

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CAROLINA VEIGA BUENO

**INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO NATURAL E DO USO DA ENZIMA
ASPARAGINASE NA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE ACRILAMIDA EM PÃO
FRANCÊS**

PORTO ALEGRE, 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CAROLINA VEIGA BUENO

**INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO NATURAL E DO USO DA ENZIMA
ASPARAGINASE NA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE ACRILAMIDA EM PÃO
FRANCÊS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “TCC” do Curso de Tecnologia em Alimentos, como requisito parcial para obtenção do grau de Tecnóloga em Alimentos.

Prof^a. Dr^a. Manuela Poletto Klein

Orientadora

Pro^a Dr^a Marisa Tsao

Coorientadora

PORTO ALEGRE, 2019.

Dedico este trabalho ao meu pai, ele foi o maior incentivador para que eu buscasse outra faculdade após sair da química, se hoje concluo essa jornada é por causa dele. Divido essa conquista contigo, pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Manuela que lá em 2017 permitiu minha entrada no Projeto Acrilamida e abraçou minha ideia de incluir os pães. Agradeço também a minha coorientadora Marisa por concordar em participar deste trabalho colaborando com seus conhecimentos e experiência. Agradeço a ambas pelo tempo dedicado a mim e pela orientação durante o trabalho, vocês foram essenciais para essa conquista.

Agradeço ao corpo técnico do laboratório 320. Felipe, Laíse e Vanessa, obrigada pela ajuda e disponibilidade durante a execução do TCC, pelos almoços, chás e risadas compartilhados. Obrigada Felipe pela enorme ajuda com as análises estatísticas deste trabalho. Obrigada Laíse pela parceria incrível durante esse ano, não só na universidade, mas em tudo. Também agradeço a Camila que me ajudou muito com o HPLC, me dando dicas valiosas e sempre sendo muito prestativa.

Agradeço à minha mãe por ser o maior exemplo de força e garra que tenho. Ela me mostrou que eu posso ser o que eu quiser e chegar aonde eu quiser, e estar aqui hoje é um resultado disso, obrigada mãe. Ao meu pai agradeço o apoio em todas as horas, teu carinho e amor nas tuas atitudes me dão o conforto de saber que sempre tenho aonde me segurar, obrigada. Agradeço meu irmão Tiago pela parceria de vida, minhas melhores lembranças são ao teu lado e é incrível saber que ainda temos muitas para criarmos. Ao meu irmão Guilherme que me ensina muito desde que nasceu, tu me mostras que sempre podemos ir mais longe se quisermos, tu és uma inspiração para mim, obrigada.

Agradeço ao meu marido, Matheus. A convivência contigo torna tudo mais leve, os problemas menos complicados e a vida mais divertida. Sem teu apoio nas horas mais difíceis não teria chegado aqui, obrigada por escolher estar ao meu lado.

Agradeço meus colegas de UFCSPA: Mariana, Soraya, Ana, César, Cris e Felipe. As noites foram mais divertidas, cheias de risadas e histórias para contar, sem falar dos vários *lanchos* coletivos, graças a vocês. Uma menção especial ao meu colega Felipe que dividiu tardes de central analítica, trabalhos e desesperos comigo, tua parceria foi indispensável nessa caminhada, obrigada viu *guriaaaa*.

Agradeço as minhas irmãs de coração Clarissa e Débora. Mesmo com pouca convivência “ao vivo” sinto vocês comigo constantemente, nossa amizade de tantos anos é uma das maiores alegrias que carrego comigo.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos (pessoal da química, cebecenses, galera da Levain) e familiares (Vó Maria, minha mãe², vô veiga e vô isabel, tia Pity, minha mãe preta, e Lice minha prima que é muito mais minha irmã) que entenderam meus momentos de ausência, obrigada pela compreensão, amo vocês.

RESUMO

O pão francês é responsável por 52% do consumo de pães no Brasil, e tem grande popularidade por possuir características sensoriais como aroma, casca dourada e crocante. Esses atributos são intensificados em pães feitos a partir de fermentação natural, tendência que vem crescendo no mercado da panificação. Essas propriedades sensoriais importantes na panificação resultam de diversas reações que ocorrem durante o forneamento dos pães, dentre elas, a reação de Maillard. Embora seja responsável por trazer benefícios a esses produtos, a reação de Maillard gera a acrilamida, um subproduto classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como neurotóxico e possível carcinogênico. Diferentes maneiras de mitigar a produção desse composto em produtos alimentícios vêm sendo estudadas a fim de se obter produtos mais saudáveis do ponto de vista toxicológico. Nesse estudo foram avaliados os teores de acrilamida em pães feitos a partir de três tipos de fermentação: a instantânea, a natural e a híbrida. Também foi utilizada a enzima asparaginase, em diferentes concentrações nos pães de fermentação tradicional, a fim de avaliar a redução nos níveis de acrilamida produzidos. Para a obtenção da acrilamida foi utilizado o método de QuEChERS, método seguro e eficaz para extração de substâncias em matrizes alimentícias. A detecção e quantificação de acrilamida foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando uma coluna de fase reversa e como fase móvel uma mistura de 95% de água e 5% de acetonitrila. Os resultados mostraram aumento significativo no teor final de acrilamida em pães com uso de fermento natural e instantâneo combinados, indicando que essa não é uma estratégia eficaz para redução do teor de acrilamida. Já para os pães elaborados com adição da enzima asparaginase, seu uso em diferentes dosagens se mostrou ineficiente na tentativa de reduzir o teor final de acrilamida neste trabalho, por causa da baixa interação enzima-substrato.

PALAVRAS-CHAVE: acrilamida, pão francês, asparaginase, fermentação natural.

ABSTRACT

The “*pão francês*” represents 52% of the consumption of breads in Brazil, and has great popularity thanks to its sensorial properties like the aroma and the golden, crispy crust. These properties are intensified in breads made with sourdough, a growing trend in the baking market. These important properties in bread making are a result of different chemical reactions that happen when baking, among them the Maillard reaction. Although being responsible for bringing these characteristics to baking products, the Maillard reaction generates acrylamide, a by-product classified as neurotoxic and probable carcinogen by International Agency for Research on Cancer (IARC). Different ways to reduce the formation of this compound in food products have been studied, in order to obtain healthier products from a toxicological perspective. In the present work, the levels of acrylamide were determined in breads made with three different kinds of fermentation, use of commercial baker’s yeast, use of sourdough and a combination of these two. In addition to that, the enzyme asparaginase was used in the baker’s yeast fermented bread, to attempt to reduce the acrylamide produced in baking. The extraction of acrylamide was made using the QuEChERS method, a safe and effective method for extractions in foodstuff. The detection and quantification of acrylamide was made by high efficiency liquid chromatography, using a reverse phase column and 95:5 water and acetonitrile as mobile phase. The results showed a significant increase in the levels of acrylamide in breads made with both commercial baker’s yeast and sourdough, indicating that this is not an effective strategy to reduce the levels of this compound. The use of the enzyme in the present work was ineffective for reducing the acrylamide levels, due to the poor enzyme-substrate interaction.

KEY WORDS: acrylamide, french bread, asparaginase, sourdough.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da reação de Maillard (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).	15
Figura 2: Etapas da reação de formação da acrilamida (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).....	17
Figura 3: Imagem do processo de extração após a primeira centrifugação.....	24
Figura 4: Imagens comparativas das diferentes receitas de pães e diferentes tempos de fermentação.....	27
Figura 5: Cromatograma e tempo de retenção do padrão de acrilamida utilizado para a construção da curva de calibração, realizados nas condições descritas no item 4.3 deste trabalho.	28
Figura 6: Concentrações de acrilamida nos pães submetidos a diferentes tipos de fermentação P1 (fermento instantâneo comercial), P2 (fermento natural) e P3 (fermento instantâneo comercial e natural).....	29
Figura 7: Gráfico de barras representativo das concentrações de acrilamida finais nas receitas P1, P1 com 0,007%, P1 com 0,07% e P1 com 0,14%.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2.1 FERMENTAÇÃO	13
2.2 FERMENTAÇÃO NATURAL EM PÃES	14
2.3 REAÇÃO DE MAILLARD	15
2.4 ACRILAMIDA	16
2.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUECHERS	18
2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	19
4 METODOLOGIA	21
4.1 PRODUÇÃO DOS PÃES	21
4.2 EXTRAÇÃO POR MÉTODO QUECHERS	23
4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	24
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 DESENVOLVIMENTO DOS PÃES	26
5.2 DETERMINAÇÃO DOS LoD E LoQ	27
5.3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE FERMENTAÇÃO NOS NÍVEIS DE ACRILAMIDA FORMADOS	29
5.4 INFLUÊNCIA DA ENZIMA ASPARAGINASE NOS NÍVEIS DE ACRILAMIDA FORMADOS	30
6 CONCLUSÕES	32
7 BIBLIOGRAFIA	33
ANEXO I	37
ANEXO II	37
ANEXO III	38
ANEXO IV	38
ANEXO V	39
ANEXO VI	39

1 INTRODUÇÃO

Considerado um item indispensável no café da manhã do brasileiro, o pão francês possui atributos sensoriais que justificam sua popularidade, como aroma e sabor característicos, bem como casca crocante e dourada. Por ser capaz de intensificar tais atributos (KATINA, 2005), a fermentação natural vem ganhando espaço na indústria de panificação, tendência identificada pela Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (ABIP) em seu relatório de tendências para o ano de 2019. Embora seja uma das responsáveis por desenvolver as propriedades sensoriais desejáveis citadas, a reação de Maillard também gera um subproduto tóxico, a acrilamida (STADLER *et al.*, 2002). A utilização de bactérias ácido-láticas específicas já se mostrou eficiente na redução do teor de acrilamida em produtos de panificação (BARTKIENE *et al.*, 2013), e por possuir esse tipo de microrganismo na sua composição, o fermento natural pode ser uma possível alternativa para a alteração dos níveis de acrilamida em produtos de panificação.

A panificação é um dos mais relevantes segmentos da indústria brasileira, visto que tem participação de 36% no setor de alimentos (SEBRAE, 2017). Segundo o relatório de indicadores da ABIP publicado em 2018 (ABIP - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA, 2018), estima-se que esse segmento seja responsável por cerca de 800 mil empregos diretos e 1,8 milhão de empregos indiretos no país. Nesse mercado, o pão francês é responsável por 52% do consumo de pães no Brasil, totalizando 11,76 kg de pães consumidos *per capita* anualmente (SEBRAE, 2017). Além disso, esse produto possui alta margem de contribuição, sendo de 82% por quilo produzido, representando entre 20% e 30% do lucro bruto das padarias (SEBRAE, 2009).

A reação de Maillard possui grande relevância na indústria alimentícia por garantir diferentes propriedades sensoriais desejáveis aos alimentos e, por isso, já é amplamente estudada desde que foi observada pela primeira vez em 1911 (GEORGE; MILTON, 1983). No entanto, tem como um de seus subprodutos a acrilamida. Em 2002, o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) realizado em parceria com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, sigla do inglês), determinou a toxicidade dessa substância (FAO; WHO, 2002), que foi classificada como possível carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) em 1994 (IARC, 1994). A acrilamida está presente em diversos

alimentos ricos em proteína e açúcares, que são processados à altas temperaturas, como batatas *chips* e produtos de panificação (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008; IARC, 1994).

Por causa do seu alto consumo, produtos de panificação são responsáveis por 10% a 20% da exposição à acrilamida (GROB, 2007). Considerando a importância econômica e social do pão francês no país, bem como a relevância de reduzir a concentração de acrilamida em tal produto, este trabalho buscou verificar o impacto do processamento no teor final de acrilamida do pão francês. Para isso foram analisados três tipos de fermentação: a fermentação tradicional, a fermentação natural e a fermentação híbrida, combinando os dois fermentos anteriores. Além disso, a aplicação da enzima asparaginase foi estudada na tentativa de diminuir a concentração de um dos precursores da reação de Maillard, a asparagina, e consequentemente a concentração de seus produtos e subprodutos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FERMENTAÇÃO

Definida como um processo de preservação e transformação de alimentos, feito a partir do crescimento e atividade metabólica de diferentes microrganismos, a fermentação é um tipo de processamento originado há milhares de anos (TEREFE, 2016). Porém, apenas em 1665 os microrganismos foram descobertos (GEST, 2004) e somente em 1877 houve associação de uma bactéria e suas transformações em um alimento, com a descrição da função das bactérias lácticas em leite fermentado (RAY; JOSHI, 2014). Os microrganismos que participam dos processos fermentativos em alimentos podem ser leveduras, fungos e bactérias (RAY; JOSHI, 2014). Este processo pode ser realizado de duas maneiras, espontaneamente ou pela adição de culturas ativas (ALEXANDRAKI *et al.*, 2012).

A fermentação possui grande aplicação devido às propriedades sensoriais desejáveis que atribui aos alimentos, como aroma, textura e sabor (TEREFE, 2016). Atualmente, existem também muitos estudos que relacionam esse processo com a obtenção de diferentes propriedades nutricionais, entre elas a melhor digestibilidade dos alimentos e maior biodisponibilidade de nutrientes (ŞANLIER; GÖKCEN; SEZGIN, 2019). Além disso, também é uma estratégia utilizada na redução da acrilamida (FREDRIKSSON *et al.*, 2004). Além dos benefícios nutricionais e sensoriais mencionados, a fermentação é um processo popular devido ao seu baixo custo e baixo consumo energético (LIU; HAN; ZHOU, 2011).

Sabe-se que as leveduras e bactérias ácido lácticas são microrganismos prevalentes em matrizes alimentares ricas em carboidratos, sendo conseqüentemente os mais comuns em produtos de panificação (RAY; JOSHI, 2014). Enquanto o fermento instantâneo comercial é composto por leveduras, o fermento natural é uma combinação de leveduras e bactérias ácido lácticas, sendo a última predominante (SALIM-UR-REHMAN; PATERSON; PIGGOTT, 2006).

2.2 FERMENTAÇÃO NATURAL EM PÃES

Muito utilizada no passado, a aplicação da fermentação natural foi reduzida a partir do surgimento do fermento comercial (SALOVAARA; VALJAKKA, 1987). Há alguns anos vem ganhando espaço no mercado por proporcionar aos pães propriedades sensoriais e nutricionais interessantes, como diminuição da necessidade da utilização de aditivos, pães com maior intensidade de sabor e maior vida de prateleira (STOLZ, 2010), modificações na reologia da massa (WEHRLE; ARENDT, 1998) e também nas suas propriedades físico-químicas (MARTÍNEZ-ANAYA; BENEDITO DE BARBER; COLLAR ESTEVE, 1994).

Para produzir o fermento natural, é necessário que seja feita uma “esponja”, uma mistura de água e farinha que é deixada em temperatura ambiente por várias horas, que possibilita o desenvolvimento de um ecossistema composto por leveduras e bactérias produtoras de ácido láctico (CATZEDDU, 2011). Existem três tipos de fermentos naturais definidos como Tipo I, Tipo II e Tipo III (CORSETTI; SETTANNI, 2007). Segundo esses autores, o fermento natural do tipo I é feito da maneira tradicional (mistura de partes iguais de água e farinha), e passa por “refrescos” diários para manter os microrganismos que o compõe ativos, sendo deste tipo o utilizado no presente trabalho. Ainda segundo o estudo citado, o fermento natural do tipo II é equivalente ao do tipo I, porém adicionado de fermento instantâneo comercial, utilizados com o intuito de acidificar os pães, fermentados por longos períodos e com textura semifluida. Por fim, os autores definem o fermento natural do tipo III como preparações secas de bactérias ácido lácticas resistentes ao processo de desidratação, também adicionadas de fermento instantâneo comercial.

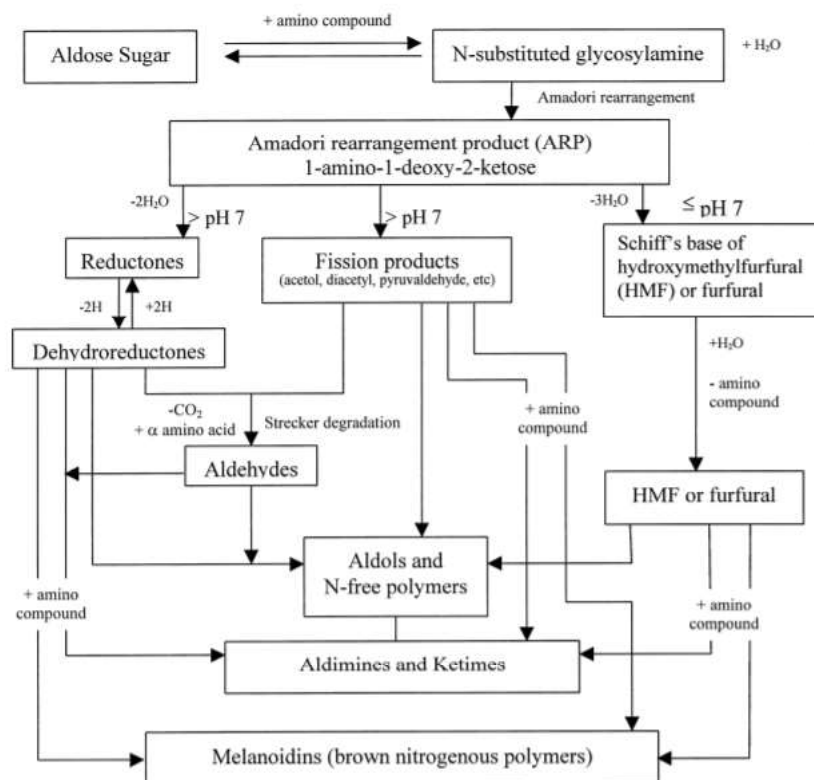
Panificadoras que trabalham com fermento natural podem utilizar apenas esse tipo de fermento em seus pães, porém sabe-se que também é utilizada uma fermentação híbrida. Isso significa que algumas padarias utilizam uma quantidade pequena de fermento instantâneo comercial para que se possa obter uma maior reprodutibilidade do produto final e também um melhor crescimento da massa. Essa estratégia não é apenas empírica, já que estudos mostrando que o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* melhora diferentes aspectos do produto final já foram publicados (CORSETTI et al., 2000; MEIGNEN et al., 2001).

2.3 REAÇÃO DE MAILLARD

Identificada pela primeira vez em 1912, a reação de Maillard recebe o nome do médico e químico que a descobriu (GEORGE; MILTON, 1983). É uma reação complexa, englobando não apenas um caminho reacional, e sim várias reações, sendo difícil de ser controlada, pois diversos fatores durante o processamento e a composição dos alimentos influenciam sua ocorrência (MARTINS; JONGEN; BOEKEL, 2001).

Ocorre quando um açúcar redutor reage irreversivelmente com uma amina (asparagina), formando uma base de Schiff, que em seguida passa pelo rearranjo de Amadori, produzindo os compostos de Amadori, que então podem gerar compostos de cor como as melanoidinas, e compostos de aroma e sabor como o maltol e o isomaltol (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008). A figura 1 mostra parte das etapas iniciais desta reação.

Figura 1: Etapas da reação de Maillard (MARTINS; JONGEN; BOEKEL, 2001).



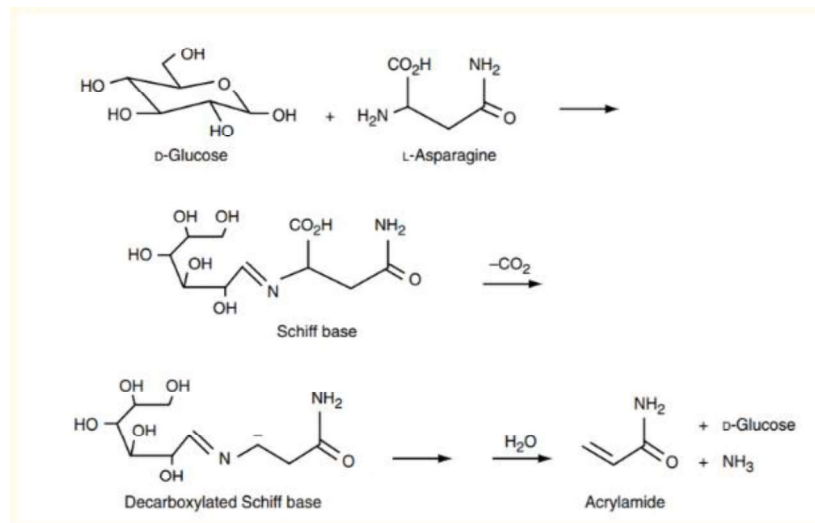
É classificada como uma reação de escurecimento não enzimático (GEORGE; MILTON, 1983). Fatores como pH, temperatura de processamento, atividade de água e composição do alimento afetam a intensidade da reação de Maillard (RAMÍREZ-JIMÉNEZ; GARCÍA-VILLANOVA; GUERRA-HERNÁNDEZ, 2002). Segundo Fennema et al (2008), diferentes açúcares redutores reagem a diferentes taxas, assim como aminas secundárias geram produtos diferentes de aminas primárias. O mesmo autor afirma que por ser uma reação com alta energia de ativação, a aplicação de temperaturas elevadas favorece sua ocorrência, bem como a atividade de água entre 0,6 e 0,7, sendo que a diminuição do pH resulta no efeito oposto.

Embora a caramelização também seja responsável pelo aroma e cor dos pães, a reação de Maillard contribui com aromas mais complexos, já que os aminoácidos presentes na farinha contribuem com átomos de nitrogênio e enxofre, produzindo novas famílias de moléculas, e conseqüentemente novas dimensões aromáticas (MCGEE *et al.*, 2004). Nos pães, a reação de Maillard, é responsável pela maioria das substâncias encontradas na casca, sendo furanos, pirróis, nitrilas e compostos sulfúricos cíclicos os predominantes (AMES, 1998). Apesar de produzir a acrilamida como subproduto, a reação de Maillard é bastante importante na indústria alimentícia pelas propriedades sensoriais já citadas, além de gerar também produtos com propriedades antioxidantes (CHUYEN, 1998).

2.4 ACRILAMIDA

A acrilamida resulta da interação entre açúcares redutores e o grupo α -amino da L-asparagina, que formam um intermediário chamado base de Schiff, que passa por uma descarboxilação, seguida que uma quebra entre a ligação carbono-carbono, formando este composto, conforme figura 2 (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).

Figura 2: Etapas da reação de formação da acrilamida (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).



Por ser subproduto da reação de Maillard (STADLER *et al.*, 2002), a acrilamida aparece em uma variedade de produtos alimentícios ricos em açúcares e proteínas, como produtos à base de batata, produtos de panificação e café (HELLENÄS, K, FOHGELBERG, P, FÄGER, U, BUSK; Z, ABRAMSSON, IONESCU, C, SANNER, 2013). Estima-se que seu consumo diário por humanos seja de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (U.S. FDA, 2009, 224481).

Possui diferentes impactos negativos para a saúde humana, como neurotoxicidade, provável carcinogenicidade nível 2 e toxicidade reprodutiva (US EPA, 2010), sendo seu nível de efeito adverso não observado (NOEL) de 0,5 mg/Kg mc/dia (FAO; WHO, 2002). Diferentes maneiras de se controlar o teor de acrilamida vem sendo estudadas a fim de minimizar a exposição à essa substância, e um manual de estratégias efetivas, já foi elaborado pela FAO (CODEX, 2009). As principais estratégias para diminuir a formação de acrilamida focam em reduzir ou diluir os precursores desta reação, principalmente a asparagina (KERAMAT *et al.*, 2011). Em produtos de panificação, ocorrem reduções significativas de acrilamida quando é feita a minimização da asparagina livre e quando o tempo de forneamento não é prolongado (ZHANG; ZHANG, 2007).

Estudos mostram que 99% da acrilamida presente em pães se encontra na casca (ŞENYUVA; GÖKMEN, 2005; SURDYK *et al.*, 2004). Isso ocorre pois o miolo

do pão atinge a temperatura de apenas 100°C, enquanto a formação da substância ocorre em temperaturas acima dos 120°C (CAUVAIN; SALMON; YOUNG, 2004).

2.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS

Descrito pela primeira vez em 2003 por Anastassiades *et al.*, o método de QuEChERS recebe esse nome como um acrônimo das palavras que o compõe, que significam rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (do inglês: **Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe). Consiste no uso de acetonitrila para extração líquido-líquido, seguido de purificação do extrato obtido utilizando uma fase sólida de extração em dispersão (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015).

Utilizado inicialmente em análises de resíduos de pesticidas, o método ganhou popularidade em análises de diferentes matrizes alimentares (RAHMAN *et al.*, 2016). Isso porque alimentos são materiais extremamente complexos e quando analisados necessitam de uma etapa de preparo da amostra, a fim de promover a extração e o enriquecimento do analito estudado, além de remover o máximo possível dos interferentes (PRESTES *et al.*, 2009).

Em 2006 foi realizada uma modificação no método de QuEChERS com a finalidade de utilizá-lo especificamente para a extração de acrilamida (MASTOVSKA; LEHOTAY, 2006). Estudos comprovaram que essa modificação já se mostrou eficiente para a extração de acrilamida em alimentos, possuindo taxas de recuperação satisfatórias (STEFANOVIĆ; DORDEVIC; JELUŠIĆ, 2017).

O método de QuEChERS possui vantagens significativas se comparado a processos de extração tradicionais, como altas taxas de recuperação, resultados acurados e baixa geração de resíduos pelo seu baixo consumo de solventes e baixa geração de resíduos (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015). Tendo em vista toda a problemática envolvendo a obtenção da acrilamida e as vantagens que apresenta, o método de QuEChERS foi utilizado para preparo de amostra no presente trabalho.

2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é definida como um método de separação físico, no qual os componentes a serem separados se distribuem em duas fases, a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária é composta mais comumente por um sólido que contribui para o processo de separação. A fase móvel, por sua vez, permeia a fase estacionária em uma direção definida, carregando os analitos. A cromatografia líquida em fase reversa, utilizada neste trabalho, ocorre quando a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, que é, em geral, um material microporoso a base de sílica com grupos alquil ligados quimicamente (ETTRE, 1993).

A detecção da acrilamida foi feita com a utilização de um detector do tipo “*Diode Array Detection*” (DAD), que se baseia na absorção da luz UV pelas substâncias analisadas na cromatografia. A quantidade de luz absorvida depende da quantidade de um composto específico que passa pelo feixe de luz em um determinado tempo (MALVIYA et al., 2010).

Embora a técnica de CLAE combinada com cromatográfica de massa seja amplamente utilizada para análise de acrilamida em alimentos (MEKAWI, 2015), a utilização de apenas CLAE é uma alternativa mais simples e barata, comparada a cromatografia de massa (MARCONI et al., 2010).

A técnica de CLAE juntamente com a detecção por DAD é utilizada para análise de acrilamida em diferentes matrizes (ZHANG; ZHANG; ZHANG, 2005), sendo eficiente em matrizes alimentícias (MARCONI et al., 2010) e também já bastante utilizada em produtos de panificação (MUTHAIAH et al., 2018).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a influência da fermentação convencional, natural e híbrida na formação de acrilamida em pães, bem como a avaliar a aplicação da enzima asparaginase para redução da asparagina. Como objetivos específicos têm-se:

- Desenvolver e comparar os efeitos de processos de fermentação natural, fermentação tradicional e fermentação híbrida sobre a concentração de acrilamida do pão francês;
- Avaliar diferentes tempos de fermentação para os três tipos de pães;
- Avaliar o impacto das diferentes fermentações na concentração de acrilamida no pão de fermentação tradicional;
- Avaliar diferentes concentrações de uso da enzima asparaginase com três concentrações diferentes (0,007%, 0,07% e 0,14%) em pães de fermentação tradicional;
- Avaliar a técnica de quantificação por CLAE-DAD quanto a sua sensibilidade.

4 METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO DOS PÃES

Nesse estudo, três pães foram desenvolvidos a partir da mesma receita base, com os seguintes ingredientes: farinha de trigo branca (Garota – Roseflor Alimentos), água potável, sal (Sal Lebre – sal marinho), melhorador de farinha (Pão Certo – Fleischmann) e fermento. Para a valiação do efeito da fermentação, as seguintes condições foram testadas: fermentação tradicional, fermentação natural e fermentação híbrida. Os fermentos utilizados foram o fermento comercial (Fermento Biológico Seco Instantâneo – Fleischmann), o fermento natural (farinha de trigo branca e água, 1:1 em massa), e a mistura de ambos descrita nas fichas técnicas presentes na figura 3. Todas as porcentagens descritas neste trabalho são porcentagens da massa de farinha utilizada, já que isso é o padrão utilizado no setor de panificação (SEBRAE, 2009).

Além dos ingredientes já citados, três outras amostras foram preparadas com a adição de três diferentes concentrações da enzima asparaginase (Acrilaway 3500 BG WF – Novozymes). As concentrações utilizadas foram de 0,07%, quantidade recomendada pelo fabricante, 0,007%, uma concentração dez vezes menor que a recomendada, e 0,14%, sendo essa quantidade vinte vezes maior do que a recomendada. Dessa maneira foi possível avaliar o efeito da enzima quando utilizada conforme recomendado, e também quando utilizada em quantidades maiores ou menores que a recomendada.

A modelagem dos pães foi feita em modeladora de cilindros (G. Paniza, MPS 250). Os pães foram fermentados a temperatura de 35°C em câmara de fermentação (PROGÁS, Climapão). Os tempos foram denominados F2 para 2 h, F4 para 4 h e F6 para 6 h.

Após a fermentação, os pães foram assados em forno turbo (Tedesco, FTT 80 E) à 200°C com utilização de vapor, por 10 min. Após assadas, as amostras foram resfriadas, pesadas, os miolos retirados e os pães pesados novamente, e então congeladas, se mantendo assim até a etapa de liofilização.

As cascas foram liofilizadas por cerca de 24h, até que a pressão do liofilizador estabilizasse. As amostras foram trituradas em liquidificador industrial da marca Tron e posteriormente maceradas em pilão de porcelana.

Figura 3: Fichas Técnicas dos pães contendo a quantidade de ingredientes utilizados.

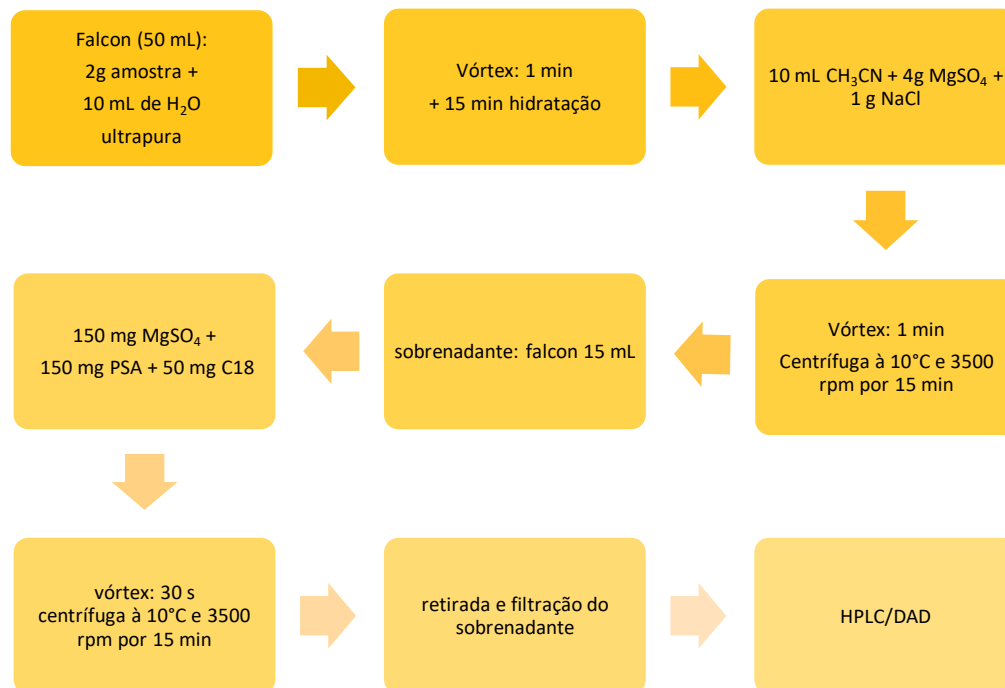
FICHA TÉCNICA			FICHA TÉCNICA		
DESCRIÇÃO DO PRODUTO: Pão tradicional			DESCRIÇÃO DO PRODUTO: Pão tradicional+ 0,14 enzima		
CÓDIGO DO PRODUTO: P1			CÓDIGO DO PRODUTO: P1 c/ 0,14		
RENDIMENTO DE PORÇÕES:	1		RENDIMENTO DE PORÇÕES:	1	
INGREDIENTES:	QUANTIDADES (g):	QUANTIDADES EM %:	INGREDIENTES:	QUANTIDADES (g):	QUANTIDADES EM %:
Farinha	35	100	Farinha	35	100
Água	21	60	Água	21	60
Sal	0,7	2	Sal	0,7	2
Fermento instantâneo	0,7	2	Fermento instantâneo	0,7	2
Melhorador de Farinha	0,35	1	Melhorador de Farinha	0,35	1
Asparaginase	0	0	Asparaginase	0,05	0,14
FICHA TÉCNICA			FICHA TÉCNICA		
DESCRIÇÃO DO PRODUTO: Pão fermento natural			DESCRIÇÃO DO PRODUTO: Pão tradicional + 0,07 enzima		
CÓDIGO DO PRODUTO: P2			CÓDIGO DO PRODUTO: P1 + 0,07		
RENDIMENTO DE PORÇÕES:	1		RENDIMENTO DE PORÇÕES:	1	
INGREDIENTES:	QUANTIDADES (g):	QUANTIDADES EM %:	INGREDIENTES:	QUANTIDADES (g):	QUANTIDADES EM %:
Farinha	30	100	Farinha	35	100
Água	14	60	Água	21	60
Sal	0,6	2	Sal	0,7	2
Fermento natural	7,5	25	Fermento instantâneo	0,7	2
Melhorador de Farinha	0,35	1	Melhorador de Farinha	0,35	1
Asparaginase	0	0	Asparaginase	0,025	0,07
FICHA TÉCNICA			FICHA TÉCNICA		
DESCRIÇÃO DO PRODUTO: Pão francês inst+nat			DESCRIÇÃO DO PRODUTO: Pão tradicional + enzima		
CÓDIGO DO PRODUTO: P3			CÓDIGO DO PRODUTO: P1 + 0,007		
RENDIMENTO DE PORÇÕES:	1		RENDIMENTO DE PORÇÕES:	1	
INGREDIENTES:	QUANTIDADES (g):	QUANTIDADES EM %:	INGREDIENTES:	QUANTIDADES (g):	QUANTIDADES EM %:
Farinha	30	100	Farinha	35	100
Água	14	60	Água	21	60
Sal	0,6	2	Sal	0,7	2
Fermento natural	7,5	25	Fermento instantâneo	0,7	2
Fermento instantâneo	0,03	0,1	Melhorador de Farinha	0,35	1
Melhorador de Farinha	0,35	1	Asparaginase	0,0025	0,007
Asparaginase	0	0			

Foram elaborados dois pães de cada formulação, de cada amostra foram realizadas duas extrações, e de cada extração foi realizada uma injeção no cromatógrafo, totalizando 4 replicatas de cada formulação.

4.2 EXTRAÇÃO POR MÉTODO QuEChERS

As amostras em pó foram submetidas ao método de extração QuEChERS para a obtenção da acrilamida. O fluxograma na figura 2 descreve o processo de extração, bem como as quantidades dos reagentes utilizadas no processo.

Figura 4: Fluxograma do processo de extração da acrilamida, QuEChERS.



Para a primeira parte da extração foram pesados 2 g de amostra em um tubo Falcon de 50mL, adicionados 10 mL de água ultrapura (H₂O UP), homogeneizados no vórtex e deixados por 15 min hidratando. Após essa etapa, foram adicionados 10 mL de acetonitrila (CH₃CN, *Sigma-Aldrich*, grau HPLC, ≥99,9%), 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄, Êxodo Científica, 98%) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl, Dinâmica, 99%), e então a mistura foi homogeneizada em vórtex (modelo AP 56, Phoenix Lufenco) novamente por 1 min. As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (modelo NT815, Novatecnica) à 10°C e 3500 rpm por 15 min. O sobrenadante (Figura 3) foi então retirado, colocado em um tubo falcon de 15 mL e

passado pela fase de “*clean-up*”. Nesta etapa, foi adicionado ao sobrenadante 150 mg de MgSO_4 , 150 mg de PSA (Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing, Sigma-Aldrich) e 50 mg de C18 (Discovery® DSC-18 SPE Bulk Packing, Sigma-Aldrich), e a mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 s, e centrifugada à 10°C e 3500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi retirado e filtrado com filtro de nylon com poro de 0,22 μm (Filtrilo, nylon) e colocado em *vial* de 1mL.

Figura 3: Imagem do processo de extração após a primeira centrifugação.



4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Para a realização da análise de cromatografia líquida foi utilizado o cromatógrafo Prominence da marca Shimadzu. Como fase móvel foram utilizadas água ultrapura e acetonitrila (Sigma-Aldrich, grau HPLC, $\geq 99,9\%$) na proporção de 95:5, respectivamente. As análises tiveram duração de 10 min e o fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min. A coluna utilizada foi CLC-ODS (M) (Shim-pack, 25cm, 4,6 x 250 mm,

5 μ m). Um padrão externo de acrilamida (*Merck*, $\geq 99\%$), diluído em acetonitrila, foi utilizado para construção da curva de calibração com 16 concentrações diferentes, conforme é mostrado na tabela 2. Os limites de detecção e quantificação da acrilamida foram determinados pelo método de regressão (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

Tabela 2: Pontos e concentrações utilizados na curva padrão.

Padrão	Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	50
2	500
3	1000
4	1500
5	2000
6	2500
7	3000
8	3500
9	4000
10	4500
11	5000
12	5500
13	6000
14	6500
15	7000
16	7500

4.4 CÁLCULO DE LoD E LoQ

Para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação da análise cromatográfica foi utilizado o método de regressão linear (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011). As fórmulas utilizadas para os cálculos foram: $\text{LoD}=3 \text{ Sa}/\text{b}$ para o cálculo do limite de detecção e $\text{LoQ}=10 \text{ Sa}/\text{b}$ para o limite de quantificação.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

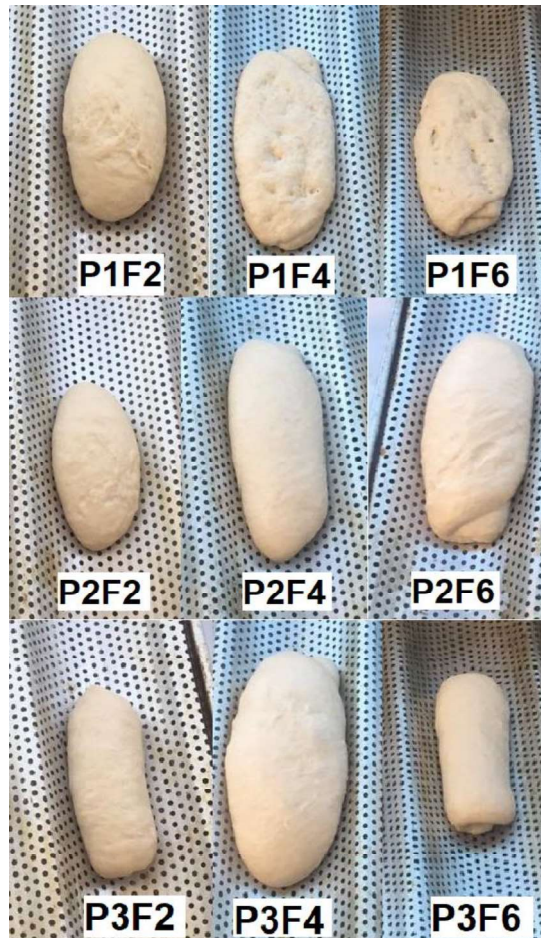
A análise de variâncias (ANOVA) foi utilizada para avaliar: (1) o efeito das diferentes concentrações da enzima (0%, 0,007%, 0,07% e 0,14%) sobre a concentração da acrilamida formada em pães com fermentação tradicional e, (2) a influência dos diferentes tipos de fermentações sobre a concentração de acrilamida em pães. Os pressupostos da ANOVA, normalidade e homogeneidade de variâncias, foram checados por meio dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como o pressuposto de homogeneidade de variâncias foi violado, foi utilizado o teste F de Welch (ou Welch ANOVA), que é a versão robusta da ANOVA. Em ambas as análises, para identificar quais grupos diferiram significativamente, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Holm. Todas as análises foram realizadas por meio do software R (R Core Team, 2018) e o nível de significância, α , foi de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS PÃES

Para cada tipo de fermento foram avaliados três tempos de fermentação. A figura 4 ilustra as diferenças visuais de cada pão nestes diferentes tempos. É possível ver que para a formulação P1 (fermento instantâneo comercial) o tempo mais adequado de fermentação observado foi de 2 h, pois, após este tempo é possível perceber que os pães murcharam, comportamento característico do excesso de fermentação. Para a formulação P2 (fermento natural) o tempo mais adequado de fermentação observado foi de 6 h, pois os pães fermentados por menos tempo possuem pouco desenvolvimento da massa, e menor volume comparados ao pão fermentado por 6 h. E para o pão de formulação P3 (fermento instantâneo comercial e natural), o tempo mais adequado de fermentação observado foi de 4 h, já que em 2 horas o pão ainda estava muito pequeno, e em 6 horas já começou a murchar (ABNT; SEBRAE, 2015).

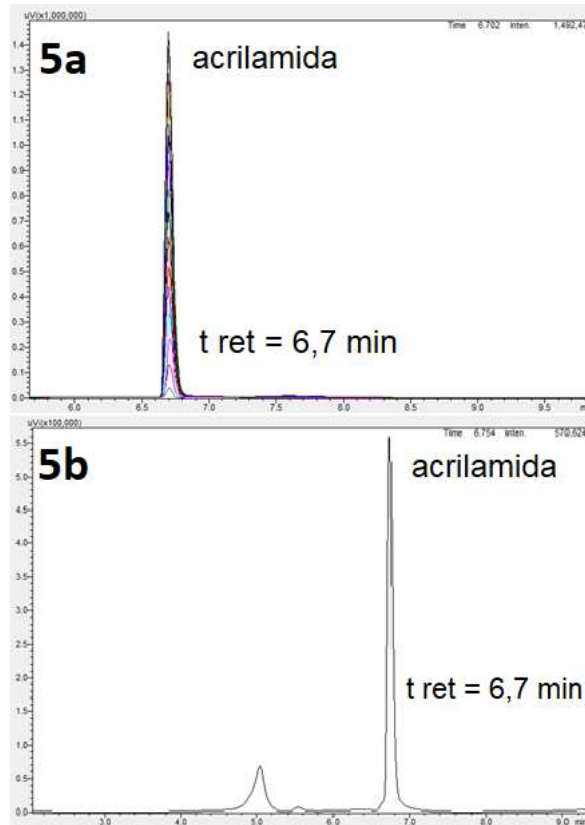
Figura 4: Imagens comparativas das diferentes receitas de pães e diferentes tempos de fermentação.



5.2 DETERMINAÇÃO DOS LoD E LoQ

Na figura 5a está apresentado o cromatograma das soluções utilizadas para a construção da curva padrão e na figura 5b do cromatograma da amostra de receita P1. A eluição da acrilamida ocorreu em torno de 6,7 min nas amostras, assim como nos diferentes pontos da curva de calibração elaborada com o padrão cromatográfico de acrilamida, e o limite de detecção encontrado foi de 54,65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e o limite de quantificação de 165,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Figura 5: Cromatograma e tempo de retenção do padrão de acrilamida utilizado para a construção da curva de calibração, realizados nas condições descritas no item 4.3 deste trabalho.



Os cromatogramas das amostras P2 (anexo I), P3 (anexo II), P1 com 0,007 (anexo III), P1 com 0,07 (anexo IV) e P1 com 0,14 (anexo V) de asparaginase, bem como a curva de calibração realizada (anexo VI) se encontram no anexo deste trabalho. As áreas médias das curvas cromatográficas, bem como os desvios padrão das amostras se encontram na tabela 3.

Tabela 3: Área média e desvio padrão das áreas dos cromatogramas das amostras.

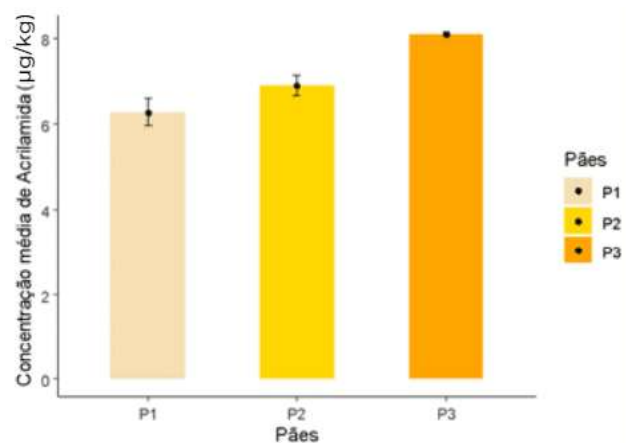
Amostra	Área média	Desvio Padrão
P1	2473592,25	233382,3773
P2	2704062,5	175073,9923
P3	3156269,75	34555,01324
P1 c/ 0,007	3127367,25	36832,48996
P1 c/ 0,07	2620122,5	55524,45451
P1 c/ 0,14	3023863,75	153127,4559

5.3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE FERMENTAÇÃO NOS NÍVEIS DE ACRILAMIDA FORMADOS

As concentrações médias de acrilamida encontradas nos pães foram de $1647 \pm 81 \mu\text{g/kg}$ para P1 (fermento instantâneo comercial), $1764 \pm 59 \mu\text{g/kg}$ para P2 (fermento natural) e $2153 \pm 10 \mu\text{g/kg}$ para P3 (fermento instantâneo comercial e natural). Esses resultados são similares a resultados encontrados na literatura para produtos de panificação a base de trigo (CLAEYS; DE VLEESCHOUWER; HENDRICKX, 2005; MUTHAIAH et al., 2018).

A figura 6 ilustra as diferentes concentrações de acrilamida em P1, P2 e P3, elaboradas com fermento instantâneo comercial, fermento natural e com a utilização dos dois fermentos, respectivamente. O gráfico de barras, mostra diferenças significativas nas concentrações de acrilamida dos pães elaborados ($F_{(2,5.72)} = 16,768$, $p\text{-valor} = 0,004052$). Na tabela 4 se encontram os valores de acrilamida encontrados nesses pães.

Figura 6: Concentrações de acrilamida nos pães submetidos a diferentes tipos de fermentação P1 (fermento instantâneo comercial), P2 (fermento natural) e P3 (fermento instantâneo comercial e natural).



Foi possível ver que a concentração média de acrilamida dos pães P1 e P2 ($1647 \pm 81 \mu\text{g/kg}$ e $1764 \pm 59 \mu\text{g/kg}$, respectivamente) não diferem significativamente entre si, porém diferiram significativamente da amostra P3 ($2153 \pm 10 \mu\text{g/kg}$). Uma possível explicação para esse aumento na concentração de acrilamida do pão com

fermentação híbrida é a combinação da utilização de fermentação natural e do menor tempo de fermentação utilizado se comparado ao pão de fermentação exclusivamente natural.

O aumento do nível de acrilamida em pães com fermentação natural foi observado no relatório elaborado pelo projeto HEATOX (*Heat Generated Food Toxicants*), um projeto financiado pela união europeia para analisar compostos tóxicos gerados por aquecimento em alimentos, que relata que o uso de fermento natural não reduz o nível de asparagina e também impacta negativamente o consumo dessa substância pela levedura, que indica que pães com uso de fermento natural podem apresentar maiores concentrações de acrilamida (SKOG, 2007).

Já foi observado também que ao se utilizar tempos maiores de fermentação para pães de fermentação natural, há uma redução de acrilamida se comparado a pães que fermentam por tempos menores (FREDRIKSSON et al., 2004). Portanto a utilização de fermento natural, aliado a fermentação por um tempo mais curto são possíveis explicações para o aumento de acrilamida no pão de fermentação híbrida.

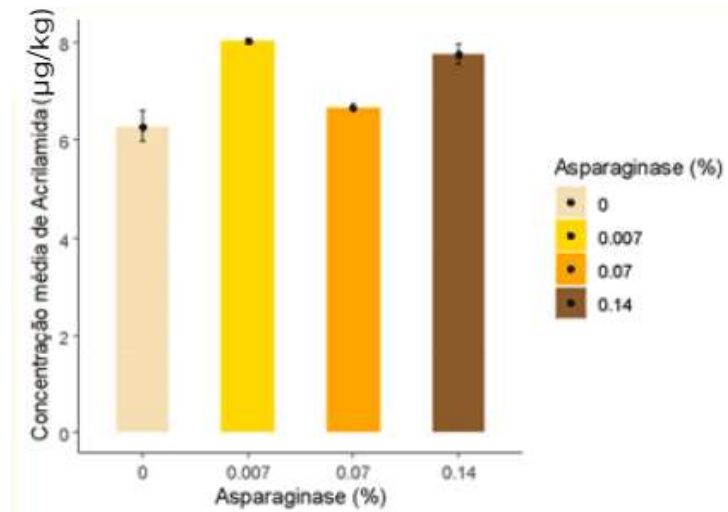
Tabela 4: Concentrações de acrilamida nos pães P1, P2 e P3.

Amostra	Concentração de Acrilamida μg/kg pão
P1	1647 ± 81
P2	1764 ± 59
P3	2153 ± 10

5.4 INFLUÊNCIA DA ENZIMA ASPARAGINASE NOS NÍVEIS DE ACRILAMIDA FORMADOS

A figura 7 representa os resultados das análises estatísticas para os pães submetidos a fermentação convencional (P1), e adicionados de diferentes concentrações da enzima asparaginase (0,007%, 0,07% e 0,14%) de asparaginase, que também apresentaram diferenças significativas entre eles ($F_{(3,5.96)} = 68.201$, p-valor= $5.25e^{-13}$). Na tabela 5 se encontram as concentrações de acrilamida nos pães P1 e as formulações com adição da enzima.

Figura 7: Gráfico de barras representativo das concentrações de acrilamida finais nas receitas P1, P1 com 0,007%, P1 com 0,07% e P1 com 0,14%.



Os pães P1 ($1647 \pm 81 \mu\text{g/kg}$) e P1 com 0,07% ($1805 \pm 19 \mu\text{g/kg}$) de asparaginase diferem significativamente dos pães P1 com 0,007% ($2270 \pm 11 \mu\text{g/kg}$) e 0,14% ($2121 \pm 55 \mu\text{g/kg}$) de asparaginase, sendo os últimos com as maiores concentrações de acrilamida. As amostras, no entanto, não apresentaram concentrações lineares entre elas. Cabe ressaltar que é importante garantir a interação enzima-substrato, e para isso, é sugerida a utilização de quantidades extras de água no alimento produzido a fim de garantir essa interação da asparaginase com o seu substrato (LAW; WHITEHURST, 2009). Essa é uma possível explicação para que as concentrações não tenham seguido um comportamento linear, já que as formulações foram feitas com a mesma quantidade de água presente na receita sem adição de enzimas.

Tabela 5: concentrações de acrilamida nos pães P1 e pães com adição da enzima.

Amostra	Concentração de Acrilamida $\mu\text{g/kg}$ pão
P1	1647 ± 81
P1 c/ 0,007	2270 ± 11
P1 c/ 0,07	1805 ± 19
P1 c/ 0,14	2121 ± 55

6 CONCLUSÕES

Para que os diferentes pães desenvolvidos nesse trabalho se adequassem as recomendações da ABNT para elaboração do pão francês, foram necessários diferentes tempos de fermentação para cada formulação. Os pães P1, P2 e P3 necessitaram de 2, 4 e 6 h de fermentação, respectivamente.

Os resultados encontrados sugerem que há uma tendência de aumento no teor de acrilamida com a utilização do fermento natural e com a utilização de tempos menores de fermentação. Isso indica que, mesmo com o apelo gastronômico e tecnológico que a fermentação natural apresenta, ela não se mostra uma alternativa para a redução dos níveis de acrilamida em pães.

As quantidades de acrilamida dos pães com a utilização de diferentes concentrações da enzima asparaginase não apresentaram resultados lineares. Este fato pode ser explicado pela não adição de uma quantidade extra de água às formulações que contem asparaginase, que é sugerida pela literatura para garantir uma melhor interação enzima-substrato. Isso motiva a realização de estudos com a utilização das enzimas e a adição extra de água nas amostras produzidas.

As análises realizadas no presente trabalho sugerem que há diferença no teor de acrilamida final dos pães com a utilização de diferentes tipos de fermentação, e impulsiona novos estudos que analisem a cinética de formação da acrilamida e a concentração de asparagina durante a fermentação.

7 BIBLIOGRAFIA

- ABIP - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA. Indicadores da panificação e confeitaria 2018. p. 12, 2018.
- ABNT, A. B. DE N. T.; SEBRAE, S. B. DE A. ÀS M. E P. E. **Guia de implementação pão tipo francês: Diretrizes para avaliação da qualidade e classificação**. [s.l.: s.n.].
- ALEXANDRAKI, V. et al. Status and Trends of the Conservation and Sustainable Use of Micro-Organisms in Food Processes. **Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture - Background Study Paper No. 65**, n. December, 2012.
- AMES, J. M. **Applications of the Maillard reaction in the food industry**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 1998. v. 62
- BARTKIENE, E. et al. Study on the reduction of acrylamide in mixed rye bread by fermentation with bacteriocin-like inhibitory substances producing lactic acid bacteria in combination with *Aspergillus niger* glucoamylase. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 35–40, 2013.
- CATZEDDU, P. **Sourdough Breads**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.
- CAUVAIN, S. P.; SALMON, S. S.; YOUNG, L. S. **USING CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY Proceedings of the Edited by**. [s.l.: s.n.].
- CHUYEN, N. V. Maillard Reaction and Food Processing. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, p. 364–369, 1998.
- CLAEYS, W. L.; DE VLEESCHOUWER, K.; HENDRICKX, M. E. Quantifying the formation of carcinogens during food processing: Acrylamide. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 5, p. 181–193, 2005.
- CODEX. Code of Practice for the Reduction of Acrylamide in Foods. p. 1–11, 2009.
- CORSETTI, A. et al. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives bread firmness and staling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 3044–3051, 2000.
- CORSETTI, A.; SETTANNI, L. Lactobacilli in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p. 539–558, 2007.
- ETTRE, L. S. Nomenclature for chromatography (iupac recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 819–872, 1993.
- FAO; WHO. Health Implications of Acrylamide in Food Report of a Joint FAO/WHO Consultation Issued by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations FOOD SAFETY PROGRAMME DEPARTMENT OF PROTECTION OF TH. n. June, p. 12–16, 2002.

- FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Food Chemistry**, 2008.
- FREDRIKSSON, H. et al. Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 5, p. 650–653, 2004.
- GEORGE, R. W.; MILTON, S. F. **The Maillard Reaction in Foods and Nutrition**. [s.l: s.n.].
- GEST, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. **Notes and Records of the Royal Society**, v. 58, n. 2, p. 187–201, 2004.
- GROB, K. Options for legal measures to reduce acrylamide contents in the most relevant foods. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 71–81, 2007.
- HELLENÄS, K, FOHGELBERG, P, FÄGER, U, BUSK, L.; Z, ABRAMSSON, IONESCU, C, SANNER, J. Acrylamide in Swedish food - targeted sampling 2011 and 2012. **Livsmedels Verket, National food agency.**, p. 1–29, 2013.
- IARC. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. 1994.
- KATINA, K. **Sourdough: A tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread**. [s.l: s.n.].
- KERAMAT, J. et al. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 530–543, 2011.
- LAW, B. A.; WHITEHURST, R. J. **Enzymes in Food Technology: Second Edition**. [s.l: s.n.].
- LIU, S. NA; HAN, Y.; ZHOU, Z. JIANG. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 643–651, 2011.
- MALVIYA, R. et al. High performance liquid chromatography: A short review. n. June 2010, p. 23–30, 2010.
- MARCONI, O. et al. Acrylamide risk in food products: The shortbread case study. **Analytical Methods**, v. 2, n. 11, p. 1686–1691, 2010.
- MARTÍNEZ-ANAYA, M. A.; BENEDITO DE BARBER, C.; COLLAR ESTEVE, C. Effect of processing conditions on acidification properties of wheat sour doughs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 249–255, 1994.
- MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; BOEKEL, M. A. J. S. VAN. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. v. 73, n. 6, p. 36, 2001.
- MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Rapid sample preparation method for LC-MS/MS

or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7001–7008, 2006.

MCGEE, H. et al. **ON FOOD AND COOKING The Science and Lore of the Kitchen COMPLETELY REVISED AND UPDATED**. [s.l.: s.n.].

MEIGNEN, B. et al. Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. **Food Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 239–245, 2001.

MEKAWI, E. M. Acrylamide Content in Selected Commercial Foods in Egypt Using High- Performance Liquid Chromatography. **International Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 10, p. 102–105, 2015.

MUTHAIAH, P. M. et al. HPLC-UV Quantitative Analysis of Acrylamide in Snack Foods of India. **Defence Life Science Journal**, v. 4, n. 1, p. 45–54, 2018.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

RAHMAN, M. et al. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for 2 pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography- A review. p. 1–33, 2016.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A.; GARCÍA-VILLANOVA, B.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E. Effect of toasting time on the browning of sliced bread. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 5, p. 513–518, 2002.

RAY, R. C.; JOSHI, V. Fermented Foods: Past, Present and Future. n. November, 2014.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 980–1010, 2015.

SALIM-UR-REHMAN; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R. Flavour in sourdough breads: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 10, p. 557–566, 2006.

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 & Technology**, v. 22, n. 6, p. 591–597, 1987.

ŞANLIER, N.; GÖKCEN, B. B.; SEZGIN, A. C. Health benefits of fermented foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 506–527, 2019.

SEBRAE. Encarte Técnico. 2009.

SEBRAE. Estudo de Mercado. p. 45, 2017.

ŞENYUVA, H. Z.; GÖKMEN, V. Survey of acrylamide in Turkish foods by an in-house validated LC-MS method. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 3, p. 204–209, 2005.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p. 21, 2011.

SKOG, K. The HEATOX project: Heat-generated food toxicants: Identification, Characterisation and Risk Minimisation. **Food Science and Technology**, n. 506820, 2007.

STADLER, R. H. et al. Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 449–450, 2002.

STEFANOVIĆ, S.; DORDEVIC, V.; JELUŠIĆ, V. Rapid and reliable QuEChERS-based LC-MS/MS method for determination of acrylamide in potato chips and roasted coffee. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 85, n. 1, p. 0–6, 2017.

STOLZ, P. Biological Fundamentals of Yeast and Lactobacilli Fermentation in Bread Dough. **Handbook of Dough Fermentations**, n. 1, 2010.

SURDYK, N. et al. Effects of Asparagine, Fructose, and Baking Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 2047–2051, 2004.

TEREFE, N. S. **Food fermentation**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 109

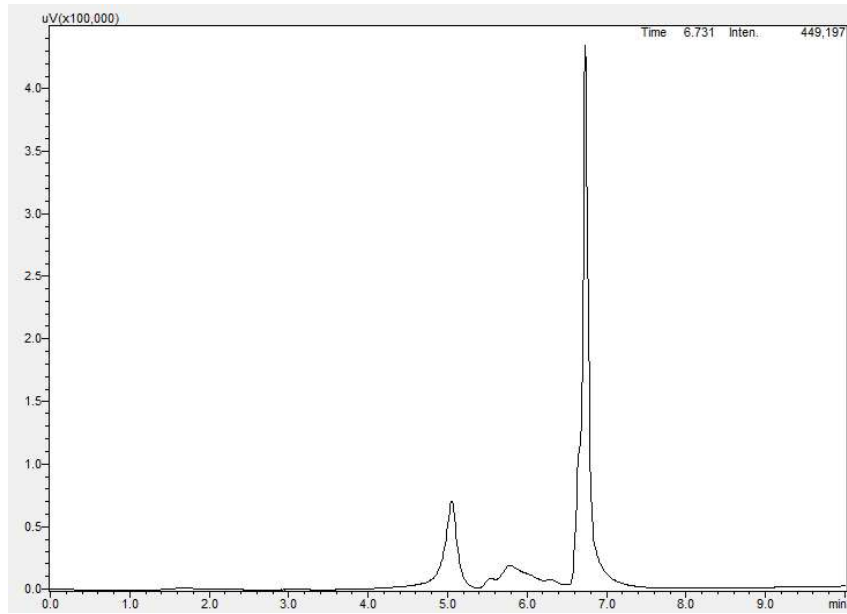
US EPA. Toxicological Review of acrylamide. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 39, n. 110, p. 759–786, 2010.

WEHRLE, K.; ARENDT, E. K. Rheological changes in wheat sourdough during controlled and spontaneous fermentation. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 6, p. 882–886, 1998.

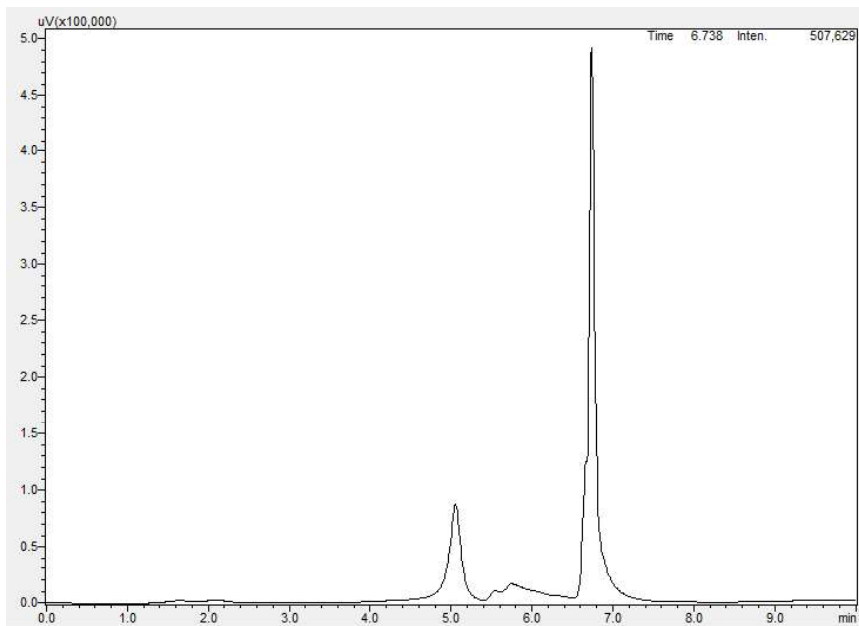
ZHANG, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, n. 1–2, p. 1–21, 2005.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Formation and reduction of acrylamide in maillard reaction: A review based on the current state of knowledge. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 5, p. 521–542, 2007.

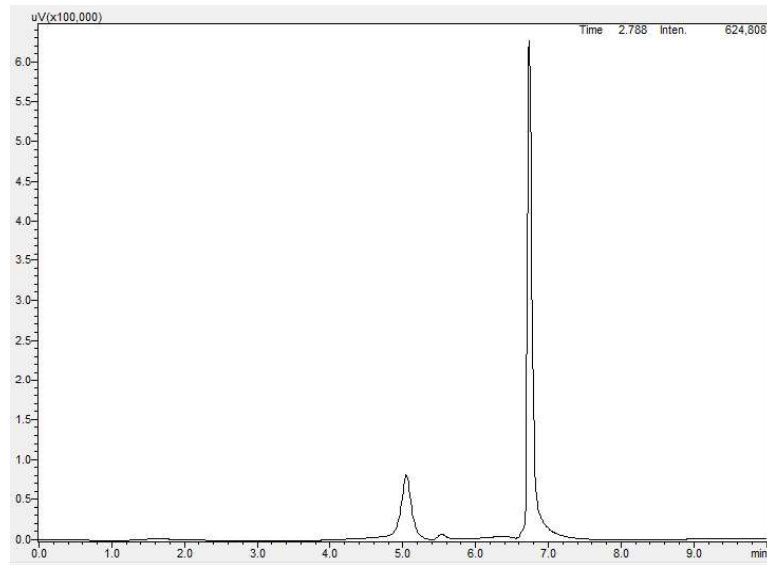
ANEXO I



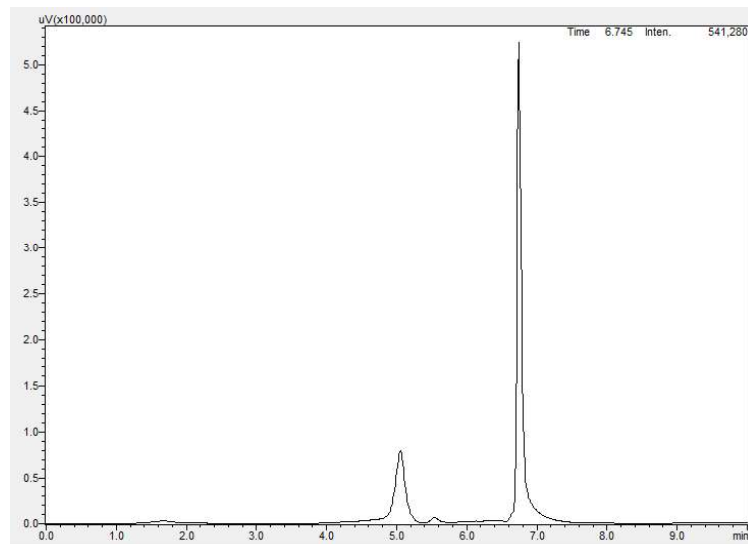
ANEXO II



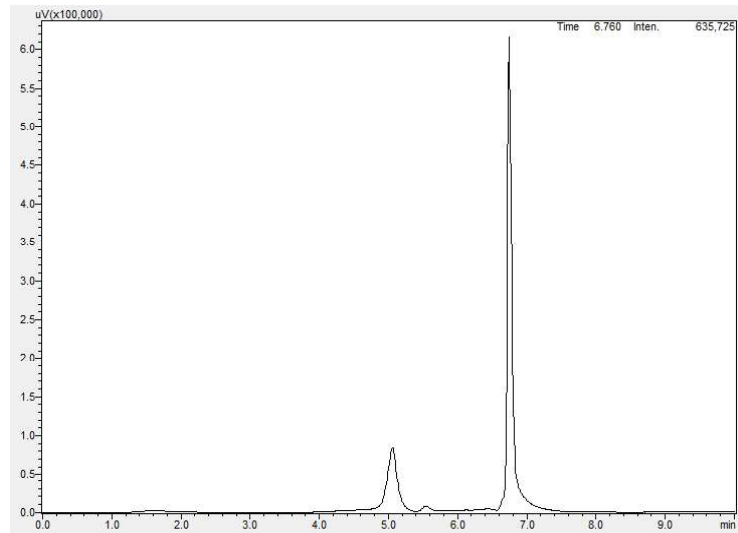
ANEXO III



ANEXO IV



ANEXO V



ANEXO VI

