



AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE*

A. O. Bernardi¹, J. C. Fracari¹, P. O. Soares¹, L. V. B. Gós¹, M. V. Copetti¹

1- Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais– CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: (55) 3220.8254– e-mail: (angelica_bernardi@hotmail.com)

RESUMO – Nos últimos anos, a formação de biofilmes fúngicos tem despertado interesse científico, contudo os dados na área de alimentos ainda são limitados. O biofilme pode favorecer a sobrevivência e propagação de fungos filamentosos, impactando a indústria alimentícia ao contaminar o ar, superfícies e alimentos. Esses fungos podem se estabelecer em ambientes de processamento e maturação, aumentando o risco de contaminação e recontaminação. Este estudo avaliou qualitativamente a formação de biofilme por *Aspergillus westerdijkiae* isolado de salame deteriorado. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços, utilizando meios de cultura com diferentes formulações de peptona e quatro variações de açúcares. De modo geral, a cepa apresentou alta capacidade de formação de biofilme em todos os meios testados, com destaque para o açúcar glicose.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos filamentosos; biofilme; contaminação.

ABSTRACT - In recent years, fungal biofilm formation has gained significant scientific interest; however, data in the food sector remain limited. Biofilms can enhance the survival and dissemination of filamentous fungi, impacting the food industry by contaminating air, surfaces, and food products. These fungi can colonize processing and maturation environments, increasing the risk of contamination and recontamination. This study qualitatively evaluated the biofilm-forming ability of *Aspergillus westerdijkiae* isolated from spoiled salami. The assays were conducted in 96-well microtiter plates using culture media with different peptone formulations and four sugar variations. Overall, the strain exhibited a high biofilm formation capacity in all tested media, with glucose showing the most significant effect.

KEYWORDS: Filamentous fungi; biofilm; contamination.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos por fungos filamentosos pode ocorrer em diferentes fases do processamento, abrangendo desde o ambiente de produção até o armazenamento e comercialização (Garcia; Bernardi; Copetti, 2019). Os conídios desses fungos podem ser introduzidos no ambiente de processamento por meio de matérias-primas, ingredientes, embalagens e equipamentos. Uma vez no



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

local, os esporos dispersos pelo ar ou aderidos às superfícies podem entrar em contato com os alimentos processados, comprometendo sua qualidade (Bernardi *et al.*, 2019).

Produtos mais suscetíveis à contaminação por fungos, como pães, queijos e carnes processadas, sofrem deterioração principalmente devido à disseminação de esporos no ambiente. Quando encontram condições favoráveis, como temperatura adequada, níveis apropriados de atividade de água (aw) e pH específico, esses esporos germinam e se multiplicam. Esse processo leva à formação de micélio visível, resultando em mudanças sensoriais e comprometendo a qualidade do alimento (Pitt e Hocking, 2009; Garnier *et al.*, 2017). Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são frequentemente encontrados em produtos cárneos curados.

O crescimento de fungos indesejáveis pode gerar prejuízos financeiros para os produtores, elevando tanto as perdas quanto os custos de produção. Além do aspecto deteriorativo muitas espécies de fungos, ao colonizar os alimentos podem produzir micotoxinas (Pitt e Hocking, 2012), dentre elas, *Aspergillus westerdijkiae* que tem a capacidade de produzir micotoxinas, como a ocratoxina A (Toscani *et al.*, 2007).

Além disso, os fungos filamentosos também são potenciais formadores de biofilme, que são frequentemente conceituados como comunidades microbianas complexas cercadas por uma matriz extracelular autoproduzida que adere fortemente a superfícies bióticas ou abióticas (Oliveira; Brugnera; Piccoli, 2010; Hobley *et al.*, 2015; Gilmore *et al.*, 2018). Essa conformação confere resistência aos fungos e dificulta sua inativação (Harding *et al.*, 2009). Esses fungos, portanto, podem se adaptar e crescer em diferentes superfícies (Kasnowski *et al.*, 2010), um fenômeno ainda pouco estudado e com dados limitados na literatura.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente a capacidade de formação de biofilme por *Aspergillus westerdijkiae* isolado de produto cárneo deteriorado (salame) em diferentes formulações de peptona e somada com variações de quatro açúcares, glicose sacarose, maltose e lactose, simulando a matéria orgânica presente em forma residual na indústria de alimentos o que auxiliaria ou não na adesão e formação de biofilme pelo fungo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do ensaio foi utilizada a cepa fúngica de *A. westerdijkiae* (LAMA SLM 09/17) isolada de produto cárneo deteriorado (salame) e que faz parte da coleção fúngica do Laboratório de Análises Micológicas de Alimentos (LAMA) da Universidade Federal de Santa Maria.

Para o preparo do inóculo inicial, a cepa foi cultivada em tubos de ensaio contendo meio em rampa de Ágar Extrato de Malte (MEA) com incubação prévia a 25 °C por sete dias. Posteriormente



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

a isso foi realizada a lavagem do micélio e feita a padronização dos esporos em câmara de Neubauer e ajustada para a quantidade final de $1,5 \times 10^5$ conídios/mL.

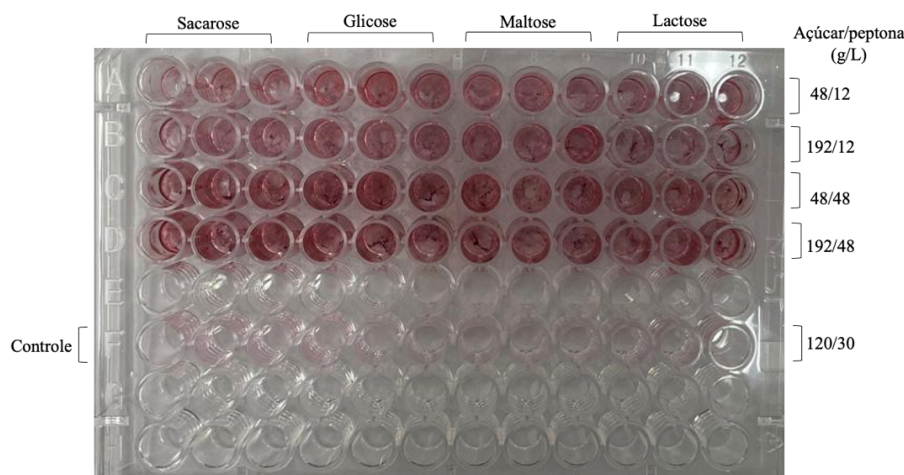
A avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme foi realizada em microplacas de microtitulação de poliestireno de 96 poços as quais foram adicionadas de 100 μ L de meio de cultura com diferentes formulações de peptona somada com variações de quatro açúcares: glicose, sacarose, maltose e lactose. Posteriormente foi adicionado 100 μ L do inóculo fúngico padronizado. O controle negativo foi realizado somente com a adição de 200 μ L dos meios de cultura, sem o fungo. Em seguida as placas foram incubadas em temperatura de 26 °C e a leitura foi realizada em 48 horas.

Decorrido esse período, as placas foram então lavadas três vezes com 200 μ L de solução tampão fosfato-salino (PBS), seguidas de 1 minuto de incubação à temperatura ambiente. Posteriormente, as estruturas de biofilme foram coradas com 100 μ l de solução de Safranina 0,5% por 15 minutos que permite a identificação e semi-quantificação de componentes da matriz extracelular (Araújo, 2019; Doll *et al.*, 2016). Após, foram realizadas sucessivas lavagens com água destilada estéril até o sobrenadante ficar translúcido e o resultado foi então observado de forma visual a olho nu pela permanência (adesão) da cor vermelha no fundo da microplaca, indicando a possível formação de biofilme.

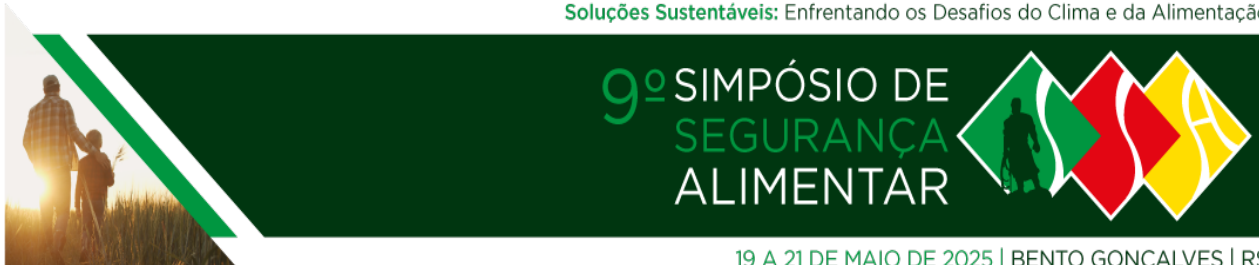
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da permanência da cor vermelha poder ser observado na figura abaixo (Figura 1).

Figura 1 – Resultado visual da intensidade de formação de biofilme por *A. westerdijkiae* (LAMA SLM 09/17) após o ensaio.

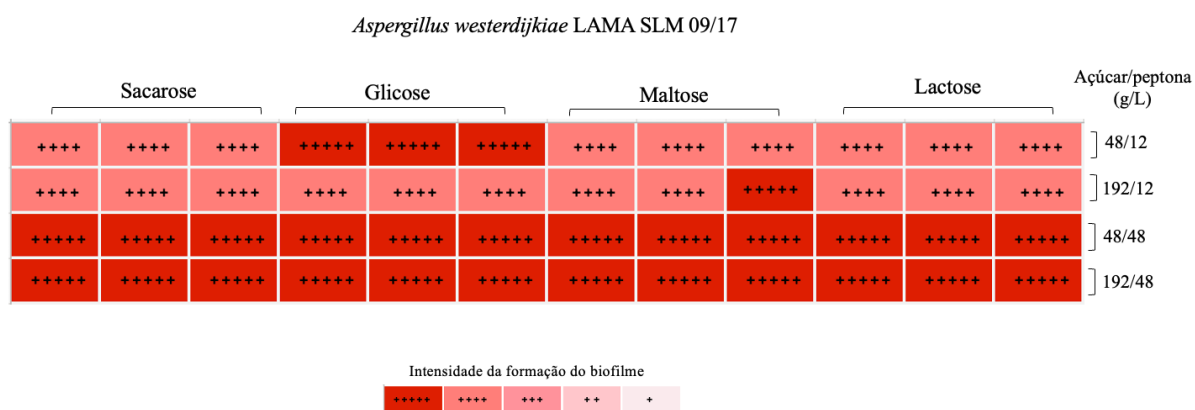


Aspergillus westerdijkiae LAMA SLM 09/17



Além disso, a partir dos resultados foi elaborado um *heatmap* (Figura 2) comparando os resultados encontrados com a escala de intensidade de cores e cruces para comparação qualitativa da formação de biofilmes fúngicos proposta por Leães, 2024.

Figura 2 – *Heatmap* da intensidade de formação de biofilme por *A. westerdijkiae* (LAMA SLM 09/17).



Nos resultados da análise qualitativa e em comparação com a escala de intensidade observou-se que a cepa avaliada de *A. westerdijkiae* demonstrou uma grande capacidade de produzir biofilme no tempo e na temperatura de incubação empregados.

Da mesma forma, o fungo teve uma boa produção de biofilme em todos os açúcares avaliados com pequenas evidências de diferenças de intensidade em algumas situações, e a glicose foi o açúcar que mais se destacou na intensidade de produção de biofilme pela cepa avaliada na maioria das variações de concentração. Além disso, observou-se que nas maiores concentrações de peptona houve uma maior intensidade de formação de biofilme.

Esses dados corroboram com estudo realizado por Leães (2024) que utilizou meios de cultivo distintos, porém que demonstraram que cepas de *A. westerdijkiae* e *Aspergillus ochraceus* isoladas de produtos cárneos deteriorados e avaliadas no estudo conduzido foram capazes de formar intensa biomassa de biofilme nas diferentes temperaturas (10, 20 e 25 °C) a partir de 24 horas.

A espécie *A. westerdijkiae* possui taxas de crescimento levemente mais rápidas a 25 °C e sem crescimento a 5 °C e não apresenta crescimento a 37 °C (Pitt e Hocking, 2012). Além disso, estudos demonstraram que em níveis elevados de atividade de água foi possível observar crescimento a 10°C (Ramos *et al.*, 1998). Portanto, na temperatura avaliada de 26 °C já se pressupunha que teria um bom crescimento, o que foi comprovado com o presente estudo.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

Sendo assim, o desenvolvimento e intensa formação de biofilme na variação de açúcares e peptona avaliados nos faz pensar que, relacionando com falhas no processo de higienização na indústria de alimentos somado com doses subletais de agentes sanitizantes favoreceria a adesão e posterior formação de biofilmes fúngicos e tornaria o processo de controle da segurança microbiológica de alimentos ainda mais árduo.

4. CONCLUSÕES

A cepa de *Aspergillus westerdijkiae* demonstrou uma forte capacidade de formação de biofilme nas condições experimentais estabelecidas neste estudo. Dentre os açúcares testados, a glicose se destacou como o principal responsável pela maior intensidade na formação de biofilme, seguido por concentrações mais elevadas de peptona, que também favoreceram significativamente o processo. Esses resultados ressaltam a necessidade crucial de um controle rigoroso sobre os resíduos de material orgânico presentes nas superfícies e equipamentos na indústria de alimentos. Tal controle é essencial para prevenir a adesão e a subsequente formação de biofilme por fungos patogênicos ou deteriorantes, minimizando riscos à segurança de alimentos e à qualidade dos produtos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, CLÁUDIA PATRÍCIA MENDES. **Avaliação da formação de biofilme e análise das proteínas do secretoma e biofilme de *Aspergillus fumigatus***. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro). Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD, Manaus, 2019. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/41442>>. Acesso em 21/01/2025.

BERNARDI, ANGÉLICA. OLIVIER. *et al.* Antifungal activity of commercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: Bakery spoilage fungi. **Food Microbiology**, v. 83, p. 59-63, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.005>.

DOLL, KATHARINA. *et al.* Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. **Journal of microbiological methods**, v. 130, p. 61-68, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.016>.

GARCIA, MARCELO VALE; BERNARDI, ANGÉLICA OLIVIER.; COPETTI, MARINA VENTURINI. The fungal problem in bread production: Insights of causes, consequences, and control methods. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 1-6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.010>.

GARNIER, LUCILLE. *et al.* Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 191-197, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

GILMORE, BRENDAN. F. *et al.* Cold plasmas for biofilm control: opportunities and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 627-638, 2018. Disponível em: DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.03.007.

HARDING, MICHEL. W. *ET AL.* Can filamentous fungi form biofilms?. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009. Disponível em: DOI: 10.1016/j.tim.2009.08.007.

HOBLEY, LAURA. *ET AL.* Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 5, p. 649-669, 2015. Disponível em <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>.

KASNOWSKI, MARIA CARMELA. *et al.* Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, p. 1-23, 2010. Disponível em: <http://www.faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/fxPTiYWerLkT9Si_2013-6-25-16-32-0.pdf>. Acesso em 21/11/2024.

LEÃES, GRAZIELA. FUMAGALLI. Biofilmes de fungos filamentosos: uma alternativa na produção enzimática. In F. O. GIACOMELLI (Ed.), **Anais do Webinário Internacional de Ciência e Tecnologia em Alimentos: artigos de revisão** (Vol. 1, p.704), 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/23515/E-Book_Artigos_de_Revisao_WICTA_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 21/01/2025.

OLIVEIRA, MAÍRA MACIEL MATTOS. BRUGNERA, DANILO FLORISVALDO. PICCOLI, ROBERTA HILSDOR. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69_3_completa/1289.pdf>. Acesso em 21/01/2025

PITT, J. I. *et al.* **Improving Public Health Through Mycotoxin Control**. Lyon - France: International Agency for Research on Cancer, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/J-Miller-6/publication/322231661_Improving_public_health_through_mycotoxin_control/links/5a4ced94a6f6cc3e99d13160/Improving-public-health-through-mycotoxin-control.pdf.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Springer. 3ª Edição, 2009, 4.

TOSCANI, T.; MOSERITI, A.; DOSSENA, A.; DALL'ASTA, C.; SIMONCINI, N.; VIRGILI, R.. Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC- FLD quantitative method. **Journal of Chromatography**, v. 855, p. 242–248, 2007.