



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

KAMILA VELOSO DA SILVA

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS EM PROCESSOS DE
PANIFICAÇÃO**

Palmas/TO
2020

KAMILA VELOSO DA SILVA

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS EM PROCESSOS DE
PANIFICAÇÃO**

Monografia apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Palmas para obtenção do título de Engenheira de Alimentos, sob orientação da Prof. (a) Dr. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos e Coorientadora: Me. Bárbara Marques Bianchini Condessa.

Palmas/TO
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S586p Silva, Kamila Veloso da.

Potencial de aplicação de leveduras selvagens em processos de panificação. / Kamila Veloso da Silva. – Palmas, TO, 2020.

28 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2020.

Orientadora : Claudia Cristina Auler do Amaral Santos

Coorientadora : Bárbara Marques Bianchini Condessa

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Biotecnologia. 3. Leveduras. 4. Pão. I.
Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

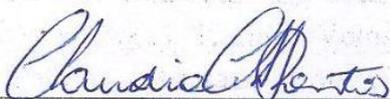
KAMILA VELOSO DA SILVA

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS EM PROCESSOS DE
PANIFICAÇÃO**

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário Palmas, Curso de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de Engenheira de Alimentos e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

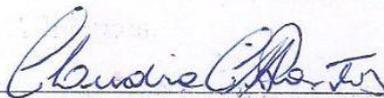
Data de aprovação: 22 / 12 / 2020

Banca Examinadora



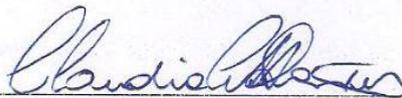
Dr^a. Claudia Cristiana Auler do Amaral Santos

Professor(a) Orientador(a)



Dr^a. Solange Cristina Carreiro

Avaliador(a) – membro interno



Dr^a. Glêndara Aparecida de Souza Martins

Avaliador(a) – membro interno

Palmas, 2020

Dedico, bem como todas as outras conquistas aos meus pais Adélcio e Rose. A minha mãe por acreditar em mim, por me incentivar e me apoiar. Ao meu pai (em memória), por ser a minha força mesmo não estando presente fisicamente, e sei que de onde ele estiver sempre olhará por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita bondade, por me proporcionar a realização de mais um sonho e por sempre está ao meu lado durante esta caminhada, me amparando nos momentos difíceis e me ajudando a superar as dificuldades.

Agradeço a minha família que ao longo desta etapa me encorajaram e me apoiaram, em especial a minha mãe, que é a maior responsável por essa vitória e minha maior incentivadora. As minhas irmãs Prysley e Thalyta por sempre me apoiarem e me darem forças em todos os momentos da minha vida. Aos meus avôs e meu padrasto Nason pelos conselhos e apoio.

As minhas amigas Dhayna, Amanda, Tábita, Tamires e Ianna por sempre me apoiarem e por acreditarem em mim mais do que eu mesma, fazendo com que esta fosse uma das melhores fases da minha vida.

Agradeço a minha querida orientadora Prof Dr. Claudia Auler por todos os ensinamentos, pela condução deste trabalho e pela amizade. Você é um exemplo de mulher, professora e ser humano. Obrigada por todo o apoio durante todos esses anos e por ter contribuído grandemente na minha formação profissional e pessoal.

A minha coorientadora Bárbara, por toda ajuda, dedicação e por sanar minhas dúvidas com imensa atenção. E por fim, agradeço ao PET e toda a equipe do LMA, que fizeram parte dessa jornada me dando todo suporte e ajuda necessária para encarar os desafios diários. A todos vocês minha gratidão!

RESUMO

O pão é consumido em grande quantidade no mundo, sendo de diferentes tipos e formas, dependendo dos hábitos culturais. A demanda do mercado por produtos diferenciados está aumentando cada vez mais, devido a utilização de apenas um grupo resumido de *Saccharomyces cerevisiae*, resultando em uma limitação sensorial dos produtos panificados, o que incentiva a busca por microrganismos que agregam sabor e aroma aos pães. Nesse cenário, o Cerrado tem um papel importante, sendo apontado como um bioma que pode ampliar diversos setores da economia, apresentando biodiversidade única e grande potencial para gerar produtos diferenciados. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de 2 leveduras selvagens, para serem aplicadas em processos de panificação. Os pães produzidos com as leveduras selvagens e a controle (Dona Benta, fermento seco instantâneo) foram submetidos a análises físico-química e análise microbiológica. A realização das análises físico-químicas indicou que as leveduras analisadas apresentam uma faixa de pH decrescente durante os 12 dias de análise, e os pães obtidos apresentaram teor de umidade igual a 25,64 %, 30,32% e 27,06% estando dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Os resultados obtidos nas análises microbiológicas foram satisfatórios devido à ausência dos microrganismos alvo, que foram: *Salmonella spp.*, coliformes totais, bolores e leveduras. Diante do exposto, as leveduras selvagens autóctones do cerrado possuem potencial de serem aplicadas em processos de panificação.

Palavras-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*; Biotecnologia; Leveduras; Pão.

ABSTRACT

Bread is consumed in large numbers in the world, being of different types and forms, depending on cultural habits. The market demand for differentiated products is increasing, due to the use of only a summarized group of *Saccharomyces cerevisiae*, resulting in a sensory limitation of the bakery products, which encourages the search for microorganisms that add flavor and aroma to the breads. In this scenario, the Cerrado plays an important role, being pointed out as a biome that can expand several sectors of the economy, presenting unique biodiversity and great potential to generate differentiated products. Thus, the objective of this work was to analyze the potential of 2 wild yeasts to be applied in bakery processes. The breads produced with wild yeasts and control (Dona Benta, instant aninstant dry yeast) were submitted to physicochemical analysis and microbiological analysis. The physicochemical analyses indicated that the analyzed yeasts presented a decreasing pH range during the 12 days of analysis, and the breads obtained presented moisture content equal to 25.64%, 30.32% and 27.06% being within the standards established by the current legislation. The results obtained in the microbiological analyses were satisfactory due to the absence of the target microorganisms, which were: *Salmonella* spp., total coliforms, molds and yeasts. In view of the above, the native wild yeasts of the cerrado have the potential to be applied in bakery processes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Biotechnology; Yeasts; Bread.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Mapa metabólico da levedura.	14
Figura 2- Fluxograma de Produção do Pães.	17
Figura 3-Teste de produção de aminos biogênicas realizado para as cepas de leveduras selvagens.	21
Figura 4- A) Desprendimento de CO ₂ da massa dos pães controle; B) Desprendimento de CO ₂ da massa dos pães produzidos com a SC 5952; C) Desprendimento de CO ₂ da massa dos pães produzidos com ART 101.3.	22
Figura 5- pH dos pães produzidos com as leveduras selvagens.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Leveduras selvagens utilizadas no trabalho e suas origens.	15
Tabela 2- Formulação dos Pães.	17
Tabela 3-Umidade dos pães produzidos com as leveduras controle e selvagens.	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 Fermento	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Insumos e Cepas de Microrganismos	15
4.2 Reativação das Leveduras	15
4.3 Produção de aminas Biogênicas	16
4.4 Obtenção dos Inóculos para Panificação	16
4.5 Padronização dos Inóculos	16
4.6 Elaboração dos Pães	17
4.7 Caracterização Físico-química	18
4.7.1 Determinação do pH e do Padrão de Liberação do CO ₂	18
4.7.2 Umidade	18
4.8 Caracterização Microbiológica dos Pães	19
4.8.1 Coliformes Totais e Termotolerantes	19
4.8.2 <i>Salmonella spp.</i>	19
4.8.3 Bolores e Leveduras	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Produção de Aminas Biogênicas	21
5.2 Caracterização Físico-química dos Pães Produzidos	22
5.3 Caracterização Microbiológica	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	26

1. INTRODUÇÃO

A arte da panificação é uma das mais antigas da civilização, a produção de pães é reportada de 8.000 a.C a 600 d.C no vale dos rios Tigres e Eufrates, na antiga Mesopotâmia. Já a fermentação da massa do pão passou a ser utilizada por volta de 4000 a.C pelos egípcios, oferecendo ao pão um aspecto mais similar ao que conhecemos hoje. Os pães eram utilizados como moeda de troca e até mesmo como forma de pagamento (GUIMARÃES et al, 2014). O pão é consumido em grande quantidade no mundo, nos diferentes tipos e formas, dependendo dos hábitos culturais. O consumo anual brasileiro é de 33,5 kg de pão por habitante (ABIP, 2018).

A demanda do mercado por produtos diferenciados está aumentando cada vez mais, o que incentiva a busca por microrganismos que agregam sabor e aroma aos pães. Nesse cenário, o cerrado tem um papel importante, sendo apontado como um bioma que pode impactar diversos setores da economia, apresentando biodiversidade única e com grande potencial para produzir produtos diferenciados (BIANCHINI, 2016).

Diferentes leveduras podem alterar a qualidade sensorial e microbiológica do pão. Entretanto, somente um número reduzido de leveduras, da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, é atualmente utilizado na indústria de panificação, permanecendo grande parte da biodiversidade existente ainda inexplorada. A utilização deste grupo reduzido de *Saccharomyces cerevisiae* resulta em uma limitação sensorial dos produtos de panificação (CONDESSA, 2019).

Nesse sentido, a biotecnologia aplicada à indústria de alimentos pode contribuir com as mudanças exigidas pelos consumidores por meio da prospecção de novos microrganismos capazes de agregar sabor e aroma aos produtos fermentados (MARTINBIANCO et al, 2013). O uso de leveduras tem como objetivo a liberação de gases durante o processo de fermentação, produzindo uma massa crescida com alvéolos e texturas singulares. Além da produção de compostos orgânicos (SEBESS, 2014; ASLANKOOHI et al, 2016).

Diversos substratos são fontes importantes para isolamento de leveduras, dentre eles as flores e frutos. Entre os biomas brasileiros, o cerrado é o mais característico e próprio do país, abrange uma área territorial de 2.034.448 km² e destaca-se pela riqueza de espécies da fauna e flora, sendo uma das maiores biodiversidades biológicas do Brasil (IBGE, 2014).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial de leveduras selvagens para serem aplicadas em processos de panificação.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de amins biogênicas pelas leveduras autóctones do cerrado;
- Avaliar o desprendimento de CO₂ durante a fermentação da massa do pão;
- Selecionar leveduras para a produção de pães do tipo pão de forma;
- Realizar a caracterização físico-química e microbiológica dos pães produzidos;
- Elaboração dos pães, seguindo padrões exigidos pela legislação brasileira.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo a Resolução RDC nº 263 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA, o pão é o produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes (BRASIL, 2005).

Tradicionalmente, o pão origina-se da farinha derivada de trigo. Outros cereais, leguminosas e até legumes podem ser moídos, produzindo uma “farinha”, no entanto, a capacidade das proteínas de transformar o mingau de farinha e água em uma massa glutinosa, que se torna pão, limita-se em geral ao trigo e a alguns outros cereais habitualmente utilizados, como o centeio e arroz (SEBESS, 2014). Os principais ingredientes em panificação dividem-se em dois grandes grupos: essenciais (farinha de trigo, água, fermento biológico e sal) e não essenciais (açúcar, gordura, leite, enzimas e outros) (CANELLA-RAWLS, 2005). Nos últimos anos, a indústria de panificação tem buscado aditivos e novos microrganismos com o intuito de produzir produtos diferenciados e agregar sabor e aroma aos pães (APLEVICS, 2013; ASLANKOOHI et al, 2016).

Os primeiros pães eram espécies de bolachas planas, de cereais moídos e água, cozidos sobre pedras quentes. Mais tarde, observou-se que a textura e a digestibilidade melhoravam quando a massa era deixada em repouso. O passo seguinte foi deixar sem cozinhar uma pequena parte da massa, para acrescentá-la na preparação seguinte. Durante esse período entre separar a massa crua e incorporá-la à nova massa ocorre a fermentação alcoólica causada pelas leveduras e bactérias do ácido láctico presentes no ambiente. Esses microrganismos atuam sobre os carboidratos presentes na farinha, produzindo etanol e gás carbono (SDE, 2017).

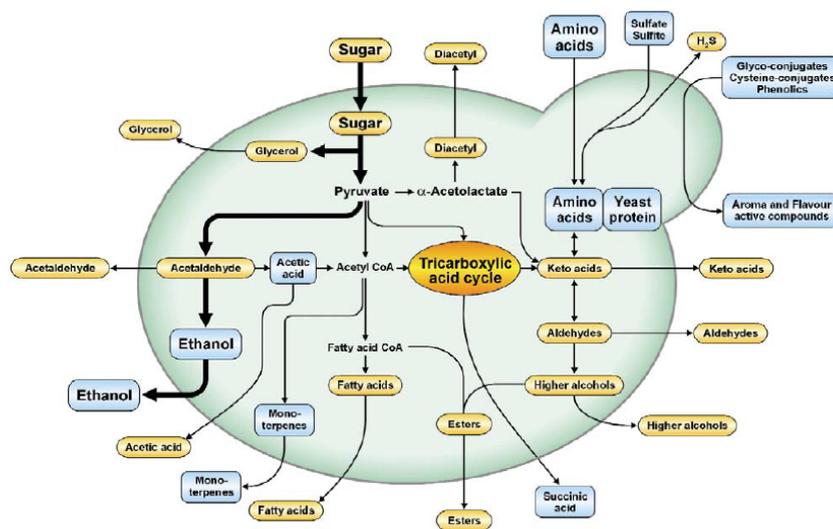
A produção do pão ganhou um forte impulso com a Revolução Industrial. Nesta época, as terras para o cultivo do trigo aumentaram e surgiram os primeiros moinhos, que facilitavam a moagem dos cereais. O alimento, que era feito de água, farinha, sal e fermento, passou a ser produzido em larga escala, se disseminando, aos poucos, pelo mundo (MADRE, 2018). No Brasil, o setor de panificação é composto por mais de 70 mil panificadoras em todo o país, atendendo em média 40 mil clientes por dia, além de gerar 700 mil postos de trabalho diretos e 1,5 milhão de empregos indiretos.

3.1 Fermento

Destacam-se no processo de panificação o fermento químico e o biológico, o fermento químico é um produto à base de bicarbonato de sódio, neste, o gás é obtido em reações do bicarbonato de sódio com algum ácido. Já o fermento biológico é composto por leveduras vivas que se alimentam dos carboidratos fermentescíveis presentes na farinha de trigo. O metabolismo das leveduras (*S. cerevisiae*) favorece a produção das bolhas de gás carbônico que fazem a massa crescer. O fermento biológico está disponível comercialmente no mercado de três formas que diferem em relação ao teor de umidade, implicando em diferentes métodos de utilização e armazenamento, sendo eles: o fresco, ativo seco e instantâneo (SILVA, 2018).

De forma majoritária, o fermento utilizado pelo setor de panificação é constituído de levedura *S. cerevisiae*. O uso de leveduras tem como objetivo a liberação de gases durante o processo de fermentação alcoólica, produzindo uma massa crescida com alvéolos e texturas singulares. As leveduras metabolizam os açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose, frutose e maltose) presentes na massa, por meio da glicólise, produzindo o ácido pirúvico que em seguida é reduzido a álcool etílico e dióxido de carbono (Figura 1). Também durante a etapa de fermentação, há produção de compostos orgânicos (álcoois, ácidos carboxílicos, aldeídos, ésteres, etc.), que contribuem para a formação do aroma e sabor do pão (ASLANKOOHI et al, 2016).

Figura 1-Mapa metabólico da levedura.



Fonte: Swiegers et al, 2005.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Insumos e Cepas de Microrganismos

Os insumos necessários para a formulação dos pães foram adquiridos no comércio local de Palmas, Tocantins. As cepas de leveduras selvagens utilizadas foram previamente selecionadas por Condessa (2019) pelo potencial para serem aplicadas em processos de panificação (Tabela 1). As cepas foram preservadas em meio *Yeast Extract Peptone Glucose* (YEPG): 10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona bacteriológica, 20g/L de glicose e 20g/L de ágar bacteriológico, pH 4,5, cobertos com óleo mineral estéril e conservadas a 4°C. As cepas se encontram no banco de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFT-Palmas.

Tabela 1-Leveduras selvagens utilizadas no trabalho e suas origens.

Levedura	Origem	Espécie	Código de acesso	Isolamento
ART 101.3	Araticum (<i>Annona montana</i>)	<i>Candida Tropicalis</i>	MT228926	Conceição, 2014
SC 5952	Sugar cane must (<i>Saccharum officinarum</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT355080	Profª. Drª. Paula Benevides, Laboratório de Análises Ambientais – UFT

Fonte: Autor, 2020.

Além das leveduras selvagens, foi utilizada *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Dona Benta, fermento seco instantâneo) na elaboração dos pães usados como controle.

4.2 Reativação das Leveduras

As cepas foram reativadas em placas de Petri contendo meio YEPG, com pH ajustado para 4,5, e incubadas a 30°C por 48h. Obtiveram-se colônias isoladas pelo método do esgotamento por estrias múltiplas.

4.3 Produção de aminas Biogênicas

A metodologia de Aslankoohi et al. (2016) foi utilizada para verificar a produção de aminas biogênicas, sendo 10^6 células/mL inoculadas em meio YEPG sólido suplementado com 0,006% de púrpura de bromocresol e 1% de mix de aminoácidos. Os aminoácidos presentes no mix eram tirosina, histidina, fenilalanina, leucina, triptofano, arginina e lisina em proporções iguais. As placas foram incubadas a 30°C por 7 dias observando-se diariamente as alterações no meio. Para interpretação dos resultados considerou-se:

- Positivo: presença de halo roxo que tende a aumentar e escurecer com o tempo.
- Negativo: presença de halo amarelo que tende a virar roxo com o tempo.

4.4 Obtenção dos Inóculos para Panificação

De acordo com Bianchini (2016), colônias isoladas das leveduras previamente selecionadas, provenientes de crescimento em meio YEPG sólido, a 30°C por 48h, foram utilizadas para inocular 5 mL de caldo YEPG, sendo os tubos incubados a 30°C. O sobrenadante foi descartado após 48h e a biomassa foi inoculada em um volume de 5L de caldo YEPG em biorretor mecanicamente agitado (STR) com aquecimento por camisa a 30°C e agitação de 180 rpm sem incorporação de oxigênio e controle de pH ao longo da fermentação. Os volumes utilizados para a propagação da biomassa foram: 5mL, 50 mL, 500mL e 5L.

A biomassa final foi centrifugada a 3800 rpm por 10 min, ressuspensa em água destilada autoclavada para lavagem das células e centrifugada nas mesmas condições, obtendo-se o fermento fresco.

4.5 Padronização dos Inóculos

Foi realizada a suspensão de 0,1g das leveduras não produtoras de aminas biogênicas em 0,9 mL de água destilada autoclavada, seguida de diluições seriadas apropriadas e plaqueamento em YEPG. Após 48h incubadas a 30°C, as células de leveduras foram contadas utilizando câmara de Neubauer com o auxílio de azul de metileno para a determinação da viabilidade celular de cada inóculo (UFC/g). Para a padronização do tamanho do inóculo, os pães foram elaborados com quantidade suficiente de levedura que corresponda a 3g do

fermento padrão (*Saccharomyces cerevisiae* comercial), conforme metodologia adaptada de Heitmann et al (2015).

4.6 Elaboração dos Pães

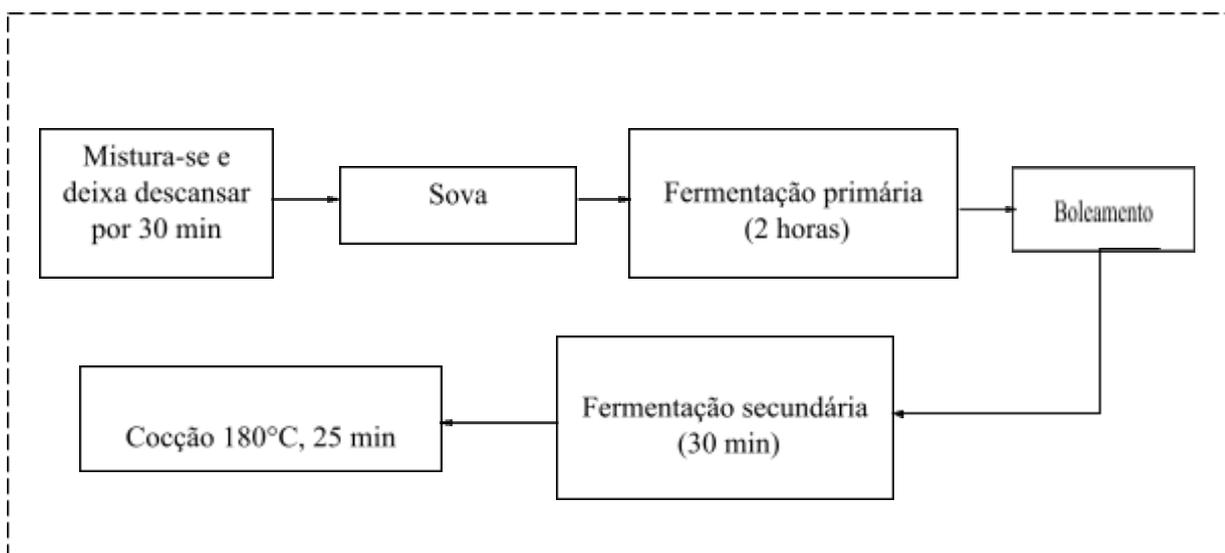
Os insumos necessários para a formulação dos pães: farinha de trigo (Paulista), sal (Cisne), óleo (Sinhá) e açúcar (Cristal) foram adquiridos no comércio local de Palmas. Elaborou-se os pães, em três repetições independentes, utilizando-se a mesma formulação (Tabela 2), a levedura controle (*S. cerevisiae* comercial), e as leveduras selvagens SC 5952 e ART 101.3, separadamente, conforme Figura 2.

Tabela 2- Formulação dos Pães.

Ingredientes	Quantidades para 360 g
Água destilada	120 ml
Açúcar	13,5g
Fermento comercial (dona Benta)	3g
Óleo	30ml
Farinha de Trigo	243g
Sal	3g

Fonte: Autor, 2020.

Figura 2-Fluxograma de Produção dos Pães.



Fonte: Autor, 2020.

Os pães foram produzidos e armazenados em fatias de 1,5 cm envoltos em papel alumínio, agrupadas em sacos autoclavados, mantidos sob refrigeração (7°C) durante toda a execução do experimento.

4.7 Caracterização Físico-química

4.7.1 Determinação do pH e do Padrão de Liberação do CO₂

As análises físico-químicas dos pães foram realizadas segundo as metodologias estabelecidas pelo Instituto Adolf Lutz (2008), com algumas adaptações. Foram realizadas análises de pH, liberação de CO₂ e umidade. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins – campus Palmas. Para análise de pH, foram pesados 10 g do pão em um béquer e procedeu-se à diluição em 90mL de solução de solução salina estéril (0,9 g/L de cloreto de sódio). Determinou-se o pH, utilizando pHmetro da MB-10 Marte, previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

O padrão de liberação do CO₂ durante a fermentação foi avaliado utilizando-se béqueres de 100 mL contendo 10g da massa do pão que foram pesadas em balança analítica em intervalos de 10 min, durante toda a fermentação primária, totalizando 120min. Após 60 min de fermentação, antes da realização da pesagem, as amostras da massa do pão foram pressionadas para a retirada dos gases.

4.7.2 Umidade

O teor e umidade do pão foi analisado utilizando o método de secagem em estufa (Instituto Adolf Lutz, 1985). Fatias de 1,5 cm de pão foram picadas e colocadas em estufa de secagem em placas de Petri abertas a 105°C durante 24h. Após a secagem, as placas foram mantidas dentro de um dessecador por 1h e em seguida foram pesadas. Calculou-se o teor de umidade utilizando a equação 1.

$$U(\%) = \frac{(M1-M2)}{(M1-M)} \times 100 \quad (Eq. 1)$$

U= Teor de umidade;

M1= Massa da amostra + placa de Petri;

M2= Massa da amostra após secagem + placa de Petri;

M= Massa da placa de Petri.

4.8 Caracterização Microbiológica dos Pães

A análise microbiológica dos pães foi realizada após 24 e 72h do preparo, bem como após 6, 9 e 12 dias, sendo analisada a presença de coliformes totais e termotolerantes à 45°C, *Salmonella spp.*, bolores e leveduras. Para a inoculação dos meios, 10g do pão foram homogeneizados em 90mL de solução de salina estéril (0,9%), seguido do preparo de diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-3}), sendo considerados os padrões do Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos – RDC n° 12- (BRASIL, 2001).

4.8.1 Coliformes Totais e Termotolerantes

A análise de coliformes foi realizada utilizando-se caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) da Kasvi. Utilizando tubos de ensaio, contendo 10 mL de caldo e tubo de Durham invertido, para inoculação de 100 µL da amostra proveniente da suspensão do pão e suas diluições, sendo incubados a 30°C por até 48h. Em caso de confirmação de detecção de coliformes totais, foi determinada a presença de coliformes à 45°C (termotolerantes), com confirmação da presença de *Escherichia coli* através da realização de provas bioquímicas com os isolados característicos. Os resultados foram expressos de acordo com a tabela de Número Mais Provável (BUZANELLO et al., 2008).

4.8.2 *Salmonella spp.*

Para a detecção de *Salmonella* em 25 g dos pães foi utilizado método de acordo com a norma ISO 6579:2002. Conforme descrita na norma, a técnica dividiu-se em quatro etapas: pré-enriquecimento com incubação a 35°C durante 18±2 horas; enriquecimento seletivo em Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetracionato (TT), com incubação a 35°C durante 24 horas; plaqueamento em Ágar Entérico de Hectoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar Xilose

Lisina Desoxicolato (XLD) com incubação à 35°C durante 24 horas; e por fim, confirmação de colônias suspeitas, através de provas bioquímicas.

4.8.3 Bolores e Leveduras

A presença de bolores e leveduras foi analisada pela técnica de plaqueamento por em superfície (100µL), nas diluições de 10^{-1} a 10^{-3} , em meio Ágar Batata Dextrose, da Himedia, preparado e esterilizado de acordo com o fabricante. A incubação foi realizada a 30°C, 48h. Os resultados foram expressos em UFC/g, tendo-se utilizado o método de contagem padrão em placas (SILVA et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de Aminas Biogênicas

Após os 7 dias de observação, as todas as colônias estudadas apresentaram halo amarelo ao redor das colônias de leveduras (Figura 3), causado pela fermentação da glicose, seguido por uma redução de pH que faz com que o meio fique roxo depois de um período, indicando resultado negativo para a presença de aminas biogênicas. Em contraste, quando aminas biogênicas são produzidas, a descarboxilação de aminoácidos resulta em um halo roxo desde o início do crescimento da cepa.

Figura 3-Teste de produção de aminas biogênicas realizado para as cepas de leveduras selvagens.



Fonte: Autor, 2020.

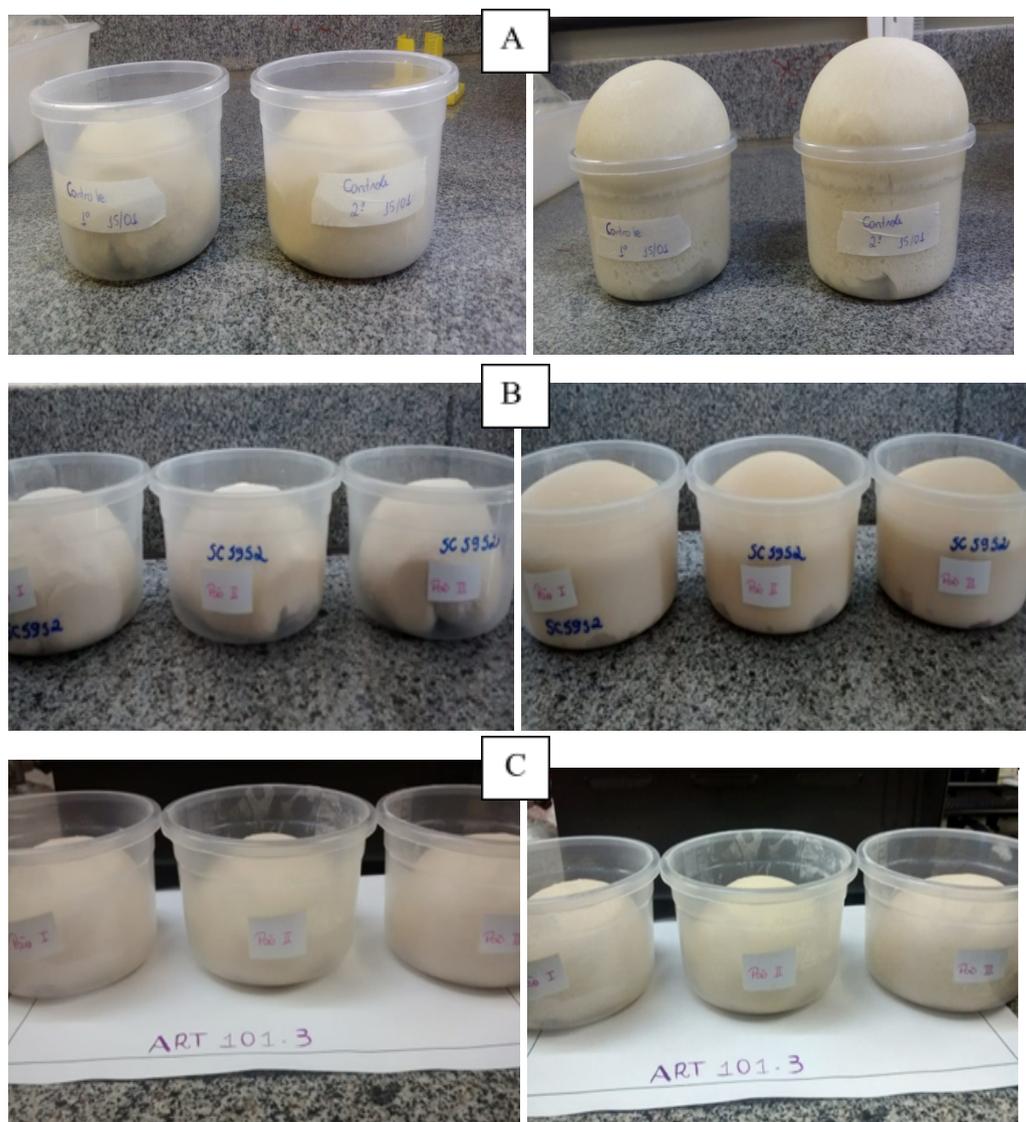
**A) Formação de coloração amarela indicando negativo para a produção de aminas biogênicas. B) Formação de coloração roxa após 6 dias de análise, indicando negativo para a produção de aminas biogênicas.

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular com atividade biológica, produzidas a partir da ação da enzima descarboxilase, produzidas principalmente por microrganismos utilizados na fermentação de alimentos. Sua produção está ligada à estratégia de sobrevivência do microrganismo aos ambientes ácidos, ou como um suplemento alternativo de energia metabólica quando as células estão expostas a condições desfavoráveis de substrato. A principal fonte de aminas biogênicas exógena é proveniente da alimentação, a quantidade e o tipo de aminas nos alimentos em geral, dependem da natureza, origem, etapas de processamento e microrganismos presentes e o consumo desses compostos causa graves efeitos toxicológicos, indesejáveis para a saúde humana (GOMES et al, 2014).

5.2 Caracterização Físico-química dos Pães Produzidos

Durante o processo fermentativo, a cepa de levedura controle apresentou alto desprendimento de CO_2 , tornando o produto leve e macio (Figura 4-A), além de um miolo com granulometria uniforme. No entanto, os pães produzidos com as leveduras selvagens não foram capazes de produzir um alto desprendimento (conforme verificação na Figura abaixo). De acordo com Marqués et al (2007), as leveduras selvagens normalmente produzem menos gás carbônico do que as leveduras domésticas empregadas industrialmente, pois nem sempre são capazes de fermentar a maltose.

Figura 4- A) Desprendimento de CO_2 da massa dos pães controle; B) Desprendimento de CO_2 da massa dos pães produzidos com a SC 5952; C) Desprendimento de CO_2 da massa dos pães produzidos com ART 101.3.

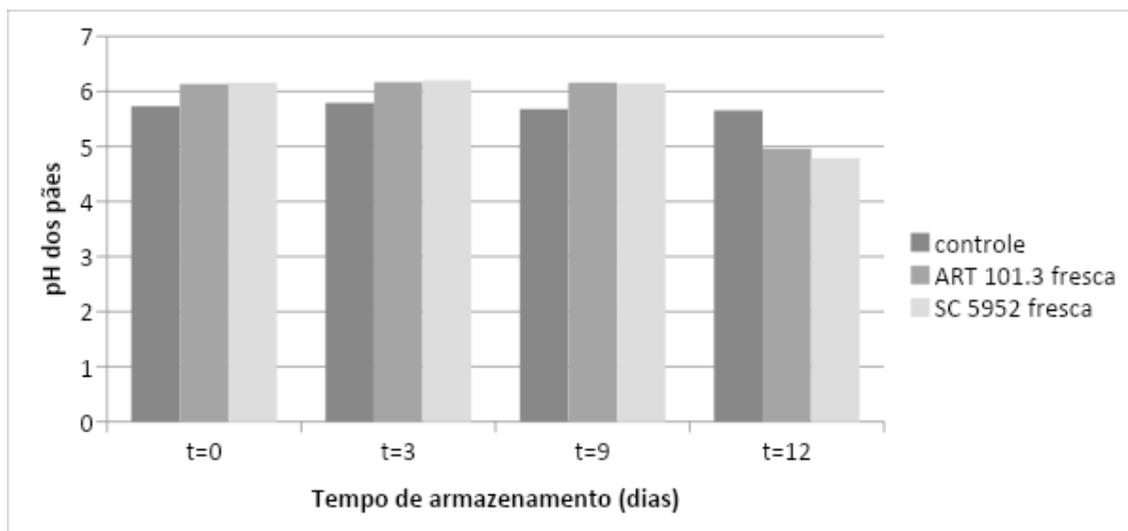


Fonte: Autor, 2020.

Os pães produzidos com as leveduras selvagens apresentaram valores de pH próximos a 6,0 (Figura 5), sofrendo uma ligeira redução a partir do dia 3º dia de fermentação, devido à formação de ácidos fracos pelas leveduras. Parte do CO₂ se dissolve na água produzindo ácido carbônico, contribuindo para a acidificação e redução do pH do meio (VITTI, 2001; GUERREIRO, 2006; BIANCHINI, 2016).

Levando-se em consideração que as leveduras selvagens produzem menos CO₂, era esperada menor acidificação nas massas dos pães produzidas com estas. Já os pães produzidos com a levedura controle apresentaram pH mais baixo, conforme Figura 5.

Figura 5- pH dos pães produzidos com as leveduras selvagens.



Fonte: Autor, 2020.

De acordo com os limites estabelecidos pela RDC n°90/2000 (BRASIL, 2000), a umidade dos pães situa-se em valores próximos a 30% e em torrada, em torno de 5%. Os valores obtidos no presente trabalho estão descritos na Tabela 3. Os resultados indicam que os pães produzidos estão adequados segundo a referida legislação. Umidade em excesso, além de aumentar a atividade microbiana, deixa os produtos panificados com aspecto borrachudo, levando à perda de crocância da crosta, além do aumento da dureza e modificações no aroma e sabor (ESTELLER, 2005).

Tabela 3-Umididade dos pães produzidos com as leveduras controle e selvagens.

	Umidade (%)
Levedura controle	25,64 ± 3,02
SC 5952	30,32 ± 1,36
ART 101.3	27,06 ± 2,16

Fonte: Autor, 2020.

5.3 Caracterização Microbiológica

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas, foram satisfatórios devido à ausência dos microrganismos alvo, que foram: *Salmonella spp.*, coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras. Os parâmetros microbiológicos estabelecidos pela RDC nº12/2001 para pão sem recheio e sem cobertura e produtos de panificação é: Coliformes – no máximo 10^2 UFC/g e *Salmonella* – ausente. Já de acordo com o dossiê técnico de panificação (GUERREIRO, 2006) para pão são: Coliformes – ausentes, bolores e leveduras – no máximo 5×10^3 UFC/g e *Salmonella* – ausente. Os pães obtiveram padrões microbiológicos dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, as leveduras selvagens, possuem potencial biotecnológico para serem aplicadas em processos de panificação, sendo capazes de produzir CO₂, não são produtoras de amins biogênicas e apresentam umidade e parâmetros microbiológicos dentro dos limites impostos pela legislação brasileira.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIP – Associação brasileira da indústria de panificação e confeitaria. Balanço e tendências do mercado de panificação e confeitaria. 2018.

APLEVICZ, K. S. Identificação de bactérias lácticas e leveduras em fermento natural obtido a partir de uva e sua aplicação em pães. 2013. 162f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

ASLANKOOHI, E.; HERRERA-MALAVAR, B.; REZAEL, M. N.; STEENSELS, J.; COURTIN, C. M.; VERSTREPEN, K. J. Non-conventional yeasts strains increase the aroma complexity of bread. PLOS ONE. Outubro de 2016.

BIANCHINI, B. M. Avaliação do potencial de leveduras selvagens, isoladas de frutos e casca de árvore do cerrado, para aplicação em processos de panificação. 2016. 58f. Monografia (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Fundação Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, 2016.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2000.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 263, de 23 de setembro de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005.

BUZANELLO, E. B.; MARTINHAGO, M. W.; ALMEIDA, M. M.; PINTO, F. G. S. Determinação de coliformes totais e termotolerantes na água do lago municipal de Cascavél, Paraná. Revista Brasileira de Biociências. v. 1, p. 59-60. 2008.

CANELLA-RAWLS, S. Pão: arte e ciência. São Paulo: SENAC, 2005. 320 P.

CARDOSO, L. M. Araticum, cagaita, jatobá, mangaba e pequi do cerrado de Minas Gerais: ocorrência e conteúdo de carotenoides e vitaminas, p. 75, 2011.

CONDESSA, B. M. B. Potencial de leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* autóctones do cerrado como culturas iniciadoras em processos de panificação. 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2019. Cap. 1.

ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. da S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 25, n. 4, p. 802-806. 2005.

Flavour. *Advances in Applied Microbiology* 57, 131–175.

GOMES, M. B.; PIRES, B. A. D.; FRACALANZZA, S. A. P.; MARIN, V. A. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 1123-1134, abr. 2014.

GUERREIRO, L. Dossiê Técnico: Panificação. p. 34. 2006.

GUIMARÃES, A. D. et al. Tecnologia em gastronomia: levain, panificação e processo de fermentação natural. Maio 2014. Disponível em: <http://famesp.com.br/novosite/wp-content/uploads/2014/tcc/famesp_annalia_d_guimaraes_ferreira.pdf>. Acesso em: 30 de novembro de 2020.

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Impacto f diferente beer yeast on wheat dough and bread quality. *Journal of cereal Science*. V.6, p.49-56. 2015.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed., 1 ed. digital. São Paulo, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22.

ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

MADRE, M. B. Entenda a Importância do Pão e como ele mudou ao longo da história. *Revista Eletrônica Ramalhos Brasil*, 2018. Disponível em: <<http://massamadreblog.com.br/know-how/curiosidades/entenda/-importancia-do-pao-e-como-ele-mudou-ao-longo-da-historia/>>. Acesso em 30 de novembro de 2020.

MARQUÉS, C. J. B.; ALBIÑANA, M. L. L.; LACUEVA, C. P. La masa madre: El secreto del pan. *Alimentaria*. v. 380, p. 51-62. 2007.

MARTINBIANCO, F.; MARTINS, A.R.; RECH, R.; FLORÊS, S. H.; AYUB, A. Z. Avaliação sensorial de pães de fermentação natural a partir de culturas starters inovadoras. *Ciência Rural*. V. 43, n. 9, p. 1706. 2013.

SDE – Secretaria de Desenvolvimento econômico do governo de Goiás. Caderno didático: panificação, 2017.

SEBESS, P. Técnicas de padaria profissional. Editora: SENAC, Rio de Janeiro: 2014.

SILVA, E. P. Caracterização do desenvolvimento de frutos do cerrado: marolo (*Annoma crassiflora*, Mart) e gabirola (*Compomanesia pubescens*). Dissertação (mestrado) p.115, 2009 –Universidade Federal de Lavras, 2009.

SILVA, M. A. Fermentação Natural - conhecendo o *levain* e sua aplicação comercial no mercado de fortaleza. 2018. 34 f. TCC (Graduação) - Curso de Gastronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Cap. 1

SWIEGERS, J.H. and Pretorius, I.S. (2005) Yeast modulation of wine

VITTI, P. Pão. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia na produção de alimentos. *Biotecnologia industrial*, vol4, Ed. Edgar Blucher, p. 365-386, 2001.