



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE PÚBLICA

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO E ESTRATÉGIA DE CONTROLO DO
CONTAMINANTE SAZONAL NEUROSPORA CRASSA EM PRODUTOS DE
PANIFICAÇÃO**

Trabalho submetido por
Raquel Alexandra Osório Breyd
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde Pública

Mai de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE PÚBLICA

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO E ESTRATÉGIA DE CONTROLO DO CONTAMINANTE SAZONAL NEUROSPORA CRASSA EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO

Trabalho submetido por
Raquel Alexandra Osório Breyd
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde
Pública

Trabalho orientado por
Professor Doutor Fernando Bernardo

e coorientado por
Dra Cristina Aleixo

Maió de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista, com muito amor e carinho, à pessoa mais importante da minha vida, minha mãe.

“Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo, minha mãe.”

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por toda a força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Meus sinceros e cordiais agradecimentos,

Ao Professor Doutor Fernando Bernardo pelo apoio, força e energia transmitida no desenvolvimento da dissertação.

Ao Professor Pedro Louro, pela convicção e encaminhamento na oportunidade de realização do meu tema.

Com especial carinho e amizade, à Dra Cristina Aleixo por me ter recebido, acompanhado e disponibilizado, a sabedoria e os ensinamentos na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constante.

Ao Arq. Luís Luz, sócio-gerente da Pani-Mafra, pela oportunidade de poder realizar este projeto.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

A panificação é um processo industrial, por vezes contínuo, através do qual se realizam uma série de operações ordenadas e sequenciais, que conduzem à obtenção de um produto final - o pão.

O Pão é um alimento fundamental para todas as classes sociais, tendo conseguido uma posição transversal no comportamento alimentar da sociedade. Não admira, portanto, que a indústria de panificação, tenha alcançado uma posição de destaque a nível económico, visto ser, o pão, um dos alimentos fundamentais da dieta diária humana.

Neste trabalho procedeu-se a um estudo sobre as origens da contaminação pelo fungo *Neurospora crassa* em produtos de panificação. Com os resultados obtidos conceberam-se possíveis estratégias para o seu controlo, de forma a garantir a qualidade e segurança alimentar do produto final – o “Pão de Mafra”.

Neurospora crassa é habitualmente referenciado em ambientes tropicais, subtropicais e zonas geográficas com predominância de áreas agrícolas.

Neurospora crassa ganhou expressão científica no momento em que surgiram os primeiros relatos de pães contaminados com bolor alaranjado, em 1843, em França. Este fungo encontra-se no ar, no solo, e nas superfícies com condições favoráveis ao seu desenvolvimento e produz esporos facilmente dispersáveis pelo ar.

De forma a caracterizar e identificar a origem do contaminante estabeleceu-se, um plano de monitorização microbiológica do ambiente, de superfícies, de matérias-primas, de produtos intermédios e de produto acabado bastante mais exaustivo especialmente intensificado durante o período historicamente correspondente ao aparecimento do contaminante. Tendo por base os resultados obtidos, procedeu-se ao reajustamento dos procedimentos de fabrico, tomando em consideração o histórico da indústria e o carácter sazonal do contaminante. Para impedir o desenvolvimento de *N. crassa*, foi necessário implementar um conjunto de medidas capazes de contrariar a atividade daquele agente microbiano.

Palavras-chaves: *Neurospora crassa*, “Pão de Mafra”, panificação, contaminante.

ABSTRACT

Baking is an industrial process, sometimes continuous, through which a number or ordered and sequential operations are performed, leading to the final product – the bread.

Bread is an essential food for all social classes, which has achieved a transverse position in the society's nourishment behaviour. Therefore, the baking industry has reached a prominent position in today's economy, as the bread is essential for the human daily diet.

It was carried out a study about the origin of contaminations by the fungus *Neurospora crassa* in bakery products. The final results helped to develop possible strategies to control contamination and ensure the quality and safety of the final product – “Pão de Mafra”.

Neurospora crassa is usually associated to tropical, subtropical and geographical areas predominantly the ones with agricultural lands.

Neurospora crassa was known scientifically when the first rumours of contaminated bread with orange mold arose in 1843, in France. This fungus can be found in the air, in the soil and also in surfaces with favourable conditions for its development, being easily spread through the air.

In order to characterise and identify the source of the contaminant, it was established a plan to monitor the microbiological environment of surfaces, raw materials, intermediate and final products. It was a relatively exhausting plan intensified during the period correspondent to the historical appearance of the contaminant.

Based on the achieved results, a realignment of the manufacturing procedures was undertaken, taking into consideration the history of the industry and the seasonal nature of the toxin. To prevent the development of *Neurospora crassa*, it was necessary to implement a set of measures capable of contradicting the activity of the microbial agent.

Key Words: *Neurospora crassa*, “Pão de Mafra”, baking, contaminant.

RESUMEN

La panadería es un proceso industrial, a veces continuo, en el que a través de una serie de operaciones ordenadas y secuenciadas, conducen a la obtención de un producto final de pan.

El pan es un alimento fundamental para todas las clases sociales, habiendo alcanzado una posición transversal sobre la alimentación en el comportamiento de la sociedad. No ha de sorprender entonces que la industria de la panadería, haya alcanzado una posición destacada a nivel económico, ya que el pan, es uno de los alimentos en dieta diaria fundamental humana.

En este trabajo se ha realizado un estudio sobre el origen de la contaminación por el hongo *Neurospora crassa* en productos de panadería. Con los resultados obtenidos se han concebido las posibles estrategias para su control, para garantizar la calidad y seguridad alimentaria del producto final – el "Pão de Mafra".

Neurospora crassa generalmente se encuentra en los ambientes subtropicales tropicales y las zonas geográficas con predominio de zonas agrícolas.

Neurospora crassa ganó expresión científica cuando surgieron los primeros reportes de pan contaminado con molde naranja, en 1843, en Francia. Este hongo está en el aire, el suelo y en áreas con condiciones favorables para su desarrollo y produce esporas que son dispersadas fácilmente a través del aire.

Con el fin de caracterizar e identificar la fuente contaminante, se estableció un plan de monitoreo microbiológico del medio ambiente, de las superficies, de las materias primas, los productos intermedios y productos terminados. Especialmente se había intensificado durante el período correspondiente a la aparición del contaminante. Basado en los resultados obtenidos, se procedió a la readecuación de la fabricación de los procedimientos, teniendo en cuenta la historia de la industria y la estacionalidad del contaminante. Para prevenir el desarrollo de *N. crassa*, fue necesario implantar un conjunto de medidas para contrarrestar la actividad de agente microbiano.

Las palabras clave: *Neurospora crassa*, "Pão de Mafra", panadería, contaminante.

ÍNDICE GERAL

Dedicatória	3
Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract	6
Resumen	7
Índice Geral.....	8
Índice de Figuras	10
Índice de Tabelas.....	12
Índice de Gráficos	13
Lista de Abreviaturas	14
1. Introdução	15
1.1. O Pão	15
1.1.1. Microrganismos da fermentação	16
1.1.2. Importância económica, política e social do Pão	17
1.1.3. O conceito Qualidade	19
1.2. A Bioquímica do Pão	20
1.3. “Pão de Mafra”	31
1.3.1. O Processo De Fabrico.....	32
1.3.2. Processo de Certificação	39
1.4. Conservação do Pão	41
1.4.1. Fatores Intrínsecos e Extrínsecos	41
1.5. Fungos e Alimentos	51
1.5.1. Sistemática e Taxonomia	51
1.5.2. Necessidades Nutricionais.....	52
1.5.3. Micotoxinas.....	53
1.5.4. Reprodução	55
1.5.5. <i>Neurospora crassa</i>	55
2. Materiais e Métodos	61
2.1. Amostragem.....	61
2.1.1. Determinações do pH e de a_w	62
2.1.2. Leitura de temperaturas.....	62
2.1.3. Contagem de bolores e leveduras e de microrganismos mesófilos	62
3. Resultados e Discussão	65
3.1. Tipificação dos Produtos de Panificação da Unidade Fabril da Pani-Mafra	65
3.2. Arrefecimento	67

3.3.	Histórico de Reclamações sobre o Aparecimento de <i>Neurospora</i>	71
3.4.	Análise Microbiológica (Contagem de Bolores e Leveduras e Contagem de Microrganismos a 30°C)	74
3.5.	Deteção de <i>Neurospora crassa</i> em superfícies e produto acabado	85
3.6.	Identificação de <i>Neurospora crassa</i>	89
4.	Conclusões	93
5.	Bibliografia	95
6.	Anexos.....	102
6.1.	Especificações Técnicas do “Pão de Mafra”	102
6.2.	Registos das Temperaturas.....	102
6.3.	Lista de Leveduras	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Grãos de Cereais e pão em massa.	15
Figura 2: Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Figura 3: Pistrinum – Padaria pública na antiga Pompéia (D'andrea, 2012).	17
Figura 4: Pinturas do pão no antigo Egípcio (D'andrea, 2012).	17
Figura 5: Simboliza alimento sagrado – Pão.	18
Figura 6 : Micrografias dos grânulos de amido de trigo.	20
Figura 8: Grão de trigo – composição (http://www.saudelar.com/edicoes/2010/fevereiro/principal.asp?send=06_nutricao.htm).	21
Figura 7: Grão de trigo.	21
Figura 9: Teor de proteína no grão de trigo em função do tipo de grão (Scheuer <i>et al.</i> , 2011).	22
Figura 10: Estrutura química da amilose (Ferreira, 2011).	23
Figura 11: Estrutura química da amilopectina (Ferreira, 2011).	23
Figura 12: Gelatinização do amido (http://umaquimicairresistivel.blogspot.pt/2011/06/indigestibilidade-do-amido.html).	24
Figura 13: Envelhecimento do Pão (Giraldo, 2002).	25
Figura 14: Formação de glúten (www.cienciaviva.pt/projectos/pollen/sessao6pao.pdf).	26
Figura 15 : Glúten.	26
Figura 17: Fotografia da moagem da farinha em mós de pedra (Fonte: Raquel Breyd).	27
Figura 16: Evolução da retenção de água em função do processo de confeção de Pão (Giraldo, 2002).	27
Figura 19: Sal.	28
Figura 18: Grãos de Centeio.	28
Figura 20: Estrutura da proteína no processo de amassadura (Giraldo, 2002).	29
Figura 21: Reação química da fermentação alcoólica (Giraldo, 2002).	29
Figura 22: “Pão de Mafra” – estrutura alveolar (Fonte: Raquel Breyd).	30
Figura 23: “Pão de Mafra” (Fonte: Raquel Breyd).	32
Figura 24: Fluxograma do processo de fabrico do “Pão de Mafra”.	33
Figura 25: Fluxograma do das etapas da fermentação do “Pão de Mafra”.	34
Figura 26: Esquema representativo da alteração das proteínas no processo amassadura (www.cienciaviva.pt/projectos/pollen/sessao6pao.pdf).	35
Figura 27: Produto tendido em tabuleiro de PVC (Fonte: Raquel Breyd).	35
Figura 28: Tabuleiros de PVC onde ocorre a 2ª fermentação (Fonte: Raquel Breyd).	36
Figura 29: Forno de alvenaria com aquecimento direto (Fonte: Raquel Breyd).	36
Figura 30: Lar do forno de alvenaria (Fonte: Raquel Breyd).	37
Figura 31: “Pão de Mafra” (Fonte: Raquel Breyd).	37
Figura 32: Concelho de Mafra (CMM, 2006).	38

Figura 33: Símbolo comunitário de Indicação Geográfica Protegida (IGP) (ACISM, 2011).....	39
Figura 34: Logotipo da marca coletiva registrada- "Pão de Mafra" (ACISM, 2011).	40
Figura 35: Fatores extrínsecos e intrínsecos do desenvolvimento microbiano (https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRLqb86CpUR-lbpa7G3VK4fMzjDVyvS0ZGIlof_3OJz2P6jw6PeDQ).	42
Figura 36: “Pão de Mafra” embalado (Fonte: Raquel Breyd).	49
Figura 37: <i>Neurospora crassa</i>	56
Figura 38 – Várias representações de <i>N. crassa</i> Imagem obtida do Perkins Lab (http://www.stanford.edu/group.neurospora).	56
Figura 39: <i>Neurospora crassa</i>	57
Figura 40: <i>Neurospora crassa</i> (Fonte: Raquel Breyd).	58
Figura 41: Desenvolvimento de <i>Neurospora crassa</i> em tronco de árvore (http://newscenter.berkeley.edu/2011/01/31/neurospora-genomes-reverse-ecology/).	59
Figura 42: Onchom.....	59
Figura 43. Conjunto de resultados após incubação de 5 dias.	63
Figura 44: Conjunto de resultados após incubação.	64
Figura 45: Presença de <i>N. crassa</i> a 19-06-2013 no cais de expedição (Fonte: Raquel Breyd).....	64
Figura 46: Molde metálico.	66
Figura 47: Pontos térmicos Pão Saloio de Forma.	67
Figura 48: Pontos térmicos “Pão de Mafra”.	67
Figura 49: Centro térmico Pão Saloio.	67
Figura 50: Base do tabuleiro inox.....	69
Figura 51: Tabuleiros em Inox de arrefecimento do “Pão de Mafra” (Fonte: Raquel Breyd).	70
Figura 52: Tabuleiro de arrefecimento com Pão Saloio de Forma (Fonte: Raquel Breyd).	70
Figura 53: Pão contaminado com <i>Neurospora crassa</i> , proveniente de reclamação (Fonte: Raquel Breyd).	71
Figura 54: “Pão de Mafra” com <i>Neurospora crassa</i> 1ªfase (Fonte: Raquel Breyd).	86
Figura 55: “Pão de Mafra” com <i>Neurospora crassa</i> , 2ªfase (Fonte: Raquel Breyd).	86
Figura 56: “Pão de Mafra” com <i>Neurospora crassa</i> , 3ªfase (Fonte: Raquel Breyd).	86
Figura 57: <i>Neurospora</i> . (http://www.fgsc.net/Neurospora).....	89
Figura 58:Micrografia SEM de conídios de <i>Neurospora crassa</i> (www.fgsc.net/614)	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição química dos cereais (Giraldo, 2002).	20
Tabela 2: Características da amilose e amilopectina do Trigo (Giraldo, 2002).	24
Tabela 3: Classificação dos alimentos em função da atividade da água (Dytchfield, 2000).	45
Tabela 4: Relação do potencial redox em função do tipo microrganismo (Johnston, M. & Lin, R. (1987).	48
Tabela 5: Resultados das medições de a_w nos diferentes pães.	65
Tabela 6: Resultados das medições de pH nos diferentes pães.	65
Tabela 7: Histórico de reclamações.	71
Tabela 8: Condições meteorológicas ao tempo das reclamações.	72
Tabela 9: Variação dos teores totais de bolores e leveduras (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente realizadas ao longo do tempo.	74
Tabela 10: Variação do teor total microbiano (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente.	75
Tabela 11: Variação dos teores totais de bolores e leveduras (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente realizadas ao longo do tempo nos pontos adicionais.	76
Tabela 12: Variação do teor total microbiano (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente realizadas ao longo do tempo nos pontos adicionais.	78
Tabela 13: Resultados positivos para <i>Neurospora crassa</i> em meio de CRB.	80
Tabela 14: Resultados positivos para <i>Neurospora crassa</i> em meio de PCA.	81
Tabela 15: Condições meteorológicas à data dos resultados de presença da <i>Neurospora crassa</i>	82
Tabela 16: Deteção de <i>N. crassa</i> em superfícies.	85
Tabela 17: Deteção de <i>N. crassa</i> em produto acabado.	85
Tabela 18: Especificações técnicas do “Pão de Mafra”.	102
Tabela 19: Registo de temperaturas (°C) nas diferentes fazes de confeção dos produtos.	102
Tabela 20: Registo das temperaturas (°C) e humidade relativa (%) da instalação fabril.	103
Tabela 21: Lista de leveduras identificadas nos ensaios microbiológicos.	103

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Variação da Temperatura do “Pão de Mafra” ao longo do tempo de arrefecimento.	68
Gráfico 2: Variação da Temperatura do Pão Redondo ao longo do tempo de arrefecimento.	68
Gráfico 3: Variação da Temperatura do Pão Saloio de Forma ao longo do tempo de arrefecimento.	69
Gráfico 4: Gráfico de Temperatura (°C) em função da data da reclamação.	72
Gráfico 5: Gráfico da Humidade (%) em função da data da reclamação.	73
Gráfico 6: Gráfico da Humidade (%) em função da temperatura (°C).	73
Gráfico 7: Evolução da contaminação micológica ar ambiente ao longo do percurso do Pão na fábrica... 75	
Gráfico 8: Evolução da contaminação microbiana de ar ambiente ao longo do percurso do pão na fábrica.	76
Gráfico 9: Evolução da contaminação microbiana de ar ambiente ao longo do percurso do Pão na fábrica.	77
Gráfico 10: Evolução da contaminação microbiana de ar ambiente do percurso do Pão na fábrica, nos diferentes locais amostrados.	77
Gráfico 11: Evolução da contaminação microbiana ao longo do percurso do Pão na fábrica, nos pontos adicionais.	78
Gráfico 12: Evolução da contaminação microbiana ao longo do percurso do Pão na fábrica.	79
Gráfico 13: Evolução da contaminação micológica e bacteriana ao longo do percurso do Pão na fábrica. 79	
Gráfico 14. Gráfico de Humidade (%) em função da temperatura (°C), nas datas de ocorrência de <i>Neurospora crassa</i>	83
Gráfico 15. Registo de condições médias meteorológicas do mês de Junho 2013 (http://www.meteoprog.com.pt/pt).	83
Gráfico 16. Registo de condições médias meteorológicas do mês de Setembro 2013 (http://www.meteoprog.com.pt/pt).	84

LISTA DE ABREVIATURAS

N. crassa – *Neurospora crassa*

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

ACISM – Associação do Comércio, Indústria e Serviços de Mafra

CMM – Câmara Municipal de Mafra

IGP – Indicação Geográfica Protegida

INPI – Instituto Nacional.

DOP – Denominação de Origem Protegida

ETG – Especialidade Tradicional Garantida

PCA - Plate Count Agar

CRB – *Cooked Rose Bengal chloramphenicol agar*

a_w – Atividade da água

HACCP - *Hazard Analysis Critical Control Points*

1. INTRODUÇÃO

1.1.O Pão

Desde o Paleolítico, há cerca de 30 mil anos, o pão é considerado um alimento fundamental da dieta humana. Nalguns casos o pão transformou-se numa referência simbólica para muitas religiões. O seu nome provém do latim, *panis*, que significa massa branca, alimento comum, elaborado a partir de farinha, proveniente de cereais nomeadamente trigo, centeio, cevada, milho, e arroz, em conjugação com água, levedura biológica, vulgarmente designada por fermento e sal. O fabrico de pão com massa levedada é uma das mais antigas artes de culinária com cerca de oito mil anos, desde o período Neolítico. Os primeiros pães foram elaborados a partir de vários cereais, tais como, aveia, cevada e trigo, os quais eram misturados com água e colocados sobre pedras quentes, onde fermentavam e, posteriormente, eram cozidos. O processo de fermentação foi obtido de forma, ocasional, espontâneo, seguindo-se aperfeiçoamentos sucessivos até aos meados do século XX (Anónimo1, 2009; Murcia, 2011).



Figura 1: Grãos de Cereais e pão em massa.
(diariodigitalcastelobranco.pt)

Segundo a legislação portuguesa, Portaria n° 425/98, o pão é definido como “o produto obtido da amassadura, fermentação e cozedura, em condições adequadas, das farinhas de trigo, centeio, triticale 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, nas condições legalmente fixadas”.

1.1.1. Microrganismos da fermentação

Na Idade Média os mestres padeiros europeus trabalhavam com uma levedura que produzia uma fermentação líquida, geralmente obtida a partir do lúpulo (Cauvain & Young, 2007).

As leveduras são organismos vivos, unicelulares, eucariotas, pertencente ao Reino *Fungi*, que se encontram distribuídas na Natureza e das quais se conhecem descritas, atualmente, cerca de 1000 espécies (Boundy-Mills, 2006).

Entre as muitas espécies, destaca-se *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada e estudada na produção de alimentos, nomeadamente na indústria da panificação, cerveja e vinificação (García Olmedo, 1964).

A sua ação pode traduzir-se na degradação de açúcares simples que resultam na formação de etanol e dióxido de carbono (Cauvain & Young, 2007).

Presentemente mais de 2,5 milhões ton de levedura *S. cerevisiae*, são produzidas e utilizadas na confeção de pão (Toro, 2008).

Outra área de aplicação e não menos importante é a sua utilização no tratamento de efluentes industriais, onde atuam, sobretudo, na velocidade de digestão anaeróbia dos efluentes (Peito, 1998).

Na presença de oxigénio, *S. cerevisiae* metaboliza os hidratos de carbono presentes, tendo como resultado a produção de dióxido de carbono e água. Na ausência de oxigénio o microrganismo opta pela via fermentativa, obtendo como metabolitos finais etanol e dióxido de carbono (Cauvain & Young, 2007).

Estes microrganismos reproduzem-se assexuadamente por gemulação ou cissiparidade. A gemulação consiste no desenvolvimento de um goma ou gémula adjacente à estrutura do organismo, que mais tarde acaba por formar um organismo independente do que lhe deu origem, enquanto a cissiparidade baseia-se num processo em que a célula divide-se em duas, por mitose, e origina duas células geneticamente idênticas (Aleixo, 1996).



Figura 2: Levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
(commons.wikimedia.org)

1.1.2. Importância económica, política e social do Pão

A confeção do pão foi uma das descobertas mais importantes da humanidade, desempenhando um papel extremamente importante no desenvolvimento social, económico e religioso (Lagos, 2009).

Na Antiguidade, os Gregos, constataram que a alimentação era a via mais eficaz de prevenir o aparecimento de doenças. Segundo citação do pensador grego Hipócrates, “faz do teu alimento o teu remédio e do teu remédio o teu alimento”. Os povos desta civilização aprenderam a arte de confeccionar o pão com os Egípcios, promoveram a importância deste alimento na alimentação e foram responsáveis pelo início da “História do pão” (D’Andréa, 2012).

A alimentação do povo Egípcio, era à base de cereais, essencialmente trigo e cevada.



Figura 3: Pistrinum – Padaria pública na antiga Pompéia (D'andrea, 2012).

No ano VII a.C., surgem os primeiros fornos de barro, criados pelos Egípcios (D’Andréa, 2012).

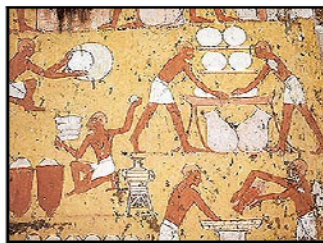


Figura 4: Pinturas do pão no antigo Egípcio (D'andrea, 2012).

Por volta de 250 a.C., os Gregos, iniciaram a divulgação do pão na Europa, de tal forma que foi considerado o principal alimento na Roma antiga (Mazoyer *et al.*, 2009; D'Andréa, 2012).

Inicialmente, os pães, eram confeccionados a nível doméstico, pelas mulheres e mais tarde surgiram as primeiras padarias públicas, por volta 168 a.C. (D'Andréa, 2012).

O pão é um alimento valioso sob o ponto de vista nutricional, uma vez que permite repor os valores energéticos e quantidades significativas de vários macro e micronutrientes. O pão é considerado fonte de hidratos de Carbono, proteínas, fibras, ferro, zinco e vitamina - B1. Desempenha um papel fundamental na dieta humana, como alimento essencial para as necessidades energéticas e nutricionais do ser humano. Desta forma trata-se de um alimento insubstituível da base da pirâmide alimentar. (Mazoyer *et al.*, 2009; Anónimo2, 2011).

Os produtos à base de grãos cereais estão entre os principais alimentos essenciais na alimentação humana (Belitz & Grosch,1986).

Especificamente, o pão é uma das principais fontes da alimentação equilibrada nas dietas mais comuns em todo o mundo nomeadamente na chamada dieta mediterrânea (Elena *et al.*, 2010).

Religiosamente, o pão é considerado alimento sagrado, tendo várias representações, dependente do tipo de religião. No Cristianismo, simboliza, o corpo de Cristo, no sacramento da comunhão, sob a forma de hóstia (Murcia, 2011).

Na religião Judaica, antes das refeições é, habitual, abençoá-lo antes das principais refeições. No Islamismo, também é considerado uma dádiva de Deus, sem qualquer ritual associado (Mazoyer *et al.*, 2009; D'Andréa, 2012).



Figura 5: Simboliza alimento sagrado – Pão.
(http://www.pousadadascores.com.br/culinaria/historia_pao/historia_pao.htm)

1.1.3. O conceito Qualidade

O conceito Qualidade está em constante evolução no que diz respeito aos alimentos, tendo em conta a evolução do conhecimento científico bem como por estar dependente das preferências dos consumidores (Murcia, 2011; Yubero, 2011).

Atualmente o termo “pão” aplica-se a uma variedade de produtos de diferentes formas, tamanhos, texturas, corte, cor, grau de firmeza, sabor, aroma. As características de tamanho dos produtos são diversas e por isso não têm qualquer aplicabilidade no termo Qualidade, exceto para casos particulares (Cauvain & Young, 2007). A determinação da qualidade do pão, está relacionada com atributos de sabor, aroma e a palatabilidade espectável do consumidor, ou seja, um conjunto de características que o consumidor aprecia e valoriza no produto. Por conseguinte, o conceito qualidade torna-se bastante vasto e subjetivo, uma vez que depende de consumidor para consumidor (Sousa, 2006; Cauvain & Young, 2007).

O atributo do conceito Qualidade no “Pão de Mafra”, baseia-se em manter as características da autenticidade específicas do produto, através da utilização dos métodos tradicionais de produção transpostos para uma escala industrial. O “Pão de Mafra” tradicionalmente tem as seguintes características distintivas:

- Pelo menos 100% da Farinhas trigo 65 ou trigo 80, utilizadas, têm de ser produzidas em moagens artesanais através de mós de pedra.*
- Até 10% de farinha de centeio.*
- Aproximadamente 80% de água.*
- Até 2% de Levedura.*
- 1,65% de sal.*
- Cozedura em fornos de alvenaria com aquecimento direto e intervalado.*
- Miolo com alvéolos abundantes e irregulares (grandes e pequenos).
- Crosta espessa, castanha – 3 mm.
- Peso variável (de 80g a 2000g).*
- Forma elítica alongada, de altura média, com uma “cabeça” numa das extremidades.

* Especificações técnicas do produto para a obtenção do registo da Marca coletiva “Pão de Mafra” e IGP.

1.2.A Bioquímica do Pão

Os grãos de cereais são sementes de gramíneas, família de vegetais de grande importância na alimentação mundial. Nestes grãos, são armazenados os grânulos de amido, caracterizados por baixos teores de humidade, fibras, minerais e lípidos, à exceção da Aveia e Milho. O baixo teor de água, permite a conservação dos grãos de cereais, pois com esta condição o desenvolvimento microbiano fica comprometido (Giraldo, 2002).

Tabela 1: Composição química dos cereais (Giraldo, 2002).

Composição Química dos Cereais						
	Trigo	Centeio	Milho	Cevada	Aveia	Arroz
Humidade	13,2	13,7	12,5	11,7	13	13,1
Proteína	11,7	11,6	9,2	10,6	12,6	7,4
Lípidos	2,2	1,7	3,8	2,1	5,7	2,4
Amido	59,2	52,4	62,6	52,2	40,1	70,4
Outros Hidratos Carbono	10,1	16,6	8,4	19,6	22,8	5
Fibra crua	2	2,1	2,15	1,55	1,56	0,67
Minerais	1,5	1,9	1,3	2,25	2,85	1,2

O termo Trigo advém do latim *Triticum* que significa quebrado ou triturado, e em termos de sistemática pertence à família *Poaceae*, subfamília *Pooideae*, e ao género *Triticum* (Scheuer *et al.*, 2011).

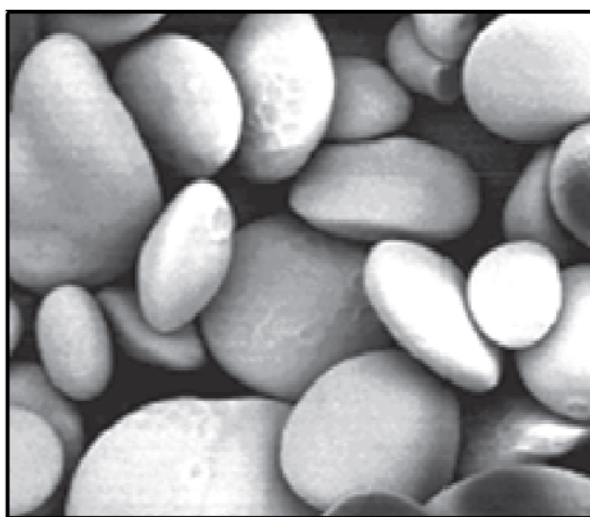


Figura 6 : Micrografias dos grânulos de amido de trigo

(Yonemoto *et al.*, 2007).

A palavra trigo, é utilizada tanto para a planta como para as respectivas sementes. Das partes vegetativas obtém-se, após secagem, “a palha”, um elemento fundamental da dieta dos animais herbívoros domésticos, durante o Inverno; do grão obtém-se, após moenda e tamizagem, as sêneas e a farinha. As sêneas são, também, um suplemento dietético fundamental na alimentação dos animais de produção (Scheuer *et al.*, 2011).

Morfologicamente, o grão de trigo é composto por pericarpo (7,8 a 8,6%), endosperma (87 a 89%) e gérmen (2,8 a 3,5%), em que cada um tem características específicas (Scheuer *et al.*, 2011).

O pericarpo é considerado a casca, a camada, mais externa, que reveste a semente do cereal, rica em pentoses, celulose e cinzas (Scheuer *et al.*, 2011).

No endosperma, a fina camada de células, envolve os grânulos de amido, que por sua vez, compreendem uma matriz proteica, responsável pelas propriedades de cozedura (Scheuer *et al.*, 2011).

O endosperma é a fração responsável pela produção de farinha refinada (Santos, 2005).

O gérmen é rico em enzimas e lípidos. Quando o grão de trigo é submetido a processos de moagem, ocorre a separação entre o endosperma e o gérmen, que resulta numa perda substancial de vitamina B e minerais (Belitz & Grosch, 1986).

A composição química do grão de trigo baseia-se em cerca de 70% de hidratos de Carbono, dos quais cerca de 60% é amido, um teor de humidade de 13%, enquanto o conteúdo proteico situa-se nos 12%, e os restantes 5% correspondem a lípidos, fibras e minerais (Belitz & Grosch, 1986).

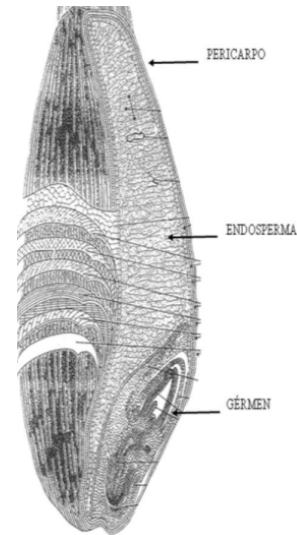


Figura 7: Grão de trigo (Scheuer *et al.*, 2011).

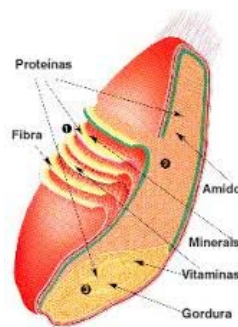


Figura 8: Grão de trigo – composição

(http://www.saudelar.com/edicoes/2010/fevereiro/principal.asp?send=06_nutricao.htm).

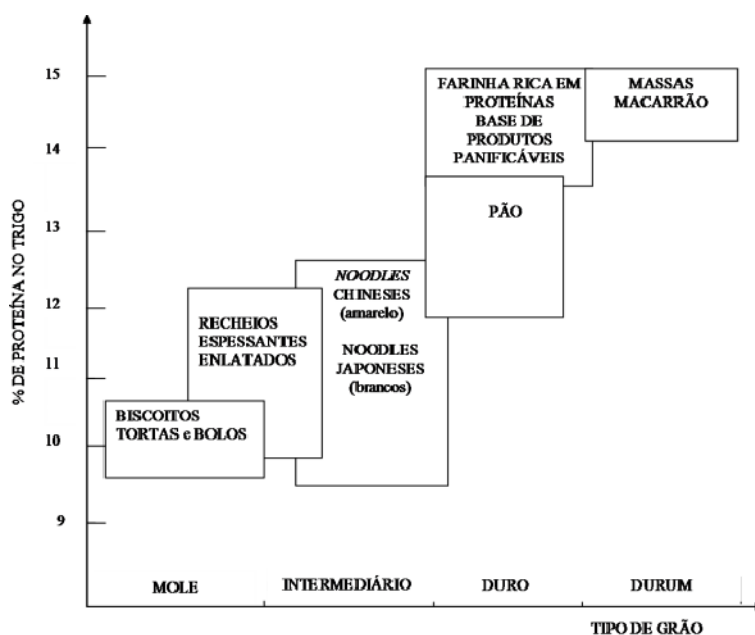


Figura 9: Teor de proteína no grão de trigo em função do tipo de grão (Scheuer *et al.*, 2011).

As propriedades funcionais dos grãos de trigo, distinguem-nos, fundamentalmente, em dois grupos: os trigos “duros” e os trigos “moles”. Os trigos duros crescem em climas mais secos, enquanto os trigos moles crescem em climas mais chuvosos. Ambos apresentam capacidades diferentes para a panificação (Santos, 2005).

O hidrato de carbono mais abundante em qualquer cereal é o amido, possui uma elevada importância em vários sectores industriais, nomeadamente na panificação, devido às suas propriedades físico-química e funcionais exclusivas (Rocha *et al.*, 2008).

O amido é considerado quimicamente como um hidrato de carbono complexo, sintetizado no endosperma das células dos cereais, designadas por amiloplastos e armazenados sob a forma de grânulos. Apresentam forma e tamanho variado conforme a sua origem botânica. Proporciona ao organismo a energia necessária para o seu correto funcionamento, assim como, para a manutenção dos tónus físico e mental (Santos, 2005).

Estruturalmente o amido é constituído por 25% de amilose e 75% de amilopectina. Os seus grânulos são relativamente densos e rígidos, insolúveis em água à temperatura ambiente. Estas moléculas são extremamente organizadas, variam de tamanho entre 2-150µm, e apresentam zonas amorfas e cristalinas (Belitz & Grosch, 1986; Santos, 2005; Solis, 2008).

De acordo com a estrutura do amido, existem 4 tipos de amilose: A, B, C e D. A amilose A é a predominante em Cereais, enquanto as restantes podem-se encontrar em tubérculos e leguminosas (Giraldo, 2002).

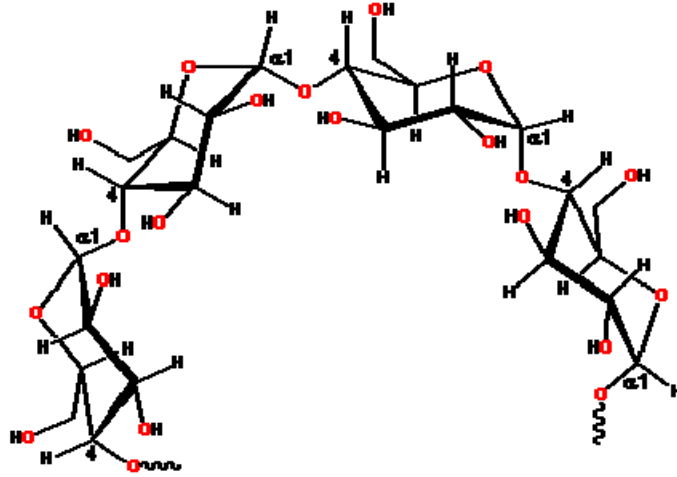


Figura 10: Estrutura química da amilose (Ferreira,2011).

A Amilose, é solúvel em água, constituída por unidades de D-glucose unidas entre si através de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ dando origem, essencialmente, a um polímero de cadeias lineares (Santos, 2005).

A Amilopectina, é insolúvel em água, constituída por cadeias ramificadas de D-glucose com ligações glicosídicas ($\alpha-1,4$) e ($\alpha-1,6$), sendo esta responsável pela estrutura cristalina nos grânulos de amido. Está organizada em duplas hélices paralelas (Giraldo, 2002).



Figura 11: Estrutura química da amilopectina (Ferreira, 2011).

Para uma melhor compreensão da qualidade da farinha obtida dos grãos de trigo, é fundamental conhecer a proporção dos dois constituintes na composição química do amido, e conseqüentemente as suas principais propriedades funcionais: gelatinização, viscosidade, retrogradação e formação de géis (Giraldo, 2002).

Tabela 2: Características da amilose e amilopectina do Trigo (Giraldo, 2002).

Características da amilose e amilopectina do Trigo		
Características	Amilose	Amilopectina
Proporção	18-27%	73-82%
Estrutura molecular	Linear	Ramificada
Ligações	α 1,4	α 1,4 e α 1,6
Massa molecular	104-106	>106
Estabilidade em solução	20-%	0-1%
Propriedades espessantes	Instável	Estável
Retrogradação	Irreversível	Reversível
Formação gel/entrecruzamento	Forte/Rápida	Pouco/Lenta

As características organoléticas dos produtos processados tecnologicamente estão diretamente relacionados com a qualidade das farinhas (García Olmedo, 1964).

A gelatinização do amido consiste em modificações que ocorrem quando este é submetido a temperaturas mais elevadas num meio aquoso. Os grânulos absorvem essa água presente, hidratam, provocando a turgescência irreversível do grânulo, ocorrendo a rotura das pontes de hidrogénio da estrutura cristalina de forma irreversível. Com o aumento da temperatura do meio, a viscosidade aumenta, assim como ocorre a perda da organização estrutural, isto é a perda de birrefringência e cristalinidade dos grânulos de amido. Ocorre a solubilização parcial, formando um produto denominado por gel, constituída por cadeias de amilose e amilopectinas, com propriedades viscoelásticas (Giraldo, 2002; Santos, 2005; Denardin *et al.*, 2009).

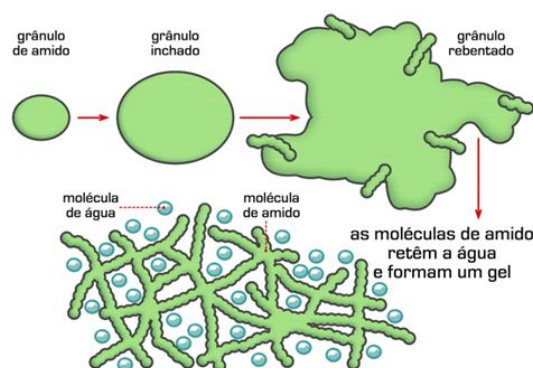


Figura 12: Gelatinização do amido (<http://umaquimicairresistivel.blogspot.pt/2011/06/indigestibilidade-do-amido.html>).

A retrogradação (re-cristalização) baseia-se na cristalização das cadeias de amido gelatinizado, após o abaixamento da temperatura (Scheuer *et al.*, 2011). Trata-se de um fenómeno complexo, influenciado pela temperatura, tempo de armazenamento, pH, fontes de amido e presença de outras componentes e condições de processamento.

A retrogradação influencia a textura, nomeadamente a formação da crosta estaladiça do pão, aceitabilidade e digestibilidade do produto (Santos, 2005; Denardin *et al.*, 2009).

O “envelhecimento” do pão é influenciado pelo processo de retrogradação, em que numa primeira fase ocorre a formação de um gel elástico e pouco estruturado. Com o arrefecimento, o gel fica estruturado com a formação de pontes de hidrogénio (Giraldo, 2002).

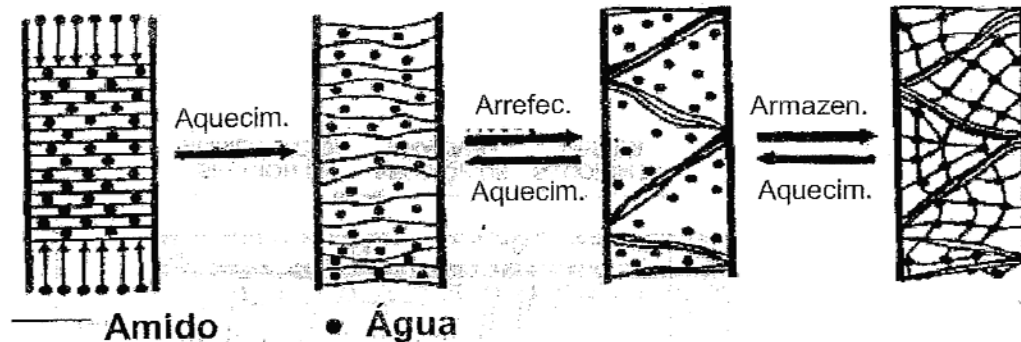


Figura 13: Envelhecimento do Pão (Giraldo, 2002).

As mudanças que ocorrem ao longo da gelatinização e retrogradação, são fatores determinantes nas características reológicas do amido (Giraldo, 2002).

Um outro componente importante dos cereais são as proteínas. Thomas Osborne classificou as proteínas, quanto à sua solubilidade em quatro categorias: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções de álcoois) e glutelina (solúveis em soluções ácidas) (Santos, 2005; Scheuer *et al.*, 2011).

As albuminas e globulinas derivam maioritariamente dos resíduos citoplasmáticos e outros resíduos subcelulares que facilmente são extraídas da farinha devido à sua solubilidade em meio aquoso. As prolaminas e as glutelinas como são insolúveis em água, estas após a hidratação da farinha de trigo, ao serem submetidas a processos mecânicos, neste caso amassadura, formam uma massa viscoelástica e coesiva denominada por glúten (Santos, 2005; Scheuer *et al.*, 2011).

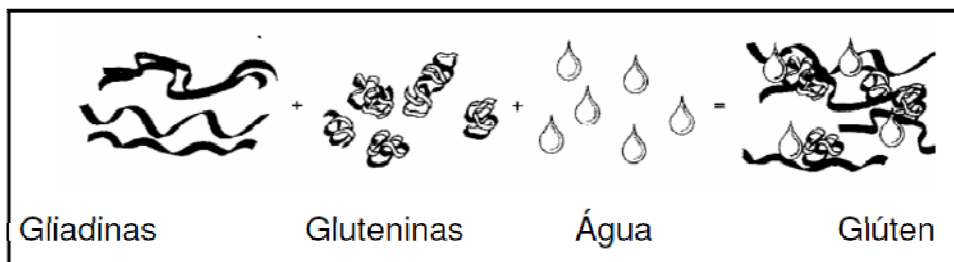


Figura 14: Formação de glúten (www.cienciaviva.pt/projectos/pollen/sessao6pao.pdf).

O glúten é responsável pela plasticidade e estabilidade da massa (Belitz & Grosch, 1986).

Esta característica única, deve-se aos elevados teores de proteínas gliadina e glutenina. Este complexo proteico, que se forma ao longo do processo de amassadura não é considerado um componente obtido diretamente dos grãos de trigo, e é caracterizado por uma cor branca e ao tacto é duro e elástico (Vasquez, 2013).

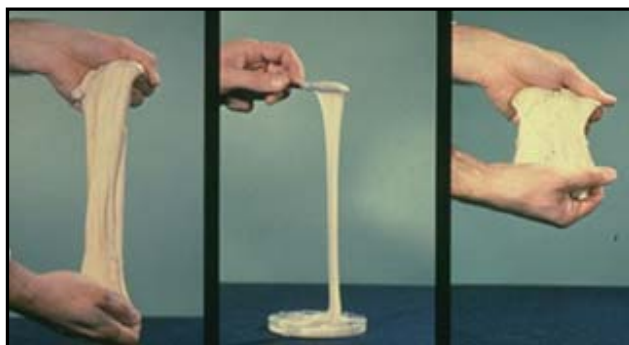


Figura 15 : Glúten.

(jamesbottura.blogspot.com)

A gliadina, é uma proteína simples, responsável pela plasticidade e viscosidade da massa, consequentemente maior resistência relativamente à deformação. Quanto às gluteninas apresentam uma estrutura química ramificada, proporcionando capacidade extensível à massa (Santos, 2005; Scheuer *et al.*, 2011).

Este conjunto de propriedades reológicas e funcionais da farinha de trigo resulta em características únicas, que conferem à massa viscoelasticidade (extensibilidade e elasticidade), resultando numa rede tridimensional, que permite a retenção de gás no decorrer da fermentação. Estas propriedades conferem ao produto acabado uma textura fofa e alveolar. Quimicamente, esta rede estabelece, pontes de hidrogénio, pontes de enxofre e ligações hidrofóbicas (Belitz & Grosch, 1986).

A quantidade destas das duas proteínas no trigo é fator determinante para a qualidade rede macromolecular homogénea formada no processo de panificação (Santos, 2005; Anónimo1, 2009).

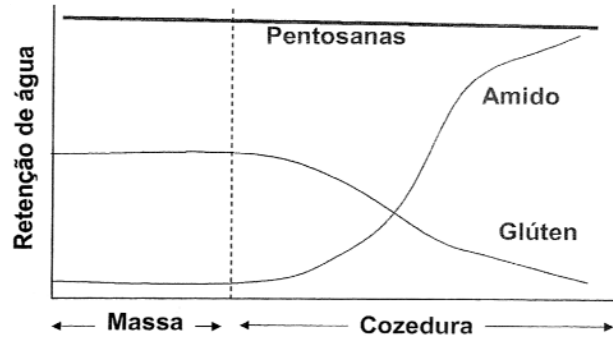


Figura 16: Evolução da retenção de água em função do processo de confeção de Pão (Giraldo, 2002).

Os lípidos também estão presentes no grânulo de amido, nas farinhas de trigo, com um conteúdo de cerca 2,5-% lípidos, dos quais 1% corresponde a lípidos apolares e os restantes a lípidos polares (Cauvain & Young, 2007).

Na figura 17, apresenta-se uma imagem da moagem tradicional do Trigo, obtendo-se uma farinha de T65. Durante a moenda, os grânulos são danificados, através das mós de pedra, permitindo uma maior suscetibilidade ao ataque enzimático e aumentando a capacidade de retenção de água (Giraldo, 2002).



Figura 17: Fotografia da moagem da farinha em mós de pedra (Fonte: Raquel Breyd).

Após a obtenção da farinha é imprescindível o seu armazenamento, uma vez que permite o amadurecimento da mesma, isto é melhora a absorção de água (H_2O) e favorece, significativamente, o comportamento da farinha no processo de amassadura (Belitz & Grosch, 1986).

Para avaliar a qualidade de uma determinada farinha é necessário ter em conta as seguintes determinações químicas: o grau de acidez, teor de glúten, índice de sedimentação, índice de queda e índice de maltose (Giraldo, 2002).

A farinha de centeio, é o segundo cereal mais utilizado na indústria de panificação. É o responsável pela coloração mais escura no produto, comparativamente com o produto obtido exclusivamente de farinha de trigo. Essa diferença deve-se ao facto da sua composição química, ou seja, é constituído por um maior teor de aminoácidos livres e de açúcares. Estes compostos quando expostos ao processo de cozedura desencadeiam reações de Maillard, isto é composto corado (Ribeiro, 2009).



Figura 18: Grãos de Centeio.

Na indústria de panificação o sal adicionado (NaCl) funciona como intensificador de sabor, fortalece o glúten, estabiliza a malha estrutural proteica, permite que a massa retenha maior quantidade de água e pode exercer alguma acção bacteriostática/bactericida, impedindo fermentações indesejáveis (Vasquez, 2013).



Figura 19: Sal.

Para elaboração do pão, atende-se aos seguintes critérios: proporção de massa, toma de água específica e água ligada. As proteínas provenientes das farinhas, encontram-se organizadas quando submetidas ao processo de amassadura (Giraldo, 2002).

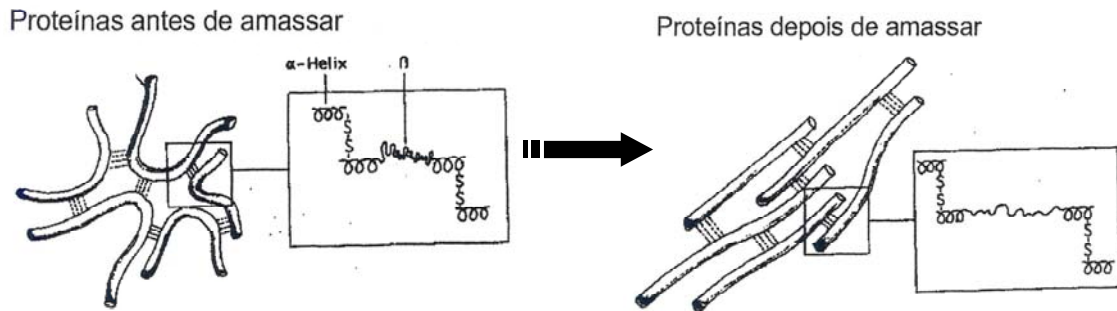


Figura 20: Estrutura da proteína no processo de amassadura (Giraldo, 2002).

Na fabricação de pão a levedura utilizada denomina-se cientificamente por *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante a fermentação, ocorre a formação de dióxido de carbono que conduz à expansão da massa, formando bolhas de ar ao longo da estrutura. Para além deste fenómeno, a levedura interfere com as propriedades reológicas da massa do pão, consequentemente, o pão torna-se mais elástico e poroso (Cauvain & Young, 2007).

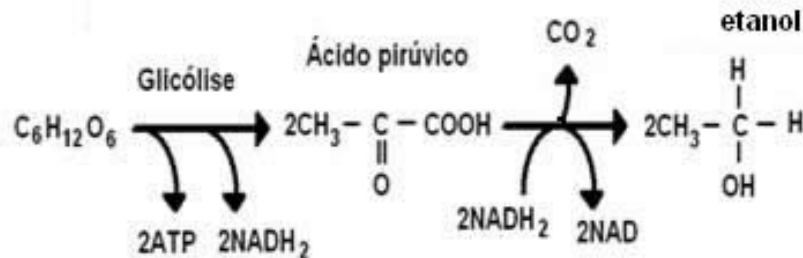


Figura 21: Reação química da fermentação alcoólica (Giraldo, 2002).

A fermentação permite a obtenção de aromas mais profundos e característicos, em que visualmente ocorre o crescimento da massa proporcionando no pão o volume desejado (Elena *et al.*, 2010; Yubero, 2011).

O desenvolvimento de uma estrutura alveolar no produto acabado, está dependente do tipo de fermentação utilizada. Quanto mais prolongado for o tempo de fermentação, maior será a formação e retenção de gás na massa, favorecendo o desenvolvimento de alvéolos de maiores dimensões.

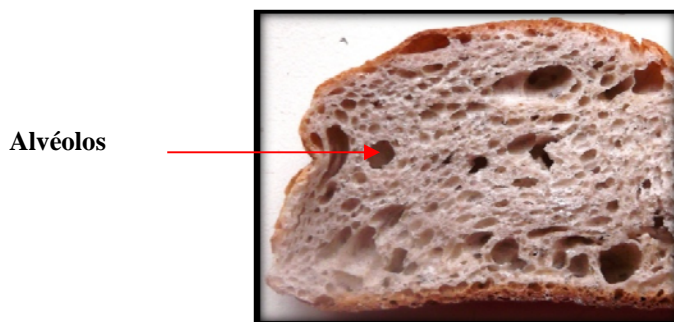


Figura 22: “Pão de Mafra” – estrutura alveolar (Fonte: Raquel Breyd).

O estudo das propriedades reológicas permite um conhecimento mais detalhado da estrutura e das interações entre componentes das massas das farinhas, por conseguinte o comportamento do produto final. Os ensaios reológicos analisam a força, tensão, elasticidade das farinhas (Santos, 2005; Vasquez, 2013).

A revolução industrial proporcionou o desenvolvimento de técnicas e métodos mais sofisticados na confeção do pão, incluindo os métodos de obtenção de farinhas e a aplicação de leveduras artificiais (não espontâneos). Ao longo de décadas esses conhecimentos processuais e meios técnicos foram sendo aperfeiçoados. Paralelamente, houve a modernização de fornos em que os tempos e temperaturas são controlados, obtendo produtos mais homogêneos que contribuíram para a melhor qualidade e diversidade do produto (Yubero, 2011).

As condições de temperatura, humidade e acidez são parâmetros decisivos no controlo da fermentação. Porém é imprescindível a existência de substrato rico em hidratos de carbono e de outros fatores nutritivos como, por exemplo, sais minerais, bem como agentes de fermentação tais como microrganismos da fermentação (García Olmedo, 1964).

1.3. “Pão de Mafra”

No século XXI, o consumidor direciona as suas preferências para pães ricos em fibras e para pães integrais, considerados elementos essenciais numa alimentação equilibrada.

A elevada diversidade dos tipos de pão que atualmente existe no mercado e a conjugação dos elementos essenciais a uma dieta equilibrada, fomentou uma mais-valia aos saberes tradicionais de confeção, uma vez que apresentam melhores características sensoriais e nutricionais (Ribeiro, 2009).

Até à primeira metade do séc. XX, o “Pão de Mafra”, denominava-se por pão saloio, devido ao seu local de confeção: região saloia. Era caracterizado por uma produção à escala doméstica e muito artesanal, essencialmente produzido em ambientes familiares (Ribeiro, 2009).

Em 1960, o “Pão de Mafra”, começa a ter expressão fora do concelho, devido à greve de padeiros de Lisboa, permitindo o seu reconhecimento e a sua expansão comercial. Paralelamente a esta situação, foi homologado o regulamento que permitiu a comercialização do pão proveniente da cozedura em fornos de alvenaria, sem licença sanitária, estimulando o aparecimento das primeiras unidades fabris (Ribeiro, 2009).

Em 1969, ocorreram as cheias em Lisboa, tornando insalubre as águas que abasteciam as padarias da Capital, proporcionando uma maior promoção do pão, produzido fora da cidade.

A partir do momento em que começou a ser vendido noutros concelhos, passou a designar-se por “Pão de Mafra”, identificando a região onde é produzido.

Atualmente, o “Pão de Mafra”, é uma das expressões simbólicas do património cultural e económico do concelho com o mesmo nome. É o principal produto das unidades fabris de Panificação, da região, nomeadamente, de Carvalhal. É de salientar que o produto encontra-se em fase terminal no processo de certificação de Indicação Geográfica Protegida “Pão de Mafra” Câmara Municipal de Mafra (CMM, 2010).

O “Pão de Mafra” é caracterizado por um pão de mistura, resultante da conjugação de dois cereais, especificamente farinha de trigo e de centeio. Esta junção de ingredientes permite a obtenção de um produto com características organoléticas muito peculiares, nomeadamente o paladar a cereais e sabor pouco acidificado. Caracteriza-se, fisicamente, por um pão com elevado volume, de textura robusta, com uma cor intensa

de cereais na estrutura externa do pão. O miolo é caracterizado por alvéolos de grandes dimensões, com uma textura macia, fofa e de baixa densidade.



Figura 23: “Pão de Mafra” (Fonte: Raquel Breyd).

1.3.1. O Processo De Fabrico

Para elaborar, tradicionalmente, o “Pão de Mafra”, é necessário ter conhecimento das complexas interações nas matérias-primas e dos métodos utilizados para o fabrico. O “Pão de Mafra” pode ser comercializado de duas formas: redondo ou comprido. Todavia a forma mais frequente e que permite caracterizá-lo, é a sua apresentação sob a forma de comprido com a formação de uma “cabeça” numa das extremidades do produto.

Relativamente à sua composição e fases do processo de fabrico, o “Pão de Mafra”, possui um conjunto de especificações únicas, conferindo-lhe características físico-químicas e organolépticas exclusivas, conforme fluxograma de processo (Ribeiro, 2009).

A qualidade da farinha é uma das principais condicionantes no que se refere à qualidade da massa e, por conseguinte, a qualidade do produto final (Ribeiro, 2009).

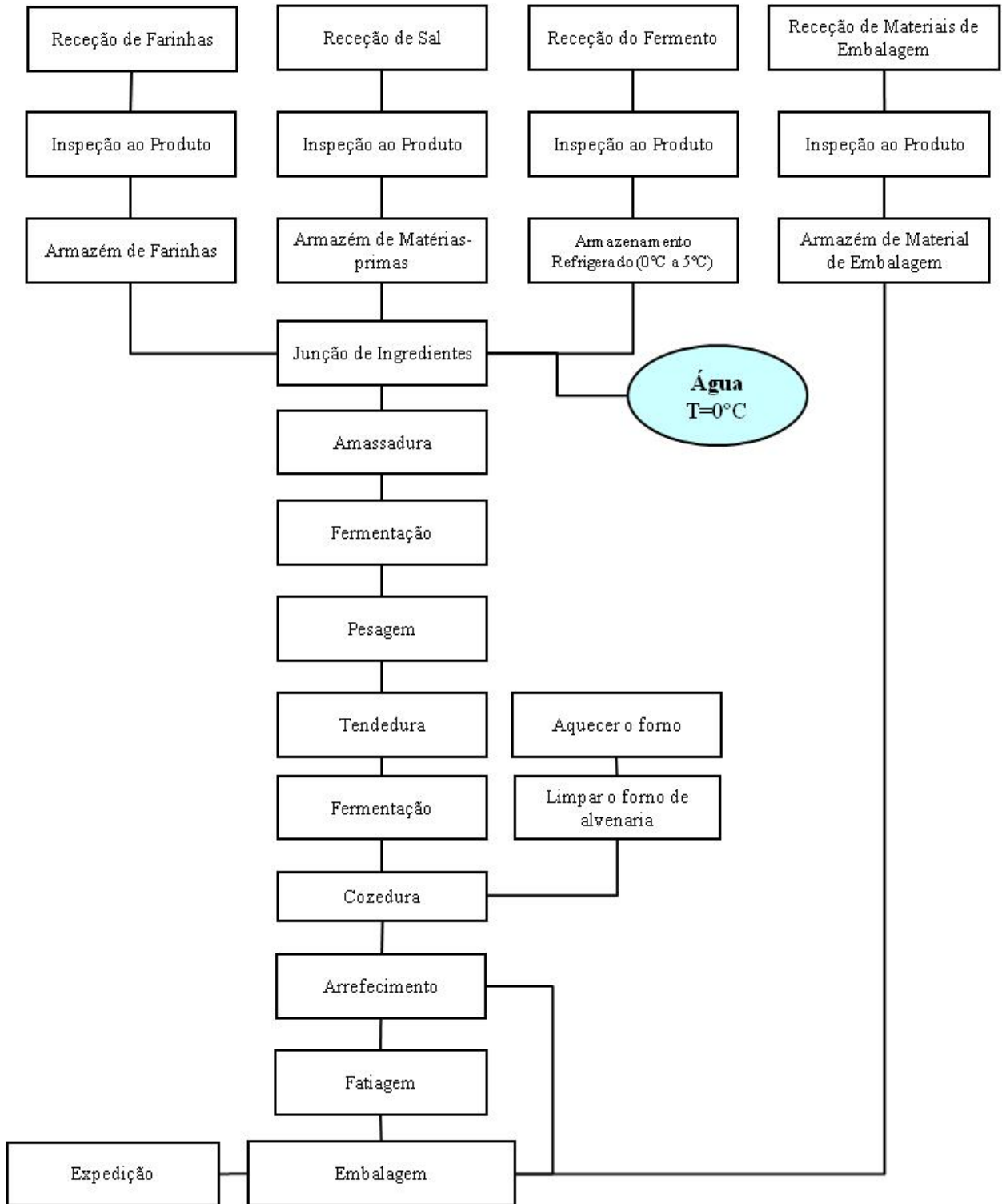


Figura 24: Fluxograma do processo de fabrico do “Pão de Mafra”.

Provavelmente, o método mais tradicional e “natural” neste processo de panificação é a fermentação da massa na sua totalidade proporcionando aspetos singulares no produto.

O “Pão de Mafra” é caracterizado por 3 tipos de fermentação, longa, média e curta. A fermentação longa é de método direto, onde a fermentação ocorre no volume total de massa, enquanto a fermentação média e curta é em método indireto, uma vez que esta ocorre individualmente nas várias peças já tendidas mas ainda em massa (antes da cozedura) (Cauvain e Young, 2007).

Para obtenção da massa é fundamental a conjugação de dois ingredientes: a água e a farinha. No caso das farinhas de trigo, quando expostas à água, durante o processo de amassadura, resultam massas pegajosas de difícil manuseamento. Desta forma, a água é um dos elementos fundamentais na elaboração do pão.

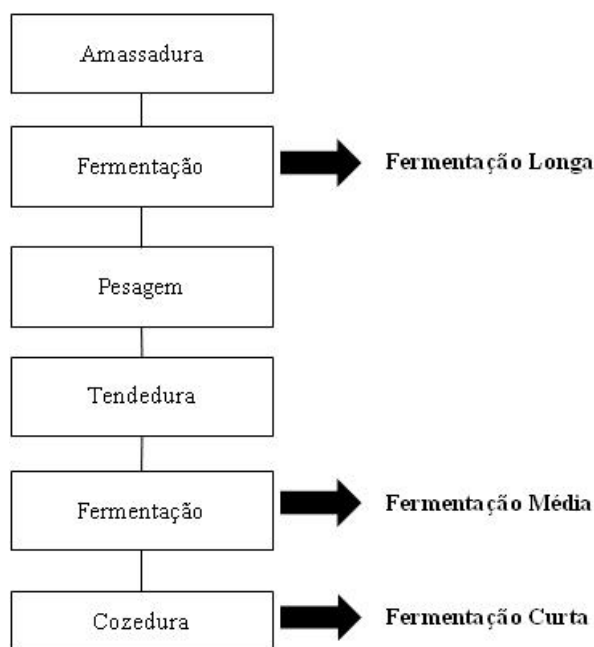


Figura 25: Fluxograma do das etapas da fermentação do “Pão de Mafra”.

Na fase de amassadura, as proteínas provenientes das farinhas dos cereais, serão submetidas aos processos mecânicos e de adição de água, estabelecendo novas ligações químicas.



Figura 26: Esquema representativo da alteração das proteínas no processo amassadura (www.cienciaviva.pt/projectos/pollen/sessao6pao.pdf).

No decurso do processo, ocorre a fermentação alcoólica, realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que consome os açúcares livres provenientes do amido da farinha, produzindo álcool etílico e dióxido de carbono (CO₂). No decorrer da fermentação existem dois momentos cruciais: a produção e retenção de gás, originando um pão de textura porosa, podendo ficar com mais do dobro do seu volume inicial, e, de seguida, o fracionamento da massa em porções no qual a massa é cortada, pesada, tendida e colocada em tabuleiros. De um modo geral, os fatores que influenciam estes dois momentos são: a concentração de açúcares no meio, a quantidade de levedura e cloreto de sódio, o tempo e a temperatura.

No fim da primeira fermentação, a massa deve estar fermentada e com uma expansão bem definida e de volume constante (Cauvain e Young, 2007).

A fermentação é interdependente do tempo e temperatura de tal forma que não é possível definir um tempo e temperatura exatos para o processo de fermentação.

Desta forma o “Pão de Mafra” apresenta as suas especificações técnicas definidas por intervalos para diferentes condições de confecção.



Figura 27: Produto tendido em tabuleiro de PVC (Fonte: Raquel Breyd).

A segunda fermentação ocorre quando a massa fica a repousar em tabuleiros de PVC. Após essa etapa, cada pão começa a ganhar forma: à entrada do forno, cada unidade de massa é colocada na pá e faz-se a imprescindível “cabeça” que está na origem do tradicional “Pão de Mafra”.



Figura 28: Tabuleiros de PVC onde ocorre a 2ª fermentação (Fonte: Raquel Breyd).

A cozedura é a etapa onde o pão é cozido em fornos de alvenaria de tijolo refratário com aquecimento direto.



Figura 29:Forno de alvenaria com aquecimento direto (Fonte: Raquel Breyd).

Os fornos de Alvenaria são limpos antes de cada fornada, aquecidos de forma direta, através de queimadores até uma temperatura de cerca de 350°C.

O objetivo primordial desta etapa é cozer a massa, transformando-a num produto apetecível, comestível e digerível. Contudo, como os fornos de cozedura do “Pão de Mafra” possuem uma particularidade, visto serem fornos de alvenaria de tijolo refratário, proporcionam ao produto melhores características organoléticas.



Figura 30: Lar do forno de alvenaria (Fonte: Raquel Breyd).

Durante a cozedura ocorrem algumas transformações, nomeadamente: o aumento da atividade da levedura, realizando a fermentação curta até à sua desnaturação, produzindo um aumento da quantidade de CO₂ no produto. Com o aumento da temperatura ocorre a sua inativação, com modificação das proteínas do glúten, iniciam-se as reações de Maillard e a formação da capa externa, côdea, no pão (Vasquez, 2013).

As reações químicas e enzimáticas obtidas no processo de fermentação permitem obter um pão volumoso, de miolo alveolar. Porém, estas características acentuam-se no produto “Pão de Mafra” devido, também, à qualidade das farinhas utilizadas (García Olmedo, 1964).

Após a cozedura do pão, dá-se início ao acondicionamento do produto, onde ocorre a primeira triagem de produto não-conforme. De seguida, o pão é colocado na zona de arrefecimento com ar tratado e controlo de temperatura. O arrefecimento tem uma duração de aproximadamente de 4 horas a cerca de 19°C. De seguida é realizada uma inspeção visual a fim de retirar todas as unidades que não obedecem aos padrões de qualidade da empresa (e.g. pão excessivamente cozido ou com forma irregular). Após esta etapa, o produto está pronto para ser embalado.



Figura 31: “Pão de Mafra” (Fonte: Raquel Breyd).

O produto acabado está disponível inteiro, onde será simplesmente embalado de forma automática, ou então, pode-se apresentar fatiado, em que terá de sofrer o corte (fatiagem), sendo de seguida embalado, automática ou manualmente, dependente do tipo de produto.

Relativamente às condições climáticas ou meteorológicas, o concelho de Mafra apresenta um clima temperado, com moderada amplitude térmica anual, com uma temperatura média anual de cerca de 15°C, devido à sua aproximação da faixa costeira Câmara Municipal de Mafra (CMM, 2006).

Quanto aos níveis de humidade relativa o concelho apresenta níveis elevados sobretudo no litoral e na época de Verão (CMM, 2006).



Figura 32: Concelho de Mafra (CMM, 2006).

1.3.2. Processo de Certificação

No seguimento da certificação do produto, desenvolveu-se um caderno de especificações do “Pão de Mafra”, no qual estão elencadas características específicas desde as matérias-primas até ao processo de confeção do produto, conforme anexo 7.1.

Em 1992, a Comunidade Europeia definiu sistemas de proteção e valorização de produtos agrícola ou géneros alimentícios através das seguintes designações, DOP, IGP, ETG. Segundo, o regulamento (CE) N.º. 510/2006, a denominação de Identificação Geográfica Protegida, IGP, é a designação atribuída a um produto em que a sua produção, transformação ou elaboração ocorre numa determinada área geográfica. Essa região geográfica confere ao produto agrícola ou género alimentício determinadas características de qualidade inigualáveis. Para alcançar esta designação, é necessário evidenciar que essa mesma região tem influência sobre as características finais do produto ou género (Anónimo3, 2013).

Esta identificação permite a valorização e reconhecimento de qualidade do “Pão de Mafra”, assim como a sua proteção relativamente a imitações. Em simultâneo, esta denominação, transmite credibilidade ao consumidor (Oliveira, 2010).



Figura 33: Símbolo comunitário de Indicação Geográfica Protegida (IGP) (ACISM, 2011).

A 4 de Maio de 2009, foi criada a Secção de Panificação da Associação de Comércio, Indústria e Serviços de Mafra (ACISM), constituída por um grupo de industriais da panificação local. No dia 21 de Maio, estabeleceu-se um protocolo de cooperação entre o Município de Mafra e a respetiva Associação (ACISM), tendo como líder, a Secção de Panificação Associação Comércio, Indústria e Serviços de Mafra (ACISM, 2009).

Posteriormente foi elaborado o regulamento interno da Secção de Panificação, com o intuito de “definir e disciplinar a comercialização dos produtos aliados à marca coletiva “Pão de Mafra” dando a conhecer os princípios e as normas que obedecem a sua utilização e, ainda, a organização e funcionamento da Secção de Panificação da

ACISM, os critérios de produção/fabrico do referido pão e ainda as condições de utilização do seu logótipo e marca” (ACISM, 2011, p.2).

Atualmente, o registo de marca coletiva “Pão de Mafra”, já foi autorizado, pela entidade oficial, Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), e o processo de atribuição do selo de Identificação Geográfica Protegida (IGP), encontra-se numa fase bastante avançada do processo.



Figura 34: Logotipo da marca coletiva registrada- "Pão de Mafra" (ACISM, 2011).

Presentemente, um dos objetivos fulcrais da unidade fabril em estudo, é a preservação das características originais do produto. Devido a esse facto, a problemática em questão, torna-se mais complexa.

1.4. Conservação do Pão

A conservação do pão durante a sua vida comercial está dependente do desenvolvimento da microbiota saprófita que se instala no pão após a cozedura. Essa microbiota desenvolve-se sob a influência de diversos fatores ecológicos.

Todos os alimentos contêm populações microbianas mistas. A taxa de crescimento de cada organismo depende de vários fatores que condicionaram qual o grupo ou grupos de microrganismos predominantes (Aleixo, 1996).

1.4.1. Fatores Intrínsecos e Extrínsecos

Os fatores intrínsecos e extrínsecos de géneros alimentícios são elementos determinantes no desenvolvimento e crescimento microbiano. Os fatores intrínsecos, como o próprio nome indica, são características inerentes ao próprio alimento, tais como: atividade da água (a_w), temperatura, pH, potencial redox e composição química do mesmo. Enquanto, os fatores extrínsecos, são as características do meio, no qual o pão é mantido, nomeadamente: temperatura atmosférica, humidade relativa do meio e presença de gases.

Há ainda a considerar os fatores tecnológicos que intervêm durante o processamento do alimento. A combinação destes dois conjuntos de fatores desempenha um papel fundamental na multiplicação de todos microrganismos incluindo os patogénicos, dos quais o alimento é o principal veículo de transmissão (Silva, 2002).

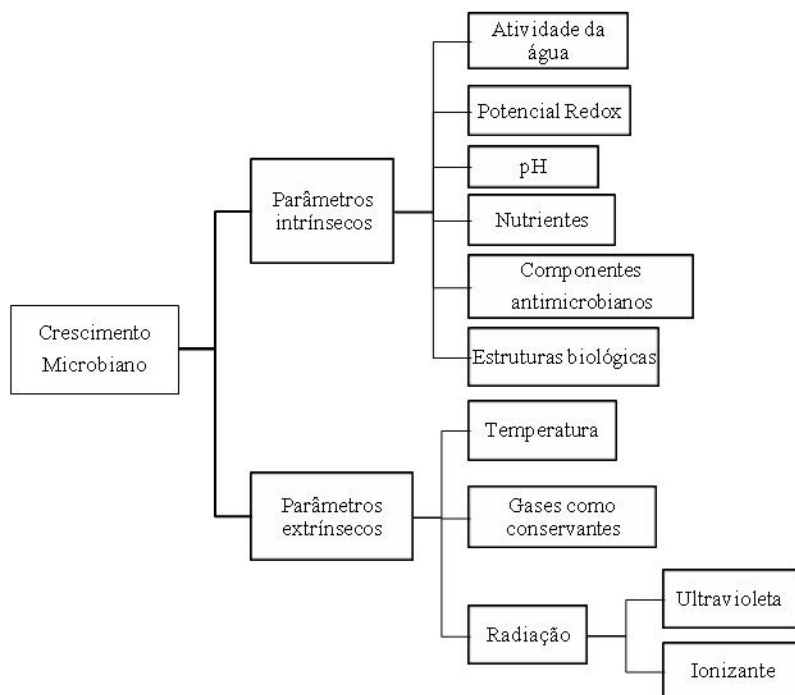


Figura 35: Fatores extrínsecos e intrínsecos do desenvolvimento microbiano (https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRLqb86CpUR-1bpa7G3VK4fMzjDVyvS0ZGIlof_3OJz2P6jw6PeDQ).

Nos alimentos, as condições ótimas de desenvolvimento dos microrganismos, bactérias e fungos, é extremamente variável, contudo os alimentos possuem, de um modo geral, condições propícias ao seu desenvolvimento.

Para um estudo mais exaustivo, há que ter em conta, a qualidade microbiana dos alimentos, isto é, a contaminação inicial e, posteriormente, a sua multiplicação.

A qualidade das matérias-primas e a higiene na unidade fabril (ambiente, manipuladores e superfícies), representam a eventual contaminação inicial. O alimento e as condições ambientais regulam a multiplicação microbiana.

Poderá ainda ter que se ter em conta a possibilidade de ocorrência de contaminações cruzadas.

1.4.1.1. Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros de grande influência sobre o desenvolvimento dos microrganismos. É um fator determinante na germinação, multiplicação, esporulação e sobrevivência dos fungos bem como na sua capacidade de produção de certos metabolitos.

A relação entre a temperatura e a taxa de multiplicação dos microrganismos varia de tal forma que os microrganismos podem ser classificados em:

- **Microrganismos psicrófilos** – organismos que crescem a temperaturas baixas, cuja temperatura de multiplicação varia entre 0°C e 20°C, com uma temperatura ótima de multiplicação entre 10°C e 15°C;
- **Microrganismos psicotróficos** – organismos capazes de se desenvolver a temperaturas próximas de 0°C, crescem em temperaturas moderadas, com temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 35°C. São caracterizados por metabolismo lento e são pouco competitivos quando a temperatura aumenta;
- **Microrganismos mesófilos** – organismos que se multiplicam a temperaturas entre 20°C e 45 °C, com o ótimo de crescimento a 37°C. Encontram-se habitualmente nos alimentos conservados à temperatura ambiente;
- **Microrganismos termófilos** – organismos que se desenvolvem a altas temperaturas, entre 45°C e 80°C, e que têm a temperatura ótima de multiplicação a cerca de 55°C;

Os microrganismos mesófilos correspondem à maior parte dos microrganismos de maior interesse na área alimentar. Os fungos têm intervalos maiores de tolerância de temperaturas favoráveis ao seu crescimento (anfotérmicos). Por sua vez, as leveduras não toleram bem as temperaturas elevadas (Carvalho, 2010).

A maior parte dos Fungos crescem bem entre 15-30°C com uma temperatura ótima de crescimento entre 20°-30°C. Há alguns que são capazes de se manter a temperaturas inferiores a 0°C (*Cladosporium*, *Geotrichum*, *Alternaria*). Estas espécies não crescerão a esta temperatura mas os esporos mantêm-se viáveis. Contrariamente, outras espécies podem crescer a temperaturas relativamente altas (*Aspergillus fumigatus* tolera temperaturas de 50°C, *Humicola lanuginosa* cresce a 60°C). Outros não crescem mas resistem a temperaturas superiores. Os ascósporos de *Neurospora*, em atmosfera seca, são capazes de sobreviver 15-20 minutos a 130°C. Isto explica a sua sobrevivência em certos produtos de panificação, como é no nosso caso o pão.

1.4.1.2. Atividade da água e humidade relativa

O controlo da água presente nos alimentos é considerado umas das técnicas mais antigas na preservação dos alimentos (Dytchfield, 2000).

Neste contexto deve-se ter em conta que nos alimentos a água apresenta-se sob duas formas: água livre e água combinada (Dytchfield, 2000).

O grau de disponibilidade de água num alimento é expresso como a atividade de água (a_w) cujos valores de medição estão compreendidos num intervalo de 0 a 1. A atividade da água, define-se como a quantidade de água disponível no alimento, para o crescimento e desenvolvimento microbiano, desencadeando reacções que podem deteriorar o alimento (Dytchfield, 2000).

Por definição, a molécula de água no estado líquido corresponde ao valor unitário (de 1), conseqüentemente quanto maior for a quantidade de água disponível no alimento, mais próximo estará esse valor de 1. Quanto menor for a atividade de água de um alimento, maior será o tempo de vida do mesmo, conservando-se, portanto, em ótimas condições, por períodos de tempo superiores (Dytchfield, 2000).

A água é utilizada para o crescimento dos microrganismos de 2 maneiras distintas:

- como solvente dos nutrientes, permitindo o seu transporte e disponibilidade no citoplasma;
- como agente químico de reacções de hidrólise necessárias às sínteses microbianas e às reacções energéticas (Aleixo, 1996).

Os fungos são microrganismos mais resistentes a baixos valores da atividade da água, permitindo o seu crescimento em intervalos de actividade da água (a_w), onde não existe competição com outros microrganismos, como por exemplo as bactérias.

A maioria dos microrganismos desenvolvem-se a valores de atividade da água (a_w) compreendidos entre 0,90 e 1. Contudo existem espécies que conseguem multiplicar-se em condições tão baixas como 0,61.

A diferença de comportamento das espécies fúngicas, segundo a disponibilidade em água dos substratos, levou alguns investigadores, a classifica-los de acordo com a atividade da água (a_w) mínima exigida para o seu desenvolvimento. Assim, Jarvis (1976) classificou-os em espécies higrófilas ($a_w > 0,90$), mesoxerotolerantes ($0,80 < a_w < 0,90$) e xerotolerantes ($a_w < 0,80$).

Segundo Johnston e Lin (1987), também os alimentos podem ser classificados em 4 categorias em função da respetiva a_w .

Tabela 3: Classificação dos alimentos em função da atividade da água (Dytchfield, 2000).

Categorias	A_w	pH
1	< 0,85	< 4,5
2	< 0,85	> 4,5
3	> 0,85	< 4,5
4	> 0,85	> 4,5

Dos cerca de 5000 géneros de fungos atualmente reconhecidos só um número muito restrito, cerca de 11, contêm espécies consideradas xerotolerantes ou mesoxerotolerantes, pertencendo a maior parte deles ao grupo dos Ascomycetes. Estes fungos pertencem, dum modo geral, aos géneros *Aspergillus*, *Eurotium*, *Penicillim* e *Wallemia*, caracterizam-se por uma grande capacidade de esporulação e, conseqüentemente, por um grande poder de disseminação. Deste modo se explica a frequência das alterações provocadas por estes microrganismos de média ou fraca exigência em água. (Aleixo, 1996; Peito, 1998)

É imprescindível, conhecer o parâmetro atividade da água nos géneros alimentícios, neste caso, no pão, de forma a tornar possível controlar ou impedir o desenvolvimento e esporulação dos fungos, especificamente, *N. crassa*. Há ainda a considerar a ação dos diferentes fatores no desenvolvimento microbiano já que na realidade estes não atuam isoladamente sobre os alimentos (Dytchfield, 2000).

Considerados até à década de 60 como contaminantes banais dos alimentos, os fungos são, hoje, reconhecidos como capazes de elaborar micotoxinas, altamente tóxicas para o Homem e animais. As investigações realizadas neste domínio permitiram, até hoje reconhecer, cerca de 150 espécies de fungos potencialmente toxinogénicas, muitas delas capazes de se desenvolver a a_w inferiores a 0.90.

Estabelece-se assim uma relação importante entre espécies toxinogénicas e xerotolerantes, o que nos dá uma dimensão diferente do problema de contaminação dos alimentos por fungos. Por outro lado o desenvolvimento dos fungos pode, ele mesmo, influenciar a humidade do meio que os rodeia pela sua atividade respiratória. Considerando a contaminação de grãos de cereais por fungos, ao utilizarem para o seu crescimento a matéria seca do grão (glúcidos, lípidos, etc) libertam dióxido de carbono (CO_2), calor e água e humidificam progressivamente os grãos sobre os quais se

desenvolvem. Deste modo, um fungo xerotolerante pode assim “preparar terreno” para outras espécies mais exigentes em água, que uma iniciado o seu desenvolvimento vão acelerar este fenómeno de reação em cadeia designado por “efeito de massa”. Na maior parte das vezes estes processos microbiológicos são mais ou menos localizados, originando zonas muito alteradas que se vão estendendo progressivamente a todo o cereal armazenado.

A Humidade Relativa é um parâmetro importante quer por interferir no a_w interior do alimento quer por condicionar o desenvolvimento da microflora de superfície (Aleixo, 1996).

Assim, quando se armazena um alimento com baixo valor de atividade de água numa atmosfera com alta Humidade Relativa (H_R) verifica-se uma captação dessa humidade pelo alimento, o que favorece a multiplicação da microflora. Por outro lado, ao armazenar certos produtos alimentares de elevada a_w condições de baixa H_R observa-se uma desidratação superficial do alimento que, embora não prejudique a sua qualidade microbiológica, se pode traduzir em perdas de outra natureza (organolética, textura, económicas) (Aleixo, 1996).

É, pois, delicada, a escolha das características de armazenamento dos alimentos. Há que considerar o conjunto inseparável dos dois parâmetros Temperatura e Humidade Relativa.

De um modo geral, a microbiota desenvolve-se numa faixa de temperatura compreendida entre os 25 os 40°C. Em particular, o fungo *N. crassa*, desenvolve-se a temperaturas e % humidades bastante elevadas (Dytchfield, 2000).

1.4.1.3. pH

Por definição o pH corresponde ao logaritmo do inverso da atividade dos iões de hidrogénio numa solução (concentração hidrogeniónica) (Harris, 1995).

É medido numa escala de 0 a 14, em que pH igual a 7 é considerado o ponto de neutralidade. Valores inferiores são considerados meios de pH ácidos, enquanto valores superiores a 7 são classificados de meios com pH alcalinos.

É de realçar que o pH é um dos fatores, a nível industrial, de melhor facilidade de manipulação de forma a controlar o crescimento microbiano.

Geralmente os fungos desenvolvem-se numa larga gama de valores de pH situada entre: 2 a 11, com o pH ótimo entre 5,5-7,5. De notar que o metabolismo dos

próprios fungos pode alterar muitas vezes o pH do meio em que se encontram, por absorção seletiva e troca de iões produção de CO₂ ou NH₃ ou por produção de ácidos orgânicos. (Carvalho, 2010).

1.4.1.4. Potencial Redox

O potencial redox (Eh) ou potencial de oxidação-redução, consiste na capacidade que certos substratos têm de perder ou ganhar eletrões (Deman, 1999).

A oxidação de um elemento ou composto corresponde à perda de eletrões ou à adição de oxigénio. A redução de um elemento ou composto corresponde ao ganho de eletrões (Aleixo, 1996).

Os microrganismos apresentam graus de sensibilidade ao potencial redox diferentes.

O principal agente oxidante é o oxigénio, conseqüentemente a quantificação do potencial redox, permite classificar os microrganismos em:

- Aeróbios estritos - exigem o O₂ como aceitador final de eletrões na cadeia respiratória, não têm capacidade de utilizar a via fermentativa e possuem catalase para eliminar o H₂O₂.
- - Aeróbios facultativos - podem-se desenvolver na presença ou ausência de O₂. Possuem as enzimas necessárias à via fermentativa e são catalase positiva. Por vezes observa-se que em condições de anaerobiose têm exigências suplementares em fatores de crescimento.
- Anaeróbios, e micro-aerófilos – têm metabolismo fermentativo obrigatório. São catalase negativa e inativados pela presença de O₂, de forma variável, em função da pressão parcial deste gás.

Nos Fungos o metabolismo dominante é aeróbio. No entanto, algumas espécies podem tolerar graus diversos de redução da pressão parcial de O₂, um acréscimo da concentração em CO₂ ou, ainda o mais frequente, uma combinação destas duas variáveis da composição gasosa no seio dos substratos. Estes dois elementos agem pelo seu papel limitante e seletivo (Aleixo, 1996).

Os géneros *Mucor* e *Trichoderma*, por exemplo, têm uma grande exigência em O₂ para o seu desenvolvimento, crescendo, por isso, à superfície dos substratos (Aleixo, 1996).

No caso dos alimentos o potencial de Oxidação-redução é determinado por:

- Potencial de oxidação – redução característico do alimento
- Capacidade de equilíbrio
- Tensão em oxigénio da atmosfera que rodeia o alimento
- Capacidade de penetração da atmosfera no interior do alimento.

Na tabela seguinte apresenta-se a relação do potencial redox em função do tipo de microorganismo em alimentos (Deman, 1999).

Tabela 4: Relação do potencial redox em função do tipo microorganismo (Johnston, M. & Lin, R. (1987).

Tipo microorganismo	Eh	Exemplo
Aeróbios	Eh positivo (+350 a +550mV)	Bolores, leveduras
Anaeróbio	Eh negativo (+30 a -550mV)	<i>Clostridium</i>
Facultativos	Eh (+100 a -350mV)	Enterobactérias
Micro-aerófilos	Eh Baixo	<i>Campylobacter</i>

1.4.1.5. Composição Química

Para o desenvolvimento da população microbiana deve-se ter em conta as necessidades e as capacidades que os microrganismos possuem para utilizar os diferentes substratos que constituem os alimentos (Carvalho, 2010).

As exigências nutricionais diferem de espécie para espécie e, sobre um determinado substrato, só se encontram as espécies cujas exigências nutricionais sejam correspondidas. Dum modo geral os microrganismos necessitam de: água, fontes de energia (pelo menos uma), fontes de azoto (pelo menos uma), sais minerais, e eventualmente O₂ e/ou fatores de crescimento, como vitaminas (Aleixo, 1996).

Geralmente, os microrganismos utilizam como fonte de Carbono, os hidratos de carbono). Os Fungos devido a serem heterotróficos em relação ao carbono necessitam de utilizar compostos carbonados como fontes de Carbono e energia. A glucose é a fonte de carbono, por excelência, mas também a maltose e frutose podem ser utilizadas. De entre, os polissacarídeos, destacam-se o amido, a celulose e a lenhina mas que não são diretamente utilizados por estes. As enzimas possuem um papel fundamental na degradação destes polissacarídeos complexos em moléculas mais simples,

designadamente, em monossacarídeos. Este substrato, já pode ser utilizado pelos microrganismos, visto que já atravessam os poros da membrana celular (Carvalho, 2010).

De modo geral, só os fungos filamentosos e leveduras utilizam as gorduras e óleos designando-se por microrganismos lipolíticos.

A fonte de azoto não é um fator limitativo da multiplicação dos microrganismos, porém quando o alimento possui elevados teores proteicos, os microrganismos proteolíticos provocam nos alimentos alteração de sabor e cheiro (aminas, amoníaco, dióxido de enxofre) (Carvalho, 2010).

As vitaminas, por norma, não se encontram em grandes quantidades nos alimentos, contudo os fungos têm a capacidade de sintetizar as suas necessidades nutricionais em vitaminas (Carvalho, 2010).

Por fim, os sais minerais não são considerados fatores limitativos do crescimento da população microbiana (Carvalho, 2010).

Dum modo geral, os produtos alimentares contêm todos os ingredientes necessários ao desenvolvimento dos microrganismos. No entanto, as diferenças de composição observadas têm um efeito seletivo sobre a flora microbiana.

1.4.1.6. Embalagem

A presença de certos gases no meio envolvente, designadamente: dióxido de carbono e oxigénio, pode provocar toxicidade ao microrganismo, desencadeando consequentemente, mecanismos inibidores dos mesmos, por interferir com o potencial de oxi-redução (Bossolan,2002).



Figura 36: “Pão de Mafra” embalado (Fonte: Raquel Breyd).

Hoje em dia, existem várias tecnologias utilizadas, para a conservação de alimentos através da utilização de gases inibidores do crescimento microbiano. Estes métodos são reforçados com o controlo de temperatura e com a utilização de materiais de embalagem adequados de modo a aumentar a eficácia inibidora do meio (Poças & Moreira, 2003).

Todos estes parâmetros físico-químicos interatuam uns com os outros e adicionalmente há que considerar a possibilidade de inter-actuação entre as várias espécies de microrganismos presentes, em simultâneo, no mesmo substrato. Isto pode conduzir a uma relação de mutualismo ou de antagonismo, desde a simples competição pelo mesmo substrato à produção de substâncias antagonistas ou à transformação do substrato por uma das espécies conduzindo a um meio desfavorável às outras espécies competitivas presentes.

O conhecimento dos parâmetros característicos dos alimentos bem como dos parâmetros ambientais que os estabilizam e das exigências específicas dos microrganismos para o seu desenvolvimento permite prever, com elevado grau de probabilidade, os riscos de degradação / contaminação mais prováveis para cada tipo de produto alimentar.

1.5.Fungos e Alimentos

A Micologia é a ciência que estuda os fungos, microrganismos caracterizados por serem constituídos por células eucarióticas, isto é, células com núcleo definido e delimitado por uma membrana, heterotróficos, não possuem a capacidade de produzirem o seu próprio alimento, osmotróficos, absorvem o alimento em vez de ingeri-lo e têm reprodução sexuada e assexuada (Ferreira, 2005).

Estes microrganismos não possuem pigmentos fotossintéticos, conseqüentemente são considerados organismos saprófitas ou parasitas. Em 1969, classificaram os fungos num único reino, visto que até aí eram considerados vegetais (Coelho, 2010).

Os fungos são microrganismos com elevado interesse científico, visto serem utilizados com frequência como modelos de estudo para a compreensão da evolução e do funcionamento de todos os seres vivos (Ferreira, 2005).

1.5.1. Sistemática e Taxonomia

Os fungos referidos como colonizadores dos géneros alimentícios pertencem todos ao Reino *Eumycota* ou *Fungi* (grupo taxonómico criado por Whittaker em 1969). Contudo, existem alguns fungos plasmóides que não pertencem a este Reino mas ao dos Protistas (*Mixomicotina* - aquáticos) (Bossolan, 2002).

Todas as espécies do reino *Eumycota* são eucariotas, sem estruturas móveis, heterotróficos, efetuando uma digestão externa dos nutrientes que assimilam (diferente das espécies do reino *Animalia*).

Atualmente considera-se que o reino *Eumycota* é composto por 3 filios: *Ascomycota*, *Zygomycota* (hifas contínuas, sem septos) e *Basidiomycota* (onde se incluem os macrofungos - cogumelos). Os fungos imperfeitos ou *Deuteromycota* (aqueles dos quais se conhece apenas a forma anamorfa) na realidade repartem-se pelos filios *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Os fungos que compõem os líquenes, seres que resultam de uma simbiose entre um fungo e uma alga, pertencem ao filo *Ascomycota* (Molinaro *et al.*, 2009).

Os fungos que possuem esporos móveis por possuírem um flagelo (zoósporos) (*Chytridiomycota*) não são atualmente incluídos no Reino *Eumycota*, mas no Reino *Protista* (filio - *Mixomicotina*) (Molinaro *et al.*, 2009).

No caso do fungo alvo de estudo neste trabalho trata-se de um género (*Neurospora*) que pertence à família *Sordariaceae*, da ordem *Sordariales*, da classe *Sordariomycetes* do filo *Ascomycota*.

1.5.2. Necessidades Nutricionais

Nutricionalmente, os fungos são decompositores orgânicos, nutrindo-se a partir de moléculas com complexidade distintas, ou seja, a partir de moléculas básicas, desde sacarídeos simples, ácidos aminados, ácidos gordos, ácidos orgânicos e seus sais a macromoléculas como por exemplo polissacarídeos, proteínas, triglicerídeos, hidrocarbonetos (Ferreira, 2005).

Como o nome indica, os fungos, pertencem ao reino *Fungi*, caracterizados por uma grande diversidade morfológica e fisiológica de macro e microrganismos. Estão organizados em três grupos distintos: cogumelos, leveduras e bolores. (Bossolan, 2002).

A maioria dos fungos vive em todos os ambientes nos quais existe matéria orgânica, nos solos, nos vegetais, sobre os animais e na água. Geralmente os seus esporos são transportados por correntes de ar, promovendo contaminações no meio envolvente (Bossolan, 2002).

Alguns dos fungos podem ser observados macroscopicamente, como é o caso dos cogumelos (*Basidiomycetes*), são organismos multicelulares, sincinciais, que armazenam o glicogénio, proteínas e lípidos e apresentam nutrição heterotrófica por absorção dos nutrientes simples a partir de digestão externa. Podem apresentar elevado valor gastronómico, nutricional e medicinal (Bossolan, 2002).

Como já referido anteriormente, os Fungos são heterotróficos, eucariotas, sem clorofila, cujo sistema vegetativo se designa por talo. Este pode ser unicelular e gemular, nas leveduras, ou filamentosos e delimitado por uma parede celular rígida, nos bolores.

Alimentam-se por absorção dos nutrientes existentes no meio que os rodeia e, simultaneamente, vão-se desenvolvendo no interior do substrato do qual se alimentam. As hifas vão segregando enzimas que hidrolisam o substrato, facilitando a absorção dos nutrientes (Aleixo, 1998).

Os Fungos suscetíveis de ser isolados de produtos alimentares pertencem, essencialmente, aos *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e anamorfose, antigos *Deuteromycetes*.

1.5.3. Micotoxinas

Ao multiplicarem-se sobre as matrizes alimentares, os Fungos provocam alterações na respetiva composição química, degradando glúcidos, prótidos, lípidos e vitaminas. Para além disso provocam modificações nas características organoléticas, nomeadamente, no seu aspeto, cor, cheiro, consistência e sabor. Do ataque aos glúcidos, prótidos e lípidos pode resultar a libertação de ácidos orgânicos, álcoois, polipéptidos, aminas, amoníaco, água, CO₂ vitaminas. Sempre que esse ataque conduz à produção de compostos orgânicos úteis, os fungos que desencadeiam essa cascata metabólica, podem ter interesse industrial e serem utilizados para fins produtivos, como são os casos das fermentações ácidas e alcoólicas ou da produção de fármacos (antibióticos, vitaminas). Acontece porém, que, em determinadas circunstâncias, alguns fungos também dão origem a produtos do metabolismo secundário que são tóxicos – as designadas micotoxinas (Aleixo, 1998). Este é um problema fulcral que reside na libertação destes metabolitos nos alimentos e que podem ser responsáveis por efeitos adversos nos animais ou nos seres humanos (neoplasias, degenerescências parenquimatosas, sensibilizações, imunossupressões, ação citopática) (Aleixo, 1998).

Os fungos toxinogénicos utilizam os produtos alimentares como substrato, produzindo metabolitos (micotoxinas), considerados tóxicos para os humano e animais. Desta forma pode-se assegurar que os fungos são considerados, não apenas, agente de decomposição, mas também entidades com relevância na segurança sanitária dos géneros alimentícios (Peito, 1998).

Numa primeira instância a ação fúngica sobre os alimentos provoca modificações nas características organoléticas, nomeadamente, no seu aspeto, cheiro e sabor. Pode ocorrer uma diminuição do valor nutricional, conseqüentemente alterações na composição de base do alimento, isto é, variação na quantidade de glúcidos, libertação de ácidos gordos, modificação de proteínas e sobretudo síntese de metabolitos secundários tóxicos (Aleixo, 1998).

O problema fulcral reside na libertação destes metabolitos nos alimentos que são responsáveis por provocar efeitos adversos no animal ou no ser humano que se manifestam através problemas alérgicos, micoses, micotoxicoses (Aleixo, 1998).

Atualmente, os exemplos de contaminação são extremamente numerosos, mas estima-se que mais de 200 espécies de bolores têm a capacidade de produzir toxinas em alimentos. (Fassbinder, 2010)

Desde a Idade Média, que se observam algumas epidemias provocadas por intoxicações, tais como o ergotismo, originada pela cravagem do centeio. O fungo responsável por esta intoxicação é *Claviceps purpurea*. A falta de limpeza do cereal para a preparação da farinha, permitia o desenvolvimento do fungo, proporcionando o desenvolvimento e a presença de alcaloides no alimento, provocando no humano sintomas agudos de vômitos, náuseas, diarreias e debilidade, podendo em casos extremos conduzir à morte.

Em 1960, o investigador, C. Moreau, observou, em França, o primeiro caso de intoxicação alimentar, devido a grãos de trigo contaminados com o bolor *Aspergillus clavatus*, originando uma toxina, denominada por Clavacina ou Patulina.

Mais tarde, em 1974, Moreau descreve a correlação entre o aparecimento de sintomas de intoxicação e a abundância de determinadas espécies de bolores.

Nas indústrias alimentares é fundamental a compreensão dos mecanismos que controlam o crescimento ou desenvolvimento dos fungos. Desta forma, a preocupação em controlar a contaminação fúngica é permanente, da qual pode resultar a produção de micotoxinas nos produtos alimentares destinados ao consumo humano e animal.

Atualmente a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação) estima que mais de 25% dos alimentos mundiais, são contaminados por toxinas. Esta situação é o resultado da interação complexa de fatores genéticos dos organismos toxigénicos, da estrutura e composição da matriz, dos fatores ambientais, e das práticas de processamento dos alimentos.

É de salientar que as micotoxinas, são compostos estáveis e que podem permanecer no alimento após a remoção ou destruição do fungo.

As micotoxinas são consideradas metabolitos secundários, de carácter tóxico, produzidos por fungos filamentosos, que representam a fase final das sucessivas reações catalizadas por enzimas, comprometendo severamente os níveis de segurança alimentar. (Aleixo, 2000)

Sempre que justificável, torna-se necessário uma análise microbiana mais rigorosa e sistemática da contagem de fungos, incluindo a identificação das espécies, assim como determinar as possíveis fontes de contaminação para se poderem adoptar técnicas de prevenção.

De modo geral o ar contém aerossóis que podem veicular material biológico (agentes microbianos), que se transmitem por essa via. Entre as principais fontes de contaminação fúngica estão os sistemas de ventilação mecânica. (Abelho, 2012).

1.5.4. Reprodução

Relativamente à forma como se reproduzem, os fungos podem apresentar ciclos assexuados e sexuados. A reprodução assexuada, desencadeia-se a partir da gemulação, fragmentação micelial, produção de conídios (ascósporos, basidiósporos) ou endoesporulação (clamidósporos), enquanto a reprodução sexuada culmina na produção de oósporos, diploides (Bossolan, 2002; Carvalho, 2010).

Cada espécie fúngica tem o seu ciclo de vida específico: umas são predominantemente de ciclo haplóide (anamorfos), outras têm fases do seu ciclo de vida que vão alternando entre as formas diplóides (teleomorfas) e haplóides. Curiosamente existem fungos que na sua fase de vida haplóide assumem a forma leveduriforme (L) e na fase diplóide são miceliares (M). (Bossolan, 2002; Carvalho, 2010).

A colonização dos géneros alimentícios, em regra, ocorre através da deposição de ascósporos, transportados por via aerógena (esporos anemófilos). Contudo sobre algumas matérias-primas alimentares frescas podem ser encontradas todas as formas vegetativas e de reprodução assexuada conhecidas (Bossolan, 2002; Carvalho, 2010).

As formas de reprodução sexuada ($2n$ – teleomorfa), em regra, só ocorrem em condições naturais, embora seja possível, nalguns casos, reproduzi-la *in vitro* (em condições laboratoriais) (Bossolan, 2002; Carvalho, 2010).

1.5.5. *Neurospora crassa*

Neurospora crassa, é um fungo filamentosos, do filum Ascomycota pertencente à família Sordariaceae. É um bolor aeróbio estrito, não patogénico ao homem, animais ou plantas, apesar do seu genoma estar relacionado com o de fungos patogénicos (Radorf, 2004). É um organismo saprófita, de fácil cultivo, cresce em meios sólidos ou líquidos de composição definida, contendo apenas uma fonte de carbono, uma mistura de sais e alguns micronutrientes (Magalhães, 2000; Gonçalves, 2008). Possui pelo menos 28 tipos de hifas tubulares, ramificadas e septadas, resultando na junção das várias hifas numa estrutura esponjosa denominada micélio (Gonçalves, 2008). Apresenta reprodução sexuada e assexuada. As primeiras pesquisas de *N. crassa* foram sempre realizadas na fase vegetativa (Anamorfa - *Crhysonilia*) sendo os esporos produzidos assexuadamente designados por conídios.



Figura 37: *Neurospora crassa*

(<http://newscenter.berkeley.edu/2010/09/09/neurospora/>).

A partir de numerosas investigações Beadle e Tatum verificaram que as células de *Neurospora crassa*, podem ser obtidas a partir de certos elementos essenciais nomeadamente de ar, água, sais inorgânicos, sacarose e vitamina biotina (Moore, 1986).

A reprodução assexuada pode ocorrer sob duas formas:

- Crescimento e fragmentação das hifas (micélio vegetativo)
- Germinação de ascósporos haplóides (micélio reprodutivo)

Por volta da segunda metade do século XX, Dodge (1940) verificou que a fase sexuada de *N. crassa* só era observada quando o microrganismo era exposto a temperaturas elevadas (Moore, 1986).

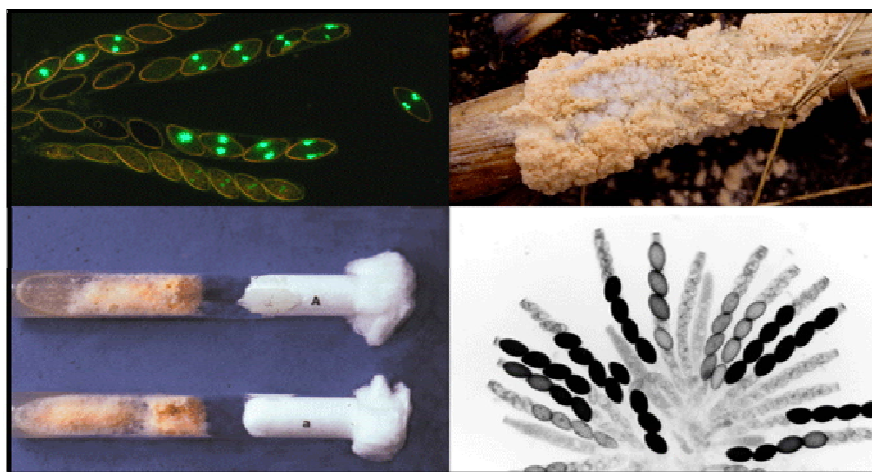


Figura 38 – Várias representações de *N. crassa* Imagem obtida do Perkins Lab
(<http://www.stanford.edu/group/neurospora>).

Tendo em conta essas condições, a matriz pão torna-se altamente suscetível ao desenvolvimento de grandes quantidades de bolor laranja brilhante (Pinto, 2008). Constatou-se também a sua proliferação em substâncias ricas em hidratos de carbono e em resíduos do processamento da cana-de-açúcar (Magalhães, 2004; Pinto, 2008).

O verão de 1843, foi descrito como um verão muito quente e húmido, surgindo os primeiros relatos de *Neurospora crassa*, como contaminante das padarias Francesas, resultando na constituição de uma comissão pelo ministério da Guerra Francês para averiguarem as causas da infestação e as possíveis medidas preventivas (Moore, 1986).

Taxonomicamente, *Neurospora crassa*, classifica-se como um microrganismo celular eucariota, pertencente ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Ordem *Sordariomycetidae*, Classe *Eumycete*, Subclasse *Ascomycete*, Família *Sordariaceae*, Subfamília *Sphaeriales*, género *Neurospora*, espécie *Neurospora crassa* (Magalhães, 2004).

A espécie *Neurospora crassa* foi descrita, pela primeira vez, em 1927, por L. Shear e Bernard Dodge (Pinto, 2008).

Em 1941, pesquisas de Beadle e Tatum, estabeleceram a relação entre o gene e a produção enzimática. Constataram que se houvesse uma mutação genética, impedia o desencadear das reações químicas associadas à produção enzimática, conseqüentemente manifestava-se o fenótipo mutante. Com estes estudos notáveis, em 1958, Beadle e Tatum, ganharam o prémio Nobel da Fisiologia/Medicina (Pinto, 2008).

Nas últimas décadas, *Neurospora crassa* tem sido um dos fungos mais bem estudados nas áreas das Bioquímica, Genética e Fisiologia, uma vez que se trata de um organismo de referência para estudos relacionados com processos celulares como por exemplo: metabolismo, diferenciação, ciclo celular e reprodução. A sua importância deve-se ao facto de se tratar de um microrganismo de fácil manipulação, que permite o conhecimento dos mecanismos de desenvolvimento e funcionamento de outros organismos mais complexos (Magalhães, 2004).

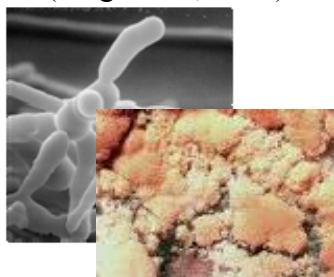


Figura 39: *Neurospora crassa*

(http://www.devbio.biology.gatech.edu/?attachment_id=10168).

O presente trabalho tem como principais objetivos a identificação da origem da contaminação de *Neurospora crassa* em produtos de panificação e definir as possíveis estratégias de controlo de forma a garantir a qualidade e segurança dos produtos finais.

Em determinadas condições este fungo provoca elevados prejuízos à comercialização do “Pão de Mafra” por surgir, inesperadamente, no decurso do circuito de distribuição.

A identificação de *Neurospora crassa*, baseia-se, fundamentalmente, nas características culturais e morfológicas da espécie. Para tal, recorre-se a meios de cultura que favorecem o seu crescimento e desenvolvimento de forma expressiva e conclusiva para o estudo.

O aparecimento deste contaminante em produtos de panificação, compromete severamente a qualidade dos produtos e por conseguinte desencadeia elevadas perdas económicas. Da análise do histórico de reclamações de clientes da indústria em questão constatou-se a sazonalidade do aparecimento da contaminação em causa. Devido a este facto, tornou-se pertinente o estudo mais detalhado e exaustivo para a deteção das possíveis fontes de contaminação e posterior estabelecimento de estratégia de controlo adequado.



Figura 40: *Neurospora crassa* (Fonte: Raquel Breyd).

Pelo menos nos últimos 100 anos, não existem observações nem registos experimentais que estabeleçam uma relação causa/efeito entre a atividade de *Neurospora* e a manifestação de doenças em humanos, animais, ou plantas (Yassin & Wheals, 1992).

Apesar do seu aparecimento ocorrer em locais, de exposição humana, tais como: padarias, fábricas de madeiras, campo queimado à base de cana-de-açúcar, bagaço de

cana, nos filtros de lama das refinarias de açúcares, não existem relatos de *Neurospora sp.*, como agente causador de doença ou infecção em humanos (Perkins & Davis, 2000).



Figura 41: Desenvolvimento de *Neurospora crassa* em tronco de árvore
(<http://newscenter.berkeley.edu/2011/01/31/neurospora-genomes-reverse-ecology/>).

Segundo estudos realizados, Perkins e Davis, demonstraram que as espécies de *Neurospora*, são incapazes de causar doença em animais, uma vez que possuem características inadequadas, isto é, são considerados organismos aeróbios obrigatórios, incapazes de se desenvolver em órgãos ou tecidos. Desta forma pode-se considerar que *Neurospora crassa*, não é considerado praga ou patogénico (Perkins & Davis, 2000).

Em várias sociedades humanas, *Neurospora crassa* é usado com o alimento, ou como ingrediente no processamento de alimentos ou bebidas, como por exemplo: onchom é uma espécie de pasta prensada altamente nutritiva, à base de soja e amendoim, com produção no Oeste de Java, Indonésia; ou de Koji na preparação de alimentos orientais. Tribos indígenas do Brasil utilizam *Neurospora crassa*, na elaboração de bebidas fermentadas (Moore, 1986).

No Bornéu, o povo Iban, recolhe fungos alaranjados, denominados por kulat amau, utilizado como alimento. *Neurospora sp.*, também se encontrou em queijos Roquefort, preparados pelos métodos tradicionais no sul de França.



Figura 42: Onchom

(<http://nutrisiuntukbangsa.org/ulukutek-leunca-si-primadona-dari-sunda/>).

A partir destes testes informais em populações humanas, verifica-se que *Neurospora sp.*, não evidencia toxicidade nem é responsável por consequências desagradáveis resultantes da sua ingestão (Perkins & Davis, 2000).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Partindo de uma análise sobre relatos históricos referentes a reclamações de clientes de uma indústria de panificação constatou-se que existia uma clara sazonalidade do aparecimento de contaminações precoces de “Pão de Mafra” com *Neurospora crassa*. Devido a este facto, tornou-se pertinente efetuar um estudo para a deteção das possíveis fontes de contaminação e posterior estabelecimento de estratégia de controlo ajustada à resolução do problema.

O presente trabalho tem como principais objetivos determinar a origem das contaminações por *Neurospora crassa* em produtos de panificação “Pão de Mafra” e definir as possíveis estratégias de controlo de forma a garantir a qualidade e a vida comercial espectável dos produtos finais.

A identificação de *Neurospora crassa*, baseia-se fundamentalmente nas características culturais e morfológicas da espécie. Para tal, recorreu-se à realização das análises microbiológicas em meios de culturas apropriados para o desenvolvimento e deteção do microrganismo.

2.1. Amostragem

Para a realização deste estudo procedeu-se à caracterização da atividade panificadora da unidade industrial. Numa primeira fase afetou-se a determinação dos parâmetros físico-químicos, sendo colhidas 5 amostras de cada produto para cada tipo ensaio. Para determinação das temperaturas ao longo dos diferentes tempos de exposição fabril, colheu-se 30 amostras de cada produto.

Para a determinação dos ensaios microbiológicos foram colhidas 618 amostras na unidade fabril da Pani-Mafra, que posteriormente, foram enviadas para processamento das respetivas análises para o Laboratório de Microbiologia - Polo do Lumiar, do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV).

Estas determinações foram efetuadas ao longo de 9 meses, nos dois turnos de laboração, em que foram colhidas 5 amostras para determinação

2.1.1. Determinações do pH e de a_w

Os valores de pH relativamente às massas que deram origem ao produto foram registados com recurso ao potenciómetro Testo 206-pH1.

No laboratório realizou-se também a determinação da atividade da água no produto em massa, produto acabado diário e produto acabado com 24 h após-exposição. Para isso utilizou-se um Higrómetro A_w Quick, da Rotronic Instrument Corporation.

2.1.2. Leitura de temperaturas

As temperaturas foram sendo registadas ao longo das diferentes etapas de confeção do produto, isto é, nas massas, produto acabado à saída dos fornos e posteriormente na zona de arrefecimento com diferentes tempos de exposição. Conjuntamente registaram-se os valores médios de temperatura e humidade relativa na instalação fabril ao longo do tempo.

No anexo 7.2 são apresentados os valores obtidos das leituras efetuadas recorrendo ao equipamento termómetro por 2 ponto de infravermelho Testo 830 – T2 com sonda acoplada.

2.1.3. Contagem de bolores e leveduras e de microrganismos mesófilos

Efetuarão-se 618 ensaios microbiológicos, de Maio a Setembro, para pesquisa de *N. crassa* em todas as zonas da unidade fabril, com o intuito de identificar o ponto ou a via de contaminação. Recorreu-se ao método de pesquisa, baseado na determinação do teor micológico em meio de cultura. O método tem como referência a norma Portuguesa NP 3277-1 de 1987, tendo esta como objetivo a determinação do número de colónias de bolores e leveduras a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em géneros alimentícios e alimentos para animais. Geralmente este parâmetro é aplicado como critério da qualidade higiénica dos produtos alimentares.

Usaram-se três matrizes analíticas distintas, especificamente: os produtos acabados (pão); as superfícies das diferentes fases de confeção e o ar ambiente fabril. As amostras foram colhidas ao longo de vários meses do ano. Inicialmente foram propostos controlos mínimos nos meses em que, historicamente, não existe qualquer tipo de informação sobre o desenvolvimento de *N. crassa*.

O processo de colheita de amostras foi realizado de acordo com a NP 1828:1882. O transporte das amostras foi efetuado em arcas de refrigeração, com termoacumuladores, destinadas para o efeito, não tendo a operação de transporte uma duração superior a duas horas (espaço de tempo entre a colheita e a receção das amostras no laboratório).

A colheita de amostras ambientais foi realizada, em pelo menos 8 pontos estratégicos da unidade Fabril. À medida que se foram obtendo os resultados, acrescentaram-se mais quatro pontos de colheita cruciais para o estudo. Em cada ponto foram colocadas duas placas contendo dois meios de cultura diferentes (PCA e CRB). O tempo de exposição teve uma duração mínima de cerca de 15 minutos.

A preparação dos inóculos para as sementeiras microbianas, em meio sólido, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Polo do Lumiar, do INIAV, utilizando como soluto de suspensão soluto de tripton-sal com tween, composto por: tripton, cloreto de sódio e éster oleico de sorbitol. O meio de cultura utilizado foi a gelose de “Chloramphenicol Rose Bengal Agar”, constituído por: peptona de soja, glucose diidrogenofosfato de potássio, sulfato de magnésio, Agar-agar e rosa bengala. O meio de cultura de CRB, foi adicionado uma solução de clorotetraciclina (35 mg/l).



Figura 43. Conjunto de resultados após incubação de 5 dias.

O meio de cultura PCA destina-se à contagem de microrganismos mesófilos e o objetivo da sua utilização, foi reforçar a consistência dos resultados.

Após a receção das placas de controlo de ar ambiente, estas foram acondicionadas em sacos de autoclave e, conforme a NP 3277-1:1987, incubadas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $120\text{h} \pm 2\text{h}$ de acordo com a ISO 4833:2003, incubadas à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $72\text{h} \pm 2\text{h}$, para a contagem de bolores e leveduras e de microrganismos mesófilos, respetivamente.

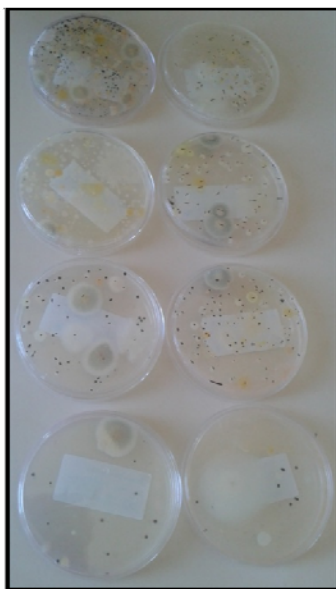


Figura 44: Conjunto de resultados após incubação.

Ao fim desse período de tempo, procedeu-se à contagem do número de colónias presentes nas duas geloses e efetuou-se a contagem de bolores e leveduras, bem como a identificação dos bolores ao género, com recurso a lupa binocular e a microscópio ótico respetivamente. (Microscópio estereoscópico da Wild Heerbrugg e Microscópio Óptico Leitz Dialux 20, Leitz Wetzlar).

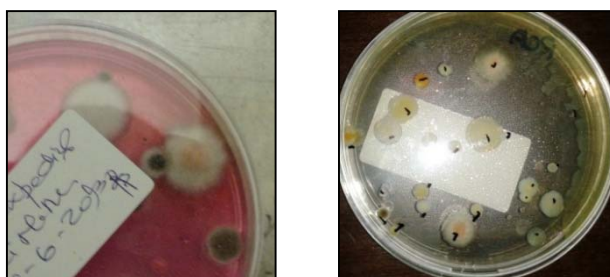


Figura 45: Presença de *N. crassa* a 19-06-2013 no cais de expedição (Fonte: Raquel Breyd).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Tipificação dos Produtos de Panificação da Unidade Fabril da Pani-Mafra

Numa primeira fase do estudo foi realizado um levantamento das principais características dos diferentes tipos de Pães confeccionados na unidade fabril da Pani-Mafra. Este levantamento teve como finalidade caracterizar os produtos e possibilitar o manuseamento de algum parâmetro de forma a controlar o desenvolvimento de *Neurospora crassa*.

Nas tabelas seguintes, apresentam-se as principais características químicas dos vários tipos de pães, nas diferentes fases de confeitura. É de salientar que os diferentes pães, diferem, sobretudo na lista de ingredientes e/ou no tipo de forno de cozedura.

Tabela 5: Resultados das medições de a_w nos diferentes pães.

a_w		
Produto	Côdea	Interior
Pão Saloio de Forma]0,973; 0,985[]1,000; 1,000[
Pão de Mafra Fatiado]0,940; 0,980[]1,000; 1,000[
Pão de Mafra "Velho"]0,932; 0,959[]1,000; 1,000[
Pão Redondo Saloio]0,902; 0,920[]1,000; 1,000[
Massa fresca Pão de Mafra]0,990; 1,000[
Massa fresca Pão Saloio]0,990; 1,000[

Tabela 6: Resultados das medições de pH nos diferentes pães.

Produto	pH
Pão Saloio de Forma	5,45
Pão de Mafra Fatiado	5,55
Pão Redondo Saloio	5,29
Massa fresca Pão de Mafra	5,31
Massa fresca Pão Saloio	5,47

A atividade da água foi determinada tanto para o produto em massa, como para o produto acabado do dia e para o produto acabado com 24h de exposição.

Verificou-se que a atividade da água para o “Pão de Mafra”, em massa, possui valores equivalentes à massa do Pão Saloio (redondo ou forma). Todavia, os resultados demonstram que na superfície de produto – cõeada o Pão Saloio de Forma, enquanto produto acabado apresenta uma atividade da água superior ao “Pão de Mafra” e ao Pão Redondo Saloio. Há que ter em conta que “Pão de Mafra” e a Pão Saloio de Forma são submetidos a cozedura no mesmo tipo de forno. Contudo o Pão Saloio de Forma durante a cozedura apresenta-se acondicionado no interior de um molde/forma natureza metálica (alumínio revestido com película antiaderente), conforme figura 51.



Figura 46: Molde metálico.

Devido a esse facto, durante a cozedura, ocorre uma menor perda da quantidade de água ao longo do processo, enquanto o “Pão de Mafra” possui uma expansão livre ao longo da cozedura. Essa expansão permite uma maior perda do conteúdo de água durante a cozedura, e conseqüentemente, uma menor atividade de água no produto acabado.

A cõeada do Pão Redondo Saloio apresenta uma atividade da água inferior comparativamente aos restantes produtos. A cozedura deste tipo de pão ocorre em metálico com aquecimento a gás.

Relativamente ao pH, observa-se que o “Pão de Mafra” apresenta um valor de pH mais elevado relativamente aos restantes pães. Enquanto o Pão Redondo Saloio apresenta os valores de pH mais baixos.

3.2. Arrefecimento

Foram recolhidos registos de temperatura no interior dos diferentes produtos na etapa de arrefecimento do processo. No “Pão de Mafra” e no Pão Saloio de Forma registou-se a variação da temperatura em diferentes pontos, atendendo à forma geométrica destes produtos, conforme ilustrado nas figuras 44 e 45. Relativamente ao Pão Redondo Saloio, e tendo em conta a sua forma geométrica, registou-se um único ponto de amostragem, o centro térmico do produto.

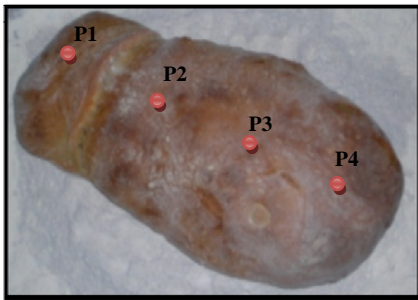


Figura 48: Pontos térmicos “Pão de Mafra”.

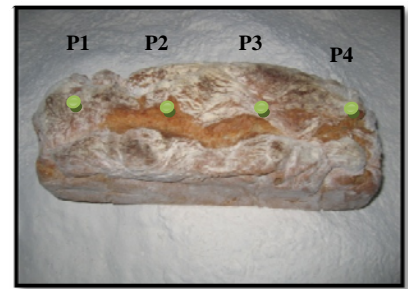


Figura 47: Pontos térmicos Pão Saloio de Forma.

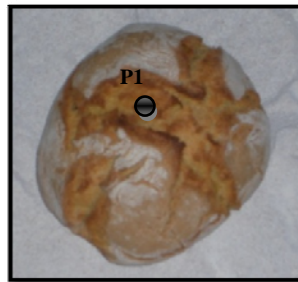


Figura 49: Centro térmico Pão Saloio.

Os registos ocorreram em intervalos de tempo compreendidos entre 0 e as 5 horas de exposição na zona de arrefecimento, onde o ar ambiente é filtrado e climatizado a uma temperatura de cerca de 19°C.

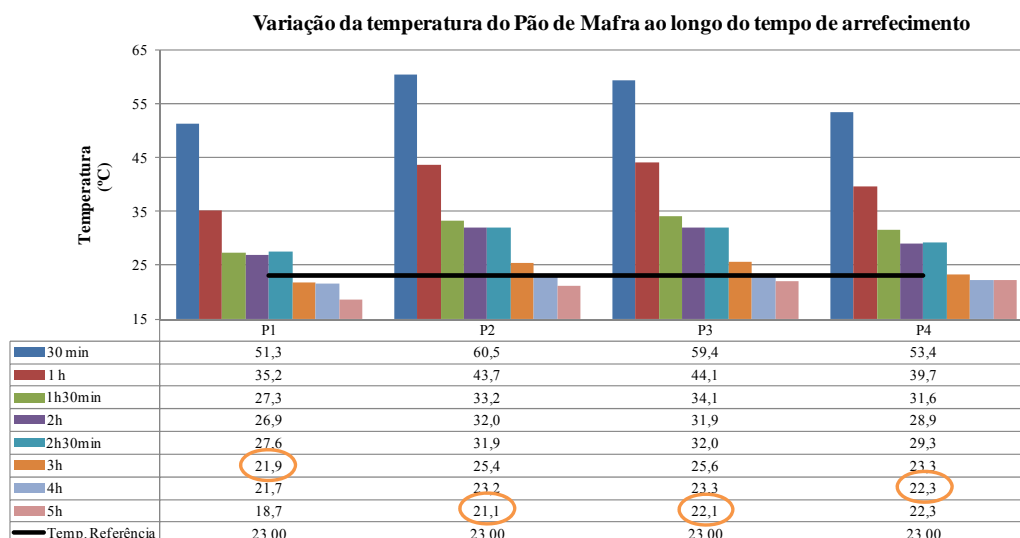


Gráfico 1: Variação da Temperatura do “Pão de Mafra” ao longo do tempo de arrefecimento.

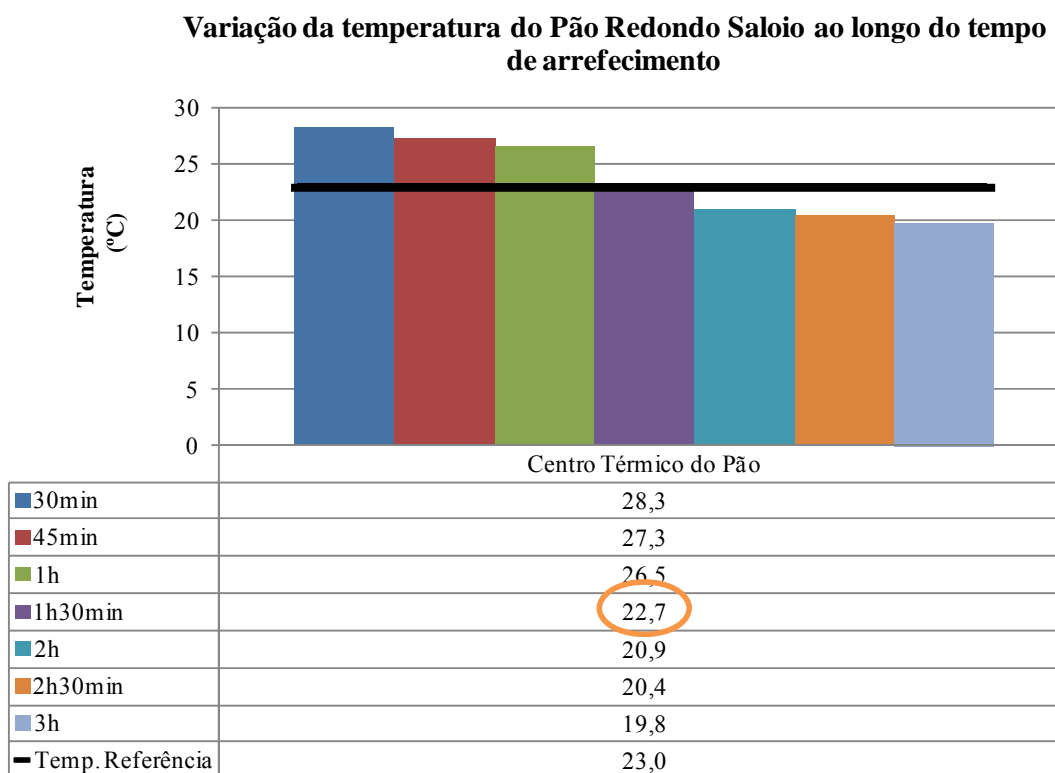


Gráfico 2: Variação da Temperatura do Pão Redondo ao longo do tempo de arrefecimento.

Variação da temperatura do Pão Saloio de Forma ao longo do tempo de arrefecimento

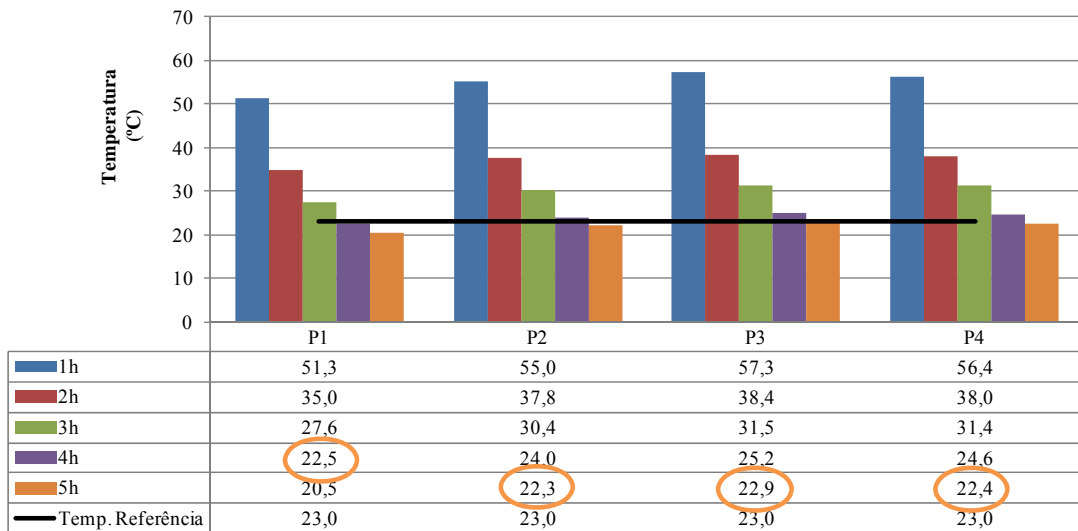


Gráfico 3. Variação da Temperatura do Pão Saloio de Forma ao longo do tempo de arrefecimento.

No estudo do arrefecimento, observou-se que o “Pão de Mafra” necessita de um arrefecimento climatizado a uma temperatura de cerca de 19°C, de pelo menos, cinco horas. Uma das formas de assegurar esse tempo de arrefecimento, é através de duas medidas que foram experimentalmente aplicadas no turno da noite: - a alteração da sequência da ordem de embalagem e/ou através da paragem de laboração da zona de embalagem. Os elementos que estão a laborar, nessa zona de fabrico - embalagem, deslocam-se para a zona de produção, obtendo-se assim um maior tempo de exposição do produto, à temperatura de arrefecimento adequada.

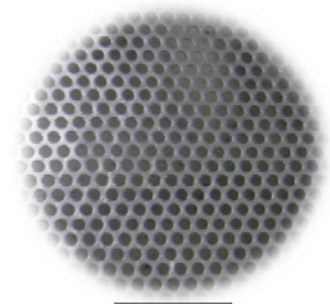


Figura 50: Base do tabuleiro inox.

Há que ter em conta que o acondicionamento do “Pão de Mafra” é feito em tabuleiros em inox macroperfurado com capacidade máxima de 80-90 unidades, de cerca de 500g cada, por tabuleiro, conforme figura 51.



Figura 51: Tabuleiros em Inox de arrefecimento do “Pão de Mafra” (Fonte: Raquel Breyd).

Para o Pão Saloio, verifica-se que o tempo de exposição necessário a um arrefecimento adequado é menor, cerca de 1h30 à temperatura de cerca de 19°C. Este facto deve-se ao tipo de acondicionamento utilizado e à morfologia do produto, forma redonda, acondicionado em caixas de rede empilháveis com capacidade máxima de 12 unidades por caixa, apesar da quantidade de produto ser a mesma do “Pão de Mafra” (500g).

Para o produto Pão Saloio de Forma, verifica-se que o produto tem de estar a temperatura de cerca de 19°C, pelo menos cinco horas. Constatou-se que durante esse arrefecimento, a parte inferior do produto, zona de contacto com a superfície metálica, encontrava-se húmida.



Figura 52: Tabuleiro de arrefecimento com Pão Saloio de Forma (Fonte: Raquel Breyd).

3.3. Histórico de Reclamações sobre o Aparecimento de *Neurospora*

Ao longo de quatro anos, a unidade fabril, tem documentada uma relação sazonal do desenvolvimento do fungo *N. crassa* nos diferentes produtos confeccionados (Tabela 7).



Figura 53: Pão contaminado com *Neurospora crassa*, proveniente de reclamação (Fonte: Raquel Breyd).

É fundamental desenvolver um histórico, onde possa existir uma relação direta entre o binómio de temperatura e humidade, no distrito de Lisboa, propício ao desenvolvimento de *N. Crassa*.

Tabela 7: Histórico de reclamações.

Data	Data de fabrico	Tipo de Pão	Peso	Apresentação	Contaminante
19-06-2009	13-06-2009	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
26-06-2009	22-06-2009	Pão Saloio de Forma	750g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
30-06-2009	18-06-2009	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
27-07-2009	17-07-2009	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
16-12-2009	10-12-2009	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
05-05-2010	01-05-2010	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
09-06-2010	05-06-2010	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
22-06-2010	18-06-2010	Pão Saloio de Forma	750g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
07-07-2010	01-06-2010	Pão Saloio de Forma	750g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
31-07-2010	19-07-2010	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
06-08-2010	04-08-2010	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
27-09-2010	25-09-2010	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
27-06-2011	25-06-2011	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
11-07-2011	20-06-2011	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
11-07-2011	02-07-2011	Pão de Mafra	2Kg	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
11-07-2011	02-07-2011	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
11-07-2011	04-07-2011	Pão Saloio de Forma	750g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
13-07-2011	07-07-2011	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
20-07-2011	15-07-2011	Pão Saloio de Forma	750g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
13-07-2011	07-08-2011	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
06-09-2011	15-08-2011	Pão Saloio de Forma	750g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
20-08-2011	17-08-2011	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
11-10-2011	09-10-2011	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
08-02-2012	22-01-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
26-05-2012	20-05-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
03-07-2012	18-06-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
03-07-2012	20-06-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
31-07-2012	27-07-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
08-08-2012	30-07-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
18-10-2012	17-10-2012	Pão de Mafra	2 kg	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
30-08-2012	20-08-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
24-10-2012	16-10-2012	Pão de Mafra	2 kg	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>
27-12-2012	22-12-2012	Pão de Mafra	500g	Fatiado	<i>Neurospora Sp</i>

Tabela 8: Condições meteorológicas ao tempo das reclamações.

Condições meteorológicas						
Data de fabrico	Temperatura Média	Temp Máx (°C)	Temp Min (°C)	Hr Média (%)	Hr Máx(%)	Hr Min (%)
13-06-2009	25,0	32,0	20,0	47,6	60,0	33,0
22-06-2009	21,5	26,0	18,0	67,1	88,0	88,0
18-06-2009	28,2	36,0	23,0	40,2	51,0	30,0
17-07-2009	20,3	24,0	17,0	58,8	77,0	77,0
10-12-2009	12,7	17,0	11,0	84,1	94,0	68,0
01-05-2010	17,6	21,0	15,0	74,5	94,0	56,0
05-06-2010	19,8	23,0	16,0	66,7	88,0	50,0
18-06-2010	18,0	21,0	16,0	70,1	82,0	53,0
01-06-2010	21,0	22,0	22,0	57,2	78,0	36,0
19-07-2010	20,1	27,0	18,0	78,9	88,0	54,0
04-08-2010	23,0	24,0	25,0	61,0	53,0	50,0
25-09-2010	18,0	18,0	18,0	77,0	77,0	77,0
25-06-2011	28,4	35,0	22,0	41,1	64,0	30,0
20-06-2011	22,9	29,0	18,0	66,2	88,0	48,0
02-07-2011	22,0	26,0	18,0	60,9	78,0	47,0
02-07-2011	26,0	18,0	0,0	78,0	47,0	0,0
04-07-2011	20,9	25,0	17,0	64,2	82,0	47,0
07-07-2011	19,2	23,0	16,0	61,7	82,0	43,0
15-07-2011	21,7	29,0	17,0	67,0	88,0	45,0
07-08-2011	21,7	28,0	17,0	66,0	88,0	37,0
15-08-2011	24,0	30,0	19,0	76,7	94,0	51,0
17-08-2011	21,2	29,0	19,0	65,8	83,0	37,0
09-10-2011	21,7	28,0	17,0	37,2	56,0	20,0
22-01-2012	11,6	17,0	7,0	76,5	93,0	52,0
20-05-2012	13,1	16,0	11,0	76,5	82,0	52,0
18-06-2012	18,1	22,0	15,0	67,7	88,0	46,0
20-06-2012	17,3	21,0	13,0	75,9	100,0	49,0
27-07-2012	22,0	26,0	17,0	70,0	88,0	47,0
30-07-2012	22,0	27,0	16,0	68,0	88,0	42,0
17-10-2012	21,9	27,0	18,0	71,5	94,0	51,0
20-08-2012	21,0	22,0	20,0	83,0	88,0	78,0
16-10-2012	20,6	26,0	16,0	63,1	88,0	36,0
22-12-2012	14,0	16,0	11,0	94,0	100,0	82,0

Gráfico de temperatura (°C) em função da data da reclamação

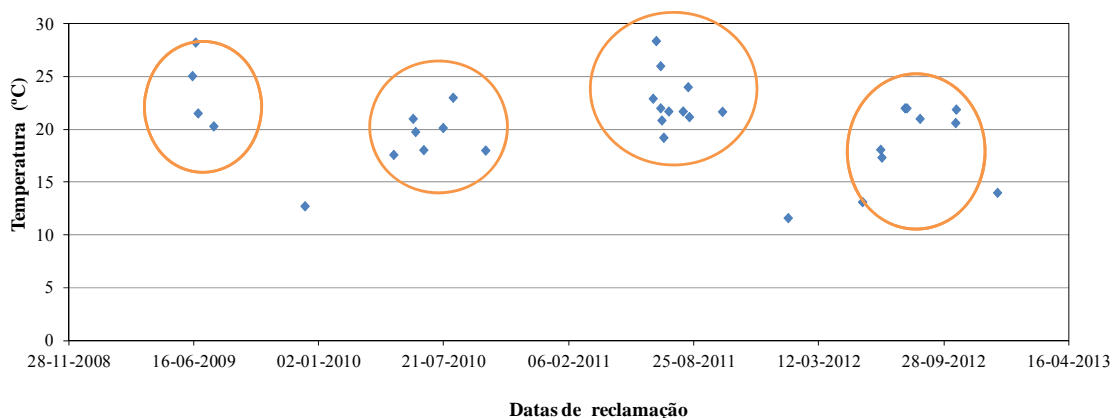


Gráfico 4: Gráfico de Temperatura (°C) em função da data da reclamação.

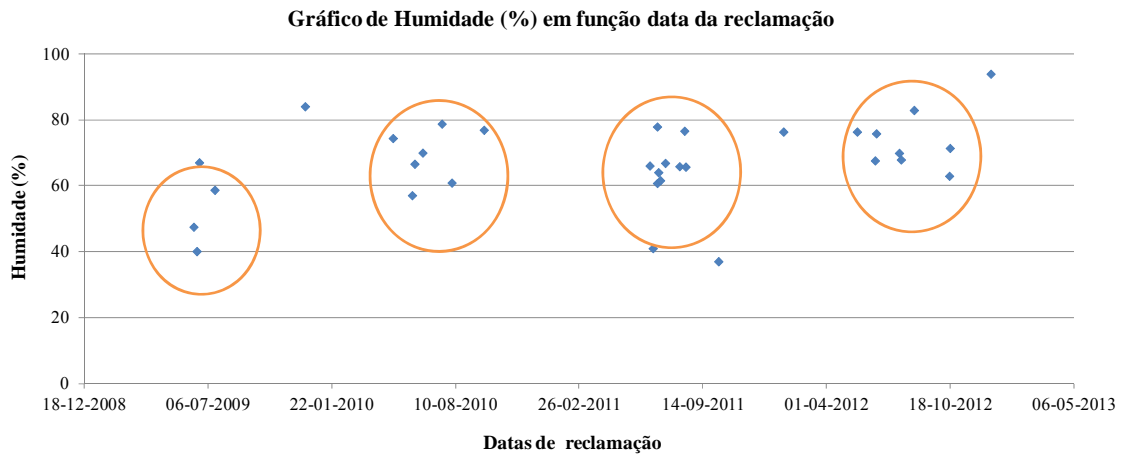


Gráfico 5: Gráfico da Humidade (%) em função da data da reclamação.

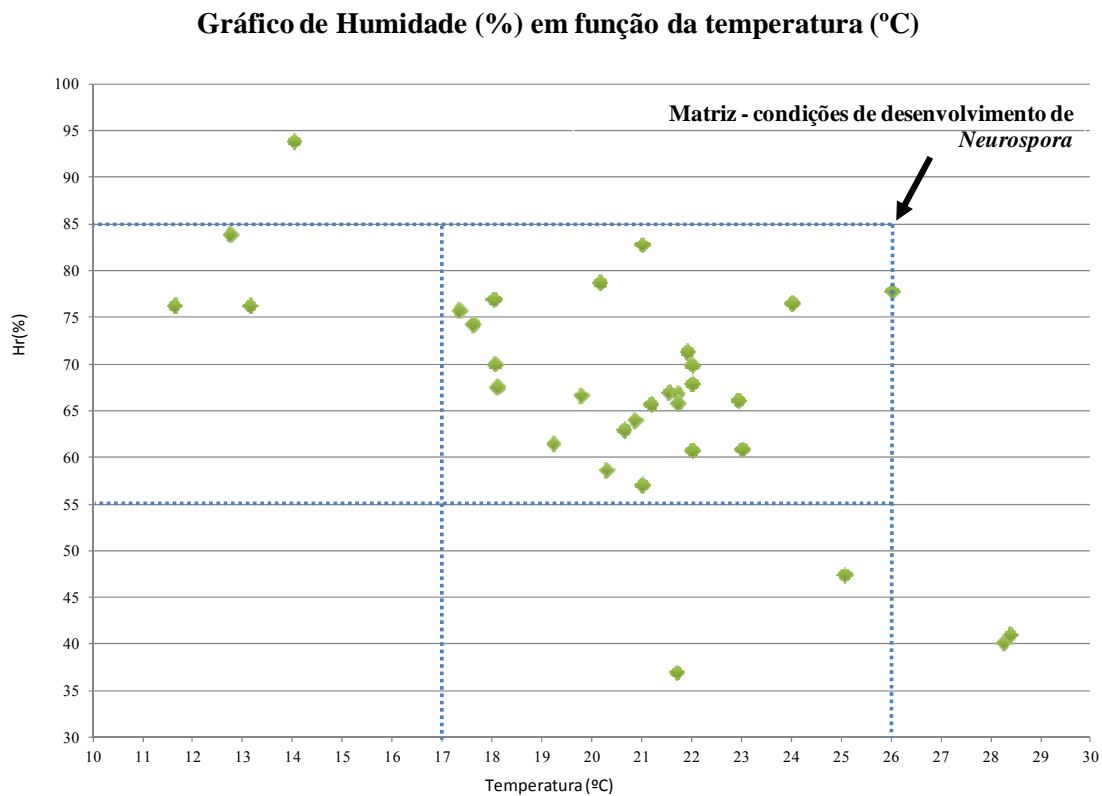


Gráfico 6: Gráfico da Humidade (%) em função da temperatura (°C).

Após análise do histórico das reclamações e tendo em conta as condições meteorológicas observadas foi possível estabelecer valores indicativos para o binómio temperatura/humidade relacionados com o aparecimento do fungo contaminante *Neurospora crassa*. Os registos evidenciaram valores de humidade relativa acima de 55% e inferiores a 85%, para valores de temperatura entre 17°C e 26°C.

Não é possível determinar exatamente os meses e os dias onde ocorre o seu desenvolvimento, porém pode afirmar-se que este ocorre, quase exclusivamente, durante os meses mais quentes do ano (Abril a Setembro).

A partir da conjugação destes valores de Humidade relativa (%) e Temperatura (°C), obtém-se a matriz do binómio Humidade Relativa/Temperatura do desenvolvimento de *Neurospora crassa*, como se pode observar no gráfico 6.

3.4. Análise Microbiológica (Contagem de Bolores e Leveduras e Contagem de Microrganismos a 30°C)

Na Tabela 9, apresentam-se os resultados do teor micológico registados nos diferentes pontos da linha de produção de pão. Os teores totais de bolores e leveduras revelaram alguma uniformidade (1 a 2,1 log₁₀/placa) no período em análise, entre Maio e Setembro.

Tabela 9: Variação dos teores totais de bolores e leveduras (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente realizadas ao longo do tempo.

Teores totais de bolores e leveduras em ufc																					
Data/Local	30 Mai	07-Jun	13-Jun	14-Jun	19-Jun	21-Jun	25-Jun	03-Jul	04-Jul	05-Jul	10-Jul	23-Jul	25-Jul	29-Jul	01-Ago	05-Ago	08-Ago	13-Set	17-Set	19-Set	30-Set
Amassadeira	49	32	55	41	2	37	31	42	70	29	18	33	Inv N	40	18	44	57	Inc	14	19	32
Mesa de tender	31	50	35	21	18	24	21	29	112	28	25	N	65	14	13	54	72	N	4	13	22
Zona de fornos	32	32	12	10	59	16	24	8	6	25	18	24	55	18	12	19	25	26	0	5	2
Zona de fornos Janela	39	40	4		27	Inv	12	24	22	17	5	25	7	15	5	9	31	37	13	11	4
Embalamento grelha	15	49	0	1	19	9	Inv	7	2	15	N	N	N	6	8	2	5	15	Inv	29	1
Embalamento Máquina	51	9	0		15	4	17	12	0	13	N	3	5	8	3	5	7	5	15	0	0
Cais de expedição	16	Inc	6	9	N	15	31	22	26	21	N	N	N	31	34	3	40	27	8		14
Plataforma elevatória	29	41	2	5	8	14	16	13	8	N	31	N	7	26	7	2	15	20	11	1	7

■ - Não foi realizada a recolha.

Inc – Incontável

N – *Neurospora*

Inv - Invasão

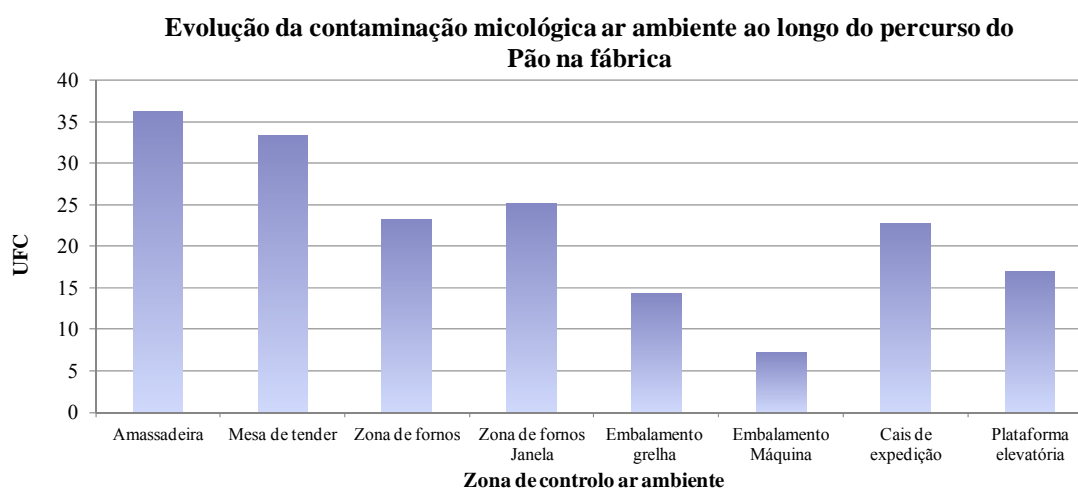


Gráfico 7: Evolução da contaminação micológica ar ambiente ao longo do percurso do Pão na fábrica.

Tabela 10: Variação do teor total microbiano (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente.

Teor total microbiano em ufc																					
Data/Local	30-Mai	07-Jun	13-Jun	14-Jun	19-Jun	21-Jun	25-Jun	03-Jul	04-Jul	05-Jul	10-Jul	23-Jul	25-Jul	29-Jul	01-Ago	05-Ago	08-Ago	13-Set	17-Set	19-Set	30-Set
Amassadeira	62	Inc	Inv	Inv	Inc	114	56	57	N	57	55		N	65	109	Inc	Inc	Inc	Inc	54	38
Mesa de tender	83	76	Inv	100	Inc	Inc	27	86	Inv	98	Inv	6	Inc	Inc	90	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	59
Zona de fornos	87	104	35	23	50	98	22	21	Inv	21	18	N	72	38	183	Inc	105	132	2	67	52
Zona de fornos Janela	23	58	3		16	36	26	18	16	14	N	21	Inc	31	26	16	19	73	3	12	11
Embalamento grelha	8	22	3	0	7	4	12	10	3	5	N	Inc	47	4	8	33	43	9	3	4	57
Embalamento Máquina	7	15	4		17	3	15	8	2	8	3	2	93	N	8	79	133	0	5		
Cais de expedição	22	Inc	0	24	31	45	32	75	Inv	76	N	N	37	60	6	25	40	27	4	11	16
Plataforma elevatória	8	86		15	23	13	11	56	4	81	N	N	22	58	2	34	54	25	5	17	37

■ - Não foi realizada a recolha.
Inc – Incontável
N – *Neurospora*
Inv - Invasão

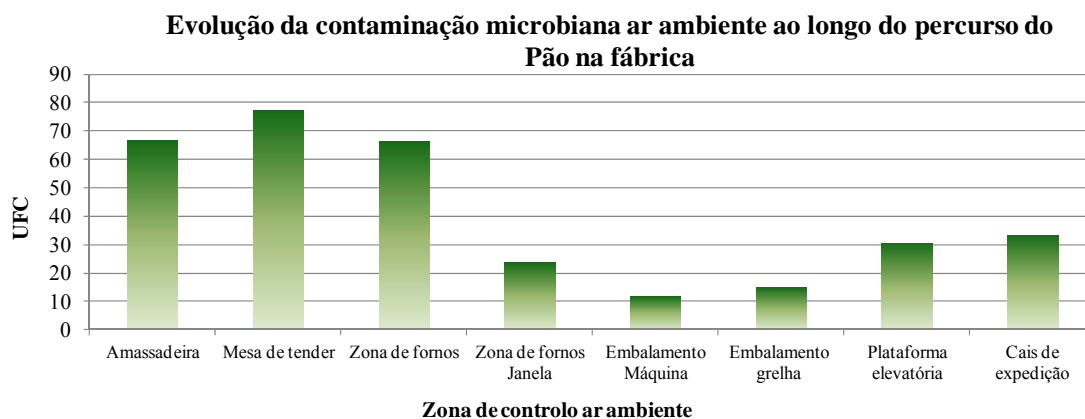


Gráfico 8: Evolução da contaminação microbiana de ar ambiente ao longo do percurso do pão na fábrica.

Tabela 11: Variação dos teores totais de bolores e leveduras (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente realizadas ao longo do tempo nos pontos adicionais.

Teores totais de bolores e leveduras em ufc																
Data/Local	21-Jun	25-Jun	03-Jul	04-Jul	05-Jul	10-Jul	23-Jul	25-Jul	29-Jul	01-Ago	05-Ago	08-Ago	13-Set	17-Set	19-Set	30-Set
Emergência			Inc			10	19		36		12		Inc	N		
Grelha de lavagem	31	43	16			12	N		21	22	3	23	18			12
Janela		59	91			N	42		27	12	16	38	49	13	29	27
Carro Pão velho "TP"						N	N		24	4	20	38		10	4	3
Carro Pão velho "CF"			6			N	N		24	6	11	31		16		
Armazém Farinha									2				2	15	2	2

■ - Não foi realizada a recolha.

Inc - Incontável

N - *Neurospora*

Inv - Invasão

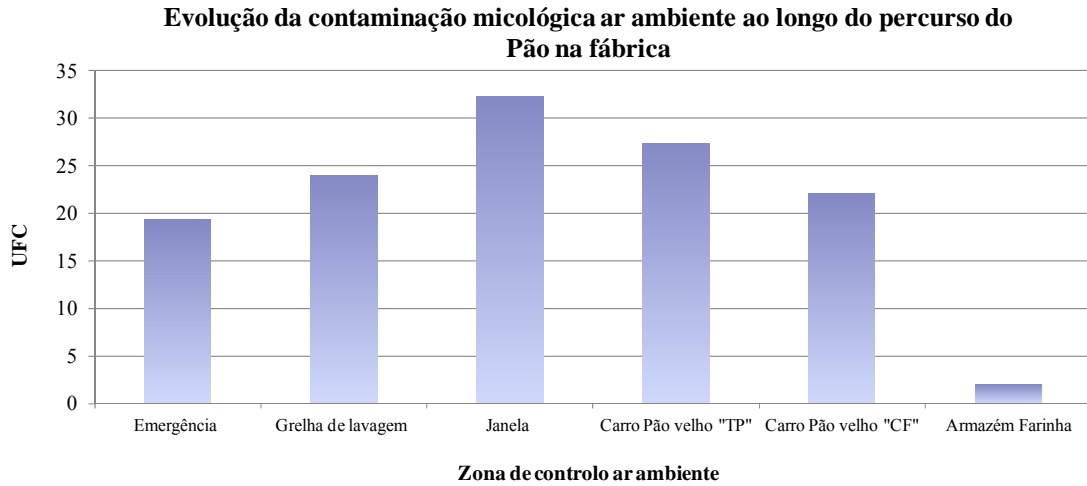


Gráfico 9: Evolução da contaminação microbiana de ar ambiente ao longo do percurso do Pão na fábrica.

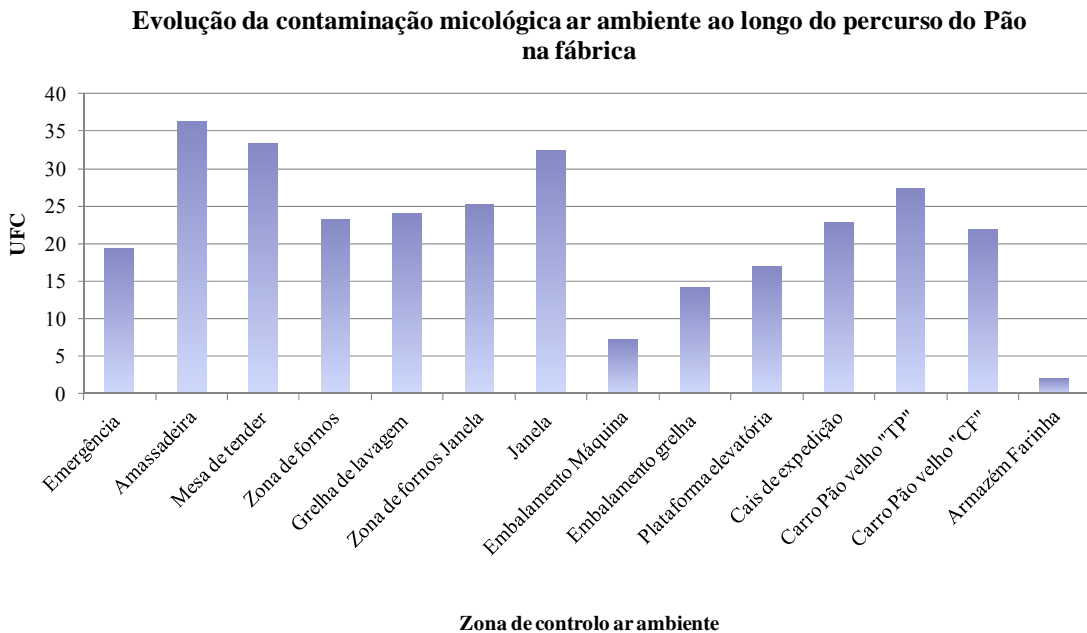


Gráfico 10: Evolução da contaminação microbiana de ar ambiente do percurso do Pão na fábrica, nos diferentes locais amostrados.

Tabela 12: Variação do teor total microbiano (ufc) nas análises de controlo de ar ambiente realizadas ao longo do tempo nos pontos adicionais.

Teor total microbiano em ufc																	
Data/Local	13-Jun	21-Jun	25-Jun	03-Jul	04-Jul	05-Jul	10-Jul	23-Jul	25-Jul	29-Jul	01-Ago	05-Ago	08-Ago	13-Set	17-Set	19-Set	30-Set
Emergência			Inc	193			N	14		24		56	22	Inc	Inc	4	
Grelha de lavagem		34	105	93			3	N		25	14	16	34	33			8
Janela			Inc	157			3	Inc		23	11	20	21	52	9	25	18
Carro Pão velho "TP"								N		17	8	9	17		8		1
Carro Pão velho "CF"				8				N		29	4	8	13		2		Inc
Armazém Farinha	10		4				42			7			4	11	7		2

■ - Não foi realizada a recolha.
Inc – Incontável
N – *Neurospora*
Inv - Invasão

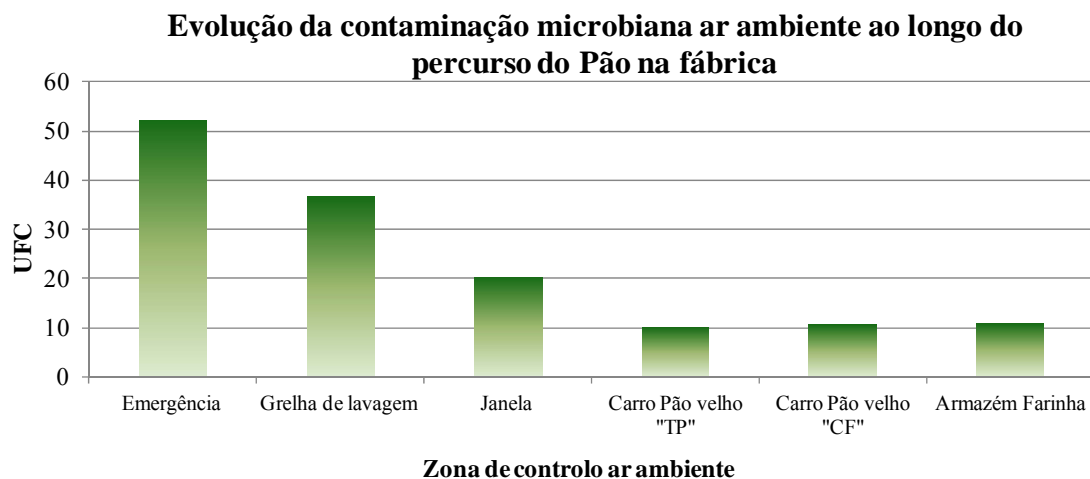


Gráfico 11: Evolução da contaminação microbiana ao longo do percurso do Pão na fábrica, nos pontos adicionais.

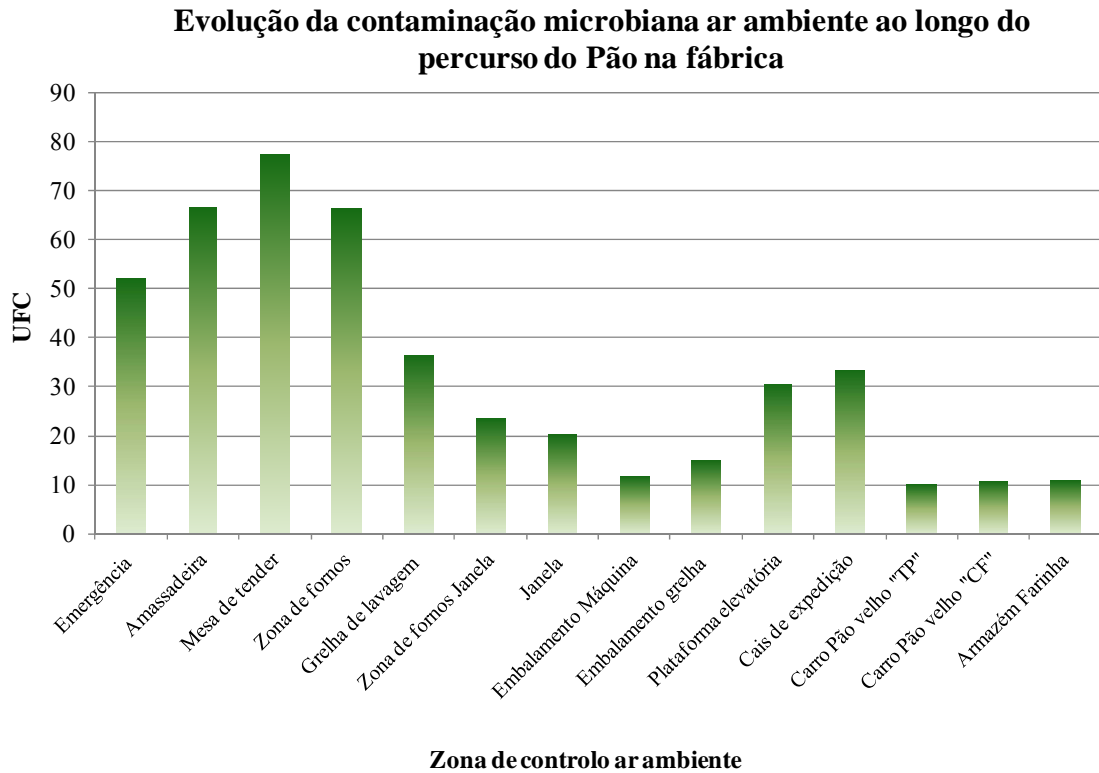


Gráfico 12: Evolução da contaminação microbiana ao longo do percurso do Pão na fábrica.

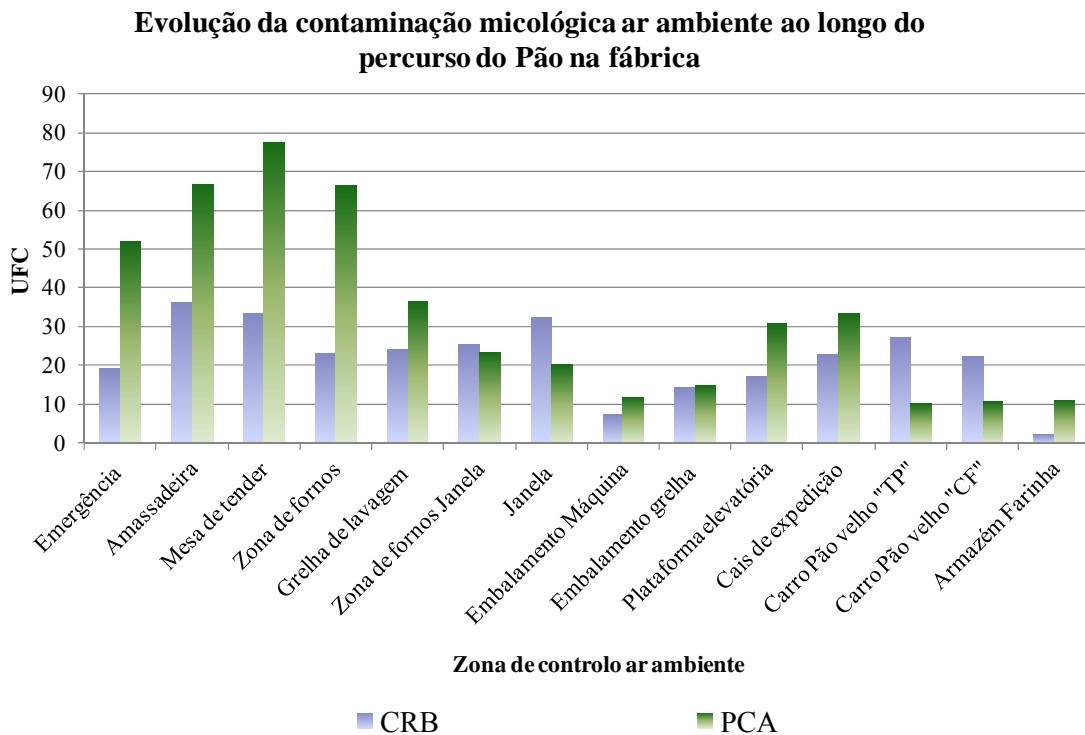


Gráfico 13: Evolução da contaminação micológica e bacteriana ao longo do percurso do Pão na fábrica.

Tabela 13: Resultados positivos para *Neurospora crassa* em meio de CRB.

Teores totais de bolores e leveduras em ufc							
Data/Local	19-Jun	05-Jul	10-Jul	23-Jul	25-Jul	13-Set	17-Set
Emergência			10	19		Inc	N
Amassadeira	2	29	18	33	N	Inc	14
Mesa de tender	18	28	25	N	65	N	4
Zona de fornos	59	25	18	24	55	26	0
Zona de fornos Janela	27	17	5	25	7	37	13
Janela			N	42		49	13
Embalamento grelha	19	15	N	N	N	15	Inv
Embalamento Máquina	15	13	N	3	5	5	15
Grelha de lavagem			12	N		18	
Cais de expedição	N	21	N	N	N	27	8
Plataforma elevatória	8	N	31	N	7	20	11
Carro Pão velho "TP"			N	N			10
Carro Pão velho "CF"			N	N			16

■ - Não foi realizada a recolha.

Inc – Incontável

N – *Neurospora*

Inv - Invasão

Tabela 14: Resultados positivos para *Neurospora crassa* em meio de PCA.

Teor total microbiano em ufc					
Data/Local	04-Jul	10-Jul	23-Jul	25-Jul	29-Jul
Amassadeira	N	55		N	65
Zona de fornos	Inv	18	N	72	38
Zona de fornos Janela	16	N	21	Inc	31
Embalamento grelha	3	N	Inc	47	4
Embalamento Máquina	2	3	2	93	N
Grelha de lavagem		3	N		25
Cais de expedição	Inv	N	N	37	60
Plataforma elevatória	4	N	N	22	58
Carro Pão velho "TP"			N		17
Carro Pão velho "CF"			N		29
Emergência		N	14		24

■ - Não foi realizada a recolha.

Inc – Incontável

N – *Neurospora*

Inv - Invasão

O plano analítico, previu uma menor frequência de recolhas, durante os primeiros meses do ano que progressivamente se foi intensificando à medida que as condições meteorológicas se tornaram favoráveis ao desenvolvimento, segundo do contaminante em avaliação, segundo o histórico de reclamações.

Dos resultados das análises ao ar ambiente nas diferentes zonas da unidade fabril, observou-se, que nos primeiros meses em estudo, não ocorreu qualquer desenvolvimento de *N. crassa*. Durante este período a temperatura média atingida, como se pode observar no gráfico 14, foi de 33°C, enquanto a humidade relativa máxima é de 78%.

A partir do mês de Junho, obtiveram-se resultados positivos quanto à presença de *Neurospora crassa*, conseqüentemente, consideraram mais 4 pontos de amostragem, para permitir uma melhor avaliação e, se possível, uma interpretação mais exaustiva dos resultados obtidos. Esses pontos apresentaram valores expectáveis de forma a reforçar a identificação da via contaminante.

É possível visualizar no gráfico 10 e gráfico 12, a evolução crescente das contaminações micológica e/ou microbiana, à medida que a zona está mais exposta ao contacto com o meio exterior. O estudo demonstrou também que as zonas exteriores com maiores exposições a correntes de ar, dependentes da orientação dos ventos, eram mais

propícias ao aparecimento de *Neurospora crassa*, o que seria expectável dado o carácter ubiquista deste contaminante, nomeadamente em ambientes rurais.

Com base no princípio do histórico de reclamações e para reforçar os seus resultados caracterizaram-se, igualmente, as condições meteorológicas dos resultados positivos nas amostras experimentais.

Analisando na íntegra, o período de ensaios experimentais, para as análises de controlo de ar ambiente, constatou-se uma contaminação ambiental do agente *Neurospora crassa* nos meses de Junho, Julho e Setembro nas diferentes zonas de laboração com maior incidência nas zonas de contacto com o exterior.

No presente estudo observou-se que foi possível constituir uma linearidade entre os resultados obtidos historicamente, com os resultados dos ensaios experimentais relativamente ao binómio das condições favoráveis ao desenvolvimento de *Neurospora crassa*.

Tabela 15: Condições meteorológicas à data dos resultados de presença da *Neurospora crassa*.

PCA e CRB						
Data	Temp Média (°C)	Temp Máx (°C)	Temp Min (°C)	Hr (%)	Hr Máx (%)	Hr Min (%)
19-Jun	16	19,0	14,0	75,8	88,0	64,0
04-Jul	33	38,0	21,0	35,2	73,0	18,0
05-Jul	30	37,0	22,0	42,9	78,0	22,0
10-Jul	27	34,0	19,0	33,8	88,0	14,0
23-Jul	21	28,0	16,0	64,1	94,0	32,0
25-Jul	22	25,0	19,0	73,4	88,0	54,0
29-Jul	21	27,0	15,0	73,3	100,0	44,0
13-Set	25	29,2	20,6	34,0	45,0	23,0
17-Set	18	21,6	15,4	76,0	88,0	50,0

Na Tabela 15, apresentam-se as condições meteorológicas dos dias onde foram obtidos resultados positivos relativamente à presença de *Neurospora crassa*, independentemente do meio de cultura.

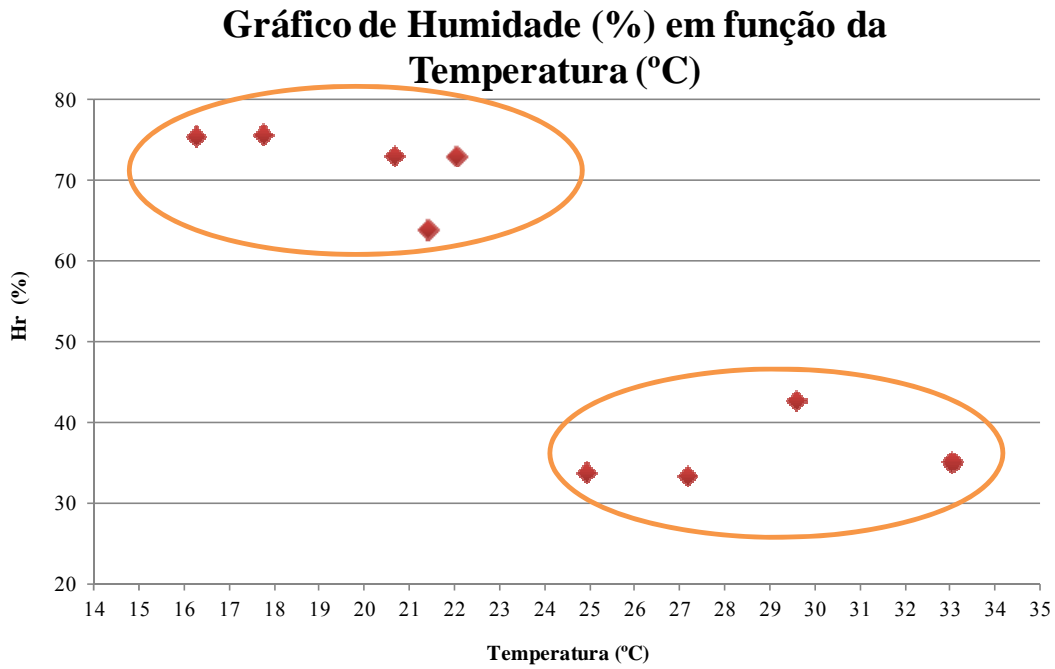


Gráfico 14. Gráfico de Humidade (%) em função da temperatura (°C), nas datas de ocorrência de *Neurospora crassa*.

Após análise dos resultados de controlo micológico e microbiano, estudaram-se de forma pormenorizada as condições meteorológicas do ano 2013.

No Gráfico 15, destacam-se as condições médias do mês de Junho, onde ocorreram pela primeira vez resultados positivos para a presença de *Neurospora crassa*.

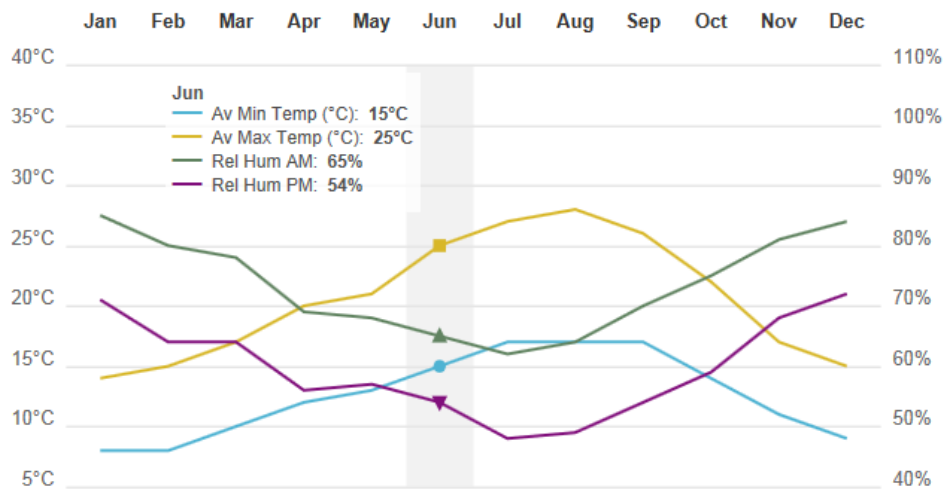


Gráfico 15. Registo de condições médias meteorológicas do mês de Junho 2013 (<http://www.meteoprog.com.pt/pt>).

No Gráfico 15, destacam-se as condições médias do mês de Setembro, onde ocorreram pela última vez resultados positivos para a presença de *Neurospora crassa*.

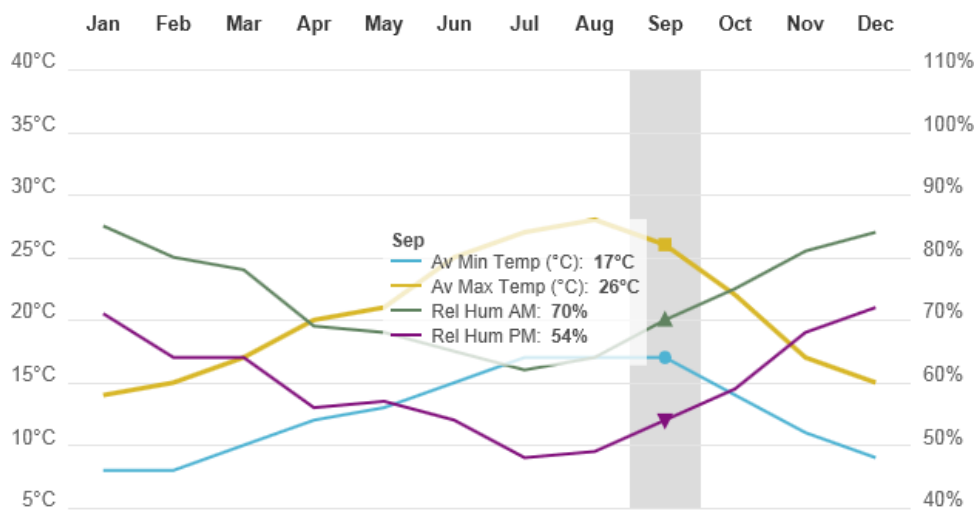


Gráfico 16. Registo de condições médias meteorológicas do mês de Setembro 2013 (<http://www.meteoprog.com.pt/pt>).

3.5. Detecção de *Neurospora crassa* em superfícies e produto acabado

Conforme referido anteriormente realizou-se o controlo microbiológico de superfícies das zonas de trabalho diretamente envolvidas nas diferentes fases de confeção do produto. Foram amostradas nomeadamente: zaragatoas de amassadeiras, mesa de tender, superfícies das lâminas de corte da fatiadora manual, superfícies das lâminas de corte da fatiadora automática. Não se realizou o controlo dos manipuladores, nem das matérias- primas, por já fazer parte do controlo habitual previsto no programa de monitorização da instalação fabril. Face aos resultados obtidos, este controlo de superfícies foi abandonado, por se considerar não ter relevância na contaminação ocasionalmente observada no produto final.

Tabela 16: Detecção de *N. crassa* em superfícies.

Pesquisa <i>Neurospora crassa</i>																					
Data/Local	30- Mai	07- Jun	13- Jun	14- Jun	19- Jun	21- Jun	25- Jun	03- Jul	04- Jul	05- Jul	10- Jul	23- Jul	25- Jul	29- Jul	01- Ago	05- Ago	08- Ago	13- Set	17- Set	19- Set	30- Set
Tina amassadeiras	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A							
Mesa de Tender	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A							
Laminas Fat. Manual	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A							
Laminas Fat. Manual	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A							

A – Ausência na deteção de *Neurospora crassa*.


 - Não foi realizada a recolha

Tabela 17: Detecção de *N. crassa* em produto acabado.

Pesquisa <i>Neurospora crassa</i>																					
Data/Local	30- Mai	07- Jun	13- Jun	14- Jun	19- Jun	21- Jun	25- Jun	03- Jul	04- Jul	05- Jul	10- Jul	23- Jul	25- Jul	29- Jul	01- Ago	05- Ago	08- Ago	13- Set	17- Set	19- Set	30- Set
Pão de Mafra	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Pão de Mafra Velho	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Pão Saloio de Forma	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Pão Saloio de Forma Velho	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Pão Redondo Saloio"	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Pão Redondo Saloio velho	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A – Ausência na deteção de *Neurospora crassa*.

P – Presença na deteção *Neurospora crassa*.

De seguida apresenta-se algumas imagens dos resultados positivos da deteção da presença de *N. crassa* em diferentes fases de desenvolvimento do microrganismo.



Figura 54: “Pão de Mafra” com *Neurospora crassa* 1ª fase (Fonte: Raquel Breyd).



Figura 55: “Pão de Mafra” com *Neurospora crassa*, 2ª fase (Fonte: Raquel Breyd).



Figura 56: “Pão de Mafra” com *Neurospora crassa*, 3ª fase (Fonte: Raquel Breyd).

A aplicação de um método adaptado de controlo de superfícies por esfregaço e posterior a deteção do microrganismo para as superfícies designadamente: mesas de tender, amassadeira, superfície de contacto das lâminas de corte da fatiadora manual e

da superfície de contacto das lâminas de corte da embaladora automática, demonstraram a ausência, em todos os resultados, de *Neurospora crassa*. Tais resultados permitem afirmar que a contaminação não é proveniente do contacto das massas e/ou produtos com superfícies de manipulação contaminadas.

No estudo realizado para a deteção da presença de *N. crassa* em produtos acabados, verificou-se uma elevada predominância de resultados positivos no produto “Pão de Mafra” e Pão Saloio de Forma independentemente de o produto ser fresco ou produto velho - com pelo menos 24h de exposição antes de submetido aos ensaios. Apesar da lista de ingredientes diferir nos produtos descritos, ambos possuem atividades de água muito semelhantes e ambos os produtos são submetidos ao mesmo tipo de forno para o processo de cozedura. Reunindo estas características e observando o desenvolvimento de *Neurospora crassa* ao longo dos produtos, realizaram-se novos ensaios. O Pão Redondo Saloio teve unicamente um resultado positivo ao logo do estudo. Este resultado não sendo conclusivo, permite todavia afirmar/especular que o produto não possui condições favoráveis ao desenvolvimento de *N. crassa* comparativamente com o “Pão de Mafra” ou Pão Saloio de Forma. A grande diferença diz respeito ao tipo de forno utilizado no processo de cozedura, que no caso do Pão Saloio se trata de um forno de superfície metálica com aquecimento a gás.

Os fornos de alvenaria de tijolo refratário, são constituídos de material cerâmico, com capacidade de absorver grandes quantidades de energia térmica, ou seja possuem um bom isolamento térmico, desencadeando uma maior absorção de teor de água à superfície do produto, formando a côdea do pão. Essa côdea funciona como uma “barreira” entre o interior do produto e o interior do forno. Durante esta fase ocorre a cozedura do produto. Porém essa barreira protetora, permite gerar condições ótimas, menor perda de conteúdo de água na estrutura interna do produto, propícias ao desenvolvimento *N. crassa*.

De forma a evidenciar este facto, realizou-se um estudo, *a posteriori*, no produto acabado com alternância a nível do forno de cozedura. O “Pão de Mafra” assim como o Pão Saloio de Forma foram submetidos a cozedura em forno metálico, enquanto o Redondo Saloio foi submetido a processo de cozedura em forno de alvenaria. Após 48horas, observou-se o aparecimento de *N. crassa*, acompanhado de libertação de calor, reação exotérmica e desenvolvimento de condensações no interior da embalagem, em todas as amostras. Contudo verificou-se que no Pão Redondo Saloio, o desenvolvimento

foi bastante rápido e muito similar ao crescimento nos restantes produtos (“Pão de Mafra” e Pão Saloio de Forma), cozidos em forno de alvenaria.

Assim sendo não é possível estabelecer uma causalidade direta entre o desenvolvimento de *Neurospora crassa* com o tipo de forno utilizado. Todavia pode-se depreender que os fornos de alvenaria realçam as condições favoráveis ao desenvolvimento de *Neurospora crassa* comparativamente ao forno metálico, trivialmente utilizado na indústria de panificação.

Durante o processo de cozedura em fornos metálicos, a perda do conteúdo de água no produto é uniforme e a cêdea formado é fina e oferece pouca resistência quanto ao toque.

Paralelamente a estas evidências, observou-se que o desenvolvimento de *Neurospora crassa* ocorre constantemente do interior do produto para o exterior do mesmo. Nunca em nenhuma amostra submetida aos ensaios se constatou o desenvolvimento de *Neurospora crassa* ao longo da superfície, o que pressupõe não existirem condições favoráveis ao seu crescimento – menor conteúdo de água relativamente ao interior do produto.

3.6. Identificação de *Neurospora crassa*

Neurospora é um membro do grande grupo de fungos chamados *Ascomycetes*. O recurso de diagnóstico dos *Ascomycetes* é que as células que são produto da divisão meiótica estão contidas temporariamente numa bolsa membranosa designada por asco. Outros ascomicetes são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padeiro).

Como os restantes bolores em geral *Neurospora* cresce pelo alongamento das extremidades das suas hifas e pela formação de novas ramificações. *Neurospora* é um dos fungos filamentosos, de crescimento mais rápido. Em condições ótimas pode crescer, aproximadamente 10 cm por dia.

O nome do género *Neurospora* quando traduzido literalmente significa esporos enervados, e está diretamente relacionado com uma característica morfológica distintiva dos seus esporos em forma de bola de rugby e que apresentam estrias longitudinais, como os axónios dos neurónios. Esta característica morfológica é importante para o diagnóstico do género.

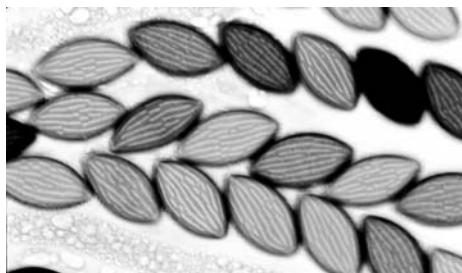


Figura 57: *Neurospora*. (<http://www.fgsc.net/Neurospora>)

Neurospora é também chamado o bolor laranja do pão. Laranja por causa de sua cor laranja-rosada característica devido a pigmentos carotenóides. Bolor do pão devido à sua propensão para inocular e crescer sobre as fatias de pão.

Todas as células de *Neurospora* contêm os componentes básicos de uma célula eucariótica: núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vacúolos, vários tipos de vesículas, citoesqueleto, ribossomas e outros. O citoplasma é delimitado por uma membrana plasmática e exteriormente possui uma parede celular rígida em grande parte composta de quitina. Estão descritas mais de uma dúzia de tipos

de células especializadas que se podem distinguir em diferentes fases do ciclo de vida, mas três tipos de células são os mais proeminentes:

- As Hifas são tubos com paredes rígidas, exceto nas pontas, que é onde ocorre o crescimento. Os componentes de parede celular e membrana plasmática são sintetizados a alguma distância da ponta e transportados para a frente até a ponta em vesículas. As vesículas acumulam-se na extremidade da hifa
- Os conídios mais frequentemente tratados (porque eles são mais proeminentes) são os macroconídios. Estes são células de forma arredondada, com uma média de 2 a 3 núcleos idênticos, que podem viver até várias semanas à temperatura ambiente (mais quando conservados sob refrigeração). Os conídios são unidades de dispersão. Sob condições apropriadas, um conídio inicia crescimento polar enviando um tubo germinal, que então se torna a primeira hifa.

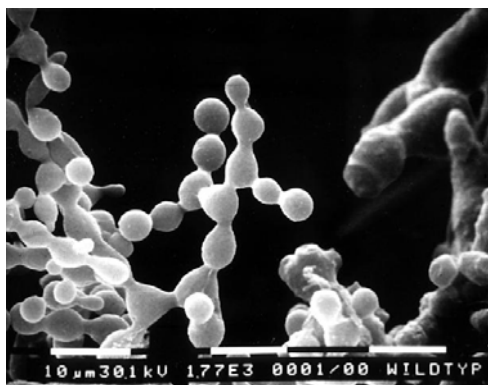


Figura 58: Micrografia SEM de conídios de *Neurospora crassa* (www.fgsc.net614)

- Os ascósporos – estes esporos em forma de bola de rugby – são células com paredes espessas e desenvolvem-se a partir dos produtos da meiose. Cada um tem numerosos núcleos haplóides idênticos. Os ascósporos são também unidades de dispersão, mas diferem dos conídios por serem mais resistentes a condições ambientais adversas (tais como baixa a_w) e sendo mais pesados, depositam-se mais rapidamente. O calor, ou a presença de produtos químicos produzidos pelo aquecimento do substrato, podem induzir a sua germinação.

Historicamente o género *Neurospora* está descrito como ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais húmidas como um colonizador comum, primário de plantas mortas pelo fogo (Perkins 2000, Turner *et al.*, 2001). Pesquisas recentes também têm encontrado *Neurospora* a colonizar árvores e arbustos mortos por incêndios florestais em regiões temperadas, da América do Norte e do Sul da Europa, regiões que

são frequentemente caracterizadas por frio e/ou menos húmidas, (Jacobson *et al.*, 2004, 2006). Embora associado a e presumivelmente adaptado ao fogo, muito permanece por saber sobre o ciclo de vida de *Neurospora* em natureza, incluindo a reprodução, disseminação e sobrevivência em fogos (Pandit & Mariotti, 1996; Perkins, 2002; Jacobson *et al.*, 2006).

Algumas tendências gerais biogeográficas estão surgindo. A diversidade de espécies de *Neurospora* difere, globalmente, em várias regiões. Por exemplo, no oeste da América do Norte, do Novo México ao Alasca, isolados obtidos são constituídos predominantemente (95%) por uma única espécie, *N. discreta*, até então, a espécie menos comum de *Neurospora* isolada. No sul da Europa, no entanto, do Sul de Portugal para a Suíça, as espécies isoladas incluíram *N. crassa.*, *N. discreta*, *N. sitophila* e *N. tetrasperma*. Embora a latitude, o clima e a vegetação sejam semelhantes aos da América do norte ocidental, a distribuição das espécies e a dinâmica espacial são bastante diferente. Para além disso, verifica-se que essas características são mais similares entre o sul da Europa e a semitropical Florida, onde quatro espécies diferentes estão também presente em escalas espaciais diversas (Powell *et al.*, 2003).

No sentido de clarificarmos a identificação do nosso contaminante procedemos ao seu isolamento a partir das placas das análises microbiológicas realizadas para diferentes meios de cultura tais como Malt Extract Agar, Potato Dextrose Agar e Glucose Yeast Extract Peptone Agar. A identificação dos bolores baseia-se, fundamentalmente, nas características morfológicas e culturais. Por isso se utilizam meios diferenciados que favoreçam a sua reprodução e/ou o seu crescimento de forma a permitir, assim, a expressão correta das características a estudar.

A partir duma colónia bem separada, com o auxílio de uma agulha esterilizada à chama, e mediante as técnicas de manipulação asséptica, usuais em Microbiologia, procede-se à colheita de uma porção da colónia a isolar i inocula-se num ponto mais ou menos central das placas contendo os diferentes meios de cultura seletivos. Avalia-se a pureza da colónia pela observação diária das placas, através da uniformidade do aspeto da colónia que se forma após incubação.

Durante a incubação vão-se observando as características culturais e terminado o período de incubação segue-se a análise microscópica das características morfológicas.

Nas características culturais avaliámos a velocidade de crescimento, a textura do talo, a cor do talo (pigmentação do talo, coloração dos conídios), cor do reverso da

cultura, presença de pigmento difusível, odor, presença de exsudado (gotas de transpiração do micélio aéreo).

Nas características morfológicas observadas ao microscópio ótico procedemos ao:

- Estudo do micélio – presença/ausência de septos nas hifas, cor, ornamentação das paredes, dimensões, modo de ramificação;
- Natureza dos órgãos diferenciados e do seu conteúdo: forma, cor, dimensões, textura das paredes, ornamentação, arranjo espacial;
- Estudo biométrico das células/estruturas esporogénicas e dos esporos.

A identificação é realizada de acordo com as características observadas com recurso a manuais com chaves de identificação. Para confirmação da identificação estamos a realizar a análise molecular do DNA das colónias isoladas, PCR da região ribossómica do DNA seguida de sequenciação (dados ainda não disponíveis).

4. CONCLUSÕES

Neste estudo demonstrou-se que existem fatores extrínsecos e intrínsecos na confeção dos produtos de panificação no concelho de Mafra condicionantes do desenvolvimento de *Neurospora crassa* durante os meses de verão.

De forma a minimizar esta presença, devem-se implementar medidas preventivas, tais como:

- Monitorização do binómio de temperatura e humidade, em todas as zonas da unidade fabril, com indicação luminosa, tendo em conta o risco de contaminação para o desenvolvimento *N. crassa*;
- Manter todas as entradas da instalação fechadas de forma a poder evitar nos períodos mais críticos a entrada de carga fúngica, principalmente nos locais de maior exposição a ventos;
- Alteração das estruturas de arrefecimento, nomeadamente no Pão Saloio de Forma. O suporte de arrefecimento, de estrutura metálica deve de estar em menor contacto possível com o produto acabado, de forma a assegurar, que todo o produto perde a mesma quantidade de água ao longo da superfície.
- No caso do “Pão de Mafra”, os tabuleiros deveriam ser expostos a correntes de ar climatizado e filtrado, com diferentes orientações, de forma a assegurar o arrefecimento de todas as superfícies de contacto das diferentes unidades no interior do tabuleiro.
- Segunda filtração do ar na grelha de entrada de ar na zona de arrefecimento de modo a reformar purificação do ar na condução de acesso à zona.
- A adição de conservantes nos produtos que seja possível a sua utilização.
- Apresentação do produto de forma inteira o intuito de diminuir a superfície de contacto à exposição do agente. O produto torna-se menos suscetível.
- Apresentação de embalagens mais pequenas, isto é redução do tamanho/peso dos produtos confeccionado de forma a diminuir o tempo de consumo dos produtos confeccionados.

No futuro deveria se realizar um estudo, pormenorizado ao dimensionamento da climatização da zona de arrefecimento de produto acabado e a realização de um estudo de mercado face à atual situação do país relativamente há possibilidade de alteração da apresentação do produto – “Pão de Mafra”.

5. BIBLIOGRAFIA

- Associação do Comércio, Indústria e Serviços de Mafra. (2009, Junho). Protecção da origem do “Pão de Mafra”. *Regeneração Urbana do Palácio Nacional de Mafra*, 21, p. 7.
- Associação do Comércio, Indústria e Serviços de Mafra. (2011). Regulamento Interno da secção de Panificação – regulamento de organização e disciplina da marca “Pão de Mafra”- Indicação Geográfica Protegida Caderno de especificações, 4-31.
- Aleixo, C. (1996a). *Morfologia de bolores e leveduras*, Documento não publicado, Produção Industrial, Inova, Açores.
- Aleixo, C. (1996b). *Fatores condicionantes da atividade microbiana*, Documento não publicado, Produção Industrial, Inova, Açores.
- Aleixo, C. (1998a). *Princípios e métodos de estudo dos Fungos*, Documento não publicado, Micologia Alimentar, Inova, Açores.
- Aleixo, C. (1998b). *Identificação de Fungos*, Documento não publicado, Micologia Alimentar, Inova, Açores.
- Aleixo, C. (1998c). *Fungos e Micotoxigénese*, Documento não publicado, Micologia Alimentar, Inova, Açores.
- Amaral, A., Magnoni, D., e Cukier, C. (2007). Fibras Alimentar [Consultado em 15.09.2012]. Disponível em <http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Fibras/117064.html>
- Anónimo1, (2009, Outubro). Panificação: os ingredientes enriquecedores. *Food Ingredients Brasil*, 10, 22-27. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/114.pdf>
- Anónimo2, (2011). PAN placer, alimento y nutrición. [Consultado em 15.04.2013] *Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria*. Disponível em: http://www.semfyc.es/pfw_files/cma/Pan.pdf.
- Anónimo3, (2013). [Consultado em 10.01.2014]. Disponível em <http://consumidores.extensity.pt/43/denominacao-de-origem-prottegida-dop-e-indicacao-geografica-prottegida-igp.htm>.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (1986). Cereals and cereal products. *Food Chemistry*, (pp. 495-532). New York: Springer Verlag.

- Bossolan N. R. S. (2002). Introdução à microbiologia, *Universidade de São Paulo-Instituto de Física de São Carlos-Licenciatura em Ciências Exatas*. Capítulo, 3, 28-48.
- Boundy-Mills, K. (2006). Yeast Biodiversity: How Many and How Much?. *In Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 1-9). Springer Berlin Heidelberg. Doi: 10.1007/3-540-30985-3_1
- Carvalho, I. T. (2010). Microbiologia Básica. *EDUFRPE*. (pp. 108).
- Cauvain, S. P., & Young, L. S. (Eds). (2007). *Technology of Breadmaking*. (pp. 420) Springer, New York, USA.
- Câmara Municipal de Mafra. (2006, s.d.). Caracterização socioeconómica. *Carta Educativa do Concelho de Mafra*, 14-26.
- Câmara Municipal de Mafra (2009, Julho). Pão de Mafra: Proteger para potenciar. *Mafra Notícias-Boletim da Câmara Municipal de Mafra*, p. 6. Disponível em: http://www.cm-mafra.pt/files/Informacao_Institucional/Boletim/julho2009.pdf.
- Câmara Municipal de Mafra. (2010, Julho). “Pão De Mafra” em evento gastronómico de referência. *Mafra Notícias-Boletim da Câmara Municipal de Mafra*, p. 11. Disponível em: http://www.cm-mafra.pt/files/Informacao_Institucional/Boletim/julho2010.pdf.
- CienciaViva, [Consultado a 20.11.2013]. Disponível em: www.cienciaviva.pt/projectos/pollen/sessao6pao.pdf
- Dateca, [Consultado em 15.09.2012]. Disponível em https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRLqb86CpUR-1bpa7G3VK4fMzjDVyvS0ZGIlof_3OJz2P6jw6PeDQ
- D'andréa, A. (2012). A origem do pão. [Consultado a 20.11.2013]. Disponível em: <http://www.confrariagiuseppina.com.br/2012/10/a-origem-do-pao/>
- DeMan, J. M. (1999). *Principles of Food Chemistry*. (pp. 29-31). Springer, New York.
- Denardin, C. C. & Silva, L. P. (2009). Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, 39 (3), 945-954. doi: 10.1016/S0008-6215(00)00275
- Devbio, [Consultado em 04.12.2013]. Disponível em http://www.devbio.biology.gatech.edu/?attachment_id=10168
- Diário Digital, [Consultado em 18.05.2013]. Disponível em <http://diariodigitalcastelobranco.pt>

- Dytchfield, C. (2000). *Estudo dos métodos para a medida da atividade da água* (Dissertação de Mestrado). Escola Politécnica Universidade São Paulo, Brasil.
- Elena, M., Marrouí, L., & González, V. (2010). Valor nutritivo de pan con sustitución parcial de harina de trigo (*Triticum aestivum*) por arracacha (*Arracacia xanthorrhiza Bancroft*) fortificado. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1 (2), 244-261.
- Ferreira, A. V. B. (2005). Primórdios do Sexo. *Ciência hoje*, 37 (218), 34-41.
- Ferreira, J.M.R. (2011). *Efeito do tratamento por alta pressão na sorção da água pelo amido* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Aveiro, Portugal.
- Fgcnnet, [Consultado em 20.11.2013]. Disponível em <http://www.fgsc.net/Neurospora>
- García Olmedo, F. (1964). Papel de la fermentación en la fabricación del pan. *Cereales*, 173, 13-15.
- Giraldo, I. D. (2002). *Cereais-Bioquímica Alimentar I*. Documento não publicado, Universidade de Aveiro-Departamento de Química, Aveiro.
- Gonçalves, R.D. (2008). *Identificação de fatores de transcrição de Neurospora crassa envolvidos na regulação do metabolismo de glicogénio* (dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Harris, D. C. (1996). Chemical equilibrium. *Quantitative chemical analysis*, (p. 105). New York: W. H. Freeman and Company.
- ISO 4833:2003 *Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes - Technique de comptage des colonies à 30 degrés C.* (2008). CEN – Comité Européen de Normalisation.
- Jamesbottura, [Consultado em 15.09.2012]. Disponível em <http://jamesbottura.blogspot.com>
- Jacobson, D. J., Boesl, C., Sultana, S., Roenneberg, T., Merrow, M., Duarte, M., ...Taylor, J. W. (2006). New findings of *Neurospora* in Europe and comparisons of diversity in temperate climates on continental scales. In *The Mycological Society of America, Lawrence*, 98(4), 550–559. doi: 10.3852/mycologia.98.4.550 Mycologia July/August 2006 vol. 98 no.
- Jacobson, D. J., Powell, A. J., Dettman, J. R., Saenz, G. S., Barton, M. M., Hiltz, M. D.,... & Natvig, D. O. (2004). *Neurospora* in temperate forests of western North America. *Mycologia*, 96 (1), 55-74. doi: 10.3852/mycologia.98.4.550 Mycologia July/August 2006 vol.

- Johnston, M. & Lin, R. (1987). FDA views on the importance of a_w in good manufacturing practice. (pp. 287-294). Marcel Dekker, New York.
- Lagos, O.C.T. (2009). *Desarrollo y evaluación física-química y sensorial de un pan usando salvado de trigo y harina integral* (Dissertação de Mestrado). Escola Agrícola do Panamera, Honduras.
- Magalhães, R.P. (2004). *Metabolismo do glicogênio em Neurospora crassa. Um estudo molecular e bioquímico e análise de interação proteína-proteína* (Tese de Doutoramento). Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Mazoyer, M. & Roudart, L. (2009). História das agriculturas no mundo. (pp. 193-333). Editora Unesp, São Paulo.
- Meteoprog, [Consultado em 08.01.2014]. Disponível em <http://www.meteoprog.com.pt/pt>
- Moore, J. (1986). Science as a way of knowing -genetics. *American Zoologist*, 26 (3), 583-747. doi: 10.1093/icb/26.3.583.
- Molinaro, E. M., Caputo, L. F. G., & Amendoeira, M. R. R. (2009). Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Rio de Janeiro: *EPSJV*, 4, 400-408. Disponível em: /beb/textocompleto/009570.
- Murcia, J. L. (2011). El pan en la base de la dieta mediterránea. *Distribución y consumo*, 21(115), 64-68.
- Newscenterberkeley, [Consultado em 09.12.2013]. Disponível em <http://newscenter.berkeley.edu/2010/09/09/neurospora/>
- NP 3277-1 (1987). *Contagem de bolores e leveduras*. Incubação a 25°C. (1987). Caparica: Instituto Português da Qualidade.
- NP 1828 (1982). *Colheita de amostras para análise microbiológica*. Microbiologia alimentar (1982). Caparica: Instituto Português da Qualidade.
- Nutrisiuntukbangsa, [Consultado em 17.08.2013]. Disponível em <http://nutrisiuntukbangsa.org/ulukutek-leunca-si-primadona-dari-sunda/>
- Oliveira, J.M.L.B. (2010). *Denominações de Origem e Indicações Geográficas – Proteção e Impacto Socioeconómico* (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Economia e Gestão, Portugal.
- Pandit, A. & Maheshwari, R. (1996). Life history of *Neurospora intermedia* in a sugar cane field. *Journal of biosciences*, 21(1), 57-79. doi: 1007/BF02716813.
- Peito, M. A. (1998). *Ecofisiologia dos Fungos*, Documento não publicado, Micologia Alimentar, Inova, Açores.

- Perkins, D. D. & Turner, B.C. (1988). *Neurospora* from natural populations: Toward the population biology of a haploid eukaryote. *Experimental Mycology*, 12(2), 91-131. [http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975\(88\)90001-1](http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975(88)90001-1)
- Perkins, D. D., & Davis, R. H. (2000). Evidence for Safety of *Neurospora Species* for Academic and Commercial Uses. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5107–5109. doi: 10.1128/AEM.66.12.5107-5109.2000.
- Perkins, D. D. (2002). *Neurospora perithecia*: the first sighting. *Fungal Genet News*, 49, 9-10.
- Pinto, D.M.M. (2008). *Proteínas que ligam FK506: identificação e análise em Neurospora crassa* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Aveiro, Portugal.
- Portaria n.º 425/98 de 25 de Julho (1998). *Fixa as características a que devem obedecer os diferentes tipos de pão e de produtos afins do pão. Diário da Republica I Serie. N.º 170 (98-07-25), 3552-3556.*
- Pousadas das cores, [Consultado em 07.11.2013]. Disponível em http://www.pousadadascors.com.br/culinaria/historia_pao/historia_pao.htm
- Powell, A. J., Jacobson, D. J., Salter, L., & Natvig, D. O. (2003). Variation among natural isolates of *Neurospora* on small spatial-temporal scales. *Mycologia* 95 (5), 809-819.
- Regulamento (CE) 510/2006 de 20 Março relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios , Jornal Oficial da União Europeia, L 093 Comissão Europeia Bruxelas.
- Ribeiro, P.S. (2009). *Aproximação ao estudo da tipificação do Pão de Mafra* (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Rocha, T. S., Demiate, I. M. & Franco, C. M. L. (2008). Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (3), 620-628.
- Santos, D.M.J. (2005). *Influência das pentosanas nas propriedades funcionais do glúten e amido de trigo* (Dissertação de Doutoramento). Universidade de Aveiro, Portugal.

- Saudelar, [Consultado em 15.06.2013]. Disponível em http://www.saudelar.com/edicoes/2010/fevereiro/principal.asp?send=06_nutricao.htm
- Scheuer, P. M., Francisco, A., Miranda, M. Z. & Limberger, V. M. (2011). Trigo: Características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 13 (2), 211-222.
- Schuller, D.E. (1998). *Desenvolvimento de um meio de cultura selectivo/diferencial* (Dissertação de Mestrado). Universidade do Minho, Portugal.
- Silva, M.C. (2002). *Avaliação da quantidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema Simplate* (Dissertação de Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luís de Quieroz”, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Solis, V.E. (2008). *Estudios estructurales de almidón de fuentes no convencionales: mango (Mangifera indica L.) y plátano (Musa paradisiaca L.)* (Dissertação de Mestrado). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Sousa, C. P. (2006). Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Rev At Prim Saúde*, 9 (1), 83-88.
- Stanford, [Consultado em 15.10.2013]. Disponível em <http://www.stanford.edu/group/neurospora>
- Yassin, S., & Wheals, A. (1992). *Neurospora* species in bakeries. *Journal of Applied Bacteriology*, 72 (5), 377–380. doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01849.x
- Yonemoto, P. G., Calori-Domingues, M. A. & Franco, C. M. L. (2007). Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27 (4), 761-771.
- Yubero, I. (2011, Janeiro). *Historia y presente del pan. importancia alimentaria y cualidades nutricionales*, In Distubucón y consumo. Doi Mercasa, pp. 71-78
- Toro, J.P.T. (2008). *Elaboración de un plan de mercadeo para levadura seca en el mercado ecuatoriano* (Dissertação de Mestrado). Universidad Andina Simon Bolivar, Equador.
- Turner, B. C., Perkins, D. D. & Fairfield, A. (2001). *Neurospora* from Natural Populations: A global Study. *Fungal Genetics and Biology*, 32 (2), 67-92. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.2001.1247>.

Umaquimicairresistivel, [Consultado em 03.07.2013]. Disponível em [http://
http://umaquimicairresistivel.blogspot.pt/2011/06/indigestibilidade-do-
amido.html](http://http://umaquimicairresistivel.blogspot.pt/2011/06/indigestibilidade-do-amido.html)

Vásquez, S.E.P. (2013). *Utilización de la harina de malanga (xanthosoma sagittifolium) en la obtención de productos de panificación* (Dissertação de Mestrado). Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador.

Wikimedia, [Consultado em 15.10.2013]. Disponível em [http:// commons.wikimedia.org](http://commons.wikimedia.org)

6. ANEXOS

6.1. Especificações Técnicas do “Pão de Mafra”

Tabela 18: Especificações técnicas do “Pão de Mafra”

Parâmetros	Unidades	“Pão de Mafra”
Unidade fabril	N.A.	Concelho de Mafra
Farinha Trigo T65 ou T80	%	100
Farinha de Centeio	%	10
Água	%	80
Levedura	%	2
Sal	%	1,65
Moagens artesanal da Farinhas Trigo	%	> a 70
Tipo de forno	-	Fornos de alvenaria de tijolo refratário com aquecimento direto.
Amassadura	min	25 a 40
1ª Fermentação	min	25 a 45
2ª Fermentação (tabuleiro)	min	10 a 30
Cozedura	min	35 a 70

6.2. Registos das Temperaturas

Tabela 19: Registo de temperaturas (°C) nas diferentes fases de confeção dos produtos.

Tipo de Produto	Temp (massas)	Temp* (Produto à Saida dos Fornos)	Zona de Arrefecimento*	
			Após 4h	Após 5h
°C				
Pão de Mafra] 21;24[98,3/98,9/99,1/99,1	18,7/21,1/22,1/22,3	18,7/21,1/22,1/22,3
Pão Saloio de Forma] 21;24[98,3/98,7/98,5/98,4	22,5/24,0/25,2/24,6	20,5/22,3/22,9/22,4
Pão Redondo Saloio] 21;24[98,3	22,7*	2,4*

* Valores médios nos diferentes pontos do produto.

* P1 /P2 /P3 / P4 pontos térmicos, ver página 67.

Tabela 20: Registo das temperaturas (°C) e humidade relativa (%) da instalação fabril.

Tipo de Produto	Instalação Fabril				
	Produção	Arrefecimento	Embalamento	Cais de Expedição	
	°C				%
Pão de Mafra] 25;33[] 18;19[] 18;23[] 18;26[] 30;70[
Pão Saloio de Forma] 25;33[] 18;19[] 18;23[] 18;26[] 30;70[
Pão Redondo Saloio] 25;33[] 18;19[] 18;23[] 18;26[] 30;70[

6.3. Lista de Leveduras

Tabela 21: Lista de leveduras identificadas nos ensaios microbiológicos.

Leveduras
<i>Cladosporium sp</i>
<i>Alternaria sp</i>
<i>Penicillium</i>
<i>Neurospora Sp</i>
<i>Aspergillus flavipes gr</i>
<i>Aspergillus flavus gr</i>
<i>Aspergillus glaucus gr</i>
<i>Aspergillus candidus gr</i>
<i>Aspergillus niger gr</i>
<i>Mucor sp</i>
<i>Rhizopus sp</i>
<i>Trichoderma sp</i>
<i>Phoma sp</i>