



INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *PENICILLIUM ROQUEFORTI*

P. O. Soares¹, A. O. Bernardi¹, J. C. Fracari¹, 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 – Em anos recentes a formação de biofilmes fúngicos tem despertado o interesse da comunidade científica, contudo, informações na área de alimentos ainda são limitadas. Este conhecimento é relevante uma vez que a presença de biofilme poderia favorecer tanto a persistência de uma espécie fúngica deteriorante quanto sua propagação, impactando na indústria alimentícia ao contaminar o ar, superfícies e alimentos. Esses fungos poderiam assim se estabelecer em ambientes de processamento e maturação, aumentando o risco de contaminação e recontaminação de produtos. Este estudo se propôs a avaliar qualitativamente a formação de biofilme por *Penicillium roqueforti* isolado de pão deteriorado. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços, utilizando meios de cultura formulado com diferentes concentrações de peptona e açúcares (glicose, lactose, maltose e sacarose). De modo geral, *P. roqueforti* apresentou baixa capacidade de formação de biofilme em todos os meios testados, com pequenas variações na intensidade conforme o açúcar utilizado.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme; contaminação; indústria de alimentos.

ABSTRACT - In recent years, the formation of fungal biofilms has gained increasing interest within the scientific community. However, information in the field of food science remains limited. This knowledge is particularly relevant since the presence of biofilms could facilitate both the persistence and dissemination of deteriorative fungal species, thereby impacting the food industry by contaminating air, surfaces, and food products. These fungi may establish themselves in processing and maturation environments, increasing the risk of contamination and recontamination of products. This study aimed to qualitatively evaluate biofilm formation by *Penicillium roqueforti* isolated from deteriorated bread. The assays were conducted in 96-well microplates using culture media formulated with different concentrations of peptone and sugars (glucose, lactose, maltose, and sucrose). Overall, *P. roqueforti* exhibited a low capacity for biofilm formation in all tested media, with slight variations in intensity depending on the sugar used.

KEYWORDS: Biofilm; contamination; food industry.

1. INTRODUÇÃO



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

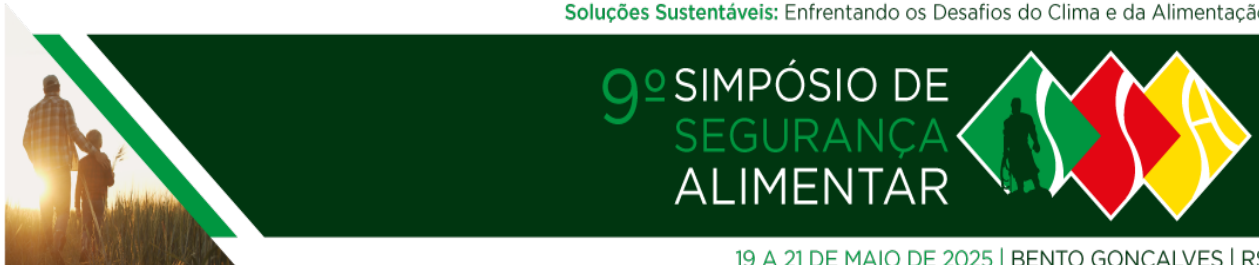
Nos últimos anos os fungos filamentosos têm recebido atenção da comunidade científica pela sua capacidade de produzir biofilmes. Os fungos microscópicos, tanto bolores quanto leveduras, desempenham um papel relevante na indústria de alimentos, podendo ter aplicações benéficas na área de biotecnologia e serem uma alternativa para a produção industrial de enzimas, entretanto os fungos também são potenciais deterioradores de alimentos. Devido à persistência de algumas espécies deteriorantes de alimentos em ambientes de produção alimentícia, acredita-se que esses microorganismos sejam potenciais formadores de biofilmes (Copetti; Leães; Miranda, 2022).

Atualmente, os biofilmes fúngicos são caracterizados como a adesão irreversível de esporos seguida da sua germinação, que só se inicia em condições ambientais adequadas. Segundo Wang *et al.* (2024) a formação de biofilmes por fungos com certas estruturas e funções ocorre por meio de vários estágios, como adesão inicial, agregação, crescimento, maturação e dispersão. Biofilmes fúngicos maduros têm uma variedade de funções importantes, alguns fungos podem produzir hifas ou pseudohifas, a agregação e o crescimento de hifas estão envolvidos na produção de biofilmes. Posteriormente, a diferenciação hifal e a invasão do substrato produzem uma rede complexa de hifas (micélio) formando um biofilme maduro, e semelhante aos biofilmes bacterianos, existe produção de matriz extracelular polimérica (EPS) e substâncias *quorum sensing*.

Os biofilmes fúngicos podem ter a capacidade também de se aderirem nas superfícies das instalações de produção da indústria alimentícia levando à redução da qualidade dos produtos, deterioração precoce dos alimentos ou até mesmo problemas de saúde dos consumidores, devido à capacidade de produção de micotoxinas por alguns fungos filamentosos (Kulisová *et al.*, 2023).

Penicillium roqueforti, segundo Pitt e Hocking (1997), é um fungo decompositor amplamente distribuído que pode crescer em baixa tensão de oxigênio. O *P. roqueforti* é um fungo de origem alimentar que é resistente a ácidos, pode contaminar produtos de panificação, produtos cárneos e alimentos conservados sob baixas temperaturas (Zhao *et al.*, 2023). A farinha utilizada na indústria de panificação é considerada uma das principais fontes de contaminação devido à contaminação dessa matéria prima com esporos fúngicos os quais podem ser difundidos através de partículas de farinha dispersas no ar das instalações de processamento, durante a pesagem de ingredientes, por exemplo (Garcia *et al.*, 2019; Copetti *et al.*, 2025). Entretanto, a persistência de uma espécie fúngica em indústrias de panificação com problemas recorrentes de deterioração por esta mesma espécie fúngica poderia estar relacionada à formação de biofilmes neste ambiente produtivo.

Sendo assim, este trabalho buscou fornecer informações iniciais sobre a capacidade de *P. roqueforti* isolado de produto panificado deteriorado (pão) de formar biofilmes em microplacas de microtitulação contendo diferentes formulações de peptona, somada com variações de quatro



açúcares: glicose, sacarose, maltose e lactose, simulando o material orgânico residual presente em indústrias alimentícias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepa fúngica utilizada

O ensaio foi realizado utilizando a cepa fúngica *P. roqueforti* (PR 11/LAMA 81), proveniente de um produto panificado deteriorado (pão), que integra a coleção do Laboratório de Análises Micológicas de Alimentos (LAMA) da Universidade Federal de Santa Maria.

2.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, a cepa foi cultivada em tubos de ensaio contendo Ágar Extrato de Malte (MEA), sendo incubada a 25 °C por sete dias. Após esse período, o micélio foi lavado, e a quantidade de esporos foi ajustada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, com uma concentração final de $1,5 \times 10^5$ conídios/mL.

2.3 Avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme

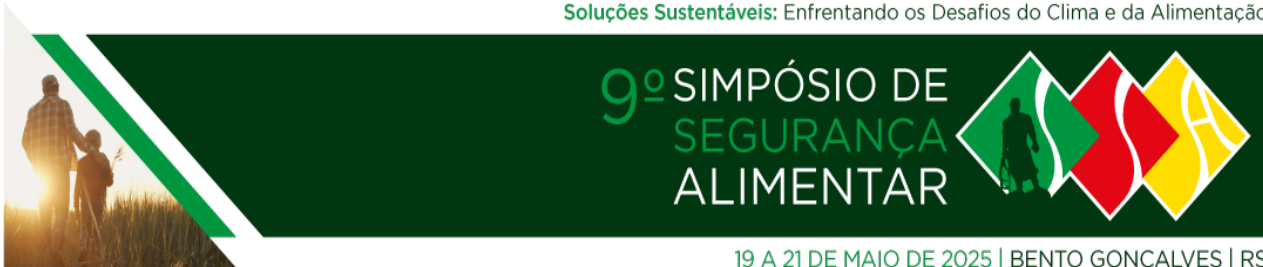
A avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme foi realizada em microplacas de 96 poços de poliestireno. Para cada poço, foram adicionados 100 µL de meio de cultura contendo diferentes concentrações de peptona e variações de quatro açúcares: glicose, sacarose, maltose e lactose. Após isso, 100 µL do inóculo fúngico padronizado foi introduzido em cada poço. O controle negativo consistiu em 200 µL do meio de cultura, mas sem a presença do fungo. As placas foram incubadas a 26 °C, e a leitura foi realizada após 48 horas.

2.4 Processo de lavagem e incubação

Decorrido o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 200 µL de solução tampão fosfato-salino (PBS), seguidas de 1 minuto de incubação à temperatura ambiente.

2.5 Coloração do biofilme

As estruturas de biofilme formadas foram coradas com 100 µL de solução de Safranina 0,5% durante 15 minutos, procedimento que permitiu a identificação e semi-quantificação da matriz extracelular (Araújo, 2019; Doll et al., 2016), sendo esta coloração tão mais intensa quanto maior a quantidade de biofilme produzido.



2.6 Lavagem final e análise visual

Em seguida, as placas foram lavadas diversas vezes com água destilada estéril até que o sobrenadante se tornasse translúcido. O resultado foi analisado visualmente pela persistência da cor vermelha no fundo da microplaca, indicando a adesão e a formação do biofilme.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados foi elaborado um *heatmap* (Figura 1) juntamente com a comparação dos resultados encontrados com a escala de intensidade (em cruzes e cores) de formação de biofilmes proposta por Leães (2024).

Figura 1 – Resultado qualitativo da intensidade de formação de biofilme por *P. roqueforti* frente a variações de açúcares e peptona em 48 horas.

Sacarose			Glicose			Maltose			Lactose			Açúcar/peptona (g/L)
+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++] 48/12
+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++] 192/12
+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++] 48/48
+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++] 192/48

Intensidade da formação do biofilme

+++++ ++++ +++ ++ +

Nos resultados da análise qualitativa, em comparação com a escala de intensidade, observou-se que a cepa avaliada de *P. roqueforti* demonstrou capacidade de produzir biofilme no tempo e na temperatura de incubação empregados contudo, não atingiu, em nenhuma variação testada, a capacidade máxima de intensidade de formação de biofilme da escala proposta. Da mesma forma, o fungo mostrou de maneira geral uma boa capacidade produção de biofilme em todos os açúcares avaliados com evidências de diferenças de intensidade de cor em algumas situações, como no caso da sacarose, que foi o açúcar que mais se destacou na intensidade de formação de biofilme. Os açúcares lactose e maltose apresentaram intensidade de formação de biofilme idênticas e a glicose foi o açúcar que menos induziu a produção d a formação de biofilme.

Outro destaque é a influência da peptona, fonte proteica, na formação de biofilmes. Observou-se que nas concentrações menores assim como nas maiores de peptona houve uma maior intensidade de formação de biofilme nos açúcares maltose e lactose, e vice-versa, mas esta influência não foi perceptível na interação peptona e sacarose ou peptona e glicose.



4. CONCLUSÕES

A cepa de *P. roqueforti* demonstra ser formadora de biofilme em todas as condições testadas, sendo que a sacarose foi o açúcar que mais estimulou a capacidade desta espécie formar biofilme, independentemente da quantidade de peptona presente. Por outro lado, níveis baixos de peptona pareceram estimular a produção de biofilmes quando o açúcar em questão era maltose ou lactose. Visto que a sacarose está frequentemente presente em formulações de pães e pode atuar como substrato para o crescimento dos biofilmes fúngicos, evidencia-se a importância de uma higienização rigorosa na indústria de alimentos prevenindo a produção destas estruturas que podem aumentar a resistência microbiana.

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 – ILMMD, Manaus, 2019. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/41442>>. Acesso em 21/01/2025.

BUTASSI, E.; SVETAZ, L. CARPINELLA, M. C.; EFFERTH, T.; ZACCHINO, S. Fungal Biofilms as a Valuable Target for the Discovery of Natural Products That Cope with the Resistance of Medically Important Fungi—Latest Findings, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/9/1053>.

COSTA-ORLANDI, Caroline B. et al. Biofilmes fúngicos e doenças polimicrobianas. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 2, p. 22, 2017.

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>.

KULISOVÁ, M.; MATÁTKOVÁ, O.; BRÁNYIK, T.; ZELENKA, J.; DRÁBOVÁ, L.; KOLOUCHOVÁ, I.J. Detection of microscopic filamentous fungal biofilms – Choosing the suitable methodology, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701223000106>.

LEÃES, G. F. **Avaliação da formação de biofilmes por fungos filamentosos relevantes em produtos cárneos**. 2024. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2024.

MANNAN, M.; NABEELA, S.; MISHRA, R.; UPPULURI, P. Host immune response against fungal biofilms, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527424000961>.



9º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR



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

MIRANDA, C. V. A.; LEÃES, G. F.; COPETTI, M. V. Fungal biofilms: insights for the food industry, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799322000480>.

OLANBIWONINU, A.; POPOOLA, B. Biofilms and their impact on the food industry, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X22004399>.

PITT, J. I. E HOCKING, AD (1997) Fungos e deterioração de alimentos. 2ª edição, Blackie Academic and Professional, Londres.

PITT, J. I. Fungi and food spoilage. 2009.

SUN, W.; YU, Y.; CHEN, J.; YU, B. CHEN, T.; YING, H.; ZHOU, S.; OUYANG, P.; LIU, D.; CHEN, Y. Light Signaling Regulates *Aspergillus niger* Biofilm Formation by Affecting Melanin and Extracellular Polysaccharide Biosynthesis, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/org/science/article/pii/S2150751121116831#B5>.

WANG, D.; ZENG, N.; LI, C.; LI, Z.; ZHANG, N.; LI, B. fungal biofilm formation and its regulatory mechanism, 2024. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024087978?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=9049bc87ef5487ec.