



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TALITA DE OLIVEIRA CARETTA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIO DE  
*Starmerella bombicola* COMO AGENTE ANTIFÚNGICO E NO  
DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTO ATIVO PARA  
CONSERVAÇÃO DE VEGETAIS**

TALITA DE OLIVEIRA CARETTA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIO DE  
*Starmerella bombicola* COMO AGENTE ANTIFÚNGICO E NO  
DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTO ATIVO PARA  
CONSERVAÇÃO DE VEGETAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- C271 Caretta, Talita de Oliveira .  
PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIO DE *Starmerella bombicola* COMO AGENTE ANTIFÚNGICO E NO DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTO ATIVO PARA CONSERVAÇÃO DE VEGETAIS / Talita de Oliveira Caretta. - Londrina, 2021.  
117 f. : il.
- Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.  
Inclui bibliografia.
1. antimicrobiano - Tese. 2. fitopatógenos - Tese. 3. tomates - Tese. 4. morangos - Tese. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

TALITA DE OLIVEIRA CARETTA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIO DE  
*Starmerella bombicola* COMO AGENTE ANTIFÚNGICO E NO  
DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTO ATIVO PARA  
CONSERVAÇÃO DE VEGETAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine  
Colabone Celligoi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

---

Prof. Dr. Galdino de Andrade Filho  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Suzana Mali de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de novembro de 2021

*Deus dá a todos uma estrela.*

*Uns fazem dela um sol,  
outros nem conseguem vê-la.*

Helena Kolody

## AGRADECIMENTOS

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro.

À **minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi**, que me direcionou durante todo este percurso, me ensinou, orientou, e incentivou a superar meus limites.

**Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, pela oportunidade de desenvolvimento e finalização deste trabalho.

**A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia**, pela atenção, ensinamentos, paciência, apoio, colaboração e auxílios prestados.

**Ao Prof. Dr. Galdino de Andrade Filho**, por ter me permitido desenvolver parte da pesquisa no LEM.

**Aos professores que compõem minha banca**, vocês são importantíssimos nessa trajetória.

Às **minhas companheiras de laboratório, Victória, Amanda, Reginara, Gabi, Nádia, Gi**, por tornarem meus dias mais leves, e compartilharem comigo todas as “alegrias e tristezas” do dia a dia no laboratório.

À **Deus**, que me deu vida, e me concedeu cura para a realização deste sonho.

**Aos meus pais Salvador e Iracema** que sempre foram meus maiores incentivadores, meu exemplo, meu apoio e meu porto seguro.

**Ao meu irmão Danilo**, pois mesmo à distância sei que posso contar com ele a qualquer momento

À **minha filha Gabriela** por toda paciência e compreensão mesmo sendo tão pequenina.

Caretta, Talita de Oliveira. **Produção e aplicação de sofrorolipídio de *Starmerella bombicola* como agente antifúngico e no desenvolvimento de revestimento ativo para conservação de vegetais**. 2021. 117 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina, 2021.

## RESUMO

Sofrorolipídio é um biossurfactante glicolipídico, produzido principalmente por *Starmerella bombicola*. É uma molécula anfifílica formada geralmente por 16 ou 18 carbonos, disponível na forma acídica ou lactônica, o que lhe confere uma gama de aplicações. Neste trabalho, sofrorolipídio lactônico teve sua atividade antimicrobiana testada contra os fungos fitopatógenos: *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora ultimum* em testes *in vitro*, e a atividade contra *B. cinerea* também foi avaliada nas folhas e nos frutos do tomateiro. Em seguida, o biossurfactante foi utilizado na produção de revestimentos ativos multifuncionais, com formulações contendo amido de mandioca, sofrorolipídio a 2 g/100 g de sólidos, e sofrorolipídio + frutooligossacarídeos a 2 g e 10 g/100 g de sólidos. Os revestimentos foram caracterizados através de propriedades mecânicas e sua aplicação em morangos frescos foi avaliada por parâmetros físico-químicos e microbiológicos. O biossurfactante inibiu o crescimento micelial *in vitro*, na concentração mínima de 2 mg/mL. A aplicação de sofrorolipídio a 1, 2 e 4 mg/mL em folhas destacadas do tomateiro antes da inoculação do fungo *B. cinerea* reduziu a necrose foliar em até 76,90%. Quando a aplicação foi feita nas folhas previamente infectadas, ou prévia e posteriormente à infecção fúngica, a necrose foi reduzida até 53,80%. O emprego de sofrorolipídio na lavagem de tomates antes da inoculação de *B. cinerea* inibiu o desenvolvimento do mofo cinzento em até 96,27%, e os resultados para folhas e frutos do tomateiro sugerem que o biossurfactante atua com maior eficácia quando utilizado de maneira preventiva. Nos revestimentos ativos, a suplementação com biomoléculas ativas reduziu a resistência à tração, dos filmes, aumentando em 10x a sua elasticidade, e os revestimentos provocaram redução significativa da perda de massa dos morangos, inibiram o aumento do pH e do teor de antocianinas, desacelerando o amadurecimento das frutas revestidas. Também controlaram o crescimento de bolores e leveduras durante 15 dias, mantendo os morangos frescos por mais tempo. O sofrorolipídio é uma molécula estável, e se mostrou promissor para a substituição de agrotóxicos contra os principais fitopatógenos do tomate, e a proposta de um revestimento multifuncional foi capaz de prolongar a vida útil, agregar valor nutricional e manter os atributos de qualidade de frutas altamente perecíveis como o morango.

**Palavras-chave:** sofrorolipídio; antifúngico; tomate; fitopatógeno; morango; revestimento ativo.

Caretta, Talita de Oliveira. **Production and application of sophorolipid from *Starmerella bombicola* as an antifungal agent and in the development of an active coating for vegetable conservation**. 2021. 117 p. PhD Thesis in Biotechnology - State University of Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Sophorolipid is a glycolipid biosurfactant, produced mainly by *Starmerella bombicola*. It is an amphiphilic molecule generally composed of 16 or 18 carbons, in acidic or lactone forms, which gives it a range of applications. In this work, lactonic sophorolipid had its antimicrobial activity tested in vitro against the phytopathogenic fungi: *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, and *Pythium ultimum*, and the activity against *B. cinerea* was also evaluated in tomato leaves and fruits. Therefore, the biosurfactant was used in the production of multifunctional active coatings, with formulations contained cassava starch, sophorolipid at 2 g/100 g solids, and sophorolipid + fructooligosaccharides at 2 g and 10 g/100 g solids. The coatings were characterized by mechanical properties and their application was evaluated on fresh strawberries by physicochemical and microbiological parameters. The biosurfactant inhibited mycelial growth in vitro, at a minimum concentration of 2 mg/mL. The application of sophorolipid at 1, 2, and 4 mg/mL on detached tomato leaves before inoculation with the fungus *B. cinerea* reduced leaf necrosis by up to 76.90%. When the application was performed on previously infected leaves, or before and after fungal infection, necrosis was reduced to 53.80%. The use of sophorolipid in washing tomatoes before inoculation with *B. cinerea* inhibited the development of gray mold by up to 96.27%, and the results for tomato leaves and fruits suggest that the biosurfactant acts more effectively when used in a preventive way. In the coatings, the addition of active biomolecules reduced the tensile strength of the films, increasing their elasticity by 10x, and the coatings caused a significant reduction in strawberry mass loss, inhibited the increase in pH, and anthocyanin content, slowing down the ripening of the coated fruits. They also controlled the growth of molds and yeasts for 15 days, keeping the strawberries fresh for longer periods. Sophorolipid is a stable and very promising molecule for the replacement of pesticides against the main tomato phytopathogens, and the proposal of a multifunctional coating was able to extend the shelf life, add nutritional value and maintain high-quality attributes of perishables fruits, like strawberries.

**Keywords:** sophorolipid; antifungal; tomato; phytopathogens; strawberry; active coating.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial Teórico

**Figura 1** – Estrutura química dos sofrorolipídios ácido (A) e lactônico (B). ..... 21

**Figura 2** – Biossíntese do sofrorolipídio (SLPs). ..... 24

Artigo 2: Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato

**Figure 1** – Fermentation kinetic parameters (sophorolipids production, biomass and consumption of glucose and oleic acid). ..... 60

**Figure 2** – High-performance liquid chromatograph (HPLC) analysis of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* (A); standard 1',4''-sophorolactone 6',6''-diacetate (B). ..... 60

**Figure 3** – NMR experiments of sophorolipid standard 1',4''-sophorolactone 6',6''-diacetate (A); sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* (B). ..... 61

**Figure 4** – Effect of temperature (A), pH (B) and ultraviolet light (C) on the surface tension of sophorolipids. .... 62

**Figure 5** – Antimicrobial activity of sophorolipids against tomato phytopathogens. Controls (A–D) and treatments with 2 mg.mL<sup>-1</sup> of sophorolipids (A1–D1). ..... 63

**Figure 6** – SEM micrographs of the controls of *Botrytis cinerea* (A), *Pythium ultimum* (B), *Rhizoctonia solani* (C) and *Sclerotium rolfsii* (D), as well as the respective phytopathogens treated with sophorolipids at a concentration of 2 mg mL<sup>-1</sup> (A1–D1). ..... 64

**Figure 7** – Sophorolipids activity at concentrations of 1, 2 and 4 mg mL<sup>-1</sup> against *Botrytis cinerea* on detached leaves of tomato. Preventive (P), Curative (C) and preventive-curative (CP) treatments. .... 66

**Figure 8** – Sophorolipids activity at concentrations of 1, 2 and 4 mg mL<sup>-1</sup> in tomato infected with *Botrytis cinerea* during 30 days storage compared to control. 1 – without infection; 2 – with infection. .... 67

Artigo 4: Improved nutritional quality and shelf life of strawberries by starch coatings incorporated with sophorolipid and fructooligosaccharides

<b>Fig. 1</b> – SEM micrographs of cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS).....	83
<b>Fig. 2</b> – FT-IR spectra of sophorolipids, fructooligosaccharides and cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS).....	84
<b>Fig. 3</b> – DSC thermogram of fructooligosaccharides (A), sophorolipids (B) and cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS) .....	85
<b>Fig. 4</b> – Yeast and mold counts of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS) .....	91

## LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

**Tabela 1** – Microrganismos produtores de soforolipídio ..... 22

**Tabela 2** – Produção de soforolipídio variando as condições de fermentação por diferentes autores ..... 27

**Tabela 3** – Formulações de filmes ativos contendo amido (AM), soforolipídio 2% (SLP) e soforolipídio 2% + fructooligosacarídeos 10% (SLP-FOS) ..... 44

Artigo 2: Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato

**Table 1** – Percentage of severity and efficacy of sophorolipids using different concentrations and treatments against *Botrytis cinerea* in detached leaves of tomato ..... 65

**Table 2** – Percentage of severity and efficacy of sophorolipids in different concentrations against *Botrytis cinerea* in tomato fruit ..... 67

Artigo 4: Improved nutritional quality and shelf life of strawberries by starch coatings incorporated with sophorolipid and fructooligosaccharides

**Table 1** – Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP) and mechanical properties of cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS) ..... 86

**Table 2** – Weight loss (%) of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS) ..... 88

**Table 3** – Titratable acidity and pH of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS) ..... 89

**Table 4** – Anthocyanin Content of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS) ..... 90

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1	A CULTURA DO TOMATE .....	15
3.2	DOENÇAS DO TOMATEIRO .....	16
3.2.1	Tombamento Precoce .....	16
3.2.2	Podridão Do Esclerócio.....	18
3.2.3	Bolor Cinzento .....	18
3.3	A CULTURA DO MORANGO E SUAS PROPRIEDADES .....	19
3.4	SOFOROLIPÍDIO: BIOSÍNTESE E PRODUÇÃO .....	20
3.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO SOFOROLIPÍDIO .....	31
3.6	REVESTIMENTOS ATIVOS E APLICAÇÃO EM MORANGOS .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1	MICROORGANISMO .....	39
4.2	CURVA DE BIOMASSA .....	39
4.3	PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIO .....	39
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO SOFOROLIPÍDIO .....	40
4.4.1	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE) .....	40
4.4.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	40
4.4.3	Testes De Estabilidade .....	40
4.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i> .....	41
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	42
4.7	FITOTOXICIDADE .....	42
4.8	TESTE EM FOLHAS DESTACADAS DO TOMATEIRO .....	42
4.9	TESTE EM TOMATES.....	43
4.10	PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS ATIVOS .....	44
4.10.1	Produção De Frutooligossacarídeos .....	44

4.10.2	Produção De Revestimentos Ativos .....	44
4.11	CARACTERIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS ATIVOS .....	45
4.11.1	Microscopia Eletrônica De Varredura.....	45
4.11.2	Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada No Fourier (FTIR).....	45
4.11.3	Calorimetria Diferencial De Varredura (DSC) .....	45
4.11.4	Espessura .....	46
4.11.5	Solubilidade Em Água.....	46
4.11.6	Permeabilidade Ao Vapor De Água (PVA) .....	46
4.11.7	Propriedades Mecânicas .....	47
4.12	APLICAÇÃO DOS REVESTIMENTOS .....	48
4.13	CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTOS REVESTIDOS.....	48
4.13.1	Porcentagem De Perda De Massa .....	48
4.13.2	Medidas de pH e Acidez Titulável.....	48
4.13.3	Teor De Antocianinas.....	49
4.13.4	Contagem De Bolores E Leveduras .....	49
4.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
5.1	PATENTE .....	51
5.3	ARTIGO 2 – PUBLICADO EM: JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, 2021. ....	53
5.4	ARTIGO 3 – PUBLICADO EM: BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT, 2021. ....	73
5.5	ARTIGO 4 – SUBMETIDO EM: FOOD AND BIOPROCESS BIOTECHNOLOGY. ....	74
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Soforolipídio é um biossurfactante da classe dos glicolipídios, produzido principalmente por *Starmerella bombicola*, uma levedura não patogênica. Apresenta uma cabeça de sofrorose ligada a uma cauda de ácido graxo, formada geralmente por 16 a 18 carbonos, e pode ser encontrado na forma acídica ou lactônica, com diferentes acetilações, o que confere a existência de mais de 20 congêneres deste glicolipídio. A produção da molécula é acentuadamente maior quando estão presentes no meio de cultivo um substrato hidrofílico e um lipofílico. Diversos tipos de matérias-primas hidrofílicas (glicose, melão de cana, soro de leite, glicerol, sabugo de milho hidrolisado e palha de arroz hidrolisada) e hidrofóbicas (ácido oleico, óleo de soja, óleo de canola, óleos residuais de fritura, gordura de frango) já foram avaliadas como potenciais substratos para a produção de sofrorolipídio, e os melhores rendimentos observados até hoje ocorrem em presença de glicose e ácido oleico.

Com elevado potencial de produção, o sofrorolipídio abriu uma miríade de aplicações, com capacidade de aplicação industrial em detergentes, cosméticos, lubrificantes, emulsificantes, agroquímicos e antimicrobianos.

As práticas agrícolas têm se desenvolvido muito nos últimos anos, e culturas como a do tomate e do morango exibem muitos desafios a serem vencidos, visto que as perdas entre o plantio e o armazenamento chegam a 30% da produção. Os tomates são de difícil cultivo, pois podem ser atacados por diversos microrganismos fitopatógenos em qualquer estágio de desenvolvimento, provocando murcha, tombamento e podridão precoce. Os morangos são frutas altamente perecíveis, podendo, apresentando vida de prateleira de apenas um dia após a colheita se não forem armazenadas de forma correta. Por não terem casca, perdem água com facilidade, e são susceptíveis ao ataque de microrganismos. O controle de fitopatógenos ocorre por aplicação de agrotóxicos, porém seu uso desenfreado é uma preocupação global, visto que estes se acumulam no ambiente (contaminando solo e água), e deixam resíduos nos alimentos, que ao serem consumidos, podem provocar doenças em humanos, como o câncer.

Uma alternativa aos agrotóxicos é a utilização de antimicrobianos naturais, que, ao contrário dos agroquímicos, na maioria das vezes são moléculas biodegradáveis, de fonte renovável e de baixa toxicidade. O sofrorolipídio pode ser aplicado diretamente em vegetais, como os tomateiros, durante seu desenvolvimento, reduzindo a contaminação microbiana de fitopatógenos, ou após a colheita, aumentando a vida útil dos frutos.

Outra técnica de conservação dos alimentos são os revestimentos ativos. Estes são comumente fabricados com matérias primas atóxicas, e que não deixam resíduos no ambiente, e incorporados com ingredientes ativos, que oferecem ao alimento revestido maior valor nutricional agregado e aumento da vida útil. Dentre os diversos ingredientes ativos, como antimicrobianos, antioxidantes, óleos essenciais e prebióticos, estão os frutooligossacarídeos produzidos por *Bacillus subtilis*, prebióticos bastante conhecidos. Estes são capazes de melhorar a microbiota intestinal, estimulando o desenvolvimento de bactérias benéficas e a absorção de nutrientes.

O soforolipídio também pode ser agregado às formulações de revestimentos ativos capazes de proteger frutas como morangos da perda de massa, choques mecânicos, desidratação precoce e contaminação microbiana. Embora já existam trabalhos que desenvolvam filmes e revestimentos utilizando estes ingredientes separadamente, o emprego de revestimentos ativos contendo associação de soforolipídio e frutooligossacarídeos ainda não foi relatado na literatura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir e avaliar a atividade antimicrobiana do soforolípido de *Starmerella bombicola* contra fungos fitopatógenos do tomateiro e ainda, verificar seu efeito em revestimentos ativos na vida útil de morangos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Produzir soforolípido por *Starmerella bombicola* em biorreator;
- Caracterizar estruturalmente o soforolípido;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do soforolípido contra fungos fitopatógenos do tomateiro *in vitro*;
- Verificar a atividade antifúngica do soforolípido contra *Botrytis cinerea* em folhas e em frutos do tomateiro;
- Produzir e caracterizar estruturalmente revestimentos ativos de amido de mandioca acrescido de soforolípido e frutooligossacarídeos;
- Aplicar e verificar o efeito dos revestimentos ativos na vida útil dos morangos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A cultura do tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é um fruto climatérico proveniente do tomateiro e pertence à família Solanacea. É o segundo vegetal mais cultivado do mundo, com produção anual que excede 180 milhões de toneladas, dos quais 88 milhões são destinados ao mercado *in natura* e 42 milhões são processados industrialmente (FAOSTAT, 2019; VINCHIRAVILARRAGA *et al.*, 2021).

Foi introduzido em solo brasileiro por imigrantes europeus no final do século XIX, e atualmente é cultivado em todos os estados brasileiros. O Brasil ocupa o ranking entre os dez maiores produtores, e a safra de tomates para 2021 está estimada em 3.769.561 toneladas, e destas, 276.823 toneladas serão produzidas no Paraná (IBGE, 2021).

A espécie cultivável do tomate é uma planta herbácea de caule mole e flexível, que não suporta o peso dos frutos na vertical. Desta forma, a hortaliça é cultivada estaqueada ou envarada, enquanto a cultura utilizada para produção industrial é feita de forma rasteira, e as variedades são melhoradas de acordo com o local, forma de cultivo e a sua finalidade (CAMARGO *et al.*, 2006).

O tomate é um fruto de elevado valor nutricional, rico em licopeno, um pigmento encontrado em alta concentração em frutos maduros e associado à prevenção de algumas modalidades de câncer (SCHREIBER, 2012), e em betacaroteno, que apresenta atividade provitamina A e está relacionado a menores índices de doenças coronarianas. (CORREA *et al.*, 2015).

Embora apresentem alta produtividade, as lavouras de tomate são acometidas por pragas e doenças vegetais em níveis alarmantes, e o maior risco de contaminação microbiana ocorre durante o processo de maturação, embora os tomateiros possam ser atacados em qualquer fase de desenvolvimento (BLANCARD, 2014). Os agentes patogênicos são encontrados principalmente no solo e nas águas de irrigação, e após a contaminação das plantas, causam seu adoecimento (ARAGÜEZ *et al.*, 2020; PARDINI *et al.*, 2021). Dentre os principais contaminantes do tomateiro estão os fungos, e doenças importantes provocadas por estes microrganismos estão descritas a seguir.

### 3.2 Doenças do Tomateiro

O tomate possui alta perecibilidade, e por isso sua cultura é uma das mais exigentes na utilização de agrotóxicos. Na insuficiência de informações confiáveis, os tomaticultores fazem uso da infinidade de produtos químicos existentes para combater as doenças, mas isso tem efeitos negativos, podendo ser letal para microrganismos benéficos na rizosfera, além de entrarem na cadeia alimentar e se acumularem no corpo humano como resíduos químicos indesejáveis (BIDARI *et al.*, 2011; LACKAR *et al.*, 2015; CHAOUACHI *et al.*, 2021).

Dentre os principais fitopatógenos do tomateiro estão os fungos, microrganismos causadores do maior número de doenças de plantas, e os grandes vilões da tomaticultura, já que cerca de 15% dos custos de produção de tomate são atribuídos ao uso de fungicidas no combate destes fitopatógenos. Os fungos produzem esporos ou hifas que se espalham pelo vento ou por gotículas de água provindas da chuva e da irrigação. Podem também desenvolver formas de resistência que os permitem sobreviver na ausência da planta hospedeira, em qualquer estação do ano, podendo estar associados ao solo, às plantas, sementes ou insetos (LOPES; ÁVILA, 2005; VINCHIRA-VILARRAGA *et al.*, 2021).

Entre as numerosas estratégias de infecção desenvolvidas por estes fitopatógenos estão a biotrófica, onde o organismo permanece dentro da célula vegetal e a mantém viva, e a necrotrófica, onde os organismos só colonizam a planta hospedeira após matá-la. A morte das células hospedeiras por enzimas fúngicas impede que ela se comunique com outras células de defesa, e o microrganismo prevalece (DIXIT *et al.*, 2018).

A identificação dos fungos é feita de acordo com os sintomas provocados na planta ou pelas suas estruturas vegetativas e reprodutivas (como a forma e o tamanho dos esporos), e a medida preventiva é a principal maneira de controlá-lo, incluindo um conjunto de providências que vão desde a escolha da área a ser cultivada até operações pós-colheita (YOO; LEE; KIM, 2005; SANTOS *et al.*, 2020).

#### 3.2.1 TOMBAMENTO PRECOCE

Uma importante doença do tomateiro é o tombamento precoce, causada pelo oomiceto *Pythium ultimum*, um patógeno ubíquo transmitido pelo solo, onde microrganismos do gênero *Pythium* são comumente encontrados. Eles estão frequentemente associados ao apodrecimento

de qualquer tecido vegetal que esteja em contato com o solo contaminado, e na ausência de hospedeiros, permanecem em dormência através de oósporos ou clamidiósporos (LARA-CAPISTRAN *et al.*, 2020; SVECOVÁ *et al.*, 2013).

*Pythium ultimum* é um patógeno de difícil controle que provoca podridão das sementes, raízes, caules e frutos em campos e estufas (ROBERTS *et al.*, 2021). O fungo pode penetrar diretamente nos tecidos epidérmicos jovens ou através de feridas, e sua invasão é favorecida pela ação combinada de enzimas celulolíticas e pectinolíticas. Os tomateiros podem ser acometidos tanto na fase de produção de mudas quanto após o transplante, e a infecção inicial pode passar despercebida (BLANCARD, 2014). Após o contágio, esporângios são produzidos dentro dos tecidos ou em sua superfície, e a esporulação ocorre tanto em presença quanto em ausência de solo. O tombamento ocorre pelo apodrecimento da base do caule, que provoca a morte da planta, poucos dias após o contágio, e o manejo da podridão é um grande desafio, visto que a doença pode afetar a planta em qualquer idade de desenvolvimento (LOPES; ÁVILA, 2005; SVECOVÁ *et al.*, 2013).

Tal como *Pythium* ssp., o basidiomiceto *Rhizoctonia solani* também é muito encontrado no solo, e são conhecidos pouquíssimos fungicidas eficazes no seu controle (CURTIS *et al.*, 2010). O gênero *Rhizoctonia* é composto por uma diversidade de fungos que variam em relação à especificidade e morfologia do hospedeiro, e causam principalmente murcha de mudas, cancro do caule e podridão das raízes e frutos do tomateiro, resultantes da colonização dos tecidos da planta por hifas ou escleródios, que são uma massa compacta de hifas capaz de sobreviver em condições desfavoráveis (ZHANG *et al.*, 2021). O escleródio confere ao fungo resistência a fungicidas e a condições ambientais adversas, e desempenha um papel significativo na sobrevivência dos propágulos infecciosos em campos agrícolas (LI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019).

As plantas podem ser acometidas por *R. solani* antes ou depois da emergência, o patógeno penetra pela parede celular da epiderme da raiz ou do hipocótilo, e o micélio invade os tecidos vegetais com o auxílio de diversas enzimas que degradam a parede. Como *R. solani* é uma espécie necrofítica, o desenvolvimento das hifas e dos escleródios é proporcional a morte dos tecidos, e as primeiras lesões observadas são manchas avermelhadas ou enegrecidas na planta (BLANCARD, 2014; SALES, 2011).

### 3.2.2 PODRIDÃO DO ESCLERÓCIO

*Sclerotium rolfsii* é um fungo basidiomiceto necrofítico, ubíquo, transmitido pelo solo, e que também pode formar escleródios. Este fungo ataca os tomateiros em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo muito comum em tomates rasteiros, e geralmente provoca infecção dos caules inferiores, próximos a superfície do solo, formando pequenas lesões enxarcadas de água que se espalham rapidamente. Se as condições climáticas forem favoráveis, os micélios se desenvolvem rapidamente, formando uma estrutura algodonosa que toma conta de toda a lesão das áreas subjacentes. Os escleródios são formados (estruturas bege e marrons semelhantes a grãos de mostarda), e o complexo micelial invade todo o sistema radicular da planta, provocando uma murcha inicialmente reversível, seguida de morte (SURIYAGAMON *et al.*, 2018; MILNER *et al.*, 2019).

*S. rolfsii* também é capaz de atacar frutos e folhas que entrem em contato com o solo ou com partes da planta já afetadas, apresentando uma coloração amarelada seguida de uma podridão úmida que provoca degradação dos tecidos (BLANCARD, 2014).

### 3.2.3 BOLOR CINZENTO

*Botrytis cinerea* é um deuteromiceto necrofítico, considerado um dos principais patógenos fúngicos pós-colheita, capaz de infectar todas as partes aéreas da planta em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo uma ameaça durante a safra e após a colheita, durante o armazenamento e transporte do vegetal (CHAOUACHI, 2021). É um fungo onipresente, observado em plantações de tomate em praticamente todas as áreas de produção do mundo, comumente encontrado em campos abertos, locais de maior incidência de umidade.

Quando a infecção ocorre na fase inicial dos tomateiros, a germinação pode ser inibida. Quando os cotilédones são colonizados, há comumente a formação de cancrios no caule, que afetam todo o desenvolvimento da planta. As folhas frequentemente exibem pontos bege a marrons, que levam ao apodrecimento local e eventualmente danifica a folha inteira, com necrose gradual e colapso tecidual. Nos frutos, a infecção pode ser vista como pequenos pontos negros distribuídos superficialmente, após a abertura do cálice. Após a colheita, os frutos infectados formam manchas escuras na epiderme, podendo atingir o mesocarpo, que se torna amarronzado e com consistência gelatinosa (BLANCARD, 2014; KUMAR *et al.*, 2020; PEIAN *et al.*, 2021).

*B. cinerea* também é capaz de formar escleródios, ou de sobreviver saprofiticamente sobre resíduos de plantas (RGUEZ, *et al.*, 2020).

De maneira geral, o controle de todos os microrganismos citados por atacarem o tomateiro é feito por fungicidas químicos. No entanto, o uso desenfreado destes produtos provoca efeitos nocivos à saúde humana e ao ambiente, pois deixam resíduos tóxicos nos alimentos (JI *et al.*, 2020). Desta forma, muitos métodos alternativos têm sido estudados para reduzir a contaminação fúngica dos tomateiros.

### 3.3. A Cultura do Morango e Suas Propriedades

O morango (*Fragaria x ananassa*) faz parte do grupo das frutas vermelhas. Teve sua origem na Europa, no século XVIII, mas hoje é cultivado em diversas regiões do mundo, que desenvolveram variedades adequadas ao clima, fotoperíodo e altitude. É produzido comercialmente tanto para consumo imediato quanto para processamento, e pela alta perecibilidade, requer muitos cuidados na colheita e armazenamento seco e fresco (YAN *et al.*, 2019).

A produção mundial foi crescente nos últimos anos, passando de 7.879.108 toneladas (2013) para 9.223.815 toneladas (2017), ou seja, um aumento de 17% nos últimos cinco anos (FAOSTAT, 2019). No Brasil, a produção atingiu 165.000 toneladas no ano de 2020 (ANUARIO HF, 2020).

O morango é uma fruta muito apreciada por seu sabor e textura, além de ser rico em nutrientes (LI *et al.*, 2020) e antioxidantes, como as antocianinas, que além de serem responsáveis pela coloração da fruta, também são benéficas à saúde pela diminuição do risco de doenças cardiovasculares e de câncer, além de suas propriedades antiinflamatórias (YUAN *et al.*, 2020).

O amadurecimento do morango é visualizado pela mudança de coloração e firmeza, e pela redução da acidez, onde os ácidos orgânicos transformam-se em açúcares durante o processo respiratório. O pH é importante na conservação dos frutos, pois auxilia na manutenção de processos enzimáticos e na estabilidade das antocianinas, interferindo diretamente na expressão da coloração das frutas (VIGNOLO, 2015).

Por não possuir casca, o morango é uma fruta altamente perecível e susceptível ao ataque de microrganismos (PAVINATO *et al.*, 2020). A vida útil da fruta pós-colheita é muito curta (OZTURK; SINGH, 2019), e as principais causas de perdas estão relacionadas ao

manuseio incorreto e armazenamento em embalagens inadequadas (LEBERSORGER; SCHNEIDER, 2014).

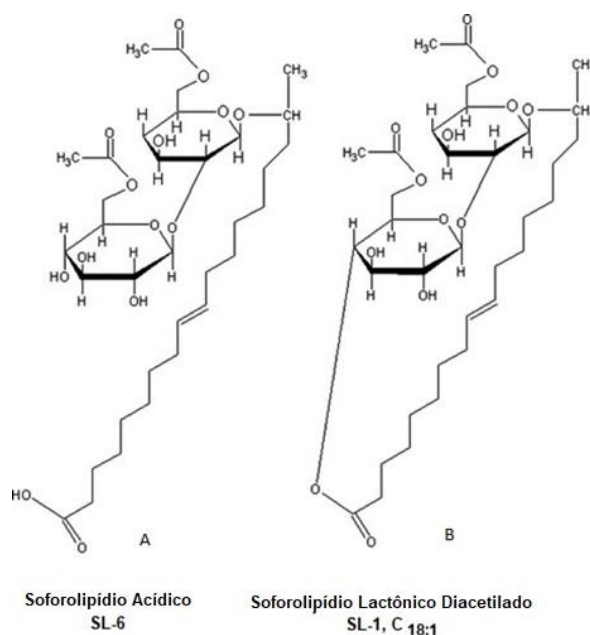
Visando reduzir as perdas, processamentos pós-colheita são necessários, e os principais utilizados são a secagem e a refrigeração. O método de secagem, embora útil para muitos vegetais, apresenta desvantagens quando adotado na conservação de morangos, pois provoca alterações nos níveis de antocianinas, mudanças de coloração e pode levar à ruptura das frutas (ANSAR *et al.*, 2020). A refrigeração é um método frequentemente adotado, que deve ocorrer imediatamente após a colheita e permanecer constante, pois qualquer interrupção da cadeia de frio pode permitir o desenvolvimento de microrganismos. Ainda assim, sabe-se que algumas espécies conseguem atacar os morangos refrigerados, pois as baixas temperaturas reduzem a resistência da cutícula das frutas (FELIZIANI; ROMANAZZE, 2016).

Além dos processamentos citados acima, uma técnica muito utilizada é a aplicação de fungicidas para controlar a podridão pós-colheita dos morangos. Porém, o aumento da exigência de consumidores por produtos livres de agroquímicos despertou o interesse de pesquisadores para métodos alternativos que controlem esta decomposição, e uma técnica que têm se destacado é a utilização de revestimentos ativos, que fornecem ao vegetal uma barreira a danos mecânicos, podendo ter incorporada compostos antimicrobianos ou nutracêuticos, que podem agregar valor ao produto (CHU *et al.*, 2020; FILHO *et al.*, 2020; HAJJI *et al.*, 2020).

#### 3.4. Soforolipídio: Biossíntese e produção

Soforolipídio é um biosurfactante da classe dos glicolipídios, constituído por um dissacarídeo sofrorose e um ácido graxo de cadeia longa, que foi descrito pela primeira vez a cerca de 60 anos atrás, por Gorin, Spencer e Tulloch, que produziram sofrorolipídio de *Torulopsis magnoliae* (GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961; KAUR *et al.*, 2019). Este biosurfactante é um metabólito secundário que pode ser produzido na forma acídica e lactônica, com diferentes padrões de acetilação na porção hidrofílica (Figura 1). A porção hidrofóbica pode variar no comprimento da cadeia (16 ou 18 carbonos), no grau de saturação e na posição da hidroxilação (terminal ou subterminal), possibilitando a formação de diferentes congêneres.

**Figura 1** - Estrutura química dos sofrorolipídios ácido (A) e lactônico (B).



Fonte: ASMER *et al.*, 1988.

Quanto à aplicação, o sofrorolipídio apresenta potencial de utilização em diversos campos industriais, incluindo cosméticos, detergentes, têxteis, alimentos, produtos farmacêuticos e antimicrobianos (YANG *et al.*, 2019). Suas vantagens incluem compatibilidade ambiental, biodegradabilidade e baixa citotoxicidade, combinadas com propriedades funcionais benéficas, como detergência, complexação e atividade antimicrobiana (PINTO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020; DHAR *et al.*, 2021). O equilíbrio hidrofílico/lipofílico, a capacidade de formação de espuma e os efeitos antimicrobianos são fortemente influenciados pelo grau de formação da lactona (VAN BOGAERT *et al.*, 2007; SOLAIMAN; ASHBY; UKNALIS, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2019).

É um metabólito secundário produzido principalmente pela levedura não patogênica *Starmerella bombicola*, também conhecida como *Candida bombicola* (PAULINO *et al.*, 2016), mas existem diversos microrganismos capazes de produzir sofrorolipídio, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1** - Microrganismos produtores de soforolipídio

<b>Microrganismos</b>	<b>Referências</b>
<i>Candida albicans</i>	Yang <i>et al.</i> (2012); Gaur <i>et al.</i> (2019)
<i>Candida apicola</i>	Kurtzman <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida bombicola</i>	Ceresa <i>et al.</i> (2020); Chen <i>et al.</i> (2020)
<i>Candida floricola</i>	Konish <i>et al.</i> (2017)
<i>Candida glabrata</i>	Gaur <i>et al.</i> (2019)
<i>Candida kuoi</i>	Price <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida rugosa</i>	Chandran and Das (2011)
<i>Candida riiodocensis</i>	Kurtzman <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida stellata</i>	Kurtzman <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida tropicalis Y9</i>	Chandran and Das (2011)
<i>Candida parapsilosis</i>	Garg; Priyanka; Chatterjee (2018)
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Mousavi <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhodotorula babjevaeYS3</i>	Sen <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	Van Bogaert; Zhang; Soetaert, 2011
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Chandran and Das (2011)
<i>Starmerella bombicola</i>	Silveira <i>et al.</i> (2019); Hipólito <i>et al.</i> (2020)
<i>Wickerhamiella anomalus</i>	Souza <i>et al.</i> (2017)
<i>Wickerhamomyces (Pichia) anomalus</i>	Van Bogaert; Zhang; Soetaert (2011)
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	Gonçalves <i>et al.</i> (2020)

O Soforolipídio pode ser produzido a partir de uma única fonte de carbono. Porém, quando há associação entre fonte hidrofílica e hidrofóbica, há um aumento substancial desta produção (ASMER *et al.*, 1988). A influência positiva das duas fontes de carbono é explicada pois a fonte hidrofílica é utilizada para a soforose, enquanto a partir do substrato hidrofóbico é sintetizada a cauda lipídica (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012). Além disso, as fontes de carbono também servem para gerar energia ao processo fermentativo.

Quando fontes hidrofílicas diferentes da glicose são utilizadas, estas são convertidas em açúcares redutores que entrarão na via glicolítica, formando o piruvato (Figura 2). Então, a enzima piruvato-desidrogenase catalisará a conversão do piruvato a acetil -CoA, e esta entrará no Ciclo de Krebs, fornecendo energia e metabólitos intermediários para a manutenção do

microrganismo. Ainda, o piruvato poderá sofrer um processo de neoglicogênese, gerando glicose- 6- fosfato. Ao passo que isso acontece, há conversão da glicose para a UDP-glicose ativada, para sintetizar glicogênio e outros carboidratos complexos por fosfoglucomutase e UDP-glicose pirofosforilase, servindo para a composição primária do sofrorolípido (VAN BOGAERT *et al.*, 2007, VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011, MA *et al.*, 2020).

A produção a partir de n-alcenos cresce com o aumento da cadeia na seguinte ordem: C18>C16>C14>C12. Os ácidos palmítico (C16), oleico e esteárico (C18) são diretamente incorporados, mas os substratos de cadeia curta são primeiramente degradados por enzimas oxidases (substratos alcoólicos) ou desidrogenases (demais substratos) e depois utilizados pela via para sintetizar ácidos graxos C16 e C18 que irão compor a estrutura sofrorolípida (CERESA *et al.*, 2020).

O grau de insaturação do ácido graxo adicionado ao meio afeta diretamente a produção do sofrorolípido, e de acordo com Felse *et al.* (2007), a produção é inversamente proporcional ao número de insaturações de sua fonte hidrofóbica.

A enzima CYP52M1 monoxigenase catalisa a oxigenação dos ácidos graxos na porção terminal ( $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ), com auxílio do NADPH. Depois, a glicose (UDP-glicose) é glicosidicamente acoplada na posição C1' do grupo hidroxila do ácido graxo através da ação de uma enzima específica glicosil-transferase I. Em sequência, uma segunda glicose (UDP-glicose) é acoplada na posição C2' da primeira glicose pela ação da enzima glicosil-transferase II. O sofrorolípido obtido após esta etapa é uma molécula ácida não acetilada. A maioria das moléculas são modificadas por esterificação interna (lactonização) e por acetilação do carboidrato. O sofrorolípido lactônico é formado por uma reação de esterificação do grupo carboxila do ácido graxo com um grupo hidroxila da sofrorose. Essa esterificação ocorre normalmente na posição 4, mas também pode ocorrer na posição 6 (VAN BOGAERT *et al.*, 2007, VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011; ROELANTS *et al.*, 2019).

Caso o substrato hidrofóbico não esteja presente no meio, ácidos graxos poderão ser formados pela via de síntese de novo, a partir da acetil-CoA derivada da glicólise. Quando, no meio de cultivo a concentração de glicose for baixa, e a de ácidos graxos for elevada, parte destes será conduzida para a  $\beta$ -oxidação afim de promover a manutenção celular, e a síntese do biossurfactante é interrompida (VAN BOGAERT *et al.*, 2007).



Além das fontes de carbono, as fontes de nitrogênio e os parâmetros (temperatura, tempo, pH e oxigenação), bem como o tipo de processo fermentativo empregado interferem diretamente no rendimento da produção e na proporção de formas acídicas e lactônicas (OLIVEIRA, 2017; TANG *et al.*, 2020).

Diversas fontes de nitrogênio já foram testadas para a produção de soforolipídio, e as principais são as fontes orgânicas: ureia, peptona, extrato de malte e extrato de levedura. O extrato de levedura é considerado o mais eficiente, pois além do nitrogênio, disponibiliza ao cultivo o ácido pantotênico, tiamina e piroxina, além dos metais zinco, ferro e magnésio, a nível traço. Possui um efeito linear negativo na produção, mas quando há interação com a glicose, possui efeito positivo. Em alta concentração, a fonte de nitrogênio depleta a fonte de glicose para promover o crescimento da levedura, mas em baixas concentrações (cerca de 1g/L), há estímulo da produção. A relação nitrogênio/carbono presentes no cultivo para a produção de soforolipídio precisa ser baixa, pois o aumento da concentração da fonte de nitrogênio implicará na diminuição da produção do biossurfactante e aumento da síntese proteica, gerando mais biomassa (CASAS; GARCIA-OCHOA, 1999; MA *et al.*, 2020).

Quando se trata do balanço de síntese das formas acídicas/ lactônicas, menores concentrações de extrato de levedura e longos tempos de fermentação aumentam os teores das formas lactônicas produzidas, independentemente do método de fermentação utilizado (MA *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2019).

Ribeiro *et al.* (2013) reportaram em seus estudos que a fonte de nitrogênio inorgânica nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) estimula a produção de soforolipídio acídico diacetilado devido ao prolongamento da fase exponencial na presença deste sal, visto que o soforolipídio acídico é precursor do soforolipídio lactônico.

Com relação aos parâmetros fermentativos, a temperatura empregada na produção de soforolipídio é de 25 a 30 °C, porém a mais utilizada é a de 30 °C, que Segundo Casas; Garcia-Ochoa (1999), estimula o consumo de substratos e o crescimento celular.

Por tratar-se de um metabólito secundário, o tempo de produção é relativamente longo. Para as produções em batelada simples, o tempo de fermentação varia em torno de 120 horas, e para as bateladas alimentadas, acima de 168 horas, como pode ser observado na Tabela 2.

Quando se trata de pH, o descrito como ótimo foi entre 5,0 e 6,0 para promover o crescimento celular (pH inicial) e em 3,5 durante a fase estacionária para promover a produção de soforolipídio (DÁVILA; MARCHAL; WANDECASTEELE, 1997). Normalmente o pH

sofre uma queda durante a fase estacionária do processo fermentativo devido ao consumo da fonte de nitrogênio e geração de ácidos graxos, e por isso vários trabalhos demonstram que não houve controle do pH durante a produção (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012). Porém, de acordo com Davery; Pakshirajan (2010), o controle do pH pode promover aumento de até 27,6% na produção de soforolipídio.

A oxigenação durante o processo fermentativo é essencial tanto na fase exponencial, pois as leveduras são sensíveis à limitação de oxigênio (GUILMANOV *et al.*, 2002) mas também na síntese do soforolipídio, pois a enzima P450 monoxigenase envolvida na biossíntese carece de oxigênio molecular para sua atuação (VAN-BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

O tipo de processo fermentativo tem influência na produção de soforolipídio, e as melhores produções encontradas na literatura são obtidas em biorreator, cerca de 477 g/L como está descrito na Tabela 2 (ZHANG *et al.*, 2018). Os autores afirmam que o excesso de soforolipídio no meio de cultivo inibe a produção do biossurfactante, e que a própria molécula pode servir de fonte de carbono para a produção. Além disso, o soforolipídio suprime o crescimento celular, indicando que a recuperação do produto ameniza a inibição, obtendo-se melhores taxas de produção.

A adição controlada do substrato hidrofóbico previne o efeito inibitório dos ácidos graxos no crescimento celular e na produção de soforolipídio. A adição em excesso de substrato hidrofóbico favorece a formação de soforolipídio na forma lactônica, enquanto a adição controlada favorece a formação acídica (LIU *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2019).

**Tabela 2:** Produção de soforolipídio variando as condições de fermentação por diferentes autores

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato Hidrofílico</b>	<b>Substrato Hidrofóbico</b>	<b>Substrato Nitrogenado</b>	<b>Tipo de Fermentação</b>	<b>T(°C) / t(h)</b>	<b>Rendimento (g/L)</b>	<b>Referência</b>
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Glicerol	Éster de Metil-soja	Extrato de levedura	Biorreator com Alimentação	27/ 168	46,0	Ashby <i>et al.</i> (2006)
		Éster de Etil-soja				42,0	
		Éster de Propil-soja				18,0	
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Melaço de soja	Ácido oleico	Extrato de levedura	Biorreator com Alimentação	26/ 168	75,0	Solaiman <i>et al.</i> (2007)
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose	Óleo de soja	Extrato de levedura/Ureia	Erlenmeyer	30/ 120	29,37	Daverey e Pakshirajan, (2009)
	Melaço de cana	Óleo de soja	Extrato de levedura/Ureia			12,67	
	Melaço de cana	Óleo de soja	Não utilizado			23,25	
	Melaço de cana	Óleo de girassol	Não utilizado			17,46	
	Melaço de cana	Azeite de Oliva	Não utilizado			18,96	

<i>S. bombicola</i> NRRLY 17069	Soro desprot. e glicose	Ácido oleico	Extrato de levedura	Erlenmeyer	30/ 192	23,29	Daverey e Pakshirajan, (2010)
				Biorreator	30/ 192	25,54	
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose	Óleo de girassol	Extrato de levedura	Erlenmeyer	30/ 200	12,3	Wadekar <i>et al.</i> (2012)
		Óleo de girassol usado				3,97	
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Bagaço de sorgo	Óleo de soja	Extrato de Levedura	Biorreator	25/ 240	84,60	Samad <i>et al.</i> (2014)
	Fibra de milho	Óleo de soja				15,60	
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Glicerol	Óleo de rícino	Não definido	Biorreator	30/ 200	2,7	Bhangale <i>et al.</i> (2014)
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose	Torta de óleo de girassol e óleo de soja bruto	Peptona e amônia	Fermentação em estado sólido	30/ 96	41,2	Rashad <i>et al.</i> (2014)
<i>C. bombicola</i> NBR 102423	Hidrolisado de espiga de milho	Azeite	Extrato de levedura	Biorreator	25/ 168	43,8	Konishi <i>et al.</i> (2015)
<i>C. bombicola</i>	Glicose		Extrato de levedura	Erlenmeyer	30/ 120	39,81	Minucelli <i>et al.</i> , 2016

ATCC 22214		Gordura de frango					
<i>W. domercqiae</i> CGMCC1576 <sup>a</sup>	Palha de arroz hidrolisada	Ácido oleico	Extrato de levedura	Erlenmeyer	30/-	53,0	Liu <i>et al.</i> (2016)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose	Óleo de palma	Extrato de levedura, ureia	Erlenmeyer	30/ 120	32	Shah <i>et al.</i> (2017)
		Óleo de Tapis				26	
		Óleo de Ratawi				21	
		Óleo de Melita				19	
<i>C. bombicola</i>	Glicose	Óleo de Cavalo	Extrato de Levedura	Biorreator	25/ 168	71,7	Maeng <i>et al.</i> (2018)
<i>C. albicans</i> 0-13-1	Glicose	Ácido oleico	Extrato de levedura, peptona	Biorreator	30/ 70	477,0	Zhang <i>et al.</i> (2018)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose/ licor de milho	Óleo de canola	Amônia	Biorreator	25/ 125	200,0	

							Chen <i>et al.</i> (2019)
<i>S. bombicola</i> MTCC 1910	Glicose	Óleo de Girassol Óleo ácido de girassol	Extrato de levedura, peptona	Erlenmeyer	30/ 192	15,03 46,69	Jadhav; Pratap; Kale (2019)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose	Ácido Oleico	Proteína de soja, milhoarina e soro de leite	Erlenmeyer	30/ 120	36,13	Afonso <i>et al.</i> (2020)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose	Biodiesel Biodiesel e óleo de canola	Extrato de Levedura, peptona	Erlenmeyer Biorreator com alimentação	25/ 144 25/-	58,1 224,2	Kim <i>et al.</i> (2020)

### 3.5 Atividade Antimicrobiana do soforolipídio

O soforolipídio ganhou uma importância considerável devido às suas propriedades contra uma ampla gama de microrganismos. A atividade antimicrobiana deste biossurfactante diz respeito às suas propriedades de permeabilização da membrana celular, uma vez que pode induzir a formação de poros e canais iônicos na bicamada lipídica, sendo capaz de desestabilizar a membrana plasmática, perturbando sua integridade e permeabilidade. Além disso, a formação de poros pode causar influxos de íons transmembranares, incluindo  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , que resultam em rompimento da membrana e morte celular. (CELLIGOI *et al.*, 2020; FRACCHIA, 2012; HIPÓLITO *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2019).

Existem relatos na literatura que comprovam a eficácia do soforolipídio contra microrganismos patogênicos humanos, encontradas em alimentos ou capazes de formar biofilmes, e também contra fitopatógenos.

À respeito da atividade do soforolipídio contra microrganismos capazes de causar infecções em humanos Zhang *et al.* (2016) reportaram em seu trabalho a avaliação da atividade antimicrobiana de soforolipídio de *S. bombicola* (ATCC 22214) contra *Salmonella ssp.* e *Listeria monocytogenes*. A produção do biossurfactante se deu com três fontes hidrofóbicas (ácidos oleico, palmítico ou esteárico), em batelada alimentada. Os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana do soforolipídio lactônico nas concentrações 1, 5 e 10 mg/mL é maior do que a da forma acídica, independente do substrato hidrofóbico utilizado em sua produção. Uma redução de mais de 5 logs na contagem de *L. monocytogenes* foi observada após 1 min de aplicação do soforolipídio lactônico associado a etanol 20%. A mesma redução foi constatada após 1h de aplicação em *Salmonella ssp.*

Zhang *et al.* (2017) produziram soforolipídio segundo a metodologia de ZHANG *et al.* (2016), e avaliaram sua atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* O157:H7. Os resultados mostraram que o soforolipídio lactônico produzidos com ácido esteárico e com ácido oleico nas concentrações 1, 5 e 10 mg/mL e dissolvidos em etanol 20% foram mais eficazes no controle de *E. coli*, reduzindo significativamente o seu crescimento entre 1 e 2 horas de aplicação.

Olanya *et al.* (2018) produziram soforolipídio utilizando como fonte hidrofóbica o ácido palmítico, e avaliaram sua atividade antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*. Foram preparadas soluções com etanol, água e soforolipídio em diferentes concentrações e realizados testes *in vitro* e no tomate (pós-colheita).

Os resultados mostram que o soforolipídio apresentou atividade bactericida à partir da concentração de 0,05 mg/mL.

Gaur *et al.* (2019) testaram soforolipídio de *C. glabrata* contra estirpes de *B. subtilis* (MTCC 441) e *E. coli* (MTCC 723). Os resultados mostraram que 0,06 mg/mL de biossurfactante matou 65,8% de *B. subtilis* e 4% de *E. coli.*, pelo método de análise de citometria de fluxo.

Silveira *et al.*, (2019) testaram a atividade de soforolipídio de *S. bombicola* (ATCC 22214) associados ao ácido láctico contra *Clostridium perfringens* (ATCC® 3624™) e *Campylobacter jejuni* (ATCC® 33560™), pelo método de microdiluição em caldo. Os resultados mostraram que, para *C. perfringens*, a concentração inibitória mínima (CIM) de soforolipídio puro foi de 0,03 mg/mL, e em combinação com ácido láctico, 0,015 mg/mL. Já para *C. jejuni*, a concentração inibitória mínima (CIM) de soforolipídio puro foi de 10 mg/mL, e em combinação com ácido láctico, 5 mg/mL, mostrando que o tratamento combinado de soforolipídio e ácido láctico foi capaz de manter a eficiência antibacteriana em apenas ½ CIM de cada composto, representando uma interação aditiva.

Fontoura *et al.* (2020) produziram soforolipídio de *C. bombicola* utilizando gordura de frango, e aplicaram contra bactérias Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*) e bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*). Os resultados revelaram que houve redução da viabilidade microbiana quando o biossurfactante foi aplicado na concentração de 0,5 mg/mL contra bactérias Gram-positivas e 2 mg/mL contra bactérias Gram-negativas.

Alguns microrganismos são capazes de formar biofilmes, colonizando cateteres e provocando infecções graves em pacientes. A respeito da atividade do soforolipídio contra estes microrganismos, Diaz-De-Rienzo *et al.* (2015) investigaram a atividade antimicrobiana e o efeito do soforolipídio na interrupção do crescimento de biofilmes. Os resultados mostraram que o biossurfactante teve atividade bactericida e bacteriostática contra *Cupriavidus necator* (ATCC 17699) e *B. subtilis* (BBK 006), em concentrações superiores a 50 mg/mL durante as primeiras 3 h de células de crescimento. A mesma concentração de soforolipídio também foi capaz de interromper biofilmes formados por *B. subtilis* (BBK 006), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144) em condições estáticas e de fluxo.

Haque *et al.* (2016) investigaram em seu trabalho o efeito do soforolipídio sozinho ou associados à anfotericina-B ou fluconazol. Os resultados mostraram que o biossurfactante

regula negativamente a expressão de genes específicos das hifas, o que possivelmente explica seu efeito inibitório no biofilme. A concentração inibitória mínima de soforolipídio foi de 0,06 mg/mL, e quando associados à anfotericina ou ao fluconazol, houve uma interação sinérgica contra a formação dos biofilmes.

Pontes *et al.* (2016) testaram a eficácia do soforolipídio em prevenir a formação de biofilmes de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), e os resultados revelaram que a presença do biossurfactante diminuiu a hidrofobicidade dos cateteres de silicone, inibindo a formação do biofilme. Soforolipídio a 0,38 mg/mL inibiu 100% da formação de filmes de *S. aureus*, e 60% de *E. coli*.

Ceresa *et al.* (2020) também testaram a eficácia do soforolipídio contra biofilmes de *S. aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *C. albicans* (IHEM 2894). Soforolipídio em concentrações acima de 1mg/mL mostrou efeito de interrupção de biofilmes de 70%, 75% e 80% para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, respectivamente.

Na agricultura, o controle da proliferação de microrganismos fitopatogênicos é um desafio, pois estes podem provocar perdas de lavouras inteiras, e enormes prejuízos à economia. O soforolipídio também apresenta bons resultados contra alguns tipos de microrganismos fitopatogênicos (BLANCARD, 2014; CELLIGOI *et al.*, 2020).

Yoo *et al.* (2005) produziram soforolipídio de *C. bombicola* (ATCC 22214) em biorreator, com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica contra fitopatogênicos. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram que 80% do crescimento micelial de *Phytophthora* sp. e *Pythium* sp. foi inibido com 0,5 mg/mL de soforolipídio, e a motilidade de zoósporos de *Phytophthora* sp. diminuiu em 80% com 0,1 mg/mL de soforolipídio. No entanto, as concentrações eficazes para a lise do zoósporo foram duas vezes superiores às da inibição da motilidade. A maior lise dos zoósporos foi observada em *Phytophthora capsici*, que apresentou 80% de células lisadas quando aplicados 0,1 mg/mL de soforolipídio.

Schofield *et al.* (2013) depositaram uma patente em que descrevem a administração de soforolipídios puros, naturais e modificados contra microrganismos fitopatogênicos *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vitro*, soforolipídio em concentrações de até 5 mg/mL apresentou atividade antimicrobiana contra diversos fungos, como *Alternaria tomatophilia*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium asiaticum*, *Fusarium austroamericana*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium*

*digitatum*, *Penicillium funiculosum*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici* e *Ustilago maydis*; e contra os fitopatógenos bacterianos, *Acidovorax carotovorum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris*. Soforolipídio modificado mostrou um aumento de atividade em comparação com sofrorolipídio natural, que segundo os autores, pode chegar até a ser mil vezes maior, usando modificações simples, como esterificação de grupos carboxila de ácidos graxos e acetilação de grupos específicos.

Um outro estudo utilizando sofrorolipídio foi realizado por Dengle-Pulate *et al.* (2014). Neste trabalho, os autores produziram o biossurfactante utilizando álcool láurico, e o adicionaram após a purificação como ingrediente ativo em uma solução sanitizante contendo sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) e carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Foram realizados testes *in vitro* utilizando  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  UFC de diversas bactérias, com destaque nas bactérias gram-negativas *Erwinia crysanthemii* e *Xanthomonas campestris*. Na concentração de 2,5 mg/mL, houve inibição total de *E. crysanthemii*, e na concentração de 10 mg/mL houve 80% de inibição de *X. campestris*.

Fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. Pisi e *Corynespora cassiicola* apresentaram um perfil de sensibilidade ao sofrorolipídio produzido por *Rhodotorula babjevae* YS3 no trabalho desenvolvido por Sen *et al.* (2017). De acordo com os testes, a atividade antifúngica foi promissora quando o sofrorolipídio foi aplicado em concentrações até 1 mg/mL.

Hipólito *et al.* (2020) testaram a ação antimicrobiana do sofrorolipídio contra 5 espécies de fungos contaminantes de alimentos, e os testes de microdiluição em placas de 96 poços mostraram ação contra *F. oxysporum* e cinco espécies de *Aspergillus* ssp. na concentração de 0,73 mg/mL, *B. cinerea* na concentração 0,43 mg/mL e *Rhizopus* ssp na concentração 0,23 mg/mL.

Como muitos microrganismos adquiriram resistência aos antimicrobianos convencionais, o sofrorolipídio é uma boa alternativa de antimicrobiano natural, pois além de ser uma molécula estável e de baixa toxicidade, também é biodegradável, e não deixa resíduos poluentes no ambiente.

### 3.6 Revestimentos ativos e aplicação em morangos

A busca por alimentos naturais, de alto valor nutricional, vida útil prolongada, e livres de agrotóxicos cresceu muito nos últimos anos, e isso tem levado ao desenvolvimento de revestimentos contendo compostos ativos naturais (TREVINO-GARZA *et al.*, 2015; MANTOVAN *et al.*, 2018). Os revestimentos ativos são películas protetoras comestíveis que formam uma camada sobre o alimento e contribuem para que sua vida útil seja estendida, reduzindo as trocas gasosas e as reações oxidativas, além de formarem uma barreira protetiva contra microrganismos deteriorantes. Estes revestimentos contêm em sua formulação os chamados “ingredientes ativos”, e dentre os principais estão os antimicrobianos, prebióticos, óleos essenciais, extratos de plantas e proteínas (BERSANETI *et al.*, 2016; BERSANETI *et al.*, 2019; FALCÓ *et al.*, 2019; CHU *et al.*, HAJJI *et al.*, 2020; NAIR *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2020).

Tendo em vista a alta perecibilidade dos morangos, vários trabalhos foram desenvolvidos associando o uso de revestimentos ativos para esta fruta, com intuito de manter os atributos de qualidade e aumentar a vida útil do alimento (CHU *et al.*, 2020; DONG e WANG, 2017; FALCÓ *et al.*, 2019).

Trevino-Garza *et al.*, (2015) produziram e aplicaram em morangos, revestimentos ativos comestíveis à base polissacarídeos como pectina, pululana e quitosana, incorporados com benzoato de sódio e sorbato de potássio, visando prolongar sua vida útil, associando os revestimentos ao armazenamento sob refrigeração. Os resultados mostraram que os morangos revestidos tiveram menor perda de peso, e os filmes contendo quitosana foram os que apresentaram melhor inibição microbiana. Os revestimentos melhoraram as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos morangos, aumentando a vida útil de 06 para 15 dias.

Dong; Wang (2017) realizaram um estudo que teve como objetivo determinar os efeitos de revestimentos compostos de carboximetilcelulose e óleo essencial de alho em morangos armazenados a 20 °C. A eficácia dos revestimentos foi avaliada por análises físico-químicas e teste sensorial. Os resultados revelaram que morangos revestidos apresentaram retardo na senescência e manutenção do conteúdo nutricional em até 6 dias de armazenamento.

Tomadoni *et al.* (2018) produziram revestimentos ativos de gelana incorporados com geraniol e extrato de romã, em diferentes concentrações. Ambos os ingredientes ativos possuem

eficácia comprovada contra diversos tipos de microrganismos. Morangos minimamente processados foram imersos nas diferentes soluções e armazenados (7 dias, 5 °C) para avaliação da evolução de bactérias mesofílicas, bolores e leveduras (YM) e bactérias psicotróficas. Além disso, nos dias 0 e 7, foi realizada uma avaliação sensorial. Os revestimentos de gelana não tiveram efeito significativo contra os microrganismos, em comparação ao controle. Os revestimentos de gelana + geraniol em todas as concentrações testadas reduziram significativamente as contagens microbiológicas, e a incorporação do extrato de romã não conseguiu controlar o crescimento microbiano nos morangos. Por outro lado, morangos contendo revestimento de geraniol tiveram sua textura significativamente afetada pelo tempo de armazenamento, e apresentaram perda de firmeza maior que a dos controles.

Hajji *et al.* (2018) produziram filmes ativos de quitosana contendo carotenoproteínas de camarão, e aplicaram em morangos. Propriedades físico-químicas e microbiológicas foram avaliadas durante o armazenamento refrigerado (4 °C, por 11 dias). Os resultados mostraram que os revestimentos foram eficazes na redução da composição fúngica, e os morangos revestidos apresentaram perda de peso significativamente menor, o que confere maior vida útil a estas frutas.

Falcó *et al.* (2019) reportaram em seu trabalho que existe uma preocupação eminente com as doenças de origem alimentar causadas pelo consumo de alimentos contaminados com vírus entéricos humanos. Com base nisso, produziram revestimentos ativos de alginato contendo extrato de chá verde como agente antiviral, para preservação de morangos. Os resultados mostraram que as propriedades antioxidantes dos filmes não foram dependentes do pH, mas a atividade antiviral foi maior em pH 5,5. A infecciosidade viral em morangos frescos após os tratamentos de revestimento foi reduzido em aproximadamente 1,5–2 log durante o período de armazenamento de 4 dias a 10 °C em comparação com os controles, e uma inativação completa dos vírus foi observada após armazenamento noturno a 25 °C.

Mahcene *et al.* (2020) também desenvolveram filmes ativos à base de alginato, e incorporaram com óleos essenciais de *R. officinalis* L, *A. herba alba* Asso, *O. basilicum* L e *M. pulegium* L. Os filmes foram caracterizados de acordo com suas propriedades ativas, como espessura, teor de umidade, vapor de água e permeabilidade ao oxigênio, teste de liberação, propriedades mecânicas, moleculares, biodegradabilidade e térmicas. Os resultados mostraram que os filmes ativos apresentaram efeito antibacteriano contra seis tipos de bactérias

patogênicas, com zona de inibição entre 18,5 e 38,67 mm. Além disso, a capacidade antioxidante dos filmes variou de 4,57% a 23,09%, mostrando que estes filmes podem ser utilizados no revestimento de alimentos.

Chu *et al.* (2020) avaliaram em seu trabalho o efeito de revestimentos ativos de pululana acrescidos com nanoemulsão de óleo essencial de canela na vida de prateleira e senescência de morangos frescos armazenados em temperatura ambiente. Após seis dias de armazenamento, o revestimento ativo reduziu notavelmente a perda de massa das frutas, e mostrou atividade contra bactérias e fungos (2,544 e 1,958 log UFC / g, respectivamente), revelando que estes revestimentos ativos são eficientes na conservação dos morangos.

Muley e Singhal (2020) prepararam filmes conjugados de quitosana e proteína de soro de leite, com a finalidade de estender a vida útil dos morangos no pós-colheita. As soluções filmogênicas foram avaliadas segundo suas propriedades como cor, vapor de água e taxa de transferência de oxigênio, textura, cristalinidade térmica e propriedades antioxidantes. Após isso, os filmes foram aplicados como revestimento comestível em morangos e estudados para estabilidade de armazenamento a 5 °C e 20 °C, avaliando parâmetros físico-químicos e bioquímicos. Os resultados mostraram uma redução considerável nos índices de cor, perda de peso, pH e acidez titulável, açúcares redutores, ácido ascórbico, fenólicos totais. Os morangos controle tiveram uma vida útil de 3 e 5 dias, enquanto os revestidos, 5 e 8 dias, quando armazenados a 20 °C e 5 °C, respectivamente.

Embora a aplicação de revestimentos ativos de soforolipídio em morangos ainda seja inexistente na literatura, filmes de amido de mandioca contendo soforolipídio em diferentes concentrações já foram produzidos por Hipólito *et al.*, (2021), e apresentaram atividade *in vitro* contra o fungo *B. cinerea*. Além disso, o trabalho relevante de Silveira *et al.* (2020) mostra a produção de filmes ativos de ácido polilático incorporados com soforolipídio, e os testes de suas propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. Os resultados revelaram que a adição de soforolipídio teve um efeito plastificante nos filmes, melhorando sua elasticidade e flexibilidade. Além disso, os filmes produzidos com 10% de soforolipídio exibiram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, indicando que podem ser utilizados para revestir e conservar alimentos.

Além da propriedade antimicrobiana dos revestimentos, estes também podem ser acrescidos de prebióticos, agregando valor nutricional aos alimentos revestidos. São citados na

literatura revestimentos ativos incorporados com fibra de maçã (BAMBACE, ALVAREZ e MOREIRA, 2018), fibras de laranja, inulina (ALVAREZ, PONCE E MOREIRA, 2017), e oligossacarídeos (TANG *et al.*, 2015). Os frutooligossacarídeos destacam-se entre os prebióticos, pois capazes de estimular o crescimento de bactérias benéficas do intestino, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal e reduzindo a absorção de gorduras e açúcares (BERSANETI *et al.*, 2016, BERSANETI *et al.*, 2019). Embora existam diversos estudos sobre a atividade prebiótica dos frutooligossacarídeos, sua aplicabilidade em revestimentos ativos para morangos ainda não é conhecida.

Dentre as diversas matérias-primas utilizadas na produção de revestimentos ativos, o amido de mandioca é comumente utilizado, por ser um ingrediente de baixo custo e que não forma nenhum resíduo tóxico (ALI *et al.*, 2018; BERSANETI *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2019; MANIGLIA *et al.*, 2019; MANTOVAN *et al.* 2018).

Desta forma, a produção de um revestimento de amido de mandioca incorporado com soforolipídio e frutooligossacarídeos se mostra promissora, e sua aplicação em morangos agregará valor ao produto, mantendo a qualidade durante um período prolongado e agregando valor nutricional às frutas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

A levedura *Starmerella bombicola* ATCC 22214 (utilizada na produção do soforolipídio) foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, USA) em 2013, fazendo parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil).

### 4.2 Curva de Biomassa

Para a curva de biomassa de *S. bombicola*, o meio de ativação utilizado foi o YM, contendo em g/L: glicose (10), extrato de levedura (3), peptona (5) e extrato de malte (3). O inóculo foi preparado em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio, incubado em shaker orbital a 150 rpm, 48 h a 30 °C. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (centrífuga universal 320, Hettich, Alemanha) a 7000 rpm, 15 min a 4 °C, a biomassa obtida após a centrifugação foi ressuspensa em solução salina NaCl 0,9 %. Uma alíquota de 1 mL foi submetida a diluições seriadas para obter leituras em espectrofotômetro (libra S22, Biochrom, Reino Unido) de 0,2 a 0,8 de absorvância em  $\lambda = 600$  nm, e as absorvâncias obtidas foram correlacionadas com a curva de biomassa em g/L. Paralelamente, 3 alíquotas de 1 mL foram distribuídas em cadinhos, previamente tarados, e levados à estufa (TC4S, Quimis, Brasil) a 70 °C, até atingir peso constante. Em seguida, os dados foram plotados em um gráfico relacionando absorvância (abs) X peso seco (g/L), e o inóculo foi padronizado em 0,5 g/L para a produção de soforolipídio.

### 4.3 Produção de Soforolipídio

O soforolipídio foi produzido em biorreator de bancada (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda, França) de 5 L, contendo 3,5 L de meio de cultivo (em g.L<sup>-1</sup>): 150 de glicose; 6 de extrato de levedura; 219,5 de oleico. As condições do inóculo foram: 0,5 g/L de células, 120 h, 30°C, 450 rpm, 1 vvm e manutenção do pH em 3,5, por 12 dias. A cada 24h e no tempo final, a biomassa, o soforolipídio, o açúcar e o óleo residual foram quantificados. Ao término

da fermentação, o caldo foi centrifugado e passou por um processo de extração com acetato de etila (1:1) v/v. A fase aquosa foi descartada, o acetato de etila foi removido em rotavaporador (RE 100 Pro, DLAB, EUA) e ao produto resultante foram adicionados metanol, água (4:1) v/v e hexano (1:1) v/v, separando o sofrorolípido (fase metanólica) do ácido oleico residual (fase hexânica). Após a secagem completa do metanol em estufa, o material foi liofilizado (HIPÓLITO *et al.*, 2020).

#### 4.4 Caracterização do sofrorolípido

##### 4.4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O sofrorolípido foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido (LC-20A Prominence, Shimadzu, Japão) em comparação com o padrão 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma Aldrich, USA), utilizando detector de arranjo de iodo, utilizando coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 da Shimadzu (4,6 x 250mm; 4,6mm; 12nm) (SILVEIRA *et al.*, 2019).

##### 4.4.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas para a confirmação da estrutura do sofrorolípido, utilizando um espectrômetro (Avance III, Bruker, EUA) operando a 400,13 MHz para <sup>1</sup>H e equipado com uma sonda de detecção direta (5 mm). O solvente utilizado foi o DMSO-D<sub>6</sub>, com sequências de pulso padrão. Os deslocamentos químicos no espectro ( $\delta$ ) para <sup>1</sup>H foram expressas em partes por milhão em relação ao tetrametilsilano.

##### 4.4.3 TESTES DE ESTABILIDADE

A estabilidade do sofrorolípido foi testada por análises de parâmetros como temperatura, pH e luz ultravioleta. Cada parâmetro foi avaliado isoladamente, utilizando 25 mL

de solução aquosa do biossurfactante na concentração micelar crítica (CMC) de 65 mg/L, de acordo com SILVEIRA *et al.* (2019).

Para determinar a estabilidade térmica em termos de tensão superficial, o soforolipídio foi aquecido até 100 °C por 30 min e uma amostra foi autoclavada (120 °C) pelo mesmo período. Os testes de estabilidade em diferentes níveis de pH, tiveram o pH ajustado de 2 até 12 utilizando HCl (3M) ou NaOH (3M), e na análise fotoestabilidade do soforolipídio, este foi colocado sob radiação ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) por 72h.

Todos os testes foram realizados em triplicata, e ao final de cada tratamento a tensão superficial foi medida utilizando tensiômetro (Krüss K6, Fisher, Alemanha) com anel de Du Nouy.

#### 4.5 Atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica do soforolipídio produzido foi testada contra os fungos *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *R. solani* e *P. ultimum* pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, e foram gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Galdino de Andrade Filho, para a realização deste experimento.

O soforolipídio liofilizado foi solubilizado em meio ágar de batata dextrose (BDA) a 2 mg/mL, autoclavado (Vertical CS, Primatec, Brasil) e colocado em placas de Petri de 50 mm de diâmetro. Discos fúngicos de 5 mm de *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *R. solani* e *P. ultimum* foram colocados no centro das placas e estas foram incubadas a 24 °C para os três primeiros fungos e 28 °C para os dois últimos. O crescimento micelial de cada fungo foi comparado com o controle durante 120h, e a inibição fúngica foi calculada pela equação descrita por ROBLEDO *et al.* (2018):

$$\% \text{ inibição} = \frac{(FC - FT)}{FC} \times 100$$

onde, *FC* é o diâmetro micelial do controle (mm) e *FT* é o diâmetro micelial do tratamento (mm). O resultado é a média das triplicatas.

#### 4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada de acordo com a metodologia de CARDOZO *et al.* (2013). Plugs de cada espécie fúngica com e sem o composto antimicrobiano (2mg/mL) foram fixados por imersão em 1mL de glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, em tubos de microcentrifugação, por 12h e, então, as amostras foram pós-fixadas em OsO<sub>4</sub> a 1% por 2 horas, secas em CO<sub>2</sub>, e por fim as lâminas foram coladas e revestidas em ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas em Quanta 200 SEM (Quant 200 SEM, FEI, EUA).

#### 4.7 Fitotoxicidade

Para esse teste, folhas centrais completamente desenvolvidas do tomateiro, (variedade Santa Clara) após 60 dias de germinação em casa de vegetação, foram adicionadas a placas de Petri de 15 cm de diâmetro, em experimento de câmara úmida, e receberam concentrações diferentes de soforolipídio (1, 2, 4, 8 e 16 mg/mL), dissolvido em DMSO 2%, óleo mineral 0,25% e água destilada. Após isso, foram acondicionadas a 25 °C, como descrito por MIORINI *et al.* (2019). A avaliação foi realizada visualmente a cada 24 horas, durante 3 dias, em comparação ao controle, que foi pulverizado com água destilada + DMSO 2% + óleo mineral 0,25%.

#### 4.8 Teste em folhas destacadas do tomateiro

Folhas de tomateiro, (variedade Santa Clara) com seis semanas de idade sem qualquer lesão aparente foram destacadas, selecionadas e transferidas para placas de Petri de 10 cm de diâmetro, com um algodão umedecido no pecíolo. Após isso, um plug do fungo *B. cinerea* foi inoculado ao centro de cada folha, e estas foram incubadas em estufa a 24 °C, com fotoperíodo de 12h dia/noite durante 72 h. Foram realizados três tratamentos: o preventivo – 24h antes do inóculo, o curativo – 24h após o inóculo e o preventivo-curativo – 24h antes e 24 e 48h após o inóculo fúngico, nos quais foram borrifados 500 µL por folha de soforolipídio diluído em DMSO 2% + 0,25% de óleo mineral + água destilada nas concentrações 1, 2 e 4 mg/mL. Foram

feitas 9 amostras para cada tratamento, e o controle foi borrifado com DMSO 2% + 0,25% de óleo mineral + água destilada.

O índice de gravidade da doença foi classificado numa escala de 0 a 4, de acordo com GAO *et al.* (2018): 0 – nenhum sintoma, 1 – 0,1 a 5%, 2 – 5,1 a 20%, 3 – 20,1 a 40%, 4 – 40,1 a 100%.

A severidade da doença foi calculada pela fórmula:

$$SD = \sum ((FD \times GD) / (4 \times FA)) \times 100$$

onde, *SD* é a severidade da doença, *FD* é o número de folhas doentes, *GD* é o índice de gravidade da doença e *FA* é o número de folhas avaliadas.

A eficácia do soforolipídio foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de Eficácia} = (C - T) / C \times 100$$

onde *C* se refere a *SD* do controle e *T* se refere a *SD* das amostras de cada tratamento.

#### 4.9 Teste em Tomates

O efeito do soforolipídio contra o mofo cinzento causado pelo fungo *B. cinerea* foi testado de acordo com Lahkar *et al.* (2018). A solução de soforolipídio foi preparada utilizando DMSO 2% e água (ambos estéreis) nas concentrações 1, 2 e 4 mg/mL. Para o controle, foram utilizados apenas DMSO 2% e água. Tomates orgânicos (sweet grape) foram adquiridos em mercado local. Frutos saudáveis, pesando aproximadamente 15 g foram selecionados, lavados com água corrente, imersos em solução de 1% de hipoclorito de sódio por 3 minutos e secos por 30 minutos. Em seguida, foram mergulhados em 100 mL de cada concentração do biossurfactante, durante 15 min, e depois acondicionados em caixas plásticas previamente esterilizadas, onde foram secos por 30 min. Então, o controle de infecção e os tratamentos foram feridos utilizando uma agulha estéril, e receberam uma gota de 20 µL de solução 10<sup>6</sup> de esporos de *B. cinerea* sobre a ferida. Após secagem de 10 min, as caixas foram armazenadas em estufa de circulação de ar em temperatura de 24 °C, no escuro, por 30 dias. Durante o tempo de incubação, a formação de micélio foi registrada. O ensaio foi feito com três repetições e três

frutos por repetição. O índice de severidade da doença e de eficácia foram calculados usando a fórmula de GAO *et al.* (2018).

#### 4.10 Produção dos revestimentos ativos

##### 4.10.1 PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Na primeira etapa, a levanasacarase foi produzida por *Bacillus subtilis* em 420,7 g/L de sacarose a 150 rpm por 24 h. A fermentação foi interrompida por centrifugação, e o sobrenadante considerado como extrato bruto (EB). Na segunda etapa ocorreu a síntese de nistose no meio com 200 mL de solução de sacarose (350 g/L) em tampão citrato (0,1 M), pH 6,0 a 35 °C por 36 h com 50 mL da fonte enzimática (EB). A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 15 min. Para purificação dos frutooligossacarídeos o sobrenadante foi submetido à ultrafiltração em membrana com porosidade de 3 kDa (Milipore Ultracel PL). Assim, foram removidos os polissacarídeos (levana com massa molecular superior a 3 kDa). Após isso, os frutooligossacarídeos foram precipitados com etanol absoluto e liofilizados (BERSANETI *et al.*, 2016).

##### 4.10.2 PRODUÇÃO DE REVESTIMENTOS ATIVOS

Os revestimentos foram preparados a partir de uma solução filmogênica contendo água como solvente, com adição de amido de mandioca, soforolipídio e frutooligossacarídeos parcialmente purificados e glicerol, pelo método de casting (SIPOS *et al.*, 2008; TARANTILI AND KOUMOULOS, 2008), como pode ser visto na Tabela 3.

**Tabela 3:** Formulações de filmes ativos contendo amido (AM), soforolipídio 2% (SLP) e soforolipídio 2% + frutooligossacarídeos 10% (SLP-FOS)

Ingredientes (g)	Formulações		
	AM	SLP	SLP-FOS
Água	386,5	386,5	386,5
Glicerol	2,4	2,4	2,4
Amido	12	11,76	10,56
Soforolipídio	-	0,24	0,24
Frutooligossacarídeos	-	-	1,2

O amido, o glicerol e a água foram aquecidos a 90 °C com agitação constante durante 7 a 8 min, até a obtenção de uma solução homogênea, seguida do resfriamento até 60 °C e da adição de soforolípido e frutooligossacarídeos. Após a homogeneização, a solução filmogênica foi levada ao sonicador (Unique USC-1800) durante 10 min, para a eliminação de bolhas, e em seguida, foram adicionadas 30g de cada formulação em placas de Petri acrílicas de 45 mm para secagem em estufa de circulação de ar a 30 °C por aproximadamente 20h, até a formação dos revestimentos. Após isso, estes foram armazenados em dessecador contendo sílica gel, para que não absorvessem água.

#### 4.11 Caracterização dos Revestimentos ativos

##### 4.11.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras foram mantidas em dessecador com sílica, depois foram recortadas a 5x5 mm, revestidas com ouro por um Sputter Coater e avaliadas com voltagem de aceleração de 30.0 kV.

##### 4.11.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA NO FOURIER (FTIR)

O aparelho utilizado foi o FTIR-8300 (FTIR-8300, Shimadzu, Japão) com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, utilizando-se escala de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram incorporadas à brometo de potássio, e os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR.

##### 4.11.3 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Os ensaios foram realizados no calorímetro DSC -204 (DSC-204, Netzsch, Alemanha) com uma taxa de aquecimento de 10 °C /min em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. Cerca de 10 mg de cada amostra foram colocados em cadinhos de alumínio, o soforolípido foi aquecido de 30 a 300 °C e as amostras de cada revestimento de 20 a 100 °C.

#### 4.11.4 ESPESSURA

A determinação da espessura dos revestimentos foi feita por um Micrômetro (Mitutoyo®), pela escolha aleatória de três pontos na superfície de cada amostra.

#### 4.11.5 SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Os testes foram realizados pelo método de GONTARD; GUILBERT; CUQ (1992), medindo a quantidade de matéria seca dissolvida em água, por 24h. Os testes foram feitos em triplicata, e o percentual de solubilidade foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Solubilidade}(\%) = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100$$

Onde  $m_f$  é a massa final e  $m_i$  é a massa inicial da amostra.

#### 4.11.6 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA)

A PVA foi determinada gravimetricamente seguindo as normas da American Society for Testing and Materials (ASTM E96-95 1996). As amostras foram colocadas em cápsulas de permeabilidade ( $0.00181 \text{ m}^2$ ) previamente preenchidas com cloreto de cálcio anidro para obtenção de uma umidade relativa = 0. Foi realizada uma pesagem no tempo 0 e o armazenamento em dessecador contendo solução saturada de NaCl, com umidade relativa de 75%, à temperatura ambiente. Foram realizadas pesagens a cada duas horas, durante 24h, e os testes foram feitos em triplicata.

O transporte de vapor de água através do revestimento foi mensurado pela diferença de massa (g) da cápsula de permeação em função do tempo (t). Foi determinado o coeficiente angular pela regressão linear da reta obtida, e calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TVA):

$$TVA = \frac{g}{t.A}$$

Onde  $g/t$  é o coeficiente angular da reta (regressão linear) e  $A$  é a área de permeação ( $m^2$ ) da cápsula.

Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$PVA = \frac{TVA \cdot m}{\Delta P}$$

Onde  $m$  é a espessura média do revestimento ( $m^2$ ),  $\Delta P$  é a diferença de pressão de vapor de água do ambiente contendo  $CaCl_2$  anidro (0% de UR) e solução saturada de NaCl (75% de UR).

#### 4.11.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Foram determinadas utilizando um texturômetro Instron 1141 (Instron Ltda, Canton – EUA), seguindo as normas da ASTM (D992-91, 1996). Os corpos de prova de 25 x 100 mm foram mantidos por 24 h em dessecadores contendo solução saturada de  $MgNO_3$ , mantendo a umidade relativa em 55%. Depois disso, as amostras foram ajustadas no texturômetro, a distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de tração de 500 mm/min. Foram determinadas a resistência máxima a tração (Mpa) e a alongação da ruptura (%), de acordo com as fórmulas abaixo:

$$Resistência\ Máxima\ à\ Tração = \frac{F_{max}}{A_{min}}$$

Onde,  $F_{max}$  é a força máxima (N) registrada no equipamento e  $A_{min}$  é a área mínima inicial da amostra ( $m^2$ ).

$$Alongação\ na\ Ruptura = \frac{\Delta t}{DG} * 100$$

Onde, **At** é a elongação total da amostra até a ruptura (m) e o **DG** é a distância inicial entre as garras (m).

#### 4.12 Aplicação dos Revestimentos

Morangos orgânicos maduros adquiridos no mercado local da cidade de Londrina - PR foram lavados em água corrente, assepsiados por imersão em álcool 70% por 1 min, e secos por ventilação forçada durante 30 min à temperatura ambiente. Os frutos foram categorizados aleatoriamente em 4 grupos, com 15 frutos por tratamento. Os revestidos foram feitos por imersão em cada formulação (AM, SLP, SLP-FOS). Após isso, todos os frutos foram secos em ventilação forçada à temperatura ambiente por 12h e armazenados sob refrigeração a 4 °C, para posterior análises.

#### 4.13 Caracterização dos frutos revestidos

##### 4.13.1 PORCENTAGEM DE PERDA DE MASSA

Morangos (5 por tratamento) foram pesados em balança digital no início do experimento, e em 3, 7, 10 e 15 dias. Os resultados foram expressos como porcentagem de perda de massa em relação ao peso inicial, como descrito por MANTILLA *et al.* (2013):

$$PM = (PI - PF/PI) \times 100$$

Onde, *PM* é a perda de massa em g, *PI* é o peso inicial (g) e *PF* é o peso final (g).

##### 4.13.2 MEDIDAS DE pH E ACIDEZ TITULÁVEL

O pH foi medido utilizando um pHmetro de bancada, de acordo com o método AOAC (1994), e as análises de acidez titulável foram pela titulação de 5 mL do suco do morango com NaOH 0,1 molar, utilizando o indicador fenolftaleína (MAZUMDAR and MAJUMDER, 2003). Os testes foram feitos em triplicata e resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

#### 4.13.3 TEOR DE ANTOCIANINAS

Para a dosagem de antocianinas, 20 g da fruta foram misturados com 10 mL da solução de extração (etanol 95% e HCl 1,5 molar, 85:15), e após a maceração, o extrato foi centrifugado a 0 °C, 7000 rpm e 15 min, seco em papel filtro n° 4, e 5 mL da solução resultante foram transferidos para balões de 25 mL, acrescidos com 20 mL de soluções de pH 1,0 e pH 4,5, previamente preparadas, em triplicata, deixados em repouso por 4h, e após isso a quantificação foi feita por absorvância a 535 nm, de acordo com LEES e FRANCIS, (1972).

#### 4.13.4 CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

Para estes testes, 25g de morangos foram triturados e homogeneizados com 50 mL de água peptonada. Foram feitas diluições seriadas, e 1mL de cada diluição foi plaqueada em meio ágar BDA a 25 °C por 2 dias. Todos os testes foram feitos em triplicata, e as contagens de microrganismos foram expressas em log CFU g<sup>-1</sup>. (MALI e GROSSMANN, 2003).

#### 4.14 Análises Estatísticas

A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software Statistica® 12 (Statsoft, Oklahoma).

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de 4 artigos científicos e uma patente.

5.1 – Patente: “Filme Multifuncional com ação prebiótica e antimicrobiana para revestimento de morangos”

5.2 – Artigo 1: Sophorolipids: A review on production and perspectives of application in agriculture

5.3 – Artigo 2: Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato

5.4 – Artigo 3: Aplicação de soforolipídios produzidos por *Starmerella bombicola* em filmes ativos para revestimento de morangos

5.5 – Artigo 4: Improved nutritional quality and shelf life of strawberries by starch coatings incorporated with sophorolipid and fructooligosaccharides

## 5.1 Patente

### **Filme Multifuncional com ação prebiótica e antimicrobiana para revestimento de morangos**

**Autores:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Suzana Mali de Oliveira, Galdino de Andrade Filho, Bárbara Gionco Cano, Ane Stéfano Simionato, Victória Akemi Itakura Silveira, Talita de Oliveira Caretta.

Protocolada em: 30/09/2020 (processo BR 10 2020 020086 0)

**Resumo:** A presente invenção refere-se a um filme multifuncional com ação prebiótica e antimicrobiana, desenvolvido com frutooligossacarídeos de *Bacillus* e soforolipídios de *Starmerella*. A tecnologia apresentada compreende o desenvolvimento de um filme multifuncional para aplicação no revestimento de morangos, visando prolongar a vida útil desse produto altamente perecível através da barreira física e incorporação de soforolipídio como antimicrobiano, além de trazer o apelo prebiótico, devido a incorporação dos frutooligossacarídeos. Assim, a principal aplicação da tecnologia é revestir morangos durante o pós-colheita, a fim de trazer maior qualidade e segurança ao consumidor e diminuir as perdas devido sua perecibilidade.

5.2 Artigo 1: Publicado em: Spanish Journal of Agricultural Research, 2020.

URL: <https://doi.org/10.5424/sjar/2020183-15225>

### **Sophorolipids: A review on production and perspectives of application in agriculture**

Maria Antonia P. C. Celligoi<sup>\*</sup>, Victória A. I. Silveira<sup>1</sup>, Amanda Hipólito<sup>1</sup>, Talita O. Caretta<sup>1</sup> e Cristiani Baldo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 43 33714270 E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

#### **Abstract**

Sophorolipids are bioactive molecules that have gained a lot of attention in the recent decades due to their unique functional properties of reducing surface and interfacial tension, emulsification and solubilization. They are mainly produced by the yeast *Candida bombicola* and are composed of a sugar moiety linked to a fatty acid chain. Sophorolipids are non-toxic, highly efficient and stable at extreme conditions and possess environmentally friendly characteristics over the chemical surfactants. This review is focused on the main characteristics of sophorolipids, fermentation processes, and their utilization in the agricultural field. In this context, sophorolipids are very suitable for use in agriculture, as enhancers of solubility and mobility of plant nutrients, which could result in increased plant biomass, root size and fruit yield. In addition, they could be used for biodegradation of oils, bioremediation of heavy metals in contaminated soils, and as potential biopesticides, to control phytopathogenic microorganisms in agriculture. The extensive use of chemical pesticides has led to widespread insecticide resistance and to hazards to human health and the environment due to their high toxicity. Thus, the introduction of a new biomolecule to control plant diseases and increase crop yield has become an interesting alternative. As a result of the demonstrated antimicrobial activity towards phytopathogenic bacteria and fungi, sophorolipids could be extensively explored in the agriculture field, as a sustainable and natural multifunctional agent for plant crops and soils.

5.3 Artigo 2 Publicado em: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021.  
DOI 10.1002/jsfa.11462

**Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against  
phytopathogens from cherry tomato**

**Running title: Antimicrobial activity of sophorolipids against tomato pathogens**

Talita de Oliveira Caretta<sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Galdino de Andrade Filho<sup>2</sup>,  
Fernando Macedo Jr.<sup>3</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi\*

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas. Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 43 33714270 E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Phytopathogenic microorganisms are the main cause of plant diseases, generating significant economic losses for the agricultural and food supply chain. Cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) are very perishable plants and highly demanding in the use of pesticides, therefore alternative solutions, such as biosurfactants, have aroused as a potent substituent. The main objective of this study was to investigate the antimicrobial activity of sophorolipids against the phytopathogens *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. **RESULTS:** The biosurfactant inhibited the mycelial growth *in vitro* with a minimum concentration of 2 mg.mL<sup>-1</sup>. The application of sophorolipids at 1, 2 and 4 mg.mL<sup>-1</sup> in detached leaves of tomato before the inoculation of the fungus *B. cinerea* was the best treatment, reducing the leaf necrosis by up to 76.90%. The use of sophorolipids in washing tomato fruits before the inoculation of *B. cinerea* was able to inhibit the development of gray mold by up to 96.27%. **CONCLUSION:** The results for tomato leaves and fruits revealed that the biosurfactant acts more effectively when used preventively. Sophorolipids is a stable molecule and has shown promise action for a potential replacement of pesticides in the field and the post-harvest process against the main tomato phytopathogens.

**Keywords:** antimicrobial, sophorolipids, tomato, phytopathogens

## 1. Introduction

Since the beginning of agricultural practices, plants at any stage of development can be attacked by phytopathogens, generating large losses in the harvest. Fungi are the main cause of plant diseases because besides spreading easily through the wind, rain droplets, or irrigation, they can develop forms of resistance capable of surviving in any season, even in the absence of the plant hostess. The fungi *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and the oomycete *Pythium ultimum* affect a diversity of plants, rotting seeds and roots, withering stems, and leading to early tipping and death of plants<sup>1,2,3</sup>. *Botrytis cinerea* is a necrophytic fungus capable of infecting more than 1,400 plant species, both during development and in the post-harvest phase, causing a disease known as gray mold<sup>4</sup>.

Although the tomato culture is widespread in several regions of the world, it is one of the most demanding in the use of pesticides, as it is highly perishable<sup>5</sup>. Despite the effectiveness and ease of application, in the long-term pesticides have a harmful effect when they accumulate in the environment, destroying ecosystems and damaging the human health, in addition to inducing the resistance of microorganisms<sup>6,7</sup>.

As an alternative to pesticides, biosurfactants have aroused interest, as they are stable, biodegradable, and of low toxicity. Sophorolipids is a biosurfactant produced mainly by the non-pathogenic yeast *Starmerella bombicola* and has high chemical stability at different temperatures, pH levels, and ultraviolet light. It can act as an antimicrobial agent, promoting the destabilization of the cell membrane of the microorganism and the formation of pores that can cause transmembrane inflows of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, resulting in cell disruption and death<sup>8,9</sup>.

Although the antimicrobial activity of sophorolipids is known against several phytopathogens, such as: *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp.<sup>10</sup>; *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium verticillioides* and *Corynespora cassicola*<sup>11</sup>; *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora infestans*<sup>12</sup>; *Aspergillus* ssp., *Botrytis cinerea* and *Rhizopus* ssp.<sup>13</sup>; the potential of sophorolipids as a substitute for synthetic pesticides is still poorly explored. Thus, the objective of this work was to produce and to apply the sophorolipids of *Starmerella bombicola* against four tomato phytopathogens *in vitro*, and *in vivo* tests of leaves and cherry tomato fruits against *B. cinerea*.

## 2. Material and methods

### 2.1 Microorganisms

The yeast *Starmerella bombicola* (ATCC® 22214™) was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, USA) and used for sophorolipid production. The fungi *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *R. solani* and the oomycete *P. ultimum* were obtained from the microorganism collection of the Microbial Ecology Laboratory, Department of Microbiology of the State University of Londrina, and used for the antifungal activity tests.

### 2.2 Sophorolipids production

Sophorolipids was produced in a 5 L bioreactor with 3.5 L of working volume comprising the medium composition in g.L<sup>-1</sup>: 150 of glucose, 219.5 of oleic acid and 2.5 of yeast extract, for a period of 12 days (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltd.)<sup>13</sup>. At the end of fermentation, the broth was centrifuged, and the supernatant was submitted to extraction with ethyl acetate<sup>14</sup>. Every 24 h, samples were collected for quantification of sophorolipids, biomass, and substrate consumption.

### 2.3 Sophorolipids characterization

#### 2.3.1 High-performance liquid chromatography (HPLC)

Sophorolipids was analyzed by HPLC in comparison with the sophorolipid standard 1',4"-sophorolactone 6',6"-diacetate (Sigma Aldrich, USA), using a diode array detector SPD M20A ( $\lambda$  207 nm) and a Shim-pack column Shimadzu CLC-ODS (M)<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm; 4.6  $\mu$ m; 12 nm)<sup>14</sup>.

### 2.3.2. Nuclear magnetic resonance (NMR)

<sup>1</sup>H NMR analysis used a Bruker Avance III instrument operating at 400,13 MHz, using a direct probe (5 mm) and DMSO-d<sub>6</sub> as the utilized solvent. The chemical shifts in the spectrum ( $\delta$ ) for <sup>1</sup>H were expressed in parts per million in relation to tetra-methylsilane.

### 2.3.3 Stability tests

Sophorolipids stability was tested by analyzing the environmental parameters: temperature, pH and ultraviolet light in terms of surface tension. Each parameter was evaluated separately, using 25 mL of the biosurfactant diluted in distilled water at the critical micellar concentration (CMC) of 65 mg.L<sup>-1</sup>, according to Silveira *et al.*<sup>14</sup>. Thermal stability was determined by heating the sophorolipids to 100 °C for 30 min and by autoclaving (120 °C) for the same period. To analyze the stability at different pH levels, sophorolipids solution was adjusted from 2 to 12 using HCl (3M) or NaOH (3M). The photostability test was performed under ultraviolet radiation ( $\lambda = 254$  nm) for 72 hours. All tests were performed in triplicate, and at the end of each treatment, the surface tension was measured using Fisher tensiometer (Krüss K6) with Du Nouy ring.

### 2.4 Antimicrobial activity

Sophorolipids was solubilized in potato dextrose agar (PDA) at a concentration of 2 mg.mL<sup>-1</sup> and placed in Petri plates with 50 mm diameter. PDA plugs with 5 mm containing the test phytopathogens *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *R. solani* and *P. ultimum* were placed in the plates and these were incubated at 24 °C for the first two and at 28 °C for the last two. The test was performed in triplicate and control of only fungi or PDA medium were used. The mycelial growth of each phytopathogen was compared to the control for 120 h, and the inhibition was calculated by the equation described by Robledo *et al.*<sup>15</sup>:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(GC - GT)}{GC} \times 100$$

Where:

CG: growth of control (mm) and CT: growth of each treatment (mm)

## 2.5 Phytotoxicity

Fully developed central leaves of the tomato plant, after 60 days of germination, were added to Petri plates with 15 cm in diameter, in a humid chamber, and were sprinkled with different concentrations of sophorolipids (1, 2, 4, 8 and 16 mg.mL<sup>-1</sup>), dissolved in a solution containing 20 g.kg<sup>-1</sup> DMSO, 2.5 g.kg<sup>-1</sup> mineral oil and distilled water. After that, the plates were stored at 25 °C<sup>16</sup>. The evaluation was performed visually every 24 h, for 3 days, in comparison with the control, which was sprayed with distilled water + 20 g.kg<sup>-1</sup> DMSO + 2.5 g.kg<sup>-1</sup> mineral oil.

## 2.6 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was performed according to the methodology described by Hipólito *et al.*<sup>13</sup>. Briefly, disks of *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *R. solani* and *P. ultimum* with and without the antimicrobial compound (sophorolipids at 2 mg.mL<sup>-1</sup>) were immersed in 25 g.kg<sup>-1</sup> glutaraldehyde and 20 g.kg<sup>-1</sup> paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer solution for 12 h. Then, samples were washed with the sodium cacodylate buffer solution, and post-fixed in 10 g.kg<sup>-1</sup> OsO<sub>4</sub> for 30 min. The samples were dehydrated in ethanol gradient and were taken to the critical point in CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 critical point dryer), with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and analysed using a FEI Quanta 200 microscope at 30 kV.

## 2.7 Test in tomato leaves

Six-week-old tomato leaves without any apparent lesion were detached, selected, and transferred to Petri plates, and the ends of the petioles were wrapped in moistened cotton to prevent desiccation. After that, a PDA plug with *B. cinerea* fungus was inoculated in the center of each leaf, and these were incubated in a greenhouse with a 12h day/night photoperiod for 72 h at 24 °C. Three treatments were carried out: preventive (24h before the inoculum), curative (24h after the inoculum), and preventive-curative (24h before and 24 and 48h after the fungal inoculum). The leaves were sprayed with 500 µL of a solution containing different concentration of sophorolipids (1, 2 and 4 mg.mL<sup>-1</sup>) dissolved in DMSO 20 g.kg<sup>-1</sup> + 2.5 g.kg<sup>-1</sup>

mineral oil + distilled water. Nine samples were conducted for each treatment, and the controls were sprayed with 20 g.kg<sup>-1</sup> DMSO + 2.5 g.kg<sup>-1</sup> mineral oil + distilled water.

The disease severity index was classified on a scale of 0 to 4<sup>17</sup>: 0 - no symptoms, 1: 0.1 to 5 %, 2: 5.1 to 20 %, 3: 20.1 to 40%, 4: 40.1 to 100 %. The disease severity was calculated by the equation:

$$DI = \sum ((DL \times DS) / (4 \times RL)) \times 100$$

Where: *DI* is the disease index, *DL* is the number of diseased leaves, *DS* is the disease severity index and *RL* is the number of leaves rated.

Sophorolipids efficacy was calculated by the equation:

$$\% \text{ efficacy} = (C - T) / C \times 100$$

Where: *C* refers to *DI* of the control and *T* refers to *DI* of each treatment.

## 2.8 Test in tomato fruit

The effect of sophorolipids against gray mold caused by the fungus *B. cinerea* was tested<sup>18</sup>. The sophorolipids solution was prepared using DMSO 20 g.kg<sup>-1</sup> and water (both sterile) in the concentrations of 1, 2 and 4 mg.mL<sup>-1</sup>. For the control, only 20 g.kg<sup>-1</sup> DMSO and water were used. Organic tomatoes were purchased from a local market and healthy fruits, weighing approximately 15 g each, were selected, washed with water, immersed in a 10 g.kg<sup>-1</sup> sodium hypochlorite solution for 3 min and dried for 30 min. After, the tomatoes were dipped in 100 mL of each concentration of the biosurfactant for 15 min, and then packed in previously sterilized plastic boxes, where they remained for 30 min to dry. Then, the infection control and the treatments were wounded using a sterile needle and received a drop of 20 µL of 10<sup>6</sup> spores of *B. cinerea* on the wound. After drying for 10 min, the boxes were stored in an air circulation oven at 24 °C for 30 days. During the incubation time, the formation of mycelium was recorded. The test was carried out with three repetitions and with three fruits per repetition. The disease severity and effectiveness index were calculated using the formula of Gao *et al.*<sup>17</sup>.

## 2.9 Statistical analysis

The experiments were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, ( $p \leq 0,05$ ), employing the Statistica 10.0 software.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Sophorolipids production

The results of the fermentation kinetics (production of sophorolipids, biomass and consumption of substrates) are described in Fig. 1. The biomass increased along with the fermentation time and reached a maximum of  $60.6 \text{ g.L}^{-1}$ . The glucose consumption and the sophorolipids biosynthesis were intensified from the 4<sup>th</sup> day, which is justified by the fact that the biosurfactant is a secondary metabolite. Sophorolipids production increased proportionally to the fermentation time, and the maximum was  $111.25 \text{ g.L}^{-1}$  at 12 days. Oleic acid was partially consumed until the end of the process ( $91 \text{ g.L}^{-1}$ ), while glucose was used almost entirely ( $149 \text{ g.L}^{-1}$ ).

The substrates were chosen based on the literature, which state that the best production yields occur in the presence of glucose and oleic acid<sup>19</sup>. Besides that, these substrates are commonly used to produce lactonic sophorolipids, which have been recognized as potent antimicrobial agents<sup>14</sup>.

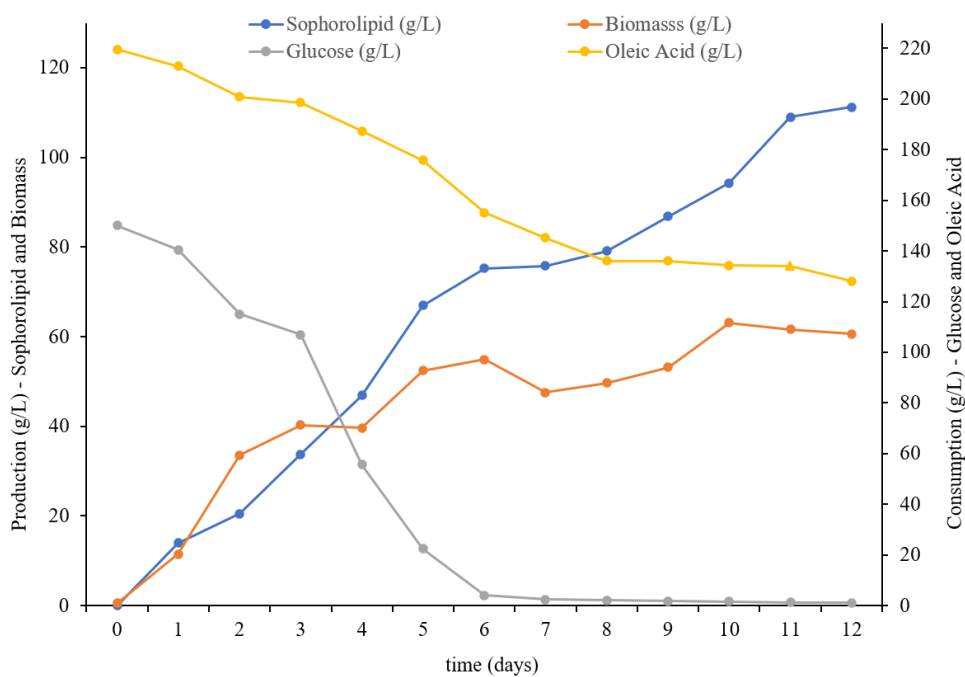
### 3.2 Sophorolipids characterization

#### 3.2.1 High-performance liquid chromatography (HPLC) and nuclear magnetic resonance (NMR)

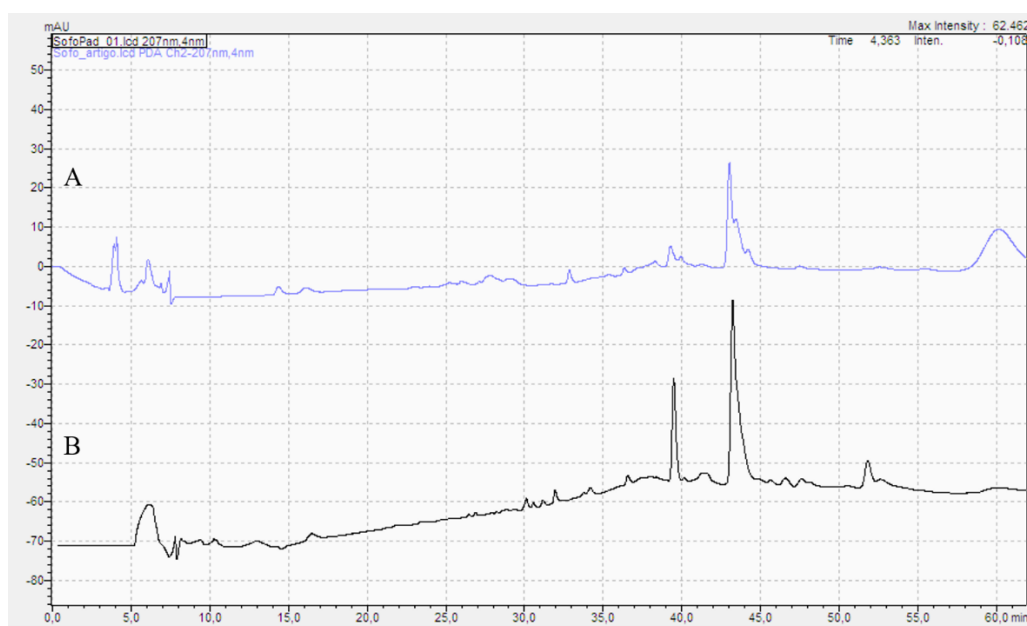
The HPLC analysis showed that the produced sophorolipids profile, in comparison with the sophorolipid standard 1',4''-sophorolactone 6',6''-diacetate, was mainly diacetylated lactonic C18: 1, with retention time in 43.20 min (Fig. 2).

The <sup>1</sup>H NMR spectra (Fig. 3) showed signals at 4.52 and 4.48 ppm attributed to the anomeric protons in the portion of the sophorose and their carbinolic hydrogens between 3.0 and 4.0 ppm. The signs of the oleophilic hydrogens appeared in the characteristic region of 5.18

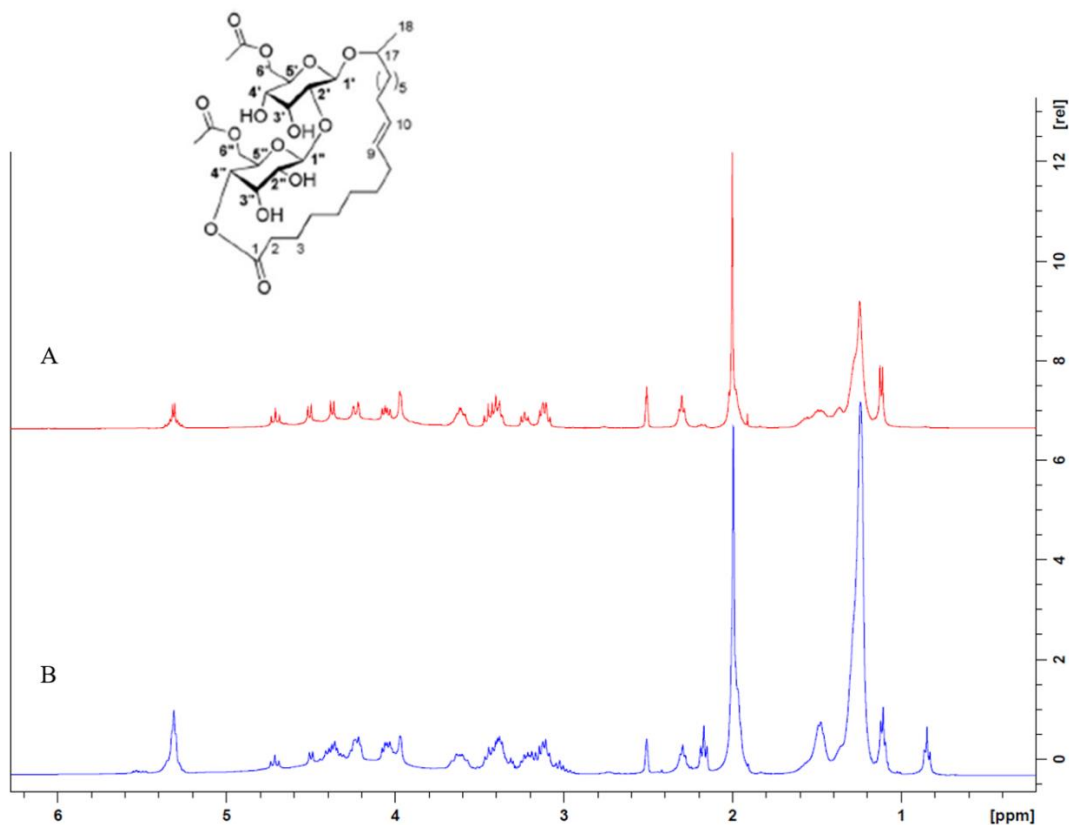
ppm. The peaks between 1.6 and 1.0 ppm, were attributed to the hydrogens of the saturated groups of the aliphatic chain, with methylene in the  $\alpha$  position. The methyls of the acetyl groups were confirmed by the signals at 1.91 ppm and the carbonyl of the lactone was identified at 2.20 ppm.



**Figure 1.** Fermentation kinetic parameters (sophorolipids production, biomass and consumption of glucose and oleic acid).



**Figure 2.** High-performance liquid chromatograph (HPLC) analysis of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* (A); standard 1',4''-sophorolactone 6',6''-diacetate (B).



**Figure 3.** NMR experiments of sophorolipid standard 1',4''-sophorolactone 6',6''-diacetate (A); sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* (B).

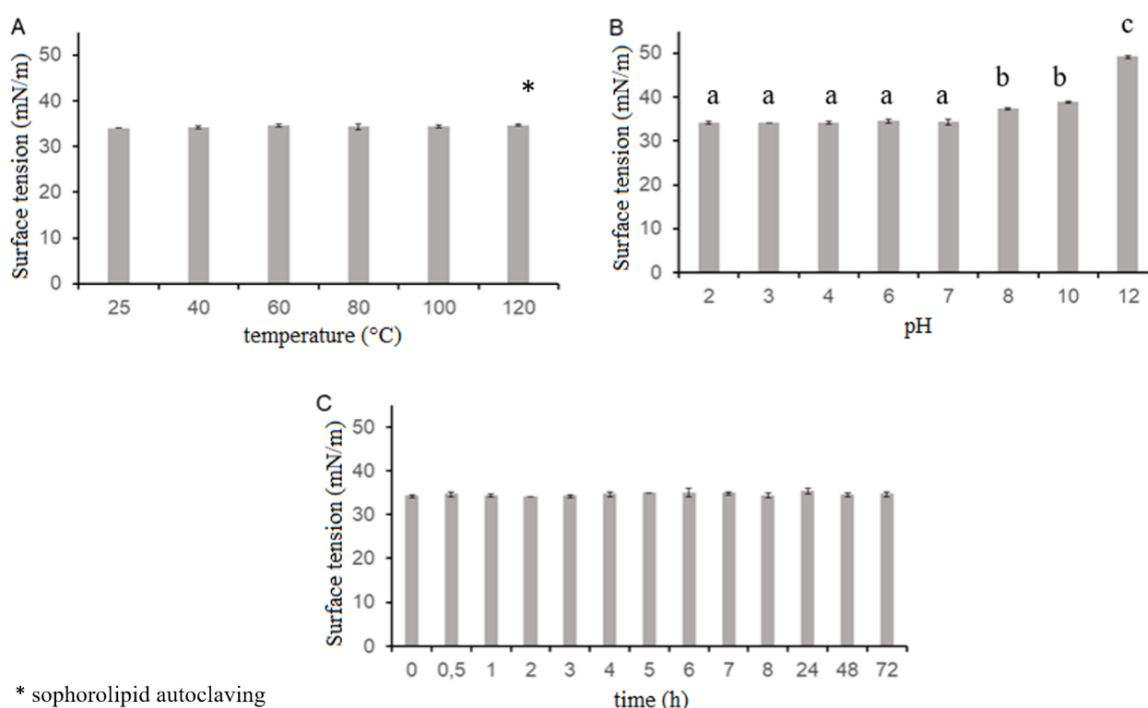
### 3.2.2 Stability tests

Stability at diverse environmental conditions is one of the main features for a successful practical application of any molecule<sup>20</sup>. Hence the effects of temperature, pH and ultraviolet light on surface tension reduction by the sophorolipids was investigated in the study.

The results of the stability tests are demonstrated in the Fig. 4. The thermal stability tests showed that there was no significant variation in the surface activities of sophorolipids, as the surface tension remained stable ( $\sim 34 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) at all temperature levels, including after autoclaving. At different pH levels, the surface tension remained unchanged until pH 7.0 ( $\sim 34 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). At pH 8.0 and 10.0, the tension varied significantly to 37.3 and 38.8  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , respectively, and at pH 12, it reached 49.2  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .

In the photostability test, there was no significant variation in the surface activity of sophorolipids, and the surface tension remained stable ( $\sim 34 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) during the 72 h of ultraviolet radiation. Sophorolipids showed similar thermal stability and different pH levels in the other works<sup>20,21</sup>, but data on stability of sophorolipids under ultraviolet light are mentioned for the first time in this work.

The critical micellar concentration is one of the most important parameters to determine the efficiency of a biosurfactant. According to Sharma and Oberoi <sup>22</sup>, surfactants are amphiphilic agents capable of decreasing the surface tension of water between two immiscible fluids and for a biosurfactant to be considered effective, it must be able to reduce the surface tension of water from 72 to 30 mN.m<sup>-1</sup> and the interfacial tension between water and n-hexadecane from 40 to 1 mN.m<sup>-1</sup>. A stable molecule such as sophorolipids may come to be useful in field and industrial applications, as it will not be degraded by sunlight, nor by the pH of the soil.



**Figure 4.** Effect of temperature (A), pH (B) and ultraviolet light (C) on the surface tension of sophorolipids.

### 3.5 Antimicrobial activity and phytotoxicity

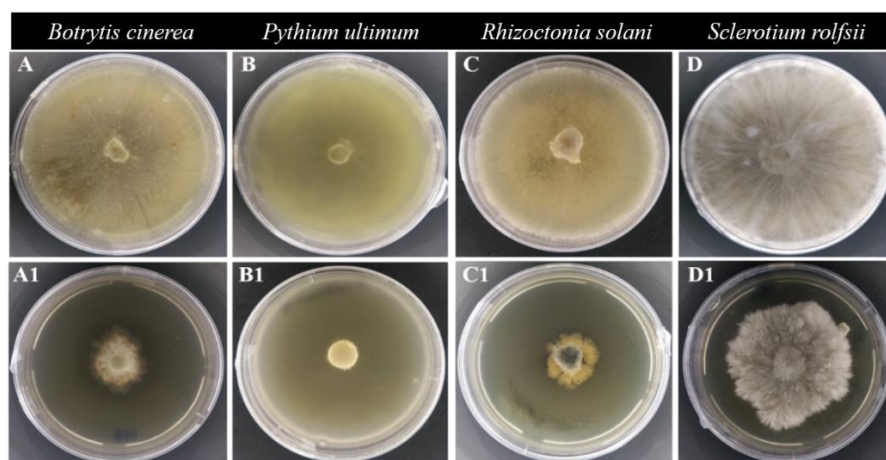
Sophorolipids presented antimicrobial activity against all studied phytopathogens. Sophorolipids was more effective against *P. ultimum*, with 95 % inhibition of the mycelial growth, followed by *B. cinerea* with 75.7 %, *R. solani* with 64.3 % and *S. rolfsii* with 28.5 % (Fig. 5). These phytopathogens are responsible for collar rot and stem rot, causing yellowing and wilting of the leaves, tipping and early death of the tomato seedling <sup>1,2,3</sup>. They can also infect the fruit during the post-harvest, as in the case of *B. cinerea*, which causes early rot, generating considerable economic losses <sup>4</sup>.

Sophorolipids antimicrobial activity occurs mainly by destabilization of the cell membrane of the pathogen, causing changes in its permeability, and possibly inducing to cytoplasmatic extrusions and death <sup>13</sup>. Chen *et al.* <sup>12</sup> studied the effect of sophorolipids against the fungus *Phytophthora infestans* and reported that the biosurfactant can inhibit an enzyme responsible for the development of hyphae, which may also explain the difference observed in growth between control and treatments.

Other studies support the results of sophorolipids having this biocidal activity. Sophorolipids was tested against the oomycetes *Phytophthora* and *Pythium*, obtaining a mycelial inhibition of 42 % with 2 mg.mL<sup>-1</sup> <sup>10</sup>. Also, sophorolipids from *Wickerhamiella domercqiae* inhibited the growth of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* at 10 mg.mL<sup>-1</sup> concentration <sup>23</sup>. An antifungal activity of sophorolipids produced by *Rhodotorula babjevae* YS3 (1 mg.mL<sup>-1</sup>) against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* was also reported <sup>11</sup>.

To determine the pertinence of sophorolipids as a biocontrol agent, phytotoxicity test was performed against tomato leaves. The leaves treated with sophorolipids did not presented any visual changes at any of the tested concentrations (1, 2, 4, 8 and 16 mg.mL<sup>-1</sup>), indicating that this biosurfactant does not have a phytotoxic effect on plants up to a concentration of 16 mg.mL<sup>-1</sup>, and can be used safely for foliar application in tomato plants.

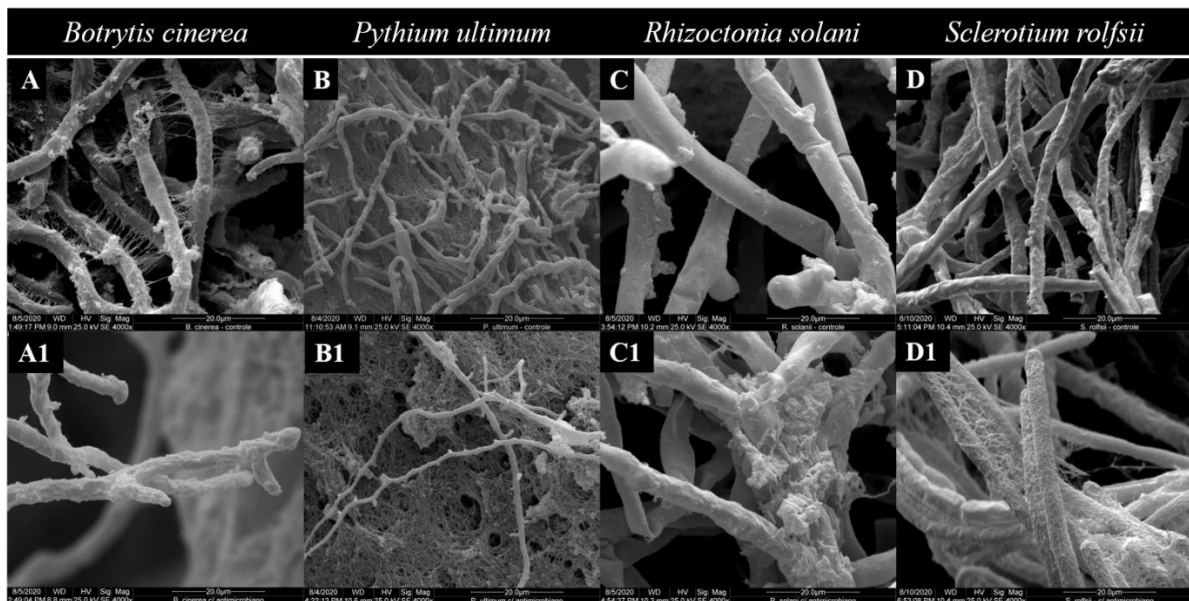
Therefore, the use of sophorolipids as an antimicrobial agent for controlling phytopathogens could be interesting, as it is a biomolecule that does not induce resistance of microorganisms, possess low cytotoxicity, and may be a viable alternative for the replacement of conventional fungicides <sup>24</sup>.



**Figure 5.** Antimicrobial activity of sophorolipids against tomato phytopathogens. Controls (A–D) and treatments with 2 mg.mL<sup>-1</sup> of sophorolipids (A1–D1).

### 3.6 Scanning electron microscopy (SEM)

The SEM images demonstrated the mycelial growth of *B. cinerea*, *P. ultimum*, *R. solani*, and *S. rolfsii*. Fig. 6 A-D represents the controls and Fig. 6 A1-D1 the phytopathogens treated with 2 mg.mL<sup>-1</sup> of sophorolipids. In the controls, it is possible to observe intact mycelial growth, with morphologically normal cells, and the formation of exopolysaccharides (EPS) for *B. cinerea*, which is directly related to the fungal necrotic activity<sup>25</sup>. All phytopathogens treated with sophorolipids presented cellular modifications, for example, *B. cinerea* cells showed deformities in the structure, and there was inhibition in the formation of EPS. This phenomenon has been reported by Simionato *et al.*<sup>26</sup> in which the application of phenazines significantly reduced the production of EPS by the fungus. For *P. ultimum*, the treatment with sophorolipids suppressed the oomycete growth, observing a reduction in the number of hyphae, as previously demonstrated in Fig. 5. For *R. solani* it was possible to observe degenerative changes in the hyphae when compared to controls. For *S. rolfsii*, the formation of a filamentous substance involving the hyphae was observed.



**Figure 6.** SEM micrographs of the controls of *Botrytis cinerea* (A), *Pythium ultimum* (B), *Rhizoctonia solani* (C) and *Sclerotium rolfsii* (D), as well as the respective phytopathogens treated with sophorolipids at a concentration of 2 mg mL<sup>-1</sup> (A1–D1).

### 3.7 Test in tomato plants

The fungus *B. cinerea* was chosen to proceed with the following tests in tomato plants due its ability to contaminate tomatoes at all stages of development and post-harvest process.

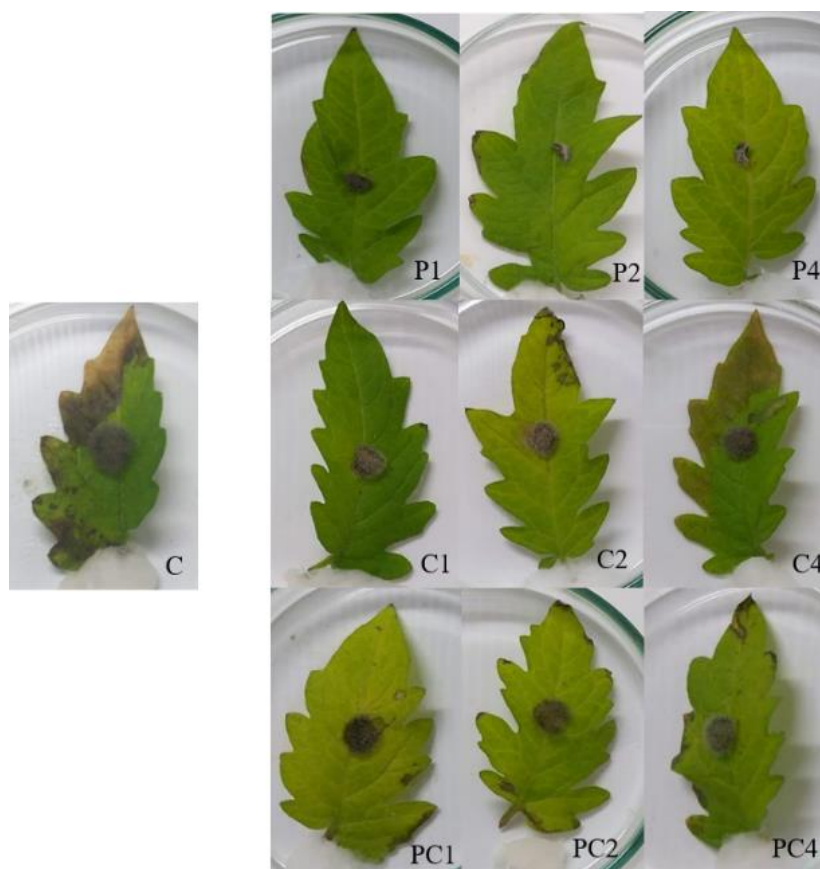
### 3.7.1 Test in tomato leaves

This test was performed to verify the potential action of sophorolipids (1, 2 and 4 mg.mL<sup>-1</sup>) on contaminated tomato leaves with *B. cinerea*. The fungus caused injuries that reached 72.2% of severity in the controls (Table 1). In the preventive test, all treatments presented a significant difference in comparison with the control, being the concentrations of 1 and 4 mg.mL<sup>-1</sup> the most effective against the necrotic lesions. In the curative treatment, only the concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup> had a significant efficacy. In the preventive-curative treatment, the same percentage of efficacy occurred in the concentration of 2 mg.mL<sup>-1</sup> in comparison with the curative treatment with 1 mg.mL<sup>-1</sup>. The concentration of 4 mg.mL<sup>-1</sup> was also significant, whereas the concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup> had no significant difference. The best treatment against the fungus on tomato leaves was preventive, as it prevented the fungus from adhering to the leaf, causing its death. The other treatments, on the other hand, were able to inhibit fungal development, but did not caused its death (Fig. 7).

**Table 1.** Percentage of severity and efficacy of sophorolipids using different concentrations and treatments against *Botrytis cinerea* in detached leaves of tomato

Sophorolipids (mg/mL)	Treatments					
	Preventive		Curative		Preventive -Curative	
	Severity (%)	Efficacy (%)	Severity (%)	Efficacy (%)	Severity (%)	Efficacy (%)
0 (control)	72,2 <sup> A a*</sup>	0 <sup> A a</sup>	72,2 <sup> A a</sup>	0 <sup> A a</sup>	72,2 <sup> A a</sup>	0 <sup> A a</sup>
1	16,7 <sup> B b</sup>	76,90 <sup> B b</sup>	33,3 <sup> B ab</sup>	53,80 <sup> B ab</sup>	50,0 <sup> AB a</sup>	30,70 <sup> AB a</sup>
2	25,0 <sup> B b</sup>	65,40 <sup> B b</sup>	58,3 <sup> A a</sup>	19,20 <sup> A a</sup>	33,3 <sup> B b</sup>	53,80 <sup> B b</sup>
4	16,7 <sup> B b</sup>	76,90 <sup> B b</sup>	58,3 <sup> A a</sup>	19,20 <sup> A a</sup>	41,7 <sup> B a</sup>	42,30 <sup> B a</sup>

\*Capital letters represent statistical comparison between columns and lower-case letters represent statistical comparison between rows



**Figure 7.** Sophorolipids activity at concentrations of 1, 2 and 4 mg mL<sup>-1</sup> against *Botrytis cinerea* on detached leaves of tomato. Preventive (P), Curative (C) and preventive-curative (CP) treatments.

### 3.7.2 Test in tomato fruits

The results are shown in Table 2 and Fig. 8. Sophorolipids inhibited the growth of *B. cinerea* at concentrations of 2 and 4 mg.mL<sup>-1</sup>, in 30 days of the experiment. Tests at different concentrations of rhamnolipids in tomato plants against the fungus *Alternaria solani* showed that the minimum concentration of 1.5 mg.mL<sup>-1</sup> completely inhibited the development of the fungus<sup>27</sup>. Additionally, tests with rhamnolipids in chili peppers to control anthracnose disease, caused by the fungus *Colletotrichum capsici*, concluded that the concentration of 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> was sufficient to reduce the severity of the disease from 67.5% to 12.5%<sup>18</sup>.

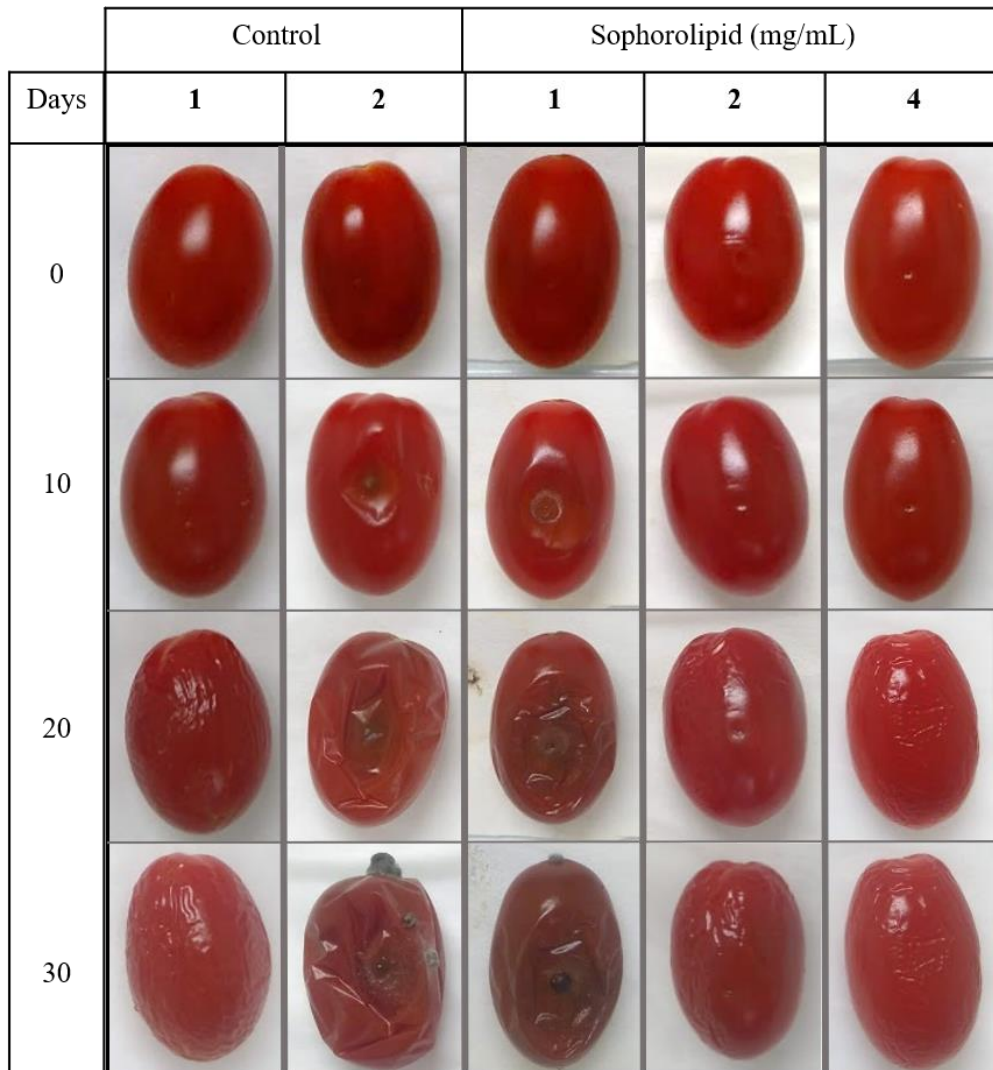
The germicidal effect of sophorolipids was tested on different vegetables. The biosurfactant was used as a sanitizing solution in the concentration of 0.25 mg.mL<sup>-1</sup>, and the results showed that the treatment was effective in preventing the deterioration of chikoos (sapodilla), tomatoes, cucumbers, and lemons<sup>28</sup>. The germicidal effect of different concentrations of sophorolipids in tomatoes (post-harvest) against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* was also tested, revealing that at 5 mg.mL<sup>-1</sup> a

significant reduction in the bacterial growth in tomatoes was observed, demonstrating its sanitizing capacity <sup>29</sup>.

**Table 2.** Percentage of severity and efficacy of sophorolipids in different concentrations against *Botrytis cinerea* in tomato fruit

Sophorolipids (mg/mL)	Severity (%)	Efficacy (%)
0 (control)	75,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
1	86,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2	5,5 <sup>b</sup>	92,67 <sup>b</sup>
4	2,8 <sup>b</sup>	96,27 <sup>b</sup>

Different letters in the same column indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's test.



**Figure 8.** Sophorolipids activity at concentrations of 1, 2 and 4 mg mL<sup>-1</sup> in tomato infected with *Botrytis cinerea* during 30 days storage compared to control. 1 – without infection; 2 – with infection.

### 3.6 Conclusions

The production of sophorolipids reached 111.25 g.L<sup>-1</sup> in 288 h of fermentation and the characterization analysis showed a predominance of a lactonic form. The stability tests demonstrated that the molecule remained stable at temperatures up to 120 °C at 1 atm, at pH values up to 7 and in the presence of UV light. Sophorolipids showed antimicrobial activity against *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. Preventive treatment with sophorolipids in tomato leaves infected with *B. cinerea* led to the death of the fungus in all concentrations tested, and the use of sophorolipids at 2 and 4 mg.m<sup>-1</sup> in tomato fruits was effective for 30 days. Sophorolipids demonstrated to be a promising natural antimicrobial agent against phytopathogens, being an alternative to conventional pesticides for tomato plants and fruits during harvest and post-harvest process.

### Acknowledgements

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the support.

### Conflict of interest

None.

## References

1. De Curtis F, Lima G, Vitullo D, De Cicco V. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. *Crop Prot* **29**: 663-670 (2010).
2. Svecová E, Proietti S, Caruso C, Colla G, Crinò P. Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. *Crop Prot* **43**: 223-230 (2013).
3. Suriyagamon S, Phonkerd N, Bunyaratratchata W. Compost seed of *Trichoderma harzianum* UD 12-102 in controlling collar and stem rot of tomato caused by *Sclerotium rolfii*. *Environ Nat Resour J* **16**: 20-28 (2018).
4. Oliva M, Hatan E, Kumar V, Galsurker O, Sisim-Levi A, Ovadia R, Galili G, Lewinsohn E, Elad Y, Alkan N, Oren-Shamir M. Increased phenylalanine levels in plant leaves reduces susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Plant Sci* 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110289>
5. Bidari A, Ganjali MR, Norouzi P, Hosseini MRM, Assadi Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chem* **126**: 1840–1844 (2011).
6. Mishra J and Arora NK. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Agric Ecosyst Environ Appl Soil Ecol* **125**: 35-45 (2018).
7. Goswami M and Deka S. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids Surf B* **178**: 285-296 (2019).
8. Diaz de Rienzo MD, Babat IM, Dolman B, Winterburn J, Martin PJ. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *N Biotechnol* **32**: 720-726 (2015).
9. Valotteau C, Banat IM, Mitchell CA, Lydon H, Marchant R, Babonneau F, Pradier CM, Baccile N, Humblot V. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram-negative pathogens. *Colloids Surf B* **157**: 325–334 (2017).

10. Yoo D, Lee BS, Kim E. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. *J Microbiol Biotechnol* **15**: 1164-1169 (2005).
11. Sen S, Borah SN, Bora A, Deka S. Production, characterization and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjavae* YS3. *Microb Cell Factories* **16**: 95-109 (2017).
12. Chen J, Liu X, Fu S, An Z, Feng Y, Wang R, Ji P. Effects of sophorolipids on fungal and oomycetes pathogens in relation to pH solubility. *J Appl Microbiol* **128**: 1754-1763 (2020).
13. Hipólito A, Silva RAA, Caretta TO, Silveira VAI, Amador IR, Panagio LA, Borsato D, Celligoi MAPC. Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101797>
14. Silveira VAI, Nishio EK, Urzedo CAQF, Amador IR, Kobayashi RKT, Caretta, TO, Celligoi MAPC. Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. *Biocatal Agric Biotechnol* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101287>
15. Robledo N, Vera P, López L, Yazdani-Pedram M, Tapia C, Abugoch L. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. *Food Chem* **246**: 211-219 (2018).
16. Miorini TJJ, Kamvar ZN, Higgins RS, Raetano CG, Steadman JR, Everhart SE. Differential aggressiveness of *Sclerotinia sclerotium* isolates from North and South America and partial host resistance in Brazilian soybean and dry bean cultivars. *Trop Plant Pathol* **44**: 73-81 (2019).
17. Gao P, Qin J, Li D, Zhou S. Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190932>
18. Lahkar J, Goswami D, Deka S, Ahmed G. Novel approaches for application of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* for biocontrol of *Colletotrichum capsici* responsible for anthracnose disease in chilli. *Eur J Plant Pathol* **150**: 57–71 (2017).

19. Gupta R and Prabhune AA. Structural determination and chemical esterification of the sophorolipids produced by *Candida bombicola* grown on glucose and  $\alpha$ -linolenic acid. *Biotechnol Lett* **34**: 701–707 (2011).
20. Daverey A and Pakshirajan K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. *Colloids Surf B* **79**: 46–253 (2010).
21. Elshafie AE, Joshi SJ, Al-Wahaibi YM, Al-Bemani AS, Al-Bahry SN, Al-Maqbali D, Banat IM. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. *Front Microbiol* 2015.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01324>.
22. Sharma R and Oberoi HS. Biosurfactant-aided bioprocessing: industrial applications and environmental impact, in Recent advances in Applied Microbiology, ed. by Shukla P. Singapore: Springer Singapore, 55–88 (2017).
23. Yuan B, Yang S, Chen J. Antimicrobial activity of sophorolipids on pathogenic fungi isolated from fruits. *Chin J Appl Environm Biol* **17**: 330–333 (2012).
24. Celligoi MAPC, Silveira VAI, Hipólito A, Caretta TO, Baldo C. Sophorolipids: a review on production and perspectives of application in agriculture. *Span J Agric Res* 2020.  
<https://doi.org/10.5424/sjar/2020183-15225>
25. El Oirdi M, El Rahman TA, Rigano L, El Hadrami A, Rodriguez MC, Daayf F, Vojnov A, Bouarab K. *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* **23**: 2405–2421 (2011).
26. Simionato AS, Navarro MOP, de Jesus MLA, Barazetti AR, da Silva CS, Simões GC, Balbi-Penã MI, Mello JCP, Panagio LA, Almeida RSC, Andrade G, Oliveira AG. The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. *Front Microbiol* 2017  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>.
27. Lahkar J, Borah SN, Deka S, Ahmed G. Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: the causal organism of early blight of tomato. *BioControl* **60**: 401–411 (2015).

28. Dengle-Pulate V, Joshi J, Bhagwat S, Prabhune A. Application of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol as a germicide and fruit-vegetable wash. *J Pharm Sci* **3**: 1630-1643 (2014).
29. Olanya OM, Ukuku DO, Solaiman DKY, Ashby RD, Niemira BA, Mukhopadhyay S. Reduction in *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro* and on tomato by sophorolipid and sanitizer as affected by temperature and storage time. *Int J Food Sci Technol* **53**: 1303-1315 (2018).

5.4 Artigo 3 – Publicado em: Brazilian Journal of Development, 2021.

ISSN: 2525-8761

### **Aplicação de soforolipídios produzidos por *Starmerella bombicola* em filmes ativos para revestimento de morangos**

Nádia Jaber Abdulah Costa<sup>1</sup>, Talita de Oliveira Caretta<sup>1</sup>, Cristiani Baldo, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi\*

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 43 33714270 E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

#### **RESUMO**

O morango é uma fruta muito suscetível a infecções por patógenos, o que reduz sua qualidade nutricional e tempo de prateleira. Uma alternativa para aumentar o prazo de validade dos morangos é a utilização de tecnologias usando filmes comestíveis incorporados à compostos antimicrobianos, como os soforolipídios. O objetivo deste trabalho foi produzir soforolipídios por *Starmerella bombicola* e incorporar em filmes de amido de mandioca, visando a redução da contaminação microbiana e aumento de tempo de validade do morango. As fermentações resultaram na produção de 7,6 g/L de soforolipídios, que foram utilizados para as formulações dos biofilmes. A formulação 1 continha apenas amido, a formulação 2 foi composta de amido acrescido de 5% de soforolipídios e formulação 3 continha amido e 10% de soforolipídios. Após 20 dias, nas frutas controle não revestidas foi observado 11,84% de perda de massa, enquanto nas frutas revestidas somente com o amido a perda foi de 9,28%. Em morangos tratados com amido acrescido de soforolipídios na concentração de 10% e 5%, observou-se 8,47 e 7,12% de perda de massa, respectivamente. Em relação à severidade de contaminação, as frutas controle apresentaram o índice de 75%, enquanto em frutas tratadas com amido acrescido de soforolipídios observou-se uma drástica redução da severidade de contaminação (25%) para as duas concentrações testadas. A porcentagem de eficácia dos revestimentos do tratamento com amido e com amido acrescido de soforolipídios (5 e 10%) foi de 25% e 66,6%, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo mostraram pela primeira vez na literatura o potencial uso de soforolipídios produzidos por *S. bombicola* como agentes de revestimentos de morangos agregando importantes propriedades às formulações poliméricas.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano; Prebióticos; Revestimento Ativo; Plasticidade; Antocianinas

5.5 Artigo 4 – Submetido em: Food and Bioprocess Biotechnology.

**Improved nutritional quality and shelf life of strawberries by starch coatings incorporated with sophorolipid and fructooligosaccharides**

Talita de Oliveira Caretta<sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Amanda Hipólito<sup>1</sup>, Nádia Jaber Abdulah Costa<sup>1</sup>, Suzana Mali<sup>1</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 43 33714270 E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

**Abstract**

This study aimed to characterize and evaluate the effect of active coatings containing sophorolipid, a natural antimicrobial and fructooligosaccharides, prebiotics, on the shelf life of strawberries. The formulations were produced containing cassava starch, sophorolipid at 2 g/100 g solids, and sophorolipid + fructooligosaccharides at 2 g and 10 g/100 g solids. The coatings were characterized by mechanical properties and their functionality on fresh strawberries was evaluated by physicochemical and microbiological parameters. The addition of sophorolipids and fructooligosaccharides reduced the tensile strength of the films, increasing their flexibility by 10x. The use of coatings resulted in a significant reduction in the weight loss of strawberries, keeping the pH and anthocyanin content stable over the storage time, and slowing down the ripening of the coated fruits. They were also effective in controlling mold and yeast growth for 15 days, keeping strawberries fresh for a longer period. The use of the multifunctional coating was able to extend shelf life, add nutritional value and maintain the microbiological quality attributes of highly perishable fruits such as strawberries.

**Keywords:** antimicrobial; prebiotic; active coating; anthocyanins

## 1. Introduction

Strawberry (*Fragaria x ananassa*) is a fruit known for its specific sensory characteristics, such as color, texture, aroma, and flavor. Rich in bioactive substances such as vitamins C, E,  $\beta$ -carotene, and phenolic compounds such as anthocyanins (Van de Velde et al., 2013, Ventura-Aguilar et al., 2018). It is a very perishable fruit because it has high metabolic rates and is susceptible to mechanical injuries and infections by microorganisms, which limits its shelf life and generates many post-harvest losses (Robledo et al., 2018).

The preservation of these fruits is usually done through refrigeration (Yoon et al., 2020), although simply reducing the temperature is not enough to preserve the chemical, physical and biological characteristics during prolonged storage (Li and Yu, 2000; Campaniello et al., 2008). Therefore, another popular method is the addition of fungicides to strawberries in the field, which in addition to being toxic to consumers, also generates residues that accumulate in the environment (Gol et al., 2013).

Studies are being carried out to increase the shelf life of strawberries, including the use of active coatings, containing in their formulation a base raw material and the addition of active ingredients, such as antimicrobials (Garcia et al., 2010; Peretto et al., 2017; Badawy et al., 2017) and prebiotics (Bersaneti et al., 2016; Alvarez et al., 2021). These coatings protect against mechanical shocks and microbial contamination, increasing the shelf life and the nutritional value of the food when a biomolecule is incorporated (Radványi and Moskowitz, 2019).

Cassava starch is normally used to develop this type of coatings, and it is considered a low-cost, non-toxic, and biodegradable ingredient (Ferreira, Molina & Pelissari, 2020). Although starch coatings are very advantageous, their mechanical properties are not satisfactory (Aydogdu et al., 2020), which can be solved by the addition of surfactants, which, being amphiphilic, possess emulsifying and wetting properties in addition to have functions as plasticizers and as antimicrobial agents (Solaiman et al., 2015; Huang et al., 2018; Motta et al., 2020; Ribeiro, Estevinho & Rocha, 2020).

Sophorolipid is a glycolipid biosurfactant consisted of a disaccharide sophorose and a long-chain fatty acid, often with 16 or 18 carbons, produced in high concentrations by the yeast *Starmerella bombicola* (Solaiman et al., 2017). It is a stable molecule with low toxicity (Pinto et al., 2018) described in many food applications (Zhang et al., 2016; Olanya et al., 2017; Silva et al., 2020). A highlight point is its antimicrobial activity against several food pathogens, being

recently incorporated in formulations with polylactic acid and starch by Silveira et al. (2020) and Hipólito et al. (2021), respectively, forming bioactive coatings with antimicrobial activity against the food industry pathogens *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, and *Botrytis cinerea*.

The coatings may have prebiotics incorporated in their formulation, capable of increasing the nutritional quality of the food (Ali et al., 2019). Fructooligosaccharides (FOS) are prebiotics capable of stimulating the growth of beneficial bacteria in the intestine, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species, promoting the balance of the intestinal microbiota and reducing the absorption of both fats and sugars (Bersaneti et al., 2019). FOS are oligosaccharides of fructose produced by *Bacillus subtilis natto*, consisting of a glucose molecule connected to fructosyl units at  $\beta$ -(2  $\rightarrow$  1) position, and possess interesting features to be explored in the food industry as a functional ingredient (Bersaneti et al., 2016).

Therefore, this work aimed to produce, characterize, and test the effect of cassava starch coatings incorporated with active biomolecules, such as sophorolipid and fructooligosaccharides, to improve the quality and shelf life of strawberries, being an innovative alternative capable of providing a barrier against microbial contamination and an improvement in nutritional quality. For the best of our knowledge, this is the first report describing the multifunctional effects of the association of sophorolipids and FOS in a coating matrix.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Materials and microorganisms

Cassava starch and glycerol were provided by Yoki Alimentos S.A (Paraná, Brazil) and Synth (Labsynth, São Paulo, Brazil). *Starmarella bombicola* (ATCC<sup>®</sup> 22214<sup>™</sup>) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) and *Bacillus subtilis natto* CCT 7712 was isolated from fermented soybeans (natto) at the Department of Biochemistry and Biotechnology of the State University of Londrina (Brazil) and identified by Fundação André Tosello (Campinas, Brazil).

## 2.2 Sophorolipids production

Sophorolipids production was conducted for 12 days in a bench bioreactor (FerMac 320 Electrolab Biotech Ltd., United Kingdom) using the yeast *S. bombicola* as the producer microorganism, according to the methodology described by Caretta *et al.* (2021). The produced sophorolipids was obtained by solvent extraction, followed by lyophilization and characterization analyses of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR), being characterized as predominantly lactonic C18:1 diacetylated form.

## 2.3 Fructooligosaccharides production

FOS production was carried out by fermentation using *B. subtilis* natto for 44 h according to Bersaneti *et al.* (2016). Briefly, the medium composition in g/L was 400 of sucrose, 2.0 of yeast extract, 1.0 of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.0 of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.6 of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.2 of  $\text{MnSO}_4$ . The total FOS production was estimated by high performance liquid chromatography (HPLC), corresponding to 80 % of nystose (666.58 Da) and 20 % of 1-kestose (504.44 Da).

## 2.4 Production of active starch coatings

The coatings were prepared by casting with cassava starch, sophorolipids, fructooligosaccharides and glycerol (Bersaneti *et al.*, 2016). Three formulations were prepared containing 385.6 g of water and 2.4g of glycerol, and the other components, in g: 12.0 of starch for the AM formulation, 11.76 of starch and 0.24 of sophorolipids for the SLP formulation (2% w/w of sophorolipids); 10.56 of starch, 0.24 of sophorolipids and 1.2 of fructooligosaccharides for the SLP-FOS formulation (2% w/w of sophorolipids and 10% w/w of fructooligosaccharides).

The starch, glycerol and water were heated to 90 °C with constant agitation during about 7-8 min, until the obtention of a homogeneous formulation, following by cooling to 60 °C and the addition of sophorolipids and fructooligosaccharides. After, the filmogenic solution was homogenized by sonication (Unique USC-1800) for 10 min for elimination of bubbles and poured onto acrylic Petri plates (30g each) for drying in a ventilated oven TE-394-3 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) at 30 °C for 24 h.

## 2.5 Coatings characterization

### 2.5.1 Scanning electron microscopy (SEM)

Analyzes were performed by a FEI Quanta 200 microscopy (Hillsboro, EUA) at an accelerating voltage of 30 kV. The samples were cut in 5x5 mm, coated with gold by a sputter coater (BAL-TEC-SCD 050) and analyzed for the observation of the surface morphology of the films.

### 2.5.2 Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy

The equipment used was the Shimadzu FTIR-8300 (Kyoto, Japan) with a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ , using a spectral range from  $4000$  to  $500\text{ cm}^{-1}$ . The samples were incorporated into potassium bromide (KBr), and the results were analyzed by the Shimadzu Hyper IR program.

### 2.5.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

The analyses were carried out in a Shimadzu DSC-60 calorimeter (Japan) at a heating rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  in an atmosphere with a flow of nitrogen gas of  $10\text{ mL}/\text{min}$ . Approximately  $10\text{ mg}$  of each sample was placed in platinum containers and DSC calibration was performed with indium. Sophorolipids sample was heated from  $30$  to  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the coatings samples were heated from  $20$  to  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.4 Thickness

The thickness of the coatings was determined by a Mitutoyo micrometer (São Paulo, Brazil), at 10 different points on the surface of each sample. The mean standard deviation within the film was approximately 5% of the average thickness.

### 2.5.5 Solubility

Tests were performed using the Gontard et al. (1992) method, measuring the amount of dry matter dissolved in water for 24 hours. The samples were weighed and immersed in 80 mL of distilled water under constant agitation (50 rpm). The non-solubilized films were removed and dried to determine the weight of the dry matter. The analyses were performed in triplicate, and the solubility percentage was calculated according to the equation:

$$\text{Solubility}(\%) = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100$$

Where  $m_f$  is the final mass and  $m_i$  is the initial mass of the sample.

### 2.5.6 Water vapor permeability (WVP)

WVP was determined gravimetrically following the standard protocol of the American Society for Testing and Materials (ASTM E96-95, 1996). The samples were placed in permeation capsules previously filled with anhydrous calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) to obtain a 0 % relative humidity (RH). These were sealed to ensure that the transfer of water vapor occurred exclusively through the coating. Weighing was performed at time 0 and storage was carried out in a desiccator containing a saturated sodium chloride solution ( $\text{NaCl}$ ), to provide 75% RH. The capsules were weighted every 2 h for 24 hours, and the tests were performed in triplicate. The water vapor transport was measured by the difference in mass ( $m$ ) of the permeation capsule as a function of time ( $t$ ). The slope of each line was determined by linear regression and the water vapor transmission rate (WVTR) was calculated:

$$\text{WVTR} = \frac{m}{t \cdot A}$$

Where  $m/t$  is the angular coefficient of the curve and  $A$  is the sample permeation area ( $\text{m}^2$ ).

The WVP was calculated as:

$$WVP = \frac{WVTR \cdot m}{\Delta P}$$

Where *m* is the average thickness of the coating (m<sup>2</sup>) and ΔP is the difference in water vapor pressure of the environment containing CaCl<sub>2</sub> (0% RH) and NaCl (75% RH).

### 2.5.7 Mechanical properties

The mechanical properties tensile strength (MPa) and elongation (%) were determined using an Instron 1141 (Instron Ltd., Canton – USA) following the ASTM D882-9 standards. Samples of each formulation (25 × 100 mm) were placed between the pneumatic grips and the force (N), and deformation (mm) were recorded during extension at 50 mm min<sup>-1</sup> with an initial distance between the grips of 50 mm.

## 2.6. Coating application in strawberries

Organic strawberries were purchased at the local market in the city of Londrina – PR. The fruits were washed in running water, immersed in 70% alcohol for 1 min, and dried under forced ventilation for 30 min at room temperature. The strawberries were randomly categorized into 4 groups with 15 fruits per treatment, 1- uncoated (control), 2- starch coating (AM), 3- starch coating with sophorolipids (SLP) and 4 - starch coating with sophorolipids and fructooligosaccharides (SLP-FOS). The coatings were made by immersing strawberries in each formulation, followed by drying in forced ventilation at room temperature for 12 hours, and stored under refrigeration at 4 °C for further analysis.

## 2.7 Post-harvest measurements

### 2.7.1 Weight loss

All coated and uncoated strawberry samples (5 per treatment) were weighed at the beginning of the experiment and after 3, 7, 10 and 15 days. Weight loss was determined by

taking their initial and final weights differences and expressed as percentage of mass loss, as described by Mantilla et al. (2013):

$$WL = (WI - WF/WI) \times 100$$

Where, *WL* is the weight loss in grams (g), *WI* is the initial sample weight (g) and *WF* is the final sample weight (g).

### 2.7.2 Titratable acidity (TA) and pH

pH measurements were carried out using a pH meter previously calibrated, according to the AOAC method (1994). Total titratable acidity was evaluated according to Mazumdar and Majumder (2003) by titrating 5 mL of strawberry juice sample with 0.1 M sodium hydroxide (NaOH), using a phenolphthalein indicator. The tests were performed in triplicate and the results were expressed as percentage of citric acid.

### 2.7.3 Anthocyanin content

Anthocyanin content was determined by mixing 20 g of strawberries with 10 mL of the extraction solution (95% ethanol and 1.5 N HCl, 85:15), and after maceration, the extract was centrifuged at 0 °C, 7000 rpm for 15 min. The samples were filtered, and 5 mL of the resulting solution were transferred to 25 mL flasks, complete with 20 mL of pH 1.0 and pH 4.5 solutions and allowed to stand for 4h. After this incubation time, the quantification was performed by absorbance at 535 nm, according to Lees and Francis (1972).

### 2.7.4 Microbiological analysis

Microbiological analyzes were performed based on the count of molds and yeasts (Mali and Grossmann, 2003). Strawberry samples of 25 g homogenized with 50 mL of peptone water and subjected to serial dilutions in triplicate. Then, 1 mL of each dilution was plated on PDA agar medium and incubated at 25 °C for 2 days. Viable counts were expressed as log colony-forming units (CFU) per gram of fruit.

## 2.8 Statistical analysis

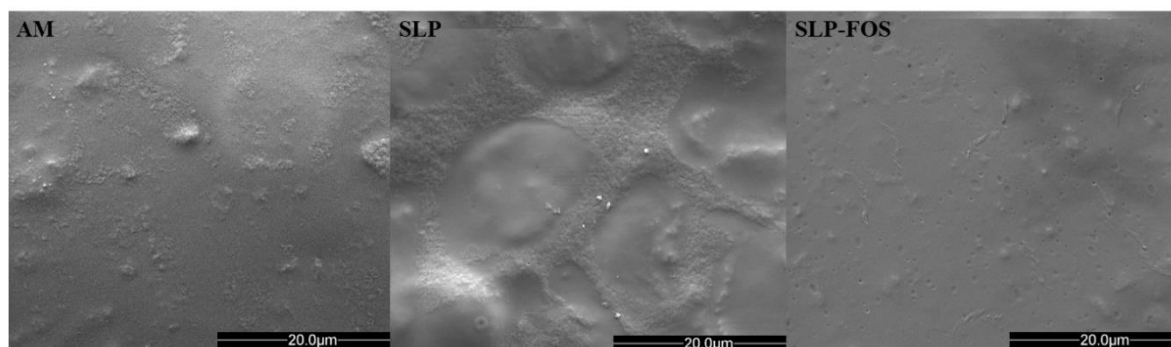
Analysis of variance (ANOVA), Tukey mean comparison test ( $p \leq 0,05$ ), and regression analysis were performed employing Statistica® 12 software (Statsoft, Oklahoma).

## 3. Results and discussion

All produced coatings were homogeneous, without bubbles or cracks and were easily removed from the plates, indicating a good dissolution of solids and an adequate concentration of ingredients in the filmogenic solution. Additionally, the incorporation of sophorolipids and fructooligosaccharides did not change the appearance of the film, suggesting a good incorporation of these biomolecules into cassava starch coatings.

### 3.1 Thickness and Scanning electron microscopy (SEM)

Thickness directly interferes with the coating's properties, being surface uniformity an important feature (Pellá et al., 2020). The coatings presented thickness values ranging from 153 to 160  $\mu\text{m}$ , showing no statistical difference among the formulations ( $p > 0.05$ ) (Table 1). Additionally, the incorporation of sophorolipids and fructooligosaccharides did not influence the appearance and transparency of the coatings. In the SEM images (Fig. 1), it was possible to observe a similar homogeneous surface in all formulations, although in SLP-FOS, a more uniform surface was noticed. This appearance may be due to the addition of fructooligosaccharides, which was also observed by Bersaneti *et al.* (2016), where starch coatings with the incorporation of 10% fructooligosaccharides also presented a smoother matrix. Silveira *et al.* (2020) reported that PLA films became rougher and with a more porous surface as the concentration of sophorolipids increased in the formulation. In the microscopy of SLP coating, it was possible to notice the appearance of a slightly dimpled and porous surface morphology, which may be attributed to the low concentration of sophorolipids in the formulation.

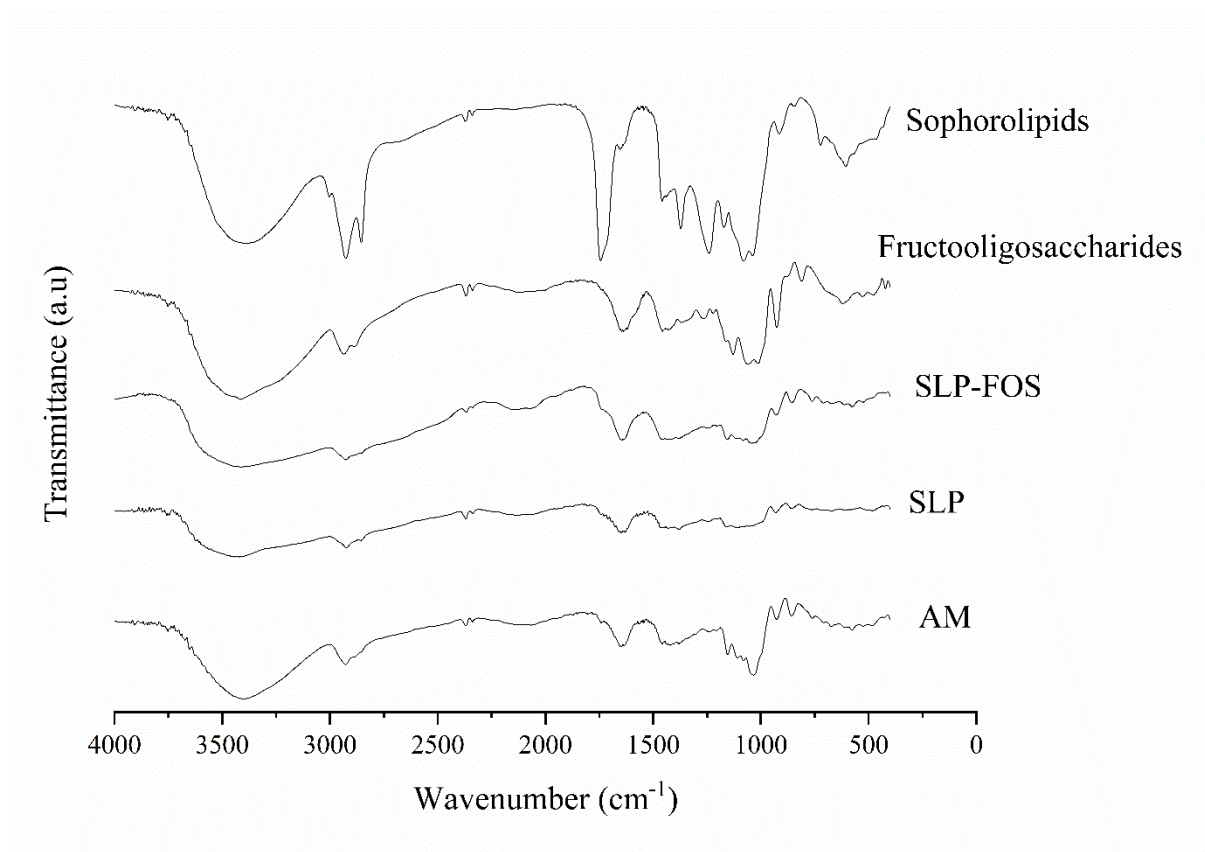


**Fig. 1:** SEM micrographs of cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS)

### 3.2 Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy

FT-IR analysis was used to identify and compare the chemical bonds of fructooligosaccharides and sophorolipids individually and incorporated into the filmogenic matrix (Fig. 2). It was possible to observe very similar regions in all spectra since all compounds possess hydroxyl hydrocarbons in their structure. The bands at  $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$  are ascribed to the stretching vibration of hydroxyl groups (O-H), highlighting a strong band proximate to  $3470\text{ cm}^{-1}$  presented in all samples (Romano *et al.*, 2016). However, it is noticed that in the sophorolipids and fructooligosaccharides samples, this band is more intense than in the coating samples, suggesting that the hydroxyls are involved in hydrogen bonds in the coatings, maintaining the polymer matrix (Maniglia *et al.*, 2019).

The bands near  $2920\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  were observed in all samples and were attributed to aliphatic compounds ( $\nu\text{sCH}_2$ ) (Minucelli *et al.*, 2016). The band at  $1650\text{ cm}^{-1}$  was attributed to water molecules incorporated in the polymeric matrix of starch (Santos *et al.*, 2014). In the sophorolipids sample, bands proximate to  $1643\text{ cm}^{-1}$  are observed due to the stretching of unsaturated carbon bonds (C=C) (Daverey and Pakshirajan, 2009), and at  $1750\text{ cm}^{-1}$ , there is a band attributed to the carbonyl groups (COO-) presented in the lactone form of sophorolipid (Minucelli *et al.*, 2016). Bending vibration groups (OCH, COH, CCH) in the region of  $1300\text{ cm}^{-1}$  to  $1500\text{ cm}^{-1}$  were observed both in the sophorolipids and fructooligosaccharides samples individually and in the coatings (Kang *et al.*, 2020). These bands appear more intensely in the compounds, indicating that chemical interactions may have occurred in the coatings (Bersaneti *et al.*, 2016).



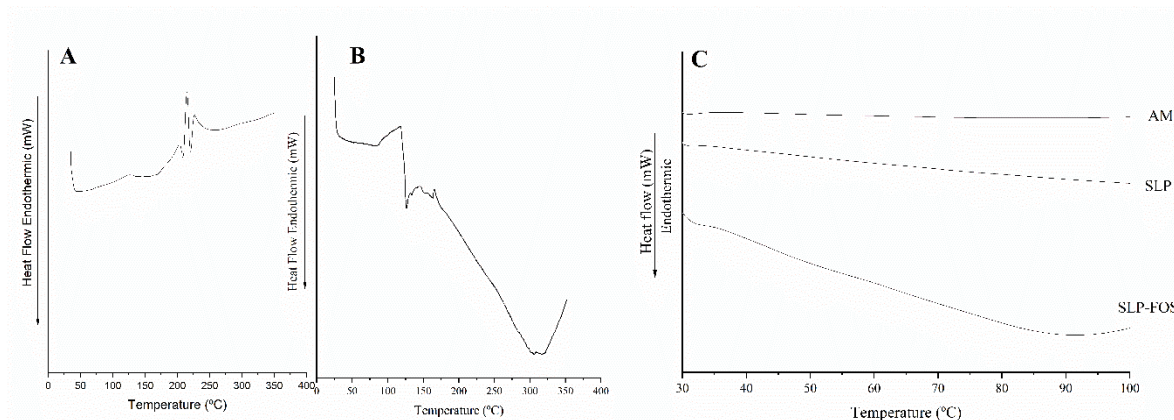
**Fig. 2:** FT-IR spectra of sophorolipids, fructooligosaccharides and cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS)

The spectral region of  $1100\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  was related to the glycosidic linkage (C-O-C) that occurs in sophorolipids, starch and fructooligosaccharides molecules. Although, this same region in the coating samples became much less intense, which might indicate a change in the interaction of the compounds and the matrix. Besides the changes in intensity among the coating samples, it was possible to notice that all spectra showed similar location and shape of the main bands, indicating that the interactions between starch molecules prevailed over starch-sophorolipids and/or starch-fructooligosaccharides interactions.

### 3.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

The thermograms of fructooligosaccharides (A), sophorolipids (B), and the coatings (C) are shown in Fig. 3. For sophorolipids, the temperature ranged from 30 to 325 °C, with a small endothermic peak observed at 121 °C, followed by a decay until 308 °C, which was probably related to the thermal degradation of sophorolipids. Zini *et al.* (2008) and Silveira *et*

*al.* (2020) also reported endothermic peaks of sophorolipids at 123 °C and 125-150 °C, respectively, which were attributed to the melting point of the biomolecule. Regarding the fructooligosaccharides thermogram, the temperature range was the same for the sophorolipids sample, presenting two small endothermic peaks at 212°C and 223°C. In Bersaneti *et al.* (2016) work, the thermogram of fructooligosaccharides had a temperature variation similar to the presented in this study, with endothermic peaks observed between 220-226 °C, which may indicate the beginning of degradation at this temperature. Yu *et al.* (2020) used commercial FOS in PLA electrospun nanofibers and reported a glass transition temperature of FOS at 69 °C and a melting point between 200-225°C.



**Fig. 3:** DSC thermogram of fructooligosaccharides (A), sophorolipids (B) and cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS)

In relation to the coating samples, it is important to highlight the thermal stability of all formulations under the temperature range of 20-100 °C, which no degradation was observed during the DSC analysis. Additionally, the thermal degradation peaks observed for sophorolipids, and FOS occurred at much higher temperatures than the ones used for the production of the coatings in this study (the incorporation of the compounds was carried out at 60 °C), which demonstrates that the compounds were stable during the production process.

### 3.4 Solubility and water vapor permeability (WVP)

The solubility and water vapor permeability of the coatings are shown in Table 1. The solubility of the coatings did not change significantly with the addition of sophorolipids. This might be explained by the low concentration of the biosurfactant in the filmogenic solutions, as

it is expected that the solubility of the films increases proportionally to the augment of the concentration of sophorolipids (Silveira et al., 2020).

**Table 1.** Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP) and mechanical properties of cassava starch coatings (AM) with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS)

Formulations	Thickness (μm)	Solubility (%)	WVP x 10 <sup>11</sup> (g Pa <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup> )	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)
AM	153 ± 2,89 <sup>a</sup>	17,08 ± 0,54 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,03 <sup>b</sup>	9,28 ± 2,09 <sup>a</sup>	29,79 ± 2,33 <sup>b</sup>
SLP	160 ± 0,58 <sup>a</sup>	18,61 ± 1,51 <sup>b</sup>	2,22 ± 0,63 <sup>b</sup>	10,58 ± 1,78 <sup>a</sup>	19,37 ± 2,33 <sup>b</sup>
SLP-FOS	153 ± 5,77 <sup>a</sup>	51,80 ± 0,39 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,91 ± 1,63 <sup>b</sup>	221,26 ± 2,61 <sup>a</sup>

The results are expressed as the mean ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's test.

Although, coatings with the addition of sophorolipid + fructooligosaccharides (SLP-FOS) showed a significant increase in solubility. It is possible that in this formulation, the presence of fructooligosaccharides weakened the chemical interactions in the polymer matrix. Since the prebiotic can dissolve quickly, it might leave spaces that allowed the entry of water and the consequent acceleration in the dissolution of the coatings. This is a positive behavior as it may indicate a better release of the prebiotic from the starch matrix into the food being coated (Tang et al., 2015). The same behavior was reported by Bersaneti et al. (2016), in which the starch coatings showed an increase in solubility directly proportional to the increasing concentration of fructooligosaccharides in the filmogenic solution.

The incorporation of sophorolipids in the coatings formulation did not present a statistically significant difference for the water vapor permeability (WVP), however, when sophorolipids were incorporated in combination with fructooligosaccharides, a significant change in the WVP was observed. Bertuzzi et al. (2007) state that WVP is directly proportional to solubility. As we observed a considerable increase in the solubility for the SLP-FOS formulation, an increase in the WVP was also expected. This is mainly due to the hydrophilic nature of the prebiotic, which, together with the biosurfactant, increased the hygroscopicity of the coatings, facilitating the penetration of water molecules through them. The affinity between the coating polymer matrix and water is what defines the permeability process (Martelli et al., 2017).

### 3.5 Mechanical properties

The results are shown in Table 1. The mechanical properties of the AM and SLP formulations presented no significant differences. Although, the incorporation of the fructooligosaccharides in the SLP-FOS formulation showed significantly reduced mechanical strength and increased elongation. In the works of Ashby and Solaiman (2014), Ortega-Toro et al. (2014), Maniglia et al. (2019), Silveira et al. (2020) and Hipólito et al. (2021), the authors describe the development of films with the incorporation of biosurfactants, revealing that this biomolecule can act as a plasticizer, increasing the flexibility and mobility of the polymer chain, which results in a decreased in the tensile strength. In this study, it was not possible to observe this difference, probably because of the low concentration of the sophorolipid added (2% w/w). Silveira et al. (2020) also did not report differences in the tensile strength with the addition of 2.5% of sophorolipid in PLA films.

On the other hand, when FOS was added in combination with sophorolipids (SLP-FOS) to the coatings, it produced a synergistic effect, significantly increasing their plasticizing action. According to Tang et al. (2015), the addition of a prebiotic compound in the filmogenic solutions also has a plasticization effect, decreasing resistance while increasing elongation. Plasticizers interfere in the polymer matrix by reducing the interactions between the adjacent chains and decreasing the intermolecular forces in the biopolymer, leading to an increase in mobility and flexibility of the material (Bergo and Sobral, 2007), which has been previously reported in starch (Bersaneti et al., 2016) and methylcellulose films (Romano et al., 2014).

### 3.6 Coating application in strawberries

After application and drying of the coatings, the coated and uncoated strawberries presented a similar appearance, indicating a perfect adhesion of the coating to the surface.

### 3.7 Weight loss

Weight loss results in negative impacts on the shelf life of fruits and vegetables and generally occurs during the post-harvest and storage period due to the transpiration process

(Nawab et al., 2017). Strawberries are susceptible to weight loss due to their thin skin, resulting in high easy loss of water and carbon reserves and tissue deterioration (Sogvar et al., 2016). As can be seen in Table 2, weight loss was influenced by the type of treatment applied and the storage period. Although the weight loss increased with time in all treatments, it was significantly higher in the uncoated sample (control) ( $p \leq 0.05$ ). The lower values for the weight loss of coated samples can be explained due to the barrier property provided by the coatings, which were able to maintain the moisture and vapor pressure, while difficult the water permeation from the fruit to the environment (Shahbazi et al., 2021). The coatings can act as a barrier against gases exchange, thus slowing down the respiration process and oxidation reactions (Nawab et al., 2017).

**Table 2.** Weight loss (%) of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS)

Treatments	Weight loss (%)			
	Day 3	Day 7	Day 10	Day 15
Control	2,50 ± 0,1 <sup>aA</sup>	6,23 ± 0,1 <sup>aB</sup>	8,54 ± 0,2 <sup>aC</sup>	14,20 ± 0,2 <sup>aD</sup>
AM	2,45 ± 0,1 <sup>aB</sup>	4,54 ± 0,1 <sup>dA</sup>	6,52 ± 0,2 <sup>dC</sup>	11,73 ± 0,2 <sup>bD</sup>
SLP	1,12 ± 0,1 <sup>cA</sup>	3,40 ± 0,2 <sup>cB</sup>	4,48 ± 0,2 <sup>cC</sup>	6,71 ± 0,1 <sup>dD</sup>
SLP -FOS	1,85 ± 0,1 <sup>bA</sup>	3,76 ± 0,2 <sup>bB</sup>	5,32 ± 0,1 <sup>bC</sup>	8,32 ± 0,1 <sup>cD</sup>

The results are expressed as the mean ± standard deviation. Uppercase letters represent statistical comparison between column values and lowercase letters represent statistical comparison between row values. Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's test.

The loss on the 15<sup>th</sup> day for the control was 14.20%, and for the treatments, it was 11.73% (AM), 6.71% SLP, and 8.32% SLP-FOS. As the acceptable weight loss for ingestion is up to 10% (Kader, 1991), SLP and SLP-FOS coatings were able to promote the maintenance of freshness of the fruit during the 15 days of the experiment. When comparing the SLP and SLP-FOS formulations, the weight loss was greater for SLP-FOS, which could be associated with the increase in solubility and WVP discussed before when the biosurfactant and the prebiotic were combined in the formulation (Table 1). These results confirm the effectiveness of the coatings in increasing the shelf-life of strawberries by reducing water losses. Rodrigues, Cedran & Garcia (2018) observed a reduction in the weight loss of fresh-cut yacons with the utilization of alginate based edible coatings, which contributed to higher quality and shelf life

of the vegetable. The authors also stated that edible coatings may promote the “sacrificial effect”, which the coating loses water before the food product, consequently, the lost water content is derived from the coating itself, keeping the freshness and appearance of the food.

### 3.8 Titratable acidity (TA) and pH

The initial pH values (day 0) ranged between 3.66 and 3.82 for the 4 groups tested (Table 3). From day 10, uncoated strawberries showed a significant increase in pH, differing from all treatments.

**Table 3.** Titratable acidity and pH of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS)

Treatments	pH				
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 15
Control	3,66 ± 0,01 <sup>dA</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>abB</sup>	3,85 ± 0,01 <sup>aC</sup>	3,92 ± 0,02 <sup>aD</sup>	3,97 ± 0,01 <sup>aE</sup>
AM	3,77 ± 0,01 <sup>bA</sup>	3,82 ± 0,00 <sup>aB</sup>	3,84 ± 0,01 <sup>aC</sup>	3,87 ± 0,01 <sup>bD</sup>	3,88 ± 0,01 <sup>bD</sup>
SLP	3,82 ± 0,01 <sup>aA</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>abA</sup>	3,82 ± 0,01 <sup>bA</sup>	3,85 ± 0,01 <sup>bB</sup>	3,89 ± 0,02 <sup>bC</sup>
SLP-FOS	3,70 ± 0,01 <sup>cA</sup>	3,79 ± 0,01 <sup>bB</sup>	3,80 ± 0,01 <sup>bB</sup>	3,86 ± 0,02 <sup>bC</sup>	3,89 ± 0,01 <sup>bD</sup>
	Titratable acidity (TA %) (acidez em solução molar por cento v/m)				
Control	1,13 ± 0,02 <sup>aA</sup>	1,11 ± 0,02 <sup>aA</sup>	1,09 ± 0,02 <sup>aB</sup>	0,93 ± 0,02 <sup>bC</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>bD</sup>
AM	1,12 ± 0,05 <sup>aA</sup>	1,11 ± 0,02 <sup>aA</sup>	1,08 ± 0,02 <sup>aB</sup>	0,97 ± 0,03 <sup>aC</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>aC</sup>
SLP	1,11 ± 0,02 <sup>aA</sup>	1,11 ± 0,03 <sup>aA</sup>	1,06 ± 0,02 <sup>bB</sup>	0,97 ± 0,02 <sup>aC</sup>	0,95 ± 0,04 <sup>aC</sup>
SLP-FOS	1,12 ± 0,03 <sup>aA</sup>	1,11 ± 0,02 <sup>aA</sup>	1,06 ± 0,02 <sup>bB</sup>	0,97 ± 0,02 <sup>aC</sup>	0,95 ± 0,02 <sup>aC</sup>

The results are expressed as the mean ± standard deviation. Uppercase letters represent statistical comparison between column values and lowercase letters represent statistical comparison between row values. Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's test.

These results are consistent with those of Mali and Grossmann (2003), who coated strawberries with yam starch and obtained higher pH values in the uncoated controls. The increase in pH and the reduction in titratable acidity are parameters that indicate fruit maturation, and thus, the results obtained on days 10 and 15 demonstrated that the AM, SLP, and SLP-FOS coatings can delay the ripening of the fruits when compared to the control.

### 3.9 Anthocyanin Content

Anthocyanins are flavonoid pigments responsible for the red color of strawberries (Tumbariski et al., 2019), highlighting the pelargonidin-3-glycoside (P 3-gl) and cyanidin-3-glycoside (Cy 3-gl) (Mali and Grossmann, 2003), which usually have their levels increased during the ripening process. Table 4 shows the content of anthocyanins in fresh mass, and it can be seen that all treatments presented increased values over time. Although in the uncoated fruits (control), the increase was significantly higher. This can be explained by a delay in ripening caused by the coatings, maintaining the quality of the fruit for a longer period than the uncoated fruit (Ayala-Zavala et al., 2004; Dhital et al., 2018). These results are in accordance with previous reports about the increased synthesis of anthocyanins during storage, resulting in redder and darker fruits (Garcia et al., 2012). Additionally, the coating can act as a barrier, modifying the atmosphere surrounding the fruit, which changes the levels of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>, causing a delay in biochemical reactions, such as the production of anthocyanins (Badawy et al., 2017). Garcia et al. (2010) also demonstrated that 3% starch coatings had a beneficial effect on shelf life of strawberries, decreasing the respiration rate and showing a good integrity of the fruits after storage.

**Table 4.** Anthocyanin Content of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FO)

Treatments	Anthocyanin Content (mg/100g)				
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 15
Control	8,40 ± 0,04 <sup>aA</sup>	8,53 ± 0,03 <sup>aA</sup>	9,82 ± 0,03 <sup>aB</sup>	12,55 ± 0,12 <sup>aC</sup>	14,48 ± 0,03 <sup>aD</sup>
AM	7,57 ± 0,05 <sup>cA</sup>	8,43 ± 0,03 <sup>bB</sup>	9,69 ± 0,06 <sup>bC</sup>	12,45 ± 0,06 <sup>aD</sup>	13,62 ± 0,11 <sup>bE</sup>
SLP	8,08 ± 0,07 <sup>bA</sup>	8,25 ± 0,01 <sup>cB</sup>	9,77 ± 0,05 <sup>abC</sup>	11,78 ± 0,08 <sup>bD</sup>	13,41 ± 0,02 <sup>cE</sup>
SLP-FOS	8,06 ± 0,05 <sup>bB</sup>	7,62 ± 0,04 <sup>dA</sup>	9,67 ± 0,02 <sup>bC</sup>	12,47 ± 0,17 <sup>aD</sup>	13,71 ± 0,07 <sup>bE</sup>

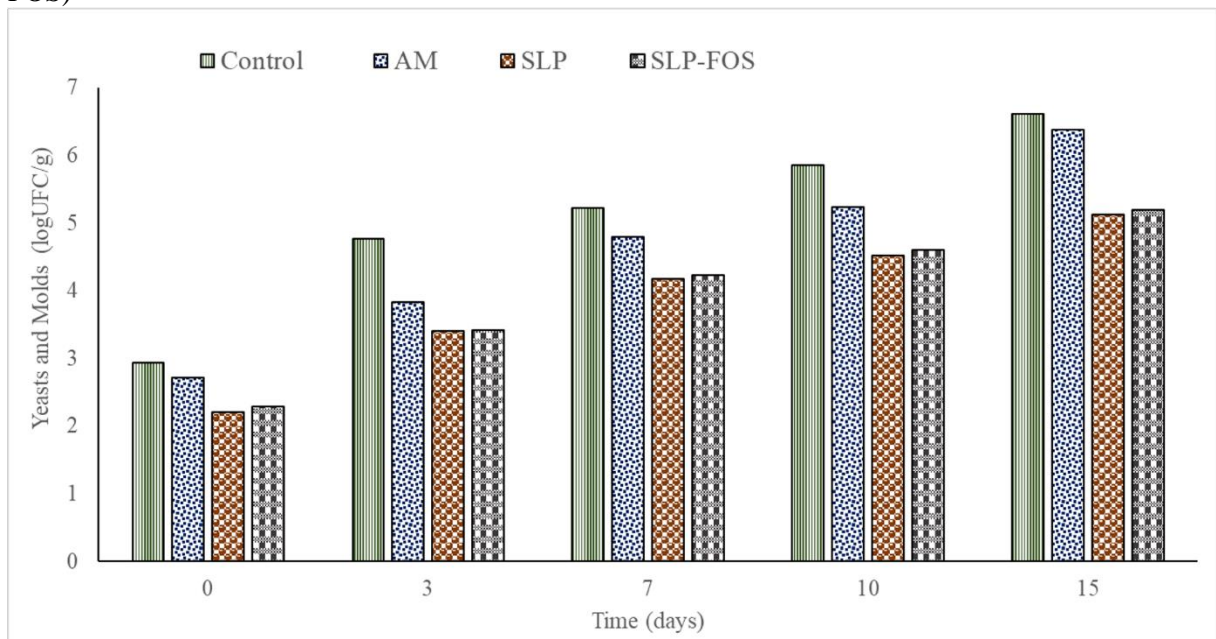
The results are expressed as the mean ± standard deviation. Uppercase letters represent statistical comparison between column values and lowercase letters represent statistical comparison between row values. Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's test.

### 3.10 Microbiological analysis

The results of the microbiological analysis are shown in Fig. 4. It is possible to observe an increase in mold and yeast counts on all test days. The best inhibition results were obtained in strawberries coated with SLP and SLP-FOS, which differed significantly from the control and AM treatments. This can be explained by the antimicrobial properties of sophorolipids, which cause the destabilization of the plasma membrane and the extravasation of cell

cytoplasmic content of the pathogen (Hipólito et al., 2020; Silveira et al., 2019). Immediately after application of the coatings, it was possible to observe a significant reduction in the growth of microorganisms, compared to the control, as previously reported by Trevino-Garza et al. (2015). This is due to the coating formation on the fruit, reducing the direct contact with the external environment, gas exchange, water loss, and the development of microorganisms. The results of this analysis showed that coatings containing sophorolipid and fructooligosaccharides do not significantly differ in fungal growth from coatings containing only sophorolipid, which proves that the presence of the prebiotic adds another property without interfering with the performance of the biosurfactant as an antimicrobial.

**Fig. 4:** Yeast and mold counts of strawberries uncoated (control) and coated with cassava starch coatings (AM), with sophorolipids (SLP) and the combination of sophorolipids + fructooligosaccharides (SLP-FOS)



#### 4. Conclusions

Starch coatings with the addition of sophorolipids and fructooligosaccharides showed uniform aspects and led to a decrease in tensile strength, indicating an increase in the flexibility of the material, an important industrial characteristic. The SLP and SLP-FOS coatings led to a delay in the ripening of strawberry fruits, evaluated by the parameters of weight loss, pH, titratable acidity, and anthocyanin content. It was also possible to observe an immediate inhibition of mold and yeast growth in strawberries coated with SLP and SLP-FOS, which

lasted for 15 days of evaluation. The active coatings containing the biomolecules, sophorolipids and fructooligosaccharides, formed a protective film on strawberries, capable of increasing shelf life, in addition to maintaining nutritional quality.

## References

- Ali, A., Chen, Y., Liu, H., Yu, L., Baloch, Z., Khalid, S., Zhu, J., & Chen, L. (2019). Starch-based antimicrobial films functionalized by pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 1120-1126.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.068>
- Alvarez, M. V., Bambace, M. F., Quintana, G., Gomez-Zavaglia, A., & Moreira, M. del R. (2021). Prebiotic-alginate edible coating on fresh-cut apple as a new carrier for probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 137, 110483.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110483>
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC international, 16<sup>th</sup> ed.; Association of Official Analytical Chemistry: Arlington, TX, 1995; Vol. 2.
- Ashby, R. D., & Solaiman, D. K. Y. (2014). Sophorolipid-induced dimpling and increased porosity in solvent-cast short-chain polyhydroxyalkanoate films: Impact on thermomechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 40609.  
<https://doi.org/10.1002/app.40609>
- ASTM (1996). Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95. *In Annual book of ASTM*; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA.
- ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882-9. *In Annual book of American standard testing methods* (pp. 162e170). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Ayala-Zavala, J. F., Wang, S. Y., Wang, C. Y., & González-Aguilar, G. A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 687–695.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.002>

- Aydogdu, A., Radke, C. J., Bezci, S., & Kirtil, E. (2020). Characterization of curcumin incorporated guar gum/orange oil antimicrobial emulsion films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.255>
- Badawy, M.E.I., Rabea, E.I., El-Nouby, M.A.M., Ismail, R.I.A., & Taktak, N.E.M. (2017) Strawberry shelf life, composition, and enzymes activity in response to edible chitosan coatings. *International Journal of Fruit Science*, 17(2), 117-136. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1219290>
- Bergo, P., & Sobral, P.J.A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1285–1289. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.014>
- Bersaneti, G. T., Garcia, S., Mali, S., & Celligoi, M. A.P.C. (2019). Evaluation of the prebiotic activities of edible starch films with the addition of nystose from *Bacillus subtilis* natto. *LWT - Food Science and Technology*, 116, 108502. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108502>
- Bersaneti, G. T., Mantovan, J., Magri, A., Mali, S., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Carbohydrate Polymers*, 151, 1132–1138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.081>
- Bertuzzi, M. A., Castro Vidaurre, E. F., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch-based films. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 972–978. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.016>
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M.; & Corbo, M. R. (2008). Chitosan: antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. *Food Microbiology*, 25 (8), 992– 1000. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.009>

- Caretta, T.O., Silveira, V.A.I., Galdino, A., Macedo, F., & Celligoi, M.A.P.C. Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021.
- Daverey, A., & Pakshirajan, K. (2009). Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 663–674. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8449-z>
- Dhital, R., Mora, N. B., Watson, D. G., Kohli, P., & Choudhary, R. (2018). Efficacy of limonene nano coatings on post-harvest shelf life of strawberries. *LWT - Food Science and Technology*, 97, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.038>
- Ferreira, D.C.M., Molina, G., & Pelissari, F.M. (2020). Effect of edible coating from cassava starch and babassu flour (*Orbignya phalerata*) on Brazilian Cerrado fruits quality. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 172–179. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02366-z>
- Garcia, L. C., Pereira, L.M., Sarantópoulos, C. I. G. L., & Hubinger, M. D. (2010). Selection of an edible starch coating for minimally processed strawberry. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 834-842. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0313-9>
- Garcia, L. C., Pereira, L.M., Sarantópoulos, C. I. G. L., & Hubinger, M. D. (2012). Effect of antimicrobial starch edible coating on shelf-life of fresh strawberries. *Packaging Technology and Science*, 25 (7), 413-425. <https://doi.org/10.1002/pts.987>
- Gere, A., Radványi, D., & Moskowitz, H. (2019). Consumer perspectives about innovations in traditional foods. In Galanakis, C.M. (Eds.), *Innovations in Traditional Foods*, Woodhead Publishing.
- Gol, N.B., Patel, P.R., & Rao, T.V.R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.008>

- Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.-L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- Hipólito, A., Silva, R. A. A., Caretta, T. O., Silveira, V. A. I., Amador, I. R., Panagio, L. A., Borsato, D., & Celligoi, M. A. P. C. (2020). Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101797. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101797>
- Hipólito, A., Caretta, T. O., Silveira, V.A.I., Bersaneti, G. T., Mali, S., & Celligoi, M. A. P. C. (2021). Active biodegradable cassava starch films containing sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* ATCC® 22214™. *Journal of Polymers and the Environment*. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02103-8>
- Huang, K., Tian, Y., Salvi, D., Karwe, M., & Nitin, N. (2018). Influence of exposure time, shear stress, and surfactants on detachment of *Escherichia coli* O157:H7 from fresh lettuce leaf surfaces during washing process. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 621–633. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2038-5>
- Kader, A. A. (1991). Quality and its maintenance to the postharvest physiology of strawberry A Dale, J.J Luby (Eds.), *The strawberry into the 21st century*. Proceedings of the third North American strawberry conference, Houston, TX, Timber Press.
- Kang, S., You, H. J., Lee, Y.-G., Jeong, Y., Johnston, T. V., Baek, N.-I., Ku, S., & Ji, G. E. (2020). Production, structural characterization, and in vitro assessment of the prebiotic potential of butyl-fructooligosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 445. <https://doi.org/10.3390/ijms21020445>
- Lees, D.H., & Francis, F.J. (1972) Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience*, 7, 83-84.

- Li, H., & Yu, T. (2000). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (2), 269-274. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20010115\)81:2<269::AID-JSFA806>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20010115)81:2<269::AID-JSFA806>3.0.CO;2-F)
- Mali, S., & Grossmann, M. V. E. (2003). Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7005–7011. <https://doi.org/10.1021/jf034241c>
- Maniglia, B. C., Laroque, D. A., de Andrade, L. M., Carciofi, B. A. M., Tenório, J. A. S., & de Andrade, C. J. (2019). Production of active cassava starch films; effect of adding a biosurfactant or synthetic surfactant. *Reactive and Functional Polymers*, 144, 104368. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104368>
- Mantilla, N., Castell - Perez, M.E., Gomes, C., & Moreira, R.G. (2013). Multilayered antimicrobial edible coating and its effect on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.010>
- Martelli, S. M., Motta, C., Caon, T., Alberton, J., Bellettini, I. C., do Prado, A. C. P., Barreto, P. L. M., & Soldi, V. (2017). Edible carboxymethyl cellulose films containing natural antioxidant and surfactants:  $\alpha$ -tocopherol stability, in vitro release and film properties. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.026>
- Mazumdar, B.C., & Majumder, K. (2003). Methods on physico-chemical analysis of fruit. Daya Publishing House, India, Delhi, pp. 112-115.
- Minucelli, T., Ribeiro-Viana, R. M., Borsato, D., Andrade, G., Cely, M. V. T., de Oliveira, M. R., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Sphorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*, 8, 743–753. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9592-3>

- Motta, J.F.G., Souza, A.R., Gonçalves, S.M., Madella, D.K.S.F., Carvalho, C.W.P., Vitorazi, L., & Melo, N.R. (2020). Development of active films based on modified starches incorporating the antimicrobial agent lauroyl arginate (LAE) for the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 2082–2093. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02548-0>
- Nawab, A., Alam, F., & Hasnain, A. (2017). Mango kernel starch as a novel edible coating for enhancing shelf- life of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 581-586. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.057>
- Olanya, O.M., Ukuku, D.O., Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Niemira, B.A., & Mukhopadhyay, S. (2017). Reduction in *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro* and on tomato by sophorolipid and sanitizer as affected by temperature and storage time. *International Journal of Food Science Technology*, 53 (5), 1303-1315. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13711>
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P., & Chiralt, A. (2014). Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids*, 38, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.011>
- Pellá, M., Silva, O. A., Pellá, M. G., Beneton, A. G., Caetano, J., Simões, M. R., & Dragunski, D. C. (2020). Effect of gelatin and casein additions on starch edible biodegradable films for fruit surface coating. *Food Chemistry*, 309, 125764. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125764>
- Peretto, G., Du, W-X., Avena-Bustillos, R. J., Berrios, J.J. Sambo, P., & McHugh, T.H. (2017). Electrostatic and conventional spraying of alginate-based edible coating with natural antimicrobials for preserving fresh strawberry quality. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 165-174. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1808-9>

- Pinto, M. I., Ribeiro, B., Guerra, J. M. C., Rufino, R., Sarubo, L. A., Santos, V. A., & Luna, J. M. (2018). Production in bioreactor, toxicity and stability of a low-cost biosurfactant. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 595-600. <https://doi.org/10.3303/CET1864100>
- Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2021). Preparation and incorporation of functional ingredients in edible films and coatings. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 209–231. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02528-4>
- Robledo, N., López, L., Bunger, A., Tapia, C., & Abugoch, L. (2018). Effects of antimicrobial edible coating of thymol nanoemulsion/quinoa protein/chitosan on the safety, sensorial properties, and quality of refrigerated strawberries (*Fragaria ananassa*) under commercial storage environment. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1566–1574. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2124-3>
- Rodrigues, F.J., Cedran, M.F., & Garcia, S. (2018). Influence of linseed mucilage incorporated into an alginate-base edible coating containing probiotic bacteria on shelf-life of fresh-cut yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1605–1614. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2128-z>
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.018>
- Romano, N., Santos, M., Mobili, P., Vega, R., & Gómez-Zavaglia, A. (2016). Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. *Food Chemistry*, 202, 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.002>
- Santos, M. I., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugars using a

- combined approach of near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Food Research International*, 64, 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.040>
- Shahbazi, Y., Shavisi, N., & Karami, N. (2021). Development of edible bioactive coating based on mucilages for increasing the shelf life of strawberries. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 394-405. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00638-3>
- Silveira, V. A. I., Marim, B. M., Hipólito, A., Gonçalves, M. C., Mali, S., Kobayashi, R. K. T., & Celligoi, M. A. P. C. (2020). Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100591. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100591>
- Silva, I. A., Veras, B.O., Ribeiro, B.G., Aguiar, J.S., Campos Guerra, J.M., Luna, J.M., & Sarubbo, L.A. (2020). Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. *PeerJ* 8:e9064. <https://doi.org/10.7717/peerj.9064>
- Silveira, V. A. I., Nishio, E. K., Urzedo Queiroz Freitas, C. A., Amador, I. R., Takayama Kobayashi, R. K., Caretta, T. O., Macedo, F., & Celligoi, M. A. P. C. (2019). Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101287. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101287>
- Sogvar, O. B., Saba, M. K., & Emamifar, A. (2016). Aloe vera and ascorbic acid coatings maintain postharvest quality and reduce microbial load of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.019>
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Zerkowski, J. A., Krishnama, A., & Vasanthan, N. (2015). Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.006>

- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., & Uknalis, J. (2017). Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. *Journal of Microbiological Methods*, 136, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.012>
- Tang, Y., Xie, F., Zhang, D., Zhu, M., Liu, L., Liu, P., & Gu, C. (2015). Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. *Starch*, 67, 124–131. <https://doi.org/10.1002/star.201400080>
- Treviño-Garza, M. Z., García, S., Flores-González, Ma. del S., & Arévalo-Niño, K. (2015). Edible active coatings based on pectin, pullulan, and chitosan increase quality and shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Food Science*, 80, M1823–M1830. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12938>
- Tumbariski, Y., Nikolova, R., Petkova, N., Ivanov, I., & Lante, A. (2019). Biopreservation of fresh strawberries by carboxymethyl cellulose edible coatings enriched with a bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47. *Food Technology and Biotechnology*, 57, 230–237. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.6128>
- Van de Velde, F., Tarola, A., Güemes, D., & Pirovani, M. (2013). Bioactive compounds and antioxidant capacity of camarosa and selva strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Foods*, 2, 120–131. <https://doi.org/10.3390/foods2020120>
- Ventura-Aguilar, R. I., Bautista-Baños, S., Flores-García, G., & Zavaleta-Avejar, L. (2018). Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food Chemistry*, 262, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.063>
- Yoon, Y.S., Ameer, K., Song, B.S., Kim, J. K., Park, H. Y., Lee, K.C., Eun, J.B., & Park, J. H. (2020). Effects of X-ray irradiation on the postharvest quality characteristics of ‘Maehyang’ strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Food Chemistry*, 325, 126817. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126817>

- Yu, H., Liu, W., Li, D., Liu, C., Feng, Z., Jiang, B. (2020). Targeting delivery system for *Lactobacillus plantarum* based on functionalized electrospun nanofibers. *Polymers*, 12, 1565. <https://doi.org/10.3390/polym12071565>
- Zhang, X., Fan, X., Solaiman, D.K.Y., Ashby, R. D., Liu, Z., Mukhopadhyay, S., & Yan, R. (2016). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on the surface of spinach leaves by biobased antimicrobial surfactants. *Food Control*, 60, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.026>
- Zini, E., Gazzano, M., Scandola, M., Wallner, S. R., & Gross, R. A. (2008). Glycolipid biomaterials: solid-state properties of a poly(sophorolipid). *Macromolecules*, 41, 7463–7468. <https://doi.org/10.1021/ma800496f>

## 6 CONCLUSÕES

- O soforolipídio de *S. bombicola* teve produção máxima de 111,25 g/L, foi caracterizados por CLAE e RMN e a forma predominante foi a lactônica diacetilada C18:1.
- O soforolipídio foi capaz de inibir o crescimento fúngico de *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *R. solani* e *P. ultimum* quando aplicados em testes *in vitro*. Quando aplicado em folhas de tomateiro infectadas por *B. cinerea*, reduziu até 53,80% da necrose, e quando empregado na imersão de tomates antes da inoculação de *B. cinerea*, inibiu o desenvolvimento do mofo cinzento em até 96,27%.
- Todos os revestimentos apresentaram aspecto uniforme, e em associação de soforolipídio e frutooligossacarídeos, a resistência à tração diminuiu cerca de 10x. O efeito sinérgico provocado pelos dois ingredientes ativos fez com que os revestimentos de amido tivessem sua plasticidade aumentada.
- Os revestimentos ativos aplicados em morangos foram capazes de reduzir cerca de 2x a perda de massa até o 15º dia de avaliação, e provocaram um retardo no amadurecimento das frutas, avaliado pelos parâmetros de pH, acidez titulável e teor de antocianinas. Os revestimentos também foram capazes de conter o crescimento de bolores e leveduras durante todo o período de análises.

Desta forma, conclui-se que o soforolipídio é uma alternativa viável para reduzir a contaminação microbiana no tomateiro e em tomates, minimizando o consumo de agrotóxicos e seus efeitos nocivos à saúde e ao ambiente, além de auxiliar na manutenção dos atributos de qualidade dos morangos no pós-colheita, quando incorporados à revestimentos ativos.

## 7 REFERÊNCIAS

- AFONSO, L.; SILVEIRA, V. A. I.; CARETTA, T. O.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aplicação de subprodutos agroindustriais como fontes de nitrogênio para a produção de sofrorolipídios por *Starmerella bombicola*. **Brazilian Journal of Development**, v.6, p.14875 - 14887, 2020.
- ALI, A., CHEN, Y., LIU, H., YU, L., BALOCH, Z., KHALID, S., ... CHEN, L. Starch-based antimicrobial films functionalized by pomegranate peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 1120-1126, 2019.
- ALVAREZ, M. V.; PONCE, A. G. MOREIRA, M. R. Influence of polysaccharide-based edible coatings as carriers of prebiotic fibers on quality attributes of ready-to-eat Fresh blueberries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98 (7), p. 2587-2597, 2017.
- ANSAR, N.; AZIS, A.D. New frozen product development from strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.). **Helyon**, v.6 (9), e05118, 2020.
- ANUÁRIO HF, Hortifruti – Brasil, 2020. Acesso em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/213216/1/Anuario-HF-2020-LEC-Antunes.pdf>
- ARAGÜEZ, L., COLOMBO, A., BORNEO, R., & AGUIRRE, A. Active packaging from triticale flour films for prolonging storage life of cherry tomato. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 25, 100520, 2020.
- ASHBY, R.; SOLAIMAN, D. K.Y.; FOGLIA, T.A. The use of fatty acids to enhance free acid sophorolipid synthesis. **Biotechnology Letters**, v.28, p.253–260, 2006.
- ASMER, HJ., LANG, S., WAGNER, F. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 65, p. 1460 – 1466, 1988.
- ASTM. (1996). Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. In Annual book of American standard testing methods (pp. 162e170). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced production of bioactive sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by design of experiment approach with successive purification and characterization. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 7, p. 377–386, 2012.

BAMBACE, M.F.; ALVAREZ, M. V. MOREIRA, M. R. Prebiotic edible coatings with biopreservatives: Quality and safety of fresh apple cubes. **Journal of Food Process Engineering**, e12971, 2018.

BERSANETI, G. T.; GARCIA, S.; MALI, S.; & PEDRINE COLABONE CELLIGOI, M. A. Evaluation of the prebiotic activities of edible starch films with the addition of nystose from *Bacillus subtilis natto*. **LWT**, v.116, p.108502, 2019.

BERSANETI, G. T.; MANTOVAN, J.; MAGRI, A.; MALI, S.; & CELLIGOI, M. A. P. C. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis natto* CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1132–1138, 2016.

BHANGALE A.; WADEKAR, S.; KALE, S.; BHOWMICK, D.; PRATAP. Production of sophorolipids synthesized on castor oil with glucose and glycerol by using *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 336-343, 2014.

BLANCARD, D. Tomato diseases: Identification, Biology and Control. **CRC Press**, 2<sup>a</sup>ed. 688 p.,2014.

BIDARI, A.; GANJALI, M. R.; NOROUZI, P.; HOSSEINI, M. R. M.; ASSADI, Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v.126, p.1840-1844, 2011.

CAMARGO, F. P.; ALVEZ, H. S.; FILHO, W. P.; VILELA, N. J. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.11, p.07-20, 2006.

CARDOZO, V.F., OLIVEIRA, A.G., NISHIO, E.K., PERUGINI, M.R., ANDRADE, C.G., SILVEIRA, W.D., NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.12(1), p. 12, 2013.

CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHA, F. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, n.7, p. 613-621, 1999.

CELLIGOI, M. A. P. COLABONE; SILVEIRA, V. A. I.; HIPÓLITO, A.; CARETTA, T. O. BALDO, C. Sophorolipids: a review on production and perspectives of application in agriculture. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.18 (3), p. E03R01, 2020.

CERESA, C., FRACCHIA, L., WILLIAMS, M., BANAT, I. M., & DÍAZ DE RIENZO, M. A. The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. *Journal of Biotechnology*, v.309, p.34–43, 2020.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant. **International Journal of Science Natural** p. 63–71. 2011.

CHAOUACHI, M.; MARZOUK, T.; JALLOULI, S.; ELKAHOUI, S.; GENTZBITTEL, L.; BEN, C.; DJÉBALI, N. Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 172, 111389, 2021.

CHEN, J.; LIU, X.; FU, S.; AN, Z.; FENG, Y.; WANG, R.; JI, P. Effects of sophorolipids on fungal and Oomycetes pathogens in relation to pH solubility. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, p.1754-1763, 2020.

CHEN, Y., LIN, Y., TIAN, X., LI, Q., & CHU, J. Real-time dynamic analysis with low-field nuclear magnetic resonance of residual oil and sophorolipids concentrations in the fermentation process of *Starmarella bombicola*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 157, p. 9-15, 2019.

CHU, Y.; GAO, C. C.; LIU, X.; ZHANG, N.; XU, T.; FENG, X.; YANG, Y.; SHEN, X.; TANG, X. Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 122, 109054, 2020.

CORREA, L.C.; DIAS, R. C. S.; SOUZA, R. C. R.; MARTINS, S. S.; SILVA, P. T. S. Determinação de Betacaroteno e Licopeno em Frutas e Hortaliças por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa**, v.126, 17p, 2015.

CURTIS, F.; LIMA, G.; VITULLO, D.; DE CICCIO, V. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. **Crop Protection**, v.29, p.663-670, 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 2090–2101, 2010.

DAVEREY A, PAKSHIRAJAN K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and lowcost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, p.499-504, 2009.

DAVEREY A, PAKSHIRAJAN K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. **Coloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n.2, p. 246-253, 2010.

DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 496–501, 1997.

DENGLE-PULATE, V.; CHANDORKNAR, P.; BHAGWAT, S.; PRABHUNE, A. Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. **Journal of Surfactants Detergents**, v.17 (3), p. 543-552, 2014.

DHAR, P.; HAVSKJOLD, H.; THORNHILL, M.; ROELANTS, S.; SOETAERT, W.; KOTA, H R.; CHERNYSHOVA, I. Toward green floration: Interaction of a sophorolipid biosurfactant with a copper sulfide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 585, p. 386-399, 2021.

DÍAZ DE RIENZO, M. A.; BANAT, I. M.; DOLMAN, B.; WINTERBURN, J.; MARTIN, P. J. Sophorolipid biosurfactants: possible use as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 720–726, 2015.

DIXIT, R., AGRAWAL, L., SINGH, S. P., PRATEEKSHA, SINGH, P. C., PRASAD, V., & CHAUHAN, P. S. *Paenibacillus lentimorbus* induces autophagy for protecting tomato from *Sclerotium rolfsii* infection. **Microbiological Research**, 215, 164–174, 2018.

DONG, F.; WANG, X. Effects of carboxymethyl cellulose incorporated with garlic essential oil composite coatings for improving quality of strawberries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 821-826, 2017.

FALCÓ, I.; FLORES-MERAZ, P. L.; RANDAZZO, W.; SÁNCHEZ, G.; LÓPEZ-RUBIO, A.; FABRA, M. J. Antiviral activity of alginate-oleic acid-based coatings incorporating green tea extract on strawberries and raspberries. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 611-618, 2019.

FAOSTAT – Food and agriculture organization of the United Nations statistics. Acesso em: <http://faostat.fao.org/>

FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. **Journal of Berry Research**, v.6(1), p.47–63, 2016.

FELSE, A. P. SHAH, V.; CHAIN, J.; RAO, K.J.; GROSS, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 316–323, 2007.

FERREIRA, D. C. M.; MOLINA, G.; PELISSARI, F. M. (2019). Effect of Edible Coating from Cassava Starch and Babassu Flour (*Orbignya phalerata*) on Brazilian Cerrado Fruits Quality. **Food and Bioprocess Technology**. doi:10.1007/s11947-019-02366-z

FILHO, J. G. O.; DEUS, I. P. B.; VALADARES, A. C. F. V.; FERNANDES, C. C.; ESTEVAN, E. B. B.; EGEA, M. B. Chitosan film with *Citrus limonia* Essential Oil: Physical and Morphological Properties and Antibacterial Activity. **Colloids and Interfaces**, v. 4, 2020.

FONTOURA, I. C. C.; SAIKAWA, G. I. A.; SILVEIRA, V. A. I.; PAN, N. C.; AMADOR, I. R.; BALDO, C.; ROCHA, S. P. D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Antibacterial Activity of Sophorolipids from *Candida bombicola* Against Human Phatogens. **Brazilian Arquivos of Biology and Biotechnology**, v. 63, e20180568, 2020.

FRACCHIA, L. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications- present status and future potentials. **Biomedical science, engineering and technology**, v.14, p. 325-370, 2012.

GAO, P., QIN, J., LI, D., ZHOU, S. Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *.Botrytis cinerea*. **PLOS ONE**, v.13(1), p.e0190932,

GARG, M; PRIYANKA; CHATTERJEE, M. Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. **Biotechnology Reports**. 2018.

GAUR, V. K., REGAR, R. K., DHIMAN, N., GAUTAM, K., SRIVASTAVA, J. K., PATNAIK, S., ... MANICKAM, N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. **Bioresource Technology**, v. 285, 121314, 2019.

GONÇALVES, P.; GONÇALVES, C.; BRITO, P.; SAMPAIO, J. P. The *Wickerhamiella/Starmerella* clade – A treasure trove for the study of the Evolution of yeast metabolism. **Yeast Primer**, v. 37, p. 313-320, 2020.

GONTARD, N., GUILBERT, S., CUQ, J.-L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v. 57(1), p.190–195, 1992.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; & TULLOCH, A. P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39(4), p.846–855, 1961.

GUPTA, R.; REETIKA, K. **Biosynthesis of novel sophorolipids using *Candida bombicola* ATCC 22214: characterization and applications**. Thesis, (Doctor of Philosophy in Biotechnology), The University of Pune, India, 2012.

GUILMANOV, V.; BALLISTRERI, A.; IMPALLOMENI, G., & GROSS, R. A. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 489–494, 2002.

HAJJI, S.; YOUNES, I.; AFFES, S.; BOUFI, S.; NASRI, M. Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 375-392, 2018.

HAQUE, F.; ALFATAH, M. D; GANESAN, K.; BHATTACHARYYA, M. S. Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. **Scientific Reports**, v. 6, 23575, 2016.

HIPÓLITO, A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; BERSANETI, G.T; MALI, S.; CELLIGOI, M.A.P.C. Active Biodegradable Cassava Starch Films Containing Sophorolipids Produced by *Starmerella bombicola* ATCC® 22214™. **Journal of Polymers and Environment** v. 29, p. 3199–3209, 2021.

HIPÓLITO, A.; SILVA, R.A.A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; AMADOR, I.R.; PANAGIO, L.A.; BORSATO, D., CELLIGOI, M.A.P.C. Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.29, p.101797, 2020.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção estimada de tomates. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=produ%C3%A7%C3%A3o+de+tomate>

JADHAV, J. V., PRATAP, A. P., & KALE, S. B. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 15-24, 2019.

JING-YU, J., JING, Y., BO-WEN, Z., SHU-REN, W., GUO-CAI, Z., & LIAN-NAN, L. Sodium pheophorbide a controls cherry tomato gray mold (*Botrytis cinerea*) by destroying fungal cell structure and enhancing disease resistance-related enzyme activities in fruit. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 104581, 2020.

KAUR, G., WANG, H., TO, M. H., ROELANTS, S. L. K. W., SOETAERT, W., & LIN, C. S. K. Efficient sophorolipids production using food waste. **Journal of Cleaner Production**, v.232, p.1–11, 2019.

KIM, J.H.; OH, Y.R.; HWANG, J.; JANG, Y.A.; LEE, S. S. HONG, S. H.; EOM, G. T. Value-added conversion of biodiesel into the versatile biosurfactant sophorolipid using *Starmerella bombicola*. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 1, 100027, 2020.

KONISHI, M.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; UEMURA, S.; IWABUCHI, H.; KITAMOTO, D. Selective production of acid-form sophorolipids from glycerol by *Candida floricola*. **Journal of Oleo Science**. p.1365–1373. 2017.

KONISHI M, YOSHIDA Y, HORIUCHI JI. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 119, p. 317-322, 2015.

KUMAR, V.; HATAN, E.; BAR, E.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; DORON-FAIGENBOIM, ADI.; SPITZER-RIMON, B.; ELAD, Y.; ALKAN, N.; LEWINSOHN, E.; OREN-SHAMIR, M. Phenylalanine increases chrysanthemum flower immunity against *Botrytis cinerea* attack. **The Plant Journal**, v. 104, p. 226-240, 2020.

KURTZMAN, C. P.; PRICE, N. P. J; RAY, K. J.; KUO, T. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **Foodborne Bacterial Pathogens and Mycology Research Unit**, 2010.

LAHKAR, J., BORAH, S.N., DEKA, S., AHMED, G. Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: the causal organism of early blight of tomato. **BioControl**, v.60, p. 401-411, 2015.

LARA-CAPISTRAN, L., ZULUETA-RODRIGUEZ, R., CASTELLANOS-CERVANTES, T., REYES-PEREZ, J. J., PRECIADO-RANGEL, P., & HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. Efficiency of Marine Bacteria and Yeasts on the Biocontrol Activity of *Pythium ultimum* in Ancho-Type Pepper Seedlings. **Agronomy**, v.10(3), p. 408-420, 2020.

- LEBERSORGER, S.; & SCHNEIDER, F. Food loss rates at the food retail, influencing factors and reasons as a basis for waste prevention measures. **Waste Management**, v.34(11), p.1911–1919, 2014.
- LEES, D.H. AND FRANCIS, F.J. Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. **HortScience**, v.7, p.83-84, 1972.
- LI, H.; YONG, C.; ZHANQUAN, Z.; BOQUIANG, LI.; GUOZHENG, Q.; SHIPING T. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. **Food Quality and Safety**, v. 3, p. 111-119, 2020.
- LI, Y., DONG, Q., CHEN, J., & LI, L. Effects of coaxial electrospun eugenol loaded core-sheath PVP/shellac fibrous films on postharvest quality and shelf life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, v.159, 111028, 2020.
- LI, Y.; GUO, Q.; WEI, X.; XUE, Q.; LAI, H. Biocontrol effects of *Penicillium griseofulvum* against monkshood (*Aconitum carmichaelii* Debx.) root diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium* spp. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1532-1545, 2019.
- LIU, Y.; CAMACHO, L. M.; TANG, S. TAN, Z.; SALÉM, A. Z. M. Advances in nutritional manipulation rumen functions of surfactants. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p. 1451-1458, 2013.
- LIU, X., MA, X., YAO, R., PAN, C., & HE, H. (2016). Sophorolipids production from rice straw via SO<sub>3</sub> micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **AMB Express**, v. 6(1), p. 6-60, 2016.
- LOPES, C.; ÁVILA, A. **Doenças do Tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005.
- MA, X., MENG, L., ZHANG, H., ZHOU, L., YUE, J., ZHU, H., & YAO, R. Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 77-100, 2019.
- MAENG, Y; KIM, KT; ZHOU, X; JIN, L; KIM, KS; KIM, YH; LEE, S; PARK, JH; CHEN, X; KONG, M; CAI, L; LI, X. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 917–929, 2018.
- MAHCENE, Z.; KHELIL, AM.; HASNI, S.; AKMAN, P. K.; BOZKURT, F.; BIRECH, K.; GOUDJIL, M. B. TORNUK, F. Development and Characterization of sodium alginate based active edible films incorporated with essential oils of some medicinal plants. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 124-132, 2020.
- MALI, S., & GROSSMANN, M. V. E. Effects of Yam Starch Films on Storability and Quality of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51(24), p. 7005–7011, 2003.

- MANIGLIA, B. C.; LAROQUE, D. A.; DE ANDRADE, L. M.; CARCIOFI, B. A. M.; TENÓRIO, J. A. S.; DE ANDRADE, C. J. (2019). Production of active cassava starch films; effect of adding a biosurfactant or synthetic surfactant. **Reactive and Functional Polymers**, 104368.
- MANTOVAN, J.; BERSANETI, G. T.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; CELLIGOI, M. A. P. C.; & MALI, S. Use of microbial levan in edible films based on cassava starch. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, p. 31–36, 2018.
- MANTILLA, N., CASTELL - PEREZ, M.E., GOMES, C., MOREIRA, R.G. Revestimento comestível antimicrobianos multicamadas e seu efeito na qualidade e prazo de validade do abacaxi minimamente processado (Ananas comosus). **LWT-Food Science and Technology**, v.51, p. 37 – 43, 2013.
- MAZUMDAR, B.C., MAJUMDER, K. Métodos de análise físico-química de frutas. **Daya Publishing House**, Índia, Delhi pp. 112 – 115.
- MILNER, H.; JI, P.; SABULA, M.; WU, T. Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) detection of soilborne pathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Soil Ecology**, v. 136, p. 86-92, 2019.
- MINUCELLI, T; RIBEIRO-VIANA, R. M; BORSATO, D.; ANDRADE, G.; CELY, M. V. T; DE OLIVEIRA, M.R.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 743–753, 2017.
- MIORINI, T.J.J.; KAMVAR, Z.N.; HIGGINS, R.S.; RAETANO, C.G.; STEADMAN, J.R.; EVERHART, S.E. Differential aggressiveness of *Sclerotinia sclerotium* isolates from North and South America and partial host resistance in Brazilian soybean and dry bean cultivars. **Tropical Plant Pathology**, 2019.
- MORYA, V.K.; PARK, J.H.; KIM, T.J.; JEON, S.; KIM, E.K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed batch culture. **Bioresource Technology**. 2013.
- MOUSAVI, F., BEHESHTI-MAAL, K., MASSAH, A. Production of sophorolipid from an identified current yeast, *Lachancea thermotolerans* BBMCZ7FA20, isolated from honeybee. **Current Microbiology**, v.71 (2), p.303–310. 2015.
- MULEY, A. B. SINGHAL, R. S. Extension of postharvest shelf life os strawberries (*Fragaria ananassa*) using a coatings of chitosan-whey protein isolate conjugate. **Food Chemistry**, v. 329, 127213, 2020.
- NAIR, M. S.; TOMAR, M.; PUNIA, S.; KUKULA-KOCH, W.; KUMAR, M. Enhancing the funtionality of chitosan-and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 304-320, 2020.

OLANYA, O. M.; UKUKU, D. O. SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D. NIEMIRA, S. M. Reduction in *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on tomato by sophorolipid and sanitiser as affected by temperature and storage time. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1303-1315, 2018.

OLIVEIRA, M.R. **Produção de soforolipídios por células imobilizadas de *Candida bombicola* ATCC22214 em Alginato de Cálcio**. 185p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

OZTURK, O.; TAHKAR, P. S. Selected physical and viscoelastic properties of strawberries as a function of heated-air drying conditions. **Drying Technology**, p.1-11, 2019.

PARDINI, A.; CONSUMI, M.; LEONE, G.; BONECHI, C.; TAMASI, G.; SANGIORGIO, P.; VERARDI, A.; ROSSI, C.; MAGNANI, A. Effect of diferente post-harvest storage conditions and heat treatment on tomatine contente in comercial varieties of green tomatoes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 96, 103735, 2021.

PAULINO, B.N.; PESSÔA, M.G.; MANO, M.C.; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.

PAVINATTO, A., DE ALMEIDA MATTOS, A. V., MALPASS, A. C. G., OKURA, M. H., BALOGH, D. T., SANFELICE, R. C. Coating with chitosan-based edible films for mechanical/biological protection of strawberries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.151, p.1004-1011, 2020.

PEIAN, Z., HAIFENG, J., PEIJIE, G., SADEGHNEZHAD, E., QIANQIAN, P., TIANYU, D., ... JINGGUI, F. Chitosan induces jasmonic acid production leading to resistance of ripened fruit against *Botrytis cinerea* infection. **Food Chemistry**, 127772, 2020.

PONTES, C., ALVES, M., SANTOS, C., RIBEIRO, M. H., GONÇALVES, L., BETTENCOURT, A. F., & RIBEIRO, I. A. C. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, 513(1-2), 697–708, 2016.

PINTO, M. I. S.; RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; SANTOS, V. A.; LUNA, J. M. Production in Bioreactor, Toxicity and Stability of a Low-cost Biosurfactant. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 595-600, 2018.

PRICE, N.P.J.; RAY, K.J.; VERMILLION, K.E.; DUNLAP, C.A.; KURTZMAN, C.P. Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. **Carbohydrate Research**.2012.

RASHAD, M.M.; NOOMAN, M.; ALI, M. M.; ALKASHEF, A. Production, characterization and anticancer activity of *Candida bombicola* sophorolipids by means of solid-state fermentation of sunflower oil cake and soybean oil. **Grasas y Aceites**, v. 65 (2), e017, 2014.

RGUEZ, S., BEN SLIMENE, I., ABID, G., HAMMEMI, M., KEFI, A., ELKAHOUI, S., ... DJÉBALI, N. Tetraclinis articulata essential oil reduces *Botrytis cinerea* infections on tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 266, 109291, 2020.

RIBEIRO, I.A., BRONZE, M.R., CASTRO, M.F.; RIBEIRO, M. H. L. Sophorolipids: improvement of the selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, 1875–1887, 2013.

ROBERTS, D.P.; SELMER, K.; LUPITSKY, R.; RICE, C.; BUYER, J.; MAUL, J. E.; LAKSHMAN, D. K.; SOUZA, J. Seed treatment with prodigiosin controls damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum*. **AMB Express**, v.11 (10), 2021.

ROBLEDO, N.; VERA, P.; LÓPEZ, L.; YAZDANI-PEDRAM, M. TAPIA, C.; ABUGOCH, L. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v. 246, p. 211-219, 2018.

ROELANTS, S.; SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; LODENS, S.; VAN RENTERGHEM, L.; SOETAERT, W. Production and Applications of Sophorolipids. **Biobased Surfactants**, p.65–119. 2019.

SALES, R. S. A. **Controle Biológico de *Rhizoctonia solani*, agente causal do tombamento de tomateiro, com *Trichoderma* spp.** Dissertação (Mestrado em Agricultura), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, p.39. 2011.

SAMAD, A., ZHANG, J.; CHEN, D.; LIANG. Sophorolipid production from biomass hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n.22, v. 46-57, 2014.

SANTOS, S. F. DOS, CARDOSO, R. DE C. V., BORGES, Í. M. P., ALMEIDA, A. C. E, ANDRADE, E. S., FERREIRA, I. O., & RAMOS, L. DO C. (2020). Post-harvest losses of fruits and vegetables in supply centers in Salvador, Brazil: Analysis of determinants, volumes and reduction strategies. **Waste Management**, v. 101, p. 161–170, 2020.

SCHREIBER, D. S. Anti-cancro, Uma nova maneira de viver. **Nutricias**, v. 14, p.35-38, 2012.

SCHOFIELD MH, THAVASI TR, GROSS RA, 2013. **Modified sophorolipids for the inhibition of plant pathogens.** Patent No. US 2013/0085067 A1.

SEN, S., BORAH, S. N., BORA, A., DEKA, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Microbial Cell Factories**, v.16, n.1, 2017.

SHAH, M. U. H., SIVAPRAGASAM, M., MONIRUZZAMAN, M., TALUKDER, M. M. R., YUSUP, S. B., & GOTO, M. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, p. 60–67, 2017.

SILVEIRA, V. A. I.; MARIM, B. M.; HIPÓLITO, A.; GONÇALVES, M. C.; MALI, S.; KOBAYASHI, R. K. T.; & CELLIGOI, M. A. P. C. Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens. **Food Packaging and Shelf Life**, v.26, 100591, 2020.

SILVEIRA, V. A. I.; NISHIO, E. K., URZEDO, C. A. Q.; AMADOR, I. R.; KOBAYASHI, R. T.; CARETTA, T. O.; MACEDO, F.; CELLIGOI, M. A. P. C. Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 101287, 2019.

SIPOS, P., SZÚCS, M., SZABÓ, A., ERŐS, I., & SZABÓ-RÉVÉSZ, P. An assessment of the interactions between diclofenac sodium and ammonio methacrylate copolymer using thermal analysis and Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 46(2), 288–294, 2008.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; UKNALIS, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. **Journal Microbiological Methods**, 2017.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J. A.; FOGLIA, T. A. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1341–1347, 2007.

SOUZA, K. S. T.; GUDIÑA, E. J.; SCHWAN, R. F.; RODRIGUES, L. R.; DIAS, D. R.; TEIXEIRA, J. A. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**. v. 346, p. 152-158, 2018.

SURIYAGAMON, S. Compost seed of *Trichoderma harzianum* UD12-102 in controlling collar and stem rot tomato caused by *Sclerotium rolfsii*. **Environment and Natural Resources Journal**, v. 16, p. 20-28, 2018.

SVECOVÁ, E.; PROIETTI, S.; CARUSO, C.; COLLA, G.; CRINÒ, P. Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. **Crop Protection**, v. 43, p. 223-230, 2013.

TANG, Y., MA, Q., DU, Y., REN, L., VAN ZYL, L. J., & LONG, X. Efficient purification of sophorolipids via chemical modifications coupled with extractions and their potential applications as antibacterial agents. **Separation and Purification Technology**, v. 245, 116897, 2020.

TANG, Y., XIE, F., ZHANG, D., ZHU, M., LIU, L., LIU, P., et al. Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. **Starch/Staerke**, v. 67(1–2), p. 124–131, 2015.

TARANTILI, P. A., & KOUMOULOS, H. (2008). Sustained release of guaifenesin and ipriflavone from biodegradable coatings. **European Polymer Journal**, v.44(2), p. 444–452, 2008.

TOMADONI, B.; MOREIRA, M.R.; PEREDA, M.; PONCE, A. G. Gellan based coatings incorporated with natural antimicrobials in fresh-cut strawberries: Microbiological and sensory evaluation through refrigerated storage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 97, p. 384-389, 2018.

TREVIÑO-GARZA, M. Z.; GARCÍA, S.; DEL SOCORRO FLORES-GONZÁLEZ, M.; & ARÉVALO-NIÑO, K. Edible Active Coatings Based on Pectin, Pullulan, and Chitosan Increase Quality and Shelf Life of Strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Food Science**, 80(8), M1823–M1830, 2015.

VAN BOGAERT, INA; GROENEBOER, S; SAERENS, K; SOETAERT, W. The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. **FEBS Journal**, v. 278, n. 2, p. 206–221, 2011.

VAN BOGAERT, INA; SAERENS, K; DE MUYNCK, C; DEVELTER, D; SOETAERT, W; VANDAMME, EJ. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23–34, 2007.

VAN-BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v.46, n.4, p. 821-833, 2011.

VIGNOLO, G. K. **Produção e qualidade de morangos durante dois ciclos consecutivos em função da data da poda, tipo de filme do túnel baixo e cor do mulching plástico.** Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, 2015.

VINCHIRA-VILLARRAGA, D.M.; CASTELLANOS, N.; MORENO-SARMIENTO, N.; SUAREZ-MORENO, Z.M.; RAMOS, F. A. Antifungal activity of marine-derived *Paenibacillus* sp. PNM200 against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, the causal agent of tomato vascular wilt. **Biological Control**, v. 154, 104501, 2021.

WADEKAR, S. D.; KALE, S.; LALI, A.; BHOWMICK, D. N. Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 125-142, 2012.

YAN, J.; LUO, Z.; BAN, Z.; LU, H.; LI, D.; YANG, D.; ... LI, L. The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.147, p. 29–38, 2019.

YANG, L., LI, Y., ZHANG, X., LIU, T., CHEN, J., WEI, L., & HUA, Q. Metabolic profiling and flux distributions reveal a key role of acetyl-CoA in sophorolipid synthesis by *Candida bombicola*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 145, p. 74-82, 2019.

YANG, X., ZHU, L., XUE, C., CHEN, Y., QU, L., & LU, W. Recovery of purified lactonic sophorolipids by spontaneous crystallization during the fermentation of sugarcane molasses

with *Candida albicans* O-13-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.51(6-7), p. 348–353, 2012.

YOO, D.; LEE, B.S; KIM, E. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, n.6, v. 1164-1169, 2005.

YUAN, Z.; SHI, Y.; CAI, F.; ZHAO, J.; XIONG, Q.; WANG, Y.; ... ZHENG, Y. (2019). Isolation and Identification of Polysaccharides from *Pythium arrhenomanes* and Application to Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.) Preservation. **Food Chemistry**, 125604, 2020.

ZHANG, Q.; STUMMER, B. E.; GUO, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; HARVEY. Quantification of *Pseudomonas protegens* FD6 and *Bacillus subtilis* NCD-2 in soil and the wheat rhizosphere and suppression of root pathogenic *Rhizoctonia solani* AG-8. **Biological Control**, v. 154, 104504, 2021.

ZHANG, S., LOU, X., XU, R., DAI, C., XU, N., YAN, Q., ... KIRSEBOM, H. Hydrophobic cryogels prepared via cryo-polymerization as oil carriers for biosynthesis of sophorolipids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 171, 107677, 2020.

ZHANG, X., ASHBY, R., SOLAIMAN, D. K. Y., UKNALIS, J., & FAN, X. Inactivation of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. by Palmitic, Stearic, and Oleic Acid Sophorolipids and Thiamine Dilauryl Sulfate. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016.

ZHANG, X., ASHBY, R.D., SOLAIMAN, D., LIU, Y., FAN, X. Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactonic and free acid sophorolipids against *Escherichia coli* O157:H7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 11, n. July, p. 176–18, 2017

ZHANG, Y.; JIA, D.; SUN, W.; YANG, X.; ZHANG, C.; ZHAO, F.; LU, W.; Semicontinuous sophorolipid fermentation using a novel bioreactor with dual ventilation pipes and dual sieve-plates coupled with a novel separation system. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. p. 455–464, 2018.