



João Filipe Figueiredo Santos

Licenciado em Produção Alimentar em Restauração

Desenvolvimento de tecnologia para extensão do *shelf-life* do Pão de Forma de Mafra da empresa PaniMafra

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias de Produção e Transformação Agroindustrial

Orientador: Fernando José Cebola Lidon,
Professor Associado com Agregação, FCT/UNL

Co-orientador: Bruno da Luz,
Diretor de Produção, PaniMafra

Júri:

Presidente: Professor Doutor Henrique da Silva Reboredo

Arguente: Doutora Maria Manuela Abreu da Silva

Vogal: Doutor Bruno Caetano Acúrcio da Luz

Setembro 2017



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**



João Filipe Figueiredo Santos

Licenciado em Produção Alimentar em Restauração

Desenvolvimento de tecnologia para extensão do *shelf-life* do Pão de Forma de Mafra da empresa PaniMafra

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias de Produção e Transformação Agroindustrial

Orientador: Fernando José Cebola Lidon,
Professor Associado com Agregação, FCT/UNL

Co-orientador: Bruno da Luz,
Diretor de Produção, PaniMafra

Júri:

Presidente: Professor Doutor Henrique da Silva Reboredo

Arguente: Doutora Maria Manuela Abreu da Silva

Vogal: Doutor Bruno Caetano Acúrcio da Luz

Setembro 2017



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Lombada

Desenvolvimento de tecnologia para extensão do *shelf-life* do Pão de Forma de Mafra da empresa PaniMafra
João Filipe Figueiredo Santos

2017



Direitos de Cópia/Copyright – João Filipe Figueiredo Santos, FCT/UNL, UNL

“Desenvolvimento de tecnologia para extensão do *shelf-life* do Pão de Forma de Mafra da empresa PaniMafra”

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Lidon, coordenador do Mestrado em Tecnologias de Produção e Transformação Agroindustrial, pela simpatia, disponibilidade e paciência demonstradas ao longo do mestrado, do estágio e da elaboração desta tese.

Aos restantes professores do Mestrado em Tecnologias de Produção e Transformação Agroindustrial da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, uma vez que todos contribuíram de forma determinante na minha formação. Um bem-haja a todos!

Destacarei a Professora Doutora Maria Fernanda Pessoa pela preciosa ajuda dada no laboratório, principalmente ao nível da utilização dos aparelhos e na obtenção dos dados, e o Professor Doutor José António Almeida pelas fotografias dos bolores obtidas na lupa binocular.

Às investigadoras do INIAV, Ana Bagulho, Paula Scotti e Paula Coelho pelas ajudas na obtenção e tratamento dos dados.

Ao Dr. Luís Luz, sócio-gerente da PaniMafra e ao seu filho Bruno Luz (responsável da produção), pelo desafio proposto e pela oportunidade de poder realizar este projeto.

À Andreia e ao David pelo companheirismo demonstrado nas horas passadas no laboratório. À Patrícia pela companhia nas deslocações à empresa e pelos divertidos almoços.

Aos meus pais, aos meus avós e ao meu irmão por estarem sempre comigo em todos os momentos.

Aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, me acompanharam nesta caminhada.

À única pessoa que partilhou os meus desesperos, frustrações e angústias e que nunca me deixou desistir por mais sinuoso que se mostrasse o caminho, incentivando-me a continuar e a batalhar pelos meus objetivos e pela qual sinto um amor incondicional.

Obrigado!

Resumo

Este estudo tem por objetivo desenvolver tecnologia que permita alargar o tempo de vida útil (*shelf-life time*) do pão de Mafra, fabricado a partir de farinha de trigo e centeio, levedura, sal e elevada % de água, na sua versão “pão de forma” fatiado. A empresa garante apenas 1 dia de validade para o produto (o pão é produzido, distribuído e recolhido diariamente) mas pretende alargar para 5 dias. Para tal recorreu-se à utilização de aditivos alimentares com ação conservante, nomeadamente os aditivos E 210, E 211, E 219, E 260, E 280 e E 281, tendo sido preparadas soluções em água destilada e etanol absoluto conforme solubilidade.

A estratégia adotada consistiu na pulverização (exigência da empresa para utilização de todas as funcionalidades da sua máquina de embalagem) com aditivos sobre o pão fatiado (pulverização apenas da parte externa), sendo embalado de seguida e guardado num local seco e fresco. Diariamente efetuou-se uma vistoria a todas as amostras para análise de eventuais desenvolvimentos de bolores.

Foram realizados três ensaios em laboratório e um teste à escala industrial. Dos ensaios em laboratório foi possível concluir que os aditivos E 210 e E 219 demonstravam melhores resultados que os restantes, uma vez que conseguiam prolongar o *shelf-life* para 14 dias, conseguindo atingir-se os 21 dias numa amostra, mas apenas quando esta era constituída por três fatias de pão. À medida que se foi aumentando a dimensão da amostra para metade de um pão (o que equivale a 9 fatias) e, mais tarde, quando se tratou um pão inteiro (18 fatias) verificou-se que a ação dos aditivos diminuiu, começando o crescimento de bolores antes do 5º dia do tratamento. Este desenvolvimento ocorreu essencialmente na parte interna do miolo que não havia sido tratada, uma vez que a pulverização estava circunscrita à superfície do produto. Assim, o tratamento demonstrou não ser eficaz para garantir os objetivos estabelecidos. Paralelamente caracterizaram-se as farinhas utilizadas na preparação do pão e calculou-se, para as amostras de pão de forma de Mafra, o teor de cinzas (0,662%), o teor de matéria orgânica (51,073%), a humidade relativa (48,265%), os elementos minerais (com recurso ao *XRF Analyzer*) (Cl, K, S, P, Ca, Si, Zn, Mo, Zr, Nb, U, Sr, Rb) e a cor (com recurso a colorímetro que atua no espaço de cor CIELab) (h° miolo = 87,26; 68,16 ≤ h° côdeas ≤ 72,90). Efetuou-se também, uma análise sensorial hedónica, para verificar se a pulverização de aditivos afetou ou não as características organoléticas do pão em causa (sendo que as preferências recaíram sobre o pão não tratado – pão fresco). Os dados foram sujeitos ao teste ANOVA com um grau de significância de 5%, recorrendo à estatística do *Microsoft Office Excel 2007*.

Da análise da função dos aditivos com ação conservante, verificou-se que o elevado A_w do pão favoreceu a proliferação dos bolores, pelo que o tratamento apenas da superfície e não do

interior favoreceu a contaminação e a impossibilidade de calcular a quantidade de aditivo que realmente fica impregnado no produto.

Assim, recomenda-se que a empresa adote a via de incorporação de aditivos alimentares na massa do pão a fim de garantir uma distribuição uniforme dos mesmos, tanto no miolo como na côdea. Como nota futura poderia considerar-se a utilização de “Massas *Madres*”, pois já diversos estudos comprovaram a sua eficácia na extensão do *shelf-life* de produtos de panificação.

Palavras-chave: Aditivos Alimentares, Conservantes, Pão de Forma de Mafra, Pulverização, *Shelf-Life*

Abstract

The main aim of this study was to develop technology to allow the extension of the shelf-life of “Pão de Forma de Mafra”, manufactured with wheat flour and rye flour, yeast, salt and a high % of water, in the version of sliced form bread. The company guarantees only 1 day of shelf-life (the bread is produced, distributed and collected daily) but intends to enlarge that period for 5 days. To do so it was necessary the usage of preservatives such as E 210, E 211, E 219, E 260, E 280 and E 281, preparing solutions in distilled water and absolute ethanol according to the preservatives solubility.

The adopted strategy consisted on spraying (this process was a demand of the company to use all the functionalities of their packaging machine) the preservatives on the sliced bread (only spraying the surface, the crust), being wrapped after that and kept at a dry and fresh place. Daily the samples were checked to assess the growth of molds.

Three rehearsals were accomplished in laboratory and a test to the industrial scale has been made. About the rehearsals in laboratory it was possible to conclude that the preservatives E 210 and E 219 showed better results than the remaining ones, once they got to extend the shelf-life for 14 days, getting to reach the 21 days in a sample, but just when the samples were constituted by three slices. As the size of the sample was increased for half of a bread (which is the same as 9 slices) and, later, in the scale-up when a whole bread was treated (18 slices) it was noticed that the action of the preservatives decreases, beginning the growth of molds before the 5th day of the treatment. This growth occurred essentially in the intern part of the bread core that had not been treated, once the spraying was bounded only to the surface of the product. Though, the treatment proved himself not to be effective to guarantee the established goals. At the same time some analysis were made: description of the flours used in the preparation of the referred bread and several tests were made for the samples of “Pão de Forma de Mafra” such as the content in ashes (0,662%), the content of organic matter (51,073%), the relative humidity (48,265%), the mineral elements (handling the XRF Analyzer) (Cl, K, S, P, Ca, Si, Zn, Mo, Zr, Nb, U, Sr, Rb) and the color (handling a colorimeter which performs his action in the CIELab color space) (L^* of the bread core = 87,26; $68,16 < L^*$ of the crust $< 72,90$). It has also been made a hedonic sensory analysis, to check if the preservatives spraying affected the organoleptic characteristics of the bread or not (the preferences were clear and the fresh bread won when compared with the treated one). The data were processed using the ANOVA test with a 5 % significance level, using the statistics of Microsoft Office Excel 2007.

From the analysis of the preservatives used, it was verified that the high A_w of the bread favored the growth of molds, because the treatment only reached the surface and not the inside

core of the bread and so it favored the contamination, as well as the impossibility of calculating the amount of preservative that is really impregnated in the product.

It would be wiser for the company to mix the preservatives in the dough during the process to guarantee a uniform distribution of them, in the inside bread core and in the crust, assuring full protection and prevention. As a near future development, the company should consider the usage of sourdough, because it has already been proved by several scientific studies the real effectiveness in the extension of the shelf-life of bakery products.

Keywords: Food Additives, “Pão de Forma de Mafra”, Preservatives, Shelf-Life, Spraying.

Índice Geral:

1.	Objetivos	1
2.	Caracterização da Empresa PaniMafra	2
3.	O Pão	4
3.1.	História, Evolução e Importância	4
3.2.	Enquadramento Legal	6
4.	Principais Constituintes do Pão	8
4.1.	Farinha.....	8
4.1.1.	Glúten.....	10
4.1.2.	Amido	12
4.1.3.	Gelatinização e Retrogradação	13
4.1.4.	Parâmetros de Qualidade	14
4.2.	Água.....	15
4.3.	Sal	15
4.4.	Levedura.....	16
5.	Processo de Fabrico do Pão	17
6.	Pão de Mafra	22
7.	Microbiologia e Conservação do Pão	25
7.1.	Fungos	25
7.1.1.	Bolores.....	26
7.1.2.	Fatores de crescimento dos bolores	27
8.	Aditivos.....	31
8.1.	Definição e objetivos de utilização:.....	31
8.2.	Tipos de aditivos alimentares existentes	34
9.	Conservantes.....	38
9.1.	E 210 – Ácido Benzoico	39
9.2.	E 211 – Benzoato de Sódio.....	41
9.3.	E 219 – Sal Sódico do p-hidroxibenzoato de Metilo	42
9.4.	E 260 – Ácido Acético	43
9.5.	E 280 – Ácido Propiónico.....	44
9.6.	E 281 – Propionato de Sódio	45
10.	Material e Métodos.....	46
10.1.	Reagentes.....	46
10.2.	Amostras	46
10.3.	Materiais e Equipamentos	46

10.4.	Métodos	47
10.4.1.	Ensaio 1	47
10.4.2.	Ensaio 2	49
10.4.3.	Ensaio 3	49
10.4.4.	Ensaio em Contexto Empresarial	50
10.4.5.	Determinação da Humidade Relativa	51
10.4.6.	Determinação do Teor de Cinzas	52
10.4.7.	Determinação do Teor de Matéria Orgânica	52
10.4.8.	Análise da Cor	53
10.4.9.	Análise aos Elementos Minerais.....	54
10.4.10.	Análise Sensorial.....	55
10.4.11.	Identificação de Bolores ao MOC e à Lupa Binocular	55
10.4.12.	Análise Estatística	56
11.	Resultados e Discussão	57
11.1.	Parte 1 – Análises Diversas.....	57
11.2.	Parte 2 – Ensaio	63
11.3.	Parte 3 – Análise Sensorial	71
11.4.	Parte 4 – Identificação de Bolores	72
11.5.	Parte 5 – Soluções Propostas	74
12.	Conclusão	76
13.	Bibliografia	78
14.	Anexo 1 – Máquina de Fatiagem e Embalamento	86
15.	Anexo 2 – Questionário de Análise Sensorial Descritiva.....	89
16.	Anexo 3 – Questionário de Análise Sensorial Hedónica (aplicado)	91
17.	Anexo 4 – Dados HR, Cinzas e MO	92
18.	Anexo 5 – Resultados da ANOVA	93
19.	Anexo 6 – Tabelas do XRF	95
20.	Anexo 7 – Fotografias dos Ensaio Laboratoriais e em Contexto Empresarial	97
21.	Anexo 8 – Tabela Análise Sensorial Hedónica.....	105
22.	Anexo 9 – Bolores observados à Lupa Binocular e ao MOC.....	106

Índice de Figuras:

Figura 1 – Novo logótipo da empresa PaniMafra	3
Figura 2 – Constituição do grão de trigo	8
Figura 3 – Formação da rede de glúten através da gliadina e da glutenina	11
Figura 4 – O Processo de Fabrico do Pão	17
Figura 5 – Logótipo do Pão de Mafra	22
Figura 6 – Fluxograma de Fabrico do Pão de Forma de Mafra	24
Figura 7 – pH e Crescimento Microbiano.....	29
Figura 8 – Classificação dos Aditivos Alimentares.....	34
Figura 9 – Fórmula de Estrutura do Ácido Benzoico (E 210).....	40
Figura 10 – Fórmula de Estrutura do Benzoato de Sódio (E 211)	41
Figura 11 – Fórmula de Estrutura do Ácido Acético (E 260)	43
Figura 12 – Fórmula de Estrutura do Ácido Propiónico (E 280)	44
Figura 13 – Espaço de Cor CIELab.....	53
Figura 14 – Representação da Cor nas Coordenadas $L^*/C^*/h^\circ$	53
Figura 15 – Estruturas a Observar ao Microscópio Características dos Géneros <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	73

Índice de Quadros:

Quadro 1 – Composição nutricional da farinha vs Taxa de extração.....	9
Quadro 2 – Características de diferentes tipos de levedura	16
Quadro 3 – Ingredientes do Pão de Mafra.....	23
Quadro 4 – Composição Nutricional da forma de pão de Mafra	23
Quadro 5 – Géneros alimentícios nos quais a presença de um aditivo não pode ser autorizada	32
Quadro 6 – Classificação das classes funcionais de aditivos alimentares.....	35
Quadro 7 – Aditivos alimentares e respetivo código E	37
Quadro 8 – Materiais e Equipamentos utilizados	47
Quadro 9 – Concentrações dos reagentes utilizados no Ensaio 1	48
Quadro 10 – Concentrações dos reagentes utilizados no Ensaio 2	49
Quadro 11 – Concentrações dos reagentes utilizados no Ensaio 3	50
Quadro 12 – Concentrações dos reagentes utilizados a nível Industrial	50
Quadro 13 – Principais caraterísticas das farinhas utilizadas na PaniMafra.....	57
Quadro 14 – Valor do BAL do XRF e correlação com MO	60
Quadro 15 – Coordenadas de cor obtidas para o miolo e côdeas do pão de forma de Mafra ..	61

Índice de Gráficos:

Gráficos 1 e 2 – Curvas típicas do alvéografo para farinhas com pouco glúten (à esquerda) e com muito glúten (à direita)	14
Gráfico 3 – Problemas de amassadura e qualidade da massa obtida.....	18
Gráfico 4 – Maturação vs Taxa de Fermentação.....	20
Gráfico 5 – Composição média das amostras de pão de forma de Mafra.....	58
Gráfico 6 – Teor de humidade relativa (%) do pão de forma de Mafra.....	58
Gráfico 7 – Teor de cinzas (%) do pão de forma de Mafra.....	59
Gráfico 8 – Teor de matéria orgânica (%) do pão de forma de Mafra	59
Gráfico 9 – Elementos minerais presentes no pão de forma de Mafra	62
Gráfico 10 – Resultados do Ensaio 1	64
Gráfico 11 – Resultados do Ensaio 2	66
Gráfico 12 – Resultados do Ensaio 3	67
Gráfico 13 – Resultados do teste a Nível Industrial	69

Abreviaturas, Siglas e Definições

ACISM – Associação do Comércio, Indústria e Serviços do Concelho de Mafra

ANOVA – Análise de Variância

APT – Água Peptonada Tamponada

A_w – quantidade de água disponível no alimento, para o crescimento e desenvolvimento microbiano, desencadeando reacções que podem deteriorar o alimento

CMM – Câmara Municipal de Mafra

DRBC – *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar*

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points*

HR – Humidade Relativa

IGP – Indicação Geográfica Protegida

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

MOC – Microscópio Ótico Composto

MP – Matérias-Primas

NP – Norma Portuguesa

PCC – Ponto Crítico de Controlo

PM – Pão de Mafra

ppm – Partes Por Milhão

Shelf-life – período de vida útil de um género alimentício

Starters – culturas bacterianas iniciadoras

Target – público-alvo

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

VDR – Valor Diário de Referência

<LOD – Inferior ao Limite de Detecção

1. Objetivos

Com o presente trabalho que se dividirá em parte laboratorial (no laboratório da faculdade) e parte na empresa, onde se pretende verificar e, se possível, generalizar os resultados obtidos em laboratório, pretende-se:

- Caracterizar química e fisicamente o pão de forma de Mafra da empresa PaniMafra, através de testes que levem à caracterização das farinhas, à determinação do teor de cinzas, matéria-orgânica e humidade relativa, determinação dos elementos minerais e colorimetria;
- Seriar e testar um conjunto de aditivos alimentares com propriedades antifúngicas;
- Definir implicações decorrentes da aplicação de antifúngicos na extensão do *shelf-life* do pão de forma de Mafra;
- Analisar sensorialmente o produto obtido e verificar a conformidade do mesmo com a legislação em vigor;
- Incorporar esta etapa de adição de aditivos alimentares no processo de fabrico do pão de forma de Mafra já instaurado (utilizar a máquina de fatiagem e embalamento da empresa, dado que possui um pulverizador instalado).

2. Caracterização da Empresa PaniMafra

A empresa PaniMafra, cuja designação comercial é Pão Real, foi fundada em 1980 pelo Sr. Leonel Teotónio Acúrcio, pela sua esposa D.^a Maria Gertrudes Ferreira e pela sua irmã Maria Helena Acúrcio que juntos abriram a primeira padaria na pequena aldeia do Carvalhal perto de Mafra. Inicialmente começaram a cozedura do pão com apenas dois fornos a lenha, contando com a sabedoria e experiência de Maria Gertrudes Ferreira na arte de amassar e cozer o pão tradicional da região e com as capacidades comerciais de Leonel que se encarregava da venda e distribuição do apelidado “Pão de Mafra” pelas redondezas. Com o passar dos anos e com o aumento do número de clientes e, consecutivamente, de encomendas, isto é, para conseguirem fazer face à crescente procura a padaria foi sendo aumentada e modernizada, chegando aos dias de hoje com cerca de 60 trabalhadores (**Pão Real ^b, 2015**), 8 fornos de alvenaria com capacidade para cerca de 160 pães cada um e 1 forno metálico, moderna tecnologia para efetuar o aquecimento dos fornos (queimadores a gás), a divisão da massa bem como ao nível do embalamento e etiquetagem, possuindo também frota própria, com 14 carrinhas de distribuição e respetivos motoristas. A fábrica opera durante 363 dias por ano, labora em dois turnos distintos (turno do dia e turno da noite) e possui uma equipa independente para efetuar as operações de limpeza.

A gestão está ao cargo do arquiteto e genro do fundador, o Sr. Luís Luz, contando com a colaboração do filho Bruno Luz como supervisor da produção e engenheiros alimentares que garantem as condições de produção, o desenvolvimento de novos produtos bem como asseguram a higiene e a segurança alimentar.

Os clientes são vários, desde as mercearias e supermercados da região até grupos relevantes como os supermercados SPAR instalados em Portugal (maior cadeia de supermercados a nível mundial), os supermercados Pingo Doce do grupo Jerónimo Martins, a Padaria Portuguesa, o Recheio, o Meu Super, entre outros grupos de renome.

Eles denominam-se como “artesãos de pão” que valorizam “a tradição, a história e a cultura característica da região de Mafra” e assentam toda a filosofia num conjunto de valores essenciais para o sucesso, a saber: qualidade, frescura, sabor, dedicação e preço. Qualidade na seleção de ingredientes que asseguram um bom valor nutricional, frescura diária nos pontos de venda graças à eficaz rede de distribuição, sabor genuíno do pão pela utilização de farinhas artesanais e métodos de fabrico também eles artesanais, dedicação dos padeiros e procura de processos cada vez mais inovadores para se constituir um pão de excelência e ótima relação qualidade-preço, onde se oferece um produto autêntico e de qualidade *gourmet* a preços acessíveis aos consumidores (**Pão Real ^a, 2015**).

Em relação ao fabrico do pão propriamente dito afirmam que “o grande segredo é respeitar os tempos da natureza. Só assim se consegue um pão com características únicas, de sabor artesanal e qualidade comprovada” e que se orgulham da “herança cultural” e colocam “em cada fornada o... amor à arte de fazer pão”. Obviamente que o facto de utilizarem farinhas de moagem artesanal, de tenderem o pão manualmente e de o cozerem em fornos de alvenaria são fatores preponderantes para a obtenção de um produto final de elevadíssima qualidade. A moagem artesanal em mós de pedra dá origem a farinhas de moleiro de elevada qualidade, uma vez que não são branqueadas e albergam todos os constituintes do grão, incluindo o gérmen do trigo, o que por si só já confere um sabor único ao pão. Após a saída da máquina de corte a massa é colocada a descansar em tabuleiros e ganha a forma final pelas mãos hábeis e experientes dos padeiros quando é colocada em cima das pás de madeira que introduzem o pão no forno. Ora, é também o forno que confere certas características ao pão enquanto este coze, que por ser de alvenaria se apresenta redondo, com uma cúpula abobadada, tendo sido construídos segundo métodos artesanais transmitidos entre gerações **(Pão Real ^a, 2015)**.

No que respeita aos produtos fabricados são vários, a saber: pão de Mafra, forma de Mafra (ambos com farinha de trigo tipo 65, farinha de centeio tipo 130, água, sal e levedura fresca prensada), pão redondo saloio, pão alentejano, broa de milho, papo seco, pão integral, forma de aveia, forma de papo seco, bolas de mistura, bolinhas de Mafra, pão com chouriço, pão de hambúrguer, pão de leite e pão de deus **(Pão Real ^c, 2015)**.

Os produtos podem ser expedidos sem embalagem por exigência do cliente (normalmente acontece com pão que fornecem a mercearias ou pão destinado a ser vendido a peso num balcão nas instalações do cliente) ou embalados e rotulados num filme plástico microperfurado que foi recentemente alterado para conter o novo logótipo da empresa como se apresenta na figura seguinte (Figura 1):



Figura 1 – Novo logótipo da empresa PaniMafra (Designação comercial: Pão Real) (Fonte: <http://www.paoreal.pt/wp-content/uploads/2016/10/logo-carimbo.png>)

3. O Pão

3.1. História, Evolução e Importância

O consumo de pão reveste-se de uma enorme importância, na medida em que é mundialmente reconhecido como um elemento essencial na dieta alimentar, não só nos dias de hoje como desde o início do Neolítico (entre 10 000 e 3 000 anos a.C.) com o surgimento da agricultura na zona do Próximo e Médio Oriente (zona do crescente fértil) alastrando, posteriormente, ao continente europeu. A agricultura, a sedentarização e sobretudo a domesticação de espécies selvagens animais e vegetais são, contrariamente à corrente que afirma a existência de limitações económicas e de recursos no Mesolítico (período antecedente ao Neolítico), a expressão de uma mutação de ordem social e ideológica que conduz à modificação das relações profundas entre o homem e o mundo natural (**Cauvin, 1994 cf. Flandrin e Montanari ^a, 1998**).

Os cereais outrora selvagens passaram agora a ser cultivados (nomeadamente trigo e centeio) a par com a criação de gado servindo doravante para o fabrico de pão lêvedo, bolos e papas, constituindo a base da alimentação tradicional. A comprovar isto observa-se a abundância de mós de pedra e o especial cuidado que lhes é dedicado nas casas. Pouco mais tarde dá-se o aperfeiçoamento e inovação das estruturas de combustão como a construção de lareiras no interior das habitações e o surgimento dos primeiros fornos fechados com câmara de cozedura única, sendo idênticos aos fornos de pão tradicionais a lenha, existentes hoje em dia (**Flandrin e Montanari ^a, 1998**).

Já desde as primeiras civilizações (nomeadamente Sumérios e Acadianos) que a participação numa refeição tomada em comum é considerada como ponto máximo da união de indivíduos e sobretudo grupos familiares, sendo esta união expressa pela fórmula: “Comemos o pão, bebemos a cerveja e ungimo-nos com óleo” (**Durand, 1982 cf. Flandrin e Montanari ^a, 1998**), assumindo o pão, mais uma vez, uma posição de destaque nos hábitos alimentares e de subsistência das populações.

No Antigo Egipto os cereais trigo e cevada destinavam-se ao fabrico de pão para as classes sociais mais elevadas e à produção de cerveja, respetivamente, enquanto que as classes sociais mais modestas eram abastecidas com pão de espelta (**Flandrin e Montanari ^a, 1998**). Inicialmente o pão era preparado pela adição de água e sal à respetiva farinha, sendo a mistura amassada e cozida logo de seguida diretamente sobre uma pedra lisa colocada sobre o lume ou no lastro do forno aberto. Só mais tarde se começou a levedar os pães com a adição de fermento obtido a partir de massa velha (que ficava do dia anterior e era adicionada à massa nova do dia

seguinte). A partir de 1 500 a.C. passou a utilizar-se levedura sob a forma líquida, proveniente do fabrico de cerveja (**Darby et al, cf. Flandrin e Montanari ^a, 1998**). Os pães apresentavam formas diferentes, redonda, oval, triangular, semicircular ou cónica, podendo ser cozidos em formas de argila (**Lepsius, 1971 cf. Flandrin e Montanari ^a, 1998**).

É na Grécia Antiga, nos finais do século V a.C. que surgem os primeiros padeiros, nas cidades, como pequenos negociantes, os quais efetuavam tanto a moenda dos cereais como a cozedura e distribuição do pão propriamente dito. No império Romano o pão representa o alimento simbólico do cidadão soldado, uma vez que o trigo em grão se conserva bem e transporta com facilidade e, depois de transformado em pão era considerado o mais duro e mais compacto alimento cozido, tendo uma durabilidade alargada, satisfazendo as necessidades das legiões romanas em marcha (**Flandrin e Montanari ^a, 1998**).

Na Alta Idade Média (entre o século V e o século X), com os “retrocessos” inerentes em diversas áreas devido às constantes invasões, os principais cereais cultivados são a cevada, a espelta, o sorgo e o milho miúdo, bem como se utilizavam leguminosas reduzidas a farinha para o fabrico de pão. Como o teor em glúten era sobejamente inferior ao do trigo, os pães não se prestavam à fermentação dando origem a pães achatados, mais parecidos com fogaças. Eram cozidos debaixo de cinzas ou sobre placas de barro. Estes pães endureciam rapidamente, sendo mergulhados em água, vinho ou caldo para se poderem tragar (**Flandrin e Montanari ^a, 1998**).

Na Baixa Idade Média (entre o século XI e o século XV) recuperou-se o fabrico de pão com recurso ao trigo, tendo ocorrido uma evolução exponencial da padaria e das profissões associadas (moleiros, padeiros e forneiros). Nas cidades o pão de trigo marcava a civilidade urbana, havendo variedades diferentes conforme a classe social a que se pertencia: os privilegiados comiam pão com miolo branco e arejado, com uma leve crosta dourada, os burgueses e oficiais alimentavam-se do pão trigueiro ou escuro e os mais pobres alimentavam-se de pão integral ou «pão de tudo», servindo para todo o tipo de confeções culinárias (**Flandrin e Montanari ^b, 1998**).

No final do século XVIII, devido à grave crise económica que França atravessava, os cereais e, conseqüentemente, o pão eram escassos, levando à disseminação de um estado de fome e descontentamento generalizado da população que culminaria na Revolução Francesa e na decapitação do Rei Luís XVI e de Maria Antonieta.

Nos dias atuais houve uma “inversão de papéis”, dado que com o avanço técnico e científico se comprovou que cereais mais integrais, mais escuros e menos processados demonstram benefícios maiores para a saúde humana, daí a difusão alargada e o crescente interesse por este tipo de pães.

3.2. Enquadramento Legal

Em termos legais e de acordo com a **Portaria nº 52/2015** de 26 de fevereiro dos Ministérios da Economia, da Agricultura e do Mar e da Saúde, a qual fixa as características a que devem obedecer os diferentes tipos de pão e de produtos afins do pão ou de padaria fina, e regula aspetos da sua comercialização, define-se pão como o produto obtido da amassadura, fermentação e cozedura, em condições adequadas, das farinhas de trigo, centeio, tritcale ou milho, estremes ou em mistura, de acordo com os tipos legalmente estabelecidos, água potável e fermento ou levedura sendo ainda possível a utilização de sal e de outros ingredientes, incluindo aditivos, bem como auxiliares tecnológicos, nomeadamente enzimas, nas condições legalmente fixadas. Dentro da definição enunciada anteriormente existem diversos pães que diferem entre si pelo prazo de consumo (pão fresco *versus* pão de longa duração), pelo modo e técnicas de fabrico (pão tradicional, pão artesanal), pela origem e modo de cultivo dos ingredientes (pão biológico) e pelos processos industriais que sofrem (pão ralado). Existem ainda os produtos afins do pão ou de padaria fina (produtos originários de massas levedadas ou sovadas) e os produtos intermédios ou em processo de fabrico como sejam o pão pré-cozido, a massa de pão congelada e diversas massas semielaboradas.

Ainda segundo a mesma portaria e em relação aos tipos de pão (classificados de acordo com os tipos de farinha utilizados) existem: pão de trigo, pão de centeio, pão integral, pão tritcale, pão de mistura, pão de milho ou broa de milho e pão especial (nomeadamente pão de leite e pão tostado).

Para além dos ingredientes mencionados acima (farinha, água e levedura), os quais fazem parte da receita base de qualquer pão, podem ser utilizados aditivos (sorbatos, propionatos, entre outros), enzimas (lípsases, amílases, entre outras) e auxiliares tecnológicos (vinagre para acidificação das massas, por exemplo) que auxiliem o processo de fabrico e melhorem as características organoléticas, nomeadamente no que concerne ao aroma, cor, sabor e textura. Para tendedura do pão poderão ser usadas, sem prejuízo, quaisquer farinhas e sêmolas aptas à indústria da panificação.

Em termos das características analíticas do pão, nomeadamente o teor de açúcares totais (expresso em sacarose e referido à matéria seca) não deve exceder os 3% para a generalidade dos pães, reservando-se um limite máximo de 8% para o pão especial já referido e um intervalo entre 8% e 22% para os produtos afins do pão ou de padaria fina. No que respeita ao teor máximo de sal e segundo a **Lei nº 75/2009 de 12 de agosto**, admite-se um teto máximo para o conteúdo de sal no pão, após confeccionado, de 1,4 g por 100 g de pão, ou seja, 14 g de sal por quilograma de pão ou o correspondente 0,55 g de sódio por 100 g de pão. Excluem-se da

aplicação do disposto anteriormente, os pães reconhecidos como produtos tradicionais com nomes protegidos.

Relativamente à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios (no rótulo), a denominação dos diferentes tipos de pão deve incluir o termo «Pão» seguido da indicação da farinha utilizada no fabrico ou a indicação do ingrediente que o distinga (Exemplo: pão de trigo – feito essencialmente com farinha de trigo; ou pão de passas – feito com farinha de trigo, sendo adicionadas passas à massa, constituindo um pão diferente do anterior embora a massa seja a mesma). Poderão ser utilizadas também expressões tradicionais, regionais ou referentes ao formato do pão (Exemplo: pão de Cabeça), bem como o uso de qualificativos que se refiram a uma origem geográfica (Exemplo: pão de Rio Maior). O qualificativo «caseiro» poderá ser utilizado, desde que o pão ou os seus produtos afins ou de padaria fina não sejam fabricados em estabelecimentos industriais **(adaptado de Portaria nº 52/2015)**.

4. Principais Constituintes do Pão

4.1. Farinha

A farinha é obtida pela moagem dos grãos dos cereais, um processo que consiste na trituração do grão com a finalidade de se obter partículas com um tamanho mais apto para as mais diversas aplicações industriais ou culinárias (**Léon e Rosell, 2007**). Basicamente, é pela moagem e posterior trituração (do cereal descascado) que se dá a separação dos diversos constituintes do grão, ficando no final deste processo, misturados numa poeira fina, à qual se atribui o nome de farinha integral ou de rama (**Rodrigues, 2012**). Esta farinha integral possui então todos os constituintes do grão, nomeadamente o gérmen ou embrião rico em lípidos e proteínas, o endosperma que contém o amido e algumas proteínas e o farelo abundante em fibras (**Liu et al, 2015**). Na figura 2 é possível observar-se a constituição de um grão de cereal, neste caso de trigo:

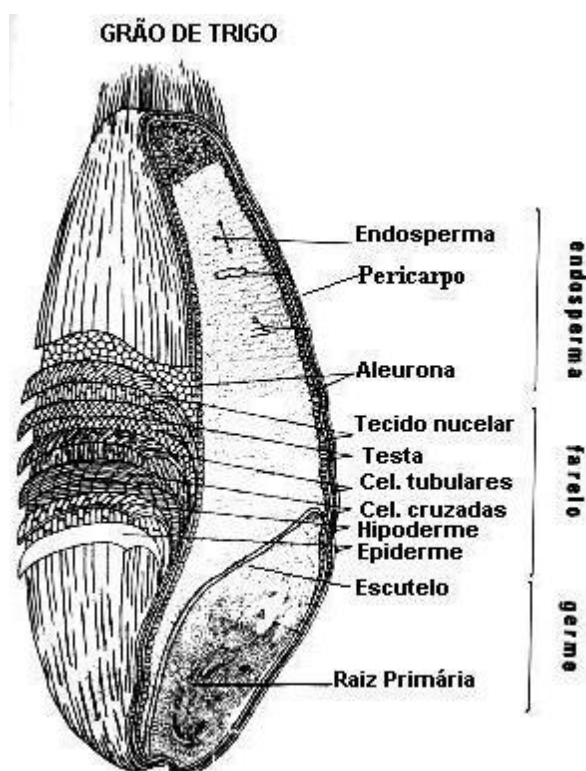


Figura 2 – Constituição do grão de trigo (**adaptado de Rodrigues, 2012**)

A farinha integral obtida na moagem é, posteriormente, sujeita a um processo de peneiração que permite a separação do endosperma dos restos dos invólucros ou farelo e que, dependendo do grau de peneiração assim se obtém maior ou menor quantidade de farinha de consumo. Quanto mais peneirada for a farinha mais branca será, contendo entre 60 a 65 % do

grão inicial, sendo uma farinha classificada como de baixo grau de extração (uma vez que a taxa de extração corresponde à percentagem de farinha que se obtém em relação ao peso total do grão). O contrário também é verdade, isto é, farinhas menos peneiradas, portanto, mais escuras por conterem entre 82 e 90 % do grão inicial são designadas por farinhas de alto grau de extração **(Ferreira, 1994)**. 100 % de taxa de extração significa que estamos na presença da farinha integral ou de rama que não foi peneirada, sendo uma farinha de alto valor nutricional, muito rica em fibras, vitaminas e minerais, contendo, no entanto, alto teor de ácido fítico que poderá comprometer a absorção de cálcio e ferro **(Brandão e Lira, 2011)**. No quadro seguinte (Quadro 1) é possível observar a variação da composição nutricional da farinha de trigo em função da taxa de extração:

Extração (%)	Calorias (g)	Glicídios (g)	Proteínas (g)	Lipídios (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Ferro (mg)
50	362,0	76,85	11,08	1,15	-	-	-
60	363,3	76,75	11,17	1,20	-	-	-
70	358,4	75,36	12,00	1,00	20	97	1,10
74	361,7	77,78	10,10	1,14	92	191	4,20
80	374,6	75,20	13,74	2,10	41	372	3,30

Quadro 1 – Composição nutricional da farinha vs Taxa de extração **(adaptado de Brandão e Lira, 2011)**

As farinhas indicadas para usos industriais, entre os quais se destaca a panificação, vêm descritas na **Portaria 254/2003 de 19 de março** e consideram-se as seguintes: farinhas de trigo (Tipos 45, 55, 65, 80, 110, 150), farinhas de centeio (Tipos 70, 85, 130, 170) e farinhas de milho (Tipos 70, 100, 175). Uma farinha de trigo Tipo 45 será muito mais refinada (mais branca) que uma farinha de trigo Tipo 110. Obviamente que poderão ser usadas outras farinhas para fabrico de pão (farinha de alfarroba, de arroz, de malte, entre outras), contudo são aplicadas numa percentagem bastante inferior às descritas na Portaria 254/2003, tendo de ser utilizadas sempre em combinação com as mesmas, para um bom resultado final.

O trigo é o cereal mais importante na área da panificação por causa do seu melhor desempenho na cozedura quando comparado com outros cereais **(Dziki et al, 2014)**. Isto deve-se aos elevados teores de proteínas e amido que possui, contribuindo para a textura, a retenção de gás e desenvolvimento de propriedades viscoelásticas por um lado (as proteínas – glúten) e para o melhoramento da textura do produto final e aumento do tempo de armazenamento por outro (o amido ao sofrer processos de gelatinização e retrogradação) **(Dias, 2008)**. O trigo comum (*Triticum aestivum*) é o mais usado em panificação, reservando-se o trigo duro (*Triticum durum*) para o fabrico de massas alimentícias e o trigo club (*Triticum compactum*) para o fabrico de bolos, bolachas e biscoitos **(Pessoa, 2016)**.

O centeio (*Secale cereale* L.) é o segundo cereal mais consumido na Europa (**Pawlak, 2015**), sendo muito utilizado em panificação conjuntamente com o trigo. A farinha de centeio produz um pão normalmente com uma coloração mais escura do que o obtido a partir somente de farinha de trigo. Esta diferença deve-se à maior quantidade de aminoácidos livres e açúcares, presentes na farinha, o que favorece a formação de compostos corados provenientes das reações de *Maillard* (reações de escurecimento não enzimático), que ocorrem aquando da cozedura (**Ribeiro, 2009**).

Existe um cereal criado pelo Homem, com recurso a técnicas de manipulação genética, que combina o trigo e o centeio, sendo conhecido como *Triticale*. Apresenta a rusticidade e a tolerância a condições desfavoráveis do centeio e é rico em glúten como o trigo. É um cereal essencialmente energético, sendo usado em rações para alimentação do gado (**Pessoa, 2016**).

4.1.1. Glúten

Designa-se por glúten, a rede viscoelástica tridimensional formada pelas gliadinas e pelas gluteninas (proteínas de reserva presentes em determinados cereais), quando misturadas com água e sujeitas a trabalho mecânico (energia mecânica) (**Dias, 2008**). É pelo trabalho mecânico que se imprime na massa durante a amassadura que se quebram as ligações químicas mais frágeis das proteínas (**Brandão e Lira, 2011**), havendo um desenrolamento das estruturas que, posteriormente, se ligam novamente entre si para formar então a rede de glúten. É esta rede de glúten que permite a retenção do dióxido de carbono proveniente da fermentação, fazendo com que o pão aumente de volume sem rebentar, devido à extensibilidade e consistência conferidas pelas proteínas supracitadas (**Food Ingredients, 2009**). As ligações de hidrogénio das cadeias laterais do amido são, também elas, umas das responsáveis na coesão do glúten quando à farinha é adicionada água (**Cornell e Hoveling, 1998**).

As gliadinas são proteínas de cadeia simples e são responsáveis pela consistência e viscosidade da massa, apresentando, no entanto, pouca resistência à extensão (**Food Ingredients, 2009**). São constituídas por cadeias únicas de polipéptidos capazes de formar algumas ligações dissulfeto intramoleculares, abundando as estruturas α -hélice e estruturas desordenadas, bem como β -turns (**Cauvain, 2003**). São extremamente pegajosas, contribuindo para a agregação dos restantes materiais que constituem a matriz do pão (**Dias, 2008**).

As gluteninas, por seu turno, são responsáveis pela elasticidade, extensibilidade, força e firmeza da massa (**Nobre, 2013**), uma vez que apresentam cadeias ramificadas (**Food Ingredients, 2009**). Estruturalmente as gluteninas são constituídas por cadeias proteicas ligadas por ligações dissulfeto intermoleculares, com regiões α -hélice, estrutura β e desordenadas

(Cauvain, 2003). Na figura seguinte (figura 3) é possível observar a combinação de gliadinas e gluteninas para formar o glúten:

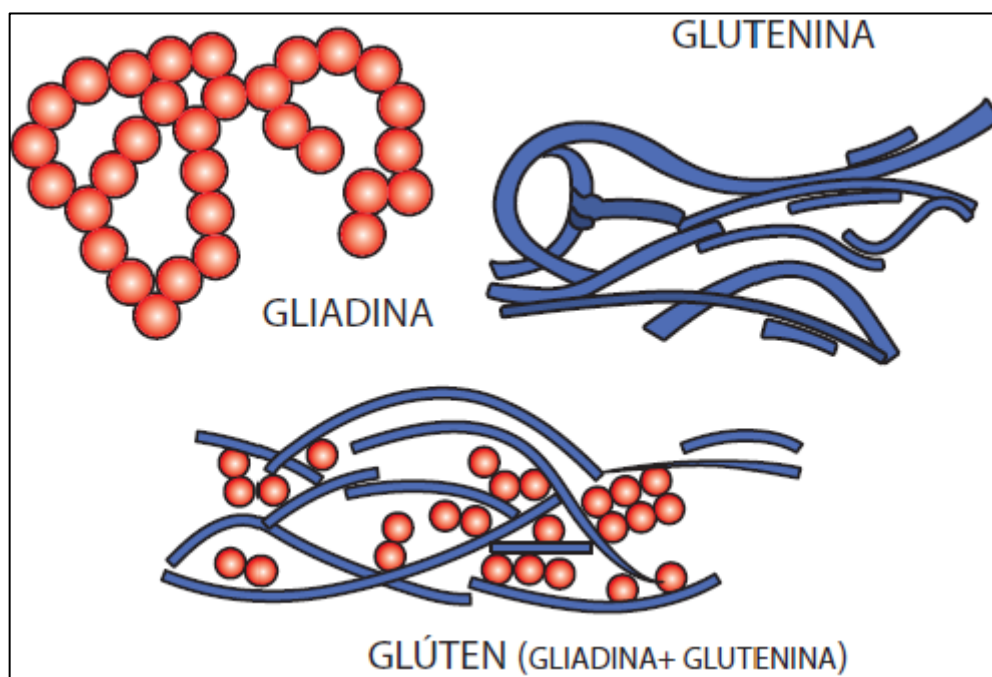


Figura 3 – Formação da rede de glúten através da gliadina e da glutenina (adaptado de Brandão e Lira, 2011)

As proporções destas duas proteínas são fatores determinantes para a qualidade da rede formada no processo de panificação e, consequentemente, para a qualidade do produto final obtido. Assim, proporções aproximadas de 50% para cada uma delas serão os valores ideais (Pité, 2007). Farinhas que tenham deficiências numa destas proteínas terão de ser corrigidas através dos agentes de tratamento das farinhas para que a qualidade do pão seja assegurada. Outro método passará pelo enriquecimento da farinha em glúten (Food Ingredients, 2009).

O glúten está presente nos cereais trigo, centeio e cevada e nos alimentos produzidos a partir dos mesmos e na aveia, sendo que poderá ser apenas por contaminação cruzada aquando o processamento/embalamento, (Escouto, 2004).

O glúten não é tolerado por todos os indivíduos da mesma forma, sendo que uns não são afetados pela ingestão de glúten e outros, os doentes celíacos, demonstram um conjunto de perturbações aquando da ingestão de glúten, como se explica seguidamente. Assim, a doença celíaca é uma doença autoimune que ocorre em indivíduos com predisposição genética, causada pela permanente sensibilidade ao glúten. Esta doença pode ser diagnosticada em qualquer idade e afeta múltiplos sistemas de órgãos e caracteriza-se por um estado de inflamação crónica da mucosa intestinal, cuja base são reações imunológicas complexas que vão induzir alterações na mucosa do intestino delgado, levando à diminuição da absorção de nutrientes e ao aumento

do risco de morbilidade e malignidade. Esta inflamação reverte aquando da exclusão do glúten da alimentação e reincide após a sua reintrodução na dieta. Assim sendo, o único tratamento disponível até à data consiste na prática de uma dieta isenta de glúten que se deverá manter para toda a vida **(APN, 2014)**.

Os principais sintomas associados a esta doença são distensão e dor abdominal, anorexia, diarreia, esteatorreia, flatulência, atraso no crescimento (caso das crianças), atrofia muscular, perda de peso e alterações comportamentais. Para se confirmar a doença celíaca deverão ser feitos os seguintes testes: análises ao sangue e às fezes para confirmar a má absorção dos alimentos, testes serológicos para detetar anticorpos da doença celíaca (anti gliadina, anti endosímio e anti transglutaminase) e finalmente efetuar uma biópsia intestinal para confirmar o diagnóstico **(APN, 2014)**.

Para se conferir a mesma estrutura aos produtos de pastelaria e padaria dirigidos aos celíacos é necessário trabalhar com polissacáridos hidrocolóides (isto é, polissacáridos que em contacto com água formam géis) como o agar, a goma xantana ou a metilcelulose, os quais desempenham o papel funcional do glúten nos alimentos (conferir extensibilidade e elasticidade às massas, auxiliando as fermentações pela retenção do gás). Obviamente que a sua ação será menos eficaz que o próprio glúten, mas ao aplicarem-se vários polissacáridos em conjunto conseguem obter-se resultados bastante satisfatórios, levando ao fabrico de alimentos com texturas e sabores aproximados aos alimentos que contêm glúten. Um dos maiores obstáculos aos alimentos sem glúten será o preço dos mesmos (substancialmente mais caros quando comparados com os mesmos produtos sem glúten) e a disponibilidade comercial.

4.1.2. Amido

A presença de glícidos é de grande importância no processo de panificação dado que servem de substrato para as leveduras (no seu processo de respiração anaeróbia – fermentação) que produzem o dióxido de carbono responsável pelo crescimento da massa. Os açúcares, juntamente com as proteínas, são responsáveis pela cor, sabor e aroma dos produtos de panificação devido às reações de escurecimento não enzimático (reações de *Maillard*) que ocorrem durante o cozimento da massa **(Dias, 2008)**.

A funcionalidade do amido influencia ou controla propriedades como a textura, o volume, a consistência, a humidade e o tempo de vida de prateleira dos alimentos **(Raeker et al., 1998, cf. Rodrigues, 2012)**.

Ora o amido é o principal glícido do trigo (entre 65 e 70 %) e é constituído por dois polissacáridos, a amilose e a amilopectina, que formam cadeias lineares e cadeias ramificadas,

respetivamente e que se ligam entre si por ligações glicosídicas. A amilose é um polímero linear constituído por unidades de glucopirranose com ligações glicosídicas α (1→4) entre elas (**Matsuda, 2007**). A amilopectina, por sua vez, é um polímero ramificado que possui um dos maiores pesos moleculares conhecidos de entre todos os polímeros que ocorrem na natureza. Este é constituído por unidades de glucopirranose unidas por ligações glicosídicas α (1→4). De aproximadamente 20 a 30 resíduos de glucopirranose, surge uma ramificação, onde uma cadeia de unidades de α (1→4) glucopirranosal está ligada à posição C-6 hidroximetil de um resíduo de glucose através de uma ligação glicosídica α (1→6) (**Karim, 2000, cf. Dias, 2008**).

Em termos percentuais, pode afirmar-se que a presença de amilose no amido é de cerca de 20 a 30% (**Weber et al, 2009, cf. Rodrigues, 2012**), sendo que a restante percentagem cabe à amilopectina, entre 72 % e 75 % (**Matsuda, 2007**).

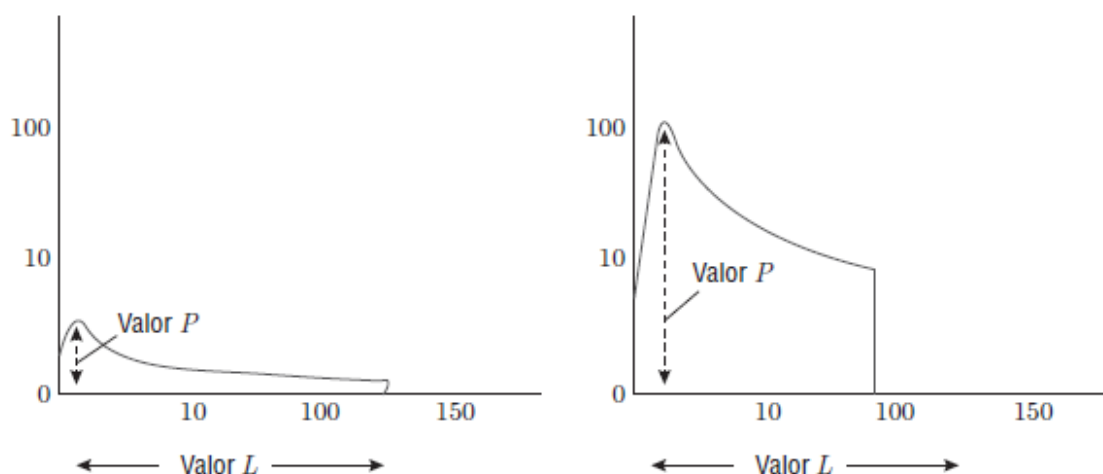
4.1.3. Gelatinização e Retrogradação

O amido tem pouca capacidade de absorver água, porém esta característica pode ser alterada pela ação do calor (**Nobre, 2013**). Assim, quando o amido entra em contacto com água e se atinge uma determinada temperatura (temperatura de gelatinização), na qual as ligações de hidrogénio mais fracas entre a amilose e a amilopectina são quebradas, há um inchamento dos grãos de amido e ocorre a formação de uma pasta viscosa. A este processo dá-se o nome de gelatinização (**Cauvain, 2003, cf. Dias, 2008**). Este processo continua até que os grânulos de amido entrem em rutura e a estrutura granular desapareça por completo. Ocorre na fase de cozedura, numa faixa de temperaturas compreendidas entre 60 e 90 °C (**Pateras, 1998, cf. Nobre, 2013**). De maneira inversa, quando a temperatura decresce e se atinge a temperatura ambiente, ocorre um processo denominado por retrogradação do amido, no qual ocorre um rearranjo das moléculas através de ligações de hidrogénio que se estabelecem entre as moléculas de amilose e as moléculas de água, favorecendo a recristalização (**Dias, 2008**). Se no processo de gelatinização ocorreu uma perda da organização estrutural, no processo de retrogradação dá-se uma reassociação das cadeias num estado mais ordenado (**Rodrigues, 2012**). Com esta recristalização ocorre também uma expulsão de água do sistema, o que contribui, no caso do pão, para um endurecimento do produto final e uma diminuição do tempo de prateleira (**Cauvain, 2003, cf. Dias, 2008**). Este fenómeno de retrogradação varia com a temperatura e tempo de armazenamento, pH, fonte de amido, presença de outros componentes (lípidos, eletrólitos e açúcares) e condições de processamento. Como exemplo e segundo **Eliasson (1996/2004)** e **Tharanathan (2002)** (**cf. Rodrigues, 2012**), os processos de congelamento/descongelamento aceleram fortemente o processo de retrogradação e de

sinérese (expulsão de água do sistema), o que assume especial importância quando se refere um pão pré-cozido que tenha sido ultracongelado.

4.1.4. Parâmetros de Qualidade

No alvéografo é realizada a hidratação constante e determina a reação da massa quando é sujeita a um esforço aplicado de insuflação. Permite registrar a P – tenacidade, L – extensibilidade, relação de equilíbrio P/L e W – Força (**Bagulho, 2016**). Do alvéografo saem curvas como as que se exemplificam nos gráficos seguintes (Gráficos 1 e 2):



Gráficos 1 e 2 – Curvas típicas do alvéografo para farinhas com pouco glúten (à esquerda) e com muito glúten (à direita) (**adaptado de Brandão e Lira, 2011**)

No farinógrafo é realizada a hidratação adaptada para conferir consistência constante e acompanha o comportamento da massa ao longo do processo de mistura, permitindo verificar se ela aguenta bem o processo ao longo do tempo ou não; registra a Ab – capacidade de hidratação da farinha, o TD – tempo de desenvolvimento da massa até atingir a consistência máxima, Estabilidade – o tempo durante o qual consegue aguentar essa consistência e o Grau de Enfraquecimento – a quantidade de consistência que se perde ao fim de 10 minutos (**Bagulho, 2016**).

O *Falling Number*, também conhecido como Índice de Queda, permite quantificar a atividade da alfa-amilase em produtos ricos em amido como é o caso dos trigos, das farinhas e das sêmolas. O método consiste na gelatinização rápida de uma suspensão aquosa de farinha, num banho de água fervente, e posterior degradação do amido por ação da alfa-amilase, em

condições similares ao cozimento do pão. Quanto maior for o valor obtido, em segundos, menor é a atividade enzimática da farinha (**Cerealis, 2017**).

4.2. Água

Juntamente com a farinha, a levedura e o sal, a água é uma das matérias-primas básicas, exercendo diversas funções como: facilitar o desenvolvimento do glúten, a rede proteica que se forma durante a amassadura e que dá à massa as suas características de elasticidade, dissolver os vários componentes da receita e permitir a sua dispersão na massa, facilitar a disponibilização dos nutrientes essenciais à levedura, permitir controlar a temperatura da massa, sendo adicionada mais quente ou mais fria para que se obtenha uma temperatura final ótima, contribuir para a consistência desejada da massa e contribuir para a conservação do pão (**Marques ^a, 2012**).

A água (da torneira ou de outra fonte diversa) que é usada em panificação não é 100% pura havendo diferentes minerais e outros componentes dissolvidos na mesma, os quais lhe conferem alguma dureza (presença de certos carbonatos e sulfatos), acidez (pH) e salinidade (teor em sais). Cada uma destas características tem o seu efeito próprio na atividade da levedura e nas características da massa como se observa: águas duras (isto é, água com elevados teores de carbonatos) endurecem excessivamente o glúten e atrasam a fermentação, sendo aconselhável aumentar a dose de levedura e a temperatura da massa, diminuir o sal e aumentar os tempos de fermentação; águas moles (águas com baixos teores de carbonatos) produzem massas descaídas e pegajosas, pelo que se aconselha reduzir a água, aumentar o sal e a dosagem do melhorante; e águas alcalinas (baixa acidez, pH alto) diminuem a atividade enzimática e fermentativa e dissolvem o glúten, sendo recomendável acidificar a massa (com vinagre como auxiliar tecnológico, por exemplo), usar “massa velha” e aumentar os tempos de fermentação (**Marques ^a, 2012**).

4.3. Sal

O sal (cloreto de sódio) utilizado na panificação apresenta diversas funções sensoriais e tecnológicas. Sensorialmente é responsável pelo sabor salgado que confere aos alimentos, tecnologicamente o sal é utilizado para controlar a taxa de fermentação uma vez que inibe o crescimento de leveduras, para reduzir a atividade da água (A_w) e prolongar o tempo de vida útil do pão (**Pflaum et al, 2013, cf. Pawlak, 2015**) e para fortalecer a rede de glúten, permitindo

uma maior retenção de gás, pela melhoria das características de viscoelasticidade da massa (Cauvain e Young, 2006, cf. Rodrigues, 2012).

4.4. Levedura

As leveduras exercem influência sobre as propriedades reológicas (propriedades de textura) da massa, tornando-a mais elástica e porosa, permitindo obter um pão mais digestível e nutritivo (Rodrigues, 2012). O tipo de levedura mais usada em panificação é a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a sua principal função a fermentação dos açúcares presentes na farinha produzindo CO₂. O gás produzido leva à expansão da massa, especialmente, durante a fermentação e no início da cozedura, sendo ainda responsável pela diminuição de pH e pelo desenvolvimento da massa (Nobre, 2013). A par desta produção de gás são ainda produzidos álcoois, os quais são preponderantes no sabor e aroma do pão (Pawlak, 2015). As leveduras são condicionadas na sua atividade por valores de pH menores que 3 (não atuam) e por temperaturas superiores a 55 °C (temperatura que dita o final da fermentação por morte das leveduras).

Existem diversas formas de utilizar e comercializar a levedura, e diferem entre si pelo estado físico final e pelos processos que lhe deram origem, bem como se destinam a padarias de maior ou menor dimensão. Existem assim a levedura líquida industrial, fornecida em camião cisterna refrigerado, a levedura líquida estabilizada (variante da anterior), a levedura seca instantânea e a levedura fresca prensada (esta será a mais utilizada para padarias de pequena/média dimensão) (Marques ^a, 2012). No quadro seguinte (Quadro 2) pode comparar-se os três tipos de levedura enunciados anteriormente:

	Levedura Líquida Estabilizada	Levedura Fresca	Levedura Seca Instantânea
Aplicação	Adicionada em qualquer altura da amassadura	Adicionada em qualquer altura da amassadura	Preferível adicionar no início do processo
Tolerância à Água Fria	Grande tolerância	Grande tolerância	Pouca tolerância
Homogeneização	Quase imediata	Alguns minutos	Alguns minutos
Conservação	Até 5 semanas	Até 6 semanas	2 anos
Estabilidade na Conservação	Sensível	Sensível	Não sensível
Armazenagem	Requer refrigeração	Requer refrigeração	Não requer refrigeração
Fator de Conversão em %	130 – 150 %	100%	30 – 35 %
Dosagem indicativa (% sobre a farinha)	3 – 10 %	2 – 8 %	1 – 3 %

Quadro 2 – Características de diferentes tipos de levedura (adaptado de Marques ^a, 2012)

5. Processo de Fabrico do Pão

Na generalidade todo o pão segue o mesmo fluxograma/diagrama de fabrico, sendo as etapas sequenciais compreendidas entre a mistura dos ingredientes e a cozedura. O que varia de tipo de pão para tipo de pão são os ingredientes adicionados e as respetivas proporções relativas, os tempos de amassadura, os tempos de fermentação e a temperatura da água adicionada (a qual depende da temperatura final da massa que se deseja, cujo cálculo entra em linha de conta com três fatores: temperatura da farinha, temperatura da água e tolerância da amassadeira, isto é, o calor libertado por fricção entre a massa, as paredes da amassadeira e o garfo da amassadeira e pela incorporação de ar à temperatura ambiente da padaria, sendo medida como a diferença entre a temperatura inicial da massa e a temperatura final da mesma no término da amassadura) (Marques ^b, 2012).

Genericamente assume-se o seguinte diagrama para o processo de fabrico de pão (Figura 4):

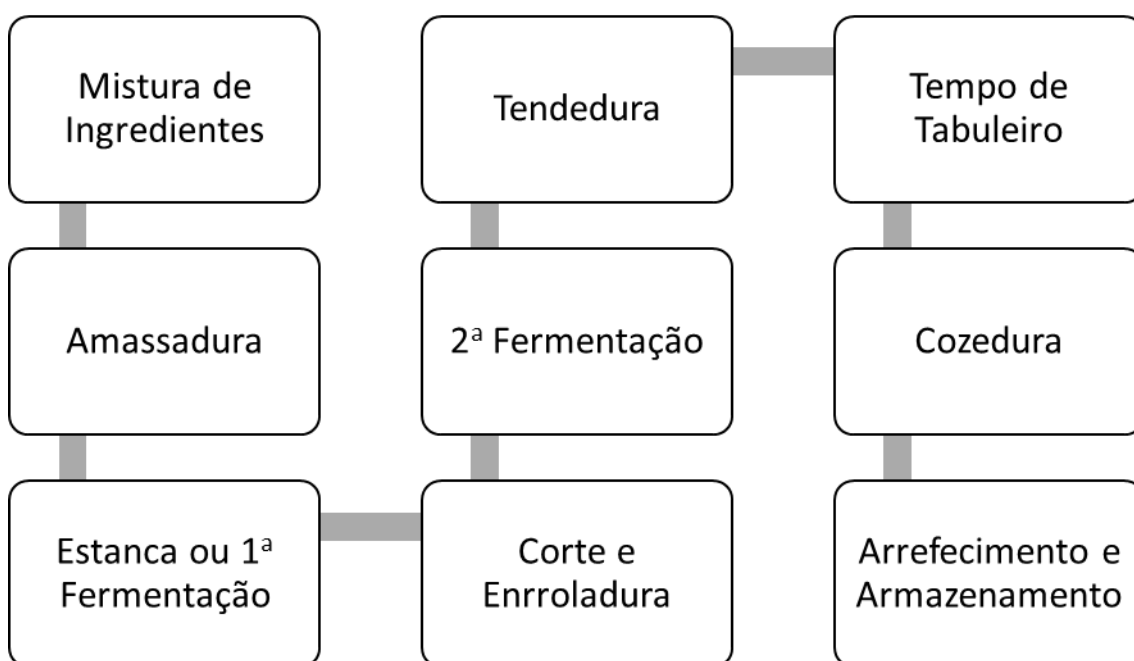


Figura 4 – O Processo de Fabrico do Pão (adaptado de Marques ^b, 2012 e Nobre, 2013)

Após a pesagem e colocação dos ingredientes secos na cuba da amassadeira vai-se adicionando a água aos poucos, sendo que no início se coloca a amassadeira em 1ª velocidade para que ocorra a mistura e a hidratação dos ingredientes (primeiras funções da amassadura). Seguidamente, quando estas funções estão asseguradas passa-se para a 2ª velocidade (uma velocidade superior) para que ocorra o desenvolvimento da rede de glúten e para que se dê a distribuição das células de levedura e o arejamento da massa (incorporação de oxigénio na

matriz). O oxigénio incorporado vai constituir os núcleos de gás, os quais irão expandir durante a fermentação (**Bloksma e Bushuk, 1988**). Quando estas funções estão asseguradas significa que a amassadura deverá ser interrompida sob pena de se atingir uma massa sobre desenvolvida, a qual conduzirá a uma manipulação posterior dificultada e a obtenção de pão de inferior qualidade. Para se determinar qual o ponto ideal onde parar a amassadura podem seguir-se várias dicas como a observação da massa, que deverá apresentar-se macia, com pouca humidade e não se deverá agarrar às paredes da amassadeira ou então poderá realizar-se o teste do véu no qual se destaca uma pequena porção de massa da amassadeira e se estica a massa cuidadosamente em todas as direções (usando a ponta dos dedos) até formar um véu ou membrana fina. Por fim avalia-se o estado de elasticidade/resistência da massa. Se o véu formado for suficientemente fino e não quebrar, significa que a massa está no ponto ótimo (**Marques ^b, 2012**). No gráfico seguinte (Gráfico 3) podem observar-se as consequências de amassaduras deficientes ou excessivas, as quais originam problemas ao nível do desenvolvimento do glúten e, consequentemente, problemas de qualidade do produto final.

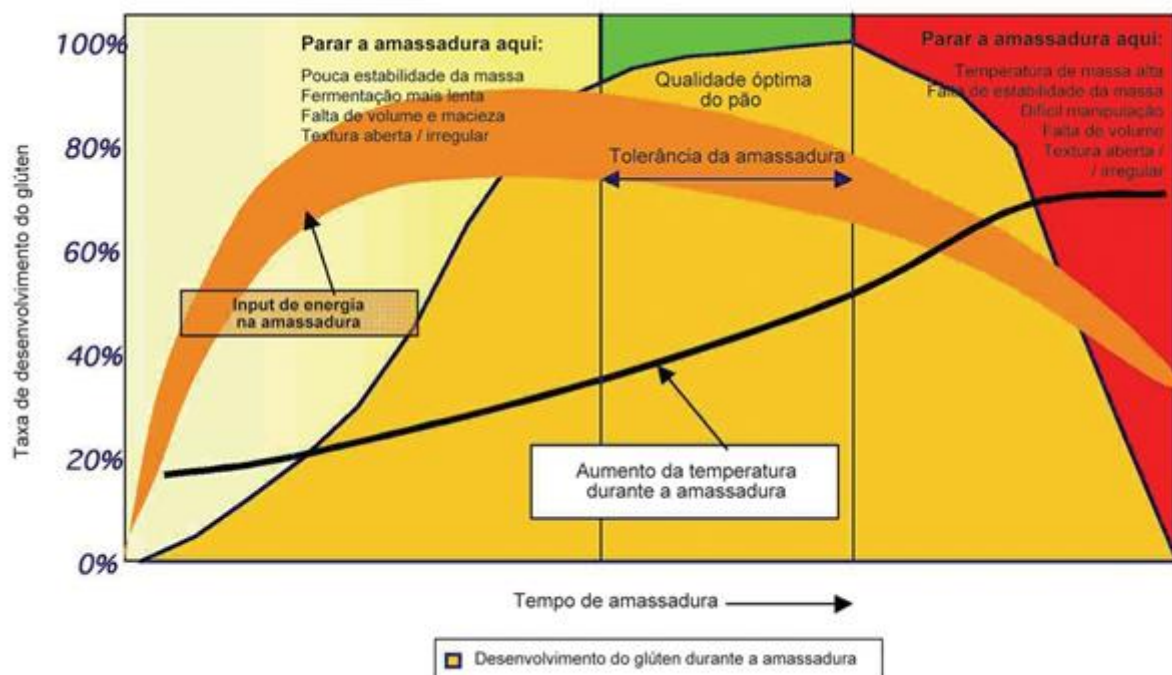


Gráfico 3 – Problemas de amassadura e qualidade da massa obtida (**adaptado de Marques ^b, 2012**)

Durante a 1ª fermentação ou estanca ou fermentação longa ocorre a ação da levedura presente pela conversão dos açúcares na massa. Os primeiros açúcares a serem utilizados são a glicose e a frutose e, de seguida, os açúcares provenientes da hidrólise da maltose pelas amilases. As leveduras utilizam estes compostos como substrato para a sua respiração anaeróbia, realizando a fermentação alcoólica que dá origem à produção de etanol, dióxido de

carbono e compostos secundários como ácidos orgânicos, ésteres e outros álcoois. O etanol e os compostos secundários são essenciais para o sabor e aroma característicos do pão. Já o dióxido de carbono é fulcral para a expansão da massa e consequente aumento de volume, para que se obtenha um miolo alto e fofo, com uma miga regular. O aprisionamento deste gás fica a cargo da rede de glúten formada, a qual dada a sua extensibilidade e elasticidade consegue reter o gás sem rebentar **(Nobre, 2013)**. É nesta altura que ocorre também a maturação da massa.

A fermentação depende de diversos fatores como sejam a qualidade da farinha, a temperatura final da massa, a temperatura de fermentação, a percentagem de humidade relativa presente na atmosfera de fermentação, o tipo de pão, a consistência da massa, a percentagem de levedura adicionada, a percentagem relativa de cada ingrediente e o tipo de processo de fabrico selecionado **(Marques^b, 2012)**.

Contudo, o fator mais importante de todos será a temperatura de fermentação, uma vez que a maturação/desenvolvimento da massa e a produção de dióxido de carbono têm as suas taxas máximas a diferentes temperaturas, sendo que a temperatura ótima para a atividade da levedura (e produção de CO₂) é superior à temperatura ótima para a maturação da massa. Este facto introduz uma dualidade que deverá ser gerida por forma a evitar erros de fermentação e originar produtos finais de menor qualidade **(Idem, 2012)**.

Assim, quando a temperatura na câmara de fermentação é alta (de 35 °C ou mais) a levedura fica extremamente ativa, produz grandes quantidades de gás (CO₂) e a levedação dá-se mais rapidamente. No entanto, a massa não faz o seu desenvolvimento (maturação) à mesma cadência, o que significa que no momento em que a massa atinge a altura ou o volume requerido para ir ao forno não está ainda suficientemente desenvolvida até ao nível ótimo de maturação. O mesmo acontece quando se adiciona demasiada levedura, isto é, dá-se uma fermentação extemporânea, forma-se uma textura irregular e perde-se volume e macieza. Por outro lado, quando a temperatura da massa é demasiado baixa (ou diminui durante o processo) a produção de CO₂ pela levedura abranda comparativamente com a velocidade de maturação da massa e atinge-se a maturação ótima sem que o volume necessário tenha sido atingido **(Idem, 2012)**. Temperaturas entre os 26 e os 28/29 °C são as consideradas ideais para a conciliação dos dois fatores supramencionados.

No gráfico seguinte (Gráfico 4) é possível observar a evolução da maturação da massa e a discrepância com levedações demasiado rápidas (as quais advêm de temperaturas de fermentação muito elevadas, logo produz-se muito CO₂, o pão ganha muito volume, não havendo um acompanhamento adequado da maturação da massa) e com levedações demasiado lentas (nas quais a temperatura é muito baixa, e já se tendo atingido o nível de maturação ideal, ainda não se produziu a quantidade ótima de CO₂). Observa-se ainda a

levedação considerada normal (a verde) onde se tenta otimizar a maturação/desenvolvimento da massa e a produção de dióxido de carbono.

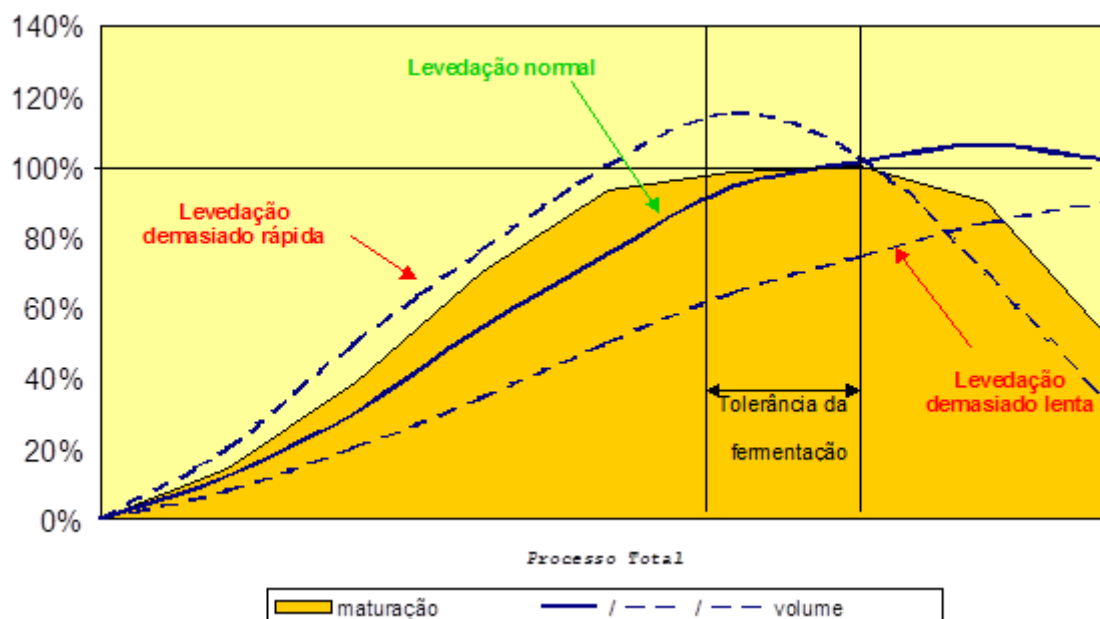


Gráfico 4 – Maturação vs Taxa de Fermentação (adaptado de Marques ^b, 2012)

A cozedura marca o momento no qual a massa pastosa e moldável se transforma num produto estável, aromático e saboroso, originando um miolo alveolado e macio e uma cêdea exterior dourada e estaladiça.

Numa primeira fase colocam-se os empelos (nome dado à massa depois de moldada) no forno a temperaturas entre 180 e 220 °C e deixam-se cozer por tempo variável dependendo do tamanho dos mesmos. Dá-se o *oven spring*, isto é, a expansão da massa e, consequentemente, o seu aumento de volume continua no forno durante a fase inicial da cozedura até que a massa atinja o seu volume máximo e a rede de glúten a sua extensibilidade máxima. Este crescimento é causado pelo aumento de atividade da levedura, pela evaporação da água e pela expansão dos gases, fenómenos provocados pelo aumento da temperatura na cozedura (Bloksma e Bushuk, 1988). Nesta fase é muito usual dar-se vapor ao pão para que se aumente o volume do pão, para que se evite que a cêdea rebente ou se controle o sítio do rebentamento da mesma e para que se obtenha uma boa cor e brilho (Marques ^b, 2012).

À temperatura de 60 °C dá-se a morte das células das leveduras (Nobre, 2013), a cessação da atividade enzimática (entre 60 e 80 °C), ocorrendo também a gelatinização do amido e a desnaturação proteica (Dziki et al, 2014, cf. Pawlak, 2015). Devido a estas reações e nesta gama de temperaturas, a massa solidifica e fixa a estrutura do miolo (Heller, 2009 e Costa, 2011, cf. Nobre, 2013).

No final da cozedura, a temperatura do centro do pão rondará os 80 °C e a da côrda os 200 °C. Estas temperaturas favorecem reações que levam ao escurecimento da côrda e ao desenvolvimento do aroma e sabor característicos do pão (desenvolvimento das características organoléticas), como é o caso das reações de caramelização dos açúcares, as reações de *Maillard* (reações de escurecimento não enzimático) e a dextrinização do amido (hidrólise do amido por aquecimento com libertação de dextrinas) (**Ponte, 1971; Bloksma e Bushuk, 1988 e Costa, 2011, cf. Nobre, 2013**). Estas reações são preponderantes não só para a definição dos atributos sensoriais do pão, mas também para o incremento do seu valor nutricional e da sua capacidade antioxidante (**Dziki et al, 2014, cf. Pawlak, 2015**).

Após a cozedura, o pão é arrefecido e pode ser manipulado, fatiado, embalado, armazenado e transportado sem sofrer danos físicos.

Obviamente que todas estas operações, ao serem bem executadas e ao serem respeitados os binómios tempo/temperatura inerentes, não garantem por si só uma prolongada conservação do pão, mas auxiliam no processo.

6. Pão de Mafra

Até à primeira metade do séc. XX, o “Pão de Mafra”, denominava-se por “Pão Saloio”, devido ao seu local de confeção: a região saloia (**Ribeiro, 2009**). Desta região faziam parte todas as zonas rurais em torno de Lisboa como sejam Alenquer, Amadora, Odivelas, Arruda dos Vinhos, Cadaval, Loures, Mafra, Sintra, Sobral de Monte Agraço e Torres Vedras e os seus habitantes viviam da agricultura e da criação de gado, que forneciam aos mercados dos arredores e à cidade de Lisboa (**Baptista, 1999**). O pão era caracterizado por uma produção à escala doméstica e muito artesanal, essencialmente produzido em ambientes familiares (**Ribeiro, 2009**).

No início dos anos 60, devido à greve de padeiros da região de Lisboa, o “Pão de Mafra” deixa de ser essencialmente caseiro e passa a atingir os mercados da grande cidade (Lisboa), passando as fronteiras do concelho. A partir desta data, iniciou-se então a sua expansão comercial a par com a promulgação do regulamento que permitiu a comercialização do pão proveniente da cozedura em fornos de alvenaria (fornos circulares de tijolo com cúpula abobadada), sem licença sanitária, estimulando o aparecimento das primeiras unidades fabris (**Idem, 2009 cf. Breyd, 2014**). Quando ocorre esta expansão, o então designado “Pão Saloio” toma o nome de “Pão de Mafra”, uma vez que era importante afirmar a região de onde era originário (**Breyd, 2014**).

Na região de Mafra existem ainda muitos moinhos como parte integrante da paisagem, que são a prova da vitalidade da indústria moleira ainda em funcionamento, tendo-se



Figura 5 – Logótipo do Pão de Mafra
(**ACISM, 2012**)

modernizado e revitalizado até aos dias atuais, fornecendo as farinhas artesanais (ou de moleiro) com que se fabrica o “Pão de Mafra”. *“O Pão de Mafra é um dos tesouros desse mundo rural português, reconhecido pelo seu sabor adocicado, miolo macio e crosta pouco rija”*, sendo, desde 2012 uma marca registada com o logótipo que se

exibe na Figura 5, existindo um esforço conjunto da Câmara Municipal de Mafra (CMM) e da Associação do Comércio, Indústria e Serviços do Concelho de Mafra (ACISM) para que haja uma certificação apropriada e se obtenha o selo de Indicação Geográfica Protegida (IGP) (**CMM, 2015 e ACISM, 2012**). O principal objetivo desta certificação é o combate às falsificações das quais este produto é alvo (**CMM, 2015**).

Os principais produtores deste pão localizam-se nas localidades de Barril, Carvalhal e Encarnação, produzindo pão que abastece todo o país (*Idem, 2015*).

No que concerne à receita e aos ingredientes utilizados eles encontram-se descritos no Quadro 3 que a seguir se apresenta. Apenas destacar que é um pão com elevada percentagem de água (*Idem, 2015*), o que lhe poderá encurtar o tempo de armazenamento.

“Pão de Mafra”		
Ingredientes	Percentagens relativas	
Farinha de trigo tipo 80	95 %	Σ = 100% (quantidade total de farinha)
Farinha de centeio tipo 70	5 %	
Água	80 % (face à quantidade das farinhas)	
Levedura	1 % (face à quantidade das farinhas)	
Sal	1,5 % (face à quantidade das farinhas)	
Vinagre	Utilizado como auxiliar tecnológico para acidificar a massa	

Quadro 3 – Ingredientes do Pão de Mafra (*observação in loco, autoria própria*)

No quadro seguinte, Quadro 4, é possível observar a composição nutricional do Pão de Mafra (no seu formato de Forma) por 100 g de parte edível e por cada duas fatias, bem como o correspondente dessas duas fatias no Valor Diário de Referência (VDR).

	Por 100 g	Por duas fatias (≈56 g)	VDR (%)
Energia	246 kcal	140 kcal	10
Proteínas	7,1 g	4 g	7
Hidratos de Carbono	51,9 g	29,6 g	11
Dos quais açúcares	0 g	0 g	0
Lípidos	1,1 g	0,6 g	< 1
Dos quais saturados	0 g	0 g	0
Colesterol	0 g	0 g	0
Sódio	320 mg	180 mg	< 1
Equivalente em sal	0,8 g	0,45 g	
Cálcio	40 mg	22,5 mg	10
Ferro	1,7 mg	1 mg	10
Tiamina (B1)	0,81 mg	0,45 mg	10
Riboflavina (B2)	0,19 mg	0,11 mg	10
Niacina (B3)	2,1 mg	1,2 mg	10

Quadro 4 – Composição Nutricional da forma de pão de Mafra (*adaptado de Pão Real ^c, 2015*)

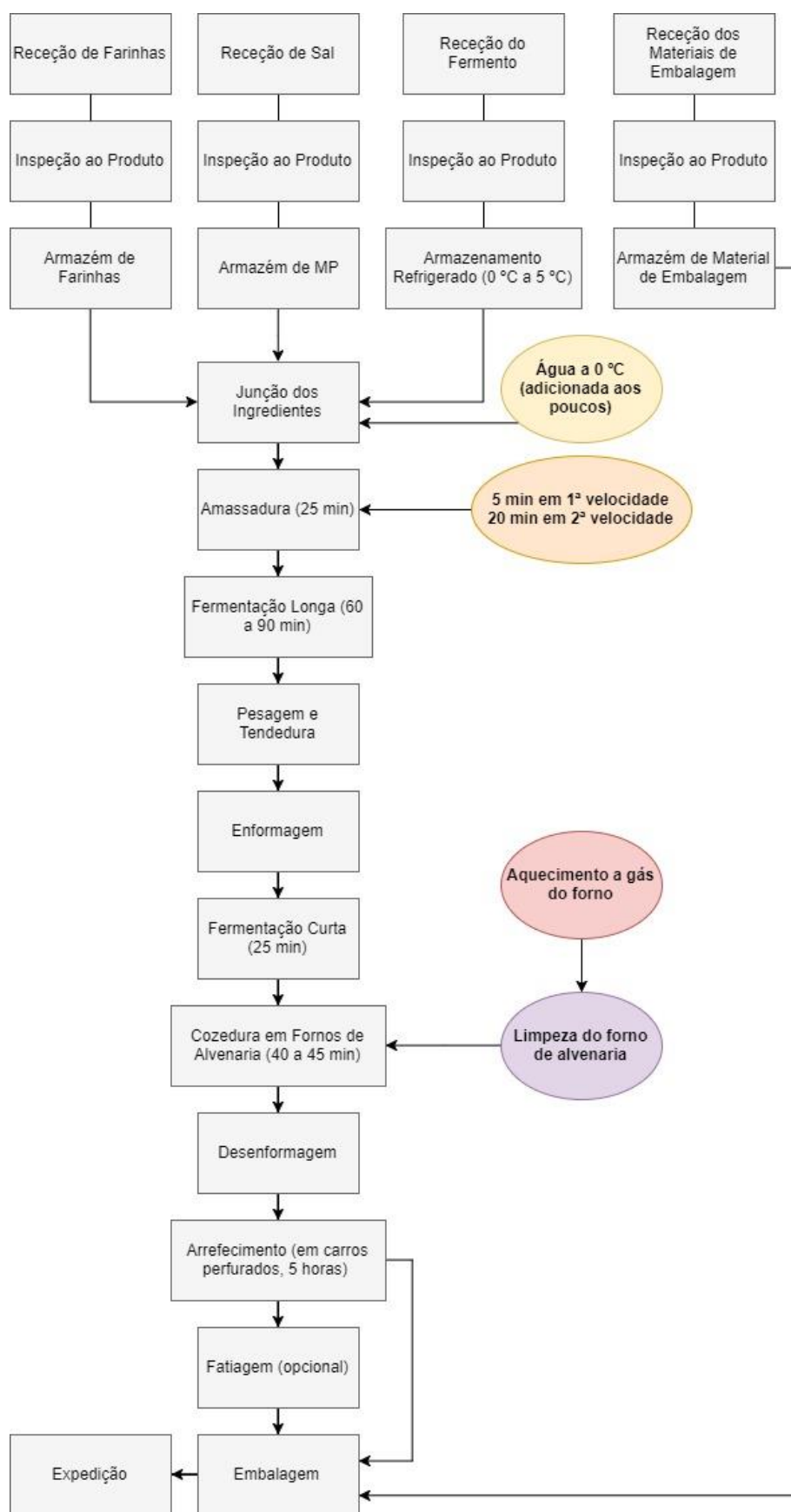


Figura 6 – Fluxograma de Fabrico do Pão de Forma de Mafra (**observação *in loco*, autoria própria e adaptado de Breyd, 2014**)

7. Microbiologia e Conservação do Pão

7.1. Fungos

Os fungos constituem um grande número de organismos eucariotas que inclui bolores (organização multicelular) e leveduras (organização unicelular), sem clorofila, produzem esporos e podem reproduzir-se sexuada ou assexuadamente. Possuem estruturas somáticas filamentosas e ramificadas, envolvidas por paredes celulares contendo quitina. São ubiqüitários, isto é, podem ser encontrados praticamente em qualquer lugar, entre solo, substâncias orgânicas em decomposição, água e ar, sendo este último especialmente importante na medida em que veicula grande quantidade de esporos, fazendo o seu transporte (**McMeekin e Ross, 1996**). São heterotróficos e, na sua maioria, saprófitas, ou seja, vivem à custa de restos, detritos e outros nutrientes orgânicos, contribuindo para a sua decomposição, encontrando nos alimentos os nutrientes necessários ao seu crescimento e, se as condições ambientais o permitirem, podem desenvolver-se, o que leva normalmente a uma deterioração rápida do produto. Do ponto de vista da saúde e inocuidade dos géneros alimentícios, os fungos presentes nos alimentos são habitualmente considerados como inofensivos, no entanto, existem algumas estirpes de bolores (bolores toxinogénicos) capazes de produzir micotoxinas, especialmente nos cereais, nos produtos deles derivados e nas oleaginosas (**Brandão, 2013**).

Estes organismos são aeróbios estritos (todos os bolores e algumas leveduras) ou facultativos (maior parte das leveduras), são pouco exigentes do ponto de vista nutritivo dado que conseguem crescer em meios com o mínimo de nutrientes e possuem conjuntos variados de enzimas que lhes permitem usar uma vasta gama de nutrientes, apresentam menor necessidade de água do que as bactérias, suportam uma maior pressão osmótica (toleram alimentos muito salgados e/ou açucarados), toleram uma gama ampla de pH, podem germinar (ainda que lentamente) em ambientes de reduzida quantidade de oxigénio, a temperatura ótima de crescimento situa-se entre os 20 e os 30 °C e possuem uma taxa de crescimento mais lenta do que a das bactérias, dificilmente competindo com estas últimas quando as condições do meio são mais favoráveis para as mesmas (**João, 2013**).

Os fungos podem formar dois tipos de colónias (em meio de cultura ou sobre a superfície do alimento contaminado), dependendo se são bolores ou leveduras. Assim, os bolores dão origem a estruturas filamentosas, a colónias algodonosas, pulverulentas ou aveludadas formadas por elementos multicelulares em forma de tubos, as hifas. Ao conjunto de todas as hifas atribui-se a designação de micélio. Estas colónias podem adquirir várias colorações, consoante o bolor. Já as leveduras originam estruturas leveduriformes formadas por organismos

unicelulares, onde as colónias apresentam textura pastosa ou cremosa, sendo semelhantes às colónias formadas por bactérias. A sua coloração pode ser variada, chegando a apresentar-se despigmentadas (**Brandão, 2013**).

Laboratorialmente pode isolar-se bolores e leveduras fazendo uma suspensão mãe com água peptonada tamponada (APT) e diluições subsequentes, propagando por espalhamento em meio *DRBC*. Este meio de cultura como possui cloranfenicol (que é um antibiótico), não permite o crescimento de bactérias, sendo ideal para isolar bolores e leveduras. Após a propagação é necessário incubar a 25 °C +/- 1 °C durante 5 dias em condições de aerobiose (**ISO 21527-1, 2008**). Depois deste período de incubação contam-se o número de colónias existentes e estima-se o número de UFC, tendo em conta o fator de diluição e o volume de solução utilizado (**João, 2013**).

7.1.1. Bolores

Os bolores, vistos ao microscópio, salientam a sua organização filamentosa (possuem um verdadeiro micélio) e a presença de órgãos de frutificação que produzem esporos assexuados (mais vulgar – esporangiósporos, conidiósporos, artrósporos, blastósporos e clamidiósporos) ou esporos sexuados (muito raro – zigósporos e ascósporos).

Os principais géneros que produzem esporangiósporos e que se encontram nos alimentos são *Mucor* e *Rhizopus*, sendo que o primeiro contamina toda a espécie de géneros alimentícios (**Brandão, 2013**) e é largamente utilizado na produção de queijo e amido (**Lidon e Silvestre, 2007**), e o segundo aparece muito frequentemente associado ao bolor no pão e na pastelaria, sendo o *Rhizopus nigricans* talvez o mais comum dentro do género, por ser o bolor preto do pão. Os géneros *Penicillium* e *Aspergillus* produzem conidiósporos, sendo que o primeiro é muito comum em frutas e cereais (associado à produção de micotoxinas) e é usado como auxiliar no processo de maturação de queijos de pasta mole e marmoreados, e o segundo, dado possuir algumas espécies xerófilas, desenvolve-se bem em grãos de leguminosas e cereais assim como alimentos com elevadas concentrações de sal ou açúcar (**Brandão, 2013**). Outro bolor que aparece muito usualmente como contaminante em pão pertence ao género *Neurospora*, espécie *Neurospora crassa*, formando colónias com cor rosada/alaranjada e apresenta os dois tipos de reprodução enunciados anteriormente (sexuada por ascósporos e assexuada por conidiósporos) (**Breyd, 2014**).

Relativamente às micotoxinas já referidas anteriormente podem ser definidas como metabolitos secundários tóxicos que são biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas pelos fungos, que surgem depois da fase exponencial do crescimento

fúngico e estão, na maioria dos casos, associadas à esporulação. Estas micotoxinas afetam os órgãos e os sistemas do ser humano, nomeadamente o fígado, os rins, o sistema nervoso, o endócrino e o imunitário (**Dantigny et al, 2005**). As principais micotoxinas associadas ao pão são a patulina e a citrinina (**Filtenborg et al, 1996**). A patulina é produzida pelos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo frequente o seu aparecimento para além do pão, em maçãs e sumos de maçã. Provoca edema cerebral e pulmonar, hemorragia pulmonar, danos capilares, paralisias diversas e convulsões. A citrinina é produzida por bolores do género *Penicillium* e aparece nos cereais trigo, cevada, milho e arroz, causando nefrotoxicidade (**Brandão, 2013**).

O aparecimento destes agentes microbianos indesejados que contaminam os produtos de panificação, comprometem severamente a qualidade dos mesmos e por conseguinte desencadeiam elevadas perdas económicas (**Breyd, 2014**).

7.1.2. Fatores de crescimento dos bolores

Os bolores proliferam na superfície dos alimentos cuja disponibilidade de água, pressão osmótica e pH são menos favoráveis às bactérias, uma vez que dificilmente competem com estas últimas quando as condições do meio lhes são favoráveis (**Brandão, 2013**).

Necessidade de água (A_w e Humidade Relativa) – os bolores, face às bactérias e à maioria das leveduras têm uma necessidade de água inferior, isto é, conseguem instalar-se e proliferar em alimentos de A_w mais reduzido, sendo que algumas espécies podem contaminar alimentos desidratados como o leite em pó ou os grãos de cereais caso a humidade relativa do ar ou da atmosfera envolvente seja elevada. Se um alimento com baixa atividade de água está armazenado num ambiente com alta humidade relativa, a atividade de água deste alimento aumenta, permitindo a multiplicação de microrganismos (**Quali, 2016**). Assim é de sobeja importância controlar este parâmetro, uma vez que interfere com o A_w do próprio alimento e favorece a multiplicação da microflora (**Aleixo, 1996**). A humidade relativa, normalmente, está correlacionada inversamente com a temperatura de armazenagem, ou seja, quanto maior a temperatura de armazenagem menor a humidade relativa e vice-versa, ora fazendo alterar o gás da atmosfera envolvente consegue manter-se a humidade relativa no nível indicado para o produto e mesmo assim impedir o desenvolvimento de microrganismos (**Quali, 2016**).

A maioria dos microrganismos desenvolvem-se em valores de A_w que variam entre 0,9 e 0,99 (alimentos frescos como carne, peixe, produtos lácteos, fruta), contudo existem espécies que se conseguem desenvolver com valores inferiores, por exemplo, a bactéria *Staphylococcus aureus* consegue crescer com valores de 0,86 e a maioria dos fungos multiplicam-se

razoavelmente bem com valores de A_w até 0,61/0,62, razão pela qual contaminam alimentos como o pão ou os frutos secos (Dias, 2006). Valores de A_w inferiores a 0,60 não permitem o desenvolvimento microbiano (Silliker et al, 1980), uma vez que todos os microrganismos têm um valor limite de A_w abaixo do qual cessam a sua atividade (Dias, 2006). Segundo Jarvis (1976 cf. Breyd, 2014) as espécies de fungos poderiam ser classificadas de acordo com o A_w exigido para o seu desenvolvimento, assim espécies fúngicas higrófilas necessitariam de valores de $A_w > 0,90$, espécies mesoxerotolerantes com valores compreendidos entre 0,80 e 0,90 e espécies xerotolerantes com valores de A_w inferiores a 0,80. Alguns bolores dos géneros *Xeromyces*, *Aspergillus* ou *Penicillium* são classificados como xerotolerantes ou mesoxerotolerantes, com elevado poder de esporulação e, como tal, com um elevado poder de disseminação, atacando e deteriorando alimentos com baixo A_w (Brandão, 2013).

Por forma a diminuir o A_w dos alimentos e limitar, de certa forma, o desenvolvimento de flora microbiana indutora de deterioração dos géneros alimentícios podem usar-se as seguintes estratégias: adição de solutos como sal e açúcar, remoção da água por processos de secagem ou cozedura, indisponibilização da água por congelação (Dias, 2006) e ligação da água a compostos macromoleculares (Quali, 2016).

Temperatura – todos os microrganismos possuem uma gama de temperatura na qual crescem, apresentando um mínimo, um máximo e um nível ótimo (Quali, 2016). Podem classificar-se em: psicrófilos (crescem bem perto dos 0 °C e têm valores ótimos abaixo de 15 °C – *Pseudomonas*, por exemplo), psicotróficos (crescem entre 0 e 7 °C com valores ótimos perto de 20 °C), mesófilos (crescem entre 15 e 45 °C com valores ótimos entre 20 e 30 °C), termófilos (crescem entre 45 e 65 °C e têm valores ótimos perto dos 55 °C) e os hipertermófilos (crescem com temperaturas entre 90 °C e 100 °C) (Brandão, 2013). Os bolores desenvolvem-se bem em temperaturas compreendidas entre 15 e 30 °C, sendo, por isso, microrganismos mesófilos, tendo um valor ótimo entre 20 e 25 °C (Breyd, 2014).

Ora, como o pão é armazenado à temperatura ambiente (e a refrigeração não é uma opção viável) e, como esta temperatura coincide com os valores ótimos de crescimento e desenvolvimento dos bolores é perfeitamente expectável que esta flora se instale no pão e leve à sua deterioração.

pH – os bolores, como se pode observar na figura seguinte (Figura 7) são, de entre os microrganismos apresentados, aqueles que toleram uma gama mais ampla de valores de pH. De facto, conseguem proliferar numa gama que varia entre 2 e 11 na escala de Sorensen,

apresentando valores ótimos entre 5,5 e 7,5 (**Breyd, 2014**). O pão apresenta valores de pH na ordem dos 5,5-6, o que propicia o desenvolvimento de bolores.

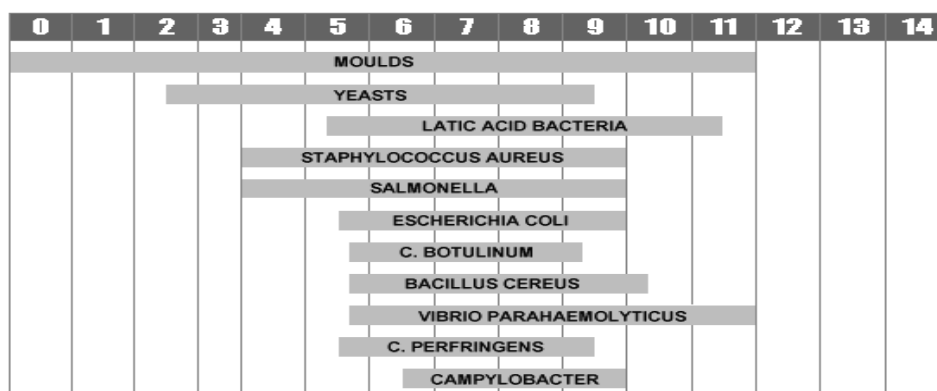


Figura 7 – pH e Crescimento Microbiano (**adaptado de Brandão, 2013**)

Oxigénio – relativamente à atmosfera envolvente os microrganismos classificam-se em aeróbios (necessidade absoluta de oxigénio para multiplicação – *Pseudomonas* e bolores), anaeróbios estritos (não se multiplicam na presença de oxigénio – *Clostridium botulinum*), anaeróbios facultativos (tanto se multiplicam na presença do oxigénio como na sua ausência – *Salmonella*) e microaerófilos (necessitam de uma pequena quantidade de oxigénio para se multiplicarem – *Listeria* e *Campylobacter*) (**Brandão, 2013**). Os bolores são aeróbios estritos e, como tal, apenas e só na presença de oxigénio conseguem sobreviver.

Tendo isto em consideração poder-se-ia pensar na opção de embalagem a vácuo na qual se retira a totalidade (quase a) do ar do interior da embalagem, fecha-se hermeticamente, ficando um vácuo quase perfeito no interior. Regra geral utilizam-se barreiras plásticas flexíveis, o que faz com que seja possível ajustar a embalagem às dimensões e formas dos mais variados produtos. As vantagens deste embalagem resumem-se à criação de um ambiente anaeróbio que previne o desenvolvimento de microrganismos aeróbios que degradem os alimentos, prolongando assim o seu *shelf-life* (**Food Code, 2013**). Ou então poder-se-ia optar por embalagem em atmosfera modificada que consiste na substituição do ar, no interior da embalagem, por uma mistura de gases como oxigénio (O₂), dióxido de carbono (CO₂) e azoto (N₂) ao redor do produto. (**El Halouat e Debevere, 1997 e Taniwaki et al., 2001, cf. Dantigny et al., 2005**). O aumento do prazo comercial deste método de conservação de alimentos deve-se ao efeito inibitório do CO₂ sobre os diferentes tipos de microrganismos e à redução ou remoção do O₂ do interior da embalagem (**Mantilla et al., 2010**).

Contudo, apesar de serem métodos eficazes contra bolores (por remoção do O₂) não são viáveis em termos económicos dado que se trata de um produto de panificação, que se quer fresco e, sobretudo, barato para o consumidor. Ao serem utilizados estes métodos, o produto final teria de refletir esse mesmo custo, que teria de ser suportado pelos compradores.

8. Aditivos

8.1. Definição e objetivos de utilização:

Segundo o **Regulamento (CE) Nº 1333/2008** de 16 de dezembro de 2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, no seu artigo 3º define-se aditivo alimentar como e passo a citar: “..., qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios...”; Isto é, são substâncias de origem natural ou sintética, cujo valor nutricional na maioria dos casos não é relevante e que, ao serem adicionadas intencionalmente aos alimentos, permitem, por exemplo, aumentar a durabilidade do produto no que diz respeito a estratégias de conservação, intensificar sabores ou aromas ou modificar propriedades estruturais, salvaguardando sempre a não diminuição do valor nutritivo final do género alimentício em questão (**Lidon e Silvestre, 2007**). Poderão contribuir ainda para a manutenção e melhoramento das propriedades organoléticas (com recurso a corantes, acidificantes ou agentes de sabor), para facilitar o manuseamento e uso de determinados géneros alimentícios com recurso a agentes anti aglomerantes ou para providenciar alimentos para *targets* específicos com necessidades nutricionais particulares como sejam os diabéticos ou os celíacos (**Lawrence, 1998**).

Segundo o regulamento supracitado a utilização dos aditivos alimentares deve ser segura e deverá decorrer de uma necessidade tecnológica, devendo ser vantajosa para o consumidor (por exemplo, extensão do *shelf-life* de produtos de panificação com recurso a conservantes, a qual permite a obtenção de “pão fresco” mesmo após uma semana de compra e/ou abertura da embalagem), não induzindo o mesmo em erro. Mais se acrescenta que, para além da necessidade tecnológica, deverão ser tomados em consideração outros fatores preponderantes na escolha da utilização de aditivos alimentares, como sejam fatores sociais, económicos, tradicionais, éticos, ambientais, o princípio da precaução e a viabilidade dos controlos.

Algumas técnicas de conservação de alimentos foram acompanhando o homem ao longo dos séculos como sejam a utilização de vinagre, sal ou açúcar para preservar os alimentos, aumentando assim o seu tempo de vida útil (**Pandey e Upadhyay, 2012**), contudo os ingredientes mencionados anteriormente, ao abrigo do **Regulamento (CE) Nº 1333/2008** são

classificados como auxiliares tecnológicos e, como tal, não poderão ser considerados como aditivos alimentares. Pode definir-se auxiliar tecnológico como qualquer substância que não seja consumida como género alimentício em si mesma, seja intencionalmente utilizada na transformação das matérias-primas, dos géneros alimentícios ou dos seus ingredientes, para atingir determinado objetivo tecnológico durante o tratamento ou a transformação e possa resultar na presença não intencional mas tecnicamente inevitável de resíduos da substância ou dos seus derivados no produto final, desde que esses resíduos não apresentem qualquer risco sanitário nem produzam efeitos tecnológicos sobre o produto final. Não são também considerados aditivos as substâncias utilizadas para a proteção das plantas e dos produtos vegetais nos termos da regulamentação comunitária aplicável no domínio fitossanitário, as substâncias adicionadas aos géneros alimentícios como nutrientes, as substâncias utilizadas no tratamento da água destinada ao consumo humano abrangidas pela Diretiva 98/83/CE do Conselho, de 3 de novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, os aromas abrangidos pelo âmbito de aplicação do Regulamento (CE) Nº 1334/2008, as enzimas alimentares abrangidas pelo âmbito de aplicação do Regulamento (CE) Nº 1332/2008 e as substâncias que ocorram nos alimentos não intencionalmente, denominando-se por contaminantes **(Lidon e Silvestre, 2007)**.

Com o advento massivo da comida processada ocorrido a partir da segunda metade do século XX foi obrigatório desenvolver e introduzir no mercado um sem número de novos aditivos alimentares, mais eficazes, eficientes e capazes de responder às necessidades quer dos industriais (com redução de custos associada) quer consumidores, com as suas exigências de qualidade e satisfação. Esta utilização generalizada de aditivos levou à criação de regras de rotulagem mais apertadas as quais garantem que todos os componentes utilizados na fabricação do produto final são do conhecimento do consumidor **(Pandey e Upadhyay, 2012)**. A nível europeu as questões de rotulagem dos géneros alimentícios bem como questões relativas aos alérgenos estão definidas e são acauteladas pelo Regulamento (CE) Nº 1169/2011.

Os aditivos alimentares poderão ser adicionados a quaisquer géneros alimentícios salvo aos seguintes **(Regulamento (UE) Nº 1129/2011 da Comissão)** (Quadro 5):

Quadro 5 – Géneros alimentícios nos quais a presença de um aditivo não pode ser autorizada
(adaptado de Regulamento (UE) Nº 1129/2011 da Comissão)

<i>Item</i>	<i>Descrição</i>
1	Géneros alimentícios não transformados, como definidos no artigo 3º do Regulamento (CE) Nº 1333/2008
2	Mel, tal como definido na Diretiva 2001/110/CE do Conselho

3	Óleos e gorduras não emulsionados de origem animal ou vegetal
4	Manteiga
5	Leite pasteurizado e esterilizado (incluindo o leite UHT) não aromatizado e natas inteiras pasteurizadas não aromatizadas (exceto natas com teor reduzido de matéria gorda)
6	Produtos lácteos fermentados, não aromatizados, não tratados termicamente após a fermentação
7	Leitelho não aromatizado (exceto leitelho esterilizado)
8	Águas minerais naturais, tal como definidas na Diretiva 2009/54/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, águas de nascente e todas as outras águas engarrafadas ou embaladas
9	Café (salvo o café aromatizado de preparação instantânea) e extratos de café
10	Chá em folhas não aromatizado
11	Açúcares, tal como definidos na Diretiva 2001/111/CE do Conselho
12	Massas alimentícias secas, com exceção das massas alimentícias isentas de glúten e/ou destinadas a dietas hipoproteicas, em conformidade com a Diretiva 2009/39/CE do Parlamento Europeu e do Conselho

Todos os outros géneros alimentícios que não constam do quadro anterior (Quadro 4) são divididos por categoria e a cada categoria é adstrito um conjunto de aditivos alimentares autorizados e quais as condições de utilização.

Todos os aditivos alimentares autorizados e, como tal, passíveis de ser utilizados constam nas listas comunitárias de aditivos alimentares, as quais figuram também no Regulamento 1129/2011. Assim, apenas estes aditivos podem ser colocados no mercado enquanto tais e utilizados nos géneros alimentícios nas condições de utilização nele especificadas. Nas listas e para cada aditivo é especificado o nome do aditivo alimentar e o seu número E, os géneros alimentícios a que o aditivo alimentar pode ser adicionado, as condições em que o aditivo alimentar pode ser utilizado (teores de utilização) e, se for caso disso, a existência ou não de restrições à venda direta do aditivo alimentar ao consumidor final. No que concerne aos teores de utilização de aditivos alimentares estes são fixados no nível mais baixo necessário à obtenção do efeito desejado e têm em conta qualquer dose diária admissível, ou avaliação equivalente, estabelecida para o aditivo alimentar, bem como o seu consumo diário provável a partir de todas as fontes e no caso de o aditivo alimentar se destinar a ser utilizado em géneros alimentícios consumidos por grupos especiais de consumidores, o consumo diário possível desse aditivo para esses grupos de consumidores. Sempre que apropriado, não é fixado qualquer teor numérico máximo para o aditivo alimentar. Nesse caso, o aditivo alimentar é utilizado em conformidade com o princípio *quantum satis*. Este princípio segundo o **DL 121/1998** entende-se como a não especificação de qualquer teor máximo, sendo, no entanto, os aditivos utilizados de acordo com

as boas práticas de fabrico, em quantidade não superior à necessária para a obtenção do resultado pretendido e desde que não induzam em erro o consumidor.

8.2. Tipos de aditivos alimentares existentes

De acordo com *Pandey e Upadhyay (2012)* existem 27 categorias de aditivos alimentares como se ilustra na figura seguinte (Figura 8):

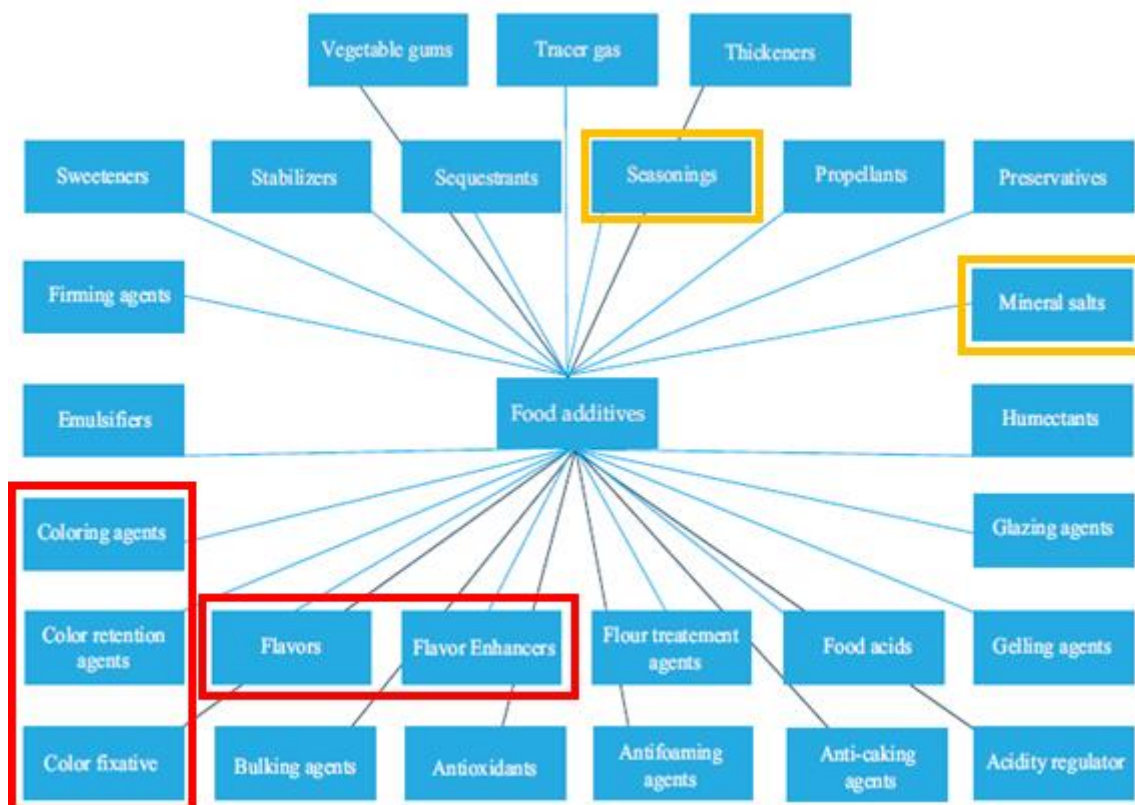


Figura 8 – Classificação dos Aditivos Alimentares (adaptado de *Pandey e Upadhyay, 2012*)

Contudo, se analisarmos mais atentamente a classificação é perceptível a existência de vários grupos de aditivos (destacados a vermelho) que afetam a mesma propriedade, no caso a cor e o sabor e que poderiam estar englobados num só grupo cada, passando de cinco grupos distintos para apenas dois, o que acontece na classificação adotada a nível europeu, onde apenas se consideram o grupo dos corantes (afetam a propriedade cor) e o dos intensificadores de sabor (afetam a propriedade sabor). Em relação aos grupos destacados a amarelo, os sais minerais e os temperos (*Seasonings*), não deveriam ser considerados aditivos alimentares, mas antes auxiliares tecnológicos.

Desta feita e segundo o **Anexo I do Regulamento 1333/2008** são definidas as seguintes 26 classes funcionais de aditivos presentes em produtos alimentares e de aditivos presentes em aditivos e enzimas alimentares (Quadro 6):

Quadro 6 – Classificação das classes funcionais de aditivos alimentares (**adaptado de Anexo I do Regulamento (CE) Nº 1333/2008**)

Classe	Descrição
Edulcorantes	Substâncias utilizadas para conferir um sabor doce aos géneros alimentícios ou utilizadas nos edulcorantes de mesa
Corantes	Substâncias que conferem ou restituem cor a um género alimentício
Conservantes	Substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos e/ou contra o desenvolvimento de microrganismos patogénicos
Antioxidantes	Substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor
Agentes de transporte	Substâncias utilizadas para dissolver, diluir, dispersar ou de outro modo modificar fisicamente um aditivo alimentar, um aroma alimentar, uma enzima alimentar, um nutriente e/ou outra substância adicionada a um género alimentício para efeitos nutricionais ou fisiológicos sem alterar a sua função (e sem que elas próprias exerçam quaisquer efeitos tecnológicos), a fim de facilitar o respetivo manuseamento, aplicação ou utilização
Acidificantes	Substâncias que aumentam a acidez dos géneros alimentícios e/ou lhes conferem um sabor acre
Reguladores de acidez	Substâncias que alteram ou controlam a acidez ou a alcalinidade dos géneros alimentícios
Antiaglomerantes	Substâncias que reduzem a tendência das partículas isoladas dos géneros alimentícios para aderirem umas às outras
Antiespumas	Substâncias que impedem ou reduzem a formação de espuma
Agentes de volume	Substâncias que contribuem para dar volume aos géneros alimentícios sem contribuírem significativamente para o seu valor energético disponível
Emulsionantes	Substâncias que tornam possível a formação ou a manutenção de uma mistura homogénea de duas ou mais fases imiscíveis, como óleo e água, nos géneros alimentícios

Sais de fusão	Substâncias que convertem as proteínas contidas no queijo numa forma dispersa, daí resultando uma distribuição homogénea das gorduras e outros componentes
Agentes de endurecimento	Substâncias que tornam ou mantêm firmes ou estaladiços os tecidos dos frutos ou dos produtos hortícolas, ou atuam em conjunto com gelificantes para produzir ou reforçar um gel
Intensificadores de sabor	Substâncias que intensificam o sabor e/ou o cheiro dos géneros alimentícios
Espumantes	Substâncias que tornam possível a dispersão homogénea de uma fase gasosa nos géneros alimentícios líquidos ou sólidos
Gelificantes	Substâncias que dão textura aos géneros alimentícios através da formação de um gel
Agentes de revestimento	Substâncias que, quando aplicadas na superfície externa dos géneros alimentícios, lhes conferem uma aparência brilhante ou um revestimento protetor
Humidificantes	Substâncias que impedem os géneros alimentícios de secar por contrabalançarem o efeito de uma atmosfera com baixo grau de humidade, ou promovem a dissolução de um pó num meio aquoso
Amidos modificados	Substâncias obtidas através de um ou mais tratamentos químicos de amidos comestíveis, que podem ter sofrido um tratamento físico ou enzimático
Gases de embalagem	Gases, com exceção do ar, introduzidos em recipientes antes, durante ou após a colocação dos géneros alimentícios nesses recipientes
Propulsores	Gases, com exceção do ar, que expõem os géneros alimentícios dos recipientes
Levedantes químicos	Substâncias ou combinações de substâncias que libertam gás, aumentando assim o volume das massas ou polmes de farinha
Sequestrantes	Substâncias que formam complexos químicos com iões metálicos
Estabilizadores	Substâncias que tornam possível a manutenção do estado físico-químico dos géneros alimentícios
Espessantes	Substâncias que aumentam a viscosidade dos géneros alimentícios
Agentes de tratamento da farinha	Substâncias, com exceção dos emulsionantes, adicionadas à farinha ou à massa para melhorar a qualidade da cozedura

A cada aditivo alimentar é feito corresponder um código alfanumérico constituído pela letra E (proveniente da palavra Europa) seguida de três ou quatro algarismos, sendo o mesmo válido em todos os países da União Europeia (**Lidon e Silvestre, 2010**). Os códigos dos principais

grupos de aditivos alimentares distribuem-se de acordo com o evidenciado no quadro seguinte (Quadro 7):

Quadro 7 – Aditivos alimentares e respetivo código E (**adaptado de Voss, 2005**)

Código E do aditivo alimentar	Ação
E 1...	Corantes
E 2...	Conservantes
E 3...	Antioxidantes
E 4...	Emulsionantes, estabilizantes, espessantes e gelificantes
E 5...	Antiaglomerantes, ácidos, bases e sais
E 620 a E 635	Intensificadores de sabor
E 901 a E 904	Agentes de revestimento
E 950 a E 967	Edulcorantes

Dependendo das características do produto alimentar e devido à degradação que os próprios aditivos alimentares podem sofrer (e, como tal, necessitam de outros compostos que os possam estabilizar) é muito comum, necessário até, utilizar simultaneamente vários aditivos que possam intensificar uma determinada função, denominando-se por ação ou efeito sinérgico sendo conseguido, por exemplo, pela ação conjunta de vários conservantes, antioxidantes ou outros (**Lidon e Silvestre, 2007**).

9. Conservantes

Os conservantes serão, provavelmente, a classe de aditivos mais importante, dado que desempenham um papel essencial na segurança dos alimentos. Todas as matérias-primas alimentares estão sujeitas a processos bioquímicos e a sofrerem contaminação microbiológica, o que limita e dificulta a manutenção das suas qualidades. Assim, os conservantes são usados para alargar o tempo de vida útil de determinados produtos e garantir a segurança dos mesmos durante esse período alargado. Essa segurança baseia-se no retardamento do desenvolvimento de agentes microbiológicos que, a existirem e a proliferarem, poderiam produzir toxinas e originar o envenenamento da população (toxinfecções alimentares) **(Emerton e Choi, 2008)**. A maioria dos conservantes são, aos dias de hoje, essencialmente antifúngicos, isto é, previnem o crescimento e a proliferação de fungos, bolores e leveduras. A sua ação antibacteriana é menos acentuada, contudo uma combinação de conservantes com algum poder antibacteriano deverá ser usada para conferir uma boa proteção generalizada. Os conservantes atacam os sistemas enzimáticos inerentes ao metabolismo celular deixando as células incapazes de levar a cabo as reações químicas necessárias à sua sobrevivência e são capazes também de alterar as propriedades da parede celular dos microrganismos, dificultando a entrada e saída de substâncias essenciais à vida **(Lawrence, 1998)**.

Assim, não há dúvida que o uso de conservantes oferece um claro benefício aos consumidores uma vez que garante a segurança alimentar dos produtos durante o *shelf-life* definido, o qual só é possível ser tão alargado devido ao seu uso, o que se coaduna com as imposições do estilo de vida moderno **(Emerton e Choi, 2008)**.

Os conservantes têm uma ação ótima com concentrações específicas, sendo que concentrações demasiado baixas resultam num controlo inadequado dos microrganismos e concentrações mais elevadas não são permitidas por lei, dado que existem teores máximos de utilização permitidos e aprovados. Assim, deverão ser usados numa concentração suficientemente alta que suprima o crescimento microbiano. Esta concentração é mantida ao longo dos tempos, uma vez que não se verifica para este grupo de compostos, o fenómeno da resistência bacteriana como acontece com os antibióticos **(Lawrence, 1998)**.

De entre os conservantes mais utilizados pode-se destacar o ácido sórbico e os seus sais (E 200 a E 203) pelo facto de serem eficazes numa multiplicidade de géneros alimentícios e por não impactarem no sabor e no aroma dos produtos, sendo aplicados em bebidas, lacticínios, peixe e marisco, produtos com elevado teor de gordura, frutas e vegetais, produtos de confeitaria e padaria, entre outros. A sua ação antimicrobiana é eficaz contra leveduras e fungos, sendo mais débil contra bactérias, resultando na perfeição em valores de pH inferiores a 6,5 (pH

ácido) (**Lidon e Silvestre, 2007**). O grupo do ácido benzoico e dos seus sais (E 210 a E 219) é mais utilizado em países em via de desenvolvimento (face ao grupo anterior que é largamente aplicado em países ditos desenvolvidos), atuam apenas em pH ácido que varia entre 4 e 4,5 e são aplicados essencialmente a bebidas não alcoólicas e produtos que tenham por base a fruta e os hortícolas. O dióxido de enxofre e os sulfitos (E 220 a E 228) são um grupo multifuncional, atuando como conservantes, antioxidantes e estabilizadores/fixadores de cor. Apresentam um elevado poder antibacteriano (mais elevado que os outros conservantes) e, como tal, são utilizados numa variedade de produtos desde sopas enlatadas, fruta desidratada, geleias, batatas ultracongeladas, até cerveja, vinho, crustáceos cozidos e salsichas frescas. Os nitratos e os nitritos (de sódio e de potássio) (E 249 a E 252) são frequentemente usados como conservantes e como fixadores de cor (os nitritos adicionados ao processo de fabricação do fiambre, por exemplo, conferem a cor rosada ao produto final após a cozedura) e são essenciais para a prevenção do aparecimento do *Clostridium botulinum* e, conseqüentemente, da doença associada, o botulismo. A sua aplicação principal situa-se no espectro das carnes curadas como os presuntos, as mortadelas, as salsichas ou o bacon. O ácido propiónico e os seus sais (E 280 a E 283) são conservantes aplicados, regra geral, ao pão pré-embalado e à pastelaria pré-embalada, dado que são mais eficazes contra os bolores do que contra as bactérias, prolongando assim o seu tempo de vida útil. A sua ação é amplificada se o meio for alcalino. Existem depois alguns conservantes utilizados apenas para produtos específicos como sejam a nisina (E 234) em derivados do leite como os queijos duros e fundidos, a natamicina (E 235) em enchidos crus ou queijos ralados (atenção que estes dois conservantes são efetivamente antibióticos, por isso nestes dois casos impõe-se a questão do desenvolvimento de microrganismos resistentes) e o ácido bórico (E 284) e o tetraborato de sódio (E 285) na conservação do caviar (**Lawrence, 1998**).

9.1. E 210 – Ácido Benzoico

Este aditivo alimentar possui a denominação química de ácido benzoico, ácido benzenocarboxílico ou ácido fenilcarboxílico, com fórmula química $C_7H_6O_2$ e massa molecular 122,12 g/mol. A sua composição apresentará um teor não inferior a 99,5 % numa base anidra sendo um produto pulverulento cristalino de cor branca. É identificado por possuir um intervalo de fusão situado entre 121,5 e 123,5 °C, um pH = 4 em solução aquosa e ensaios positivos para sublimação e pesquisa de benzoato (**Regulamento 231/2012**). A sua fórmula de estrutura é a que se apresenta na figura seguinte (Figura 9) onde se pode observar o anel benzénico característico:

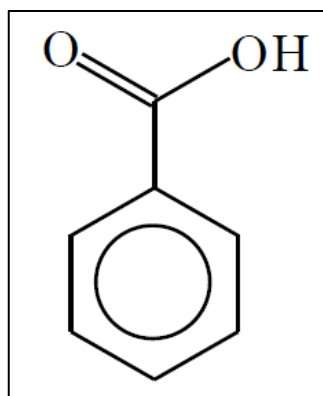


Figura 9 – Fórmula de Estrutura do Ácido Benzoico (E 210) (adaptado de Lidon, 2016)

Este ácido é pouco solúvel em água e moderadamente solúvel em gorduras e é produzido pela oxidação do tolueno (**Emerton e Choi, 2008**). Na natureza encontra-se sobre a forma de glucósido em frutos como os mirtilos e as ameixas e em especiarias como a canela ou o cravinho (**Lidon e Silvestre, 2010**). É utilizado como conservante e concomitantemente como antioxidante em alguns géneros alimentícios específicos, sendo bastante eficaz contra fungos e leveduras e menos eficaz contra bactérias. A sua ação é exercida em várias frentes: altera a permeabilidade das membranas celulares, inibe enzimas do ciclo do ácido cítrico e inibe, consequentemente, a fosforilação oxidativa. É aplicado em concentrações relativamente baixas (entre 0,005 % a 0,1 %), atua preferencialmente em alimentos com pH compreendido entre 4-4,5, sendo necessário combinar a sua ação com a de outros conservantes (**Lidon e Silvestre, 2007**).

No que concerne a efeitos secundários têm sido observados os seguintes: reações alérgicas em pessoas que sejam intolerantes ao ácido acetilsalicílico, pessoas que sofram de asma ou urticária ou pessoas que tomam anti-inflamatórios não esteroides, formação de resíduos neurotóxicos de substâncias organocloradas, formação de compostos suspeitos por reação com outras substâncias presentes nos géneros alimentícios, hipercinesia (movimentos involuntários anormais de um órgão ou região específica do corpo) e, em doses excessivas, podem causar irritação gástrica (**Lidon e Silvestre, 2010**).

São utilizados nos géneros alimentícios para os quais estão autorizados, nomeadamente: bebidas aromatizadas sem álcool (como os refrigerantes ou os xaropes), cerveja sem álcool, frutos e produtos hortícolas em conserva ou cristalizados, compotas, doces e geleias com baixo teor de açúcar ou sem adição de açúcar, produtos de confeitaria, pastilhas elásticas, produtos à base de peixe e de ovos, camarões cozidos, saladas preparadas, molhos, condimentos e temperos, beterraba vermelha cozida, entre outros (**Lidon, 2016**).

9.2. E 211 – Benzoato de Sódio

Este aditivo alimentar possui a denominação química de benzoato de sódio, sal sódico do ácido benzenocarboxílico ou sal sódico do ácido fenilcarboxílico, com fórmula química $C_7H_5O_2Na$ e massa molecular 144,11 g/mol. A sua composição terá um teor de $C_7H_5O_2Na$ não inferior a 99 %, após secagem a 105 °C durante 4 horas. Apresenta-se como um produto pulverulento cristalino ou em grânulos, praticamente inodoro, de cor branca, sendo muito solúvel em água e moderadamente solúvel em etanol. Identifica-se, à semelhança do ácido benzóico, pelo ponto de fusão entre 121,5 e 123,5 °C (após secagem sobre vácuo num exsicador com ácido sulfúrico) e pesquisa de benzoatos e sódio, ambas positivas (**Regulamento 231/2012**). Para a sua produção/síntese é feita a reação do ácido com o respetivo hidróxido (neste caso de sódio) (**Emerton e Choi, 2008**). Na figura seguinte (Figura 10) apresenta-se a fórmula de estrutura do benzoato de sódio:

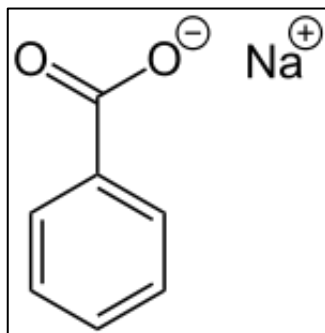


Figura 10 – Fórmula de Estrutura do Benzoato de Sódio (E 211) (Fonte:

https://pt.wikipedia.org/wiki/Benzoato_de_s%C3%B3dio)

Este sal, bem como os restantes sais alcalinos do ácido benzóico (sais de potássio – E 212 e sais de cálcio – E 213) são frequentemente usados dado que possuem o mesmo poder antimicrobiano que o seu ácido, contudo são muito mais solúveis, o que torna a sua aplicação muito útil em géneros alimentícios que se encontrem no estado líquido, como sejam os refrigerantes ou os sumos de fruta (**Lidon e Silvestre, 2007**). No entanto, a sua aplicação estende-se a todos os géneros alimentícios enumerados para o aditivo imediatamente anterior (E 210), o mesmo se aplica aos efeitos secundários enunciados.

Regra geral, são utilizados sinergicamente com outros conservantes, como os sorbatos ou o dióxido de enxofre, inibindo a ação enzimática e o escurecimento associado. Os benzoatos apresentam um sabor característico, daí serem utilizados em concentrações muito reduzidas. Não deverão ser utilizados em farinhas auto levedantes, uma vez que inativam a levedura (**Emerton e Choi, 2008**).

Doses diárias inferiores a 0,5 g de benzoato de sódio são inofensivas para o ser humano, sendo que doses $\leq 0,4$ g/dia não apresentam perigo de acumulação, sendo eliminadas por via renal sob a forma de ácido hipúrico ou como derivados do ácido glucurónico (**Lidon e Silvestre, 2010**).

9.3. E 219 – Sal Sódico do *p*-hidroxibenzoato de Metilo

Este aditivo alimentar possui a designação química de sal sódico do *p*-hidroxibenzoato de metilo ou composto sódico do éster metílico do ácido *p*-hidroxibenzóico, tem a fórmula química $C_8H_7O_3Na$ e o valor de 174,15 g/mol de massa molecular. A sua composição terá um teor não inferior a 99,5 % numa base anidra, apresentando-se como um produto pulverulento higroscópico, de cor branca. Pode ser identificado através do seu intervalo de fusão, o qual varia entre 125 e 128 °C, com ensaio positivo para pesquisa de sódio e pH compreendido entre 9,7 e 10,3 numa solução aquosa a 0,1 % isenta de dióxido de carbono (**Regulamento 231/2012**). Este éster, à semelhança dos outros ésteres do mesmo grupo (E 214, E 215 e E 218) são produzidos através da reação dos respetivos álcoois com o ácido *p*-hidroxibenzóico. O ácido resulta da reação do fenato de potássio com dióxido de carbono, sobre condições elevadas de pressão e temperatura. Estes ésteres possuem um efeito antimicrobiano superior ao do ácido benzóico, aumentando a sua eficácia com o aumento do comprimento da cadeia do grupo éster. São eficazes contra bolores e leveduras, e menos eficazes contra bactérias, especialmente as bactérias *Gram* negativas, sendo utilizados em combinação com o ácido sórbico ou o ácido benzóico. São moderadamente solúveis em matrizes gordurosas, sendo muito utilizados em produtos cosméticos e de cuidado pessoal (**Emerton e Choi, 2008**).

Nos géneros alimentícios o E 219 é utilizado em revestimentos gelatinosos de produtos cárneos, em patés, no tratamento da superfície de produtos de carne seca, aperitivos à base de cereais ou batata, frutos secos revestidos e em produtos de confeitaria (**Lidon e Silvestre, 2007**), contudo o seu uso é bastante limitado, dado que o sabor dos ésteres, mesmo presente nos alimentos em pequenas concentrações, é facilmente detetado (**Emerton e Choi, 2008**).

Como efeitos secundários identificados estão reações alérgicas e possíveis efeitos anestésiantes, vasodilatadores e desencadeantes de câibras. A inocuidade relativamente à produção de monstruosidades nos seres vivos (teratogenicidade) não está provada (**Lidon e Silvestre, 2010**).

Mais se acrescenta que o consumo deste aditivo não é recomendado a crianças, uma vez que se acredita que existe uma ligação entre o consumo do E 219 e o posterior aparecimento

de comportamentos hiperativos nas mesmas. Está proibido em França e na Austrália (**UK Food Guide, 2017**).

O **DL 33/2005** defendia a proibição da utilização dos parabenos E 214 e E 219, uma vez que a dose diária admissível dos mesmos, havia sido fixada, à data, apenas temporariamente, não havendo dados suficientes relativos à toxicidade dos mesmos, de acordo com pareceres emitidos pelo Comité Científico da Alimentação Humana. Facto é também que no **Regulamento 1129/2011**, o E 219 está inserido na lista comunitária de aditivos e, como tal, a sua utilização é autorizada, está legislada e, como tal, são apresentados os géneros alimentícios aos quais pode ser adicionado, bem como os limites relativos aos teores de aplicação.

9.4. E 260 – Ácido Acético

Este aditivo alimentar possui a denominação química de ácido acético ou ácido etanóico, com fórmula química $C_2H_4O_2$ e massa molecular igual a 60,05 g/mol. Apresenta-se como um líquido incolor, límpido, com odor acre característico e cuja composição terá um teor não inferior a 99,8 %. Para identificação utilizam-se vários parâmetros como o ponto de ebulição a 118 °C a 760 mm Hg, a densidade relativa de 1,049, a pesquisa de acetato positiva numa solução de uma parte para três (1:3) e um ponto de solidificação não inferior a 14,5 °C (**Regulamento 231/2012**). A sua fórmula de estrutura encontra-se representada na figura 11:

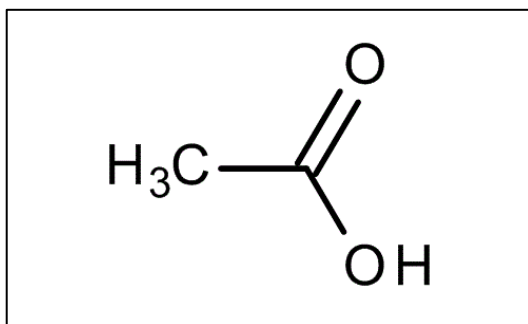


Figura 11 – Fórmula de Estrutura do Ácido Acético (E 260) (Fonte: <https://www.merckmillipore.com>)

É um dos constituintes do vinagre e desempenha funções de conservante, acidificante e regulador de acidez e é bastante eficaz contra leveduras e bactérias (a partir de uma concentração de 5 %) e menos eficaz contra bolores. Utiliza-se sinergicamente com outros aditivos como o ácido sórbico ou o ácido láctico e a sua ação é reforçada pelos métodos de conservação como sejam a pasteurização ou a esterilização ou a adição de sal (cloreto de sódio) pela diminuição do A_w do produto (**Emerton e Choi, 2008**).

Não são conhecidos efeitos secundários adversos para o ser humano causados pelo consumo de produtos com este aditivo, sendo então aplicado a uma diversidade de produtos como sejam: mostarda, molho vinagrete, frutos e produtos hortícolas em conserva, conservas de peixe, pão, queijo *mozzarella* e requeijão, pudins instantâneos, alimentos para bebés, entre outros (Lidon e Silvestre, 2007).

A fonte de produção original de vinagre começou por ser a oxidação accidental do vinho por bactérias acidificantes, contudo as soluções mais concentradas de ácido acético são produzidas industrialmente através da oxidação de etanol ou de hidrocarbonetos (Emerton e Choi, 2008). A destilação da madeira poderá ser uma forma alternativa para obtenção deste ácido (Lidon e Silvestre, 2007).

9.5. E 280 – Ácido Propiónico

Este aditivo alimentar possui a denominação química de ácido propiónico ou ácido propanóico, tem a fórmula química $C_3H_6O_2$ e a massa molecular igual a 74,08 g/mol. É um líquido oleoso, incolor ou de cor ligeiramente amarelada, com um ligeiro odor acre, apresentando um teor não inferior a 99,5 %. Tem como ponto de fusão a temperatura de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ e como intervalo de destilação a gama de temperaturas entre $138,5$ e $142,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Regulamento 231/2012). A sua fórmula de estrutura encontra-se representada na figura 12:

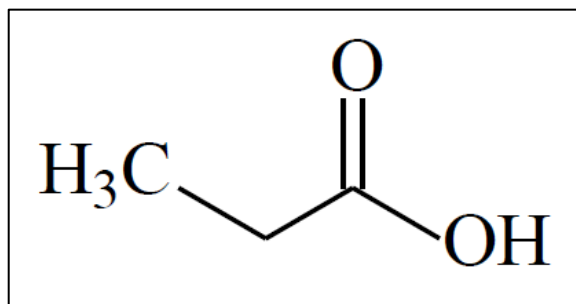


Figura 12 – Fórmula de Estrutura do Ácido Propiónico (E 280) (adaptado de Lidon, 2016)

É um ácido gordo saturado e é um constituinte dos fluidos do ser humano. Pode ser produzido a partir do ácido láctico pela *Propionibacterium* ou através da oxidação de propionaldeídos. Ocorre naturalmente no queijo Suíço (com uma concentração aproximada de 1 %) e está presente no sistema digestivo (no rúmen) dos ruminantes. É bom inibidor de bolores (inibe o crescimento de diversas espécies: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus*) e de bactérias como o *Bacillus mesenterius* ou o *Bacillus subtilis*, no entanto, a sua ação contra as leveduras é praticamente nula. É utilizado para prolongar o *shelf-life* de produtos de panificação,

queijos e seus derivados (tratamento da superfície de queijos por imersão em soluções a 8 % **(Lidon e Silvestre, 2007)**), impedindo o crescimento e proliferação de bolores, sendo também aplicado em salsichas enlatadas tipo *Frankfurt* para evitar o rebentamento da embalagem devido à acumulação de gases no seu interior, em recheios de tartes, em puré de tomate, molhos não emulsionados, geleias e conservas. O seu nível de pH ótimo situa-se entre 5 e 6 **(Emerton e Choi, 2008)**.

Nas quantidades permitidas por lei, este aditivo assim como os seus sais, não apresenta toxicidade **(Lidon e Silvestre, 2010)**.

9.6. E 281 – Propionato de Sódio

Este aditivo alimentar possui a denominação química de propionato de sódio ou propanoato de sódio, tem a fórmula química $C_3H_5O_2Na$ e a massa molecular igual a 96,06 g/mol. É um produto pulverulento cristalino higroscópico, de cor branca, ou um produto pulverulento fino, de cor branca, apresentando um teor não inferior a 99 %, após secagem a 105 °C, durante 2 horas. Para a sua identificação admitem-se ensaios para pesquisa de propionato e de sódio, ambos positivos e gamas de pH entre 7,5 e 10,5 numa solução aquosa a 10 % **(Regulamento 231/2012)**.

Este sal, assim como os outros propionatos, E 282 (cálcio) e E 283 (potássio), são solúveis em água e são produzidos através da reação do ácido propiónico com hidróxidos ou carbonatos dos respetivos sais. São prontamente digeridos e metabolizados no corpo humano. As suas funções antimicrobianas, bem como os alimentos aos quais poderão ser adicionados, serão os mesmos que o aditivo imediatamente anterior (E 280). De referir que estes sais se misturam facilmente com os géneros alimentícios e não alteram a cor, o sabor e a textura quando usados dentro dos teores previstos na legislação e, sendo pós, serão mais fáceis de utilizar do que o ácido propiónico líquido segundo **Emerton e Choi (2008)**. Ainda segundo as mesmas autoras os sais de sódio e potássio serão os mais indicados para produtos que usem levedantes químicos, uma vez que ao usar-se o sal de cálcio pode correr-se o risco de haver interferências negativas entre o ião cálcio (Ca^{2+}) e os agentes químicos que atuam como levedantes.

10. Material e Métodos

10.1. Reagentes

No decorrer de todo o trabalho experimental foram utilizados os seguintes reagentes: ácido benzóico 99,5 %, PanReac, sólido, benzoato de sódio 99,0 - 100,5 %, PanReac, sólido, ácido acético glacial 99,7 %, PanReac, solução aquosa, ácido propiónico 99 %, PanReac, solução aquosa, propionato de sódio 99,0 - 100,5 %, PanReac, sólido e 4-hidroxibenzoato de metilo 99,0 - 100,5 %, PanReac, sólido. Numa primeira fase, foram usados na preparação das soluções, água destilada obtida a partir de um destilador de marca *Nahita Blue* e com uma capacidade de 4 L/h e etanol absoluto da MERCK (R: 11, S: 7-16). Posteriormente optou-se pela utilização de apenas etanol absoluto como solvente na preparação das soluções dos aditivos.

10.2. Amostras

Todas as amostras utilizadas no decorrer do trabalho experimental, bem como as embalagens para acondicionamento das mesmas após aplicação dos aditivos (sacos plásticos microperfurados com logótipo e demais informações obrigatórias ao nível da rotulagem) foram facultadas, sempre que requisitadas, pela empresa PaniMafra. As amostras eram de pão de forma de Mafra já cozido e pronto a consumir, chegando até ao laboratório embalado e selado. Os ingredientes, as suas percentagens relativas e o fluxograma de fabrico do referido pão encontram-se supramencionados na parte introdutória desta dissertação.

10.3. Materiais e Equipamentos

No quadro seguinte (Quadro 8) é possível observar a lista completa de materiais e equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental.

Material:
Luvas de latex: marca Romed, Refª.: 350, tamanho: grande
Máscaras de proteção faciais
Micropipeta: capacidade 100-1000 µL, modelo SA0691, marca COMECTA S.A. + Pontas
Gobelés: marca <i>Simax</i> , capacidades 100 e 250 mL
Balões volumétricos: marca <i>Linex</i> , capacidade 100 mL +/- 0,1 mL, 20 °C
<i>Erlenmeyers</i> : marca <i>Simax</i> , capacidade 100 mL
Varetas de vidro

Funis de vidro
Esguicho
Espátulas metálicas
Vidros de relógio
Pulverizadores manuais plásticos com capacidades de 30, 40, 50 e 60 mL
Cadinhos de porcelana
Equipamento:
Destilador: marca <i>Nahita Blue</i> , capacidade 4 L/h
Lupa binocular: marca <i>Leica</i> , modelo DFC295, 12 V/165 mA
Microscópio Ótico Composto (MOC) com câmara fotográfica
Balança de precisão: modelo Series 5153, marca <i>Nahita</i> , máx: 300g, d = 0,001g
Estufa: marca <i>Jeio Tech</i> , modelo OF-02P, 230V, 50Hz, 4.2A, <i>serial number</i> V035208
Mufla: marca <i>Heraeus Instruments</i> , máx = 1200 °C
Exsicador a vácuo: marca <i>Jeio Tech</i> + Aspirador elétrico: modelo VE-11, 230V, 50Hz, 0.7A, marca: <i>Jeio Tech</i>
Colorímetro <i>Chroma Meter CR-400 Series</i> , Ver. 1.12, <i>Konica Minolta Sensing, Inc.</i>
<i>Niton XRF Analyzer Thermo Scientific – Mobile Test Stand</i>

Quadro 8 – Materiais e equipamentos utilizados (autoria própria, elaborado com os dados fornecidos pelos fabricantes dos equipamentos/materiais)

10.4. Métodos

10.4.1. Ensaio 1

Num primeiro ensaio trabalhou-se com a globalidade dos reagentes supramencionados (6), uma vez que era necessário efetuar uma triagem dos aditivos mais eficazes, bem como apurar quais os solventes mais indicados, tendo sempre em vista a manutenção das características organoléticas do pão e o prolongamento do seu tempo de vida útil. Assim, começou-se por preparar as soluções dos reagentes segundo as concentrações do quadro 9 que a seguir se apresenta, utilizando os solventes lá descritos (etanol absoluto para os ácidos à exceção do ácido acético e água destilada para os sais à exceção do sal sódico do p-hidroxibenzoato de metilo). De referir que as concentrações preparadas não excedem o teor máximo permitido por lei. Neste quadro os reagentes estão definidos pelo seu código E por uma questão de simplificação de escrita e simplificação da codificação atribuída às diferentes soluções preparadas, estando explícito na parte introdutória desta dissertação a associação entre o código alfanumérico que define o aditivo e a sua designação química.

Preparou-se volumes de 100 mL de solução por cada concentração, perfazendo um total de 18 soluções diferentes.

Aditivo	Teor máximo	MM (g/mol)	Volume (dm ³)	Massa (g)	Concentração (mg/dm ³)	Código	Solvente
E 210	1000 mg/Kg/L ou 0,1%	122,12	0,1	0,050	500	E210a	Etanol absoluto
				0,075	750	E210b	
				0,100	1000	E210c	
E 211	1000 mg/Kg/L ou 0,1%	144,11	0,1	0,050	500	E211a	Água destilada
				0,075	750	E211b	
				0,100	1000	E211c	
E 219	300 mg/Kg/L ou 0,03%	174,15	0,1	0,010	100	E219a	Etanol absoluto
				0,020	200	E219b	
				0,030	300	E219c	
E 260	<i>Quantum satis</i>	60,05	0,1	0,120 g ou 114 µL	1200	E260a	Água destilada
				0,240 g ou 228 µL	2400	E260b	
				0,480 g ou 457 µL	4800	E260c	
E 280	3000 mg/Kg/L ou 0,3%	74,08	0,1	0,200 ou 202 µL	2000	E280a	Etanol absoluto
				0,250 ou 252 µL	2500	E280b	
				0,300 ou 303 µL	3000	E280c	
E 281	3000 mg/Kg/L ou 0,3%	96,06	0,1	0,200	2000	E281a	Água destilada
				0,250	2500	E281b	
				0,300	3000	E281c	

Quadro 9 – Concentrações dos reagentes utilizados no Ensaio 1 (autoria própria)

Cada amostra era constituída por 3 fatias de pão e de cada solução efetuavam-se 3 réplicas, originando na totalidade 54 amostras tratadas e mais uma amostra de controlo.

Em termos de procedimento propriamente dito consistia em pulverizar cada amostra com 10 mL de solução do aditivo, fazendo incidir a pulverização no miolo, mas essencialmente na parte externa das côdeas (laterais e nos topos). De referir que as pulverizações eram efetuadas numa *hotte* para que houvesse extração dos vapores criados e o manipulador teria de estar equipado, para além da bata, com luvas e máscara oro nasal. Após a pulverização deixava-se a amostra “secar” para que o solvente evaporasse e colocava-se nos sacos de plástico microperfurados, fotografando-se em seguida as amostras neste dia de aplicação dos aditivos (considerado como dia zero). Os sacos eram deixados abertos e colocados numa caixa de cartão fechada, portanto, ao abrigo da luz solar, que se deixava à temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) (temperatura do laboratório).

Nos dias subsequentes à aplicação dos aditivos verificava-se a evolução e/ou crescimento de bolor nas amostras, fazendo-se uma observação direta das mesmas sob uma luz forte, registando-se fotograficamente. Esta manipulação era efetuada com luvas e máscara de proteção facial para que não houvesse uma fonte de contaminação externa extra.

Quando numa amostra aparecia bolor, esta era identificada e fotografada mais em pormenor (contemplando diversos ângulos das côdeas e da parte interna do miolo para distinguir o grau de ação dos bolores), não sendo, no entanto, segregada das restantes, isto é, introduzia-se novamente a amostra no saco e na caixa e voltava-se a observar no dia seguinte para verificar proliferação. Este processo repetia-se até todas as amostras ficarem

contaminadas, sendo que quando isso acontecia dava-se por terminado o ensaio e as amostras eram rejeitadas para o caixote do lixo.

Algumas amostras foram reservadas para que se pudessem observar os bolores em detalhe à lupa binocular e ao microscópio ótico composto, numa tentativa de identificar estruturas chave para uma identificação do género ou espécie do bolor presente. Finda esta observação, as amostras eram então descartadas.

10.4.2. Ensaio 2

Num segundo ensaio utilizaram-se apenas os aditivos ácido benzóico 99,5 %, PanReac, sólido e 4-hidroxibenzoato de metilo 99,0 - 100,5 %, PanReac, sólido como solutos e o etanol absoluto como solvente. Preparou-se volumes de 50 mL de solução por cada concentração, como se mostra no quadro 10, perfazendo um total de 12 soluções diferentes. Cada amostra era constituída por 3 fatias de pão e de cada solução efetuavam-se 4 réplicas, originando na totalidade 48 amostras tratadas mais uma amostra de controlo.

Aditivo	Teor máximo	MM (g/mol)	Volume (dm ³)	Massa (g)	Concentração (mg/dm ³)	Código	Solvente
E 210	1000 mg/Kg/L ou 0,1%	122,12	0,05	0,025	500	E210a	Etanol absoluto
				0,038	750	E210b	
				0,050	1000	E210c	
				0,063	1250	E210d	
				0,075	1500	E210e	
				0,088	1750	E210f	
E 219	300 mg/Kg/L ou 0,03%	174,15	0,05	0,005	100	E219a	Etanol absoluto
				0,010	200	E219b	
				0,015	300	E219c	
				0,020	400	E219d	
				0,025	500	E219e	
				0,030	600	E219f	

Quadro 10 – Concentrações dos reagentes utilizados no Ensaio 2 (autoria própria)

Em termos de procedimento efetuou-se exatamente como descrito para o Ensaio 1 (ponto imediatamente anterior), mantendo-se a quantidade de solução pulverizada bem como todos os passos subsequentes.

10.4.3. Ensaio 3

Para o terceiro ensaio (último ensaio laboratorial antecedendo o ensaio em contexto empresarial) utilizaram-se os mesmos reagentes e solvente do ensaio anterior, preparando

volumes de solução e concentrações de acordo com o estipulado no quadro 11 que a seguir se apresenta.

Aditivo	Volume (dm³)	Massa (g)	Concentração (mg/dm³)	Código	Solvente
E 210	0,200	0,700	3500	E210f	Etanol absoluto
E 219	0,200	0,060	300	E219c	
E 219	0,100	0,060	600	E219f	

Quadro 11 – Concentrações dos reagentes utilizados no Ensaio 3 (autoria própria)

A principal diferença para com os outros ensaios prende-se com a dimensão da amostra e, consequentemente, com a quantidade de solução do aditivo que é pulverizada. Assim, neste ensaio, cada amostra é composta por metade de um pão de forma de Mafra, o que equivale a 9 fatias e pulveriza-se com 30 mL da solução. Para cada solução de tratamento efetuam-se três réplicas, originando um total de 9 amostras tratadas mais uma amostra de controlo.

Em termos de procedimento efetuou-se exatamente como descrito para os Ensaios 1 e 2 (ver pontos anteriores), efetuando, como é óbvio, as alterações do parágrafo anterior.

10.4.4. Ensaio em Contexto Empresarial

Nesta última fase (fase de verificação em “grande escala” dos resultados obtidos em laboratório), desta feita já em ambiente industrial/fábrica, utilizou-se apenas o ácido benzóico 99,5 %, PanReac, sólido e o etanol como solvente, tendo sido preparada uma solução com um volume de 900 mL com a concentração que se exhibe no quadro 12 (quadro seguinte):

Aditivo	Volume (dm³)	Massa (g)	Concentração (mg/dm³)	Código	Solvente
E 210	0,900	3,150	3500	E210	Etanol absoluto

Quadro 12 – Concentrações dos reagentes utilizados a nível Industrial (autoria própria)

A principal diferença para com os ensaios preliminares em laboratório (ensaios 1, 2 e 3) prende-se com a dimensão da amostra e, consequentemente, com a quantidade de solução do aditivo que é pulverizada e com a fonte de pulverização. Assim, no ensaio em contexto empresarial, cada amostra é composta por um pão de forma de Mafra inteiro, o que equivale a 18 fatias e pulveriza-se com 60 mL da solução. Para este tratamento efetuam-se 14 réplicas, originando um total de 14 amostras tratadas mais uma amostra de controlo. A fonte de pulverização seria o pulverizador embutido na máquina de fatiagem e embalagem da empresa (consultar **Anexo 1** para ver imagens), mas devido a problemas técnicos que serão explicados

numa fase posterior desta dissertação, não foi possível utilizar este aplicador e, como tal, recorreu-se novamente a borrifadores manuais.

Assim, as pulverizações das amostras foram efetuadas na zona de embalamento da empresa após a fatiagem dos pães e antes da colocação dos mesmos nos sacos de plástico microperfurados, sendo selados de seguida. Quando se encontravam todas as amostras tratadas e embaladas foram colocadas em caixas plásticas perfuradas e foram armazenadas na zona de embalamento que se encontrava climatizada para a temperatura ambiente de cerca de 25 °C. Os procedimentos de registo fotográfico permaneceram os mesmos dos ensaios laboratoriais.

Nesta fase, tendo tudo corrido como planeado e sendo os resultados positivos e satisfatórios para a empresa, far-se-iam os ajustes da solução à máquina de pulverização, otimizando todo o processo inerente, quer em termos de fluxograma de fabrico, quer em termos de segurança alimentar quer em termos de alargamento do *shelf-life time* do produto.

10.4.5. Determinação da Humidade Relativa

Para a determinação da humidade relativa seguiu-se a **NP 516/2000** relativa à determinação do teor de água para cereais e derivados, tendo sido realizados os seguintes passos para as 10 amostras de pão de forma de Maфра analisadas: identificaram-se 10 cadinhos de porcelana com os códigos PM1, PM2, PM3, PM4, PM5, PM6, PM7, PM8, PM9 e PM10 e colocaram-se os cadinhos vazios na estufa a 130 °C durante 1 h. Retiraram-se os cadinhos e colocaram-se no exsicador durante 30 min para arrefecer. Pesaram-se os cadinhos vazios e registaram-se os pesos. De seguida, colocaram-se 5 g de amostra em cada cadinho (quando não se conseguia obter exatamente 5,000 g de amostra, eram anotados e entravam para as contas os valores mais próximos que se obtinham) e colocaram-se os cadinhos com as amostras na estufa a 130 °C durante 1:30h. Findo este tempo, colocaram-se os cadinhos com as amostras no exsicador durante 30 min para arrefecer e pesaram-se os cadinhos, anotando o peso. Repetiu-se o processo anterior 3 vezes, dado que o peso estabilizou. Caso não ocorresse a estabilização assumiu-se a paragem do processo quando a diferença do peso entre duas pesagens consecutivas fosse inferior a 10 %.

Com os valores médios obtidos foi possível chegar ao valor da humidade relativa (em %) através das seguintes fórmulas:

$$\text{Peso Matéria Seca (g)} = (\text{Peso Cadinho} + \text{Pão Desidratado}) - (\text{Peso Cadinho Vazio})$$

$$\text{Peso Água Libertada (g)} = (\text{Peso Amostra Húmida}) - (\text{Peso Matéria Seca})$$

$$\text{Humidade Relativa (\%)} = \left(\frac{\text{Peso Água Libertada}}{\text{Peso Amostra Húmida}} \right) \times 100$$

10.4.6. Determinação do Teor de Cinzas

Para a determinação do teor de cinzas seguiu-se a **NP 519/1993** relativa à determinação do teor de cinza a 900 °C para cereais e derivados, tendo sido realizados os seguintes passos para as 10 amostras de pão de forma de Mafra analisadas: utilizaram-se amostras da determinação da humidade relativa (referidas no ponto imediatamente anterior) e colocaram-se na mufla a 900 °C durante 2 h (tendo sido feito um esquema em papel com a identificação dos cadinhos, uma vez que a tinta desaparece neste processo). Tendo sido retirados da mufla, foram colocados no exsiccador até ao dia seguinte para arrefecer. Depois de frios, pesaram-se os cadinhos com as cinzas obtidas (fração mineral da amostra) e retirou-se o peso dos cadinhos vazios para que se possam totalizar as cinzas (em %) como se exemplifica nas fórmulas seguintes:

$$\text{Peso Cinzas} = (\text{Peso Cadinho} + \text{Cinzas}) - (\text{Peso Cadinho Vazio})$$

$$\text{Cinzas (\%)} = \left(\frac{\text{Peso Cinzas}}{\text{Peso Amostra Húmida}} \right) \times 100$$

10.4.7. Determinação do Teor de Matéria Orgânica

Para a determinação do teor de matéria orgânica não foi realizado nenhum procedimento experimental específico, tendo sido determinado indiretamente por cálculos que têm por base as duas determinações anteriores (humidade relativa e cinzas), como se pode observar nas fórmulas que se seguem:

$$\text{Peso Matéria Orgânica} = (\text{Peso Matéria Seca}) - (\text{Peso Cinzas})$$

$$\text{Matéria Orgânica (\%)} = \left(\frac{\text{Peso Matéria Orgânica}}{\text{Peso Amostra Húmida}} \right) \times 100$$

10.4.8. Análise da Cor

Para análise da cor utilizam-se as coordenadas cromáticas do sistema CIE Lab, constituindo as três dimensões do espaço de cor que representam as cores visíveis ao olho humano.

Estão localizadas entre 400 e 700 nm de comprimento de onda, abrangendo todas as cores desde o violeta ao vermelho (zona do visível do espectro eletromagnético). As coordenadas são então L^* , a^* e b^* , sendo que L^* varia entre 0 e 100, onde 0 corresponde à cor preta e 100 à cor branca, a^* vai desde verde (valores muito negativos) a vermelho (valores muito positivos) e b^* vai do azul (valores muito negativos) ao amarelo (valores muito positivos) (Almeida, 2004). O espaço tridimensional CIE Lab onde L^* se encontra num eixo vertical e a^*/b^* se encontram em eixos horizontais pode ser representado na figura seguinte (Figura 13):

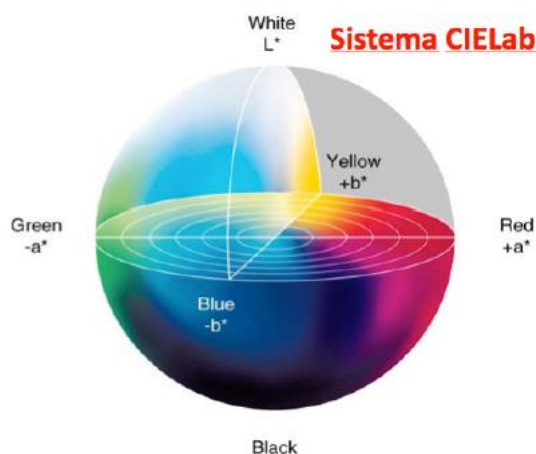
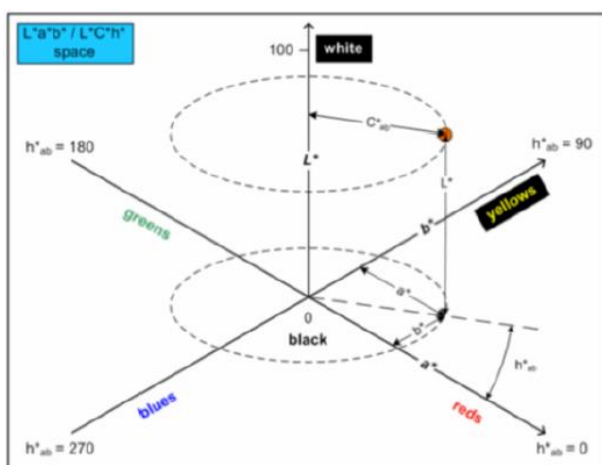


Figura 13 – Espaço de Cor CIE Lab (adaptado de Pessoa ^b, 2016)

Em relação à cromaticidade poderão avaliar-se as suas coordenadas polares, C^* e h° , onde C^* se designa por Croma e quanto maior for o seu valor maior será a pureza ou intensidade da



cor (se for igual a zero então a cor é o cinzento) e h° é o ângulo de cor, representando a tonalidade, ou seja, a cor propriamente dita. Valores de $h^\circ = 0^\circ$ correspondem à cor vermelha, $h^\circ = 90^\circ$ à cor amarela, $h^\circ = 180^\circ$ à cor verde e $h^\circ = 270^\circ$ corresponde à cor azul (Almeida, 2004). Para melhor compreensão observar a figura ao lado (Figura 14):

Figura 14 – Representação da Cor nas Coordenadas $L^*/C^*/h^\circ$ (adaptado de Pessoa ^b, 2016)

Para medir a cor utilizou-se o colorímetro referido na secção de materiais e equipamentos supramencionada, sendo a leitura efetuada para o iluminante D65 e cada leitura foi feita em triplicado, obtendo-se posteriormente os valores médios. Antes do início das leituras das amostras efetuou-se a calibração do aparelho com o auxílio de um azulejo padrão de cor branca. Depois desta calibração, a título experimental e para ter a noção efetiva dos valores e do seu significado, foram realizadas leituras a objetos azuis, verdes, vermelhos, amarelos e pretos.

As amostras a ler foram, mais uma vez, de pão de forma de Mafra, tendo sido analisada a cor do miolo, a cor das côdeas laterais, a cor da côdea superior e a cor da côdea da base. Foram realizadas três leituras de cada superfície, colocando o aparelho diretamente por cima da amostra, não havendo problema de o danificar, uma vez que não se tratava de um produto em pó nem de um líquido.

10.4.9. Análise aos Elementos Minerais

Para analisar e quantificar os elementos minerais do pão de forma de Mafra recorreu-se ao equipamento supracitado *Niton XRF Analyzer Thermo Scientific*, doravante designado apenas por *XRF*. Em termos muito genéricos, este aparelho funciona por fluorescência provocada por raios X, causando o deslocamento dos eletrões da sua posição na orbital do átomo, com consequente libertação de energia. É esta energia libertada que é captada pelo detetor que se encontra no aparelho e, como é específica para cada elemento, permite classificá-lo, identificá-lo e quantificá-lo. Esta quantificação dos elementos vem em ppm (ou mg / Kg de matéria seca), sendo necessário fazer a conversão para mg / 100 g de matéria húmida (entrando em linha de conta com o teor de humidade relativa determinado anteriormente), uma vez que as amostras lidas no *XRF* se encontram desidratadas e reduzidas a pó.

Para se efetuarem as leituras ligou-se o aparelho, efetuaram-se dois *system check* e passaram-se quatro padrões, com uma duração de 6 minutos cada um. Após esta calibração do aparelho (que deverá ser feita sempre que se façam leituras) encheram-se as cápsulas de leitura com o pão de forma de Mafra desidratado e reduzido a pó e colocaram-se no aparelho para se efetuarem leituras de 360 segundos (aproximadamente 6 minutos/cada). Como eram 10 amostras foram efetuadas 10 leituras, obtendo-se então no fim os valores médios dos elementos minerais presentes com o respetivo erro associado. Para os elementos não existentes nas amostras ou existentes, mas numa quantidade residual, o aparelho não os conseguiu detetar, afirmando que se encontravam abaixo do limite de deteção, devolvendo <LOD. O aparelho lê uma série de elementos (como se irá verificar na secção de resultados da presente dissertação) podendo ser divididos em macro e microelementos, em poluentes, contaminantes

e metais pesados. Devolve também o valor do BAL, no qual estão incluídos os elementos minerais que não lê (neste caso, o Sódio), alguma água residual que possa ter resistido à desidratação e toda a parte orgânica. Desta feita, e como será comprovado mais adiante, podemos afirmar grosseiramente que o BAL corresponde ao teor de matéria orgânica presente na amostra.

10.4.10. Análise Sensorial

A análise sensorial é fulcral na avaliação e validação das características organoléticas finais de um produto, determinando a sua aceitação ao nível do consumidor. Existem dois tipos de análise sensorial que poderiam ser aplicados, a análise sensorial descritiva e a análise sensorial hedónica, mas optou-se apenas por se utilizar a análise hedónica para expressar as preferências relativamente às amostras provadas e a uma série de atributos definidos. Não se optou por fazer uma análise descritiva dado que esta seria muito mais morosa, necessitava de um painel de provadores treinados (o que demora imenso tempo, não sendo possível terminar em tempo útil), necessitava de instalações de prova com as condições adequadas para que não houvesse interferência das condições ambientais na avaliação a fazer e necessitava da preparação de soluções padrão comparativas para cada parâmetro avaliado. No **Anexo 2** sugere-se uma possível grelha de preenchimento para uma análise sensorial descritiva.

Por todas estas razões optou-se por fazer uma análise às preferências dos provadores de pão de forma de Mafra sem aditivos e pão de forma de Mafra com aditivos no 5.º dia de tratamento (dado que era o prazo máximo pretendido pela empresa). A avaliação era feita numa escala de 1 a 9 em que 1 correspondia a “desagrada muitíssimo” e 9 correspondia a “gosta muitíssimo”. Os parâmetros avaliados foram o aspeto, a cor, o cheiro a pão de Mafra, o sabor, a textura e a humidade e no fim uma apreciação em termos globais.

Para esta avaliação foram inquiridos 16 indivíduos, 8 do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 18 e os 81 anos, com formações académicas vastas até ao nível do mestrado, havendo, também, um indivíduo analfabeto. Esta prova foi realizada no dia 12 de junho de 2017, com amostras de pão de forma de Mafra retiradas da fábrica ao 5.º dia de tratamento com o aditivo e cozido nessa manhã (sem aditivos).

No **Anexo 3** observamos o questionário que foi utilizado para esta análise hedónica.

10.4.11. Identificação de Bolores ao MOC e à Lupa Binocular

Quando surgiam bolores nas amostras estes foram primeiramente observados à lupa binocular com diversas ampliações e diversos contrastes, na tentativa de pormenorização do aglomerado e aumento das suas estruturas gerais, tendo sido tiradas as fotografias que se apresentam na secção de resultados seguinte.

Após esta primeira abordagem os bolores foram observados ao MOC onde se colocava uma parte de um bolor na lâmina de vidro e se recobria com uma lamela e se adicionava uma gota de água destilada. A imagem era depois observada com 4, 10, 40 e 100 vezes de ampliação, na tentativa de identificação de estruturas de reprodução ou corpos de frutificação para que fosse possível uma classificação do género dos bolores presentes e, com sorte, da espécie. Também aqui foram tiradas fotografias que posteriormente foram enviadas para o INIAV para identificação das espécies presentes.

10.4.12. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com recurso ao *Microsoft Office Excel 2007®* (*Microsoft Corporation, Washington*) para comparar estatisticamente as diversas amostras, recorreu-se a uma análise ANOVA (Análise de Variância – *One Way ANOVA*) para verificar se existem diferenças significativas entre as amostras analisadas. Em todos os testes-t elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05 (Ver **Anexo 5**).

11. Resultados e Discussão

11.1. Parte 1 – Análises Diversas

Em relação à caracterização das farinhas e de diversos parâmetros que lhes são intrínsecos e determinantes para um bom resultado na panificação observe-se o quadro seguinte (Quadro 13):

Farinha	António T65	Ramos T65	Centeio
Humidade (%)	14,13	13,85	12,90
Proteína MS (%)	10,90	11,13	7,90
Cinzas MS (%)	0,60	0,66	1,30
Glúten Húmido (%)	25,88	26,15	
Índice de Glúten (%)	88,25	86,00	
Tenacidade P (mm)	92,03	101,73	
Elasticidade L (mm)	67,20	60,18	
Força W (E-4J)	208,25	223,05	
Absorção (%)	55,85	57,18	62,90

Quadro 13 – Principais características das farinhas utilizadas na PaniMafra (adaptado de Bagulho, 2016)

Pelo quadro anterior pode inferir-se que as duas farinhas de trigo utilizadas (António T65 e Ramos T65) apresentam valores muito semelhantes para os atributos descritos, o que indicia um bom nível de homogeneidade ao nível da matéria-prima, levando a uma uniformização de resultados expectáveis nas massas e, posteriormente, no pão cozido. Os índices de glúten são bastante elevados (86 % e 88 %) assim como os níveis de absorção de água, o que indica uma boa aptidão para retenção do dióxido de carbono proveniente da fermentação, fazendo com que o pão aumente de volume sem rebentar, devido à extensibilidade e consistência conferidas pelas proteínas que formam a rede de glúten (após hidratação e trabalho mecânico). Em relação à força da farinha também se encontra dentro dos valores normais considerados para farinhas panificáveis, entre $160 < W < 220$, podendo atingir, em alguns casos, valores a rondar $W = 280/300$ (Cerealís, 2017).

Nos gráficos seguintes (Gráficos 5, 6, 7 e 8) é possível observar os teores médios de humidade relativa (%), o teor de cinzas (%) e o teor de matéria orgânica (%) do pão de forma de Mafra. Estes dados foram recolhidos a partir de 10 amostras do referido pão e foram seguidas as metodologias descritas na secção de Materiais e Métodos da presente dissertação. Para que se possam consultar os dados que estiveram na origem destes gráficos consultar, por favor, o **Anexo 4**.

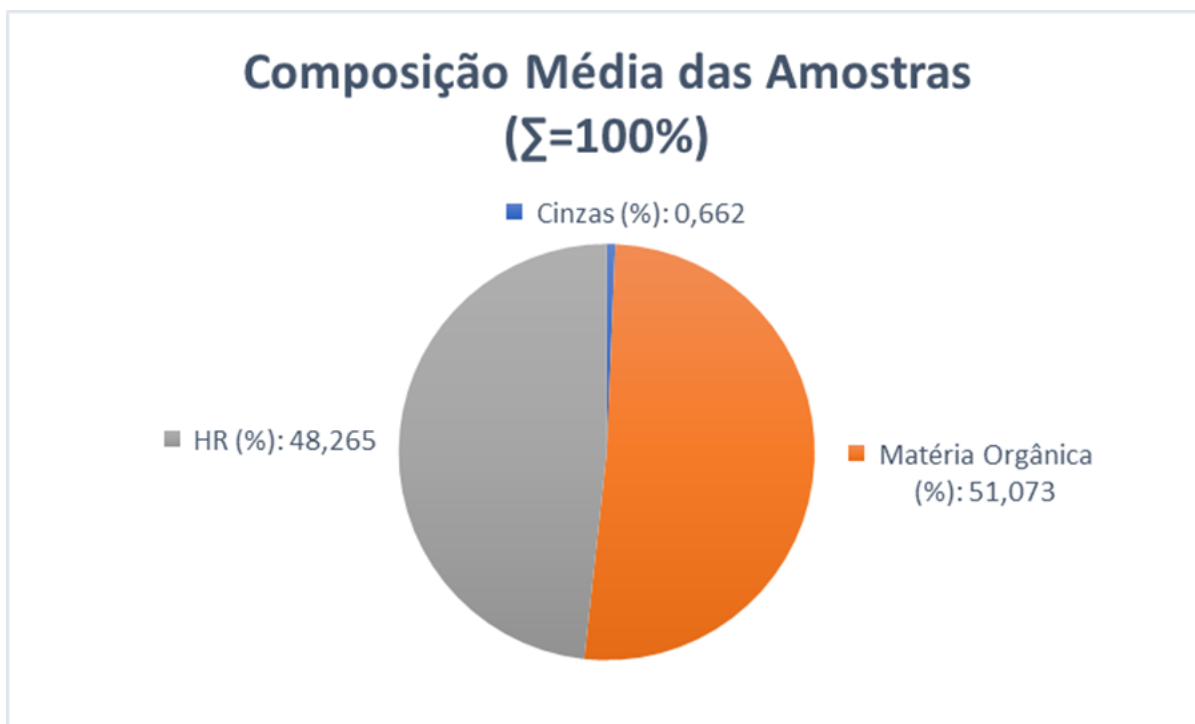


Gráfico 5 – Composição média das amostras de pão de forma de Mafra (autoria própria)

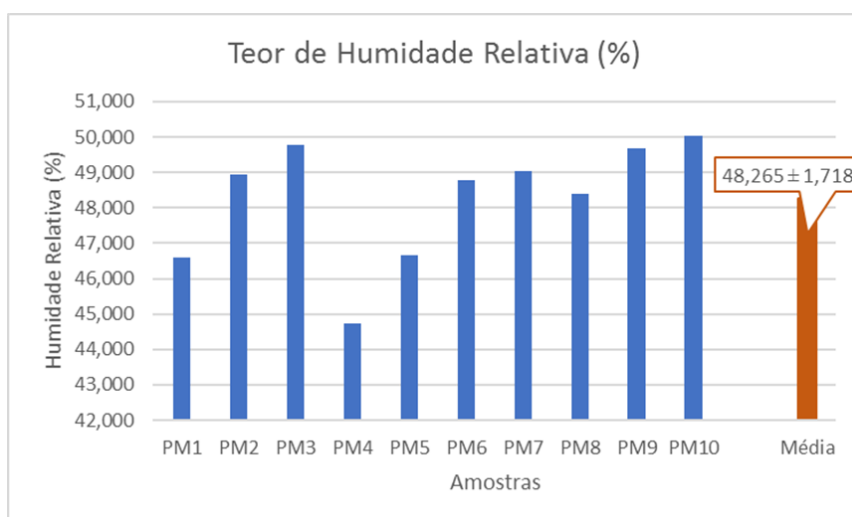


Gráfico 6 – Teor de humidade relativa (%) do pão de forma de Mafra (autoria própria)

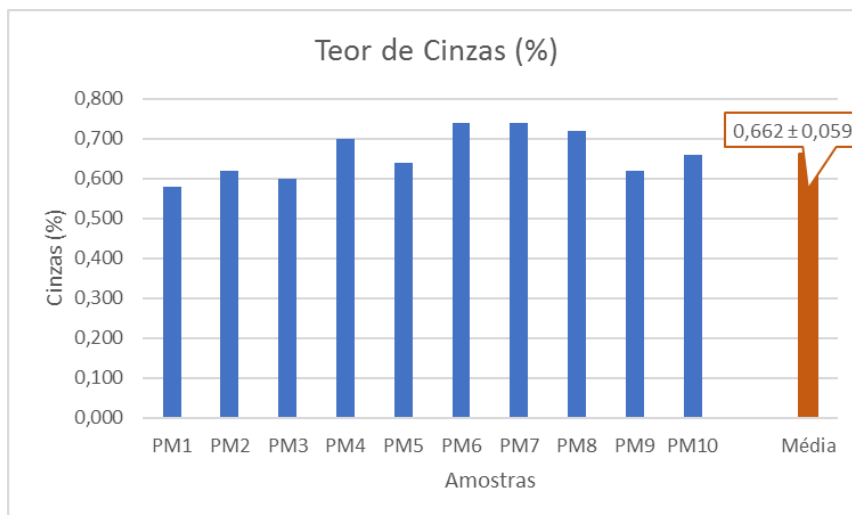


Gráfico 7 – Teor de cinzas (%) do pão de forma de Mafra (autoria própria)

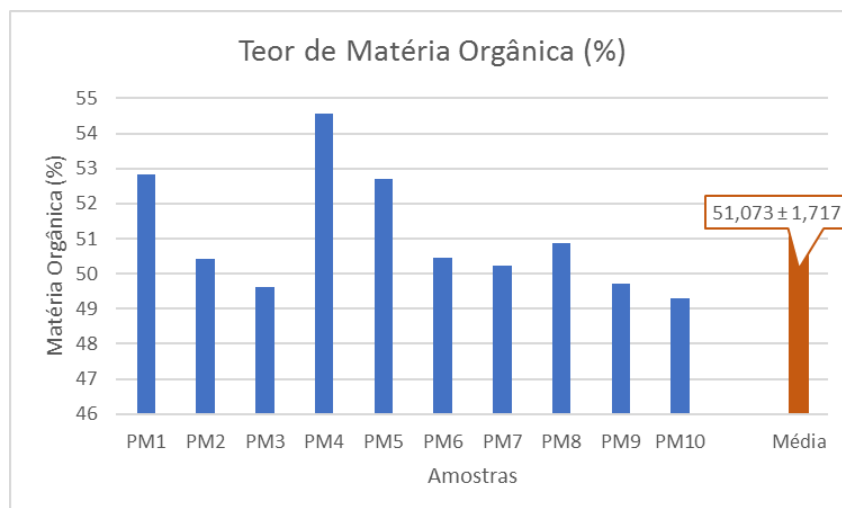


Gráfico 8 – Teor de matéria orgânica (%) do pão de forma de Mafra (autoria própria)

Em termos de água adicionada na receita do pão de forma de Mafra o valor ronda os 80 % sob o peso total das farinhas e a humidade relativa determinada laboratorialmente ronda os 48,265 %, o que implica uma perda total em água ao longo do processamento de cerca de 30 %. Esta perda será mais acentuada na etapa da cozedura devido às altas temperaturas do forno. Mesmo havendo esta evaporação e diminuição da água livre disponível, o A_w do produto ainda continua bastante elevado, o que continuará a favorecer o crescimento e desenvolvimento de flora contaminante, nomeadamente bolores.

Em relação ao teor de cinzas fica-se por 0,662 %, e corresponde à fração inorgânica, isto é, aos elementos minerais que se encontram na amostra. Quanto maior for esta percentagem

mais mineralizada será a amostra e vice-versa. Este valor apresentará uma correlação aproximada com os resultados obtidos no *XRF*, tendo sempre em consideração que este aparelho não regista o sódio das amostras e, no caso do pão, devido à adição de sal (cloreto de sódio) este parâmetro é importante. Contudo poderá inferir-se a quantidade de sódio a partir dos cloretos.

No que concerne ao teor de matéria orgânica obteve-se o valor de 51,073 % e corresponde a tudo o que não são sais minerais e água, abarcando proteínas, hidratos de carbono e lípidos. É um valor, como já foi referido anteriormente, calculado com base na humidade relativa e nas cinzas e, como tal, não é possível alocar que percentagem corresponde às proteínas, que percentagem corresponde aos hidratos de carbono e que percentagem cabe aos lípidos. Para que tal se verificasse teriam de se realizar outros testes mais dispendiosos e mais morosos, não sendo esse o propósito do trabalho experimental.

Também a matéria orgânica apresenta uma correlação aproximada com um valor lido pelo *XRF*, que é o valor do BAL. O BAL corresponde então a tudo aquilo que o aparelho não consegue ler e que é o sódio (ver parágrafos anteriores), a água e a matéria orgânica. Utilizando o valor da humidade relativa calculada para transpor de matéria seca para matéria húmida pode afirmar-se, como se prova no Quadro 14, que o BAL é aproximadamente igual ao teor de matéria orgânica, podendo ser tomado este valor como uma aproximação grosseira, mas rápida.

Quadro 14 – Valor do BAL do XRF e correlação com MO (autoria própria)

Classificação	Média (mg/Kg MS)	Média (mg/100 g MS)	Média (mg/100 g MH)	Lim Detecção (mg/Kg MS)
BAL	983707,627 ± 565,65	98370,76 ± 56,56	50892,11 ± 29,26	71,40 ± 6,72
			↓	
MS = Matéria Seca				
MH = Matéria Húmida			≈ 50,89% ≈ %MO	
Humidade = 48,265%				
Lim Detecção = Limite de Detecção				

Em relação à cor, medida com o colorímetro, os resultados obtidos foram os que se demonstram no Quadro 15 que a seguir se apresenta:

	Miolo	Côdea Topo	Côdea Base	Côdea Lateral	Global Côdeas
L*	61,69 ± 0,11	47,49 ± 0,65	70,10 ± 0,59	58,61 ± 0,36	58,74
a*	0,61 ± 0,03	6,29 ± 0,46	3,94 ± 0,02	11,70 ± 0,16	7,31
b*	12,75 ± 0,17	16,73 ± 0,43	12,79 ± 0,14	29,19 ± 0,20	19,57
C*	12,77 ± 0,17	17,87 ± 0,55	13,39 ± 0,14	31,45 ± 0,24	20,90
hº	87,26 ± 0,17	69,40 ± 1,00	72,90 ± 0,14	68,16 ± 0,15	70,15

Quadro 15 – Coordenadas de cor obtidas para o miolo e côdeas do pão de forma de Mafra (**autoria própria**)

No que respeita à cor do miolo, como seria de esperar, apresenta um valor de L* elevado (a tender para o branco), um valor de a* próximo de zero e um valor de b* positivo a tender para o amarelo ténue. Possui um valor de C* positivo não sendo, no entanto, uma cor muito intensa (quando comparada com os valores de C* das côdeas laterais e do topo). Em relação à tonalidade ou cor propriamente dita possui um valor de hº = 87,26, estando muito próximo da cor amarela (que possui hº = 90 º, como se verifica na Figura 16 da presente dissertação). No que respeita à análise de variância a um fator realizada para as medições de cor do miolo é corroborada a teoria da hipótese nula, isto é, as médias de todos os grupos são iguais com um valor de P = 0,999979984 e, assim sendo, podemos assumir os resultados das diferentes medições efetuadas como verdadeiros e generalizáveis. Para ver os resultados da ANOVA aplicados a estes e outros dados consultar, por favor, o **Anexo 5**.

Em relação à cor das côdeas pode agrupar-se as três côdeas analisadas numa só avaliação global, apresentando um valor de L* de 58,74, o qual se aproxima do L* do miolo sendo, no entanto, mais próximo da cor preta, um valor de a* positivo mas com pouca expressão, um valor de b* positivo e a tender para o amarelo (mais do que o miolo), um valor de C* duplicado face ao do miolo indicando uma maior intensidade de cor e um valor de hº = 70,15, ficando entre o vermelho e o amarelo, na zona dos laranjas/castanhos, devido à caramelização dos açúcares e às reações de *Maillard* durante a cozedura no forno. No que respeita à análise de variância a um fator realizada para as medições de cor das côdeas é corroborada a teoria da hipótese nula, isto é, as médias de todos os grupos são iguais com um valor de P = 0,999492305 e, assim sendo, podemos assumir os resultados das diferentes medições efetuadas como verdadeiros e generalizáveis. Aplicar uma análise de variância ao miolo e côdeas em conjunto não seria proveitoso, uma vez que o valor de P desceria abruptamente, não sendo possível retirar quaisquer conclusões a partir dessa análise.

A análise seguinte efetuada foi aos elementos minerais da amostra recorrendo ao *XRF* (excetua-se o sódio por deficiência de leitura do aparelho). Foram identificados e quantificados diversos macro e microelementos, bem como outros elementos não convencionais. Assim, foi possível obter o gráfico que a seguir se apresenta (Gráfico 9):

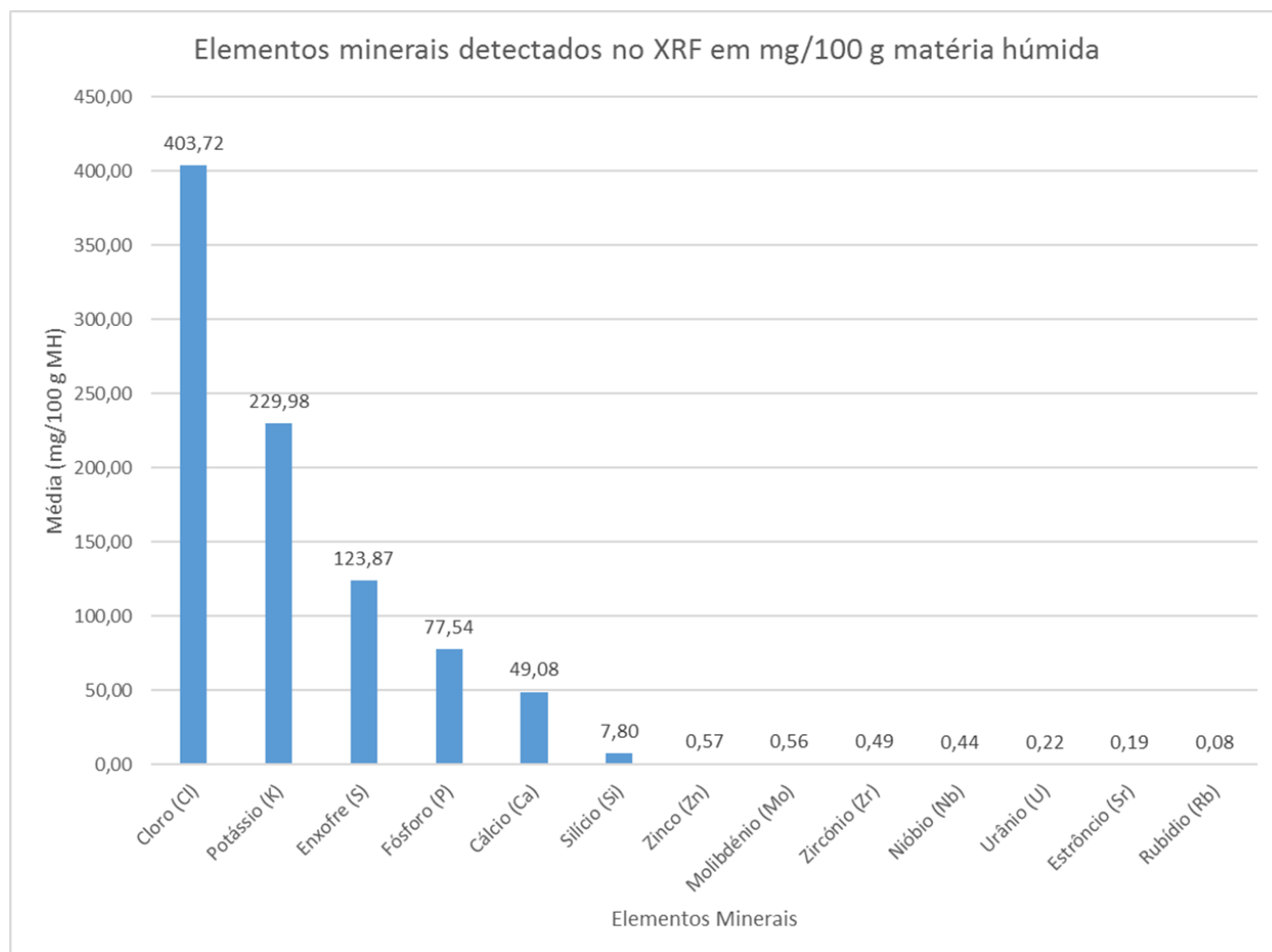


Gráfico 9 – Elementos minerais presentes no pão de forma de Mafra (**autoria própria**)

Os macroelementos são aqueles cujas necessidades diárias de ingestão são superiores a 100 mg/dia e os microelementos aqueles cujas necessidades diárias de ingestão são inferiores a esse valor. Ora, dos 6 macroelementos lidos pelo *XRF*, as amostras lidas possuem 5, correspondendo ao cloro, ao potássio, ao enxofre, ao fósforo e ao cálcio (as cinco primeiras barras do gráfico anterior) nas quantidades médias (em mg) descritas acima por 100 g de matéria húmida. O único macroelemento não detetado foi o magnésio. Para observar em detalhe os resultados obtidos, a conversão de matéria seca para matéria húmida e as doses diárias de referência consultar, por favor, o **Anexo 6**.

Em relação aos microelementos detetados nesta análise foram apenas 3 dos 8 possíveis, sendo detetados o silício, o zinco e o molibdénio. Não se detetaram o ferro, o manganês, o cobre, o selénio e o crómio. Uma particularidade interessante acerca do molibdénio (que poderá ser verificada no anexo 7 também) é que a sua dose diária de referência são apenas 45 µg/dia e, segundo a análise, no Pão de Forma de Mafra existem $0,56 \pm 0,02$ mg/100 g de matéria húmida, o que equivale a dizer que este valor representa aproximadamente 1250 % face à DDR conhecida. Contudo, segundo **Whitney e Rolfes (2011)**, o limite máximo de ingestão situa-se nos 2 mg/dia para um adulto, não sendo conhecidos casos de toxicidade em humanos. Já em animais, níveis excessivos de molibdénio provocam alterações ao nível renal e ao nível reprodutivo.

Outros elementos encontrados na análise foram o zircónio, o estrôncio, o urânio, o rubídio e o nióbio, não sendo significativos dados os valores residuais e, estou em crer que o facto de o aparelho encontrar estes elementos se prenderá com alguma falha ao nível das configurações ou da calibração do mesmo. Porque convenhamos que custa a crer que se encontrem metais pesados, como o urânio, no pão. Este ponto carece de uma investigação mais aprofundada.

No que respeita à análise de variância a um fator realizada para as medições do XRF é corroborada a teoria da hipótese nula, isto é, as médias de todos os grupos são iguais com um valor de $P = 1$ e, assim sendo, podemos assumir os resultados das diferentes medições efetuadas como verdadeiros e generalizáveis.

11.2. Parte 2 – Ensaios

Relativamente ao Ensaio 1 realizado no laboratório podemos afirmar que nem todos os aditivos aplicados tiveram o mesmo desempenho, o que permitiu efetuar uma triagem de quais os aditivos que efetivamente contribuíam para a extensão do *shelf-life* do produto e quais os que demonstravam eficácia reduzida. Desta feita foi possível eliminar uma série de aditivos, prosseguindo os testes apenas com os que cumpriam os critérios definidos, isto é, impediam o aparecimento de bolores no pão (principalmente na còdea e no miolo também) até um prazo de 5 dias a contar da aplicação (prazo imposto pela empresa). Contudo, este prazo foi alargado para 10 e 15 dias em laboratório por uma questão de margem de segurança (isto é, se o desempenho demonstrar eficácia para um prazo mais alargado, então também o demonstrará num prazo mais curto).

No gráfico 10 que a seguir se apresenta é possível observar o desempenho dos aditivos aplicados:

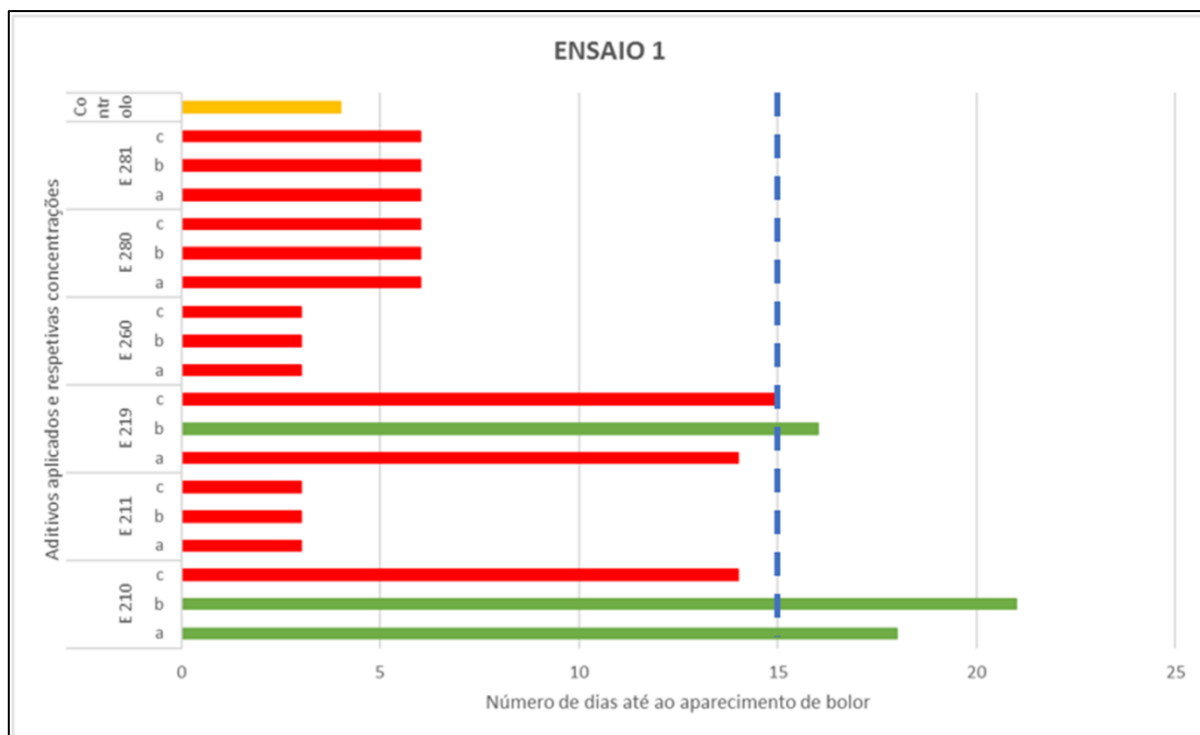


Gráfico 10 – Resultados do Ensaio 1 (autoria própria)

Ora pela observação direta do gráfico podemos concluir que as primeiras amostras a ganhar bolor, ao contrário do que seria expectável, foram as amostras tratadas com o E 211 e o E 260, falhando logo ao 3.º dia de tratamento. As razões pelas quais se sucedeu poderão ser várias, nomeadamente fraca ação conservante do aditivo, concentração da solução aplicada insuficiente ou desadequada ao produto a tratar ou pouca adesão do aditivo à superfície do produto após evaporação do solvente. A razão mais pertinente a apontar será a utilização de água destilada como solvente destas duas soluções e que, ao serem borrifadas sobre o produto, aumentaram o A_w do mesmo, o que fez com que houvesse maior quantidade de água disponível para o crescimento e proliferação dos bolores, acelerando as reações de deterioração. Os bolores apareceram na parte exposta do miolo, não havendo contaminação das côdeas nem da parte interna do miolo.

Em relação ao E 211 (benzoato de sódio) é apontado como conservante ideal para produtos lácteos como queijo, iogurtes e na maturação das massas, uma vez que é um metabolito produzido pelas bactérias ácido lácticas. Os seus valores de ação nos alimentos anteriormente mencionados, variam entre 11,9 e 288,5 mg / Kg, o que fica muito abaixo das concentrações utilizadas, mas segundo **Amirpour et al (2015)** serão suficientes para garantir a conservação dos produtos. Assim, para que este aditivo possa fazer efeito teria de ser

adicionado durante a amassadura juntamente com os restantes ingredientes, atuando na fase da maturação da massa.

Em relação ao E 260 (ácido acético) já era expectável que não funcionasse dado que já é utilizado como auxiliar tecnológico no processo de fabrico para diminuir o pH da massa e, mesmo sendo incorporado na massa sob a forma de vinagre, não contribui para a extensão do *shelf-life* do produto. Ao ser pulverizado sob o pão em concentrações baixas (para não conferir gosto acre ao pão) não demonstra qualquer efeito, antes pelo contrário, ao se misturar com água para pulverizar vai acelerar a contaminação das superfícies por aumento da água livre disponível.

A questão da utilização de água destilada como solvente prende-se com a solubilidade dos reagentes que, para os dois reagentes anteriores era maior para água destilada do que para o etanol (solvente orgânico), daí o seu uso. Estudos indicam que a adição de etanol a qualquer substrato diminui a quantidade de água livre disponível (baixa o valor de A_w do substrato), não sendo o etanol por si só, inibitório do crescimento de bolores. Contudo, com o controlo da temperatura e a adição de percentagens mínimas de etanol (entre 0,8 % e 1,6 %) consegue-se atrasar o aparecimento de bolores e outros microrganismos até 13 dias (**Berni e Scaramuzza, 2013**). Percentagens superiores a 2 % de etanol poderão conduzir a tempos de conservação de até 21 dias (**Idem, 2013**).

A amostra controlo, portanto não tratada, evidenciou contaminação no 4.º dia de tratamento, aparecendo bolor branco na parte exposta do miolo, permanecendo as côdeas e a parte interna do miolo intactas.

As amostras tratadas com os aditivos E 280 e E 281 foram as próximas a evidenciar contaminação, sucumbindo ao 6.º dia de tratamento. Neste caso particular, como falharam exatamente no mesmo dia, não se evidencia a diferença de solventes utilizados na preparação das soluções, uma vez que o E 280 estava dissolvido em etanol absoluto e o E 281 estava dissolvido em água destilada. O que se pode afirmar é que tanto o ácido propiónico como o propionato de sódio fazem depender a sua ação do A_w do produto e da concentração utilizada. Na sua concentração máxima de 0,3 % estes aditivos só demonstram alguma eficácia quando o A_w for igual ou inferior a 0,80 (**Guynot et al, 2005**).

Assim, deste primeiro ensaio laboratorial, foi possível excluir a utilização dos aditivos E 211, E 260, E 280 e E 281, bem como a exclusão da água destilada como solvente.

Os aditivos E 210 e E 219 demonstraram ser bastante eficazes, começando a falhar apenas ao 14.º dia de tratamento, havendo uma amostra que atingiu os 21 dias de conservação (amostra tratada com E 210, na concentração b). Os bolores que apareceram eram de coloração

branca e amarela e foram encontrados sempre na parte exposta do miolo, ficando as côdeas e a parte interna do miolo isentos de contaminação.

Por este motivo prosseguiram-se os ensaios com estes dois aditivos, agora não para fazer uma triagem dos mesmos, mas sim para aferir quais as concentrações mais adequadas, sem exceder os limites máximos impostos por lei.

Para observar fotos dos pães, neste e nos outros ensaios realizados, verificar, por favor, o

Anexo 7.

Em relação ao Ensaio 2 os resultados são evidenciados pelo gráfico seguinte (Gráfico 11):

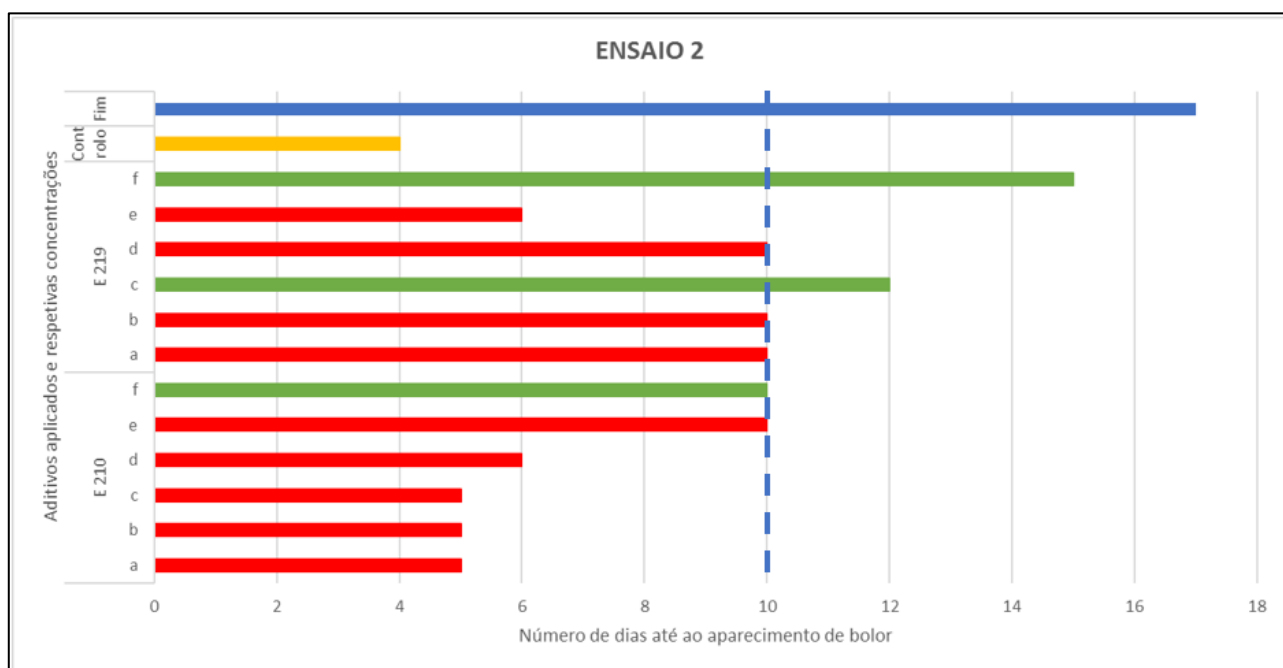


Gráfico 11 – Resultados do Ensaio 2 (autoria própria)

Neste segundo ensaio laboratorial todas as amostras chegaram ao 5.º dia de tratamento sem se verificar o aparecimento de bolores, excetuando a amostra controlo não tratada que adquiriu bolor branco na parte exposta do miolo (côdeas e miolo interno intactos) no 4.º dia do tratamento. Ao 5.º dia do tratamento as três concentrações mais baixas de ácido benzoico falharam com o aparecimento de bolores brancos, amarelos e verdes na parte exposta do miolo, deixando as côdeas e a parte interna do miolo intactas. No 6.º dia falhou mais uma concentração do ácido benzoico (concentração d) e começou a falhar uma concentração do hidroxibenzoato de metilo (concentração e) com o aparecimento de bolor verde na parte exposta do miolo. Este acontecimento realça o facto de que nem sempre concentrações mais elevadas da solução originam melhores resultados, estando aqui demonstrado o inverso (concentrações mais baixas demonstram maior tempo de conservação para este aditivo específico). Ao 10.º de tratamento o ácido benzoico deixa de fazer qualquer efeito. O aditivo que demonstra maior eficácia na

conservação, impedindo o aparecimento de bolores é o E 219, especialmente nas suas concentrações c e f, prolongando o *shelf-life* para 12 e 15 dias, respetivamente. Por este facto, estas duas concentrações passam para o ensaio seguinte (Ensaio 3) acompanhadas pela concentração f do ácido benzoico.

No terceiro e último ensaio laboratorial o objetivo foi aplicar as três concentrações que demonstraram melhor eficácia no ensaio dois (E 210 concentração f + E 219 concentrações c/f) a amostras maiores, isto é, em vez de serem três fatias de pão, eram nove fatias, ou seja, meio pão de forma de Mafra para que se verificasse a continuação dos resultados.

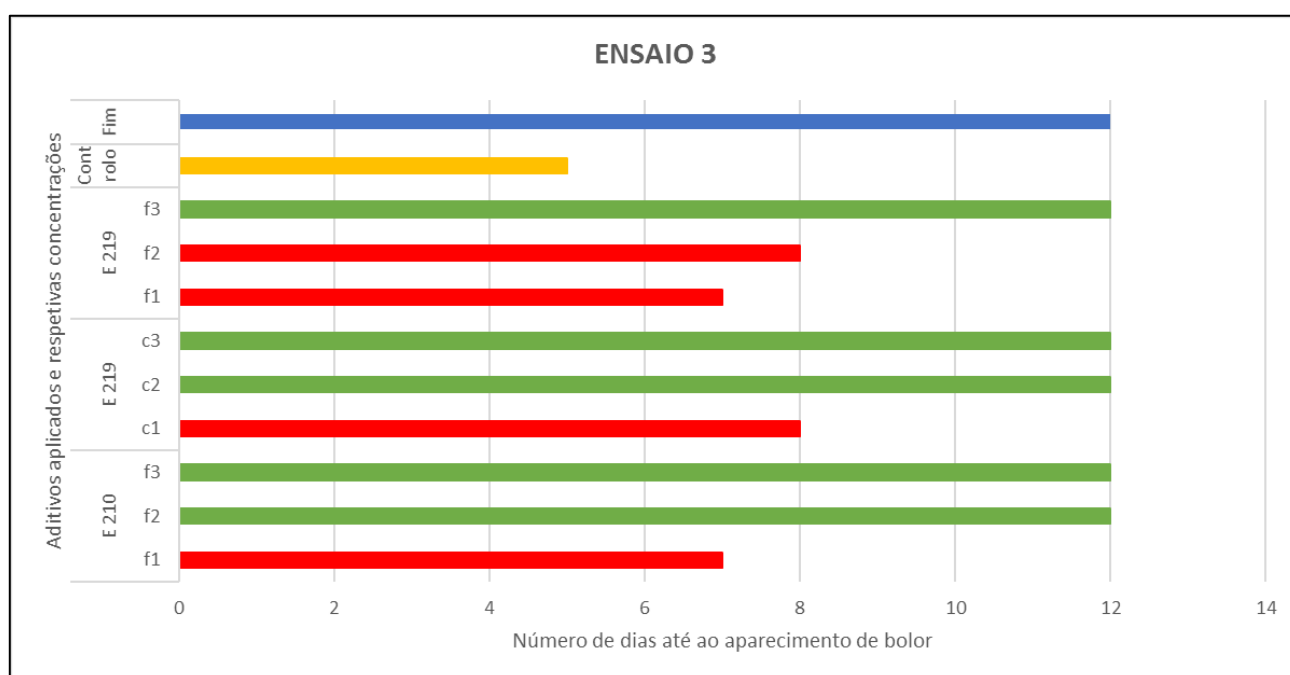


Gráfico 12 – Resultados do Ensaio 3 (autoria própria)

Pelo gráfico anterior (Gráfico 12) é possível perceber que todas as amostras satisfazem o critério dos 5 dias de conservação sem aparecimento de bolor começando as primeiras a falhar ao 7.º dia aparecendo bolor preto, branco e amarelo na parte interna do miolo e ao 8.º dia com o aparecimento de bolor verde na parte interna do miolo e bolor laranja nas côdeas.

Ora aqui residem as principais diferenças face aos ensaios anteriores. Enquanto nos ensaios anteriores demorava mais tempo a aparecer bolor nas côdeas e na parte interna do miolo, neste ensaio, como a amostra a tratar é maior e só os topos do pão são pulverizados (proibido pulverizar fatia a fatia), já era expectável que houvesse um maior desenvolvimento de bolores na zona que não tinha sido alvo de pulverização, que é a zona do miolo interno (entre as fatias). Em relação às côdeas, o bolor aparecia primeiramente na côdea da base e nas côdeas laterais e só por último aparecia na côdea do topo. A razão explicativa para este facto poderá

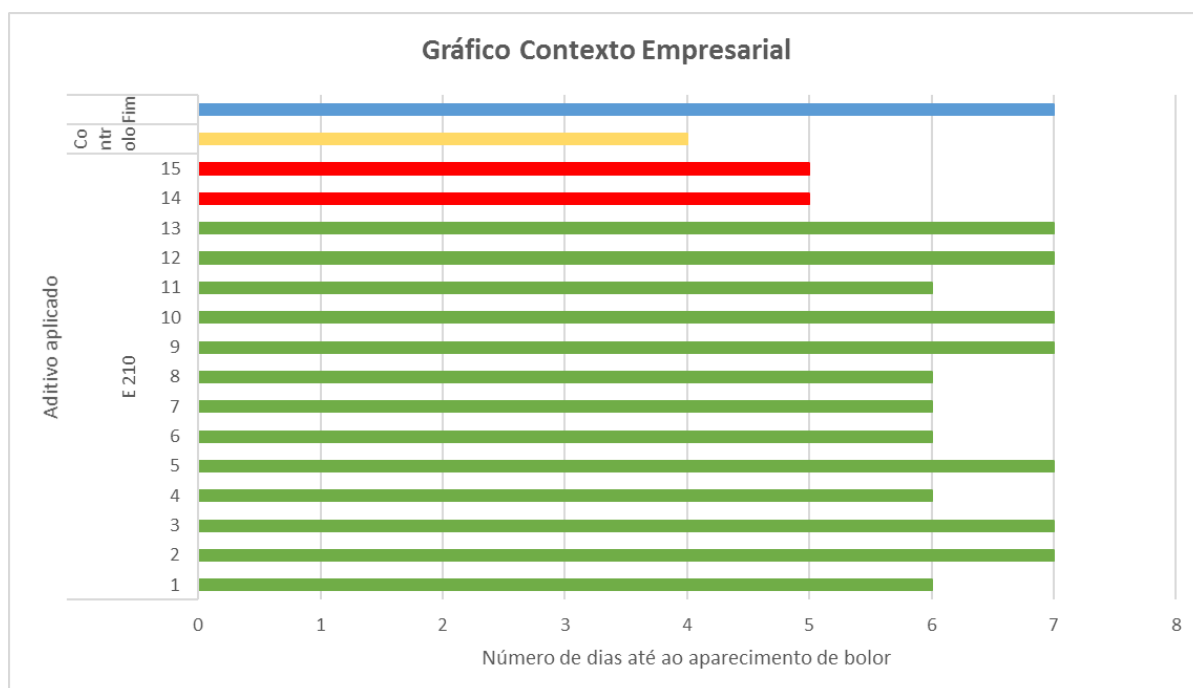
residir numa percentagem de A_w diferenciada entre as côdeas, uma vez que a côdea do topo devido à maior exposição ao calor do forno ficará mais desidratada que as restantes, logo formará uma superfície menos propícia ao desenvolvimento de flora contaminante. Assim, podemos afirmar que uma cozedura mais eficaz, pães com crosta mais dourada e estaladiça, serão mais resistentes à contaminação por bolores, tendo um *shelf-life* mais alargado em comparação com pães considerados “mal cozidos”. De referir também que as zonas de ligação da massa, onde se denotam alguns sulcos, são zonas mais frágeis no que concerne à contaminação, não formando uma côdea lisa e ininterrupta, permitindo a instalação de bolores.

Cinco amostras (num total de 9 amostras tratadas + 1 controlo) chegam aos 12 dias de conservação, data a partir da qual começam a desenvolver-se bolores verdes, brancos, pretos, amarelos e laranjas quer nas côdeas quer na parte interna do miolo. Este desenvolvimento é tão “agressivo” que passado pouco tempo é extremamente difícil despegar duas fatias consecutivas dado o crescimento das hifas dos bolores. As côdeas começam também a ficar húmidas devido à acumulação de água resultante da multiplicação dos bolores, sendo facilmente desfeitas ao toque.

Com este ensaio prova-se mais uma vez que concentrações mais baixas de aditivo apresentam melhores resultados na conservação do que concentrações superiores (para o E 219). Assim, à partida estariam aptos para a fase seguinte o E 210 f e o E 219 c, uma vez que os resultados foram semelhantes nesta fase. Contudo, decidiu-se levar apenas um para o ensaio em contexto empresarial, dado que o pulverizador da máquina era apenas um e não seria prático a limpeza do mesmo entre aplicações diferenciadas, correndo sempre o risco de haver misturas de soluções e enviesamento dos resultados. Por esta razão e pelo facto do teor máximo permitido por lei do aditivo E 219 ser consideravelmente inferior ao do E 210 (de 3000 mg / Kg do E 210 para 300 mg / Kg do E 219) e, como tal, no caso de serem precisos ajustes se se optasse pelo E 219 a margem de manobra seria bastante reduzida e a margem de erro poderia ser aumentada, optou-se por levar o E 210 a teste industrial.

Para o ensaio em contexto empresarial efetuaram-se pulverizações manuais da solução do aditivo. Efetuaram-se então as pulverizações manuais a pães de forma de Mafra inteiros, recorrendo a borrifadores. As únicas diferenças para os ensaios em laboratório, devido ao contratempo ocorrido, foram o tamanho da amostra (que então eram 18 fatias) e o ambiente de pulverização que foi na sala de embalagem da empresa. A partir deste teste final elaborou-se o gráfico 13 que a seguir se apresenta:

Gráfico 13 – Resultados do Teste a Nível Industrial (autoria própria)



Pela análise do gráfico é perceptível que os resultados de prolongamento do *shelf-life* outrora conseguidos em laboratório de 21 e 12 dias, foram drasticamente encurtados, atingindo no máximo e, apenas em algumas amostras, os 7 dias de conservação. A amostra controlo não tratada ao 4.º dia já evidenciava bolor branco, verde, preto e amarelo na cêdea, mas principalmente na parte interna do miolo. Ao 5.º dia já duas amostras sujeitas ao tratamento revelavam bolor preto na parte interna do miolo (localizado), estando, apesar de tudo, a cêdea intacta. Este bolor preto (as suas hifas) tinha proliferado no miolo de tal maneira que duas fatias consecutivas já dificilmente se despegavam uma da outra. Assim sendo, o prazo requerido pela empresa de 5 dias de conservação já tinha caído por terra. As outras amostras sucumbiram entre o 6.º e o 7.º dia após o tratamento evidenciando bolores verdes, brancos, amarelos e pretos na parte interna do miolo, permanecendo a cêdea intacta. Apenas numa amostra deste último lote foi registado o surgimento de bolores pretos e brancos na cêdea, sendo, no entanto, residuais.

Do teste, com as condições inerentes supramencionadas, é possível afirmar que a aplicação de aditivos por pulverização não é 100 % eficaz e não conduz a resultados homogêneos, repetíveis e confiáveis, não se atingindo, em alguns casos, os 5 dias de conservação almejados.

É possível afirmar também que à medida que se aumenta a dimensão do pão a tratar, diminui a ação do conservante, uma vez que a eficácia do conservante E 210, por exemplo, era ótima quando a amostra era constituída por 3 fatias de pão e foi diminuindo à medida que se

passaram para 9 e 18 fatias. Este facto pode ter a sua explicação baseada na área de pão pulverizada, a qual era menor quando se tratavam de apenas 3 fatias, havendo uma maior penetração da solução do aditivo na côrdea e até no miolo exposto, o que não acontece quando se trata de um pão inteiro que se apresenta revestido pela côrdea na sua totalidade, não conseguindo fazer chegar a solução do aditivo a qualquer parte do miolo. Este facto serve também de justificação para a manutenção das côrdeas limpas e isentas de bolores mesmo quando o miolo interno já se apresenta contaminado. Ou seja, como a pulverização se faz somente para a côrdea e a sua atmosfera envolvente, é perfeitamente plausível inferir que o aditivo se deposite à superfície do pão e exerça a sua ação somente nesta zona (o que ficou provado neste ensaio em contexto empresarial e pelos ensaios em laboratório – as côrdeas eram bastante resistentes à contaminação) e que o miolo interno, não recebendo qualquer tipo de tratamento, seja o local onde os bolores se começam a desenvolver e proliferar.

Outra hipótese levantada no início deste trabalho foi se a pulverização da côrdea criaria uma espécie de barreira que impedisse o avanço de bolores para o interior do pão. Ora, com a explicação impressa no parágrafo anterior, pode rejeitar-se esta hipótese e afirmar-se perentoriamente que o miolo interno não tratado é o local de proliferação de bolores por excelência, embora a côrdea esteja tratada e intacta. Este facto torna o processo de pulverização pouco eficaz para além do 5.^o dia e em condições favoráveis ao crescimento de flora contaminante (elevada humidade relativa da atmosfera envolvente e temperaturas na ordem dos 25 °C) mesmo o pão tratado não consegue chegar ao 5.^o dia completamente isento de bolores, contudo o seu crescimento é localizado e circunscrito.

Outro problema inerente à pulverização é que apenas é possível calcular a quantidade de aditivo que se encontra num determinado volume de solução (sabendo qual a concentração desejada), mas não é possível calcular a quantidade de aditivo que efetivamente fica à superfície do pão e que vai desenvolver a sua ação conservante. Isto acontece porque ao ser uma pulverização existem inúmeras perdas por dispersão no ar circundante.

Outro problema prende-se também com os aditivos escolhidos para pulverizar (nomeadamente o E 210, E 211 e E 219), uma vez que, apesar de se encontrarem incluídos nas listas comunitárias de aditivos autorizados, não estão contemplados na lista de aditivos que possam ser aplicados ao pão. Segundo o **Regulamento 1129/2011** apenas poderão ser aplicados ao pão o grupo do ácido sórbico e sorbatos (E 200-203), o grupo do ácido propiónico e propionatos (E 280-283) e o ácido acético (E 260). O que este regulamento não explicita claramente é que os valores estipulados são verdadeiros e os aditivos são eficazes se forem incorporados na massa durante o processamento, mas a sua ação no caso da pulverização não se verifica, levando à exclusão da sua utilização pela não eficácia demonstrada.

Concomitantemente foi-se mostrando que, embora não estando preconizados no regulamento supracitado para aplicação em pão, os aditivos E 210 e E 219 demonstraram maior eficácia que os restantes na pulverização, alcançando resultados de até 21 dias de conservação em laboratório. O seu uso está destinado e autorizado para frutas e hortícolas em vinagre, óleo e salmoura, preparações de frutas e hortícolas, doces e geleias extra, gomas de mascar e recheios. Assim sendo, a utilização destes aditivos passou a ter um fim puramente académico, dada a restrição legal existente, mas optou-se por continuar os trabalhos, principalmente porque existe muita informação sobre aditivos alimentares e a sua incorporação nas massas, mas pouca informação sobre a pulverização dos mesmos.

Assim, importa referir novamente que a pulverização foi uma exigência da empresa devido à máquina que supostamente iria ser utilizada e, como tal, todo este trabalho foi desenvolvido nesse sentido e para dar resposta a essa necessidade específica, daí estes resultados e este discurso aparentemente contraditório e inconclusivo. De referir também que deverão ser conduzidos mais trabalhos sobre esta temática, otimizando as condições de testagem.

11.3. Parte 3 – Análise Sensorial

No âmbito da análise sensorial hedónica (preferências) foram avaliados os atributos aspeto, cor, cheiro a pão de Mafra, sabor, textura e humidade, e, no fim, fez-se uma apreciação global das duas amostras em prova. No **Anexo 8** poderá consultar-se a tabela geral das pontuações obtidas na prova.

Os atributos que obtiveram pontuações mais semelhantes entre o pão sem aditivos e o pão tratado foram o aspeto e a cor, sendo que na cor ambas as amostras obtiveram a mesma pontuação de 9. Assim, pode afirmar-se que o tratamento por pulverização não influenciou as características visuais do produto. O sabor também não foi muito afetado pelo tratamento dada a proximidade das pontuações obtidas, contudo o sabor do pão tratado foi ligeiramente preterido quando comparado ao sabor do pão sem tratamento.

Os restantes atributos já obtiveram pontuações mais díspares quando comparados com os atributos acima mencionados, no entanto, pontuações acima de 6. Em relação ao cheiro a pão de Mafra o preferido pelos provadores foi o pão sem aditivos (8,94) face aos 7,25 obtidos pelo pão aditivado. Uma razão possível para a explicação desta discrepância será o cheiro muito residual a etanol que se sente ao cheirar as amostras e daí ser motivo para preterir a amostra tratada. No entanto este cheiro é, como disse anteriormente, residual e aparece apenas em

algumas amostras dado que houve provadores que atribuíram pontuação máxima (= 9) ao cheiro a pão de Mafra na amostra tratada. Em termos de textura, o pão não tratado foi preferido face ao pão tratado com a diferença aproximada de um valor. A maior diferença entre as preferências está no atributo humidade que, como seria mais do que expectável, favorece largamente o pão sem aditivos (8,63), deixando o pão tratado com apenas 6,44. Esta diferença é devida à perda de água ocorrida durante os 5 dias de armazenamento, deixando o pão tratado mais seco e quebradiço, dado que apenas possui um agente conservante com ação antifúngica e não possui qualquer componente que lhe confira frescura no armazenamento. Daí que o pão não tratado, como é fresco, leve a preferência por uma diferença superior a dois valores.

Em termos de apreciação global dos dois pães, o pão não tratado é o preferido dos provadores e, como tal, terão de se fazer ajustes no pão tratado ao nível da frescura (nomeadamente na humidade e, conseqüentemente, na textura) e ao nível do cheiro para que se possam subir os índices de aprovação deste pão.

De referir que, mais do que um bom produto com boas características organoléticas, as preferências do consumidor deverão ser tomadas em linha de conta quando se coloca um produto no mercado, porque se estas preferências forem satisfeitas, o produto é aceite e consegue vender; caso isto não se verifique, se as preferências dos consumidores não forem respeitadas, não irão adquirir o produto e a empresa que o fabricou terá, de certeza, largos prejuízos. Por isso esta análise hedónica que aqui se fez de forma simplificada, deverá existir sempre que se formule um novo produto.

11.4. Parte 4 – Identificação de Bolores

Relativamente aos bolores apresentados foram extraídos de amostras de pão de forma de Mafra sujeitas à aplicação de diversos aditivos alimentares com ação conservante (ação fungicida). O primeiro conjunto de fotografias foi obtido com recurso à lupa binocular, evidenciando 6 bolores diferentes, uma vez que apresentavam colorações distintas. O segundo conjunto de fotografias foi obtido com recurso ao microscópio ótico composto e aqui só foi possível analisar bolores de 4 cores (preto, verde, laranja e branco) (Ver **Anexo 9**). O objetivo de ambos os conjuntos fotográficos seria a captura de estruturas específicas, nomeadamente as estruturas reprodutoras, para que se pudesse fazer uma identificação clara do género e, se possível, da espécie de bolor contaminante presente.

Todavia, é extremamente difícil identificar as espécies de bolores observadas a olho nú e as ampliações que foram efetuadas (tanto da lupa binocular como do MOC) não conseguiram capturar estruturas distintivas que permitissem uma identificação. O critério da cor poderia

ajudar na identificação, contudo tal não foi possível, uma vez que os bolores vão alterando a cor consoante o seu estágio desenvolvimento.

Assim sendo, apenas se pode especular quais os bolores que efetivamente contaminaram o Pão de Forma de Mafra em tratamento, sendo que os mais comuns pertencem aos géneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* (estando as três estruturas típicas destes três géneros evidenciadas na figura 15 que se segue), *Mucor* e *Neurospora* (bolor laranja).

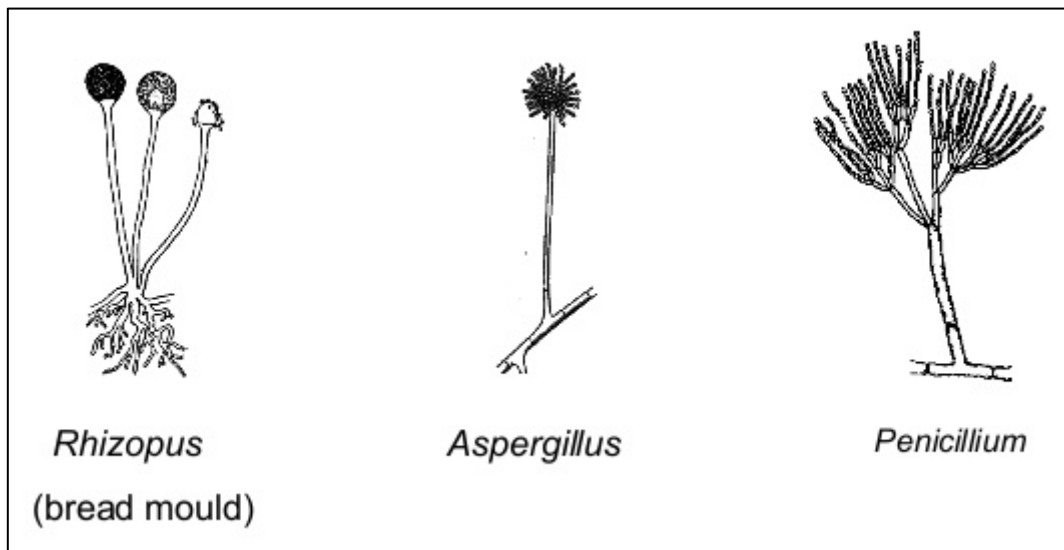


Figura 15 – Estruturas a Observar ao Microscópio Características dos Géneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* (<http://slideshare.net>)

11.5. Parte 5 – Soluções Propostas

Nesta parte, que pretende ser breve, irão apresentar-se algumas soluções que resolvem quase no imediato e sem infringir nenhuma legislação o problema da extensão do *shelf-life* do pão de forma de Mafra, dada a impossibilidade de utilização dos aditivos testados e do método utilizado.

A primeira solução, que é a mais óbvia de todas, refere-se à incorporação dos aditivos autorizados nas massas durante o processamento juntamente com os outros ingredientes. Os aditivos a incorporar seriam os do grupo do ácido sórbico e sorbatos (E 200-203) e do grupo do ácido propiónico e propionatos (E 280-283). Estes aditivos poderiam ser adicionados estremos ou em combinação, não podendo a combinação de ambos exceder os teores máximos permitidos. O ácido propiónico e os seus sais podem estar presentes em determinados produtos fermentados como resultado dos processos de fermentação em condições de boas práticas de fabrico (**Regulamento 1129/2011**), o que ao adicionar-se o aditivo estreme iria reforçar esta ação conservante já naturalmente presente. Esta opção iria obrigar a uma mudança no plano de HACCP instaurado, dado que se teria de criar um novo PCC e associar registos ao mesmo, para que houvesse um controlo efetivo da utilização dos aditivos e se conseguisse monitorizar os mesmos, agindo em conformidade caso fosse necessário. A criação deste PCC deve-se ao facto de os aditivos estarem legislados e terem teores máximos aplicáveis estabelecidos, não devendo ultrapassar esses mesmos limites por implicações decorrentes ao nível da saúde humana.

A segunda solução passa pela incorporação, na massa do dia que originará o pão de forma de Mafra, de uma “Massa *Madres*” (massa velha ou isco, à semelhança do que acontece com o Pão Alentejano) produzida artesanalmente sob condições controladas ou adquirida comercialmente sob a forma de um líquido estabilizado, que ao ser adicionada numa determinada percentagem (variável de acordo com o grau de acidez que se deseja conferir à massa) permite estender o *shelf-life* do pão. As características organoléticas não serão alteradas se a percentagem de aplicação for baixa, no caso de ser elevada irão surgir alterações ao nível do sabor (ligeiramente mais acre) e ao nível do cheiro. Facto é que ao nível da conservação, os objetivos são alcançados (**Gandra et al, 2008; Ryan et al, 2008; Belz et al, 2012; Axel et al, 2015; Jonkuvienė et al, 2016 e Stanojevi-Nikoli et al, 2016**).

Esta “Massa *Madres*” poderá ser aplicada *per se*, ou então poderão ser adicionadas enzimas ou combinar a sua ação com os aditivos mencionados na primeira solução, especialmente com o propionato de cálcio (**Belz et al, 2012**). Se se pretender fazer a produção

artesanal da “Massa *Madres*” deverão ser adquiridos os tanques/cubas de fermentação e os *starters*, que neste caso serão bactérias ácido lácticas (**Ryan et al, 2008**) e (**Stanojevi-Nikoli et al, 2016**).

A terceira e última solução proposta refere-se a dois produtos específicos que deverão ser utilizados em conjunto para maximizar resultados, fornecidos pela empresa **AB Mauri** (empresa do ramo da Panificação), a qual disponibiliza estas opções integradas na linha *Clean Label*, por terem ação conservante e não recorrerem a qualquer tipo de aditivos alimentares.

Correspondem muito genérica e sinteticamente a duas “Massas *Madres*” desidratadas em que uma garante a frescura do produto e a outra garante as propriedades antifúngicas. A primeira toma a designação comercial de Vivo IL Lievito Naturale e deverá ser aplicada numa percentagem entre 5 a 10 % sob o peso total da farinha, sendo responsável pela manutenção das características organoléticas do pão; a segunda que possui ação conservante designa-se comercialmente por Masa Madre NC, possui enzimas na sua constituição, garante 10 a 12 dias de validade e deverá ser aplicada numa percentagem de 3 a 4 % sob o peso total da farinha. Em aplicação conjunta deverá utilizar-se 5 % de *Vivo IL Lievito Naturale* + 3 % de *Masa Madre NC*.

12. Conclusão

Neste estudo foi possível testar a aplicação de diversos aditivos alimentares com ação conservante (nomeadamente ação antifúngica) para a extensão do *shelf-life* do pão de forma de Mafra produzido, embalado e distribuído pela empresa PaniMafra. Esta necessidade de extensão do tempo de vida útil do produto surgiu da necessidade imposta por um cliente da empresa, o qual pedia a centralização do Pão de Forma de Mafra, tendo de se garantir um prazo de 5 dias de conservação.

Assim, o método escolhido para a aplicação dos aditivos alimentares foi a pulverização, uma vez que este foi um requisito da empresa, dado que possuíam um aparelho específico para o efeito incorporado na sua máquina de fatiagem e embalamento e que, à data, não estava a ser utilizado.

Começou-se por seleccionar os aditivos alimentares a testar, bem como os solventes mais indicados para a preparação das soluções. Assim optou-se por utilizar o E 210, o E 211, o E 219, o E 260, o E 280 e o E 281 e a água destilada e o etanol absoluto como solventes. Os primeiros aditivos a serem excluídos foram o E 211, o E 260 e o E 281, uma vez que demonstraram eficácia reduzida na conservação, permitindo o aparecimento de bolores na parte exposta do miolo ao fim de 3 dias de tratamento (para os dois primeiros), o que ficava aquém do prazo requerido e ao fim de 6 dias para o último. A principal razão apontada para esta falha será a utilização de água destilada como solvente, o que provocou um aumento do A_w do pão de forma de Mafra, contribuindo para a existência de mais água livre, o que propiciou o desenvolvimento de bolores mais rapidamente. O E 280 também falhou ao 6.º dia de tratamento mesmo sendo uma solução preparada com etanol, daí ser motivo também para exclusão de uso. O E 210 e o E 219 foram os aditivos com melhor desempenho, conseguindo períodos de conservação de 14 dias, havendo amostras a alcançar os 21 dias.

Os ensaios seguintes permitiram apurar as concentrações mais indicadas para garantir a conservação do pão de forma de Mafra relativamente aos dois aditivos escolhidos, no entanto, também mostraram que ao se aumentar o tamanho da amostra tratada a ação do conservante diminui, levando ao aparecimento de bolores na parte interna do miolo mais cedo do que o previsto. Ou seja, embora a còdea se mantivesse intacta devido à ação do conservante, o miolo interno que não tinha sido tratado dava sinais de contaminação. Ora este é um dos grandes problemas desta técnica de pulverização pois apenas permite o tratamento da parte externa do produto, ficando o interior por tratar, sendo o local preferido para a instalação de bolores, não servindo este tratamento externo, como barreira para impedir a instalação de flora

contaminante. Mesmo assim decidiu-se prosseguir para a fase seguinte (teste a nível industrial), levando o aditivo E 210.

O ensaio em contexto empresarial teve diversos problemas, como já foi referido anteriormente, não sendo possível obter resultados que fossem homogêneos, repetíveis e confiáveis, não se atingindo, em alguns casos, os 5 dias de conservação almejados. Este teste veio provar, mais uma vez, que a ação do aditivo diminui com o aumento da dimensão da amostra (que agora era de um pão de forma de Mafra inteiro) e que apenas atua na parte externa, deixando o miolo interno sem tratamento e à mercê da contaminação. Neste ensaio industrial as amostras mais duradouras atingiram os 7 dias de conservação, sendo que a maioria falhou ao 5.^o dia de tratamento e houve até amostras que falharam antes desse prazo. Assim sendo, esta solução não satisfaz a 100 % a necessidade de prolongamento do *shelf-life* requerida.

Um dos problemas encontrados prende-se com a impossibilidade de calcular a quantidade de aditivo que efetivamente fica à superfície do pão e que vai desenvolver a sua ação conservante, o que acontece porque ao ser uma pulverização existem inúmeras perdas por dispersão no ar circundante.

Outro problema prende-se também com os aditivos escolhidos para pulverizar (nomeadamente o E 210 e o E 219), uma vez que, apesar de se encontrarem incluídos nas listas comunitárias de aditivos autorizados, não estão contemplados na lista de aditivos que possam ser aplicados ao pão, contudo foram os que apresentaram melhores desempenhos, face aos aditivos autorizados, daí se terem prosseguido os testes, agora com fins mais académicos dada a restrição legal imposta.

Algumas soluções alternativas propostas passam pela incorporação de aditivos na massa, pelo recurso a “Massas *Madres*” ou pela utilização da *Clean Label* da *AB Mauri* referida. Outras “pseudo soluções” poderiam passar pela redução do tamanho do pão de forma de Mafra para metade (consumo mais rápido) ou pelo seu fatiamento apenas nos pontos de venda e não na origem, garantindo a integridade do produto durante mais tempo.

13. Bibliografia

ACISM, 2012. *Associação do Comércio, Indústria e Serviços do Concelho de Mafra – Pão de Mafra – Secção de Panificação*. [online] Disponível em: < <http://www.acism.pt> > [Consultado em 15 de Julho de 2017].

Aleixo, C., 1996. *Fatores condicionantes da atividade microbiana*, Documento não publicado, Produção Industrial, Inova, Açores.

Almeida, D., 2004. *Fisiologia das alterações de cor – Percepção e medição da cor*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Não publicado.

Amirpour, M., Arman, A., Yolmeh, A., Azam, M., e Moradi-Khatoonabadi, Z., 2015. *Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran*. Food Additives & Contaminants: Part B, Vol. 8, No. 2, pp. 142–148.

APN – Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2014. *Alimentação na Doença Celíaca*. [pdf] Lisboa: Associação Portuguesa dos Nutricionistas e Associação Portuguesa de Celíacos. Disponível em: <http://www.apn.org.pt/>. [Consultado a 5/7/2017].

Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Peyer, L., Furey, A., Coffey, A. e Arendt, E., 2015. *Antifungal activities of three different Lactobacillus species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough*. Applied Microbiology Biotechnology, No. 100, pp. 1701–1711.

Bagulho, A., 2016. *Caraterização de diferentes tipos de farinha em termos qualitativos*. INIAV – Pólo de Elvas. Não publicado.

Baptista, L., 1999. *Território e Cultura Saloia: A Construção de (Uma) Identidade Local?* Observatório das Atividades Culturais, OBS nº 6, pp. 11-16.

Battochio, J., Cardoso, J., Kikuchi, M., Macchione, M., Modolo, J., Paixão, A., Pinchelli, A., Silva, A., Sousa, V., Wada, J., Wada, J.K. e Bolini, H., 2006. *Perfil Sensorial de Pão de Forma Integral*. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Vol. 26 (2), pp. 428-433. Campinas, São Paulo.

Belz, M., Mairinger, R., Zannini, E., Ryan, L., Cashman, K. e Arendt, E., 2012. *The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread*. Applied Microbiology Biotechnology, No. 96, pp. 493-501.

Berni, E. e Scaramuzza, N., 2013. *Effect of ethanol on growth of Chrysosporium sitophilum ('the red bread mould') and Hyphopichia burtonii ('the chalky mould') in sliced bread*. The Society for Applied Microbiology: Letters in Applied Microbiology, No. 57, pp. 344-349.

Bloksma, A.H., Bushuk, W., 1988. *Rheology and Chemistry of dough*. In: Pomeranz, Y. (ed.) *Wheat – Chemistry and Technology*. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, St.Paul, Vol.2.

Brandão, C., 2013. *Apontamentos da cadeira de MA II, Microbiologia Alimentar II*. ESHTe, Não publicado.

Brandão, S. e Lira, H., 2011. *Tecnologia de Panificação e Confeitaria*. Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil – e-Tec-Brasil.

Breyd, R.A.O., 2014. *Avaliação da contaminação e estratégia de controlo do contaminante sazonal Neurospora crassa em produtos de panificação*. Mestrado em Segurança Alimentar e Saúde Pública. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Cauvain, S. P., Ed., 2003. *Bread making: improving quality*. Cambridge. Woodhead publishing.

Cerealis, 2017. *Controlo em Panificação – Falling Number*. [online] Disponível em: <<http://cerealis.pt/moagens/laboratorio.html>> [Consultado em 15 de Junho de 2017].

CMM, 2015. *Câmara Municipal de Mafra – Pão de Mafra*. [online] Disponível em: <<http://www.cm-mafra.pt/pt/turismo/pao-de-mafra-0>> [Consultado em 15 de Julho de 2017].

Cornell, H. J., Hovelings, A. W., 1998. *Wheat - Chemistry and Utilization*. Lancaster, Technomic Publishing Co. Inc.

Dantigny, P., Guilmar, A. e Bensoussan, M., 2005. *Basis of predictive mycology*. International Journal of Food Microbiology, nº 100, pp. 187-196.

Decreto-Lei Nº 121/1998 de 8 de maio que estabelece os princípios orientadores da utilização dos aditivos alimentares, remetendo para posterior regulamentação, entre outras matérias, a fixação das condições de utilização nos vários géneros alimentícios. Diário da República – I Série – A, nº 106, pp. 2142 – 2153.

Decreto-Lei Nº 33/2005 de 15 de fevereiro que transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva nº 2003/114/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de dezembro, que altera a Diretiva nº 95/2/CE, relativa aos aditivos alimentares, com exceção dos corantes e dos edulcorantes. Diário da República – I Série – A, nº 32, pp. 1104 – 1109.

Dias, A., 2008. Análise estrutural de farinhas e alguns dos seus componentes. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Química e Qualidade dos Alimentos. Universidade de Aveiro. Aveiro.

Dias, J., 2006. A importância da atividade da água nos alimentos. [online] Disponível em: http://www.hipersuper.pt/2006/12/08/A_importancia_da_actividade_da_/ [Consultado em 9 de Abril de 2017].

Dziki, D.; Rozylo, R.; Gawlik-Dziki, U.; Swieca, M., 2014. Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. Trends in Food Science and Technology, 40, 48-61.

Emerton, V. e Choi, E. (Ed.), 2008. Essential Guide to Food Additives. 3ª Edição. Reino Unido: Leatherhead Publishing.

Escouto, L., 2004. Elaboração e avaliação sensorial de pré-mistura de massa para pão sem glúten a partir de derivados energéticos de mandioca. Dissertação para obtenção de grau de doutor em Agronomia – Área de Concentração em Energia na Agricultura. Faculdade de Ciências Agronómicas da UNESP – Campus de Botucatu.

Ferreira, F.A.G., 1994. Nutrição Humana. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

Filtenborg, O., Frisvad, J. e Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. International Journal of Food Microbiology, nº 33, pp. 85-102.

Flandrin, Jean-Louis e Montanari, Massimo (dir.)^a, 1998. História da Alimentação 1. Dos Primórdios à Idade Média. Lisboa: Terramar.

Flandrin, Jean-Louis e Montanari, Massimo (dir.)^b, 1998. História da Alimentação 2. Da Idade Média aos tempos actuais. Lisboa: Terramar.

Food Ingredients Brasil, 2009. Panificação – os ingredientes enriquecedores. Volume nº 10, pp.22-27.

Gandra, K., Bianchi, M., Godoy, V., Queiroz, F. e Steel, C., 2008. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. Ciências e Tecnologias dos Alimentos, Campinas, No. 28(1), pp. 182-192.

Guynot, M., Ramos, A., Sanchis, V. e Marín, S., 2005. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). International Journal of Food Microbiology, No. 101, pp. 161– 168.

ISO 21527-1: 2008, Microbiology of food and animal feedings stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.

João, A.L., 2013. Apontamentos da cadeira de MA II, Microbiologia Alimentar II. ESHTe, Não publicado.

*Jonkuvienė, D., Vaičiulytė-Funk, L., Šalomskienė, J., Alenčikienė, G. e Miežlienė, A., 2016. Potential of *Lactobacillus reuteri* from Spontaneous Sourdough as a Starter Additive for Improving Quality Parameters of Bread. Food Technology Biotechnology, No.54 (3), pp. 342– 350.*

Lawrence, A., 1998. Understanding Food Additives. University of York: Chemical Industry Education Centre.

Lei Nº 75/2009 de 12 de agosto que estabelece normas com vista à redução do teor de sal no pão bem como informação na rotulagem de alimentos embalados destinados ao consumo humano. Diário da República – I Série, nº 155, pp. 5225 – 5226.

Léon, A.E.; Rosell, C.M., 2007. De tales harinas, tales panes. Baéz ediciones. Argentina.

Lidon, F. e Silvestre, M. M., 2007. Indústrias Alimentares: Aditivos e Tecnologias. Lisboa: Escolar Editora.

Lidon, F. e Silvestre, M. M., 2010. Princípios de Alimentação e Nutrição Humana. Lisboa: Escolar Editora.

Lidon, F., 2016. Apontamentos da cadeira de AA I, 11750 Aditivos Alimentares I. Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologias, Não publicado.

Liu, C.; Liu, L.; Li, L.; Hao, C.; Zheng, X.; Bian, K.; Zhang, J.; Wnag, X., 2015. Effects of different milling processes on whole wheat flour quality and performance in steamed bread making. LWT - Food Science and Technology, 62, 310-318.

Mantilla, S.P.S., Mano, S.B., Vital, H.C. e Franco, R.M., 2010. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. Revista Académica: Ciências Agrárias e Ambientais. Volume 8, Número 4, pp. 437-448. Curitiba.

Marques ^a, A., 2012. Tecnologia de Panificação – A Levedura na Panificação. ESHTe, Não publicado.

Marques ^b, A., 2012. Tecnologia de Panificação – Outros Ingredientes e Processo de Fabrico. ESHTe, Não publicado.

Matsuda, L., 2007. Concentração de Amido Resistente em Pão Francês Pré-Assado Congelado: Aspectos Tecnológicos. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Engenharia Química. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil.

McMeekin, T., e Ross, T., 1996. Shelf life prediction: status and future possibilities. International Journal of Food Microbiology, nº 33, pp. 65-83.

Nobre, M., 2013. *Produção de Pão a partir de Farinhas Extremes de Aveia*. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Engenharia Alimentar – Processamento dos Alimentos. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Lisboa.

Norma Portuguesa 516/2000 – Determinação do teor de água para cereais e derivados.

Norma Portuguesa 519/1993 – Determinação do teor de cinza a 900 °C para cereais e derivados.

Pandey, R. M. e Upadhyay, S. K., 2012. *Food Additive*. Prof. Yehia El-Samragy (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6, InTech, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/food-additive/food-additive>> [Consultado em 7 de Abril de 2017].

Pão Real ^a, 2015. *Pão Real – Padaria Artesanal – A Nossa Padaria*. [online] Disponível em: <<http://www.paoreal.pt/>> [Consultado em 3 de Abril de 2017].

Pão Real ^b, 2015. *Pão Real – Padaria Artesanal – A Nossa História*. [online] Disponível em: <<http://www.paoreal.pt/a-nossa-historia/>> [Consultado em 3 de Abril de 2017].

Pão Real ^c, 2015. *Pão Real – Padaria Artesanal – Produtos*. [online] Disponível em: <<http://www.paoreal.pt/produtos/>> [Consultado em 3 de Abril de 2017].

Pawlak, C., 2015. *Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Sensorial do Pão Transmontano com azeitonas verdes descaroçadas do tipo “alcaparras”*. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança.

Pessoa, F., 2016. *Apontamentos da cadeira de MPA, 11370 Matérias-Primas Alimentares*. Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologias, Não publicado.

Pessoa ^b, F., 2016. *COR – Algumas noções básicas e sua aplicação para avaliação da Qualidade em Alimentos*. Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologias, Não publicado.

Pité, M., 2007. Validação de um método alternativo de análise de glúten em géneros alimentícios, o ELISA-R5: comparação com o atual método oficial de análise. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Lisboa.

Portaria Nº 52/2015 de 26 de fevereiro dos Ministérios da Economia, da Agricultura e do Mar e da Saúde, que revoga a Portaria Nº 425/98 de 25 de julho, atualizando as regras relativas às características do pão e dos outros produtos similares e afins ou à sua comercialização. Diário da República – I Série, nº 40, pp. 1202 – 1204.

Portaria Nº 254/2003 de 19 de março dos Ministérios da Economia, da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas, da Saúde e das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente, referente às normas técnicas relativas à definição, caracterização, composição, acondicionamento, rotulagem, métodos de análise, tolerâncias analíticas e comercialização das farinhas destinadas à panificação e a outros fins e das sêmolos destinadas ao fabrico de massas alimentícias e a usos culinários. Diário da República – I Série B, nº 66, pp. 1861 – 1865.

Quali – Segurança Alimentar, 2016. Qualidade Microbiológica dos Alimentos. [online] Disponível em: <<http://www.quali.pt/seguranca-alimentar/209-qualidade-microbiologica-alimentos>> [Consultado em 9 de Abril de 2017].

Regulamento (CE) Nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, L 354/16 - L 354/33.

Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão de 11 de novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, L 295/1 - L 295/177.

Regulamento (UE) Nº 231/2012 da Comissão de 9 de março de 2012 que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia, L 83/1 - L 83/295.

Ribeiro, P.S., 2009. *Aproximação ao Estudo da Tipicidade do Pão de Mafra*. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Engenharia Alimentar. Lisboa.

Rodrigues, A.M., 2012. *Caracterização de Pão Regional do Distrito de Viseu e de Pão São*. Dissertação para obtenção de grau de mestre em Qualidade e Tecnologia Alimentar. Escola Superior Agrária de Viseu. Viseu.

Ryan, L., Bello, F. e Arendt, E., 2008. *The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread*. International Journal of Food Microbiology, No. 125, pp. 274–278.

Silliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C., Roberts, T.A., 1980. *Ecologia microbiana de los alimentos, productos alimentícios*. Volume 2. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A.

Stanojevik-Nikolic, S., Dimic, G., Mojovic, L., Pejin, J., Djukic-Vukovic, A. e Kocic-Tanackov, S., 2016. *Antimicrobial activity of lactic acid against pathogen and spoilage microorganisms*. Journal of Food Processing and Preservation, No. 40, pp. 990-998.

U.S. Department of Health and Human Services and Food and Drugs Administration, 2013. Food Code. Anexo 6 – Food Processing Criteria.

UK Food Guide, 2017. UK Food Guide E 219. [online] Disponível em: <<http://www.ukfoodguide.net/e219.htm>> [Consultado em 8 de Abril de 2017].

Voss, C., 2005. *Veneno no seu prato? Utilidade e riscos dos aditivos alimentares*. DECO PROTESTE, Editores Lda., pp. 227.

Whitney, E. e Rolfes, S., 2011. *Understanding Nutrition*. 12ª Edição. Belmont, USA: Thomson – Wadsworth

14. Anexo 1 – Máquina de Fatiagem e Embalamento

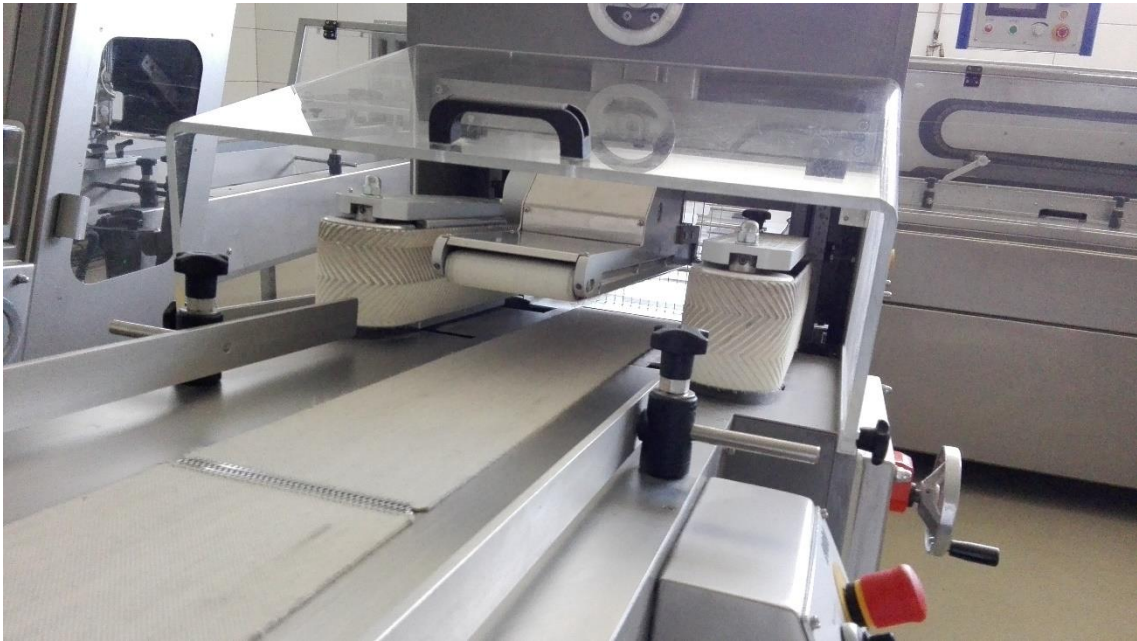
(autoria própria com autorização do Bruno Luz)



Pão de Forma de Mafra arrefecendo nos carros perfurados em zona climatizada



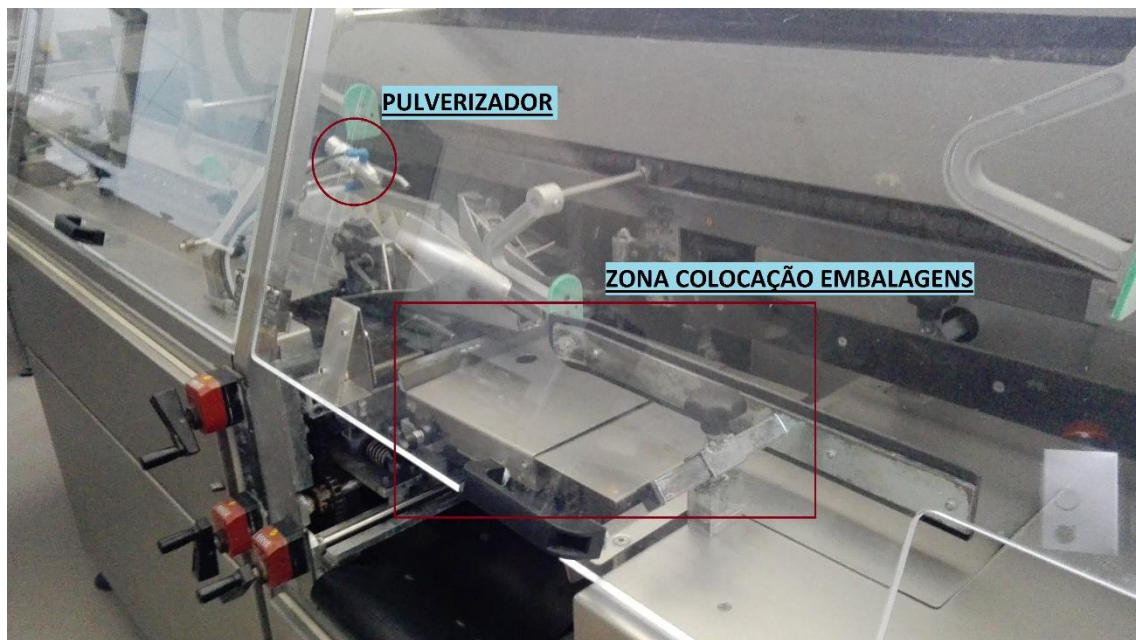
Vista panorâmica da máquina de fatiagem e embalamento



Entrada da máquina de fatiagem



Lâminas de corte da fatiadora



Parte da máquina onde se encontra o pulverizador seguida da zona de colocação dos sacos plásticos microperfurados que servirão de embalagem



Zona terminal de embalagem com mesa giratória

15. Anexo 2 – Questionário de Análise Sensorial Descritiva

Análise sensorial descritiva (adaptado de *Battochio et al*, 2006)

Avaliação de parâmetros descritores como sejam o aspeto, o cheiro, o sabor e a textura em escalas descritivas de 1 a 5. Nestas escalas o valor 1 corresponde a valores baixos do parâmetro e o valor 5 a valores elevados do parâmetro em causa, como se exemplifica no quadro abaixo (Quadro x)

Escalas Descritivas (Para o parâmetro secura – aspeto, por exemplo)	
Classificação	
1	Nada seco (pão fresco)
2	Pouco seco
3	Ligeiramente seco
4	Seco
5	Muito seco

Parâmetro Geral	Parâmetro Específico	Definição	Classificação Pão sem Aditivos	Classificação Pão com Aditivos Dia 0	Classificação Pão com Aditivos Dia 5
Aspeto	Cor da Côdea	Cor castanho escura			
	Cor do Miolo	Cor bege claro/esbranquiçado			
	Diâmetro dos Alvéolos	Verificar tamanho/regularidade dos alvéolos			
	Regularidade da Miga	Verificar se a miga se apresenta homogénea em toda a fatia			
	Secura	Verificar aspeto de pão seco (vs pão fresco)			
Cheiro	Fermentado	Cheiro caraterístico de massa fermentada			
	<i>Suis generis</i>	Cheiro típico do Pão de Mafra			
	Alcoólico	Cheiro a álcool (etanol)			
Sabor	<i>Suis generis</i>	Sabor típico do Pão de Mafra			
	Alcoólico	Sabor a álcool (etanol)			
	Salgado	Sabor a cloreto de sódio (NaCl)			
	Adocicado	Sabor doce típico da sacarose (α_H)			
Textura	Mastigabilidade	Número de vezes que se mastiga o pão antes de deglutir			
	Maciez	Força mínima necessária para comprimir a amostra			
	Humidade	Sensação provocada pela presença de água no alimento			
	Elasticidade	Facilidade em voltar à forma inicial após compressão			
	Adesividade	Força necessária para superar a tração entre o alimento e o palato			

16. Anexo 3 – Questionário de Análise Sensorial Hedónica (aplicado)

Análise sensorial hedónica (exemplo do questionário aplicado)

Avaliação de parâmetros como sejam o aspeto, o cheiro, o sabor e a textura em escala hedónica para expressar as preferências (por parâmetro e globais). Nesta escala o valor 1 corresponde a “desagrada muitíssimo” e o valor 9 a “gosta muitíssimo”, como se observa no esquema seguinte:



Nome	
Idade	
Género	
Escolaridade	
Data	

	Aspeto	Cor	Cheiro a pão Mafra	Sabor	Textura	Humidade	Global
Pão sem Aditivos							
Pão com Aditivos Dia 5							

Obrigado pela colaboração!

17. Anexo 4 – Dados HR, Cinzas e MO

Quadro de dados para o cálculo da humidade relativa

Cadinho	Peso cadinho vazio (g)	Peso amostra (g)	Peso cadinho + pão 3	Peso matéria seca	Peso água libertada (g)	HR (%)
PM1	55,011	5,000	57,682	2,671	2,329	46,580
PM2	57,229	5,001	59,782	2,553	2,448	48,950
PM3	55,855	5,002	58,367	2,512	2,490	49,780
PM4	61,635	5,000	64,398	2,763	2,237	44,740
PM5	68,428	5,001	71,095	2,667	2,334	46,671
PM6	57,229	5,001	59,790	2,561	2,440	48,790
PM7	61,637	4,999	64,185	2,548	2,451	49,030
PM8	55,008	5,002	57,589	2,581	2,421	48,401
PM9	55,861	5,001	58,378	2,517	2,484	49,670
PM10	68,436	5,000	70,934	2,498	2,502	50,040
Média:	59,6329	5,0007	62,22	2,5871	2,4136	48,26517174
Desvio Padrão:	5,224749467	0,000948683	5,236615234	0,08580786	0,086037718	1,718390594
Peso da Matéria Seca (g) = (Peso Cadinho + Pão3) - (Peso Cadinho Vazio)						
Peso Água Libertada (g) = (Peso Amostra) - (Peso da Matéria Seca)						
Humidade Relativa (%) = (Peso Água Libertada/Peso Amostra) x 100						

Quadro de dados para o cálculo das cinzas e da matéria orgânica

Cadinho	Peso cadinho vazio (g)	Peso amostra (g)	Peso cadinho + cinzas (g)	Peso cinzas (g)	Cinzas (%)	Peso MO (g)	MO (%)
PM1	55,011	5,000	55,040	0,029	0,580	2,642	52,840
PM2	57,229	5,001	57,260	0,031	0,620	2,522	50,430
PM3	55,855	5,002	55,885	0,030	0,600	2,482	49,620
PM4	61,635	5,000	61,670	0,035	0,700	2,728	54,560
PM5	68,428	5,001	68,460	0,032	0,640	2,635	52,689
PM6	57,229	5,001	57,266	0,037	0,740	2,524	50,470
PM7	61,637	4,999	61,674	0,037	0,740	2,511	50,230
PM8	55,008	5,002	55,044	0,036	0,720	2,545	50,880
PM9	55,861	5,001	55,892	0,031	0,620	2,486	49,710
PM10	68,436	5,000	68,469	0,033	0,660	2,465	49,300
Média:	59,633	5,001	59,666	0,033	0,662	2,554	51,073
Desvio padrão:	5,224749467	0,000948683	5,225216189	0,002960856	0,059238661	0,085741213	1,716959632
Peso das Cinzas = (Peso Cadinho + Cinzas) - (Peso Cadinho Vazio)							
Cinzas (%) = (Peso das Cinzas/Peso Amostra) x 100							
Peso da Matéria Orgânica = (Peso da Matéria Seca) - (Peso das Cinzas)							
Matéria Orgânica (%) = (Peso da Matéria Orgânica/Peso Amostra) x 100							

18. Anexo 5 – Resultados da ANOVA

ANOVA da cor do miolo

Anova: factor único						MIOLO
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Linha 1	5	174,7161879	34,94323758	1403,836602		
Linha 2	5	175,0533273	35,01066546	1404,092085		
Linha 3	5	175,4646114	35,09292228	1403,464839		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,05619702	2	0,02809851	2,00161E-05	0,999979984	3,885293835
Dentro de grupos	16845,57411	12	1403,797842			
Total	16845,6303	14				

ANOVA da cor das côdeas

Anova: factor único						CÔDEAS
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Linha 1	5	156,8846782	31,37693564	706,6639485		
Linha 2	5	157,3481229	31,46962458	644,1323875		
Linha 3	5	159,1203742	31,82407484	698,625242		
Linha 4	5	173,3559457	34,67118915	1156,369483		
Linha 5	5	173,0277763	34,60555527	1152,521225		
Linha 6	5	172,9482029	34,58964059	1135,76815		
Linha 7	5	199,2468163	39,84936325	524,1706591		
Linha 8	5	199,0649331	39,81298661	530,1610193		
Linha 9	5	199,0432353	39,80864705	543,3853782		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	524,5382174	8	65,56727717	0,083209581	0,999492305	2,208518074
Dentro de grupos	28367,18997	36	787,9774992			
Total	28891,72819	44				

ANOVA dos elementos minerais

Anova: factor único						XRF
SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Linha 1	14	1001661,14	71547,22429	68966984388		
Linha 2	14	1001358,94	71525,63857	68897744509		
Linha 3	14	1001160,43	71511,45929	68825116278		
Linha 4	14	1000983,72	71498,83714	68952169382		
Linha 5	14	1000945,66	71496,11857	68920916521		
Linha 6	14	1000384	71456	69159656563		
Linha 7	14	1001128,49	71509,17786	68924653363		
Linha 8	14	1000748,75	71482,05357	68930876375		
Linha 9	14	1000944,29	71496,02071	68917527294		
Linha 10	14	1000671,4	71476,52857	68888517883		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	83218,29492	9	9246,477214	1,34127E-07	1	1,952610341
Dentro de grupos	8,96199E+12	130	68938416256			
Total	8,96199E+12	139				

19. Anexo 6 – Tabelas do XRF

Classificação	Elemento	Média (mg/Kg MS)	Média (mg/100 g MS)	Média (mg/100 g MH)	DDR (mg/dia)	DDR (%)
Macroelementos	Potássio (K)	4445,42 ± 286,70	444,54 ± 28,67	229,98 ± 14,83	4700,00	4,89
	Cloro (Cl)	7803,61 ± 315,72	780,36 ± 31,57	403,72 ± 16,33	2300,00	17,55
	Cálcio (Ca)	948,75 ± 74,96	94,87 ± 7,50	49,08 ± 3,88	1000,00	4,91
	Fósforo (P)	1498,85 ± 71,19	149,88 ± 7,12	77,54 ± 3,68	700,00	11,08
	Magnésio (Mg)	ND	ND	ND	375,00	ND
	Enxofre (S)	2394,41 ± 120,12	239,44 ± 12,01	123,87 ± 6,21	0,00	0,00
MS = Matéria Seca						
MH = Matéria Húmida						
Humidade = 48,265%						
DDR = Dose Diária de Referência (Whitney, E. e Rolfes, S., 2011. <i>Understanding Nutrition</i> . 12ª Edição. Belmont, USA: Thomson – Wadsworth)						
ND = Não Detetado (<LOD)						

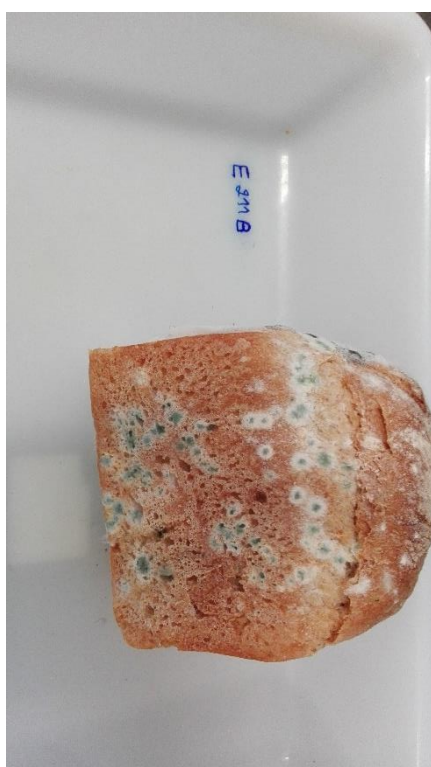
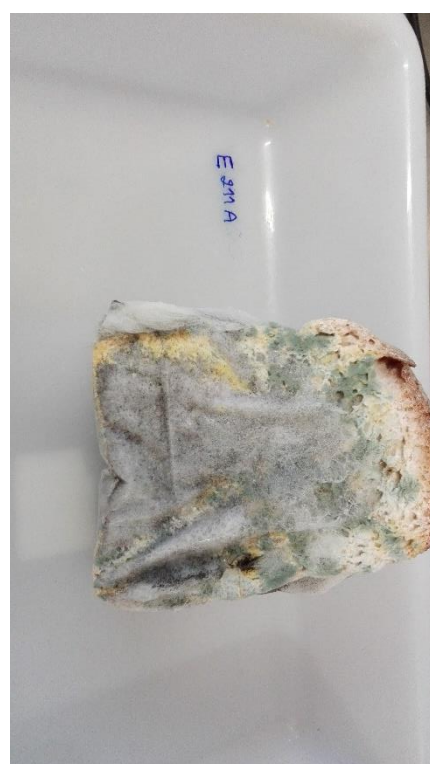
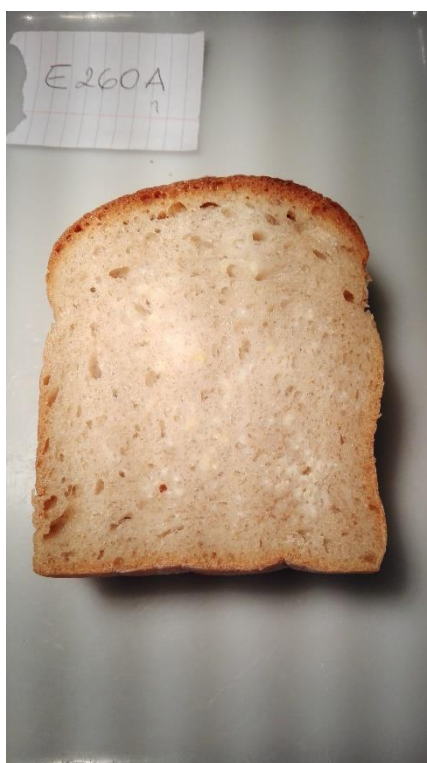
Classificação	Elemento	Média (mg/Kg MS)	Média (mg/100 g MS)	Média (mg/100 g MH)	DDR (µg/dia)	DDR (%)
Microelementos	Zinco (Zn)	11,10 ± 1,37	1,11 ± 0,14	0,57 ± 0,07	11,00*	5,22
	Ferro (Fe)	ND	ND	ND	8,00**	ND
	Manganês (Mn)	ND	ND	ND	2,30*	ND
	Cobre (Cu)	ND	ND	ND	900,00	ND
	Selénio (Se)	ND	ND	ND	55,00	ND
	Molibdénio (Mo)	10,86 ± 0,46	1,09 ± 0,05	0,56 ± 0,02	45,00	1248,88
	Crómio (Cr)	ND	ND	ND	35,00	ND
	Silício (Si)	150,78 ± 20,70	15,08 ± 2,07	7,80 ± 1,07	NA	NA
MS = Matéria Seca						
MH = Matéria Húmida						
Humidade = 48,265%						
DDR = Dose Diária de Referência (Whitney, E. e Rolfes, S., 2011. <i>Understanding Nutrition</i> . 12ª Edição. Belmont, USA: Thomson – Wadsworth)						
ND = Não Detetado (<LOD)						
NA = Não Aplicável						
*mg/dia						
** para Homens adultos, Mulheres adultas com DDR ≈ 18 mg/dia						

Classificação	Elemento	Média (mg/Kg MS)	Média (mg/100 g MS)	Média (mg/100 g MH)
Outros elementos encontrados	Zircónio (Zr)	9,38 ± 0,28	0,94 ± 0,03	0,49 ± 0,01
	Estrôncio (Sr)	3,62 ± 0,32	0,36 ± 0,03	0,19 ± 0,02
	Urânio (U)	4,21 ± 0,69	0,42 ± 0,07	0,22 ± 0,04
	Rubídio (Rb)	1,58 ± 0,18	0,16 ± 0,02	0,08 ± 0,01
	Nióbio (Nb)	8,49 ± 0,29	0,85 ± 0,03	0,44 ± 0,02
MS = Matéria Seca				
MH = Matéria Húmida				
Humidade = 48,265%				

Classificação	Elemento	Estado	Lim Detecção (mg/Kg MS)
Elementos testados e não encontrados	Níquel (Ni)	ND	8,07 ± 0,22
	Cobalto (Co)	ND	6,92 ± 0,17
	Vanádio (V)	ND	5,47 ± 0,29
	Alumínio (Al)	ND	41,75 ± 1,33
	Chumbo (Pb)	ND	1,33 ± 0,04
	Estanho (Sn)	ND	1,84 ± 0,06
	Cádmio (Cd)	ND	2,36 ± 0,08
	Arsénio (As)	ND	0,96 ± 0,02
	Mercúrio (Hg)	ND	2,34 ± 0,08
	Tório (Th)	ND	1,05 ± 0,02
	Ouro (Au)	ND	1,65 ± 0,06
	Tungsténio (W)	ND	10,27 ± 0,36
	Titânio (Ti)	ND	13,14 ± 1,45
	Escândio (Sc)	ND	4,89 ± 0,27
	Bário (Ba)	ND	10,89 ± 0,35
	Césio (Cs)	ND	2,29 ± 0,07
	Telúrio (Te)	ND	6,17 ± 0,20
	Antimónio (Sb)	ND	2,38 ± 0,08
	Prata (Ag)	ND	1,61 ± 0,06
	Paládio (Pd)	ND	1,87 ± 0,06
	Bismuto (Bi)	ND	1,5 ± 0,00
	Rénio (Re)	ND	1,5 ± 0,00
	Tântalo (Ta)	ND	1,5 ± 0,00
	Háfnio (Hf)	ND	1,5 ± 0,00
MS = Matéria Seca			
ND = Não Detetado (<LOD)			
Lim Detecção = Limite de Detecção			

20. Anexo 7 – Fotografias dos Ensaio Laboratoriais e em Contexto Empresarial

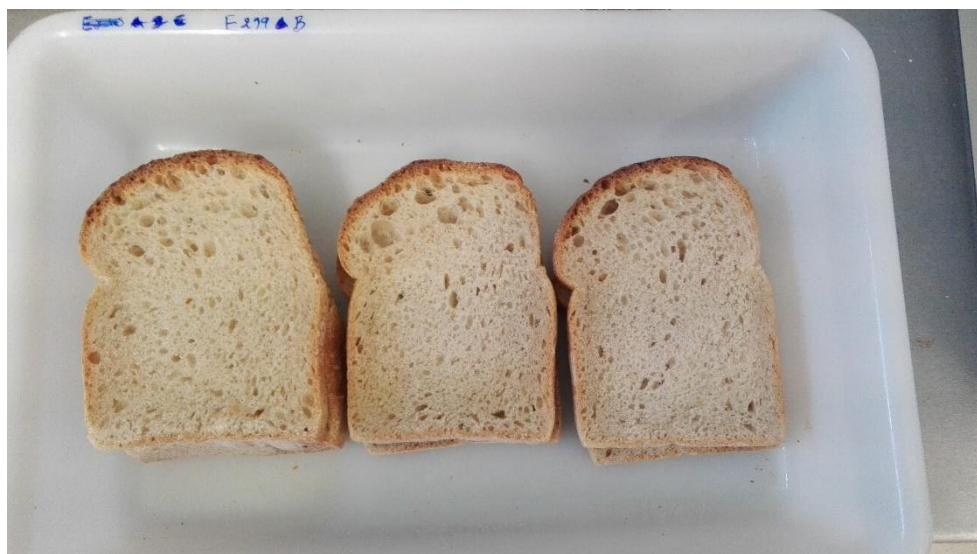
Seleção de fotografias do ensaio 1



(continuação do ensaio 1)



(continuação do ensaio 1)



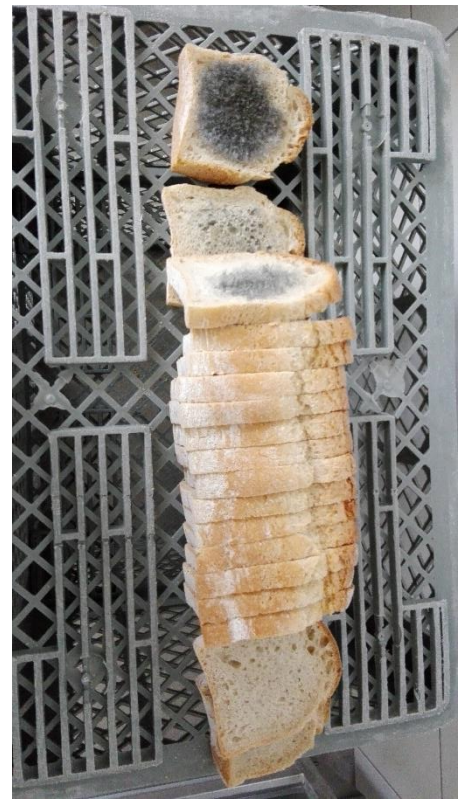
Seleção de fotografias do ensaio 2



Seleção de fotografias do ensaio 3



Seleção de fotografias do ensaio em contexto empresarial



Legenda das seleções fotográficas do Anexo 7

Seleção de fotografias do ensaio 1 (ordem a seguir: da esquerda para a direita e de cima para baixo)

- 1 – E 211 a, Dia 3
- 2 – E 260 a, Dia 3
- 3 – E 211 a, Dia 6
- 4 – E 211 b, Dia 6
- 5 – E 260 c, Dia 6
- 6 – E 280 b, Dia 6
- 7 – E 281 a, Dia 6
- 8 – E 281 c, Dia 6
- 9 – E 281 c, Dia 6
- 10 – E 210 vs E 280 ab, Dia 8
- 11 – E 219 b, Dia 15
- 12 – E 210 a, Dia 20
- 13 – E 210 b, Dia 20

Seleção de fotografias do ensaio 2 (ordem a seguir: da esquerda para a direita e de cima para baixo)

- 1 – Controlo, Dia 4
- 2 – E 210 a, Dia 5
- 3 – E 219 e, Dia 6
- 4 – E 219 a, Dia 10
- 5 – E 219 c, Dia 12
- 6 – E 219 f, Dia 17

Seleção de fotografias do ensaio 3 (ordem a seguir: da esquerda para a direita e de cima para baixo)

- 1 – Controlo, Dia 5

- 2 – E 210 f, Dia 7
- 3 – E 219 c, Dia 8
- 4 – E 210 f, Dia 12
- 5 – E 219 c, Dia 12
- 6 – E 219 f, Dia 12

Seleção de fotografias do ensaio em contexto empresarial (ordem a seguir: da esquerda para a direita e de cima para baixo)

- 1 – Observação geral após tratamento, Dia 0
- 2 – Controlo, Dia 4
- 3 – E 210 (falha), Dia 5
- 4 – E 210 (falha), Dia 5
- 5 – E 210 (sem bolor), Dia 5
- 6 – E 210, Dia 7

21. Anexo 8 – Tabela Análise Sensorial Hedónica

Comparação das preferências dos provadores atributo a atributo para o pão de forma de Mafra sem aditivos e com aditivos ao fim de 5 dias de tratamento

Aspecto		Cor		Cheiro a Pão de Mafra		Sabor		Textura		Humidade		Global		
SEM	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM	COM	
9	8	9	9	9	7	9	9	9	9	8	7	9	8	
9	9	9	9	9	9	9	7	8	7	9	5	9	8	
9	9	9	9	9	7	9	8	9	8	8	6	9	7,5	
9	9	9	9	9	7	9	8	8	8	9	7	9	7	
9	9	9	9	9	7	9	8	9	6	8	6	9	7,5	
9	8	9	9	9	7	9	9	9	9	9	7	9	8	
8	9	9	9	9	7	9	8	9	8	9	6	9	7,5	
9	9	9	9	9	7	9	7	9	7	9	6	9	7	
8	9	9	9	9	7	7	8	9	8	9	7	8,5	7	
9	8	9	9	9	7	9	9	9	9	8	7	9	8	
9	9	9	9	8	7	9	8	9	8	8	7	8	7	
9	8	9	9	9	7	9	9	9	8	9	7	9	8	
9	9	9	9	9	7	9	8	9	6	9	6	9	7,5	
9	9	9	9	9	9	9	7	8	7	9	6	9	8	
9	9	9	9	9	7	8	8	7	8	9	6	8	7,5	
9	8	9	9	9	7	9	9	8	9	8	7	8,5	8	
8,88	8,69	9,00	9,00	8,94	7,25	8,81	8,13	8,63	7,81	8,63	6,44	8,81	7,59	Média
0,33	0,46	0,00	0,00	0,24	0,66	0,53	0,70	0,60	0,95	0,48	0,61	0,35	0,40	Desv.Pad

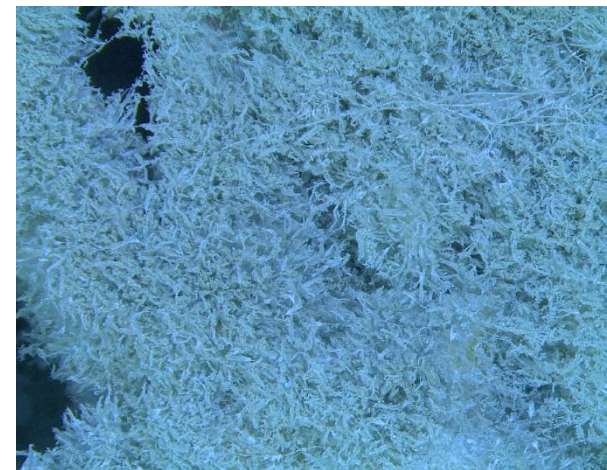
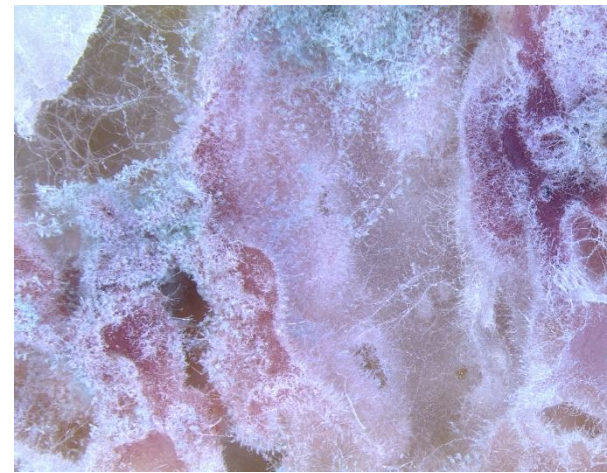
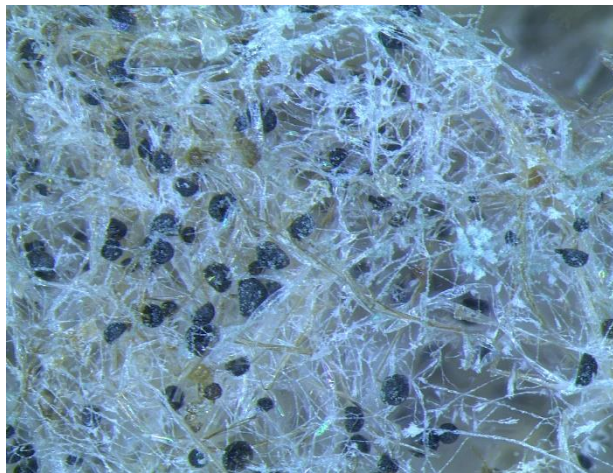
Escala: entre 1 “Desagrada Muitíssimo” e 9 “Gosta Muitíssimo”

22. Anexo 9 – Bolores observados à Lupa Binocular e ao MOC

Conjunto 1 – Bolores observados à lupa binocular (6 colorações diferentes)

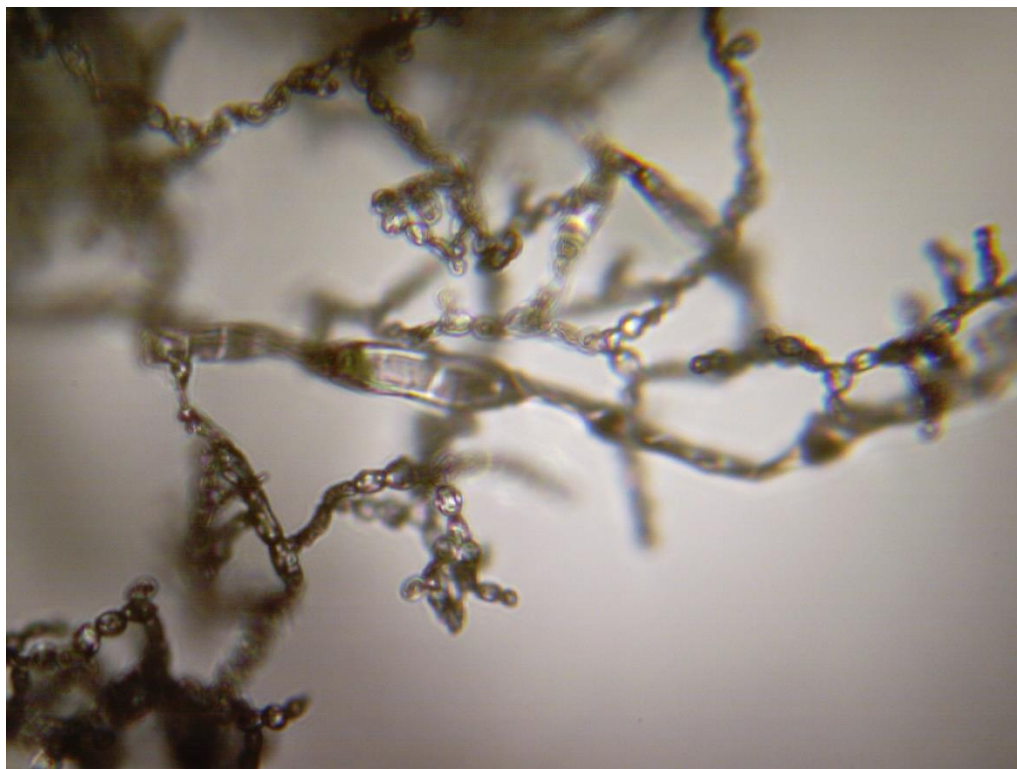


Bolores Amarelo, Laranja e Branco (da esquerda para a direita)

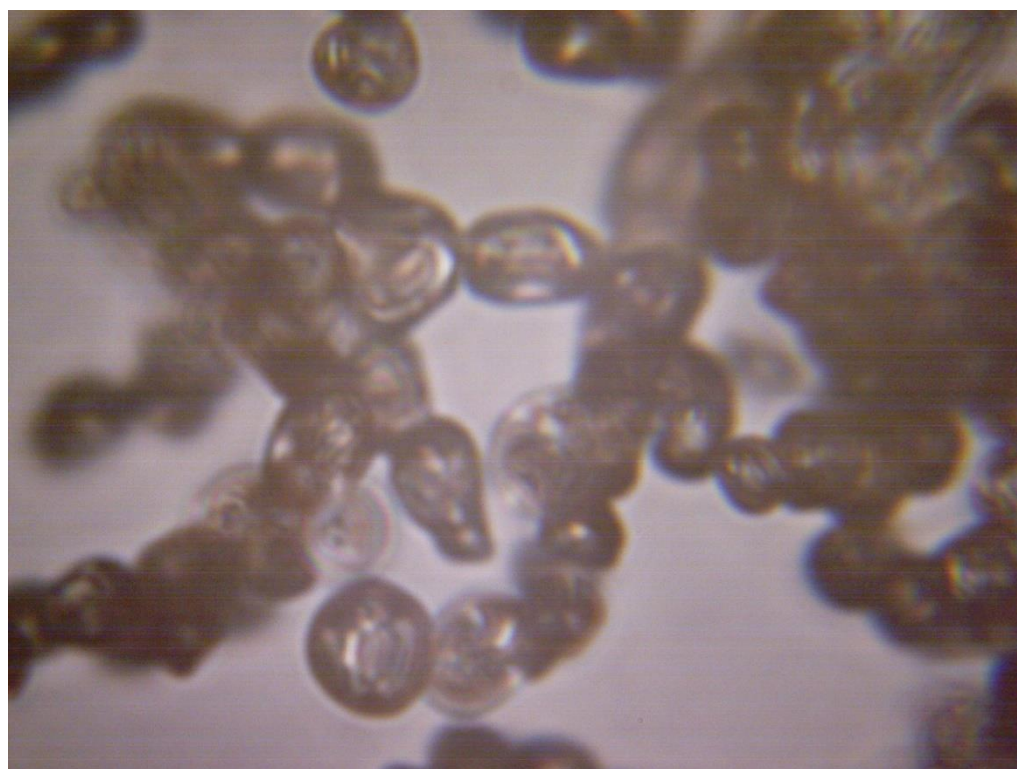


Bolores Laranja, Preto, Vermelho e Verde (da esquerda para a direita e de cima para baixo)

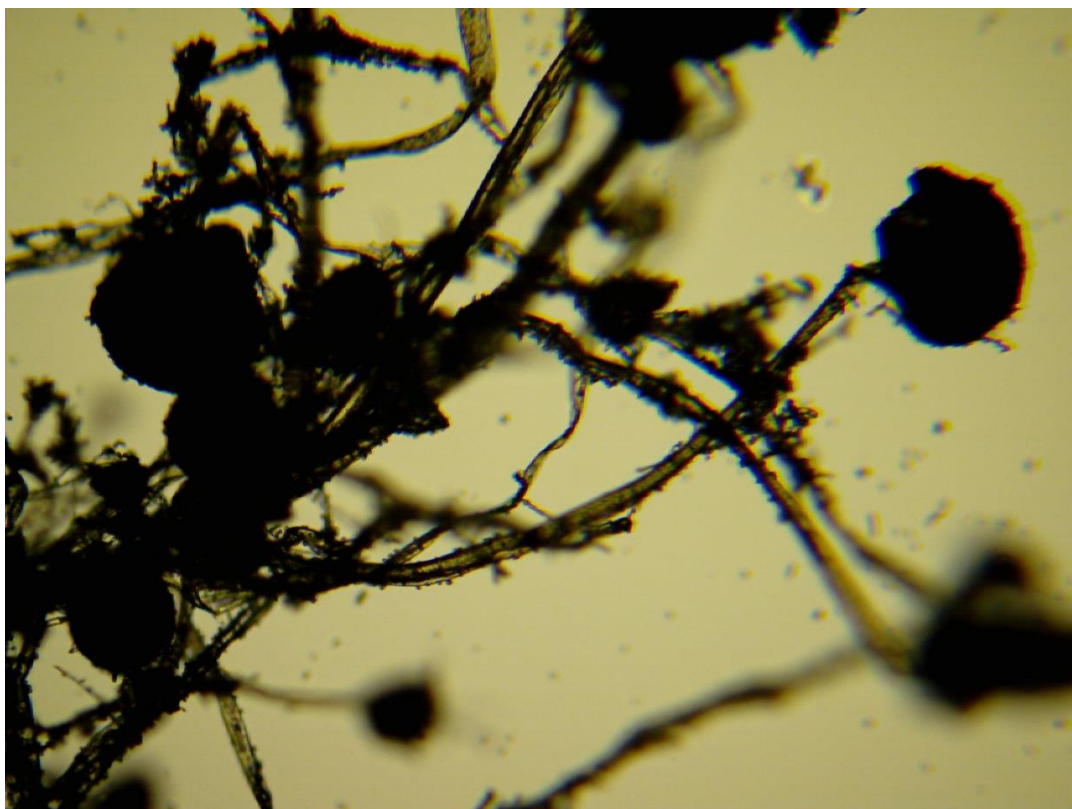
Conjunto 2 – Bolores observados ao MOC



Bolor Branco (provavelmente do género *Penicillium*)



Bolor Laranja (provavelmente do género *Neurospora*)



Bolor Preto (provavelmente do género *Rhizopus*)



Bolor Verde (hifa ao pormenor)