, é um grande desafio para a indústria de panificação. O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antifúngica do fermento *sourdough* Tipo III (tIII-SD) produzido a partir de duas bactérias ácido lácticas: *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (isolado de massa fermentada Tipo I) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC8014, além de analisar seu potencial como bioconservante para panificação. Foram utilizados diferentes substratos (farinha do grão inteiro de trigo, farinha de trigo tradicional, farinha de ervilha e farinha de linhaça) para potencializar a produção de metabólitos antifúngicos e diferentes tempos de fermentação (24 e 48 horas). As amostras tIII-SD foram analisadas em relação ao pH, acidez total titulável e ácidos orgânicos. Para avaliar o potencial antifúngico *in vitro* foi produzido um extrato solúvel em água/sal do tIII-SD que foi testado contra três dos principais fungos que contaminam produtos de panificação: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger*. Para as análises *in situ* foram elaborados pães com 10% de tIII-SD e avaliada a contaminação por fungos durante todo o período de vida útil. Antes do processo de liofilização do *sourdough*, o menor valor de pH foi obtido na fermentação de 48 horas por *L. plantarum* e os maiores valores de ácido láctico foram obtidos nos extratos salinos produzidos com tIII-SD fermentado com 70% de farinha de trigo de grão inteiro e 30% de farinha de ervilha (SWGP) por *L. plantarum* em 24 e 48 horas. Os extratos salinos exibiram graus variados de inibição fúngica no teste *in vitro*; no entanto, o maior aumento deste efeito foi obtido quando a farinha de trigo de grão inteiro (SWG) foi utilizada. O tIII-SD elaborado com SWG e fermentado por *L. plantarum* por 48 horas (SWG48-LP) prolongou a vida útil do pão em 4 dias, apresentando desempenho superior ao pão preparado com propionato de cálcio (0,1% p/p), com validade de 9 dias. Ainda, o pão elaborado com tIII-SD de farinha de trigo e linhaça, fermentado por *F. sanfranciscensis* em 48 horas (SWF48h-FS), ficou 10 dias sem o aparecimento de fungos, apresentando assim a maior validade dentre os pães elaborados com o conservante elaborado. Assim, este estudo confirmou a eficácia do uso de fermentação *sourdough* tipo III como opção de bioconservante para futuras aplicações em produtos de panificação.



**Palavras-chave:** bactéria ácido láctica; *sourdough* tipo III; atividade antifúngica; produtos de panificação com microbiota; vida útil.

## ABSTRACT

The strong demand for fermented products, such as naturally fermented bread, without the addition of preservatives, catering to a more selective audience, is a significant challenge for the bakery industry. The goal of the present study was to investigate the antifungal activity of Type III *sourdough* (tIII-SD) produced by two lactic acid bacteria: *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (isolated from Type I *sourdough*) and *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC8014, as well as to analyze its potential as a bio-preservative for baking. Different substrates were used to enhance the production of antifungal metabolites, and fermentation was carried out for 24 and 48 hours. The tIII-SD samples were analyzed for pH, total titratable acidity, and organic acids. To evaluate the in vitro antifungal potential, a water/salt-soluble extract of tIII-SD was prepared and tested against three of the main fungi that contaminate bakery products: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum*, and *Aspergillus niger*. For in situ analyses, breads with 10% tIII-SD were prepared, and fungal contamination was evaluated throughout the shelf life. Before the lyophilization process, the lowest pH value was obtained after 48 hours of fermentation by *L. plantarum*, and the highest lactic acid values were obtained in the saline extracts produced with tIII-SD obtained from the fermentation with 70% of whole wheat flour + 30% pea flour (SWG-P) by *L. plantarum* at 24 and 48 hours. The saline extracts exhibited varying degrees of inhibition in the in vitro test; however, the greatest increase in this effect was achieved when whole wheat flour (SWG) was used. The tIII-SD prepared with SWG and fermented by *L. plantarum* for 48 hours (SWG48-LP) extended the bread's shelf life by 4 days, showing superior performance to bread prepared with calcium propionate (0.1% w/w), with a shelf life of 9 days. And the tIII-SD prepared with wheat and flaxseed flour fermented with *F. sanfranciscensis* for 48 hours (SWF48h-FS) outperformed the other formulations, with a total shelf life of 10 days. This study confirmed the effectiveness of using type III *sourdough* fermentation as a bio-preservative option for future applications in baking products.

**Keywords:** lactic acid bacteria; type-III *sourdough*; antifungal activity; microbiota bakery products; shelf-life

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Tipos de sourdough	24
<b>Figura 2</b> - Gráfico circular das espécies identificadas de Lactobacillus (a) e leveduras (b) em sourdough nos últimos 30 anos.	28
<b>Figura 3</b> - Metabolismo de lactobacilos homofermentativos (A) e lactobacilos heterofermentativos (B) em sourdough.	33
<b>Figura 4</b> - Compostos antifúngicos produzidos por bactérias ácido lácticas	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BAL**- Bactéria ácido láctica

**EPS**- Exopolissacarídeos

**PB**- Peptídeos bioativos

**GRAS**- Geralmente reconhecida como segura

**QPS**- Presunção qualificada de segurança

**AF**- Ácido fenilático

**RM**- Rendimento de massa

**BLIS**- Substâncias inibidoras do tipo bacteriocina

**TTA**- Acidez total titulável

**AW**- Atividade de água

**AAB**- Bactérias do ácido acético

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>13</b>
3.1 TENDÊNCIAS DE MERCADO DE PANIFICAÇÃO E PADRÃO DE CONSUMO	13
3.2 CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM PÃES	15
3.3 FORMAS DE PRESERVAÇÃO ANTIFÚNGICA NATURAL NA PANIFICAÇÃO	17
<b>3.3.1 Compostos antifúngicos naturais</b>	<b>17</b>
<b>3.3.2 Biopreservação de Alimentos</b>	<b>19</b>
3.4 FERMENTAÇÃO NATURAL (SOURDOUGH)	22
<b>3.4.1 Histórico e definição</b>	<b>22</b>
<b>3.4.2 Composição microbiológica</b>	<b>25</b>
<b>3.4.3 Processo fermentativo</b>	<b>29</b>
3.5 FERMENTAÇÃO NATURAL COMO FERRAMENTA DE BIOPRESERVAÇÃO NA PANIFICAÇÃO	33
<b>3.5.1 Compostos antifúngicos produzidos via fermentação sourdough</b>	<b>33</b>
<b>3.5.2 Fatores que afetam a produção de compostos antifúngicos via fermentação sourdough</b>	<b>38</b>
3.5.2.1. Temperatura e período de incubação	38
3.5.2.2. Rendimento de massa e pH	40
3.5.2.3. Meio de crescimento/substrato	42
3.5.2.4. Sinergia entre os compostos antifúngicos	44
3.5.2.5. Linhagem de BAL presente no fermento	45
3.5.2.6. Oxigênio	46
3.5.2.7. Atividade de água e força osmótica	46
3.5.3 Formas de aplicação de bioconservantes produzidos através de fermentação por BAL	47
<b>4. ARTIGO</b>	<b>52</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>88</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais percebe-se a tendência do consumidor em optar por alimentos naturais ou com o mínimo de conservantes químicos. Essa preferência pode estar relacionada à divulgação da associação entre os conservantes químicos e o desenvolvimento de doenças (SAMAPUNDO et al., 2016), o que faz com que a indústria de panificação identifique a necessidade de reduzir as quantidades de conservantes químicos utilizados nos produtos.

O termo “clean label”, ou “rótulo limpo”, vem sendo utilizado para definir produtos mais naturais, isentos de aditivos, feitos com menor processamento e/ou menor número de ingredientes. Esses produtos são percebidos pelos consumidores como livres de aditivos e como mais naturais e mais saudáveis (GARCIA; BERNARDI; COPETTI, 2019).

Nesse sentido, o desafio da produção de alimentos mais naturais consiste em desenvolver produtos com qualidade sensorial e controle microbiológico, ao mesmo tempo que devem obrigatoriamente estar em conformidade regulatória. De Oliveira do Nascimento et al., (2018) pontuam que, futuramente, para produtos alimentícios, a classificação “clean label” não será apenas desejável, mas sim, uma condição minimamente aceitável.

A principal causa de contaminação na produção de pães se dá através do desenvolvimento de fungos que levam à redução da vida útil do produto e a perdas econômicas e insatisfação dos consumidores (RUSSO et al., 2017). Além disso, a produção de micotoxinas tornou-se uma ameaça à saúde dos consumidores visto os seus efeitos tóxicos (ZAIN, 2011).

No pão, a contaminação ocorre normalmente durante o resfriamento, corte, embalagem e armazenamento, pois os esporos de fungos são eliminados durante o assamento. Diversos fatores podem influenciar nessa contaminação fúngica: o tipo de produto, os ingredientes, o layout da padaria e a embalagem do produto. E vários métodos, incluindo a adição de ácido propiônico e seus sais, embalagem de atmosfera modificada, irradiação e pasteurização de embalagens, podem ser usados para minimizar a deterioração microbiana (GEREZ et al., 2010a). Alternativamente, há um crescente interesse na utilização da biopreservação envolvendo o uso de

microrganismos e/ou seus metabólitos, tanto para impedir o crescimento de patógenos quanto para estender a vida útil dos produtos.

Dessa forma, o fermento *sourdough*, uma mistura de farinha de trigo ou centeio e água, fermentada por bactérias ácido lácticas (BAL), com ou sem leveduras, é considerado atualmente uma fonte de bioconservantes. Entre os metabólitos antifúngicos responsáveis pelo potencial bioconservante do *sourdough* estão dipeptídeos cíclicos, ácidos orgânicos, compostos proteicos, ácidos graxos 3-hidroxilados, dentre outros (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Assim, tendo em vista a demanda do consumidor por alimentos mais naturais e com o uso reduzido de conservantes químicos, há estímulos crescentes de pesquisas sobre o uso de fermento *sourdough* como um bioconservante. Neste trabalho, buscou-se analisar a atividade antifúngica do fermento *sourdough* para a elaboração de um bioconservante para a indústria de panificação.

## 2. OBJETIVO GERAL

Analisar o potencial antifúngico de um fermento *sourdough* liofilizado para a elaboração de um bioconservante para a indústria de panificação.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e isolar as BAL presentes em um fermento *sourdough* tipo I maduro;
- Elaborar fermentos *sourdough* do tipo III (liofilizados) utilizando diferentes substratos e cepas de BAL isoladas;
- Analisar o pH e acidez total titulável (ATT) dos fermentos produzidos antes do processo de liofilização;
- Avaliar o potencial bioconservante dos extratos salinos obtidos através da análise antifúngica;
- Identificar e quantificar os ácidos orgânicos contidos nos fermentos elaborados;

- Comparar a ação dos bioconservantes obtidos em pão de forma com os controles produzidos com conservante químico propionato de cálcio e sem o uso de conservantes.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 TENDEÊNCIAS DE MERCADO DE PANIFICAÇÃO E PADRÃO DE CONSUMO**

O comportamento do consumidor de produtos de panificação passou por mudanças na última década, onde se destaca uma maior percepção do impacto negativo de algumas estratégias de preservação de alimentos para a saúde humana e para o meio ambiente (LAVILLA, 2019). Essa percepção levou a uma crescente demanda por pães mais naturais e sem conservantes químicos, o que veio a ser chamado de pães “clean label” ou com rótulo limpo (AXEL; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Segundo Lemos et al., (2018), para um produto ser considerado “clean label” o mesmo deve ser elaborado apenas com ingredientes naturais, isto é, sem uso de conservantes. Entretanto, não existe definição legal ou regulamentar para o termo “clean label” ou rótulo limpo. De forma geral, trata-se de um conceito que engloba aspectos relacionados ao produto, embalagens, saúde, nutrição e sustentabilidade. Diversos países apresentam alta demanda por esse tipo de produto. No Brasil, os produtos “clean label” estão aumentando e possuem grande potencial de desenvolvimento.

Diante dessa demanda, os alimentos fermentados tornaram-se alvo de numerosas pesquisas que analisam seus benefícios para a saúde, seus principais compostos bioativos e as tendências futuras sobre suas potencialidades. Além disso, os alimentos fermentados podem representar uma estratégia não invasiva para enfrentar múltiplas desordens, como hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, estresse oxidativo e múltiplas desordens cognitivas, entre outras (DIEZ-OZAETA; ASTIAZARAN, 2022).

Para se adequar ao desejo dos consumidores, a indústria de panificação tem investido para reduzir o número de conservantes nos pães, como o propionato de



cálcio, em um esforço para fazer um pão de rótulo mais limpo (RYAN et al., 2011). No entanto, produtos sem a adição de conservantes químicos ou outros aditivos artificiais devem ser de alta qualidade e ter uma vida útil prolongada (AXEL; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Assim, a biopreservação, ou seja, o controle de um organismo por outro, ganhou atenção crescente. Trata-se de prolongar a vida útil e aumentar a segurança alimentar, usando microbiota natural e seus metabólitos, através de uma abordagem inócua e ecológica (ANANOU et al., 2007). O conceito de adicionar compostos naturais aos produtos alimentícios, além de reduzir os níveis de aditivos, pode ser uma solução promissora para melhorar tanto a saudabilidade real quanto a imagem de saúde dos produtos (HUNG; DE KOK; VERBEKE, 2016).

Embora o uso de microrganismos e seus metabólitos para a produção e a preservação de alimentos tenha uma longa história de uso seguro, o crescente interesse em ferramentas de biopreservação incentivou o desenvolvimento de pesquisas nas últimas décadas para novos compostos antimicrobianos naturais de diferentes origens (LAVILLA, 2019).

Nesse contexto, o uso de culturas bioprotetoras (microrganismos com propriedades antifúngicas) representam potencial alternativa para reduzir os níveis ou eliminar totalmente os conservantes químicos na panificação. A atividade antifúngica das BAL e propionibactérias também foi estudada como estratégia para redução dos conservantes químicos (ARENA et al., 2016). Essas bactérias estão naturalmente presentes em muitos alimentos fermentados e possuem uma longa história de uso seguro pela indústria de alimentos (LAY et al., 2016).

Dessa forma, pode-se afirmar que no contexto de redução do uso de conservantes químicos na panificação, umas das grandes tendências é o uso combinado das BAL com outros potencializadores: matrizes naturais (como leguminosas, farinhas, subprodutos da moagem e óleos essenciais) (DEBONNE et al., 2018; RICCI et al., 2019), embalagens ativas com absorvedores de oxigênio ou liberadores antimicrobianos (NOSHIRVANI et al., 2017) e a utilização da biopreservação através do *sourdough* em plantas semi-industriais e industriais (RIZZELLO et al., 2015).

### 3.2 CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM PÃES

Produtos de panificação podem ser contaminados por bactérias, leveduras e bolores, contudo, o tratamento térmico inerente ao processo elimina potenciais contaminantes da matéria-prima e do produto durante o assamento. Assim, a principal causa de deterioração de origem microbiológica no pão são os fungos que contaminam o produto após a cocção (KNIGHT; MENLOVE, 1961). É durante o resfriamento, corte, embalagem e armazenamento que ocorre a contaminação do produto final (GEREZ et al., 2010a).

Os fatores que mais interferem no controle do crescimento de fungos indesejáveis em alimentos são temperatura, oxigênio, pH e atividade de água ( $a_w$ ). Pães possuem teor de umidade consideravelmente alto,  $a_w$  entre 0,94 e 0,97 e pH de cerca de 6,0 e, assim, os produtos de panificação pelas suas características intrínsecas são considerados mais suscetíveis à deterioração fúngica e incompatíveis com o crescimento e sobrevivência de bactérias patogênicas (MAGAN; ARROYO; ALDRED, 2003; SUHR; NIELSEN, 2004).

É visivelmente fácil de identificar o desenvolvimento de fungos nos pães através da presença de colônias na superfície. Além disso, a contaminação fúngica também causa mudanças perceptíveis de sabor e de textura que impedem o consumo do produto. E como resultado, há grandes perdas econômicas para a indústria e consumidores. Além disso, o desenvolvimento de fungos em alimentos é uma das principais reclamações dos consumidores, principalmente de países tropicais como o Brasil (LEMOS et al., 2018). No Brasil, as perdas relacionadas à deterioração fúngica em produtos de panificação podem facilmente chegar a 10% do total produzido anualmente (FREIRE., 2011).

Ainda, o problema da contaminação por fungos na panificação é agravado pela produção de micotoxinas e sabores desagradáveis, que podem ser produzidos antes mesmo do crescimento visível no alimento. E o consumidor quando se depara com um pão mofado frequentemente retira a parte visivelmente mofada e consome o restante do produto (GOBBETTI et al., 2019). Por isso, não só a aparência dos pães é prejudicada pelo desenvolvimento desses microrganismos como também a saúde do consumidor (AXEL; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Uma pesquisa que avaliou o impacto das micotoxinas na contaminação dos pães demonstrou que a citrinina foi capaz de contaminar a primeira fatia de pão,

enquanto as aflatoxinas e a ocratoxina foram capazes de se difundir por até cinco fatias sucessivas (PELCZAR; REID; CHAN, 1981). A exposição do consumidor a essas micotoxinas pode causar intoxicação e, a longo prazo, ocasionar inclusive o desenvolvimento de tumores (PITT; HOCKING, 2009).

As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp., *Wallemia* spp., *Fusarium* spp. e *Cladosporium* spp. foram identificadas como os contaminantes mais importantes em pães (LEGAN; VOYSEY, 1991; VYTRÁSOVÁ; PŘIBÁNOVÁ; MARVANOVÁ, 2002).

Vários métodos podem ser utilizados para minimizar essa deterioração fúngica, incluindo a adição de ácido propiônico e seus sais, embalagem de atmosfera modificada, irradiação e pasteurização de embalagens (GEREZ et al., 2010a).

Os conservantes químicos frequentemente utilizados para evitar o crescimento fúngico nos pães são os propionatos (propionato de cálcio ou sódio), os sorbatos (ácido sórbico e sorbato de potássio), os benzoatos, os parabenos (metil e propil) e o ácido acético. Porém, os mais usados são os propionatos visto que não alteram a capacidade fermentativa das leveduras (CAUVAIN, 2009).

A utilização dos conservantes químicos é limitada de acordo com cada país e, existe uma tendência mundial de diminuição do uso de conservantes artificiais. A União Europeia, por exemplo, já diminuiu a concentração permitida de sorbato para 0,2% e propionato para 0,3% (HERAS-MOZOS et al., 2019).

No Brasil, os aditivos autorizados para produtos de panificação, incluindo limites e funções, constam na Resolução 383/1999 da ANVISA, além da IN nº 211/2023, que normatizam questões mais específicas. Segundo a legislação brasileira, os aditivos químicos com a funcionalidade de inibir a ação de microrganismos na panificação são classificados como conservantes, e os mais utilizados são: ácido sórbico (INS 201), propionato de cálcio (INS 282) e sorbato de potássio (INS 202). A recomendação de dosagem desses conservantes pela ANVISA na massa dos pães é de 0,1%, baseado na quantidade de farinha. Dentre esses aditivos, o propionato de cálcio é o mais comumente utilizado e apesar da recomendação de uso de 0,1%, não há um limite máximo de uso específico.

Cabe ressaltar que a quantidade dos conservantes na panificação deve ser controlada com muita precisão, pois o uso exagerado pode retardar o processo de fermentação dos pães (REGO ET AL., 2020). E por outro lado, o consumo diário de

aditivos químicos podem resultar em malefícios para a saúde como alergias, alterações no comportamento, carcinomas, entre outros (POLÔNIO, 2009).

Além disso, Thomas et al., (2012) relataram que o ácido propiônico em níveis elevados pode se acumular no sangue, atravessar a barreira cerebral e intestinal e resultar em efeitos adversos no desenvolvimento e funcionamento do cérebro. A ingestão de ácido propiônico em níveis mais altos tem sido associada à acidemia em crianças (PENA; BURTON, 2012). Complicações da acidemia podem incluir dificuldades de aprendizagem, convulsões, sintomas gastrointestinais, arritmia e infecções recorrentes (WAJNER; GOODMAN, 2011).

Tendo em vista as limitações já descritas, há uma necessidade da indústria de panificação de retardar o crescimento fúngico nos pães sem a utilização de aditivos químicos, o que leva ao desenvolvimento de formas de preservação natural, principalmente com a finalidade de atrair o consumidor com o foco na saúde.

### 3.3 FORMAS DE PRESERVAÇÃO ANTIFÚNGICA NATURAL NA PANIFICAÇÃO

#### 3.3.1 Compostos antifúngicos naturais

A fim de evitar a deterioração fúngica, alguns estudos têm demonstrado como estratégias viáveis de conservação o uso de compostos antifúngicos produzidos por microrganismos como as BAL (SADEGHI et al., 2019a), fermentados à base de microrganismos (SAMAPUNDO et al., 2017), óleos essenciais em sua forma livre (TAKWA et al., 2018), óleos essenciais encapsulados (PINILLA; THYS; BRANDELLI, 2019), assim como, embalagens antifúngicas (HERAS-MOZOS et al., 2019).

Dessa forma, podemos ressaltar que as plantas são uma rica fonte de compostos antimicrobianos e o seu uso geralmente é seguro. Porém, frequentemente esses antimicrobianos à base de plantas não podem ser usados diretamente em alimentos considerando sua baixa solubilidade, instabilidade e produção de sabor indesejável em matrizes alimentares (MCCLEMENTS et al., 2021). Mesmo apresentando esse efeito indesejável, diversas pesquisas *in vitro* foram realizadas a fim de investigar compostos antimicrobianos em especiarias e ervas frescas ou secas, óleos essenciais, produtos vegetais purificados, como fenólicos, quinonas, alcalóides e peptídeos antimicrobianos, e extratos brutos de

plantas que tivessem viabilidade para serem utilizadas como conservantes minimizando esses efeitos indesejáveis (PREMANATH et al., 2022).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos obtidos de plantas, incluindo suas flores, sementes, folhas, frutos e raízes (ABBASZADEH et al., 2014). Os compostos fenólicos presentes nesses óleos são provavelmente os responsáveis pelo efeito bioconservante. Entre esses componentes bioativos estão o timol, carvacrol e eugenol, que são extraídos principalmente do orégano e tomilho (FONSECA et al., 2021).

Nesse sentido, pesquisadores analisaram as substâncias voláteis de óleo essencial puro (100%) de tomilho, manjeriço, cravo e alecrim, para utilização como potencial atividade antifúngica contra *Penicillium* spp. em produtos de panificação, a pesquisa indicou os óleos obtidos do tomilho e do cravo-da-índia como os mais promissores para prolongar a vida útil de pães, ao serem vaporizados nas embalagens (CÍSAROVÁ; TANČINOVÁ; BRODOVÁ, 2015).

Também, Pinilla et al., (2019) encapsularam extrato de alho através de lipossomas de fosfatidilcolina e ácido oleico a fim de verificar sua possível ação como agente antifúngico em pão de trigo. Análises do potencial antifúngico *in vitro* mostraram atividades inibitórias para o extrato de alho livre e encapsulado contra cepas fúngicas selecionadas.

Da mesma forma, filmes e revestimentos comestíveis estão sendo pesquisados como forma de conservação alternativa. Eles são produzidos usando derivados naturais, como polissacarídeos, proteínas e lipídios, ou uma mistura desses materiais. Além disso, também são capazes de incorporar microrganismos vivos. Nesse sentido, bactérias ou leveduras, podem ser incorporados em filmes comestíveis com a finalidade de estender a vida útil dos alimentos e oferecer benefícios adicionais como o efeito probiótico (GUIMARÃES et al., 2018). Os compostos mais frequentemente adicionados aos revestimentos como antimicrobianos incluem ácidos orgânicos, quitosana ou extratos de plantas (GREGIRCHAK; STABNIKOVA; STABNIKOV, 2020).

Balaguer et al., (2013) obtiveram resultado positivo utilizando filmes de gliadina incorporando cinamaldeído contra o crescimento de fungos *in vitro* e em sistemas alimentares reais. A capacidade destes filmes para estender a vida útil de pães e queijos demonstrou o potencial dessas novas biomatrizes como alternativa aos métodos sintéticos de conservação aplicados diretamente sobre os alimentos.

A aplicação de bioconservantes derivados de frutas e vegetais foi estudada como forma de reutilização dos resíduos do processamento vegetal para a produção de compostos com propriedades conservantes. Bartkiene et al., (2018) utilizaram compostos à base de cranberry em combinação com fermentação por BAL e indicaram sua utilização como promissora para atividade antifúngica e redução de acrilamida na produção de pães. Bartkiene et al., (2019) aplicaram subprodutos do processamento de maçã com células bacterianas antifúngicas imobilizadas na superfície do pão e destacaram como uma nova e promissora alternativa sustentável para biopreservação.

A utilização de compostos antifúngicos naturais produzidos por BAL pode ser uma alternativa para a composição de um bioconservante para a indústria de alimentos. Um exemplo dessa possível aplicabilidade foi a união de extrato de lúpulo (estudado como possível conservante de alimentos) com a fermentação sourdough para a produção de um biopreservante com propriedades antioxidantes adicionais (IRAKLI et al., 2019).

### **3.3.2 Biopreservação de Alimentos**

A biopreservação é definida como a extensão da vida de prateleira e aumento da segurança dos alimentos pelo uso de microbiota natural ou controlada e/ou compostos antimicrobianos. Trata-se de uma tendência crescente nos últimos anos. Além disso, esse conceito também pode ser aplicado a ingredientes vegetais ativos ou extratos de plantas (TAKWA et al., 2018).

Na biopreservação de alimentos, bactérias e fungos, incluindo seus metabólitos, são alternativas naturais de grande interesse para utilização como ferramentas de combate à deterioração fúngica. Ultimamente, várias cepas de espécies microbianas que possuem atividade antifúngica foram identificadas a partir do seu isolamento de várias fontes, como frutas, vegetais, cereais, leite, carne e outros produtos alimentícios (AXEL; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Para a bioproteção de frutas, os microrganismos mais pesquisados são as bactérias, principalmente do grupo *Bacillus*, e várias espécies de leveduras. Para carnes fermentadas, testes contra contaminação fúngica foram realizados com

leveduras (*Debaryomyces. hansenii*) e espécies de *Penicillium* spp. (LAY et al., 2016).

Nos produtos de panificação, culturas bioprotetoras podem ser uma alternativa para reduzir os níveis ou eliminar totalmente o uso de conservantes (OUIDDIR et al., 2019). As BAL são de longe os principais microrganismos testados para essa finalidade. Esses microrganismos também foram empregados na produção de cerveja (maltagem) e na produção de vegetais fermentados, bem como para proteção de grãos, sementes e frutas (SETTANNI; CORSETTI, 2008).

As BAL englobam um grande e heterogêneo grupo de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, não móveis, aerotolerantes, com forma de bastonetes e cocos, que produzem ácido lático como o principal produto metabólico final da fermentação de carboidratos (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2013). Pertencem à ordem Lactobacillales, que inclui 6 famílias, 36 gêneros e mais de 200 espécies. São encontradas no ambiente, nas plantas, na microbiota humana e animal. Elas são muito utilizadas na fabricação de alimentos fermentados e contribuem para melhorar a vida útil, as propriedades organolépticas e o valor nutricional de muitos produtos alimentícios. As principais BAL em alimentos fermentados correspondem a espécies dos gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* e *Vagococcus* (SALAS et al., 2017).

Atualmente, a biopreservação por BAL é a principal alternativa aos conservantes em alimentos. Elas estão naturalmente presentes em alimentos fermentados e são utilizadas como cultura iniciadora (*starter*) na indústria de alimentos, sendo a maioria delas reconhecida como seguras (LAY et al., 2016). Na União Europeia, elas estão na lista QPS (possuem presunção qualificada de segurança) e nos EUA são designadas GRAS (geralmente reconhecidas como seguras). Por isso, as BAL vem sendo amplamente estudadas (COTON et al., 2018).

Por outro lado, outros microrganismos antifúngicos também foram estudados, entre eles, as propionibactérias lácteas, os bacilos e as leveduras (SALAS et al., 2017). A capacidade antifúngica das propionibactérias lácteas foi apontada em pesquisa de triagem *in vitro* em 197 cepas, onde 13 cepas possuíam alta atividade antifúngica. Adicionalmente, outro estudo revelou que quase todas as cepas dessas bactérias são ativas contra cinco espécies de fungos *in vitro* (*Eurotium repens*; *P.*

*corylophilum; Aspergillus niger; Wallemia sebi; Cladosporium sphaerospermum*) (LAY et al., 2016).

De outra forma, os bacilos são bactérias Gram-positivas encontrados em diversos ambientes e são conhecidos por produzir uma variedade de metabólitos secundários, incluindo compostos antimicrobianos (FALARDEAU et al., 2013).

Já a atividade antifúngica das leveduras se deve à sua capacidade de competir por nutrientes, acidificar o meio, resistir a condições estressantes (etanol), mas também produzir moléculas antimicrobianas denominadas 'micocinas' (proteínas assassinas) que afetam o crescimento fúngico (MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

Para a utilização dessas culturas bioprotetoras com segurança na produção de alimentos é necessário seguir um rigoroso procedimento de avaliação de segurança, levando em consideração múltiplos critérios. Com relação às BAL e propionibactérias, que são comumente consideradas para aplicações industriais, e levando em consideração o status “GRAS” e “QPS”, os critérios de segurança que precisam ser incluídos durante a avaliação podem ser reduzidos ao conhecimento atual, à destinação do seu uso, à taxonomia bem definida, a perfis de resistência a antibióticos e ao potencial de formação de compostos indesejáveis, incluindo aminas biogênicas, alérgenos ou toxinas (COTON et al., 2018).

No caso de aplicação de *Bacillus* ou cepas de fungos (leveduras ou bolores), a análise de segurança também deve incluir investigação se a cepa produz outros compostos indesejáveis (como toxinas por bactérias ou micotoxinas por fungos). Caso seja identificada a possível produção, o uso em aplicações industriais deve ser descartado (SALAS et al., 2017).

A biopreservação na panificação está intimamente ligada à ação das BAL, através da fermentação natural. Pelo fato desses microrganismos já comporem o ecossistema espontâneo do fermento *sourdough*, a sua adaptabilidade à matriz alimentar já fica garantida, o que torna a fermentação *sourdough* uma importante ferramenta para a biopreservação em pães.

### 3.4 FERMENTAÇÃO NATURAL (*SOURDOUGH*)



### 3.4.1 Histórico e definição

O pão é um alimento essencial nas populações mediterrânicas (dieta mediterrânea) e pode ser considerado a projeção moderna da “dieta monástica” beneditina. A UNESCO incluiu o pão na lista do patrimônio imaterial da humanidade. Ao pensar no pão, nosso cérebro ativa diversas imagens, que não se resumem apenas a alimentos, mas também a divindades e eventos espirituais.

A história nunca relatou contraindicação ao consumo de pães. O acesso ao pão é universal, independentemente do contexto social, cultural ou religioso. O pão é o principal alimento dos monges, até mesmo nas regras beneditinas de dieta, baseadas em rigorosas normas espirituais para mortificação dos sentidos. Um exemplo disso é que nas punições por faltas mais ou menos graves, a limitação a “pão e água” determina a alimentação mínima indispensável (ARCHETTI, 2014).

A religião católica eleva o pão como alimento da vida eterna e símbolo da salvação. Esse significado eucarístico é de uma representatividade sem precedentes até hoje na história. Segundo o Evangelho de Lucas, durante a Última Ceia, Jesus tomou um pão, deu graças, partiu-o e deu-o aos apóstolos dizendo “isto é o meu corpo, que é dado por vós; fazei isto em memória de mim” (Lc 22,19).

Apesar do reconhecimento histórico e do papel central dos produtos de panificação nos hábitos alimentares da população mundial, a fermentação natural na panificação atraiu a atenção científica apenas há cerca de 30 anos. Esse atraso temporal deveu-se principalmente ao uso quase único de leveduras na panificação até o final do século XX. Desde aproximadamente 1990, iniciaram-se pesquisas com o objetivo de redescobrir o potencial da fermentação natural, também chamada de fermentação *sourdough* (ARORA et al., 2021).

Os pães de fermentação natural são também conhecidos pela denominação “Pães *Sourdough*”. O termo *Sourdough* traduz-se, de fato, em massa ácida, que consiste em uma combinação de farinha e água, fermentados por BAL e leveduras, resultando em um produto final de sabor azedo (DE VUYST; VAN KERREBROECK; LEROY, 2017). Essa massa ácida é utilizada para fermentar a massa do pão, de forma natural e por isso a denominação, pão de fermentação natural. Quatro tipos de processos de fermentação natural se diferenciam com base no inóculo aplicado e no processo tecnológico utilizado sobre a mistura de água e farinha (CALVERT et al., 2021).

Um primeiro tipo de *sourdough* (tipo I), denominado *sourdough* tradicional, refere-se ao processo iniciado espontaneamente, com alimentações (*backsloppings*) posteriores, isso é, o fermento obtido a partir da fermentação anterior, denominada massa mãe, é repetidamente misturado, em proporção entre 5% e 20% (m /v), com farinha e água. O processo é realizado em temperatura ambiente e por um período curto a moderado (de 6 a 24 h) (DE VUYST et al., 2014). Normalmente são mantidos em temperatura ambiente (20°C– 30 °C), embora possam ser refrigerados quando não estão em uso ou em intervalos regulares (GOBBETTI et al., 2016).

Na fermentação espontânea, as bactérias estão presentes inicialmente na farinha, água ou recipiente e são adicionadas continuamente ao longo da manutenção do fermento. À medida que o fermento amadurece, a diversidade de gêneros bacterianos na comunidade diminui. Um fator que leva a essa diminuição é a produção de ácidos orgânicos pelas BAL, que desfavorecem gêneros não tolerantes a ácidos, mas permitem a sobrevivência e desenvolvimento de cepas e espécies de gêneros que são tolerantes a ácidos (MINERVINI et al., 2014).

O *sourdough* tipo I é comumente usado pela panificação artesanal e geralmente começa com um pH quase neutro, que diminui continuamente até a maturação. Quando maduro, é altamente ácido em função dos ácidos orgânicos produzidos por BAL e bactérias do ácido acético (AAB) (GOBBETTI et al., 2016).

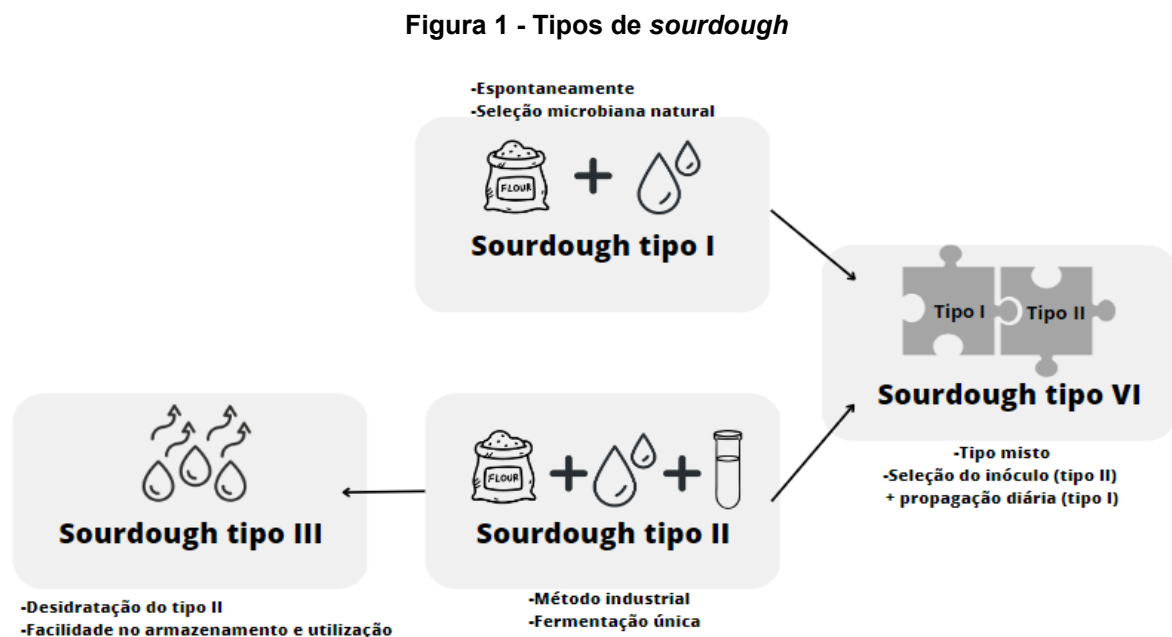
Quando o fermento é o resultado de uma cultura iniciadora ou “*starter*” adicionada à uma mistura de água e farinha, o processo é categorizado como tipo II. Essa fermentação direta não necessita de alimentações e é mais utilizada pela indústria (GAGGIANO et al., 2007). Para a produção deste tipo de fermento, cepas de cultura inicial de BAL são usadas, como por exemplo: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* ou *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. Acompanhadas ou não da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é normalmente adicionada na fase final do processo de fermentação (MORONI et al., 2010).

Em comparação com os starters tipo I, os starters tipo II geralmente são fermentados em temperaturas mais altas (de 30 °C a 50 °C) para um desenvolvimento mais rápido (até 5 dias) e sem alimentação, favorecendo a produção de ácido orgânico bacteriano e, finalmente, resultando em um sistema de pH mais baixo (DE VUYST; NEYSENS, 2005; DE VUYST; VAN KERREBROECK; LEROY, 2017).

Já a fermentação tipo III consiste na desidratação da forma estabilizada do fermento tipo II, ou seja, é a versão seca dos starters de fermento tipo II. Os starters do tipo III são práticos para utilização na escala industrial, pois podem ser armazenados e transportados mais facilmente (CALVERT et al., 2021; SIEPMANN et al., 2019; SIRAGUSA et al., 2009). No entanto, caso soluções bioprotetoras não forem utilizadas, o seu uso em pães deve ser acompanhado da adição de levedura ativa para fermentação do pão, visto que, os microrganismos inicialmente presentes são inativados pelo processo de desidratação.

Os starters tipo IV ou mistos são inoculados (tipo II) e mantidos de acordo com os métodos tradicionais (tipo I). Também podem ser adicionados outros ingredientes como frutas e mel, forçando a competição entre microrganismos inoculados e aqueles naturalmente presentes no ambiente (SIEPMANN et al., 2019).

De forma resumida, no *sourdough* tipo I, a fermentação ocorre espontaneamente através das leveduras e BAL presentes na farinha e meio ambiente, diferentemente do tipo II, onde a fermentação ocorre após a inoculação de uma cultura starter. Já o tipo III é somente o tipo II desidratado e o tipo IV é uma mistura do *sourdough* tipo I e tipo II, produzido em laboratório (SIEPMANN et al., 2018). A Figura 1 apresenta um esquema resumo sobre os tipos de fermento *sourdough*.



Fonte: elaborada pela autora (2023).

### 3.4.2 Composição microbiológica

Do ponto de vista microbiológico, o fermento *sourdough* é considerado um estressante ecossistema, abrigando leveduras e bactérias lácticas. A formação do microbioma do *sourdough* pode ser influenciada por vários fatores como as características dos cereais utilizados (composição, textura, tipo), parâmetros tecnológicos do processo (temperatura, quantidade de água, pH, tipo de inóculo) e interação entre os microrganismos presentes (GOBBETTI, 1998).

Essas interações no fermento podem ser sinérgicas ou antagônicas dependendo das interações no metabolismo de hidrocarbonetos e fontes de nitrogênio, bem como produção de compostos que estimulam ou inibem o crescimento de outras espécies (DE VUYST; NEYSENS, 2005).

A maioria das comunidades microbianas maduras tende a ser dominada por 1 a 3 espécies bacterianas, embora existam mais de 60 espécies comuns de BAL discutidas em toda a literatura, são exemplos: *F. sanfranciscensis*, *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *W. cibaria* e *W. confusa* (DE VUYST et al., 2014; DE VUYST; VAN KERREBROECK; LEROY, 2017). Assim, o crescimento de BAL com leveduras no *sourdough* ocorre principalmente devido à excreção de aminoácidos específicos e pequenos peptídeos pelas leveduras durante o crescimento ou como consequência de uma autólise acelerada (GOBBETTI, 1998; GOBBETTI; CORSETTI, 1997). As densidades celulares medianas encontradas após a fermentação *sourdough* são de 8,5 log para BAL e 6,5 log para leveduras, independentemente do protocolo utilizado, resultando em uma proporção estimada de 10:1, em vários *sourdoughs*. Normalmente, essas duas proporções traduzem o desempenho ideal do *sourdough*, desde que as densidades celulares não estejam abaixo de log 8,0 log para BAL e 6,0 log para leveduras (GOBBETTI; GÄNZLE, 2013).

Uma revisão sistemática, contemplando 30 anos de pesquisas sobre *sourdough*, identificou 59 gêneros bacterianos: 10 pertencentes a BAL e 49, a outras bactérias. A maioria dessas outras bactérias comporta-se como populações subdominantes. O gênero *Lactobacillus* é o mais abundante na massa fermentada, com 82 espécies detectadas. Sendo 16 espécies identificadas como as mais

comuns, por serem identificadas em mais de 15 *sourdoughs* em todo o mundo (ARORA et al., 2021).

Também, essa revisão sistemática referiu que já foram identificadas 80 espécies de leveduras em *sourdoughs* em todo o mundo. Elas pertencem principalmente aos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Kazachstania*, *Torulopsis*, *Yarrowia* e *Pichia*. A espécie geralmente identificada é *S. cerevisiae*. Uma possível explicação para esse fato seria a contaminação ambiental cruzada pelo uso abundante de *S. cerevisiae* na panificação tradicional (ARORA et al., 2021).

Uma meta-análise analisou 527 *sourdoughs* na literatura e revelou que cada espécie de BAL aparece em frequências variáveis. *F. sanfranciscensis* foi a espécie mais prevalente, presente em 47% dos *sourdoughs*, seguida *L. plantarum* (43%), *L. brevis* (17%) *Pediococcus pentosaceus* (14%), *Companilactobacillus paralimentarius* (13%) e *L. fermentum* (12%) (VAN KERREBROECK; MAES; DE VUYST, 2017). Nessa mesma pesquisa, *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie de levedura mais comum. Estava presente em 68% dos 394 *sourdoughs* que relataram a diversidade de espécies de leveduras. A ocorrência desta espécie de levedura foi seguida por *Candida humilis* (20%), *Pichia kudriavzevii* (6%), *Torulaspora delbrueckii* (6%), *Wickerhamomyces anomalus* (6%) e *Candida glabrata* (4%).

Cabe ressaltar que a dinâmica microbiana variável de vários *sourdoughs* reflete a microbiota autóctone da farinha, que, por sua vez, depende da origem da farinha, práticas de cultivo e condições de armazenamento (KORCARI et al., 2020). Espécies competitivas de *Lactobacillus* já presentes na farinha de centeio (por exemplo, *F. sanfranciscensis* e *L. fermentum*) tornaram-se dominantes durante a fermentação (MEROETH; HAMMES; HERTEL, 2003). A grande diversidade microbiana que afeta as farinhas orgânicas de trigo, espelta e centeio moldou a composição subsequente da microbiota do fermento (STANZER et al., 2017).

*Fructilactobacillus sanfranciscensis* é a BAL mais dominante e ocorre frequentemente junto com *C. humilis* ou *Kazachstania exiguus*, leveduras *sourdough* que são mais tolerantes a ácidos do que *Saccharomyces cerevisiae*. A espécie *F. sanfranciscensis* domina os *sourdoughs* tipo I em todo o mundo. Esse fato é explicado pelo seu rápido crescimento (na temperatura ideal entre 28 °C e 32 °C e um pH de 5,0–6,0) e pelo seu metabolismo altamente adaptado à maltose e à sacarose, as fontes de carboidratos mais abundantes nas massas fermentadas de trigo e centeio (GOBBETTI; CORSETTI, 1997).

Segundo Gänzle, (2014), alimentações pouco frequentes e altos níveis de acidez selecionam lactobacilos tolerantes a ácidos e tipicamente termofílicos, onde *L. reuteri*, *L. pontis*, *L. amylovorus* e *L. fermentum* são frequentemente dominantes. Esses lactobacilos heterofermentativos metabolizam preferencialmente maltose e sacarose. Segundo o mesmo autor, ao contrário de *F. sanfranciscensis*, essas espécies geralmente convertem a arginina em ornitina e a glutamina em g-aminobutirato. Ambas as conversões contribuem para a tolerância ácida dessas espécies.

Algumas BAL se adaptam muito bem ao ambiente *sourdough*. Os fatores que podem estar envolvidos nesse grande potencial adaptativo incluem: metabolismo e/ou transporte de carboidratos específicos da massa fermentada, como maltose e frutose, sendo a maltose o carboidrato fermentável mais abundante e a frutose um importante aceptor alternativo de elétrons; atividade proteolítica e/ou via arginina deiminase; respostas específicas ao estresse e produção de compostos antimicrobianos (DE VUYST; VANCANNEYT, 2007). As BAL do fermento natural possuem como característica enorme flexibilidade e potencial em relação não apenas a substratos catabólicos e produtos anabólicos, mas também em relação às mudanças contínuas no ambiente circundante (GOBBETTI et al., 2005).

### 3.4.3 Processo fermentativo

Durante a fermentação, os carboidratos mais abundantes encontrados no meio são o amido e a sacarose. A maioria das BAL não é capaz de metabolizar oligo ou polissacarídeos e depende de amilases e invertases derivadas de cereais e leveduras, respectivamente, para liberar maltose (do amido) e frutose e glicose (da sacarose). Da mesma forma, as BAL geralmente não exibem atividade de protease extracelular e dependem de enzimas de cereais para fornecer peptídeos, que são captados por transportadores de oligopeptídeos ou dipeptídeos. Os dissacarídeos são divididos por hidrólises específicas e/ou fosfotransferases em monossacarídeos que então entram nas vias principais (GOBBETTI; CORSETTI; ROSSI, 1994).

As BAL podem ser agrupadas segundo o seu metabolismo energético: heterofermentativo (produção de mais de um subproduto durante a fermentação), ou

homofermentativo (produção de um subproduto durante a fermentação) (GÄNZLE, 2015).

As BAL homofermentativas (*Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp. e algumas espécies de *Lactobacillus* spp.) fermentam açúcares pela via Embden-MeyerhoffParnas em piruvato, que é convertido em ácido láctico pela lactato desidrogenase (LDH). Dois tipos de isômeros de lactato, L e D, podem ser produzidos por enzimas dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) estereoespecíficas, L-LDH e D-LDH. Sob certas condições de crescimento, como limitação de carbono, o metabolismo homolático pode ser deslocado para um metabolismo ácido misto, onde formato, acetato, etanol e/ou CO<sub>2</sub> além do lactato são produzidos. Além disso, não são capazes de metabolizar pentoses (MOZZI, 2015).

As BALs homofermentativas produzem principalmente ácido láctico através da glicólise (fermentação homolática), enquanto as BAL heterofermentativas produzem, além do ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido acético e/ou etanol, dependendo da presença de substratos adicionais atuando como aceptores de elétrons (fermentação heterolática) (NARVHUS; AXELSSON, 2003).

Assim, as BALs heterofermentativas fermentam açúcares geralmente pela via da fosfocetolase. A fermentação de pentoses como xilose e ribose são fosforiladas e convertidas em ribulose-5-fosfato ou xilulose-5-fosfato por epimerases ou isomerases e subsequentemente metabolizadas pela glicose-6-fosfato ou frutose-6-fosfato levando à formação de piruvato e acetil-P e sua subsequente conversão a lactato e acetato, respectivamente (GÄNZLE, 2014).

Já as hexoses (ou seja, glicose, frutose e manose) podem ser convertidas em lactato, CO<sub>2</sub> e etanol pela glicose-6-fosfato ou frutose-6-fosfato após isomerização e/ou fosforilação. O CO<sub>2</sub> é um produto da degradação do 6-P-gluconato, que ocorre durante a conversão de hexoses em pentoses. A enzima específica da via heterofermentativa é a D-xilulose-5P fosfocetolase, que catalisa a conversão da xilulose-5P em gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e acetil-P (MOZZI, 2015).

A via da fosfocetolase gera acetilfosfato como intermediário metabólico rico em energia, que é reduzido a etanol como produto final com oxidação concomitante de dois cofatores reduzidos, NADH, a NAD<sup>+</sup>. Se a frutose estiver presente, as bactérias ácido-láticas heterofermentativas geralmente reduzem a frutose a manitol com oxidação concomitante de NADH a NAD<sup>+</sup>. Isso permite a conversão de

acetil-fosfato em acetato, juntamente com a síntese de ATP a partir de ADP e um aumento adicional da eficiência metabólica (GOBBETTI et al., 2005).

O piruvato tem um papel fundamental nas vias de fermentação pois geralmente atua como um aceptor de elétrons para formar o ácido láctico e ajuda a manter o equilíbrio redox intracelular. No entanto, dependendo da espécie de BAL, o piruvato pode ser metabolizado por diferentes enzimas levando à síntese de diferentes metabólitos como diacetil/acetoína, formato e acetil-coA, que posteriormente podem produzir etanol ou ATP e acetato. Além disso, oxigênio e frutose podem ser usados como aceptores alternativos de elétrons em vez de piruvato (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Além dessas principais rotas de energia, as respostas fenotípicas a condições de nutrientes variáveis envolvem o uso de aceptores externos de elétrons e/ou o uso simultâneo de várias fontes de energia, muitas vezes associadas a sistemas de captação induzíveis e/ou interações com substâncias endógenas e enzimas exógenas (NARVHUS; AXELSSON, 2003).

Quando as bactérias são expostas a uma mistura de fontes de carbono, elas escolhem o substrato que oferece o máximo de aproveitamento para o crescimento ou o uso obrigatório de substratos não convencionais. As cofermentações são alternativas metabólicas que permitem que as BALs utilizem substratos não fermentáveis, aumentando assim sua adaptabilidade. Um co-metabolismo de citrato e maltose ou glicose foi observado em *F. sanfranciscensis* (DAMIANI et al., 1996).

Sendo assim, a competitividade dos lactobacilos heterofermentativos no sourdough é atribuída ao metabolismo eficiente da maltose e da sacarose. A utilização desses dissacarídeos não é reprimida pela glicose e é preferida ao metabolismo da glicose por muitas BAL, incluindo *F. sanfranciscensis* e *L. reuteri*. O metabolismo da maltose e da sacarose pela maltose fosforilase e sacarose fosforilase gera glicose-1-fosfato sem gasto de ATP e, portanto, aumenta o rendimento energético do metabolismo da hexose. A utilização efetiva da frutose como aceptor de elétrons para alcançar a regeneração do cofator é um segundo fator importante para a competitividade de lactobacilos heterofermentativos (GÄNZLE, 2014).

Nesse sentido, o uso de frutose como aceptor de elétrons é preferível ao uso de frutose como fonte de carbono por lactobacilos heterofermentativos. Praticamente todas as cepas de *F. sanfranciscensis* reduzem a frutose a manitol, mas muitas



cepas não usam a frutose como fonte de carbono. Em geral, a relevância prática para o uso de aceptores externos de elétrons é a mudança do quociente de fermentação (razão molar lactato/acetato), que afeta positivamente nas propriedades sensoriais da panificação, e vida útil do produto final (GOBBETTI, 1998).

Peptídeos e aminoácidos livres são indispensáveis para o metabolismo do nitrogênio das BAL (GOBBETTI; GÄNZLE, 2013). Durante a fermentação *sourdough* há um aumento da proteólise que é atribuída à atividade proteolítica das BAL e ativação de proteólise por enzimas de cereais sob as condições ácidas de *sourdough* fermentação (GOBBETTI; CORSETTI; ROSSI, 1994; THIELE; GÄNZLE; VOGEL, 2002). A proteólise durante a fermentação do *sourdough* ocorre em dois estágios: 1- proteólise primária, que libera oligopeptídeos, é realizada principalmente por proteinases endógenas de cereais que são ativadas em pH baixo; 2- proteólise secundária, que libera aminoácidos livres e pequenos peptídeos, e é realizada exclusivamente pela atividade da peptidase da BAL (GOBBETTI; GÄNZLE, 2013).

A glutamina é o aminoácido mais abundante da proteína do trigo e as BAL podem converter a glutamina em glutamato, o que melhora a adaptação da BAL à acidez do *sourdough* devido ao consumo de prótons e liberação de amônia, aumentando assim o pH ambiental. O catabolismo de aminoácidos por BAL tem implicações no que diz respeito às propriedades sensoriais dos produtos de panificação e tem também um papel importante para a obtenção de energia em condições limitadas de nutrientes (NARVHUS; AXELSSON, 2003).

A formação de exopolissacarídeos por BAL decorre da atividade da glucanossucrase ou frutanossucrase. Essas enzimas são extracelulares ou associadas à parede celular e convertem a sacarose em frutanos poliméricos (frutanossucrases) ou glucanos (glucanossucrases). A produção desses polímeros frutanos (inulina e levana) e glucanos (dextrana, reuterana ou mutana) melhora o volume, a textura e retarda o envelhecimento do pão. A conversão de sacarose por glucanossucrases e frutanossucrases, no entanto, também libera frutose e aumenta a formação de ácido acético por lactobacilos heterofermentativos (MENDE; ROHM; JAROS, 2021).

As BAL são as que mais contribuem para o processo de acidificação da massa, enquanto as leveduras são as principais responsáveis pela fermentação. No entanto, BAL heterofermentativas também são conhecidas por contribuir

parcialmente para o processo de fermentação (GOBBETTI; CORSETTI; ROSSI, 1995).

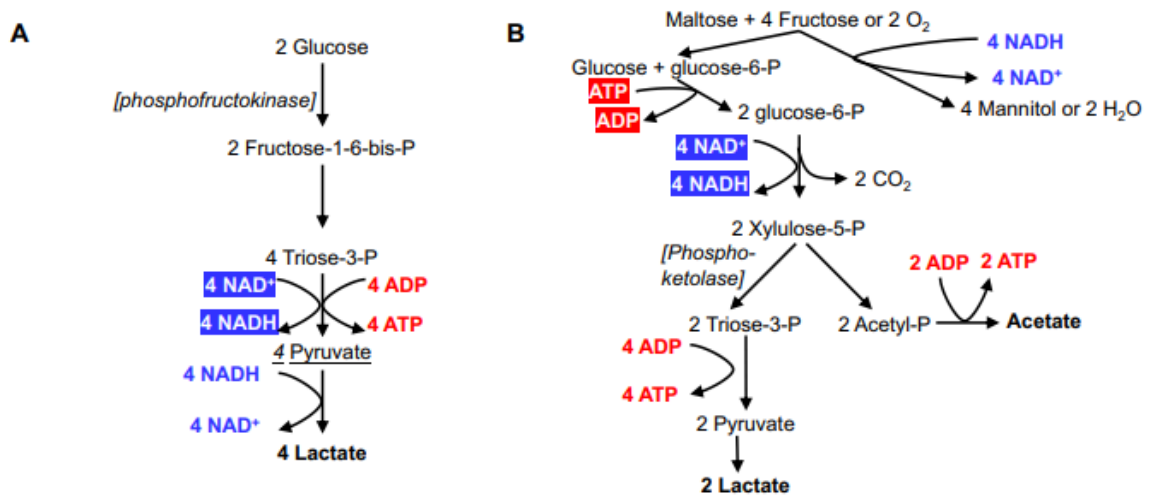
As leveduras realizam a produção de CO<sub>2</sub> na fermentação e trabalham de forma sinérgica e antagônica ao lado das BAL. Produzem ésteres, ácidos orgânicos e álcoois, que afetam tanto a atividade bacteriana quanto o sabor dos pães (CORSETTI, 2013; DE VUYST; VAN KERREBROECK; LEROY, 2017).

Para a produção de dióxido de carbono, as leveduras utilizam a glicose presente no meio como fonte de energia. A ação da alfa e beta amilase da farinha no amido danificado origina a maltose (o dano ao amido ocorre na estrutura durante a moagem). Esse dissacarídeo (maltose) é transportado para dentro da célula, onde é decomposto em duas moléculas de glicose. As alterações metabólicas a essa nova fonte de glicose do amido só são ativas quando a levedura detecta a presença de maltose no meio, e seu funcionamento leva algum tempo (fase lag). Quando o açúcar não é adicionado à massa, o fator limitante da produção de gás é a quantidade de maltose disponível (GÄNZLE, 2014).

A quantidade de amilase na farinha determina o grau de produção de glicose a partir do amido, dependente também da presença de amido danificado. Quase 95% dos monossacarídeos formados pela hidrólise do amido são convertidos pela rota 'Embden-Meyerhof-Parnas' ou glicólise antes da fermentação. Isso leva à formação de ácido pirúvico, que é descarboxilado em acetaldeído durante a fermentação com a liberação de dióxido de carbono. E o acetaldeído é posteriormente reduzido a etanol via álcool desidrogenase (PROST et al., 2012).

Um dos principais subprodutos da fermentação por BAL são os ácidos orgânicos. Eles afetam a rede de glúten, a elasticidade da massa e propriedades sensoriais que caracterizam e distinguem os produtos resultantes da fermentação *sourdough* daqueles obtidos por fermentação comercial (DE VUYST; NEYSENS, 2005; SIEPMANN et al., 2019). O crescimento de BAL leva à diminuição do pH com posterior hidrólise do amido e proteína, esses fatores favorecem o crescimento de leveduras. Por outro lado, as leveduras liberam aminoácidos (durante a autólise) que favorecem o crescimento da BAL. Esse sinergismo na microbiota resulta em vários benefícios (SIEPMANN et al., 2018). A Figura 3 apresenta o metabolismo de *lactobacilos homofermentativos* (A) e *lactobacilos heterofermentativos* (B) em *sourdough*.

**Figura 3 - metabolismo de *Lactobacilos* homofermentativos (A) e *Lactobacilos* heterofermentativos (B) em *sourdough*.**



Fonte: Gänzle et al., (2023).

### 3.5 FERMENTAÇÃO NATURAL COMO FERRAMENTA DE BIOPRESERVAÇÃO NA PANIFICAÇÃO

#### 3.5.1 Compostos antifúngicos produzidos via fermentação *sourdough*

Há séculos as BAL são exploradas como microrganismos bioconservantes e desempenham papel fundamental na fermentação de diversos alimentos envolvendo leite, carnes, vegetais e fermentos, na qual produzem uma rápida acidificação da matéria-prima (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2013). Diversos gêneros de BAL tem demonstrado atividade antimicrobiana nos alimentos e são estudados para aumentar a segurança dos alimentos e prolongar a vida útil: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (ANANOU et al., 2007).

O potencial antifúngico de determinadas espécies de BAL é oriundo da sua capacidade de produzir metabólitos específicos, entre eles: diferentes ácidos orgânicos, como ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico, que reduzem o pH; ácidos graxos hidroxilados de cadeia curta, ácido fenilático, dipeptídeos cíclicos, reuterina (GÄNZLE, 2015; GOBBETTI; GÄNZLE, 2013; OUIDDIR et al., 2019;

SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005). Além disso, essas substâncias possuem sinergia com bacteriocinas, lactocinas e nisinas (GARCIA; BERNARDI; COPETTI, 2019).

Os ácidos orgânicos (como ácido lático, acético e propiônico) são os produtos finais da fermentação a partir do metabolismo de carboidratos pelas LAB. A produção desses ácidos orgânicos fracos resulta em um ambiente ácido que geralmente restringe o crescimento de bactérias e fungos. Os efeitos antimicrobianos desses ácidos são atribuídos à redução do pH a um nível abaixo da faixa de crescimento e inibição metabólica por moléculas de ácidos orgânicos não dissociados (BATISH et al., 1997).

Nesse sentido, o ácido propiônico exerce atividades antifúngicas e apresenta um valor de pKa de 4,87, que é mais alto do que o ácido acético (pKa 4,76) (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005). O ácido fenil-lático (AF) é um metabólito antifúngico que está envolvido no metabolismo da fenilalanina (LAVERMICOCCA; VALERIO; VISCONTI, 2003). O AF tem sido amplamente relatado como um composto antimicrobiano, que possui amplo espectro antibacteriano e ação antifúngica, e talvez, seja um dos ácidos orgânicos antifúngicos de BAL mais extensivamente estudados (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2013). O papel dos AFs insaturados e hidroxilados na atividade de inibição do crescimento fúngico está diretamente ligada à sua interação com a membrana fúngica e ao aumento de sua permeabilidade.

Através da capacidade dos AFs de penetrar na camada lipídica da membrana dos fungos, esses metabólitos aumentam a fluidez da membrana. Conseqüentemente, como resultado, há alterações nas estruturas das proteínas de membrana, extravasamento de componentes intracelulares e rompimento do citoplasma que levam à degradação celular. Além disso, a posição e configuração das duplas ligações, grupos hidroxila e estrutura dos AFs e ácidos graxos são fator essencial para possuírem grande atividade inibitória. Estudos observaram que AF hidroxila insaturados e saturados não tem atividade antifúngica em comparação com os AF monohidroxilados insaturados (BLACK et al., 2013; DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010).

Os ácidos carboxílicos também estão sendo estudados pelo seu potencial como agentes antifúngicos derivados de BAL. Nove ácidos carboxílicos, incluindo três derivados do ácido cinâmico, ácido D-glucurônico e ácido salicílico foram

isolados como compostos antifúngicos de *L. amylovorus* DSM 19280 (RYAN et al., 2011). Os ácidos benzoico, vanílico, azeálico, hidrocínâmico e ácidos hidroxibenzoicos, em conjunto com outros ácidos carboxílicos, foram isolados de *Weissella cibaria* PS2 e três espécies de *Lactobacillus* spp. por Brosnan et al., (2012). Assim como, hidrocínâmico, azeálico, vanílico *p*-courâmico e ácido 4-hidroxibenzoico, foram produzidos por *L. reuteri* (GUO et al., 2012).

Já os dipeptídeos cíclicos estão envolvidos no mecanismo de “*quorum sensing*” das BAL, regulando alterações do comportamento em resposta a mudanças na densidade celular e composição de espécies da comunidade. Seu mecanismo de ação é de forma sinérgica com outros metabólitos antifúngicos e ocorre em concentrações elevadas em comparação com derivados de AFs. Igualmente, o álcool feniletílico age no “*quorum sensing*” em *S. cerevisiae*, e podem produzir micocinas (toxinas assassinas) que também estão envolvidas no efeito inibitório do *sourdough* (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012; STRÖM et al., 2002).

Os ácidos graxos possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas. O comprimento de cadeia do ácido graxo parece desempenhar um papel importante na ação antimicrobiana, sendo comprimentos de cadeia mais longos considerados ótimos para inibição. Apesar de estudos anteriores mostrarem que o ácido láurico (C12) e ácido cáprico (C10) eram os ácidos graxos mais potentes contra *C. albicans* (BERGSSON et al., 2001). Outros ácidos graxos de cadeia curta com atividade antifúngica também foram descritos. Foi descrita a capacidade das BALs em produzir ácidos graxos hidroxila a partir do ácido linoléico. Black et al., (2013) descreveram a conversão de ácido linoléico em ácido graxo mono-hidroxi octadecanóico por *L. hammesii* DSM 16381, que apresentou características antifúngicas contra *A. niger*.

Os ácidos graxos antifúngicos podem particionar as bicamadas lipídicas das membranas fúngicas, resultando na perda da integridade da membrana. Ainda, o aumento da fluidez causa permeabilidade da membrana, que resulta na liberação exacerbada de eletrólitos e proteínas intracelulares e, por sua vez, leva à desintegração citoplasmática das células fúngicas (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2013).

Outros compostos antimicrobianos também estão envolvidos na atividade inibitória do metaboloma microbiano, como a composição de antioxidantes fenólicos. Os compostos fenólicos livres podem ser liberados por meio de reações químicas ou

enzimáticas no substrato de cereais e posteriormente podem ser metabolizadas por BAL. Esse metabolismo pode ser amplificado através da ação de enzimas microbianas específicas da cepa (BLACK et al., 2013).

Entre os mecanismos de ação celular desses antioxidantes fenólicos estão: alterações na estrutura e função do DNA, mudanças no equilíbrio osmótico, indução do estresse apoptótico oxidativo, inibição da síntese de ergosterol, abertura de poros na membrana fúngica e redução da biomassa micelial (GÄNZLE; ZHENG, 2019).

Cepas de quase todos os gêneros de BAL demonstraram produzir substâncias proteicas antimicrobianas diferentes, chamadas bacteriocinas. A maioria desses compostos pode se inserir na membrana celular de microrganismos, levando assim à inibição do crescimento pela formação de poros (NARVHUS; AXELSSON, 2003).

A reuterina ( $\gamma$ -hidroxipropionaldeído), produzida por *L. reuteri*, possui atividade antimicrobiana contra diversos grupos de microrganismos, incluindo fungos. Seu efeito foi demonstrado na inibição do crescimento de *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Fusarium* (Bianchini, 2015). Além disso, este composto de baixo peso molecular exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Salmonella typhimurium* e *E. coli* K12, ao mesmo tempo que inibiu o crescimento de uma variedade de bolores e leveduras, incluindo *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* (GÄNZLE, 2015).

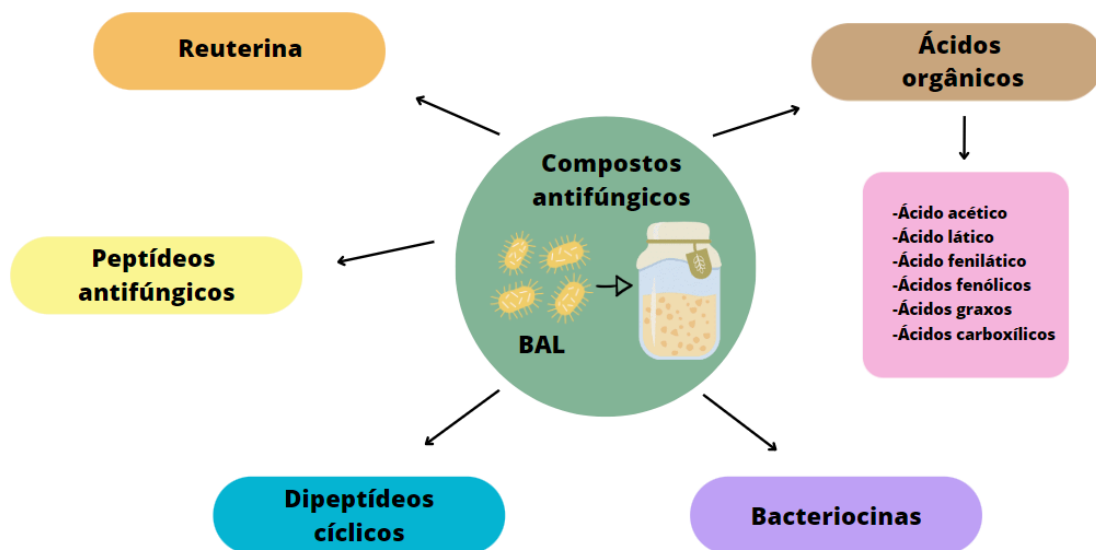
Estudos sobre compostos proteicos antibacterianos, por exemplo, bacteriocinas, são extensos em comparação com peptídeos com propriedades antifúngicas (RIZZELLO et al., 2011). Cinco peptídeos antifúngicos foram identificados em extratos solúveis em água de sourdough fermentado com *Lb. brevis* AM7. A atividade foi observada para *P. roqueforti* DPPMAF1 (CODA et al., 2008). Outro estudo avaliou os extratos solúveis em água/sal a partir de um fermento produzido com *L. plantarum* 1A7 e revelou a ação de nove novos peptídeos antifúngicos (CODA et al., 2011).

Os peptídeos antifúngicos são metabólitos das BAL que possuem efeitos inibitórios no crescimento micelial, alterações na morfologia de esporos, interferência com vias metabólicas e principalmente destruição das membranas celulares e posteriormente ação nas proteínas intracelulares, organelas e núcleos (LI et al., 2021; SHEHATA et al., 2019).

Rizzello et al., (2011) estudaram a atividade antifúngica de *L. plantarum* contra *P. roqueforti* na fermentação *sourdough*. Após a fermentação, o extrato solúvel em água/sal obtido perdeu sua atividade inibitória contra *P. roqueforti* após o tratamento com tripsina. E assim, nove novos peptídeos antifúngicos foram identificados. Outros estudos também indicaram que na síntese de compostos inibitórios pelas BAL também são liberados peptídeos antimicrobianos por meio de proteólise (CODA et al., 2008, 2011).

No entanto, são necessários mais estudos para identificar e quantificar de forma mais completa os metabólitos antifúngicos produzidos pelas BAL. E atualmente, através da metabolômica é possível compreender os mecanismos biológicos através da investigação de seus metabólitos. A Figura 4 representa os compostos antifúngicos produzidos por bactérias ácido lácticas.

Figura 4 - Compostos antifúngicos produzidos por bactérias ácido lácticas



Fonte: Adaptado de Liu et al., (2022).

### 3.5.2 Fatores que afetam a produção de compostos antifúngicos via fermentação *sourdough*

Diversos estudos relataram a inibição de crescimento fúngico por BAL (ARORA et al., 2021; AXEL et al., 2016a; BATISH et al., 1997; CÍSAROVÁ; TANČINOVÁ; BRODOVÁ, 2015; DAL BELLO et al., 2007; OUIDDIR et al., 2019;

QUATTRINI et al., 2019). No entanto, enquanto a maioria descreve a atividade inibitória das BAL, poucos relatam a caracterização de compostos ou seus mecanismos de ação (BIANCHINI, 2015).

Diversos fatores foram identificados por interferirem na capacidade das BAL em aceitar elétrons e atuar na produção de vários ácidos orgânicos antifúngicos durante a fermentação como: taxa de crescimento bacteriano; atividade enzimática; disponibilidade de frutose; teor de proteína e, especialmente, a disponibilidade de aminoácidos (GOBBETTI; CORSETTI; ROSSI, 1995).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para aumentar o potencial da atividade antifúngica do fermento *sourdough* em termos de eficiência ou espectro de ação. Algumas dessas abordagens incluem a adição de moléculas potencializadoras como precursoras para desencadear vias biossintéticas e a indução de condições de estresse às culturas ou associação de culturas microbianas com outras moléculas ativas (SALAS et al., 2017).

Porém, a produção dos compostos antifúngicos depende, principalmente, do período de fermentação, pH e temperatura (CORSETTI et al., 1998). Em estudo de (MUHIALDIN; HASSAN; SAARI, 2018) foi identificada a otimização dessa produção após o período de 24 h para *Leuconostoc mesenteroides DU15* e 48 h para três cepas de *L. plantarum*. Eles destacaram a importância de determinar as condições ideais de crescimento de cada BAL para maximizar a produção de compostos inibitórios.

### 3.5.2.1. Temperatura e período de incubação

A escolha da temperatura e do tempo de fermentação podem modular a produção de compostos antifúngicos e assim potencializar a ação conservante do *sourdough*. Essas condições variam dependendo das espécies de BAL selecionadas. Normalmente a produção de compostos antifúngicos é máxima no final da fase logarítmica de crescimento. No início da fase estacionária, a produção de compostos antifúngicos diminui em decorrência da metabolização bacteriana ou da degradação enzimática desses compostos bioativos (BATISH et al., 1997).

Roy et al., (1996) indicaram que a temperatura e o período de incubação são os dois fatores críticos no que diz respeito à produção de antimicrobianos por BAL. A



quantidade máxima de substâncias antifúngicas produzidas por *L. lactis* contra *A. fumigatus* foram produzidas a 30 °C após 48 a 72 h, dentre diferentes períodos de incubação testados. Uma tendência semelhante foi registrada por Batish et al., (1990) através da fermentação de *L. acidophilus*, na qual a produção máxima de ácido fenilático (AF) ocorreu a 30 °C após 48 h de incubação. E a 25 °C a produção máxima de AF foi obtida somente após 72 horas. Também, a redução de AF após incubação prolongada foi observada na pesquisa, sugerindo a conversão de AF para outros metabólitos ou a degradação enzimática.

Black et al., (2013) indicaram que o período de fermentação interfere na quantidade de ácidos orgânicos antifúngicos produzidos. Em sua pesquisa foi produzido *sourdough* com *L. hammesii* e *F. sanfranciscensis* fermentando por até 8 dias. As amostras foram coletadas a cada 12 horas para análise de ácidos graxos antifúngicos e as áreas de pico para o ácido graxo hidróxi C18:1 foram atingidas em 2 dias de fermentação. Foi concluído que os níveis dos compostos analisados se mantiveram constantes durante os dias subsequentes. Assim, os pães foram fermentados por 2 dias para atingir o tempo necessário para produção máxima dos compostos antifúngicos.

A temperatura de fermentação influencia o quociente de fermentação, que é a proporção de ácido láctico para ácido acético. Temperaturas mais altas causam maior produção de ácido láctico, aumentando assim a acidificação dos *sourdoughs* (CORSETTI, 2013). No entanto, nem sempre as temperaturas mais altas ocasionam um pH mais baixo, em comparação com *sourdoughs* fermentados em temperaturas mais baixas. Contudo, em geral, levam a uma maior acidez total titulável (TTA) (VOGELMANN; HERTEL, 2011). e, por outro lado, podem ser prejudiciais para o metabolismo das leveduras devido ao aumento da acidez (DE VUYST; VAN KERREBROECK; LEROY, 2017).

Baixas temperaturas de fermentação retardam a acidificação pelas BAL e favorecem o crescimento de leveduras, produção de etanol, dióxido de carbono (e, portanto, fermentação) e formação de sabor (HÄGGMAN; SALOVAARA, 2008a, 2008b).

Em baixas temperaturas, as leveduras crescem bem em associação com BAL, pois além de realizar a fermentação de glicose, também hidrolisam glucofrutanos. Como resultado, a frutose é metabolizada como um aceptor externo de elétrons alternativo (por BAL heterofermentativas) gerando manitol, que por sua

vez aumentam a formação de ácidos e o sabor típico de *sourdoughs* tipo I (GOBBETTI et al., 2005; GOBBETTI; GÄNZLE, 2013).

Nos *sourdoughs* tipo II, em geral, a rápida acidificação pelas BAL dificulta o crescimento das leveduras naturalmente presentes. Assim, os glucofrutanos não são utilizados pelas leveduras e não há frutose para produção de acetato pelas BAL, dificultando a fermentação (CORSETTI, 2013).

### 3.5.2.2. Rendimento de massa e pH

A produção e atividade dos metabólitos antifúngicos produzidos pelas BAL podem variar em diferentes níveis de pH. Batish et al., (1997) observaram em seu estudo que é evidente um aumento ou uma diminuição no crescimento das BAL devido a variações de pH que resultaram em aumento ou diminuição na produção de AF pelas culturas.

No pH citoplasmático, o ácido láctico se dissocia, determinando a fase estacionária do crescimento, mesmo que ainda haja nutrientes disponíveis. Situação semelhante também ocorre com o ácido acético.

Vários mecanismos regulam a homeostase do pH intracelular e a ATPase translocadora de prótons é a mais importante para as bactérias fermentativas. A sobrevivência sob condições ácidas é positivamente afetada por uma adaptação ao baixo pH, um mecanismo conhecido como resposta de tolerância ácida (GÄNZLE, 2014).

A produção de bacteriocinas antifúngicas por cepas de *Lactobacillus* têm atividades ótimas em pH 3,0– 4,0, contudo foi identificada a inibição fúngica em pães com valores finais de pH acima de 4,8 (MENTEŞ; ERCAN; AKÇELIK, 2007).

As proteases nas farinhas de trigo e centeio também são afetadas pelo pH, visto apresentarem atividade otimizada na faixa de pH de 3,5 a 4,5. A proteólise, seguida pelo metabolismo de peptídeos por BAL (que os utilizam para atender sua demanda de nitrogênio), é uma das principais rotas de formação de metabólitos antifúngicos (GÄNZLE; VERMEULEN; VOGEL, 2007). Assim, a fermentação *sourdough* permite alta atividade de protease e a concentração de aminoácidos aumenta de 5 a 10 vezes durante a fermentação. Os aminoácidos são importantes precursores para a formação do sabor pelo metabolismo láctico e da levedura

(GÄNZLE, 2014). Thiele et al., (2002) demonstram que a quebra proteolítica foi aumentada em pH baixo.

O rendimento de massa (RM) reflete a proporção entre farinha e água no *sourdough* e, portanto, trata da consistência do *sourdough*. Afeta diretamente a atividade de água e pH dos fermentos, pois quanto menor o rendimento, maior a quantidade de farinha fornecendo à microbiota mais carboidratos fermentáveis e também maior capacidade de tamponamento (maior teor de cinzas), como consequência afeta a atividade de enzimas endógenas da farinha, diminuindo a taxa de acidificação, levando a um pH mais alto (DE VUYST; VAN KERREBROECK; LEROY, 2017).

Além disso, a proporção de BAL para levedura é influenciada pelo RM. Em valores altos de RM há aumento no crescimento de BAL sobre o de leveduras (MINERVINI et al., 2014), embora baixas proporções de BAL para levedura sejam encontradas em fermentos com baixo RM, em comparação com os de alto RM (DI CAGNO et al., 2014).

O RM também tem um impacto na dinâmica e/ou diversidade de espécies, pois altera os valores de pH. Valores de pH baixos estimulam lactobacilos tolerantes a ácidos, enquanto valores mais altos selecionam espécies de *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella* (APONTE et al., 2013).

Em *sourdoughs* líquidos, onde o pH diminui consideravelmente após a mistura farinha-água, há um declínio das espécies BAL (MINERVINI et al., 2014). A velocidade de acidificação do *sourdough* regula o nível de *F. sanfranciscensis*, que tem seu pH ótimo para crescimento em pH 5.0 (GANZLE; EHMANN; HAMMES, 1998).

### 3.5.2.3. Meio de crescimento/substrato

A atividade antifúngica dos compostos produzidos via fermentação *sourdough* foi comprovada por Rizzello et al., (2011). Os autores demonstraram que a farinha de gérmen de trigo possui atividade antifúngica para estender a validade de pães através da fermentação natural. Em contrapartida, nenhuma atividade antifúngica foi

encontrada para o gérmen de trigo cru, levantando a hipótese de que a atividade inibitória foi relacionada à fermentação.

O meio de crescimento desempenha um papel muito importante na produção de metabólitos microbianos sob diferentes condições. Nesse sentido, a utilização de outras farinhas em substituição à farinha de trigo impacta na formação de diferentes ácidos orgânicos (AXEL; ZANNINI; ARENDT, 2017) e pode ser uma fonte potencial de bioativos vegetais com atividade antifúngica (GÄNZLE, 2015). Estudo realizado por Rizzello et al., (2010) concluiu que a concentração de ácidos orgânicos produzidos por BAL durante a fermentação do gérmen de trigo era diferente da encontrada na fermentação da farinha de trigo tradicional. O que pode ser explicado pela diferente composição química do gérmen de trigo em comparação com a farinha de trigo, com alta concentração de a-tocoferol, vitaminas do complexo B, fibra alimentar, gorduras poliinsaturadas, minerais, fitoquímicos e aminoácidos essenciais.

Estudo realizado por Axel et al., (2015) avaliou a capacidade antifúngica de fermento produzido a partir de farinha de quinoa, comparativamente ao controle elaborado com farinha de trigo, como alternativa para a produção de pães sem glúten. A farinha de quinoa é rica em aminoácidos essenciais e alta em proteínas e minerais, características que resultaram em maior produção de ácido láctico com valores de acidez total titulável superiores, em comparação com o fermento produzido a partir da farinha de trigo.

Outra pesquisa realizada por Axel et al., (2016) investigou a produção de compostos antifúngicos após a fermentação da farinha de quinoa e farinha de arroz. A fermentação sourdough de quinoa e farinha de arroz usando as cepas *L. reuteri* R29, *L. brevis* R2 e *L. brevis* L1105 gerou diferentes perfis de ácidos carboxílicos, sendo que a massa fermentada de quinoa apresentou maior concentração de ácidos carboxílicos. E quando foi utilizada *L. reuteri* R29 houve maiores concentrações de ácido acético e láctico, além de ácidos carboxílicos. Os resultados foram correlacionados com o teor de proteína superior da farinha de quinoa e sua alta atividade protease.

A degradação do amido é fundamental durante a fermentação pelas BAL e dependendo da atividade das enzimas que degradam o amido das farinhas, são produzidos diferentes açúcares fermentáveis. Nas massas fermentadas a partir da farinha de trigo, a maltose é a principal fonte de carbono disponível

(SEKWATI-MONANG; VALCHEVA; GÄNZLE, 2012). Axel et al., (2016) analisaram massas fermentadas a partir de farinhas sem glúten (farinha de quinoa e farinha de arroz) e identificaram ausência ou menor atividade da  $\beta$ -amilase e conseqüentemente não houve detecção de maltose. Concluíram que a glicose foi a fonte de carbono predominante nesses fermentos sem glúten e que a amiloglucosidase contribui principalmente para a produção de glicose fermentável na farinha de arroz e na farinha de quinoa.

Estudo realizado por Quattrini et al., (2019) explorou o uso de fermento adicionado de semente de linhaça (rica em ácido linoleico) para aumentar a formação de ácidos graxos hidroxilados antifúngicos. O pão produzido com fermento de linhaça continha níveis mais elevados de acetato do que os pães de trigo, porém a linhaça também contém mucilagem com alta capacidade de ligação à água, o que pode acelerar a deterioração por fungos. Os autores sugerem que o ácido linoleico ligado aos triglicerídeos impede a formação do ácido 10-hidroxi-12-octadecaenóico por *L. hammesii*, que possui atividade antifúngica. Estudos anteriores com o objetivo de converter o óleo vegetal em lipídios bioativos por BAL empregaram lipase para alcançar a hidrólise de triglicerídeos (QUATTRINI et al., 2019).

Em contrapartida, Black et al., (2013) demonstraram que *L. hammesii* DSM16381, isolado de um fermento natural, converteu ácido linoleico em ácido monohidroxi octadecenóico, apresentando atividade antifúngica. Esta conversão foi observada em fermentações suplementadas com ácido linoleico. O ácido monohidroxi octadecenóico em combinação com ácido coriólico inibiu o crescimento de fungos na massa de pão. Ainda, o uso de ácido coriólico e metabólitos antifúngicos de ácido linoleico como antifúngicos naturais podem inclusive substituir fungicidas no tratamento de sementes e proteção das colheitas.

O teor de fibras da farinha influencia no metabolismo microbiano através da sua capacidade de tamponamento, resultando em alterações nos perfis de pH e TTA. Portanto, um *sourdough* isento de farelo teria um TTA e pH diferentes de um *sourdough* com farelo, nas mesmas condições de fermentação (GOBBETTI; CORSETTI; ROSSI, 1994).

As cinzas presentes na farinha também atuam como um agente tampão. A maior concentração de minerais como ferro, sódio, potássio, magnésio e fósforo, viabiliza que a fermentação láctica aconteça por mais tempo, antes de ser suprimida pela baixa do pH, resultando em maior acidez em um tempo de fermentação mais

curto o que poderia potencializar a produção de compostos antifúngicos (SALOVAARA; VALJAKKA, 1987).

A produção de ácido acético, importante metabólito antifúngico, pela ação do metabolismo de carboidratos das BAL pode ser ajustado pela adição de pentoses ou pela adição de sacarose como aceptor de elétrons no metabolismo heterofermentativo. Além da atividade antifúngica, o ácido acético também afeta o sabor e textura de pão (GANZLE, 2015; GEREZ et al., 2010).

#### 3.5.2.4. Sinergia entre os compostos antifúngicos

A atividade inibitória de BAL sobre fungos pode resultar da produção de metabólitos como ácidos orgânicos (em particular, ácido láctico, propiônico e acético), dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogênio, diacetil, reuterina, e outros metabólitos de baixo peso molecular (BIANCHINI, 2015).

Pesquisas comprovam que a maior atividade inibitória do crescimento fúngico nos pães é resultante de um efeito sinérgico entre os metabólitos formados (CORSETTI et al., 1998; RIZZELLO et al., 2010). Gerez et al., (2010) analisaram a atividade antifúngica das cepas de LAB e verificaram que esse efeito se mostrou dependente da proporção de cada ácido formado, assim como do pH resultante.

Acredita-se que o ácido acético tenha um efeito sinérgico com o ácido láctico na prevenção do crescimento de fungos, no entanto, o ácido acético é descrito como mais potente devido ao seu maior valor de pKa fazendo com que tenha um maior nível de dissociação dentro da célula (BATISH et al., 1997).

Vários ácidos orgânicos produzidos por BAL foram considerados inibidores fúngicos e acredita-se que efeitos sinérgicos estejam envolvidos nessa ação. Por exemplo, uma mistura de ácido acético, fórmico, propiônico, butírico, capríco e ácido n-valérico, foi considerado responsável pelo amplo espectro da atividade antifúngica de *F. sanfranciscensis* CB1, sendo o ácido capríco fundamental na atividade antifúngica (CORSETTI et al., 1998).

Niku-Paavola et al., (1999) referiram que atividades complexas e sinérgicas entre ácidos orgânicos e peptídeos são responsáveis pela atividade antifúngica de bactérias lácticas. Em sua pesquisa, a inibição de 100% de *P. agglomerans* ocorreu pela combinação de todos os compostos de referência e ácido láctico. Esse efeito

surpreendente pode ter ocorrido devido ao fato de que os compostos antimicrobianos juntos interagiram uns com os outros, bem como com os organismos de teste. Contudo, dependendo dos compostos presentes, as reações podem ocorrer de forma diferente, resultando em ação sinérgica ou antagônica.

### 3.5.2.5. Linhagem de BAL presente no fermento

O efeito antifúngico dos compostos produzidos pelas BAL também é dependente da linhagem de BAL presente. De acordo com a literatura, diferentes compostos antifúngicos são produzidos. Estudos apontam que as BAL que mais produzem compostos antifúngicos são gênero de Lactobacillaceae (GÄNZLE; QIAO; BECHTNER, 2023).

Gerez et al., (2009) avaliaram 95 linhagens de BAL homo e heterofermentativas quanto à sua atividade antifúngica. Destas, apenas quatro linhagens isoladas de fermento *sourdough* (*L. plantarum* CRL 778, *L. reuteri* CRL 1100, *L. brevis* CRL 772 e *L. brevis* CRL 796) foram capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. O efeito antifúngico destas foi relacionado à produção de ácidos láctico, acético e fenilático e foi dependente do pH e da proporção de cada ácido identificado.

A produção de bacteriocinas ou substâncias inibidoras do tipo bacteriocina (BLIS) produzidas por BAL durante a fermentação *sourdough* foram relacionadas a linhagens específicas. *L. bavaricus* MI401 foi relacionada à produção bavaricina A por Larsen et al., (1993), *L. plantarum* ST31 à plantaricina ST31 (TODOROV et al., 1999) e *F. sanfranciscensis* C57 à BLIS C57 (CORSETTI; GOBBETTI; SMACCHI, 1996). Todas essas bacteriocinas apresentam resistência ao calor e à acidez e algumas delas são ativas contra *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Listeria* spp. No entanto, é importante salientar que BLIS de *L. lactis* M30 demonstraram eficácia na redução do crescimento de algumas BAL que frequentemente predominam durante a propagação do *sourdough* e portanto, podem influenciar na formação da complexa microflora do fermento e contribuir na implantação e estabilidade de bactérias resistentes, como *F. sanfranciscensis* (CORSETTI; SETTANNI; VAN SINDEREN, 2004).

Nesse sentido, uma triagem em 437 cepas isoladas de *Lactobacillus* em 70 *sourdoughs*, indicou a produção de BLIS por apenas cinco lactobacilos (*L. pentosus* 2MF8 e 8CF, *L. plantarum* 4DE e 3DM e *Lactobacillus* sp. CS1) (CORSETTI; SETTANNI; VAN SINDEREN, 2004). Ainda, Corsetti et al., (1998), em seu estudo, identificaram que diferentes espécies e, às vezes, diferentes linhagens da mesma espécie, podem produzir diferentes misturas de ácidos orgânicos que resultam em atividade antifúngica.

#### 3.5.2.6. Oxigênio

O oxigênio é introduzido na massa fermentada por meio da alimentação, mistura e sova, e é consumido por atividades enzimáticas e microbianas (DECAMPS et al., 2016; JOYE et al., 2012). A fermentação sourdough prossegue semianaerobicamente. O uso de oxigênio como aceptor externo de elétrons alternativo pode causar uma mudança do etanol para a produção de ácido acético (REALE et al., 2016). Assim, a presença de oxigênio pode ter um impacto sobre a dinâmica da comunidade microbiana, cinética de produção de metabólitos e formação da textura do pão (GOBBETTI et al., 2005).

O oxigênio disponível durante a sova poderá ser usado pelas leveduras para o crescimento (JOYE et al., 2012), na ausência de leveduras, o oxigênio disponível será usado pela lipoxigenase da farinha para oxidar os lipídios em aldeídos, por sua vez influenciando o perfil de sabor e o processo de panificação (DECAMPS et al., 2016).

#### 3.5.2.7. Atividade de água e força osmótica

A atividade de água dos *sourdoughs* está dentro dos parâmetros que não prejudicam o crescimento da maioria das espécies de BAL e leveduras (PARAMITHIOTIS; TSIASIOTOU; DROSINOS, 2010). No entanto, a adição de altos níveis de sal ou açúcar pode influenciar o crescimento de BAL e leveduras e, assim, selecionar espécies osmotolerantes (MINERVINI et al., 2014), influenciando a formação de compostos antifúngicos.



O aumento da força iônica gerado pela adição de sal (NaCl) favorece o crescimento de leveduras, diminuindo a proporção de BAL para levedura de 1:10 para 1:1. Desta forma, uma baixa concentração de sal (abaixo de 0,7%) é preferida para a obtenção de ácidos orgânicos, visto favorecer o crescimento de algumas espécies de BAL (SIMONSON; SALOVAARA; KORHOLA, 2003).

### **3.5.3 Formas de aplicação de bioconservantes produzidos através de fermentação por BAL**

Sourdough é um melhorador natural de massa e tem amplas perspectivas de aplicação em produtos de panificação. A sua utilização, com o emprego de BAL, é uma estratégia que possui o potencial de inibir o crescimento de fungos e prolongar a vida útil de pães. Nesse sentido, diferentes formas de aplicação do fermento *sourdough* foram propostas.

Os estudos mais atuais empregaram com essa finalidade o *sourdough* tipo II e o *sourdough* tipo III, além de outras formas uso como extratos de *sourdough* e associação com outros microrganismos (probióticos) e enzimas. A maioria das pesquisas utilizou o fermento *sourdough* fresco em formulações de pães, em quantidades que variam de 10 % a 40 % sobre o peso de farinha, com posterior avaliação da vida útil dos produtos (AXEL et al., 2016; BARTKIENE et al., 2019; DALLAGNOL et al., 2015; DEBONNE et al., 2020; GEREZ et al., 2010; JIN et al., 2021; RYAN et al., 2008, 2011; SADEGHI et al., 2019).

Nesse sentido, (Luz et al., 2019), avaliaram o efeito antifúngico de um *sourdough* tipo II produzido com *L. plantarum* CECT 749 e *L. bulgaricus* CECT 4005 em pães. Nesse estudo, foi substituído 20% do peso total dos ingredientes pelo *sourdough* e os pães fermentaram por 48h. Como resultados, houve aumento da vida útil dos produtos de 1 a 2 dias em comparação ao pão controle com 0,2% de propionato de cálcio.

Nessa mesma linha, Illueca et al., (2023) adicionaram na produção de pães 25% de fermento *sourdough* produzido com *L. plantarum* 5L1 liofilizado (fermentado por 24 h a 37° C). Os pães fermentaram por 24 h a 28° C. E como resultados, a adição desta cultura starter retardou o crescimento fúngico de *A. flavus*, *P.*

*verrucosum* e *P. commune* nos pães em diferentes graus, em comparação ao controle (sem aditivos).

Nessa sequência, Jin et al., (2021), após uma triagem *in vitro* de algumas cepas de BAL de fermento *sourdough* tipo I (espontâneo), escolheram a BAL *Pediococcus pentosaceus* para produção de um *sourdough* tipo II em combinação com *Saccharomycopsis fibuligera* e *S. cerevisiae*. Para a produção dos pães utilizaram cerca de 30% de fermento *sourdough* tipo II e o período total de fermentação foi de 18 horas (12 h em temperatura ambiente e 6 h sob refrigeração). Os pães fermentados com *P. pentosaceus* e *S. fibuligera* (C1) ou *P. pentosaceus* e *S. cerevisiae* (C4) apresentaram atividade antifúngica contra *A. flavus* em relação aos controles (fermento comercial) nos percentuais de  $56,4 \pm 5,5\%$  (C1) e 56,4% (C4).

Outro exemplo de estudo, que utilizou o *sourdough* tipo II, foi o desenvolvido por Axel et al., (2016b). Eles conduziram análises *in vitro* e *in situ* para pesquisar a atividade antifúngica de três espécies diferentes de *Lactobacillus* (*Lb. amylovorus* DSM19280, *Lb. reuteri* R29 e *Libra. brevis* R2). Os *sourdoughs* tipo II foram fermentados a 30°C (*L. amylovorus* DSM19280 e *L. brevis* R2) e 37°C (*L. reuteri* R29) por 48 h e adicionados na quantidade 20 % sobre o peso da farinha na produção dos pães, que fermentaram por 24 horas a 30°C. No geral, as cepas apresentaram boa inibição *in vitro* contra o fungo *Fusarium culmorum* TMW4.2043. Contudo, o pão *sourdough* fermentado com *L. amylovorus* teve melhor desempenho com extensão de vida útil (adição de seis dias) em relação ao pão controle sem aditivos.

Cabe ressaltar que grande parte dos estudos que utilizaram fermento *sourdough* fresco, fizeram uso do *sourdough* tipo II. Pois o *sourdough* tipo I tem algumas desvantagens incluindo um longo ciclo de fermentação e propriedades instáveis. Tornando o uso de massa fermentada com certas espécies de BAL inoculadas uma opção mais atraente (DRAKULA et al., 2021).

Além disso, a maioria desses estudos utilizou o fermento *sourdough* produzido com o objetivo de também fermentar os produtos (sem a adição de leveduras comerciais). Contudo, Dallagnol et al., (2019) pesquisaram a durabilidade de um bioconservante semilíquido (*sourdough* tipo II) desenvolvido com quatro cepas de BAL (*L. brevis* CRL 772, *L. brevis* CRL 796, *L. plantarum* CRL 778 e *L. reuteri* CRL 1100). Esse produto foi testado na preservação de pães contra

*Penicillium sp.* e o melhor efeito de bioconservação (vida útil de 5 dias) foi obtido na formulação com 40% de *sourdough* tipo II contendo *L. plantarum* CRL 778. Porém, como agente fermentador na massa dos pães foi utilizada uma cepa de levedura comercial.

Nessa perspectiva, alguns estudos produziram fermento *sourdough* liofilizado (tipo III) e utilizaram nos produtos de panificação com o objetivo exclusivo de conservação, sem promoção da fermentação do produto. Para a fermentação, juntamente com o *sourdough* tipo III, foi adicionada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que é amplamente utilizada em panificação.

Ainda, Rizzello et al., (2011) avaliaram a atividade antifúngica de um fermento liofilizado produzido a partir da fermentação do gérmen de trigo pelas BAL: *L. plantarum* LB1 e *L. rossiae* LB5. Foi adicionado 4% desse fermento liofilizado para a produção dos pães e como resultado as fatias de pães não apresentaram contaminação fúngica por 28 dias.

Recentemente, uma massa fermentada tipo III (farinha de trigo industrial fermentada por bactérias do ácido propiônico e láctico em forma de pó) combinada com uma mistura de probióticos (*L. acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium spp*, *Bacillus coagulans*) foi utilizada para melhorar a vida útil de dois tipos de produtos de panificação (pizza e focaccia). A adição da formulação melhorou o prazo de validade do produto em comparação com produtos obtidos por receita convencional em 10 dias (CALASSO et al., 2023).

Sob outro enfoque, um recente estudo comparou a melhora na vida útil e características organolépticas de pães sem glúten produzidos com 3 diferentes formas de massa de grão de bico fermentada (*sourdough* tipo I) a 37 °C por 18 h: fresca, desidratada e liofilizada. Na formulação dos pães adicionaram 28% de *sourdough* fresco, 14% de *sourdough* desidratado ou 14% de *sourdough* liofilizado (levedura comercial para a fermentação). A inclusão de todos os tipos de massa fermentada nas formulações melhorou a vida útil em comparação com o controle (sem *sourdough*). Contudo o *sourdough* fresco seguido pelo *sourdough* liofilizado apresentaram maior conteúdo de ácidos orgânicos antifúngicos.

Outras formas de aplicação do fermento *sourdough* foram utilizadas em produtos de panificação com o objetivo de retardar o crescimento fúngico. Entre eles, estudo realizado por Christ-Ribeiro et al., (2017) utilizaram extrato natural derivado da biomassa de farelo de arroz fermentado como bioconservante, visando

aumentar a vida útil de massas de pizza. O extrato obtido foi eficiente na redução da contaminação fúngica por um intervalo de 20 dias.

Recentemente, Hernández-Figueroa et al., (2022) e Hernandez-Figueroa et al. (2023) utilizaram as BAL *L. casei* e *L. acidophilus* na produção de um fermento tipo *poolish* que foi usado na formulação dos pães após 48 h de fermentação (a fermentação dos pães ocorreu pela adição da levedura *S. cerevisiae*). Em conclusão, após 14 dias de armazenamento, 90% dos pães produzidos com massa fermentada por *L. acidophilus* apresentaram crescimento fúngico, mas curiosamente apenas 10% dos pães com massa fermentada por *L. casei* apresentaram fungos.

Já na perspectiva de utilização de diferentes substratos, Luz et al., (2020) utilizaram soro de leite em pó fermentado por cepas de *L. plantarum* para aplicação em pães de forma como bioconservante. O produto fermentado por 72 h (líquido) foi aplicado na formulação substituindo 50 % e 100 % da água. O produto fermentado demonstrou alta atividade antifúngica contra vários fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Além disso, os pães produzidos com o meio fermentado obtiveram uma melhoria na vida útil de 1–2 dias em relação ao pão controle (sem aditivos).

Posteriormente, Dopazo et al., (2023) também utilizaram soro do leite como substrato para a fermentação por *L. plantarum* 5L1 para a produção de um bioconservante. Os resultados evidenciaram que a adição de 5% do soro fermentado liofilizado aos pães aumentou a ocorrência de metabólitos antifúngicos como ácido lático e ácido fenilático e prolongou a vida útil do pão contaminado com *A. flavus* e *P. verrucosum* por até 7 dias.

De outra forma, estudo realizado por Nionelli et al., (2020) bioprocessou o pão excedente, ainda apto para consumo com enzimas e fermentação por BAL selecionadas gerando um produto com propriedades antifúngicas. O ingrediente hidrolisado de pão fermentado por *L. brevis* AM7 apresentou espectro inibitório contra vários fungos testados e a atividade antifúngica variou de 20 a 70%. Foram identificados nove peptídeos antifúngicos provenientes de proteínas de trigo. Comparando com o pão de trigo comum, os pães contendo o hidrolisado fermentado (18 e 22% do peso da massa) apresentaram o maior prazo de validade (até 10 dias).

Assim, como apresentado no decorrer desse estudo, várias pesquisas obtiveram sucesso na produção de bioconservantes a partir de sourdoughs. Contudo novas ferramentas de análises no campo das ciências ômicas assim como uso de

novas BAL e combinações de substratos não convencionais, oferecem espaço substancial para a inovação.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho explorou a atividade antifúngica do *sourdough* tipo III (SD-tIII) produzido em diferentes condições: tempo de fermentação (24 e 48 horas), farinhas (endosperma do trigo, grão inteiro do trigo, linhaça e ervilha), bactérias ácido lácticas (*L. plantarum* ATCC8014 e *F. sanfranciscensis*). A BAL *F. sanfranciscensis* utilizada como cultura starter deste estudo foi isolada em um *sourdough* tipo I maduro.

O extrato solúvel em água/sal obtido dos *sourdoughs* foi testado *in vitro* contra os fungos *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger* e ambas BAL exibiram inibição em diferentes intensidades e o substrato que demonstrou potencializar esse efeito foi a farinha do grão inteiro (WG). Além disso foram identificados e quantificados quatro ácidos orgânicos. As amostras que produziram maior quantidade de ácido láctico foram fermentadas por 48 h por *L. plantarum* (SWG e SWGP) e por *F. sanfranciscensis* (SWGP e SWF).

As três variáveis utilizadas na pesquisa para a produção do SD-tIII produziram diferentes resultados de potencial antifúngico. Assim, a atividade antifúngica do SD-tIII foi matriz dependente, pois foram obtidos diferentes potenciais dependendo da composição de farinha utilizada como substrato para a fermentação pelas BAL. O tempo de fermentação de 48h demonstrou produzir maior quantidade de ácidos orgânicos e também maior capacidade antifúngica *in situ*. Ambas BAL obtiveram bom desempenho na produção de compostos antifúngicos. Contudo *F. sanfranciscensis* se destacou por produzir o SD-tIII que prolongou por mais tempo a vida útil do pão.

Na aplicação do SD-tIII como potencial bioconservante para pães, os resultados demonstraram um retardo no desenvolvimento de fungos em todas as amostras. Contudo, a amostra de farinha do grão inteiro fermentada por *L. plantarum* ATCC8014 durante 48h (BPWG48h) aumentou em 4 dias a vida útil do pão em relação ao controle (sem aditivos) e se comportou como o pão com propionato de cálcio (0,1% peso/peso), com durabilidade de 9 dias. Porém, a formulação de farinha composta por trigo e linhaça fermentada por *F. sanfranciscensis* por 48h (BSL48h) obteve resultado ainda melhor com durabilidade total de 10 dias.

Dessa forma, conclui-se que o uso de *sourdough* na forma liofilizada como bioconservante (tIII-SD) pode ser uma opção na produção de pães, por ser uma

forma estável e por ocupar menor volume, facilitando o transporte e manipulação. E o objetivo da sua utilização nesse caso seria o aumento da vida útil do produto, não necessitando dos microrganismos metabolicamente ativos como no *sourdough* tipo I e II para promover a fermentação do produto.

Ainda assim, mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos envolvidos nas atividades antifúngicas do *sourdough*. Além disso, é preciso desenvolver estratégias tanto para potencializar o efeito antifúngico quanto viabilizar a sua aplicação em escala industrial. Porém, este estudo confirmou mais uma vez o potencial da fermentação *sourdough* para futuras aplicações como bioconservante em produtos de panificação.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, como perspectivas futuras deste trabalho sugerem-se:

- Realizar avaliação sensorial para verificar a aceitabilidade do bioconservante aplicado em produto de panificação;
- Utilizar a composição de mais de um tipo do *sourdough* tipo III na produção dos pães para aumentar o espectro antifúngico. Por exemplo utilizando SPWG48h que obteve durabilidade semelhante ao pão com 0,1% de propionato de cálcio (vida útil de 9 dias) e a formulação BSL48h que obteve o melhor desempenho com durabilidade de 10 dias;
- Aplicar o *sourdough* tipo III em diferentes percentuais na produção dos pães a fim de aumentar a atividade antifúngica. E ao mesmo tempo avaliar as alterações nas características organolépticas do produto final;
- Conduzir a fermentação através de modelo de planejamento experimental por um maior período de fermentação (72 h) a fim de potencializar a produção de metabólitos antifúngicos. Além disso, formular uma composição da farinha do grão inteiro com farinha de linhaça (que obtiveram melhor desempenho antifúngico nos pães) com a BAL *F. sanfranciscensis*;
- Identificar e quantificar outros compostos antifúngicos produzidos na fermentação *sourdough* como derivados de peptídeos e ácidos graxos através da metabolômica.

E assim formular hipóteses que expliquem quais metabólitos foram produzidos nos SD- tIII que apresentaram atividade antifúngica;

-Avaliar a substituição da técnica de obtenção do *sourdough* tipo III a partir do *sourdough* tipo II (liofilização-freeze-drying) por atomização (spray drying) com o objetivo de redução de custos.

## REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 24, n. 2, 2014.

ANANO, S. et al. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, n. February 2017, p. 475–486, 2007.

APONTE, M. et al. Volatile compounds and bacterial community dynamics of chestnut-flour-based sourdoughs. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2394–2404, 2013.

ARCHETTI, G. **Storia, tecniche e simboli dal Mediterraneo all'Atlantico LA CIVILTÀ DEL PANE**. Spoleto, Italy: [s.n.].

ARENA, M. P. et al. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, 13 abr. 2016.

ARORA, K. et al. **Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review**. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2021.

AXEL, C. et al. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. **Food Microbiology**, v. 47, p. 36–44, 1 maio 2015.

AXEL, C. et al. Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 86–94, 2016a.

AXEL, C. et al. Antifungal activities of three different *Lactobacillus* species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1701–1711, 1 fev. 2016b.



AXEL, C.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3528–3542, 2 nov. 2017.

BALAGUER, M. P. et al. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 369–377, 2013.

BARTKIENE, E. et al. A concept of mould spoilage prevention and acrylamide reduction in wheat bread: Application of lactobacilli in combination with a cranberry coating. **Food Control**, v. 91, p. 284–293, 1 set. 2018.

BARTKIENE, E. et al. Application of antifungal lactobacilli in combination with coatings based on apple processing by-products as a bio-preservative in wheat bread production. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 6, p. 2989–3000, 2019.

BATISH, K. K. et al. **Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria-A Review** **Critical Reviews in Biotechnology**. [s.l.: s.n.].

BATISH, V. K.; LAL, R.; GROVER, S. **Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by Lactobacillus acidophilus** **Food Microbiology**. [s.l.: s.n.].

BERGSSON, G. et al. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 3209–3212, 2001.

BIANCHINI, A. Lactic acid bacteria as antifungal agents. Em: **Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 333–353.

BLACK, B. A. et al. Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1866–1873, 2013.

BRYŁA, M. et al. Transformation of ochratoxin A during bread-making processes. **Food Control**, v. 125, 1 jul. 2021.

CALASSO, M. et al. Shelf-life extension of leavened bakery products by using bio-protective cultures and type-III sourdough. **LWT**, v. 177, 1 mar. 2023.

CALVERT, M. D. et al. **A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research**. **PeerJPeerJ Inc.**, , 1 maio 2021.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4516–4522, 15 mar. 2011.

CAUVAIN, S. P. *Baking Science & Technology*, 4 th edition, Volume 1: Fundamentals and Ingredients by E.J. Pyler and L.A. Gorton . **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 1, n. 2, p. 138–138, 2009.

CHRIST-RIBEIRO, A. et al. Compostos antifúngicos extraídos da fermentação de farelo de arroz e aplicados na conservação de produto de panificação. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 39, n. 3, p. 263–268, 2017.

CÍSAROVÁ, M.; TANČINOVÁ, D.; BRODOVÁ, M. Antifungal activity of volatile components generated by essential oils against the genus *Penicillium* isolated from bakery products. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 04, n. Special 01, p. 01–05, 2015.

CIZEIKIENE, D. et al. Thermophilic lactic acid bacteria affect the characteristics of sourdough and whole-grain wheat bread. **Food Bioscience**, v. 38, 1 dez. 2020.

CODA, R. et al. Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and sourdough lactic acid bacteria during bread storage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7391–7398, dez. 2008.

CODA, R. et al. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3484–3492, maio 2011.

CORSETTI, A. et al. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 253–256, 1998.

CORSETTI, A. Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. Em: **Handbook on Sourdough Biotechnology**. [s.l.] Springer US, 2013. p. 85–103.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; SMACCHI, E. **Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57** *Food Microbiology*. [s.l.: s.n.].

CORSETTI, A.; SETTANNI, L.; VAN SINDEREN, D. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 521–534, 2004.

COSTA, L. F. X. et al. Evolution of the spontaneous sourdoughs microbiota prepared with organic or conventional whole wheat flours from South Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, 2022.

COTON, M. et al. Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 21–26, 2018.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. **Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives**. **Trends in Food Science and Technology**, out. 2013.

CURIEL, J. A. et al. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 51–61, 2 mar. 2015.

DAL BELLO, F. et al. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. **Journal of Cereal Science**, v. 45, n. 3, p. 309–318, maio 2007.

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. **Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review**. **Food Control**, abr. 2010.

DALLAGNOL, A. M. et al. Optimization of lactic ferment with quinoa flour as bio-preservative alternative for packed bread. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 9, p. 3839–3849, 15 abr. 2015.

DALLAGNOL, A. M. et al. Antifungal and antimycotoxigenic effect of *Lactobacillus plantarum* CRL 778 at different water activity values. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 51, n. 2, p. 164–169, 1 abr. 2019.

DAMIANI, P. et al. **The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced**. Italy: [s.n.].

DANTIGNY, P. et al. Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 261–269, 2005.

DE OLIVEIRA DO NASCIMENTO, K.; DO NASCIMENTO DIAS PAES, S.; MARIA AUGUSTA, I. A Review “Clean Labeling”: Applications of Natural Ingredients in Bakery Products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 6, n. 5, p. 285–294, 3 maio 2018.

DE VUYST, L. et al. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? **Food Microbiology**, v. 37, p. 11–29, fev. 2014.

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, 19 dez. 2016.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. **The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions**. Trends in Food Science and Technology. **Anais...**jan. 2005.

DE VUYST, L.; VAN KERREBROECK, S.; LEROY, F. Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 100, p. 49–160, 2017.

DE VUYST, L.; VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 120–127, abr. 2007.

DEBONNE, E. et al. Validation of in-vitro antifungal activity of thyme essential oil on *Aspergillus niger* and *Penicillium paneum* through application in par-baked wheat and sourdough bread. **LWT**, v. 87, p. 368–378, 1 jan. 2018.

- DEBONNE, E. et al. Modelling and validation of the antifungal activity of DL-3-phenyllactic acid and acetic acid on bread spoilage moulds. **Food Microbiology**, v. 88, 1 jun. 2020.
- DECAMPS, K. et al. Molecular Oxygen and Reactive Oxygen Species in Bread-making Processes: Scarce, but Nevertheless Important. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 5, p. 722–736, 3 abr. 2016.
- DI CAGNO, R. et al. Diversity of the lactic acid bacterium and yeast microbiota in the switch from firm- to liquid-sourdough fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 10, p. 3161–3172, 2014.
- DIEZ-OZAETA, I.; ASTIAZARAN, O. J. **Fermented foods: An update on evidence-based health benefits and future perspectives**. **Food Research International** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2022.
- DOPAZO, V. et al. Evaluation of shelf life and technological properties of bread elaborated with lactic acid bacteria fermented whey as a bio-preservation ingredient. **LWT**, v. 174, 15 jan. 2023.
- DRAKULA, S. et al. Alteration of phenolics and antioxidant capacity of gluten-free bread by yellow pea flour addition and sourdough fermentation. **Food Bioscience**, v. 44, 1 dez. 2021.
- EL HOUSSNI, I. et al. **The inhibitory effects of lactic acid bacteria isolated from sourdough on the mycotoxigenic fungi growth and mycotoxins from wheat bread**. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 jul. 2023.
- FALARDEAU, J. et al. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 7, p. 869–878, jul. 2013.
- FONSECA, L. M. et al. Suitability of starch/carvacrol nanofibers as biopreservatives for minimizing the fungal spoilage of bread. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, 15 jan. 2021.
- FREIRE F. **A Deterioração Fúngica de Produtos de Panificação no Brasil**. Fortaleza, CE: [s.n.].
- GAGGIANO, M. et al. Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 15–24, fev. 2007.
- GÄNZLE, M. G. Bread: Sourdough Bread. Em: **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 309–315.
- GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, n. Figure 2, p. 106–117, 2015.
- GANZLE, M. G.; EHMANN, M.; HAMMES, W. P. **Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation** Downloaded from APPLIED AND

**ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>.

GÄNZLE, M. G.; QIAO, N.; BECHTNER, J. The quest for the perfect loaf of sourdough bread continues: Novel developments for selection of sourdough starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 407, p. 110421, dez. 2023.

GÄNZLE, M. G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 128–138, abr. 2007.

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, 2 ago. 2019.

GARCIA, M. V.; BERNARDI, A. O.; COPETTI, M. V. **The fungal problem in bread production: insights of causes, consequences, and control methods.** **Current Opinion in Food Science** Elsevier Ltd, , 1 out. 2019.

GAROFALO, C. et al. Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7719–7728, 8 ago. 2012.

GEREZ, C. L. et al. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. **Food Control**, v. 20, n. 2, p. 144–148, fev. 2009.

GEREZ, C. L. et al. **A Ready-to-Use Antifungal Starter Culture Improves the Shelf Life of Packaged Bread** **Journal of Food Protection.** [s.l: s.n.].

GEREZ, C. L. et al. **Nota de pesquisa.** [s.l: s.n.].

GOBBETTI, M. **The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts.** Italy: [s.n.].

GOBBETTI, M. et al. **Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria.** Trends in Food Science and Technology. **Anais...**jan. 2005.

GOBBETTI, M. et al. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 3–18, 19 dez. 2016.

GOBBETTI, M. et al. Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 103–113, 2 ago. 2019.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, • A; ROSSI, • J. **The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates** **Appl Microbiol Biotechnol.** [s.l: s.n.].

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. **Lactobacillus sanfrancisco a key sourdough lactic acid bacterium: a review** **Food Microbiology.** [s.l: s.n.].

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J. Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 fructose-negative strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 939–944, 1995.

GOBBETTI, M.; GÄNZLE, M. Handbook on sourdough biotechnology. **Handbook on Sourdough Biotechnology**, p. 1–298, 2013.

GREGIRCHAK, N.; STABNIKOVA, O.; STABNIKOV, V. Application of Lactic Acid Bacteria for Coating of Wheat Bread to Protect it from Microbial Spoilage. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 223–229, 1 jun. 2020.

GUIMARÃES, A. et al. **Edible Films and Coatings as Carriers of Living Microorganisms: A New Strategy Towards Biopreservation and Healthier Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** Blackwell Publishing Inc., , 1 maio 2018.

GUO, J. et al. Antifungal activity of *Lactobacillus* against *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and *Epidermophyton floccosum*. **Bioengineered Bugs**, v. 3, n. 2, p. 104–113, 2012.

HÄGGMAN, M.; SALOVAARA, H. Microbial re-inoculation reveals differences in the leavening power of sourdough yeast strains. **LWT**, v. 41, n. 1, p. 148–154, 2008a.

HÄGGMAN, M.; SALOVAARA, H. Effect of fermentation rate on endogenous leavening of *Candida milleri* in sour rye dough. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 266–273, 2008b.

HASSAN, Y. I.; BULLERMAN, L. B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 112–115, 15 jan. 2008.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. **Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology** Frontiers Research Foundation, , 2012.

HERAS-MOZOS, R. et al. Development and optimization of antifungal packaging for sliced pan loaf based on garlic as active agent and bread aroma as aroma corrector. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, p. 42–48, 2 fev. 2019.

HERNÁNDEZ-FIGUEROA, R. H.; MANI-LÓPEZ, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal Capacity of Poolish-Type Sourdough Supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Aqueous Extracts In Vitro and Bread. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2022a.

HERNÁNDEZ-FIGUEROA, R. H.; MANI-LÓPEZ, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal Capacity of Poolish-Type Sourdough Supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Aqueous Extracts In Vitro and Bread. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2022b.

HOCKING, A. D. *Aspergillus* and related teleomorphs. Em: **Food spoilage microorganisms**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2006. p. 451–487.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. **XEROMYCES BISPORUS FRASER**, 1999. (Nota técnica).

HUNG, Y.; DE KOK, T. M.; VERBEKE, W. Consumer attitude and purchase intention towards processed meat products with natural compounds and a reduced level of nitrite. **Meat Science**, v. 121, p. 119–126, 1 nov. 2016.

ILLUECA, F. et al. Bread Biopreservation through the Addition of Lactic Acid Bacteria in Sourdough. **Foods**, v. 12, n. 4, 1 fev. 2023.

IRAKLI, M. et al. Impact of the combination of sourdough fermentation and hop extract addition on baking properties, antioxidant capacity and phenolics bioaccessibility of rice bran-enhanced bread. **Food Chemistry**, v. 285, p. 231–239, 1 jul. 2019.

JIN, J. et al. Characteristics of sourdough bread fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Saccharomyces cerevisiae* and its bio-preservative effect against *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 345, 30 maio 2021.

JOYE, I. J. et al. Monitoring Molecular Oxygen Depletion in Wheat Flour Dough Using Erythrosin B Phosphorescence: A Biophysical Approach. **Food Biophysics**, v. 7, n. 2, p. 138–144, jun. 2012.

KNIGHT, R. A.; MENLOVE, E. M. Effect of the bread-baking process on destruction of certain mould spores. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 12, n. 10, p. 653–656, 1961.

KORCARI, D. et al. Microbial consortia involved in fermented spelt sourdoughs: dynamics and characterization of yeasts and lactic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 48–54, 1 jan. 2020.

LANDIS, E. A. et al. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. **eLife**, v. 10, p. 1–24, 1 jan. 2021.

LARSEN, A. G. et al. **Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401** *Journal of Applied Bacteriology*. [s.l: s.n.].

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; VISCONTI, A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 634–640, 1 jan. 2003.

LAVILLA, M. Consumer Attitudes to Food Preservation Processes and Strategies. Em: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2019.

LAY, L. C. et al. In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. **Food Control**, v. 60, p. 247–255, 1 fev. 2016.

LEGAN, J. D.; VOYSEY, P. A. **Yeast spoilage of bakery products and ingredients** *Journal of Applied Bacteriology*. [s.l: s.n.].

LEMOS, J. G. et al. Consumers complaints about moldy foods in a Brazilian website. **Food Control**, v. 92, p. 380–385, 1 out. 2018.

LEONG, S. LIN L. et al. The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* - Growth and competition at various water activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 57–63, 31 jan. 2011.

LI, Q. et al. **Lactiplantibacillus plantarum: A comprehensive review of its antifungal and anti-mycotoxic effects**. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2023.

LI, T. et al. **Activity and mechanism of action of antifungal peptides from microorganisms: A review**. **Molecules** MDPI AG, , 1 jun. 2021.

LIU, A. et al. **Antifungal Mechanisms and Application of Lactic Acid Bacteria in Bakery Products: A Review**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 16 jun. 2022.

LUZ, C. et al. Antifungal activity and shelf life extension of loaf bread produced with sourdough fermented by *Lactobacillus* strains. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 10, 1 out. 2019.

LUZ, C. et al. A natural strategy to improve the shelf life of the loaf bread against toxigenic fungi: The employment of fermented whey powder. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 1, p. 88–97, 1 fev. 2020.

MAGAN, N.; ARROYO, M.; ALDRED, D. Mould prevention in bread. Em: **Bread Making**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2003. p. 500–514.

MCCLEMENTS, D. J. et al. **Nanoemulsion-Based Technologies for Delivering Natural Plant-Based Antimicrobials in Foods**. **Frontiers in Sustainable Food Systems** Frontiers Media S.A., , 18 fev. 2021.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 22 abr. 2013.

MENDE, S.; ROHM, H.; JAROS, D. Lactic acid bacteria: Exopolysaccharides. Em: **Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition**. [s.l.] Elsevier, 2021. v. 4p. 160–167.

MENTEŞ, Ö.; ERCAN, R.; AKÇELİK, M. Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. **Food Control**, v. 18, n. 4, p. 359–363, abr. 2007.

MEROTH, C. B.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7453–7461, dez. 2003.

MINERVINI, F. et al. **Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough**. **International Journal of Food Microbiology** Elsevier B.V., , 3 fev. 2014.



- MORONI, A. V. et al. Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 142–148, ago. 2010.
- MOZZI, F. Lactic Acid Bacteria. Em: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 501–508.
- MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. **Bioprotective role of yeasts. Microorganisms**MDPI AG, , 1 dez. 2015.
- MUHIALDIN, B. J.; HASSAN, Z.; SAARI, N. In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria low molecular peptides against spoilage fungi of bakery products. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 557–567, 1 set. 2018.
- NARISSETTY, V. et al. **Recycling bread waste into chemical building blocks using a circular biorefining approach. Sustainable Energy and Fuels**Royal Society of Chemistry, , 7 out. 2021.
- NARVHUS, J. A.; AXELSSON, L. LACTIC ACID BACTERIA. Em: BENJAMIN CABALLERO (Ed.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2003. p. 3465–3471.
- NASROLLAHZADEH, A. et al. **Antifungal Preservation of Food by Lactic Acid Bacteria. Foods**MDPI, , 1 fev. 2022.
- NIKU-PAAVOLA, M.-L. et al. **New types of antimicrobial compounds produced by Lactobacillus plantarum**Journal of Applied Microbiology. [s.l: s.n.].
- NIONELLI, L. et al. Antifungal effect of bioprocessed surplus bread as ingredient for bread-making: Identification of active compounds and impact on shelf-life. **Food Control**, v. 118, 1 dez. 2020.
- NOSHIRVANI, N. et al. Novel active packaging based on carboxymethyl cellulose-chitosan-ZnO NPs nanocomposite for increasing the shelf life of bread. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 11, p. 106–114, 1 mar. 2017.
- OMEDI, J. O. et al. Suitability of pitaya fruit fermented by sourdough LAB strains for bread making: its impact on dough physicochemical, rheo-fermentation properties and antioxidant, antifungal and quality performance of bread. **Heliyon**, v. 7, n. 11, 1 nov. 2021.
- ONISHI, M. et al. Odorant transfer characteristics of white bread during baking. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 2, p. 261–267, 2011.
- OUIDDIR, M. et al. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. **Food Microbiology**, v. 82, n. January, p. 160–170, 2019.
- PARAMITHIOTIS, S. et al. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2429–2433, dez. 2006.

- PARAMITHIOTIS, S.; TSIASIOTOU, S.; DROSINOS, E. H. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 6, p. 883–890, 2010.
- PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia conceitos e aplicações**. São Paulo: [s.n.]. v. v.2, p. 1072
- PENA, L.; BURTON, B. K. Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 7, p. 1641–1646, jul. 2012.
- PINILLA, C. M. B.; THYS, R. C. S.; BRANDELLI, A. Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic against environmental fungal in wheat bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 293, n. December 2018, p. 72–78, 2019.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. [s.l.] Springer US, 2009.
- POLÔNIO, M. L. T. P. F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 25, n. 8, p. 1653–1666, 2009.
- PREMANATH, R. et al. **Tropical plant products as biopreservatives and their application in food safety**. **Food Control** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2022.
- PROST, C. et al. Bread aroma. Em: **Breadmaking: Improving quality, Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. p. 523–561.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, 1 jan. 2013.
- 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, n. July 2018, p. 8–14, 2019.
- REALE, A. et al. Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. **LWT**, v. 73, p. 622–629, 1 nov. 2016.
- REGO ET AL. **Pães industrializados: nutrição e praticidade com segurança e sustentabilidade**. 1. ed. ed. São Paulo: Abimapi/Ital, 2020.
- RICCI, A. et al. **Vegetable By-Product Lacto-Fermentation as a New Source of Antimicrobial Compounds**. Parma, Italy: [s.n.].
- RINALDI, M. et al. Sourdough fermentation and chestnut flour in gluten-free bread: A shelf-life evaluation. **Food Chemistry**, v. 224, p. 144–152, 1 jun. 2017.
- 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 and Technology**, v. 230, n. 4, p. 645–654, 2010.
- 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, 2011.

RIZZELLO, C. G. et al. Long-term fungal inhibition by *Pisum sativum* flour hydrolysate during storage of wheat flour bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 12, p. 4195–4206, 2015.

RIZZELLO, C. G. et al. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. **Food Microbiology**, v. 64, p. 72–82, 2017.

ROSENQUIST, H.; HANSEN, A. °. **The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread** *Journal of Applied Microbiology*. [s.l.: s.n.].

ROY, U. et al. **Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3IWI** *Journal of Food Microbiology* U. Roy et al. *Al ht. J. Food Microbiology*. [s.l.: s.n.].

RUSSO, P. et al. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity as a protective starter culture for bread production. **Foods**, v. 6, n. 12, 1 dez. 2017.

RYAN, L. A. M. et al. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 276–283, 29 abr. 2011.

RYAN, L. A. M.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 274–278, 31 jul. 2008.

SADEGHI, A. et al. A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 108551, 2019a.

SADEGHI, A. et al. Application of the selected antifungal LAB isolate as a protective starter culture in pan whole-wheat sourdough bread. **Food Control**, v. 95, p. 298–307, 2019b.

SALAS, L. M. et al. **Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review**. *Microorganisms* MDPI AG, , 1 set. 2017.

SALOVAARA, H.; VALJAKKA, T. The effect of fermentation temperature, flour type, and starter on the properties of sour wheat bread. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 22, n. 1Y87, p. 591–597, 1987.

SAMAPUNDO, S. et al. Antifungal properties of fermentates and their potential to replace sorbate and propionate in pound cake. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 157–163, 2016.

SAMAPUNDO, S. et al. Antifungal activity of fermentates and their potential to replace propionate in bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 101–107, 2017.

SCHETTINO, R. et al. Extension of the shelf-life of fresh pasta using chickpea flour fermented with selected lactic acid bacteria. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–21, 1 set. 2020.

SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 70–78, 2005.

SEKWATI-MONANG, B.; VALCHEVA, R.; GÄNZLE, M. G. Microbial ecology of sorghum sourdoughs: Effect of substrate supply and phenolic compounds on composition of fermentation microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 240–246, 15 out. 2012.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. **Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation**. **International Journal of Food Microbiology**, 31 jan. 2008.

SHEHATA, M. G. et al. Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, n. 1, p. 71–78, 1 jun. 2019.

SIEPMANN, F. B. et al. Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 2, p. 242–270, 1 fev. 2018.

SIEPMANN, F. B. et al. Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. **LWT**, v. 108, p. 199–206, 1 jul. 2019.

SIMONSON, L.; SALOVAARA, H.; KORHOLA, M. **FOOD MICROBIOLOGY** [www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic](http://www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic) **Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations** **Food Microbiology**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic](http://www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic)>.

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, 2009.

STANZER, D. et al. **Diversity of lactic acid bacteria on organic flours and application of isolates in sourdough fermentation** **CROATIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY**. Croatia: [s.n.].

STRÖM, K. et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4322–4327, set. 2002.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 67–78, 2004.

TAKWA, S. et al. *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, p. 47–55, 2018.

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.** [s.l: s.n.].

THOMAS, R. H. et al. **The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/153>>.

TODOROV, S. et al. **Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by Lactobacillus plantarum ST 31 isolated from sourdough** *International Journal of Food Microbiology*. [s.l: s.n.].

UNITE. **rDNA ITS based identification of Eukaryotes and their communication via DOIs.**

VAN KERREBROECK, S.; MAES, D.; DE VUYST, L. **Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis.** *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 out. 2017.

VOGELMANN, S. A.; HERTEL, C. Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 583–589, maio 2011.

VYTRÁSOVÁ, J.; PŘIBÁNOVÁ, P.; MARVANOVÁ, L. Occurrence of xerophilic fungi in bakery gingerbread production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 72, n. 1–2, p. 91–96, 2002.

WAJNER, M.; GOODMAN, S. I. **Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: Insights from human and animal studies.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. *Anais...* fev. 2011.

WHITE, T. J. et al. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. Em: **PCR Protocols**. [s.l.] Elsevier, 1990. p. 315–322.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 15, n. 2, p. 129–144, abr. 2011.

ZHANG, G. et al. **Prevalence, genetic diversity, and technological functions of the Lactobacillus sanfranciscensis in sourdough: A review.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc., 2019.