



Potencial formação de biofilme por leveduras e fungos filamentosos isolados de linhas de processamento de suco de laranja

Palavras-Chave: biofilme, levedura, fungo filamentoso, suco de laranja

Autores(as):

Aluna: Ana Beatriz A. C de Sá – UNICAMP

Monitora: Naara Aparecida Almeida – DCAN/FEA - UNICAMP

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Liliana Rocha, DCAN/FEA- UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A deterioração fúngica é um problema recorrente na indústria de bebidas, pois a contaminação pode ocorrer durante todo o processo de produção, devido à capacidade dos fungos de colonizarem superfícies e formarem biofilmes em conjunto com outros microrganismos. O objetivo deste trabalho é avaliar a formação de biofilme por fungos filamentosos e leveduras isolados da indústria de processamento de suco de laranja. Para esse propósito, foram utilizadas as leveduras *Wickerhamomyces anomalus*, *Naganishia diffluens* e *Candida intermedia*, bem como o fungo *Paecilomyces variotii*; estes foram isolados da linha de processamento de suco de laranja e de sucos deteriorados.

Este estudo destaca a capacidade das cepas de persistirem ao longo da linha de processamento do suco de laranja e indica que medidas devem ser tomadas para controlar a presença de fungos na indústria de sucos, a fim de reduzir perdas relacionadas a deterioração.

METODOLOGIA:

As cepas fúngicas foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. O método do violeta cristal foi utilizado para observar as células aderidas, medindo a absorbância a 570 nm. Para desalojar o biofilme dos poços, foi adicionado PBS e submetido a um banho de ultrassom; em seguida, as células foram transferidas para meio MEA para contagem de UFC, conforme descrito por Afonso et al., 2019.

Para quantificação da massa do biofilme usando cristal violeta, após lavagem das células não aderidas, metanol (98%) foi aplicado para fixação durante 15 minutos. Depois, o metanol foi descartado, as placas foram secas e o biofilme fixado foi corado com 200 µL/poço de cristal violeta por 5 minutos. O excesso de corante foi lavado com água novamente. O corante ligado às células aderentes foi ressolubilizado em 200 µL/poço de ácido acético glacial 33% (v/v). A densidade óptica da solução obtida

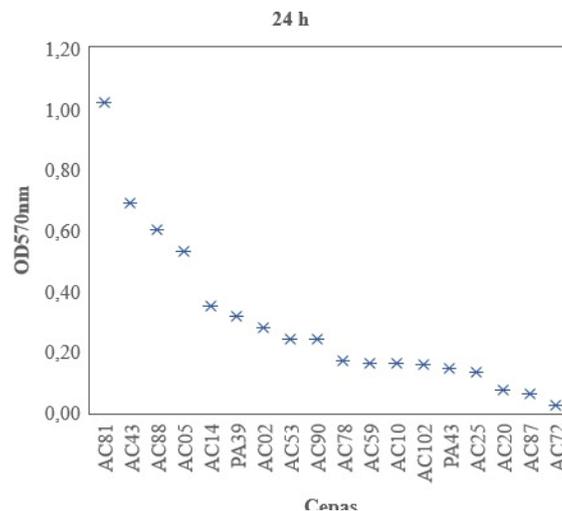
foi medida a 570 nm usando um leitor de placas microtituladoras e a massa do biofilme fúngico foi expressa em valores de OD570 nm (Afonso et al., 2019).

Para contagem de UFC, após cada período de incubação, o sobrenadante foi removido e a placa foi lavada três vezes com água estéril. Um volume de 200 µL de PBS estéril (pH 7,4) foi adicionado em cada poço e a placa de 96 poços foi coberta com a tampa e colocada em um banho de ultrassom. Para liberar as células bacterianas do biofilme, a placa de 96 poços foi submetida a banho ultrassônico por 1 minuto a 35 kHz. A análise foi feita em triplicata e plaqueada em MEA por 7 dias para determinação de UFC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Cinco cepas apresentaram valores acima do controle positivo ($0,32 \pm 0,12$), sendo elas: AC81, AC43, AC88, AC05, AC14. Todas as amostras são identificadas como *Wickerhamomyces anomalus*, como visto na imagem abaixo.

Figura 1: Análise de formação de biofilme pelo método Cristal Violeta em OD570nm em 24h.



Em relação a contagem do biofilme recuperado por UFC dos biofilmes únicos, obteve-se o valor de 5.5 a 6.68 log UFC/mL, como demonstrado pela Figura 2 abaixo.

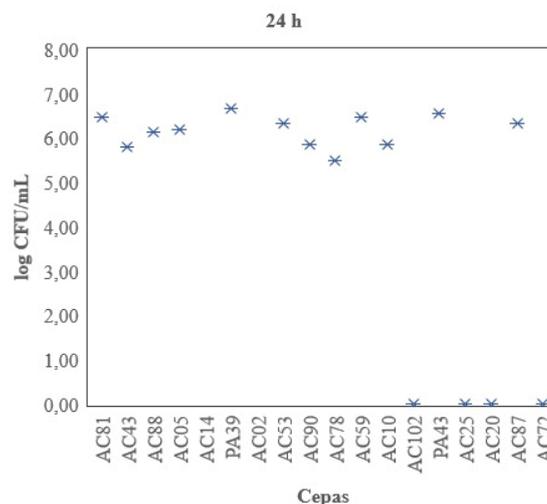


Figura 2: Contagem de UFC do biofilme recuperado em 24h das amostras únicas.

Na quantificação de massa de biofilme formado pelo método de cristal violeta, os valores de OD570nm variaram de 0,02 a 1,02, para as cepas *Paecilomyces variotii* (AC72) e *Wickerhamomyces anomalus* (AC81), respectivamente. Cinco cepas apresentaram valores de OD570nm acima do controle positivo ($0,32 \pm 0,12$), o que indica um alto potencial de formação de biofilme e, conseqüentemente, a contaminação do processo de produção de suco de laranja. Quatro dessas cinco cepas foram identificadas como da espécie *W. anomalus* (AC81, AC43, AC88) e uma cepa (AC14) foi identificada como *Naganishia diffluens*. Todos os isolados foram obtidos a partir do produto final, amostras de sucos deteriorados e da ponta do injetor. Em relação às contagens de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) em biofilmes únicos, os valores variaram de 5,5 a 6,68 log UFC/mL, e 6 das 10 cepas mostraram contagens similares às dos controles ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey, sendo identificadas como *W. anomalus* (5/6) e *Candida intermedia* (1/6). Uma correlação moderada foi encontrada entre os dois métodos ($\sim 0,43$), o que destaca a capacidade das cepas analisadas de sobreviver ao tratamento térmico e persistir ao longo da linha de processamento. Esses dados indicam que medidas devem ser tomadas para controlar a presença de fungos na indústria de sucos, a fim de reduzir as perdas relacionadas ao deterioramento e aos recalls.

CONCLUSÕES:

Os valores de OD570nm variaram de 0,02 a 1,02 para *Paecilomyces variotii* (AC72) e *Wickerhamomyces anomalus* (AC81), respectivamente. Cinco cepas mostraram valores de OD570nm acima do controle positivo ($0,32 \pm 0,12$), o que demonstra o potencial de formação de biofilme, indicando assim a capacidade de contaminar o suco de laranja ao longo da linha de processamento. Em relação às contagens de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) a partir de biofilmes únicos, os valores variaram de 5,5 a 6,68 log UFC/mL, e 6 das 10 cepas apresentaram contagens similares às dos controles (cinco cepas de *W. anomalus* e uma de *C. intermedia*).

BIBLIOGRAFIA

- AFONSO, T. B.; SIMÕES, L. C.; LIMA, N. Invitro assessment of inter-kingdom biofilm formation by bacteria and filamentous fungi isolated from a drinking water distribution system, *Biofouling*, v. 35:10, p. 1041-1054. 2019. DOI:10.1080/08927014.2019.1688793
- OLIVEIRA, J.; SETTI-PERDIGÃO, P.; SIQUEIRA, K. A. G.; SANTOS, A. C.; MIGUEL, M.A.L..Características Microbiológicas do Suco de Laranja in natura. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*,v. 26, n.2, p.241-245. Campinas - SP, abr.-jun. 2006.
- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo*, v. 69, n. 3, 2010. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552010000300001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 08 set. 2021.
- SAV, H.; RAFATI, H.; ÖZ, Y.; DALYAN-CILO, B.; ENER, B.; MOHAMMADI, F.; ILKIT, M.; DIEPENINGEN, A. D.; SEYEDMOUSAVI, S. 2018. Biofilm Formation and Resistance to Fungicides in Clinically Relevant Members of the Fungal Genus *Fusarium*. *Journal of fungi*. Basel, Switzerland.16. <https://doi.org/10.3390/jof4010016>