

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FÚNGICA DE PERAS SECADAS POR DIFERENTES PROCESSOS

Inês Almeida, Elisa Costa, Raquel Guiné

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. Nos frutos secados, os fungos só podem causar deterioração caso a actividade da água (a_w) seja relativamente elevada, uma vez que não há crescimento microbiano para valores de a_w inferiores a 0,60.

As peras secadas estudadas foram obtidas por diferentes processos de secagem: Tradicional por exposição directa ao sol, 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).

Pretendeu-se isolar e caracterizar morfológicamente leveduras e bolores a partir de amostras em estudo, pela técnica de cultura, método padrão de referência segundo a norma International Organization for Standardization ISO- 21527- 2 de 2008. A caracterização físico-química das 17 amostras em estudo teve por base a determinação dos valores de actividade de água (a_w) e humidade.

Para a obtenção de isolados de leveduras e fungos filamentosos, foi realizada a inoculação das respectivas amostras em estudo num meio de cultura selectivo, o SDA (Sabouraud Agar), suplementado com cloranfenicol. As placas foram examinadas de 2 a 2 dias durante os 7 dias de incubação, uma vez que os fungos filamentosos apresentam um crescimento muito rápido, podendo mascarar o crescimento de leveduras. Durante o exame das placas foi registado a presença ou não de leveduras e fungos filamentosos, assim como o número e aspecto morfológico.

Os resultados obtidos da caracterização bioquímica das amostras em estudo demonstram que todas as amostras apresentam uma actividade da água inferior a 0,60.

Após incubação dos inóculos só se observou o crescimento de um bolor nas amostras de pêra secada pelo método tradicional, o que nos permite concluir que as amostras em estudo, dado aos seus valores baixos em a_w e humidade, não permitem o crescimento e proliferação dos mesmos.

1. INTRODUÇÃO

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, e estão particularmente envolvidos na mineralização da matéria orgânica do solo. A maioria apresenta um genoma haplóide e a parede celular é composta tipicamente por quitina e glucanos. Crescem melhor no escuro e habitats húmidos (Loguercio-Leite *et al*, 2005; Deacon, 2006; Santos *et al*, 2009). Os verdadeiros bolores e leveduras que produzem ascósporos nos ascos estão incluídos na classe dos Ascomycetes. Outros formam basidiósporos nos basídios, por isso pertencem à classe dos Basidiomycetes, e outros ainda por não se conhecer o ciclo de reprodução sexuada estão incluídos nos Deuteromycetes (Pelczar *et al*, 1980). Os verdadeiros bolores podem ainda ser incluídos na classe dos Zygomycetes por produção sexuada formando o zigoto que origina os zigósporos ou assexuada onde o esporangióforo reproduz os esporangiósporos (Pelczar *et al*, 1980).

Os fungos são ubíquos, podendo, por isso ser isolados de vários ambientes: do ar, das superfícies, das plantas, do solo, dos alimentos e da nossa pele. Para se conseguir caracterizar morfológicamente os fungos é necessário escolher meios de cultura e condições de incubação adequadas ao tipo de Fungos a pesquisar.

1.1. Bolores

Os bolores são seres pluricelulares, constituídos por filamentos de células filiformes, longas e ramificadas, denominadas de hifas, que formam um micélio (Prescott *et al* 1996).

Em alguns fungos, existem septos ao longo de toda a hifa, resultantes da invaginação da parede do filamento, denominadas hifas septadas, que podem ser mononucleados ou multinucleados (Prescott *et al*, 1996). Em outros fungos o fluxo do protoplasma através das hifas é interrompido pelas paredes transversais ou septos, derivadas das paredes dos filamentos, estas hifas são chamadas de hifas não-septadas (cenocíticas) (Pelczar *et al*, 1980).

Os bolores podem reproduzir-se através de esporos assexuados ou sexuados. Os esporos sexuados são produzidos menos frequentemente e menos abundantemente do que os assexuados. Com frequência podem ser só produzidos em circunstâncias especiais,

de modo que é possível estarem ausentes no cultivo de fungos em meios comuns (Pelczar *et al*, 1980).

Fisiologicamente, os bolores 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, embora o óptimo para a maioria das espécies esteja entre 5 e 6. Ainda que a humidade seja exigida para o seu desenvolvimento e que possam captar água da atmosfera ou do meio nutritivo, os bolores são capazes de sobreviver em alimentos desidratados, produzindo esporos ou entrando em estado de vida latente (Pelczar *et al*, 1980). Aqueles que podem crescer a uma actividade da água inferior a 0,85 são designados de xerófilos, como por exemplo o *Aspergillus glaucus* (Christian, 1980).

No caso dos bolores o micélio pode ser visualizado a olho nu, como um conjunto confuso de fios finos que pode ser incolor ou colorido, dependendo da espécie. Os bolores podem estar presentes nos alimentos de três formas: i) no estado vegetativo, isto é, sob a forma de micélio sem produção de estruturas de reprodução especializadas; ii) no estado reprodutivo, com formação de esporos; iii) sob a forma de esporos ou estruturas de resistência. Nos dois primeiros casos, o bolor está a crescer no substrato, podendo produzir e excretar enzimas de degradação e/ou metabolitos secundários, como micotoxinas; no terceiro caso, podem colonizar o substrato, mas não estão activos metabolicamente. Ao microscópio óptico é possível distinguir três morfologias das hifas: as sepadadas mononucleadas, as septadas multinucleadas e as cenocíticas. (Pelczar *et al*, 1980; Loguercio-Leite *et al*, 2005).

Outro aspecto é a coloração da parede, que nos bolores é determinada por diferentes pigmentos (Hosoe *et al*, 1999; Sakaki *et al*, 2000), encontrados principalmente na parede, mas que também podem estar presentes nos fluidos, livres da parede e, estão, geralmente, na forma de grânulos (Butler e Day, 1998). Os pigmentos da parede, frequentemente polifenólicos, funcionam presumivelmente como reforço da rede de proteínas e polissacarídeos, através de ligações cruzadas oxidativas ou pela impregnação com um polímero hidrofóbico (Peter, 2001). Tais pigmentos podem conferir diferentes colorações às culturas e às frutificações. Muitas micotoxinas também são pigmentadas, como por exemplo, as naftoquinonas de *Penicillium* e *Aspergillus* (Buzzini e Martini, 1999; Durán *et al*, 2001).

1.2. Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente, por gemulação ou fissão binária. Em algumas leveduras, a divisão celular ocorre sexuadamente através da formação de esporos. As leveduras apresentam-se com células de formas variadas, geralmente redondas, ovóides ou cilíndricas (Loguercio-Leite *et al*, 2005).

Quando ocorrem em conjunto em diversos substratos (frutas, material em decomposição, paredes, lentes de vidro, entre outros) as culturas (ou colónias) de leveduras podem ser vistas a olho nu. Apresentam, quando isoladas *in vitro*, cores variadas e aspecto céreo brilhante, similares às bactérias. No geral, as células das leveduras são maiores do que as bactérias, as suas dimensões variam consideravelmente, com limites desde 1 a 5 µm de largura e 5 a 30 µm (ou mais) de comprimento. Cada espécie tem uma forma característica mas, mesmo em culturas puras, há consideráveis variações de tamanho e de forma das células individuais, dependendo da idade e do ambiente. Apesar das leveduras se apresentarem na forma unicelular, em condições especiais podem desenvolver pseudohifas que se assemelham ao crescimento micelial dos bolores. Estes são designados de fungos dimórficos e incluem várias espécies patogénicas para os humanos, por exemplo *Candida albicans* que geralmente cresce na forma de levedura nas mucosas dos humanos e forma hifas para invadir os tecidos do hospedeiro (Prescott *et al*, 1996; Loguercio-Leite *et al*, 2005; Deacon, 2006). Podem ocorrer variações fenotípicas das leveduras numa cultura, como alteração da forma colonial lisa para a forma rugosa. As leveduras podem perder a capacidade de esporular, se forem mantidas, durante longos períodos de tempo, em meios artificiais (Pelczar *et al*, 1980; Loguercio-Leite *et al*, 2005).

Em meios de cultura apropriados, as colónias de leveduras variam quanto ao tamanho, à textura e aos bordos. Por exemplo, algumas colónias são lisas, outras enrugadas; algumas são achatadas, outras elevadas; algumas têm bordos inteiros, outras apresentam bordos irregulares ou filamentosos. As colónias jovens têm uma consistência comparável à de uma pasta espessa, a qual, após o envelhecimento, se torna mais espessa e mais seca; podem ser produzidos pigmentos (Pelczar *et al*, 1980).

Algumas variedades de leveduras podem crescer na presença de altas concentrações de açúcar, que restringe o fornecimento de humidade, designadas de leveduras osmófilas, como por exemplo *Zygosaccharomyces rouxii*. As leveduras crescem numa ampla faixa de variação térmica, de 0 a 47°C; algumas não se desenvolvem acima de 15°C, enquanto outras não se reproduzem abaixo dessa temperatura. A temperatura óptima para a maioria das leveduras é de 20 a 30°C, embora as espécies patogénicas cresçam bem entre 30 e 37°C. Aceita-se, em geral, que as leveduras crescem melhor em meios ácidos, com pH entre 3,5 e 3,8, contudo os limites de tolerância estão situados entre pH 2,2 e 8,0 de acordo com as diversas espécies (Pelczar *et al*, 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 (Tibori e Larry, 1996).

Na indústria alimentar as leveduras desempenham um papel importante. São utilizadas no fabrico do pão e na produção de bebidas alcoólicas. No entanto, as leveduras podem ser também agentes de contaminação e deterioração dos alimentos devido à sua capacidade de crescer a temperaturas baixas e à sua tolerância a ambientes de stress físico-químicos, como são os utilizados na conservação de alimentos (Mendes-Ferreira, 2000). Por esta razão, são frequentemente isoladas de produtos com elevadas concentrações de açúcar, particularmente espécies do género *Zygosaccharomyces* (Tibori e Larry, 1996).

Algumas leveduras apresentam também a capacidade de causarem doenças em humanos, plantas e animais. As leveduras são patogénicos oportunistas capazes de provocar doenças em hospedeiros que apresentem um sistema imunitário que se encontre comprometido ou disfuncional (Van Burik e Magee, 2001).

1.3. Os fungos e a conservação dos alimentos

Os alimentos não apresentam somente um valor nutricional, para quem os consome, mas também um meio de cultura ideal para o desenvolvimento microbiano (Ferreira e Sousa, 1998). Os microrganismos apresentam um papel importante na indústria alimentar, podendo ser utilizados para a transformação de alimentos, como por exemplo vinhos, queijos e pão. Dependendo do tipo de microrganismos e a sua proliferação pode resultar a conservação ou

deterioração dos alimentos. No entanto, os alimentos podem ser veículos de transmissão de doenças, pelo que a sua detecção e controlo de patogénicos como de microrganismos de alteração, são importantes aspectos da microbiologia dos alimentos (Ferreira e Sousa, 1998).

A deterioração dos alimentos pode ser resultante de factores físicos, modificações químicas, actividade biológica e desenvolvimento microbiano (Forsythe e Hayes, 1998). O último factor vai ser explicitado de seguida realçando a sua importância na sanidade dos alimentos.

São vários os factores intrínsecos e extrínsecos aos alimentos que afectam o desenvolvimento microbiano. Os factores intrínsecos, relacionados com o próprio alimento, incluem o pH, o teor de humidade, a actividade de água (a_w), o potencial de oxidação-redução, os nutrientes, os constituintes antimicrobianos e as estruturas biológicas (Ferreira e Sousa, 1998). Quanto aos factores extrínsecos, relacionados com o ambiente de armazenamento, incluem a temperatura humidade relativa e presença e concentração de gases (CO_2 e O_2) (Jay, 1991).

A conservação de alimentos pela secagem ocorre principalmente devido à inibição do crescimento microbiano, contudo, os microrganismos não são necessariamente eliminados. Sob o ponto de vista qualitativo e quantitativo, os microrganismos presentes num alimento processado dependem da qualidade microbiológica do produto fresco e dos procedimentos seguidos até ao seu embalamento (Ferreira e Sousa, 1998). 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 *et al*, 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), ou seja, os fungos só podem causar deterioração caso a a_w seja relativamente elevada, pois não há crescimento microbiano para valores de a_w abaixo de 0,60 (Silliker *et al*, 1980). Os bolores xerófilos e as leveduras osmófilas são os microrganismos que habitualmente alteram os alimentos com actividades de água entre 0,85 e 0,61, e na tabela 2 pode-se ver alguns exemplos desses bolores e leveduras. Os bolores desenvolvem-se à superfície se

existem condições de aerobiose e as leveduras fermentativas na espessura destes produtos, produzindo dióxido de carbono (Christian, 1980). Os bolores são germes com menor grau de exigência em energia, fonte de azoto, vitaminas e minerais, seguidos pelas leveduras e bactérias (Silliker *et al*, 1980).

O pH dos alimentos é de extrema importância, atendendo a que valores baixos de pH favorecem o crescimento de leveduras e bolores. A temperatura e a humidade relativa são importantes factores extrínsecos que podem determinar a alteração microbiana dos alimentos (Jay, 1991). Também a atmosfera onde os alimentos são conservados é muito importante, entre outros. Todos estes factores estão relacionados directa ou indirectamente com a actividade da água do alimento. Quando um destes valores se desvia do valor óptimo pode haver um estreitamento do intervalo da actividade da água favorecendo o crescimento microbiano. Produtos alimentares com pH inferior a 5,0 ou com a_w inferior a 0,90 são estáveis e não requerem refrigeração (Christian, 1980). Para valores de a_w inferiores a 0,70 a deterioração é improvável que apareça antes de duas semanas de conservação e há poucos tipos de microrganismos que se desenvolvam. Para valores inferiores a 0,65, poucos microrganismos são capazes de crescer, e a deterioração é improvável que ocorra antes dos dois anos de conservação (Jay, 1991).

No caso dos frutos, os fenómenos de alteração são iniciados pelos bolores, cujas enzimas contribuem para o amolecimento e posterior penetração de outros micróbios através da membrana exterior. Vários bolores são capazes de produzir micotoxinas que se tornam tóxicas para os humanos e animais. Algumas espécies destes bolores podem atravessar a pele do fruto e produzir micotoxinas no interior antes e depois da recolha (Silliker *et al*, 1980).

As peras antes de submetidas ao processo de secagem apresentam uma humidade de cerca de 80%, e no final da secagem há uma diminuição para cerca de 20%. Comparando o teor de humidade das peras secadas pelos diferentes processos, as que têm valores mais baixos de humidade são as secadas na estufa solar da ESTV, verificando-se valores de humidade semelhantes entre as peras secadas tradicionalmente e as secadas no túnel de secagem da UC (Guiné *et al*, 2009). As peras secadas na estufa solar da ESAV, segundo Barroca *et al* (2006), apresentam uma actividade da água de 0,47. A pêra secada tem um teor de humidade relativamente baixo (cerca de 20%), e uma actividade da água muito baixa, o que inibe ou

retarda o crescimento microbiano e, conseqüentemente, confere maior segurança alimentar (Barroca *et al*, 2006).

Nos bolores associados à deterioração dos alimentos podemos considerar três grupos: os que colonizam as plantas durante todo o seu ciclo de vida e que se tornam mais abundantes com a senescência dos tecidos vegetais (*Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Pleospora*, *Trichothecium* e *Mucurales*); os de armazenagem que se desenvolvem após a colheita das plantas e que tendem a substituir os bolores primários como é o caso dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*; os que tendem a instalar-se numa fase posterior como os gêneros *Chaetomium* e *Sordaria* (Ascomycota) (Lopes e Martins, 2010).

Na pêra os bolores mais encontrados são: *Rhizopus*, *Podosphaera*, *Penicillium*, *Alternaria*. *Rhizopus* e *Penicillium* são fungos xerófilos como tal estes podem suportar o método de secagem. Nas frutas secas ao sol o grupo mais comum é o dos fungos, dos quais *Aspergillus* é o mais encontrado, como o *Aspergillus flavus* (Silliker *et al*, 1980).

As espécies do género *Aspergillus* são fungos xerófilos e na maioria saprófitas ou patogénicos oportunistas de plantas, capazes de crescer até baixas actividades de água e com temperaturas elevadas, dominando ambientes quentes e/ou secos. Adicionalmente, algumas espécies de *Aspergillus* são termófilas, capazes de crescer até temperaturas máximas de 55 °C, como por exemplo *A. fumigatus*. As espécies de *Aspergillus* regra geral crescem rápido, apesar de tardarem mais a esporular. Os seus esporos são resistentes à radiação solar e a agentes químicos (Pitt e Hocking, 1997). O fungo filamentoso *Aspergillus* aparece na cor amarela, verde ou preta em largo número nos alimentos (Christian, 1980).

Os géneros *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus* podem ser distinguidos pela visualização microscópica de características particulares (Levy, 2000).

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. O objectivo é a obtenção de alimentos com o mais baixo teor de microrganismos e que seja seguro para o consumidor. O seu sucesso de aplicação na indústria alimentar, depende dos esforços que previamente forem feitos, no sentido de limitar o número de pontos críticos a controlar (Forsythe e Hayes, 1998).

2. EXPERIMENTAL

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 à temperatura de 25°C \pm 2°C e após o valor de HR 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. Isolamento de leveduras e fungos filamentosos em frutos secados

Para se conseguir isolar fungos é necessário escolher meios de cultura e condições de incubação adequadas ao tipo de fungos a pesquisar. Existem meios generalistas e meios específicos. Um dos meios generalistas amplamente usado em alimentos é o Sabouraud agar (SDA) suplementado com clorofenicol, que se destina a pesquisar fungos capazes de crescer em alimentos secos, com baixas actividades de água. Os meios de propósitos generalistas têm de cumprir vários requisitos (Serra, 2005):

- Inibir o crescimento bacteriano, sem afectar o crescimento fúngico;
- Serem nutricionalmente adequados e suportarem fungos de crescimento lento;
- Suprimirem o crescimento de fungos de crescimento rápido (por exemplo, Mucorales), sem o suprimirem completamente, para que possam ser detectados;
- Abrandar o crescimento dos fungos, de forma a permitir uma contagem razoável de colónias por placa, sem inibir a germinação dos esporos.

Este trabalho tem como objectivos isolar e caracterizar morfológicamente, leveduras e bolores a partir de amostras de frutos secados sujeitos a diferentes processos de secagem, pela técnica de cultura, método padrão de referência segundo a norma International Organization for Standardization ISO- 21527- 2 de 2008.

2.4. Origem das amostras

Para a realização deste trabalho, foram analisadas 17 amostras de pêra secada, sujeitas a diferentes métodos de secagem: 5 da secagem tradicional, 4 da estufa solar da ESAV, 4 da estufa da ESTV e 4 do túnel de secagem da UC.

Destas amostras, pretendeu-se isolar o maior número possível de leveduras e bolores, pela sua importância a nível da deterioração de alimentos.

2.5. 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 ISSO- 21527- 2. Efectuaram-se diluições a partir de suspensão-mãe, até à diluição 10^{-6} .

2.6. Inoculação no 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, de acordo com a metodologia referida na Tabela 1.

Tabela 1 – Inoculação do meio de cultura com as diluições adequadas de amostra.

-
- 1 Identificar as placas com a referência da amostra, dia e mês.
 - 2 Transferir com a pipeta 0,1 ml das respectivas diluições preparadas das amostras para o meio de cultura SDA.
 - 3 Distribuir o inóculo uniformemente à superfície da placa, com uma zaragatoa estéril.
 - 4 Incubar as placas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 2 a 7 dias
-

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. Durante o exame das placas é importante registar a presença ou não de microrganismos assim como o número e aspecto morfológico.

2.7. 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.

2.8. Observação macroscópica e microscópica

Através da observação a olho nu da placa com crescimento fúngico pode-se 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. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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. Segundo Silliker *et al* (1980), não existe crescimento microbiano para valores de a_w abaixo de 0,60; isto significa que em todas as amostras analisadas é improvável haver crescimento fúngico, pois apresentam valores de a_w demasiadamente baixos. Das amostras de peras, a secada pelo método tradicional é a que apresenta o teor de a_w mais baixo, no entanto todas as amostras apresentam valores muito próximos.

Tabela 2 – Resultados da a_w para as diferentes amostras.

Amostra	a_w ¹	a_w ²	a_w ³	a_w ⁴	Média	Desvio padrão
“Tradicional”	0,51	0,52	0,52	0,50	0,51	0,01
“Solar ESAV”	0,63	0,53	0,53	0,54	0,56	0,05
“Estufa ESTV”	0,53	0,53	0,56	0,55	0,54	0,02
“Túnel de secagem da UC”	0,59	0,57	0,59	0,52	0,57	0,03

3.2. Avaliação da humidade

Para todas as amostras em estudo foram realizadas quatro medições da humidade, a uma temperatura constante de 120 °C. As amostras de peras apresentam valores médios de humidade compreendidos entre 9 % para a tradicional e 14 % para o túnel de secagem, como se pode ver na tabela 3. As frutas secadas normalmente apresentam valores entre 15 a 20% de humidade, pelo

que as amostras de pêra contém teores de humidade inferiores aos comuns nas frutas secadas, como tal poderão estar mais protegidas contra ataques fúngicos.

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

Amostra	H (%) ¹	H (%) ²	H (%) ³	H (%) ⁴	Média	Desvio Padrão
“Tradicional”	9,53	9,46	13,47	7,21	9,92	2,60
“Solar ESAV”	9,00	12,05	14,25	11,94	11,81	2,15
“Estufa ESTV”	10,84	9,85	11,59	15,51	11,95	2,48
“Túnel de secagem da UC”	10,04	17,03	14,61	14,03	13,93	2,90

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 1a). Nas restantes placas continuava a não haver crescimento de fungos, como se pode observar na figura 1b).

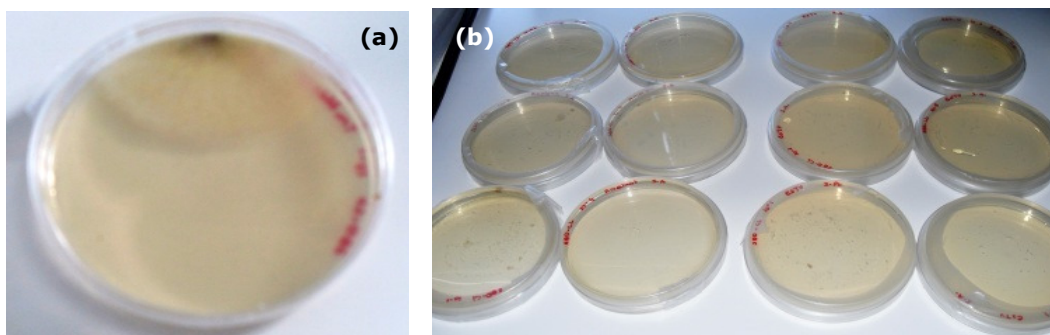


Figura 1 – (a) Fungo na diluição 10⁻¹ na amostra de pêra tradicional. (b) Placas inoculadas sem crescimento fúngico no quinto dia de incubação.

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).

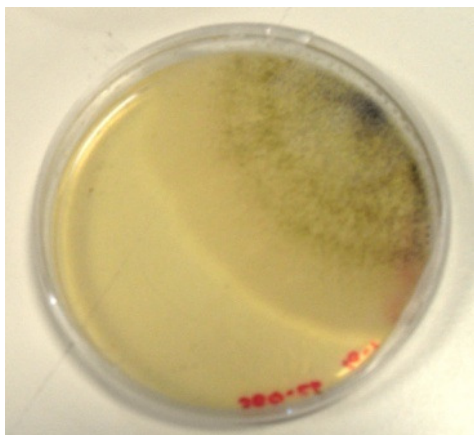


Figura 2 - Fungo na placa inoculada com a diluição 10^{-1} da pêra de secagem Tradicional no 7º dia de incubação.

Nas restantes amostras, "Solar ESAV", "Estufa ESTV" e "Túnel de secagem da UC", 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, filamentosa no caso dos bolores e cremosa no caso das leveduras; a cor da colônia; a textura da colônia que pode ser pulverulenta, algodoada 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.

Tabela 4 - Caracterização macroscópica do fungo da amostra "Tradicional".

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

Após a visualização macroscópica foi identificado um bolor devido à formação de colónias filamentosas que apresentam uma textura algodoada. 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 7 – 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. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- De acordo com os valores de aw obtidos, as amostras apresentam valores muito baixos que não favorecem o crescimento microbiano.
- Das amostras de peras, a secada pelo método tradicional é a que apresenta teores de humidade e aw mais baixos.
- Não se obteve isolados de leveduras e fungos filamentosos das amostras de "Solar ESAV", "Estufa ESTV" e "Túnel de secagem da UC".
- 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 e um teor de humidade mais baixo, 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 e UC não houve crescimento fúngico, pois estas contêm uma actividade da água abaixo do valor mínimo para o desenvolvimento fúngico, ($a_w = 0,60$), e ainda apresentam teores de humidade baixos. Para além disso, estas amostras são secadas por métodos que têm em conta os factores intrínsecos e extrínsecos que afectam o desenvolvimento microbiano.
- O bolor que cresceu na amostra de pêra de secagem tradicional pertence ao género *Rhizopus* o qual é muito comum nas frutas frescas por causar apodrecimento. Este é um bolor xerófilo capaz de sobreviver em condições adversas como as da fruta secada. As espécies de *Rhizopus* podem produzir micotoxinas, no entanto as características bioquímicas das pêras secadas não o possibilitam. Desta forma o bolor não é patogénico para os humanos, provocando apenas a deterioração do alimento.
- A existência de *Rhizopus* na pêra Tradicional pode ter a ver com o mau acondicionamento da fruta fresca e com o aproveitamento de peras para conservação que apresentam deterioração.
- Salienta-se que o crescimento de apenas um fungo não tem uma importância real para a sanidade do alimento, uma vez que as amostras não estão sujeitas a ambientes de assepsia antes e após a secagem e durante o armazenamento. No entanto, devem-se tomar medidas de controlo para que não haja a proliferação do bolor.
- O método de secagem tradicional deve ser melhorado ou substituído por um dos outros métodos analisados, de forma a proporcionar uma conservação mais prolongada do produto e uma maior segurança para o consumidor.
- Nos métodos alternativos de secagem de pêra conseguem-se obter características bioquímicas semelhantes ao método de secagem Tradicional, com a vantagem de poderem evitar problemas de contaminantes e de infestantes.
- As pêras secadas, devido ao seu carácter bioquímico, não necessitam de ser conservados sob refrigeração, e têm um tempo de vida útil longo, se forem mantidas ao abrigo da luz e em ambientes secos para que não haja rehidratação.

Referências

- Barroca MJ, Guiné RPF, Pinto A, Gonçalves FM e Ferreira DMS (2006). Chemical and Microbiological characterization of Portuguese varieties of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 84, 109-113.
- Butler MJ, Day AW (1998) Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1115-1136.
- Buzzini P, Martini A (1999) Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw material of agro-industrial origin. *Bioresearch Technology*, 71, 41-44.
- Christian JHB (1980) Actividad de agua reducida. Silliker JH, Elliott RP, Baird-Parker AC, Bryan FL, Christian JHB, Clark DS, Olson JC, Roberts TA (Eds). *Ecologia microbiana de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Deacon J (2006) *Fungal biology* (4ª Edição). UK: Blackwell publishing.
- Durán N, Teixeira MFS, De Conti R, Esposito E (2001) Ecological-friendly pigments from fungi. *Critical Review Food Science Nutrition*, 42, 53-66.
- Ferreira WFC e Sousa JCF (1998) *Microbiologia*. Volume II, Lisboa: Lidel.
- Forsythe SJ e Hayes PR (1998) *Food hygiene, microbiology and HACCP*. 2ª ed. Aspen Publications.
- Guiné RPF, Barroca MJ, Lopes P, Silva V, Santos M e Ferreira DMS (2009) Comparação entre as propriedades das peras secadas sob diferentes métodos. *Ação de divulgação, Viseu: ESAV*.
- Hosoe T, Fukushima K, Takizawa K, Miyaji M, Kawai K (1999) Three pyrrolyloctatetraenyl-a-pyrone from *Auxarthron conjugatum*. *Phytochemistry*, 52, 459-463.
- Jay JM (1991) *Modern food microbiology* (4ª Edição). New York: Chapman & Hall One penn Plaza.
- Levy CE (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 ER, Figueiredo NF, Godinho PS, Abrão RL (2005) A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. *Biotemas*, 19, 17-27.
- Lopes MC e Martins VC (2010) Fungos na segurança alimentar. *Revista da associação portuguesa de horticultura*. 101, 34-37.
- Mendes-Ferreira A (2000) *Leveduras e métodos de identificação. Trabalho de Síntese, Provas de Aptidão Pedagógica e capacidade Científica*. Universidade de Trás-os-Montes e alto Douro.
- Pelczar M, Reid R, Chan ECS (1980) *Microbiologia*. Volume I, MAKRON Books do Brasil Editora.
- Peter MG (2001) Chitin and Chitosan in Fungi. *In: Steinbüchel, A. (ed.). Biopolymers*. Wiley-Vch, Bonn, Germany.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA (1996) *Microbiology*, (3ª ed.), United States of America, Wm. C. Brown Publishers.
- Pitt JI e Hocking AD (1997) *Fungi and food spoilage*. (2 ed.) London: Blackie Academic & Professional.
- Santos C, Fraga EF, Kozakiewicz Z, Lima M (2009) Fourier transform infrared as a powerful tool for the identification and characterization of filamentous fungi and yeast. *Research in Microbiology*, 161, 168-175.
- Sakaki H, Nakanishi T, Satonaka K-Y, Miki W, Fujita T, Komemushi S (2000) Properties of a high-torularhodin mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *Journal Bioscience Bioengineering*, 89 (2), 203-205.
- Serra R (2005) *Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina*

- a. Universidade do Minho Departamento de Engenharia Biológica.
Dissertação doutoramento.
- Silliker JH, Elliott RP, Baird-Parker AC, Bryan FL, Christian JHB, Clark DS, Olson JC, Roberts TA (1980) Ecologia microbiana de los alimentos, Productos alimentícios. Volume 2. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A.
- Tibor D e Larry RB (1996) Handbook of Food spoilage. Boca Raton, USA: CRC., Inc.
- Van burik J-AH, Magee PT (2001) Aspects of Fungal Pathogenesis in Humans. Annual Review of Microbiology 55, 743-72.