

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FÚNGICA DE PERAS E OUTROS FRUTOS SECADOS

Inês Almeida¹, Raquel Guiné², Elisa Costa²

¹Escola Superior Agrária de Viseu, IPV, Viseu;

²CI&DETS, Escola Superior Agrária de Viseu, IPV.

Resumo

A conservação de peras pela secagem ocorre principalmente devido à inibição do crescimento microbiano, tornando a pêra secada um alimento mais seguro para os consumidores (Guiné, 2008). O conhecimento da flora microbiana é de grande importância para se garantir a sanidade dos consumidores.

O crescimento dos microrganismos pode ser prevenido devido à redução do conteúdo de humidade nas peras abaixo do nível crítico. Esse nível crítico é determinado por características particulares dos microrganismos e por características bioquímicas como a capacidade da água se ligar na pêra (actividade da água, aw), o que reduz a humidade livre (Pelczar, Chan e Krieg, 1996). Nos frutos secados os fungos só podem causar deterioração caso a aw seja relativamente elevada, pois não há crescimento microbiano para valores de aw entre 0,60 e 0,70 (Silliker, 1980).

As peras secadas estudadas foram obtidas por diferentes processos de secagem: Tradicional, numa estufa solar na Escola Superior Agrária de Viseu (ESAV), num secador solar na Escola Superior de Tecnologia de Viseu (ESTV) e num túnel de secagem na Universidade de Coimbra (UC).

Com este trabalho pretendeu-se isolar leveduras e fungos filamentosos a partir de amostras de pêra secada sujeitas aos diferentes processos de secagem. Neste sentido foram avaliadas as seguintes características bioquímicas da pêra secada: aw; humidade. Foi também realizada a avaliação de características morfológicas dos isolados obtidos.

Para comparação dos resultados obtidos para as pêras secadas pelos diferentes métodos de secagem, foram também sujeitas a uma caracterização bioquímica e fúngica ameixas secadas e uvas-passa, secadas por métodos industriais.

Relativamente às leveduras, os principais factores de caracterização baseiam-se no facto de crescerem à temperatura de 37° ou superiores, e transição dimórfica, por facilitar a adesão do fungo às células do hospedeiro.

Em relação aos fungos a sua caracterização baseia-se na observação do micélio macroscopicamente e a observação de hifas com paredes transversais, ou não, microscopicamente.

1. INTRODUÇÃO

As peras podem ser consumidas frescas, ou submetidas a técnicas de processamento, como a secagem (Park *et al.*, 2002). A conservação de alimentos pela secagem ocorre principalmente devido à inibição do crescimento microbiano, os microrganismos não são necessariamente eliminados (Ferreira e Sousa, 1998; Guiné, 2008).

Em Portugal, na região da Beira Alta, são produzidas peras secadas da variedade S. Bartolomeu (*Pyrus communis* L.) por um processo de secagem solar ao ar livre, que envolve as seguintes operações: colheita, descasque, primeira secagem, embarrelamento, espalma, segunda secagem e acondicionamento (Guiné e Castro, 2003; Barroca *et al.*, 2006). As peras secas segundo este processo são chamadas “pêra-passa” de Viseu.

Recentemente, o método de secagem tradicional de peras, tem sido substituído por outros métodos de secagem. Para a realização deste trabalho, para além das amostras do método de secagem tradicional, foram utilizadas amostras de peras secadas segundo outros processos de

secagem (Guiné *et al.*, 2010): secagem em estufa solar na Escola Superior Agrária de Viseu (ESAV); secagem num secador solar na Escola Superior de Tecnologia de Viseu (ESTV) e túnel de secagem na Universidade de Coimbra (UC). Com estes métodos consegue-se aproveitar, de igual forma, a energia solar e obtêm-se produtos de melhor qualidade, uma vez que os problemas relacionados com os contaminantes e infestantes são diminuídos (Guiné *et al.*, 2007). Há também uma redução do tempo de secagem.

As leveduras e os bolores estão incluídos no reino dos Fungos, que são organismos eucariotas heterotróficos, na sua maioria saprófitas, obtendo nutrientes a partir de matéria orgânica em decomposição (Loguercio-Leite *et al.*, 2005).

Os bolores são seres pluricelulares, constituídos por filamentos de células filiformes, longas e ramificadas, denominadas de hifas, que formam um micélio (Prescott, Harley e Klein, 1996). Fisiologicamente, adaptam-se a sobrecargas mais severas do que a maioria dos microrganismos. Podem crescer em substratos com concentrações elevadas de açúcar e em concentrações altas de ácidos, suportando variações de pH entre 2 e 9. Os bolores são capazes de sobreviver em alimentos desidratados, produzindo esporos ou entrando em estado de vida latente (Pelczar, Reid e Chan, 1980). Aqueles que podem crescer a uma actividade da água inferior a 0,85 são designados de xerófilos (Christian, 1980).

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente, por gemulação ou fissão binária, ou sexuadamente através da formação de esporos (Loguercio-Leite *et al.*, 2005). Algumas variedades de leveduras podem crescer na presença de altas concentrações de açúcar, que restringe o fornecimento de humidade, designadas de leveduras osmófilas. As leveduras crescem numa ampla faixa de variação térmica, de 0 a 47°C. Aceita-se, em geral, que as leveduras crescem melhor em meios ácidos, com pH entre 3,5 e 3,8 (Pelczar, Reid, Chan, 1980). As leveduras encontram-se abundantemente na natureza, particularmente em frutas, vegetais e cereais. O seu crescimento está limitado à superfície externa dos frutos sãos e intactos, não existindo internamente qualquer contaminação (Deak e Beuchat, 1996).

O crescimento dos microrganismos pode ser prevenido devido à redução do conteúdo de humidade do ambiente abaixo do nível crítico. Esse nível crítico é determinado por características particulares dos microrganismos e pela capacidade da água se ligar no alimento (actividade da água, a_w), o que reduz a humidade livre (Pelczar, Chan e Kreig, 1996). A a_w da maioria dos alimentos frescos é de 0,99, enquanto os frutos secados genericamente compreendem valores de a_w entre 0,85 e 0,61 (Christian, 1980). Os bolores xerófilos e as leveduras osmófilas são os microrganismos que habitualmente alteram os alimentos com essas actividades de água. Para valores de a_w inferiores a 0,65, muito poucos microrganismos são

capazes de crescer, e a deterioração é improvável que ocorra antes dos dois anos de conservação (Jay, 1991).

Em termos gerais, a segurança alimentar é conseguida através da aplicação de boas práticas de fabrico. Que por si só, não garante que os alimentos processados estejam isentos de microrganismos patogénicos (Forsythe e Hayes, 1998).

Este trabalho tem como objectivos isolar e caracterizar morfológicamente, leveduras e fungos filamentosos a partir de amostras em estudo, pela técnica de cultura, método padrão de referência segundo a norma International Organization for Standardization ISSO- 21527- 2 de 2008. A caracterização físico-química das 27 amostras em estudo teve por base a determinação dos valores de actividade de água (a_w) e humidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Determinação da actividade de água

Para exprimir o grau de água livre nos alimentos recorreu-se ao conceito de actividade da água (a_w). Este parâmetro é muito importante pois a água disponível é um dos principais factores externos que mais contribui para o desenvolvimento microbiano. Os valores da a_w variam entre 0 e 1 (para a água pura).

A a_w das amostras foi determinada com Higrómetro BTSR1. Este equipamento mede a humidade relativa (HR) gerada pela amostra, numa câmara isolada, à temperatura desejada (por exemplo 25°C) que deve ser estabilizada.

A leitura da humidade relativa foi feita após o valor ter estabilizado, e a a_w foi calculada por: $a_w = HR/100$.

2.2. Avaliação da humidade

A avaliação da humidade foi utilizada para determinar a quantidade de água livre presente no alimento, neste caso nas amostras de frutos secados.

A determinação da humidade foi feita pela diferença da massa inicial da amostra e da massa final após aquecimento até massa constante. Para esta determinação foi utilizada a balança de halogéneo modelo HG53 Mettler Toledo. As condições de utilização foram as seguintes:

- Fonte de calor: lâmpada de halogéneo;
- Temperatura de secagem: 120°C;
- Velocidade de secagem: 3 (intermédia).

2.3. Origem das amostras

Para a realização deste trabalho, foram analisadas 17 amostras de pêra secada, sujeitas a diferentes métodos de secagem, e ainda 5 de ameixa secada e 5 amostras de uva passa, obtidos por processos industriais (Tabela 1). Destas amostras, pretendeu-se isolar o maior número possível de leveduras e fungos filamentosos, pela sua importância a nível da deterioração de alimentos.

Tabela 1. Proveniência e respectivo número de amostras analisadas.

Proveniência de amostras	Número de amostras
“Tradicional”	5
“Solar ESAV”	4
“Estufa ESTV”	4
“Túnel de secagem da UC”	4
Ameixa secada	5
Sultana	5
Total	27

2.4. Tratamento das amostras

Após a aquisição das amostras de pêra secada sujeitas a diferentes tratamentos de secagem, ameixa secada e uva passa, obtidos por processos de secagem industrial, foi efectuado o tratamento em laboratório tendo por base a norma *International Organization for Standardization ISO- 21527- 2* de 2008.

As amostras sólidas não podem ser semeadas directamente em placas. Por esta razão, deve-se retirar uma porção de 25 g que seja representativa do total da amostra. De seguida a amostra foi homogeneizada utilizando o stomacher. Ao homogeneizado obtido acrescentou-se rigorosamente nove vezes o peso da amostra de água peptonada a 0,1% (m/v), para obtenção de uma diluição correspondente a 10^{-1} (suspensão-mãe), de acordo com a metodologia descrita na ISO- 21527- 2. Efectuaram-se diluições a partir de suspensão - mãe, até à diluição 10^{-6} .

2.5. Inoculação em meio selectivo

Uma pequena porção das diluições adequadas foi inoculada num meio de cultura selectivo, o SDA (Sabouraud Agar), suplementado com clorofenicol. Que após esterilização foi arrefecido até atingir os 50°C e colocou-se 15 ml do meio em cada placa de petri esterilizada. Após solidificação e secagem do meio, foi realizado a inoculação do meio de cultura com as diluições adequadas de amostra.

Todos os ensaios foram efectuados em duplicado. As placas foram examinadas de 2 a 2 dias durante os 7 dias de incubação, uma vez que os bolores apresentam um crescimento muito rápido, podendo mascarar o crescimento de leveduras.

2.6. Isolamento – Técnica de cultura

Para o isolamento de leveduras e bolores foi utilizada a técnica de cultura, em que colónias morfológicamente características do género (pelo menos 3) foram repicadas a partir do meio de cultura inicial, para o meio SDA, suplementado com clorofenicol.

Antes de levar a cabo testes de identificação ao microscópio óptico, é essencial assegurar que o crescimento em meio SDA é puro, examinando a morfologia das colónias.

2.7. Observação macroscópica e microscópica

Através da observação a olho nu da placa com crescimento fúngico podemos identificar algumas características macroscópicas.

Para a observação microscópica de leveduras e bolores foi utilizado o método de cultura em lâminas, este permite a preparação e observação sem perturbar o crescimento dos microrganismos, de acordo com a metodologia de Levy (Levy, 2000).

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1. Determinação da actividade de água

Para todas as amostras em estudo foram realizadas quatro medições da actividade da água, a uma temperatura estabilizada a 25°C.

Todas as amostras apresentam valores de a_w abaixo de 0,57, como se verifica na análise dos resultados expressos na tabela 2.

Tabela 2. Resultados da a_w para as diferentes amostras.

Amostra	Média	Desvio padrão
“Tradicional”	0,51	0,01
“Solar ESAV”	0,56	0,05
“Estufa ESTV”	0,54	0,02
“Túnel de secagem da UC”	0,57	0,03
Ameixa secada	0,56	0,01
Sultana	0,42	0,02

Segundo Silliker e outros, 1980, não existe crescimento microbiano para valores de aw abaixo de 0,60, isto significa que em todas as amostras analisadas é improvável haver crescimento fúngico, pois apresentam valores de aw demasiadamente baixos.

Das amostras de peras a secada pelo método tradicional é a que apresenta o teor de aw mais baixo, no entanto todas as amostras apresentam valores muito próximos.

3.2. Avaliação da humidade

Para todas as amostras em estudo foram realizadas quatro medições da humidade, a uma temperatura constante de 120 °C.

A amostra de ameixa secada é a que apresenta maior teor de humidade enquanto a amostra de sultana apresenta o menor teor de humidade, as amostras de peras apresentam valores compreendidos entre 9 e 17 %Humidade, como se pode ver na tabela 3.

Tabela 3. Resultados da percentagem de humidade para as diferentes amostras.

Amostra	Média	Desvio Padrão
“Tradicional”	9,92	2,60
“Solar ESAV”	11,81	2,15
“Estufa ESTV”	11,95	2,48
“Túnel de secagem da UC”	13,93	2,90
Ameixa secada	25,66	5,42
Sultana	0,32	0,19

As frutas secadas normalmente apresentam valores entre 15 a 20% de humidade, de todas as amostras a única que ultrapassa estes valores é a ameixa secada com valores que rondam 25,66% humidade. As amostras de pêra contém teores de humidade inferiores aos comuns nas frutas secadas, deste modo poderão estar mais protegidas contra ataques fúngicos.

3.3. Isolados obtidos

Realizou-se a técnica de cultura, método de referência recomendado pela norma ISO-21527- 2 de 2008, para a detecção de leveduras e bolores em frutos secados, com uma actividade de água inferior a 0,95.

No quinto dia de incubação a placa inoculada com a diluição 10^{-1} da pêra de secagem Tradicional apresentava um fungo, figura 1. Nas restantes placas continuava a não haver crescimento de fungos.

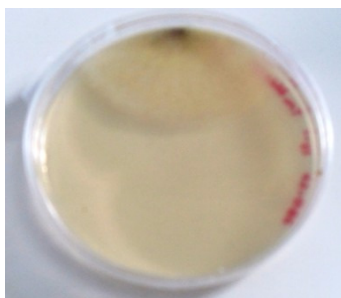


Figura 1. Fungo na diluição 10^{-1} na amostra de pêra tradicional.

No sétimo dia de incubação os resultados permaneceram iguais. O fungo na placa inoculada com a diluição 10^{-1} da pêra de secagem Tradicional proliferou (Figura 2).

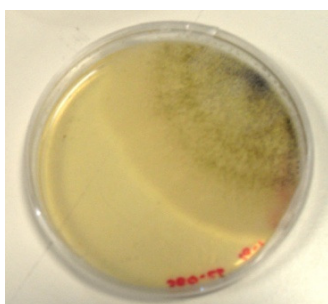


Figura 2. Fungo na placa inoculada com a diluição 10^{-1} da pêra de secagem Tradicional no 7º dia de incubação.

Nas restantes amostras, “Solar ESAV”, “Estufa ESTV”, “Túnel de secagem da UC”, ameixa secada, sultana, não houve crescimento fúngico.

3.4. Observação macroscópica e microscópica

Realizou-se a observação de características macroscópicas e microscópicas do fungo obtido na diluição 10^{-1} da amostra de pêra secada pelo método Tradicional.

Observaram-se características macroscópicas como (ver tabela 4) (Levy, 2000): tipo de colônia, filamentosas no caso dos bolores e cremosa no caso das leveduras; a cor da colônia; a textura da colônia que pode ser pulverulenta, algodoadada e aveludada; o tamanho das colônias, se invadem a placa toda ou se são limitadas; se são visíveis esporos a olho nu; se o verso é liso ou rugoso; a cor do verso.

Após a visualização macroscópica foi identificado um bolor devido à formação de colônias filamentosas que apresentam uma textura algodoadada.

Observaram-se características microscópicas como (ver tabela 5) (Levy, 2000): o tipo de hifas, se são segmentadas ou não segmentadas; o tipo de formação de esporos, se são formados nas extremidades das hifas ou dentro das hifas; forma e ornamentação dos esporos; o tipo de estrutura reprodutiva e a cor dos esporos.

Tabela 4 Caracterização macroscópica do fungo da amostra “Tradicional”.

Características macroscópicas	
Tipo de colónia	Filamentosa
Cor da colónia	Branco e preto
Textura da colónia	Algodoadada
Tamanho da colónia	Limitada (não invade a placa toda)
Esporos	Visíveis a olho nu
Verso	Liso
Cor do verso	Branco

Tabela 5 Caracterização microscópica do fungo da amostra "Tradicional".

Características microscópicas	
Tipo de hifas	Não segmentadas, cenocíticas.
Formação de esporos	Extremidade das hifas.
Forma e ornamentação dos esporos	Esporangiósporos redondos e aparecem na base dos esporangióforos.
Estrutura reprodutiva	Esporangióforos não ramificados.
Cor dos esporos	Castanho esverdeado

O bolor apresenta um conjunto de hifas cenocíticas visualizadas ao microscópio. Nas extremidades das hifas existe a formação de esporos castanhos esverdeados redondos que são formados na base dos esporangióforos que não são ramificados, estas características são comuns nas espécies de *Rhizopus*.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os valores de aw obtidos, as amostras apresentam valores muito baixos, inferiores a 0,60, que não possibilitam o crescimento microbiano.

A ameixa secada é a amostra com maior percentagem de humidade, o que pode vir eventualmente a favorecer o crescimento fúngico.

Não se obteve isolados de leveduras e fungos filamentosos das amostras de “Solar ESAV”, “Estufa ESTV”, “Túnel de secagem da UC”, ameixa secada e sultana.

Na amostra de pêra obtida por secagem Tradicional foi possível obter, apenas na diluição 10^{-1} , um fungo filamentoso. Para além de conter uma actividade da água inferior a 0,60, neste método de secagem há maior exposição a agentes microbianos devido ao facto dos frutos serem secos por exposição directa ao sol.

Nas amostras ESAV, ESTV, UC, ameixa secada e sultana não houve crescimento fúngico, pois estas contêm uma actividade da água abaixo do valor mínimo para o desenvolvimento fúngico. Para além disso, estas amostras são secadas por métodos que têm em conta as condições higiénicas do meio envolvente e dos utensílios, nestes métodos há ainda o controlo da humidade atmosférica e da temperatura de secagem.

O método de secagem tradicional deve ser melhorado ou substituído por um dos outros métodos analisados, de forma a proporcionar uma conservação mais longa do produto e uma maior segurança para o consumidor.

Agradecimentos: Os autores agradecem à FCT o financiamento concedido através do projecto PTDC/AGR-ALI/74587/2006.

Referências

- Barroca M J, Guiné R P F, Pinto A, Gonçalves F M e Ferreira D M S (2006). Chemical and Microbiological characterization of Portuguese varieties of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 84, 109-113.
- Christian J H B (1980). Actividad de agua reducida. Silliker J H, Elliott R P, Baird-Parker A C, Bryan F L, Christian J H B, Clark D S, Olson J C, Roberts T A (Eds). *Ecologia microbiana de los alimentos*. Zaragoza, Editorial Acribia – 1980: 4.
- Ferreira W F C e Sousa J C F (1998). *Microbiologia*. Volume II, Lidel: 297-306.
- Forsythe S J e Hayes P R (1998). *Food hygiene, microbiology and HACCP*. 2ª ed. An Aspen Publication: 8-11, 86 e 87.
- Deak Tibor e Beuchat Larry R. 1996. *Handbook of Food spoilage*. CRC., Inc., Boca Raton, USA
- Guiné R P F. e Castro, J.A.A.M. (2003). Analysis of moisture content and density of pears during drying, *Drying Technology*, 21(3): 581-591.
- Guiné R P F, Ferreira D M S, Barroca M J e Gonçalves F M (2007). Study of the drying Kinetics of solar-dried pears. *Biosystems Engineering*, 98, 422-429.
- Guiné R P F (2008). Pear drying: Experimental validation of a mathematical prediction model. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 248-253.
- Guiné R P F, Lima M J, Barroca M J e Ferreira D (2010). Analysis of the alterations in the color of pears dried under diferent systems. 17th International Drying Symposium, Magdeburg, Alemanha.
- International Organization for Standardization ISO- 21527 – 2* (2008). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeast and moulds. Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*.
- Jay J M (1991). *Modern food microbiology* (4ª Edição). New York, Chapman & Hall One penn Plaza: 15, 356-371.
- Levy C E (2000). *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar*. Salvador: módulo VII.
- Loguercio-Leite C, Groposo C, Dreschler-Santos E R, Figueiredo N F, Godinho P S, Abrão R L (2005). A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. *Biotemas*, 19, 17-27.
- Park, K.J., Bin, A., Brod, F.P.R. e Park, T.H.K.B., 2002, Drying of pear d’anjou with and without osmotic dehydration, *Journal of Food Engineering*, 56: 97-103.
- Pelczar M, Reid R, Chan E C S, 1980. *Microbiologia*. Brasil, MAKRON Books do Brasil Editora. . Volume I: 315-363.

- Pelczar Jr. J M, Chan E C S, Krieg N R, 1996, Microbiologia: conceitos e aplicações, volume II, 2ª ed., MAKRON Books do Brasil Editora.
- Prescott L M, Harley J P, Klein D A, 1996, Microbiology, (3ª ed.), United States of America, Wm. C. Brown Publishers: 503-515.
- Silliker J H, Elliott R P, Baird-Parker A C, Bryan F L, Christian J H B, Clark D S, Olson J C, Roberts T A, 1980. Ecologia microbiana de los alimentos, volume II, Productos alimentícios, Editorial ACRIBIA S.A., Zaragoza.