



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELBA FERREIRA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE SANITIZANTE PARA VEGETAIS
COM SOFOROLÍDIOS DE *Starmerella bombicola***

Londrina
2022

ELBA FERREIRA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE SANITIZANTE PARA VEGETAIS
COM SOFOROLIPÍDIOS DE *Starmerella bombicola***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Londrina
2022

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

J95jef22 Junior, Elba ferreira junior.

DESENVOLVIMENTO DE SANITIZANTE PARA VEGETAIS COM SOFOROLIPÍDIOS DE *Starmerella bombicola* : DESENVOLVIMENTO DE SANITIZANTE PARA VEGETAIS COM SOFOROLIPÍDIOS DE *Starmerella bombicola* / Elba ferreira junior Junior. - Londrina, 2022.

97 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi Celligoi.

Coorientador: Cristiani Baldo da Rocha Rocha.

Coorientador: Marcelo Rodrigues de Melo Melo.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2022.

Inclui bibliografia.

1. Desenvolver um sanitizante contendo soforolipídios de *Starmerella bombicola* e - Tese. 2. avaliar seu efeito antimicrobiano em alimentos minimamente processados. - Tese. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi. II. Rocha, Cristiani Baldo da Rocha. III. Melo, Marcelo Rodrigues de Melo . IV. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . V. Título.

CDU 66

ELBA FERREIRA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE SANITIZANTE PARA VEGETAIS
COM SOFOROLIPÍDIOS DE *Starmerella bombicola***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Cristiani Baldo da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 14 de abril de 2022.

“Cada dia surgem novos desafios. E são eles que nos impulsionam a ir para cima e enfrentar de frente os problemas até vencê-los. O ingrediente principal nós temos: vontade e persistência!”

Élida Pereira Jerônimo

***Dedico esse trabalho à minha família,
meu tesouro mais precioso.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais essa etapa concluída com sucesso. Agradeço por ajudar a manter o foco, perseverança e fé nos momentos que me faltaram confiança.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, por aceitar me orientar compartilhar seu conhecimento e experiência; aos incentivos e paciência, principalmente nos momentos mais complicados; pela confiança e amizade. Agradeço por esses anos compartilhados, que contribuíram para minha evolução pessoal e profissionalmente;

À minha família, pelo amor incondicional, paciência e apoio nos meus momentos achei perderia minha sanidade. Por acreditarem e na minha capacidade e sempre despertarem o melhor de mim;

Às pessoas que me auxiliaram na pesquisa Talita Carreta e Victoria akemi, por dividir a experiência e conhecimento profissional, mas principalmente pelo apoio moral e paciência, por tornarem esse tempo mais fácil e divertido;

Aos técnicos de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez minha imensa gratidão pela boa vontade, disponibilidade em todos os momentos;

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, pela atenção, apoio, colaboração e auxílios prestados.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Junior, Elba Ferreira. **Desenvolvimento de sanitizante para vegetais com soforolipídios de *Starmarella bombicola***. 2022. 96 f. Dissertação (Mestrado) em Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina, 2022.

RESUMO

Microrganismos fitopatogênicos são os principais causadores de doenças de plantas, gerando perdas econômicas significativas para a cadeia de abastecimento agrícola e alimentar. Os soforolipídios de *S. bombicola* apresentam propriedades antimicrobianas e foram utilizados na formulação de um sanitizante para aplicação em vegetais orgânicos tomate cereja (*Solanum lycopersicum var. cerasiforme*), morango (*Fragaria × ananassa*), pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha menina (*Cucurbita moschata*). Os vegetais foram previamente contaminados ou não pelo *Botrytis cinerea* e os soforolipídios foram aplicados nas concentrações de 2 mg/mL e 4 mg/mL. Os resultados demonstraram que o sanitizante com o soforolipídio tiveram eficácia de 66,67% no tomate, 80% no morango, 88,89% no pepino e 88,89% abobrinha. Esses resultados revelam que o sanitizante a base de soforolipídio foi eficaz quando usado preventivamente e que os soforolipídios são moléculas promissoras contra o principal fitopatógeno do morango, tomate, pepino e abobrinha. Esse sanitizante sustentável pode reduzir a contaminação e aumenta a validade dos produtos.

Palavras-chave: antimicrobiano; soforolipídios; morango; tomate; pepino e abobrinha.

Junior, Elba Ferreira. **Development of the sanitizer for vegetables with sophorolipids from *Starmerella bombicola***. 2022. 96 p. Master's degree in Biotechnology – State University of Londrina, 2022. Abstract

ABSTRACT

Phytopathogenic microorganisms are the main causes of plant diseases, generating significant economic losses for the agricultural and food supply chain. Sophorolipids from *S. bombicola* have antimicrobial properties and were used in the formulation of a sanitizer for application on organic vegetables cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), strawberry (*Fragaria × ananassa*), cucumber (*Cucumis sativus*) and zucchini (*Cucurbita moschata*). The plants were previously contaminated or not by *Botrytis cinerea* and the sophorolipids were applied at concentrations of 2 mg/mL and 4 mg/mL. The results showed that the sanitizer with sophorolipid had 66.67% effectiveness in tomato, 80% in strawberry, 88.89% in cucumber and 88.89% in zucchini. These results reveal that the sophorolipid-based sanitizer was effective when used preventively and that sophorolipids are promising molecules against the main phytopathogen of strawberry, tomato, cucumber and zucchini. This sustainable sanitizer can reduce contamination and increase product shelf life.

Keywords: antimicrobial; sophorolipids; strawberry; tomato; cucumber and zucchini.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de soforolipídios típicos produzidos por <i>Starmerella bombicola</i> : A – acídica B – lactônica.....	25
Figura 2 – Biossíntese de soforolipídios em <i>S. bombicola</i>	30
Figura 3 – Parâmetros cinéticos da produção de soforolipídios por <i>S. bombicola</i> em meio de fermentação com glicose (250 g/L) e ácido oleico (220 g/L).....	42
Figura 4 – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de soforolipídios produzidos por <i>Starmerella bombicola</i> (A); padrão 10,40 0- soforolactona 60.600-diacetato (B)	43
Figura 5 – Ressonância magnética nuclear do padrão de soforolipídio 10.400- soforolactona 60.600-diacetato (A); e dos soforolipídios produzidos por <i>Starmerella bombicola</i> (B)	44
Figura 6 – Atividade de soforolipídios em concentrações de 2 e 4 mg.mL ⁻¹ em tomate infectado e não infectado com <i>Botrytis cinerea</i> durante 32 dias de armazenamento em comparação com ao controle	48
Figura 7 – Atividade de soforolipídios em concentrações de 2 e 4 mg.mL ⁻¹ em morango infectado com <i>Botrytis cinerea</i> durante 16 dias de armazenamento em comparação com ao controle.....	52
Figura 8 – Atividade de soforolipídios em concentrações de 2 e 4 mg.mL ⁻¹ em pepino infectado com <i>B. cinerea</i> durante 36 dias de armazenamento em comparação com ao controle	55
Figura 9 – Atividade do sanitizante com soforolipídios a 2 e 4 mg/mL em pepino infectado com <i>B. cinerea</i> durante 38 dias de armazenamento em comparação com ao controle.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Princípios sanitizantes autorizados no Brasil.	20
Tabela 2 – Tempo (em dias) de análise dos tratamentos com soforolipídios nos diferentes vegetais.	38
Tabela 3 – Porcentagem da severidade e eficácia da solução sanitizante contendo soforolipídios no tomate	48
Tabela 4 – Porcentagem da severidade x eficácia do soforolipídio no morango.	51
Tabela 5 – Porcentagem da severidade x eficácia do soforolipídio no pepino.....	54
Tabela 6 – Porcentagem da severidade x eficácia do soforolipídio na abobrinha.....	57

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	DEGRADABILIDADE DOS VEGETAIS	16
3.2	FATORES QUE AUMENTAM A DEGRADABILIDADE DOS VEGETAIS	18
3.3	SANITIZANTES QUÍMICOS	19
3.4	SANITIZANTES NATURAIS.....	21
3.5	CONTAMINAÇÃO DE VEGETAIS POR <i>Botrytis cinerea</i>	24
3.6	SOFOROLÍPIDIOS	25
3.7	BIOSSÍNTESE DO SOFOROLÍPIDIO E MICRORGANISMOS PRODUTORES.....	27
3.8	AÇÃO ANTIMICROBIANA DO SOFOROLÍPIDIO	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAIS	35
4.2	MICRORGANISMOS	35
4.3	MEIOS DE CULTURA	35
4.4	PRODUÇÃO DE SOFOROLÍPIDIO	36
4.5	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SOFOROLÍPIDIO.....	36
4.6	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE SUBSTRATO E PRODUÇÃO DE SOFOROLÍPIDIO	36
4.7	CARACTERIZAÇÃO DE SOFOROLÍPIDIOS.....	37
4.7.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
4.7.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	37
4.8	DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO SANITIZANTE COM SOFOROLÍPIDIO	37
4.9	CONTAMINAÇÃO COM <i>Botrytis cinerea</i>	38
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1	PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIO	40
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS SOFOROLIPÍDIOS	42
5.2.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
5.2.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
5.3	EFEITO DO SANITIZANTE NO TOMATE	44
5.4	EFEITO DO SANITIZANTE NO MORANGO	49
5.5	EFEITO DO SANITIZANTE NO PEPINO	52
5.6	EFEITO DO SANITIZANTE EM ABOBRINHA	55
6.	CONCLUSÕES	58
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

A população mundial está mudando seus hábitos alimentares e o aumento da aquisição de legumes e verduras higienizados e prontos para o consumo, ou minimamente processados é uma realidade cada vez mais presente. Isto se dá, em função da busca por uma maior praticidade, diante de um ritmo de vida muito acelerado reduzindo o tempo destinado ao preparo de alimentos.

O uso intensivo de agrotóxicos na agricultura tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, como desequilíbrios biológicos no solo, plantas, animais e redução da biodiversidade. A sociedade tem se preocupado com a qualidade de vida, exigindo produtos livres de agrotóxicos e comercializados de forma transparente buscando por uma alimentação saudável e equilibrada, com todos os nutrientes carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, além do consumo por alimentos frescos e sem contaminação microbiana.

A qualidade microbiológica desses alimentos é de grande importância, pois já estão disponíveis para o consumo. Assim, o desenvolvimento de um sanitizante natural, eficiente e biodegradável se torna importante para conter a disseminação de microrganismos resistentes e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos minimamente processados.

O setor de alimentos minimamente processados, em que os produtos são higienizados e podem ser cortados antes de chegar ao consumidor, tem crescido como um todo e se diversificado, abrangendo novos produtos, inclusive frutas. Assim o setor agroindustrial depende de inovação tecnológica e da adoção de sistemas de garantia de qualidade para a sustentabilidade do agronegócio.

A popularidade de frutas e hortaliças minimamente processadas tem aumentado em virtude dos benefícios proporcionados na saúde e também em

razão da busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis e de rápido consumo.

Os biossurfactantes são compostos de superfície ativa sintetizados por diversos microrganismos e que têm recebido crescente interesse pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e produção a partir de fontes renováveis. Estes compostos apresentam propriedades emulsificante, solubilizante e dispersante, podendo ser aplicados em diversos processos, como na biorremediação, em formulações de herbicidas e pesticidas.

Os biossurfactantes também são utilizados no controle biológico por ter ação antimicrobiana, tornando uma nova alternativa do uso diretamente em vegetais, reduzindo a contaminação microbiana de fitopatógenos e aumentando a vida útil dos frutos.

Devido ao seu efeito antimicrobiano, os biossurfactantes também podem ser usados no controle biológicos de fungos e outros patógenos, tornando-se uma alternativa sustentável para reduzir a contaminação por fitopatógenos aumentando assim a vida útil de vegetais e frutas.

Os soforolipídios são biossurfactantes constituídos por uma molécula de soforose unida por ligação β -glicosídica à uma longa cadeia de ácido graxo. Podem ser produzidos por vários microrganismos, na qual a levedura *Starmerella bombicola* se destaca devido seus altos rendimentos de produção e reconhecimento como segura para a saúde humana e animal (GRAS-*General Recognized as safe*).

Considerando a busca por alimentos saudáveis, seguros e prontos para o consumo bem como as propriedades biológicas dos soforolipídios, principalmente sua ação antimicrobiana, este trabalho visa desenvolver um sanitizante com soforolipídios de *S. bombicola*, para aplicação em vegetais reduzindo a contaminação microbiana e aumentando a qualidade de frutas e hortaliças minimamente processadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sanitizante contendo soforolipídios de *Starmerella bombicola* e avaliar seu efeito antimicrobiano em alimentos minimamente processados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir soforolipídios por *S. bombicola* em meio contendo glicose e ácido oleico;
- Acompanhar os parâmetros fermentativos tais como o crescimento celular, consumo de açúcares e de ácido graxo e produção de soforolipídios;
- Caracterizar os soforolipídios produzidos por Cromatografia líquida de alta eficiência e Ressonância Magnética Nuclear;
- Produzir um sanitizante com soforolipídios de *S. bombicola* para vegetais minimamente processados;
- Avaliar a eficácia do sanitizante em tecidos vegetais de tomate, morango, pepino e abobrinha contaminados com o fungo *Botrytis cinerea*

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Degradabilidade dos vegetais

O Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro obteve uma participação de 26,6% no PIB do país em 2020, contra 20,5% em 2019, estendendo sua participação na economia brasileira. Em valores monetários, o PIB do país totalizou 7,45 trilhões de reais em 2020, e o PIB do agronegócio chegou a quase 2 trilhões de reais (CEPEA; CNA, 2021).

O conceito de perda e desperdício pode variar bastante dependendo de normas, de países e do autor do estudo em questão. As perdas se definem para o alimento que não acompanha sua cadeia produtiva até a distribuição, enquanto o termo desperdício é usado para alimentos descartados nas etapas de varejo e do consumidor (FAO, 2011).

A perda e o desperdício de alimentos se tornaram um assunto de grande importância, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. A degradação dos alimentos é um enorme problema para a indústria alimentícia e pode ser causada pela contaminação do produto, prévia ou posteriormente ao processamento, por esporos fúngicos e que em condições intrínsecas favoráveis, como atividade de água (a_w) e pH, germinam e formam um micélio visível, conseqüentemente deteriorando o produto antes mesmo deste atingido seu prazo de validade. Além disso, em alguns casos a contaminação fúngica pode causar danos à saúde dos consumidores devido à produção de micotoxinas (PITT; HOCKING, 1999; SAMSON *et al.*, 2004; GERMANO, GERMANO, 2011; GOUGOULI *et al.*, 2011; DAGNAS; MEMBRÉ, 2013; GARNIER *et al.*, 2017; BERNARDI *et al.*, 2018; BERNARDI *et al.*, 2019).

Uma das características principais da célula vegetal é a presença de uma fina, porém muito resistente, parede celular. A parede celular vegetal é formada por uma mistura complexa de polissacarídeos e outros compostos secretados pela célula e que são dispostos e conectados de uma forma muito

bem organizada através de ligações covalentes e não-covalentes (TAIZ *et al.*, 2002).

Podemos distinguir dois tipos de parede celular vegetal, a parede celular primária e a secundária rica em pectato de cálcio, presente na junção das paredes das paredes de células vivas. A presença da parede celular é uma característica intrínseca as células vegetais (PAIVA *et al.*, 2009). A parede celular primária é formada na fase de crescimento, e deve ser ao mesmo tempo mecanicamente estável e suficientemente flexível para permitir a expansão das células, evitando sua ruptura e consistem principalmente de polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas. Já a parede celular secundária forma-se após cessar o crescimento celular, e pode se tornar uma estrutura altamente especializada dependendo de sua localização, apresentado compostos de celulose e hemicelulose, e que são muitas vezes impregnados de lignina. Além dos polissacarídeos, as paredes das células vegetais contêm centenas de diferentes proteínas (TAIZ *et al.*, 2002, PAIVA *et al.*, 2009).

As pontes de cálcio entre os ácidos pécnicos ou entre esses e outros polissacarídeos dificultam o acesso e a ação de enzimas pectolíticas produzidas pelo fruto e que causam amaciamento, e daquelas produzidas pelos fungos e bactérias que causam deterioração (MOTA *et al.*, 2002).

O aumento de fungos indesejáveis ocasiona grandes impactos econômicos negativos para os produtores, aumentando as perdas e os custos de produção, além de problemas à saúde do consumidor decorrentes da exposição às micotoxinas, produzidas com o crescimento de fungos toxigênicos (MORETTI *et al.*, 2017; ZAIN *et al.*, 2011).

O aumento populacional e a tendência de consumidores cada vez mais exigentes, influenciaram a maior demanda por produtos frescos e orgânicos. Neste mercado, destacam-se os alimentos minimamente processados, que passam por operações como limpeza, lavagem com água

potável, sanitização, enxágue, descascamento, corte, embalagem e armazenamento (TEIXEIRA *et al.*, 2013). As frutas e hortaliças são os principais produtos nesse mercado, contudo, são dependentes da cadeia de distribuição para sua disponibilidade nos mercados locais e a aplicação de sanitizantes naturais poderá ser uma alternativa viável reduzindo o desperdício.

3.2 Fatores que aumentam a degradabilidade dos vegetais

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes na conservação dos produtos perecíveis (MERCIER *et al.*, 2017). O local específico para a conservação de alimentos em seu estado natural se torna eficaz desde a produção até o consumidor, mas pode ocorrer o aparecimento de microrganismos patogênicos em alimentos mal conservados ou crus, o que leva ao risco da integridade do produto e também um perigo real à saúde do consumidor.

A refrigeração é o método mais utilizado para conservação de frutas e hortaliças no período de pós colheita. Souza *et al.* 2019 armazenaram o mix de folhas e o repolho minimamente processados por até uma semana sem perda das qualidades visuais e nutricionais em ambiente refrigerado, podendo chegar a 14 dias com pequenas alterações na aparência visual. Assim, o armazenamento de produtos minimamente processados em temperatura ambiente não é aconselhável, pois os vegetais logo perdem a qualidade assim uma alternativa para aumentar o tempo de consumo pode ser a refrigeração.

A umidade é outro fator abiótico que também influencia na germinação e a esporulação de conídios, infecção de frutas e no desenvolvimento de podridões (BERNAT, 2017). Cada fungo apresenta uma temperatura ótima de crescimento, frequentemente entre 23 e 33 °C podendo influenciar processos do produto (DISKIN *et al.*, 2017). Fungos causadores de podridão pós-colheita geralmente crescem na faixa de 20-25 °C, com um

máximo entre 27 e 32 °C dependendo da espécie de fungo envolvida (SARDELLA; GATT; VALDRAMIDIS, 2018).

3.3 Sanitizantes químicos

Devido à grande proliferação dos microrganismos contaminantes, surge a necessidade da aplicação contínua de contaminantes químicos provocando impactos negativos para os ecossistemas ocasionando danos irreparáveis ao meio ambiente (ZAHID *et al.*, 2015).

A conservação por aditivos químicos é definida como a adição de substâncias químicas nos alimentos, com o objetivo de melhorar o tempo de prateleira, o sabor, aspecto e consistência (VINCENZI *et al.*, 2021). O uso desses conservantes, que tem como finalidade a prevenção e/ou inibição de microrganismos prejudiciais, evitando alterações químicas indesejadas, mantendo a qualidade do alimento, e aumentando o tempo de prateleira de alimento, porém podem ser substituídos por produtos naturais e menos tóxicos conservando as características como sabor, odor, consistência e seu valor nutritivo (VINCENZI *et al.*, 2021).

Na Tabela 1 demonstra o sanitizante químico bastante empregados na colheita e sendo compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo no após a colheita, para retirar os excessos de compostos químicos nos vegetais.

Tabela 1: Princípios sanitizantes autorizados no Brasil (ANDRADE, 2008; BRASIL, 2007; FAZLARA & EKHTELAT, 2012).

GRUPOS	PRINCÍPIOS ATIVOS
Aldeídos	Formaleído, glicoxal, glutaraldeído e paraformaldeído.
Fenólicos	Tercamilfenol; 2-benzil 4-clorofenol; 4-tercbutilfenol; cresóis 2-fenilfenol; 2-hidroxdifenileter e 2-hidroxi-2, 4, 4-triclorodifenileter.
Quaternários de amônio	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio; cloreto de alquil dimetil etilbenzil amônio; cloreto de alquil dimetil etiltoluil amônio; cloreto de lauril piridínio; cloreto e brometo de cetil trimetil amônio; cloreto de alquil trimetil amônio; N, N dialquil N,N dimetil amônio; dicloreto de polioxietileno (dimetilimino) etileno (dimetilimino) e dicloreto de polioxietileno (dimetilimino) metileno (dimetilimino) etileno. Obs.: Os radicais alquila estão compreendidos entre C8 e C18, sendo os mais efetivos os produtos resultantes da cominação C12 e C14.
Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo	Hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio.
	Ácido diclorocianúrico e os sais de sódio e potássio; ácido triclorocianúrico; N, N-

Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo	dicloroazodicarbonamida; N-cloro benzenossulfonamida sódica; N-cloro 4-metil benzenossulfonamida sódica; cloro suocinimida e 1,3- dicloro 5,5-dimetil hidantoína.
Iodo e derivados	Iodo, iodo-povidona (PVP-I) e iodóforos.
Biguanidas	Clorohexidina, cloridrato de polihexametileno biguanida.
Peróxido inorgânico	Peróxido de hidrogênio.
Peróxido orgânico	Ácido peracético.

3.4 Sanitizantes naturais

Os soforolipídios possuem propriedades químicas e biológicas únicas, tornando-o moléculas relevantes para aplicação no combate de diversas doenças e sanitizantes em muitos setores (MA, 2011). Nessa vertente, uma das principais propriedades investigadas atualmente é a respeito das suas atividades antimicrobianas, haja vista a importância e necessidade da descoberta de possíveis substituintes de antibióticos, germicidas e sanitizantes convencionais por compostos naturais e biodegradáveis, como os soforolipídios, em razão da preocupação do consumidor com o uso de antimicrobianos sintéticos, afim de melhorar a segurança alimentar.

Estudos do nosso grupo de pesquisa aplicou soforolipídios produzidos pela levedura *S. bombicola*, como sanitizante, na água de lavagem de carcaças de frango, simulando as etapas do abate e processamento, para redução de contaminantes e prevenção de contaminação cruzada, bem como manutenção da inocuidade das carcaças contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes

termotolerantes e aeróbios mesófilos. Os soforolipídios apresentaram potencial inovador de grande perspectiva para a indústria avícola, como agente descontaminante, trazendo maior segurança alimentar aos produtos e diminuição das perdas por contaminação (FREITAS *et al.* 2021).

Caretta *et al.* 2021 investigaram a estabilidade e a atividade antifúngica do soforolipídio de *S. bombicola* para os fitopatógenos de folhas e frutos de tomate. Os resultados mostraram que o soforolipídio foi estável por 120°C, pH até 7,0 e exposição à luz UV por 72h. Além disso, o soforolipídio na concentração de 2 mg/mL inibiu 95% do crescimento de *P. ultimum*; 75,7% de *B. cinerea*; 64,3% de *R. solani* e 28,5% de *S. rolfsii*. Nos testes contra *B. cinerea* nas folhas de tomate o soforolipídio na concentração de 1 e 4 mg/mL teve uma melhor eficácia de 76,9% e morte do fungo respectivamente, e nos tomates as concentrações de 2 e 4 mg/mL tiveram eficácia 96,27%. Os resultados demonstraram que o soforolipídio possui atividade antifúngica contra os principais fitopatógenos do tomate, com boa estabilidade, podendo ser uma alternativa aos fungicidas sintéticos para aplicação em culturas de tomate.

Agrawal *et al.* 2002 descreve a quitosana como um composto natural bioativo, que interfere tanto no desenvolvimento do patógeno quanto na ativação de várias respostas de defesa da planta. O emprego da quitosana para elaboração de nanopartículas também é amplamente estudado e se destaca pelo potencial antimicrobiano superior quando comparada a quitosana na sua forma macro. Além disso, resultados promissores têm demonstrado o potencial dessas nanopartículas de quitosana em uma variedade de plantas utilizadas na alimentação humana, podendo estimular a produção de alimentos mais resistentes a pragas e doenças fúngicas. Com essas características, a quitosana tem potencial para ser um auxiliar na segurança alimentar em um futuro próximo. (CARVALHO *et al.*, 2019).

Liu *et al.* 2007 também demonstraram que a quitosana inibiu o crescimento micelial e a germinação de esporos de *B. cinerea* e *Penicillium expansum*. Pasini *et al.* 1997 comprovaram a eficiência do óleo de canola associado à quitosana no controle de oídios que é um parasita obrigatório que só se desenvolve nos tecidos vivos e suscetíveis da planta hospedeira de várias culturas como (pepino, roseira, feijoeiro).

De acordo com Cavalcanti *et al.* 2004, os produtos contendo quitosana registrado nos EUA para uso no controle de oídio, míldio e mofo cinzento de abóbora, batata doce, tomate, pimenta, ervilha, cebola, melão, melancia, alface, feijão, trigo, amora, morango, cereja e outras frutíferas é o Elexa® 4PD, que possui 4% de quitosana. O mecanismo de ação do produto é pela ativação do sistema de defesa das plantas.

Bastos *et al.* 2004 comprovam a atividade biológica do óleo essencial e dos subprodutos de *Piper aduncum* (pimenta-de-macaco) como fungicida, bactericida, acaricida e inseticida em banana. Segundo Dhingra *et al.* 2004 evidencia que óleo essencial de mostarda foi efetivo no controle do tombamento (*damping-off*) em feijoeiro causado por *Rhizoctonia solani*.

RIBES *et al.* 2016 relatam que a utilização de óleos essenciais extraídos de plantas é comprovada pois são agentes antimicrobianos contra bactérias, fungos e leveduras. De acordo com RIBES *et al.* 2018 na qual a atividade é pertinente à constituição de compostos voláteis nos óleos essenciais, podendo ser detectado na casca da canela, em tomilho, orégano, hortelã-pimenta na qual possuem ótimas atividades antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos, sendo utilizados recentemente, para controlar o crescimento de fungos em compotas de morango, contribuindo no combate do *Aspergillus niger*.

Nos últimos anos, os óleos essenciais de plantas e seus constituintes atraíram um interesse considerável por causa de suas propriedades antimicrobianas e biodegradáveis de amplo espectro (DEAN *et al.*, 2012; LI

et al., 2021; SAMARAS *et al.*, 2021; STAMELOU *et al.*, 2021; XIN *et al.*, 2021).

Em razão das diferentes potencialidades dos extratos vegetais para uso na agricultura, apontadas em pesquisas ao longo dos últimos dez anos, pesquisadores vêm buscando identificar e isolar compostos presentes nesses extratos, inclusive, para tratamento de sementes (GHIMIRE *et al.*, 2020; SNEHA *et al.*, 2020; ANŽLOVAR *et al.*, 2020).

3.5 Contaminação de vegetais por *Botrytis cinerea*

B. cinerea é um fungo necrotrófico que afeta muitas plantas e frutas macias, e é um dos patógenos economicamente mais devastadores em morangos pós-colheita.

B. cinerea é um fungo ascomiceto que causa doença do mofo cinzento em mais de 1000 espécies de plantas (ELAD *et al.*, 2016; OLIVA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021; RIGHINI *et al.*, 2021; SAMARAS *et al.*, 2021).

Esse fungo pode infectar todos os órgãos da planta acima do solo, incluindo flores, folhas, brotos ou frutos e sob condições favoráveis podem causar perdas devastadoras em safras, como uvas, morangos, vegetais e plantas ornamentais em todo o mundo, causando consideráveis perdas todos os anos. Este fungo é classificado entre os 10 patógenos fúngicos de plantas mais graves devido ao seu negativo impacto em safras agronomicamente importantes e em produtos vegetais em armazenamento pós-colheita (DEAN *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2021; RIGHINI *et al.*, 2021; SAMARAS *et al.*, 2021).

B. cinerea é responsável pela infecção de uma imensa parte dos vegetais principalmente no período pós-colheita, uma vez que este fungo produz fitotoxinas e enzimas capazes de deteriorar a parede celular vegetal o que induz a necrose de tecidos vegetais favorecendo o processo de infecção (D'AMBROSIO *et al.*, 2018).

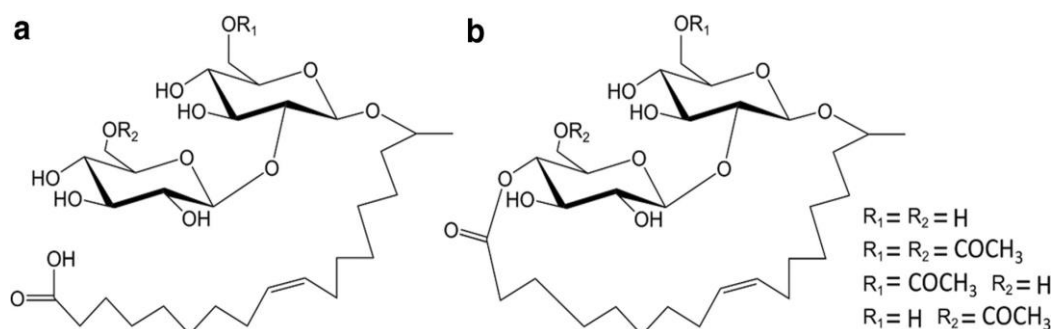
Caretta *et al.* (2021) avaliaram o efeito do soforolipídio em folhas e frutos de tomate e comprovaram que esse biossurfactante atua de forma mais eficaz quando usado preventivamente. Assim, os soforolipídios são moléculas estáveis que apresentam ação promissora para a potencial substituição de agrotóxicos no campo e foi eficiente contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*.

3.6 Soforolipídios

Os soforolipídios pertencem à classe dos glicolipídios extracelulares e são estruturalmente compostos por um dissacarídeo soforose (2'-O-β-D-glucopiranosil-1-β-D-glicose) ligado por uma ligação β-glicosídica a uma cadeia longa ácidos graxos, especialmente ácidos palmíticos (C16) ou esteárico (C18). Eles podem ser desacetilados, monoacetilados ou diacetilado na posição 6'e / ou 6' 'da soforose. O grupo carboxil de ácido graxo pode ser esterificado na posição C4 ', C6' ou C6 ", resultando em formas de lactônica ou no grupo carboxila da gordura livre ácido resultando na forma ácida (DA FONTOURA *et al.*, 2020).

Essas moléculas ocorrem em estruturas de anel aberto acídica (A) e lactônica (B), com uma intraesterificação entre o grupo carboxila de ácidos graxos e o átomo de carbono da soforose (ASMER *et al.*, 1988).

Figura 1 - Estrutura de soforolipídios típicos produzidos por *Starmerella bombicola*: A – acídica B – lactônica. Fonte: Jezierska *et al.*, 2020. Koster *et al.* (1995) e Rau *et al.* (2001).



Soforolipídios de forma ácida têm forte capacidade de formação de espuma e solubilidade em água, enquanto soforolipídios de forma lactônica têm a capacidade de diminuir a tensão superficial da água e grande potencial antimicrobiano. O grupo acetil diminui a quantidade de solubilidade da água e aumenta a atividade antiviral de soforolipídios. Soforolipídios com estruturas específicas podem ser obtidas por meio da engenharia genética e regulação do processo de fermentação (LI *et al.*, 2020).

Essas moléculas são produzidas principalmente como uma mistura complexa de congêneres, principalmente pelas leveduras não patogênicas *S. bombicola*. Homólogos de soforolipídios diferem do comprimento da cadeia de ácido graxo, posição de hidroxilação (ω ou $\omega-1$), grau de saturação em cadeia de ácidos graxos e grau de acetilação e lactonização. Enquanto a acetilação ocorre na posição C6 ' ou C6 " dos soforolipídios, a lactonização ocorre no grupo carboxila do ácido graxo cadeia e a extremidade C4 " de soforolipídios (LI *et al.*, 2020).

Pequenas modificações ocorrem nas estruturas químicas básicas que produzem diferentes moléculas do soforolipídio. Essas modificações incluem o carbono comprimento da cadeia, o grau de insaturação do hidroxilado cauda de ácido graxo, a posição de acetilação e o número de grupos acetil na cabeça soforose, e a posição de grupo hidroxila na cauda do ácido graxo lipofílico (LIU *et al.*, 2020).

Os soforolipídios exibem várias propriedades como emulsificante, lubrificante, formação de micelas, detergência, dispersabilidade e molhabilidade de formação de espuma. As propriedades antimicrobianas dos soforolipídios já eram descritos contra algumas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, a literatura ainda carece de dados mais consistentes explorando a atividade antimicrobiana dos soforolipídios (DA FONTOURA *et al.*, 2020).

Biossurfactantes são metabólitos extracelulares que atuam na mesma forma que os surfactantes químicos, mas são produzidos por microrganismos como bactérias e leveduras. Estes compostos biológicos são bons agentes emulsionantes, superfícies redutores de tensão, seletivos e mais amigáveis ao meio ambiente do que a maioria dos surfactantes sintéticos (RODRIGUES *et al.*, 2020).

De acordo com Hipólito *et al.* 2020, os biossurfactantes recebem significância devido à sua ampla aplicação experimental e vantagens sobre superfícies sintéticas, os soforolipídios são biossurfactantes promissores, classificados como glicolipídios extracelulares e produzidos por diversos microrganismos.

3.7 Biossíntese do soforolipídio e microrganismos produtores

Soforolipídios são produzidos por uma variedade de espécies de leveduras, muitas espécies não patogênicas como *Candida apicola*, *Starmerella bombicola*, *Candida bogoriensis*, *Pichia anomala*, *Candida stellata*, *Cândida rugosa*, *Rhodotorula bogorienses*, *Torulopsis petrophilim*, *Torulopsis grogropengieressi*, *Candida batistae*, *Candida Kuoi*, *Cândida florícola*, *Cândida tropicalis*, *Candida riodocensis* e *Candida sp. Y-27208* (LI *et al.*, 2016; MINUCELLI *et al.*, 2015).

A biossíntese de soforolipídio ocorre na fase estacionária do crescimento das leveduras quando submetidas a condições limitantes de nitrogênio e dissociada do crescimento celular. Os substratos normalmente usados na síntese dessa molécula são carboidratos e ácidos graxos, destacando a glicose e ácido oleico (RAU *et al.*, 2001). Na presença de fontes de carbono hidrofóbica a *S.bombicola* sintetiza os soforolipídios por meio de uma hidroxilação do ácido graxo presente no meio, podendo ser de várias origens: suplementado na forma de ácido graxo, n-alcanos, álcool, aldeído,

triglicerídeos ou ésteres de ácidos graxos, que serão metabolizados até seu correspondente ácido graxo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

São secretados principalmente como anel fechado moléculas lactônicas, mas também podem aparecer em um ácido aberto forma, que tem diferentes propriedades físico-químicas. Para exemplo, as formas lactônicas são mais potentes na diminuição da tensão superficial e têm propriedades antimicrobianas mais fortes do que suas contrapartes ácidas, que são mais solúveis em água (CIESIELSKA *et al.*, 2013).

Na ausência de fontes de carbono, o ácido graxo se forma através da síntese de novo, a partir da acetil-CoA. O processo de ativação dos ácidos graxos ocorre através da hidroxilação de sua porção carbono terminal (®) ou subterminal (®-1), essa hidroxilação é mediada pela enzima citocromo monoxigenase P450 pertencente à família CYP52 (CYP52M1), que é expressa exclusivamente na fase estacionária do crescimento do microrganismo, dependente do fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) ligado à membrana celular, conduzindo à formação do correspondente ácido graxo hidroxilado correspondente. Este pode ser metabolizado por P-oxidação quando a concentração de glicose for baixa e utilizada para a manutenção da célula em vez da síntese de soforolipídio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2020).

Nos próximos dois estágios, duas moléculas de glicose serão ligadas ao ácido graxo ativado. A primeira é ligada (posição C1') ao ® grupo hidroxila ou ®-1 do ácido graxo pela ação da Glicosiltransferase I (UgtA1). As reações requerem que a glicose seja ativada na forma de uridina difosfato glicose (UDP-glicose), que atua como doador de grupamentos de glicosil. No passo seguinte, uma segunda glicose é ligada glicosidicamente à primeira glicose (posição C2') pela Glucosiltransferase II (UgtA2). Ambas enzimas, UgtA1 e UgtA2, são expressas em grandes quantidades no início da fase estacionária. A glicose fornecida no meio não é diretamente incorporada na

estrutura do soforolípido e sim metabolizada pela via glicolítica, sendo que a glicose do soforolípido é formada a partir da gliconeogênese (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; LONDES *et al.*, 2020).

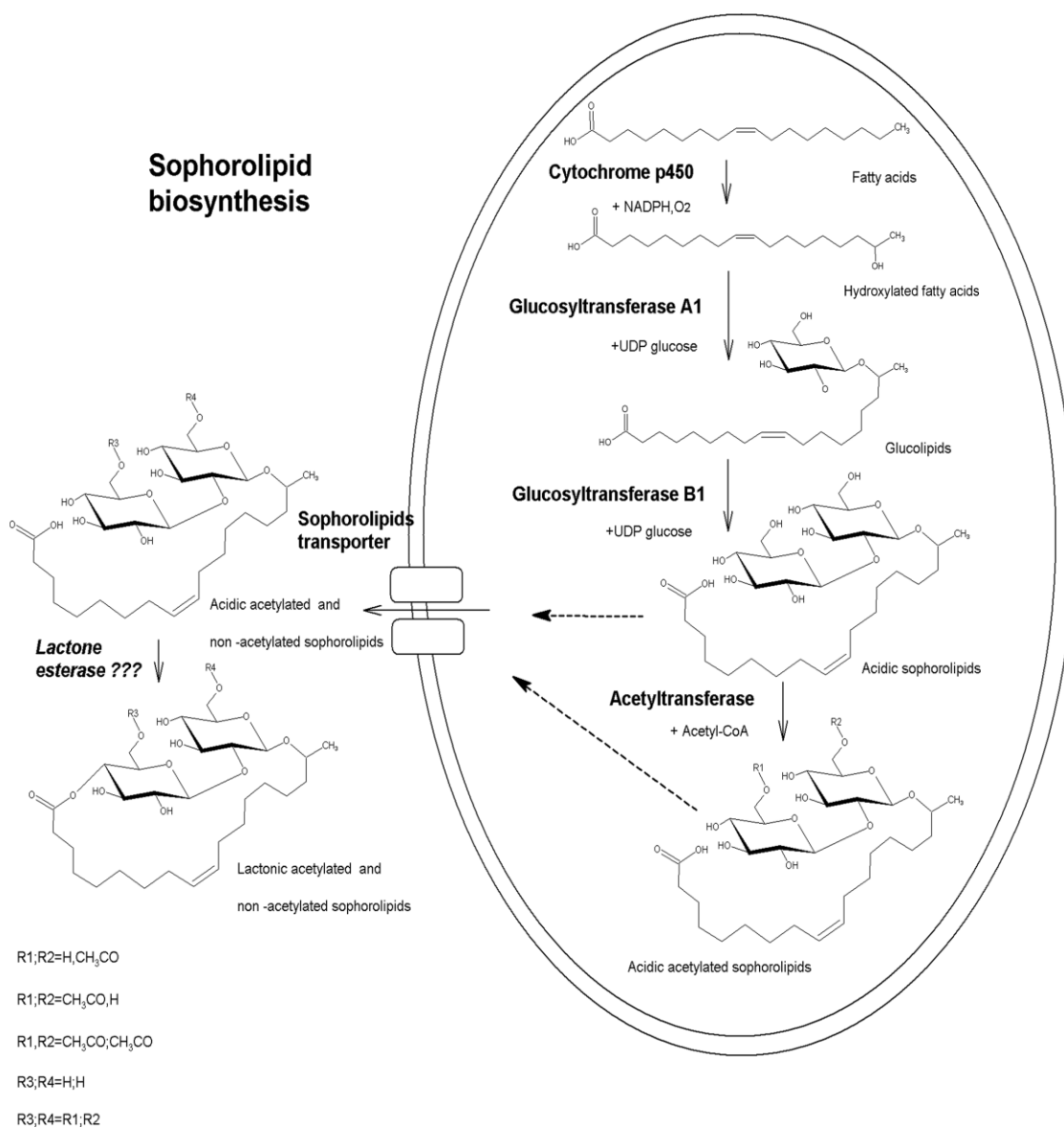
O produto da segunda reação de glicosilação é o soforolípido na sua forma ácida não acetilada, mais reações de acetilação e lactonização promovem variações estruturais. A acetilação da soforose nas posições C6 'e C6" é mediada pela ação da acetiltransferase. O processo de lactonização ocorre por meio de uma reação de esterificação entre o agrupamento carboxílico do ácido graxo e o grupo hidroxil C4 ", sendo possível ocorrer mais raramente no C6 'ou C6", e a enzima responsável pela lactonização ocorre pela ação de uma lactonesterase ligada à parede celular (figura 2). O processo de excreção do soforolípido ainda não foi completamente compreendido, sendo que pode ocorrer a partir da formação de vesículas, mediadas possivelmente por transportadores passivos ou ativos (ASMER *et al.*, 1988; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A via metabólica do soforolípido tem início pela hidroxilação dos ácidos graxos ou alcanos, pela enzima citocromo monooxigenase P450 (NADP), sendo convertidos a ácidos graxos hidroxilados. Em seguida, duas moléculas de glicose uridina difosfato ativada (UDP-glicose) são adicionadas ao grupamento hidroxila do ácido graxo pelas glicosiltransferases I e II, obtendo-se a estrutura acídica não-acetilada (VAN BOGAERT *et al.*, 2011).

Embora a biossíntese de soforolípido seja o assunto de alto interesse industrial e acadêmico, surpreendentemente, os mecanismos exatos que regulam / dirigem a biossíntese de soforolípido ainda precisam ser elucidados. O que se sabe é o fato de que a biossíntese de soforolípido é regulada positivamente por uma alta razão C/N no meio (LONDES *et al.*, 2020).

Os mecanismos moleculares exatos dessas observações permanecem desconhecidos, como também é o caso de outros biosurfactantes glicolipídios produzidos por leveduras. Como em todos os eucariotos, em leveduras / fungos muitos mecanismos regulatórios estão entrelaçados e são responsáveis pela ativação e / ou inibição da expressão gênica. (KHAN *et al.*, 2021; LONDES *et al.*, 2020).

Figura 2. Biossíntese de sofrorolipídios em *S. bombicola* (Ciesielska *et al.*, 2013)



3.8 Ação antimicrobiana dos soforolipídios

Os soforolipídios tem sido estudado quanto ao seu potencial em aplicações como antimicrobiano desde o final dos anos 1980. Um dos primeiros relatos de soforolipídios como agentes antimicrobianos foi de Lang *et al.* (1989) onde os pesquisadores testaram soforolipídios de *Torulopsis bombicola* (*S. bombicola*) em bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Streptococcus faecium* e *Propionibacterium acne* e Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* e para os fungos *Candida albicans* e *Glomerella cingulata*. Os autores demonstraram efeitos significativos na redução da viabilidade celular de bactérias Gram positivas. As formas lactônicas mono e diacetilada apresentaram MIC de 6 a 15 mg/mL para *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *S. faecium* e a forma acídica inibiu *B. subtilis*.

A ação antimicrobiana dos soforolipídios está relacionada à sua natureza anfifílica, a qual através de interações sinérgicas entre as porções da soforose e ácido graxo produz o efeito surfactante, sendo capaz de diminuir a tensão interfacial e superficial de compostos e materiais, e assim promover alterações a adesão de microrganismos (PONTES *et al.*, 2016; VALOTTEAU *et al.*, 2017).

A atividade antimicrobiana do soforolipídio é caracterizada por mudanças ou ruptura da membrana, induzindo a lise e possível vazamento do conteúdo citoplasmático das bactérias alvo, relacionado com o efeito das suas porções de açúcar e lipídios. Sendo assim, os soforolipídios, graças as suas características anfifílicas, diminuem a hidrofobicidade das membranas plasmáticas de bactérias, apresentando características bactericidas podendo induzir morte de células e biofilmes de bactérias Gram positivas e Gram-negativas (FREITAS *et al.*, 2018).

A atividade antimicrobiana tem sido objetivo de pesquisa pelo nosso grupo de pesquisa em diferentes patógenos. Fontoura *et al.* (2020)

produziram soforolipídios de *S. bombicola* utilizando gordura de frango, e aplicaram contra bactérias Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) e bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*). Os resultados revelaram que houve redução da viabilidade celular 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.

Hipólito *et al.* 2020 testaram a ação antimicrobiana dos soforolipídios contra 5 espécies de fungos contaminantes de alimentos, e os testes de microdiluição em placas de 96 poços mostraram ação contra *Fusarium 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.

Caretta *et al.* (2021) verificaram a ação dos soforolipídios contra os fitopatógenos *B. cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* que causam doenças em plantas.

Além de seus efeitos antimicrobianos, soforolipídios em combinação com outros compostos também tem sido relatado quanto a sua atividade antimicrobiana. Em 2013, Joshi-Navare *et al.* estudaram a ação sinérgica dos soforolipídios com antibióticos, relatando que a combinação com tetraciclina causou o aumento de 25% na atividade antimicrobiana para *S. aureus*, e quando combinados com cefaclor mostrou 48% de maior inibição para *E. coli*.

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™). Os resultados mostraram que, para *C. perfringens*, a concentração inibitória mínima (MIC) de soforolipídio puro foi de 0,03 mg/mL, e em combinação com ácido láctico, 0,015 mg/ mL. Para *C. jejuni*, o MIC dos 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 $\frac{1}{2}$ MIC de cada composto, representando uma interação aditiva.

Todos esses trabalhos demonstram a capacidade antimicrobiana dos soforolipídios e a ampla área de atuação, levando as buscas pela atividade antimicrobiana contra patógenos de outras áreas, como de frutas e verduras. Costa *et al.* (2021) testaram uma alternativa para aumentar o prazo de validade dos morangos onde desenvolveram filmes de amido de mandioca com soforolipídios visando a redução da contaminação microbiana e aumento de tempo de validade do morango.

Após 20 dias, nas frutas controle não revestidas foi observado 11,84% de perda de massa, enquanto que 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 que 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.

Um estudo utilizando soforolipídio foi realizado por DENGLE-PULATE *et al.* (2014) onde 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

(Na₂SO₃) e carbonato de sódio (Na₂CO₃). Foram realizados testes *in vitro* utilizando 10⁻⁴ e 10⁻⁶ UFC de diversas bactérias, com destaque nas bactérias gram-negativas *Erwinia crysanthemi* e *Xanthomonas campestris*. Na concentração de 2,5 mg/mL, houve inibição total de *E. crysanthemi*, 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 soforolipídio 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 soforolipídio foi aplicado em concentrações até 1 mg/mL.

Esses trabalhos confirmam a importância da ação dos soforolipídios na preservação de frutas e verduras, devido a sua ação antimicrobiana. Desta forma, neste trabalho foi desenvolvido uma solução sanitizante com propriedades antimicrobianas devido à incorporação de soforolipídios produzidos para aplicação em vegetais pós colheita, prolongando o tempo de prateleira e aumentando a segurança desses alimentos. O modelo aqui desenvolvido foi em morango, abobrinha, tomate-cereja e pepino por serem alimentos perecíveis e muito consumidos pela população Brasileira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizados os vegetais orgânicos: tomate cereja (*Solanum lycopersicum var. cerasiforme*), morango (*Fragaria × ananassa*), pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha menina (*Cucurbita moschata*) obtidos de supermercados locais na região de Londrina-PR.

4.2 Microrganismos

A levedura *Starmerella bombicola* (ATCC® 22214™) foi adquirida na American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA) e empregados para a produção de soforolipídios. O fungo *Botrytis cinerea* foi obtido da coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, e utilizado para os testes de atividade antifúngica. A suspensão de esporos contendo o fungo *Botrytis cinerea* foi ajustada para 1×10^6 esporos/mL utilizando uma câmara de Neubauer para contagem em um microscópio óptico com ampliação de 400x.

4.3 Meios de Cultura

Meio de preservação em g/L: glicose 10, extrato de levedura 3, peptona 5, extrato de malte 3 e ágar 20, com pH ajustado à $6,0 \pm 0,2$.

Meio de ativação em g/L: glicose 100, extrato de levedura 10 e ureia.

Meio de pré-inóculo em g/L: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e oleico.

Meio de Fermentação em g/L: 250 de glicose; 6 de extrato de levedura; 220 oleico.

4.4 Produção de soforolipídio

As fermentações foram realizadas em biorreator de bancada com o meio (g.L^{-1}): 220 de ácido oleico, 6 de extrato de levedura, e 250 de glicose. O inóculo foi preparado por cultivos em frascos Erlenmeyer de 150 mL com 50 mL do meio contendo (em g.L^{-1}): 10 de glicose, 3 de extrato de levedura, 3 de extrato de malte, 5 de peptona e 20 de ágar. Os inóculos foram padronizados em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de células, determinado em absorbância a $\lambda = 600 \text{ nm}$) correlacionando com a curva de biomassa em g.L^{-1} .

4.5 Extração e quantificação do soforolipídio

As condições foram 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 rotaevaporado (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 soforolipídio (fase metanólica) do ácido oleico residual (fase hexânica). Após a secagem completa do metanol em estufa, o material foi liofilizado (HIPÓLITO *et al.*, 2020). Esse material foi utilizado para todos os testes com os diferentes vegetais.

4.6 Avaliação do Crescimento Celular, Consumo de Substratos e produção de soforolipídios

A fermentação foi interrompida por centrifugação a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C , obtendo-se o sobrenadante (extrato livre de células) e a biomassa. A biomassa produzida foi lavada três vezes com 5 mL de acetato de etila e solubilizada em água destilada, sendo posteriormente seca em estufa a 100°C e determinado o peso seco por gravimetria (MINUCELLI *et*

al., 2017). A glicose e o ácido oleico residuais foram quantificados para a determinação do consumo desses substratos pelo microrganismo durante a fermentação. A glicose residual foi quantificada pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), a partir do sobrenadante.

4.7 Caracterização de soforolipídios

4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O soforolipídio 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).

4.7.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas para a confirmação da estrutura do soforolipídio, utilizando um espectrômetro (Avance III, Bruker, EUA) operando a 400,13 MHz para ¹H e equipado com uma sonda de detecção direta (5 mm). O solvente utilizado foi o DMSO-D₆, com sequências de pulso padrão. Os deslocamentos químicos no espectro (δ) para ¹H foram expressas em partes por milhão em relação ao tetrametilsilano.

4.8 Desenvolvimento e aplicação do sanitizante com soforolipídio

Para o desenvolvimento do sanitizante foi utilizado silicato de sódio (Na₂SiO₃) 1,5%, carbonato de sódio (Na₂CO₃) 2,5% e polietilenoglicol

(PEG) 1% como um antiespumante, para ajudar a formar um revestimento liso, permitindo evaporação sem deixar resíduo gorduroso.

As concentrações de soforolipídios utilizadas no desenvolvimento do sanitizante foram baseadas nos resultados do MIC previamente definidos por Caretta *et al.* (2021). A formulação foi desenvolvida usando as concentrações de soforolipídios 2 vezes maiores do que o MIC da concentração padrão de 2mg/mL, carbonato de sódio 1,5%, silicato de sódio 1%, PEG 1%, água destilada q.s.p. O pH da solução estava na faixa de 6, pois refere-se a melhor solubilidade dos soforolipídios em solução aquosa.

As amostras com a solução de sanitizante com soforolipídio em distintos tratamentos como morango, tomate, pepino, abobrinha na qual cada um tiveram tempos de prateleiras diferentes demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Tempo (em dias) de análise dos tratamentos com soforolipídios nos diferentes vegetais.

Vegetal	Morango	Tomate	Pepino	Abobrinha
Tempo de prateleira (Dias)	8	20	24	25
Tempo de avaliação	16	32	36	38

4.9 Contaminação com *Botrytis cinerea*

B. cinerea (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*) no controle com o fungo, tratamento com fungo + soforolipídio com 2 e 4 mg/mL na qual foi feito uma ferida e aplicado o *Botrytis cinérea* para causar as contaminações nos vegetais. Os testes foram realizados em tomate, pepino, morango e abobrinha, higienizados previamente e pulverizados com o sanitizante. Os vegetais foram feridos na casca do fruto ou do legume com uma agulha

estéril e contaminados com uma gota de 10 µL de 1×10^6 esporos de *B. cinerea* na ferida. O controle foi pulverizado com água destilada. Depois, foram secos a temperatura ambiente e acondicionados em sacos plásticos, em geladeira por 40 dias.

Os frutos e vegetais foram tratados com solução de soforolipídios a 2 e 4 mg/mL com 5 borrifadas até estar totalmente umedecido por completo. Após a aplicação dos sanitizante os vegetais foram armazenados em sacos plásticos estéreis e mantidos sob refrigeração a 5°C. Os vegetais foram analisados no total de 40 dias, na qual alguns vieram degradar-se em um menor tempo de prateleira. Foram utilizadas três amostras de vegetais utilizadas para cada tratamento, o controle com o fungo foi realizado com água destilada, tratamento com fungo + soforolipídio com 2 e 4 mg/mL e o controle com soforolipídio na concentração com 2 e 4 mg/mL.

Após a aplicação dos sanitizante os vegetais foram armazenados em sacos plásticos estéreis e mantidos sob refrigeração a 5°C. Os vegetais foram analisados por 40 dias. O grau de infecção por *B. cinerea* nos vegetais foi estimado medindo o diâmetro e a profundidade da zona macerada, devido à colonização fúngica dos tecidos 3 dias após a inoculação.

Os índices de severidade da doença e da eficácia dos soforolipídios foram calculados usando a fórmula de GAO *et al.* (2018).

Onde o índice de gravidade da doença foi classificado em uma escala de 0 a 100%: 0 - sem sintomas; 1 - 0,1% a 5%; 2 - 5,1% a 20%; 3 - 20,1% para 40%; 4 - 40,1% a 100%. A gravidade da doença foi calculada usando:

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

onde o SD: Severidade da doença, FD: número de vegetais doentes, GD: índice de gravidade da doença, FA: número de vegetais avaliadas.

Percentual de eficácia do soforolipídio

$$\% \text{ de Eficácia} = (C - T)/Cx100$$

na qual o C: SD do controle, T: SD dos tratamentos.

4.10 Análise Estatística

A análise estatística descritiva foi realizada através do software STATISTICA For Windows Versão 10.0 (Statsoft, 2010), na qual os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância em triplicata e as médias comparadas pelos testes anova e de Tukey ao nível de 5% de significância.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1Produção de soforolipídio

Os resultados da fermentação, acompanhados pela produção de soforolipídio, biomassa e consumo de substratos estão apresentados na Figura 3. A biomassa aumentou com o tempo de fermentação e atingiu um máximo de 49,68 g.L⁻¹. O consumo de glicose e a biossíntese de soforolipídio foi intensificada a partir 4º dia, o que é justificado pelo biossurfactante ser um metabólito secundário. A produção de soforolipídio aumentou proporcionalmente ao tempo de fermentação, com um máximo de 53,16 g/L em 360 horas.

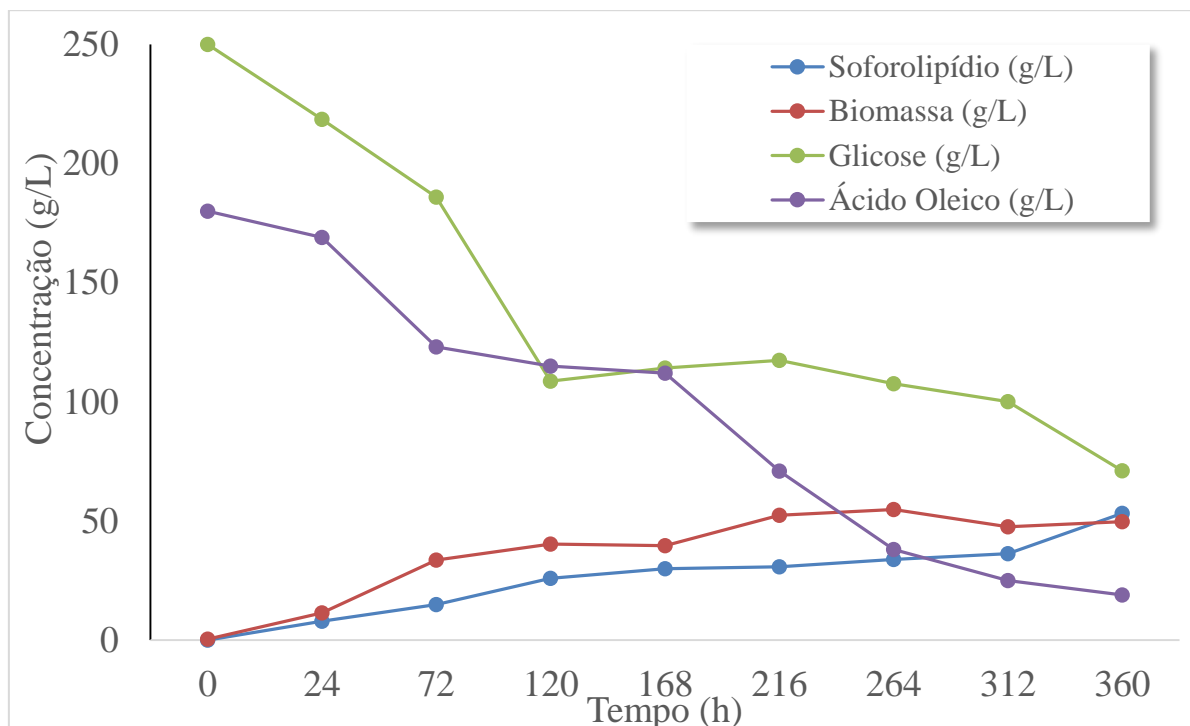
Neste trabalho a fermentação foram consumidos 161 g.L⁻¹ de ácido oleico, enquanto a glicose foi usada quase inteiramente (178,88 g.L⁻¹). Segundo Felse *et al.* (2005), os ácidos graxos com cadeias C16 e C18 são importantes na produção de soforolipídios sendo incorporados diretamente na porção de ácido hidroxila do glicolipídio. De acordo com Bajaj *et al.* (2012), usualmente, a ureia e o extrato de levedura são as fontes de nitrogênio preferíveis na produção de soforolipídios.

Autores do nosso grupo de pesquisa tem produzido soforolipídios em diferentes condições de fermentação e tem produções variadas com as condições testadas. Fontoura et al. (2020) produziram em g/L: glicose (77.5), extrato de levedura (2.5), gordura de frango (75) e obtiveram 27,86g/L.

Hipólito *et al.* (2020) usaram meio com (g/L): glicose (77.5) extrato de levedura (2.5), ácido oleico (75) obtiveram 67 g/L. Silveira *et al.* (2019) produziram 69,83 g/L de soforolipídios usando meio glicose (77.5) extrato de levedura (2.5), ácido oleico (75) e Caretta *et al.* (2021) obtiveram 111,25 g/L de soforolipídio aumentando o tempo de fermentação em biorreator usando 150 glicose, 219,5 ácido oleico e 2,5 extrato de levedura, por um período de 12 dias. Desta forma, observa-se que os valores de produção variam com as condições e processo envolvidos.

De acordo, com os dados obtidos anteriormente pelo no nosso grupo de pesquisa, neste trabalho foi usado glicose e ácido oleico para produção de soforolipídios. Segundo os trabalhos Silveira *et al.*, 2016 2019 e; CARRETA *et al.*, 2021) são reconhecidos como antimicrobianos potentes.

Figura 3. Parâmetros cinéticos da produção de soforolipídios por *S. bombicola* em meio de fermentação com glicose (250 g/L) e ácido oleico (220 g/L).

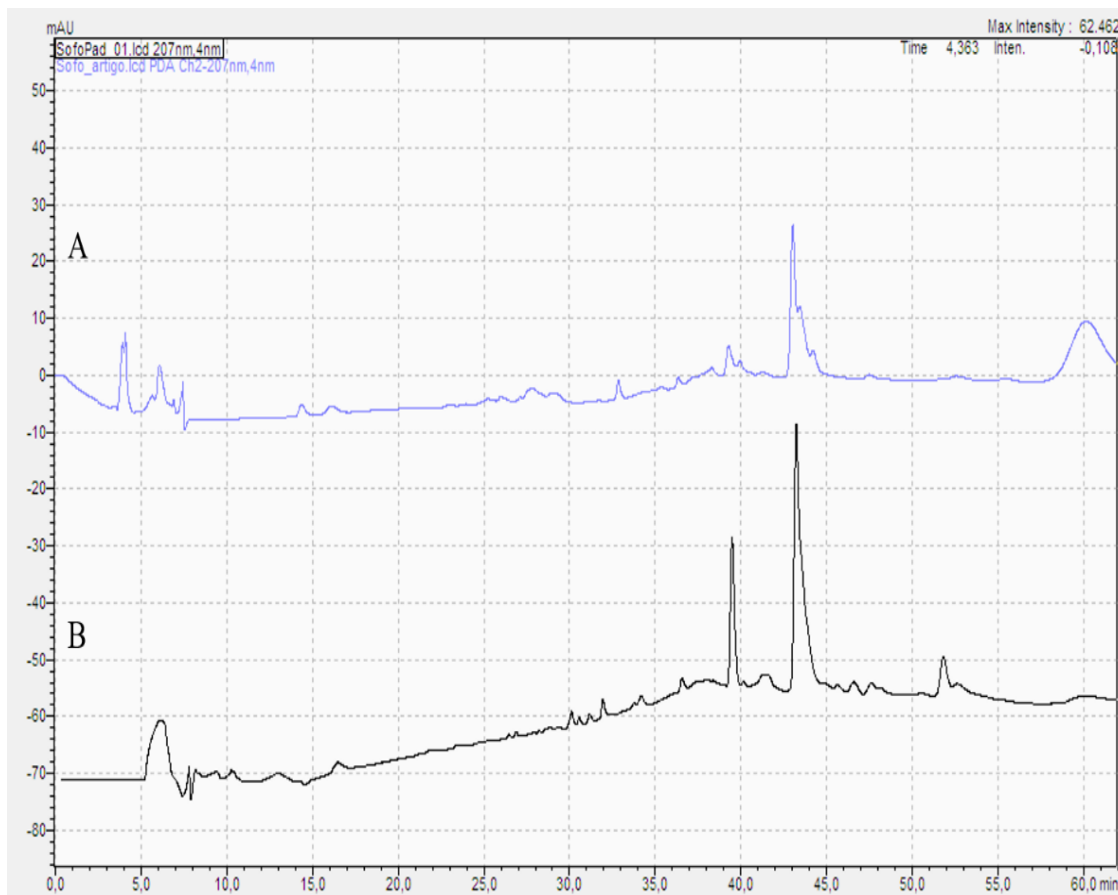


5.2 Caracterização dos soforolipídios

5.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise de HPLC mostrou que o perfil de soforolipídios produzidos, em comparação com o padrão soforolipídio 10.400-soforolactona 60,60-diacetato, foi principalmente lactônico diacetilado C18:1, com tempo de retenção de 43,20 min (Fig. 4). Segundo os trabalhos de Silveira *et al.*, 2016, 2019 e; CARRETA *et al.*, 2021, corroboram que os soforolipídios lactônicos são agentes antimicrobianos potentes.

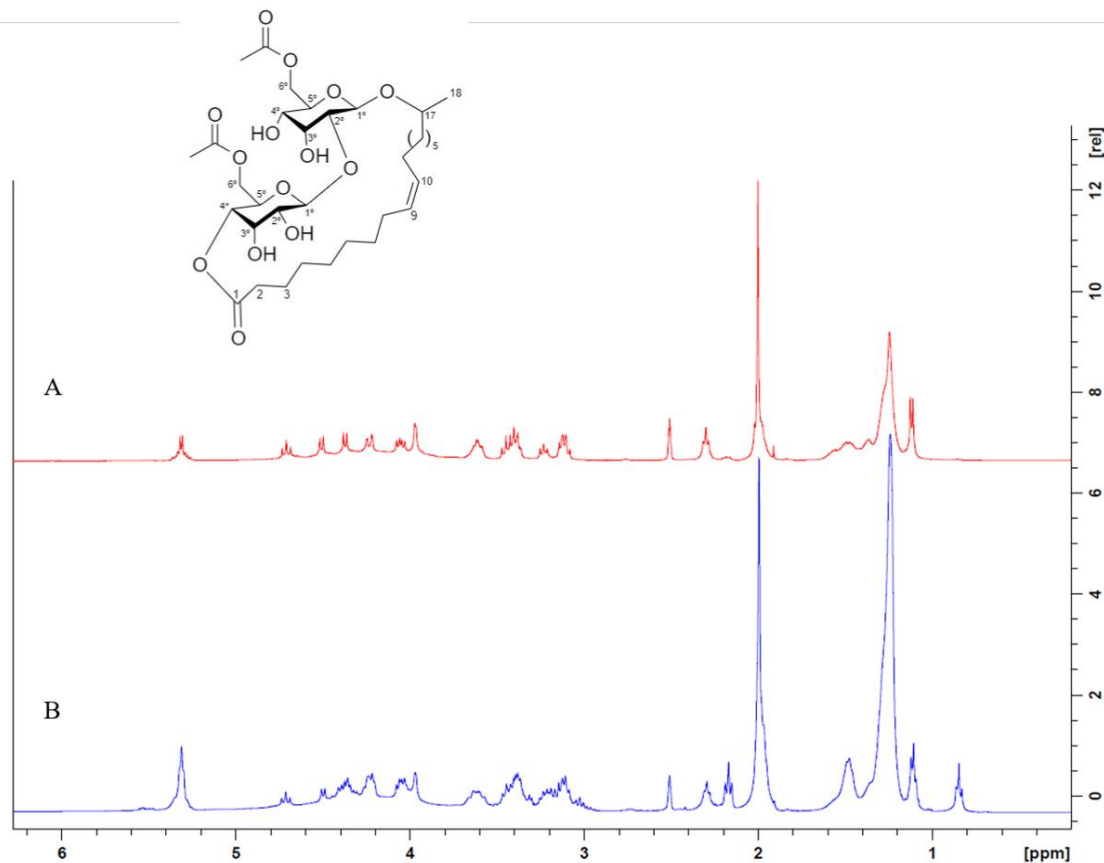
Figura 4. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de sofrorolipídios produzidos por *Starmerella bombicola* (A); padrão 10,40 0-soforolactona 60.600-diacetato (B).



5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ^1H NMR (Fig. 5) mostraram sinais em 4,52 e 4,48 ppm atribuído aos prótons anoméricos na porção da sofrorse e seus hidrogênios carbinólicos entre 3,0 e 4,0 ppm. Os sinais dos hidrogênios oleofílicos apareceram na característica região de 5,18 ppm. Os picos entre 1,6 e 1,0 ppm foram atribuídas aos hidrogênios dos grupos saturados da alifática cadeia, com metileno na posição α . As metilas do acetil grupos foram confirmados pelos sinais a 1,91 ppm e a carbonila da lactona foi identificada a 2,20 ppm.

Figura 5. Ressonância magnética nuclear do padrão de sofrorolipídio 10.400-soforolactona 60.600-diacetato (A); e dos sofrorolipídios produzidos por *Starmerella bombicola* (B).



5.3 Efeito do sanitizante no tomate

Os tomates foram inoculados com $10 \mu\text{L } 1 \times 10^6$ esporos/mL de *Botrytis cinérea* e tratados com os sanitizantes nas concentrações de 2 e 4 mg/mL de sofrorolipídios. Ferreira *et al.* (2004) relatam que o manuseio da colheita determina maior ou menor resistência do fruto, capacidade de completar a maturação, aparência e qualidade, também fatores como os patógenos e ambiente influenciam largamente o desenvolvimento de doenças pós-colheita.

Por ser um fruto climatérico, a taxa de respiração do tomate se eleva no início do amadurecimento, resultando uma série de transformações físico-químicas (KLUGE *et al.*, 1997) caracterizadas por alterações fisiológicas e

bioquímicas no fruto tais como: degradação do amido; produção de glicose e frutose; diminuição da clorofila; síntese dos pigmentos b-caroteno e allicopeno; aumento na síntese de etileno; aumento de pectinas solúveis e, conseqüentemente, amolecimento das paredes celulares (FACHIN, 2003).

Os testes com aplicação do sanitizante foram realizados para verificar o potencial de ação dos soforolipídios em tomate contaminados com *B. cinerea*. As análises foram realizadas durante 32 dias. Os resultados obtidos mostraram que a infecção por *B.cinerea* foi capaz de danificar o tomate induzindo lesão que resultou em 100% da severidade nos frutos controles com fungo (Tabela 4). De acordo com Pereira (2015), no tomate, o sintoma característico denominado "Ghost spot", que é caracterizado por pequenas lesões necróticas, geralmente rodeado por um halo brilhante, tornando o fruto não comercializável. No teste preventivo, todos os tratamentos com fungo + soforolipídio na concentração 2, 4 mg/mL, soforolipídio 2 e 4 mg/mL apresentaram diferença significativa em relação ao controle, sendo o controle com o sanitizante mais eficaz com a concentrações de 4 mg/mL contra as lesões necróticas.

Nossos resultados mostraram que o tratamento dos tomates com a solução sanitizante reduziu significativamente a incidência de doenças após a inoculação com *B. cinerea* em até 20 dias após o tratamento, sendo observado o aparecimento de contaminação com *B. cinerea* após 14 dias no controle, sendo realizado o acompanhamento durante 32 dias (Figura 6). O tomate cultivado no sistema convencional leva 14 dias e o do sistema orgânico, 15 dias para atingir o estágio de maturação total (Ferreira *et al.*, 2004), bem compatíveis com os 15 dias de vida-de-prateleira encontrados por KLUGE *et al.* (1997) em tomates *cv. Santa Clara* colhidos no estágio verde maduro e submetidos ao armazenamento em temperatura de 25°C.

Os frutos de tomate inoculados com *B. cinerea* e tratados com o sanitizante mostrou-se bastante promissor elevando o tempo de vida de

prateleira. Em temperatura ambiente, a vida-de-prateleira do tomate é variada, dependendo do grau de maturação, cultivo, manejo pós-colheita e embalagem (Ferreira *et al.*, 2004). O tomate orgânico atinge o estágio vermelho maduro em um dia os frutos do sistema convencional levaram três dias para mudar de estágio, confirmando a tendência de cultivares mutantes apresentarem lenta alteração da coloração durante o amadurecimento (MUTSCCHLER *et al.*, 1992; MOURA *et al.*, 2002), o tomate orgânico demorou sete dias para atingir o estágio passado, enquanto que o tomate cultivado no sistema convencional atingiu esse estágio de maturação em quatro dias (FERREIRA *et al.*, 2004).

Porém, se espera uma conservação de poucos dias, uma vez que às altas temperaturas que são expostas favorecem a rápida deterioração (Ferreira *et al.*, 2004; SIGRIST *et al.*, 2002). Nesse trabalho a concentração de sanitizante a 4 mg/mL de soforolipídios demonstrou melhor resultado até o 20º dia em comparação com os outros tratamentos, na qual foi capaz de atrasar o crescimento de *B. cinerea* (tabela 3).

Constatou-se que o controle do tratamento com soforolipídio com a concentração 4 mg/mL exerceu maior influência sobre o índice de doença causada por *B. cinerea* do que sem o sanitizante. Quanto ao fator tratamento, verificou-se que a aplicação com o sanitizante resultou em proteção eficiente do tomate contra o patógeno, tendo em vista que o índice de doença não diferiu estatisticamente dos respectivos controles com sanitizante, o índice de doença com o fungo foi significativamente maior nos controles aplicados com o tratamento com fungo. Contudo, os tomates tratados com sanitizante apresentaram valores médios de índice de doença significativamente menores do que tomate com a inoculação com *B. cinerea*.

De acordo com Sanino *et al.* 2002, demonstra que tomates cv. 'Débora' colhidos no ponto de colheita comercial e armazenados em ambiente refrigerado tiveram vida útil de 9 dias quando em temperatura

ambiente e de 17 dias quando armazenados em temperatura controlada (12°C e UR de 90%), apresentando em ótimo estado para consumo in natura.

Segundo Barreto *et al.*, 2016; Guerra *et al.*, (2015) e (2016), a concentração de quitosana de 4 mg/mL sendo o mínimo para formar uma solução espessa capaz de formar biofilmes, permitindo a adição de óleos essenciais de limão e orégano aos frutos do tomate, onde o crescimento foi completamente inibido quando foi utilizada uma concentração de quitosana de 4 mg/mL e 8 mg/mL.

Olanya *et al.* (2018), o efeito germicida de diferentes concentrações de soforolipídios em tomates (pós-colheita) contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* também foi testado, revelando que, a uma concentração de 5 mg/mL, uma significativa redução no crescimento bacteriano em tomate foi observada, demonstrando sua capacidade sanitizantes.

Segundo Lahkar *et al.* (2015), avaliações em distintas concentrações de ramnolipídios em tomateiros contra o fungo *Alternaria solani* corroborou que a concentração mínima de 1,5 e 4 mg/mL inibindo completamente o desenvolvimento do fungo.

Estes resultados mostraram que o soforolipídio pode inibir a germinação e o crescimento do esporo de *B. cinerea* e prolongando a vida útil em prateleiras. Além disso, os frutos inoculados com *B. cinerea* apresentou infecção 14 dias após o tratamento com sanitizante, respectivamente (Fig. 6), o número de esporos e a área da lesão começou a apresentar significativamente em resposta ao pré-tratamento com sanitizante após inoculação de *B. cinerea* tomate cereja.

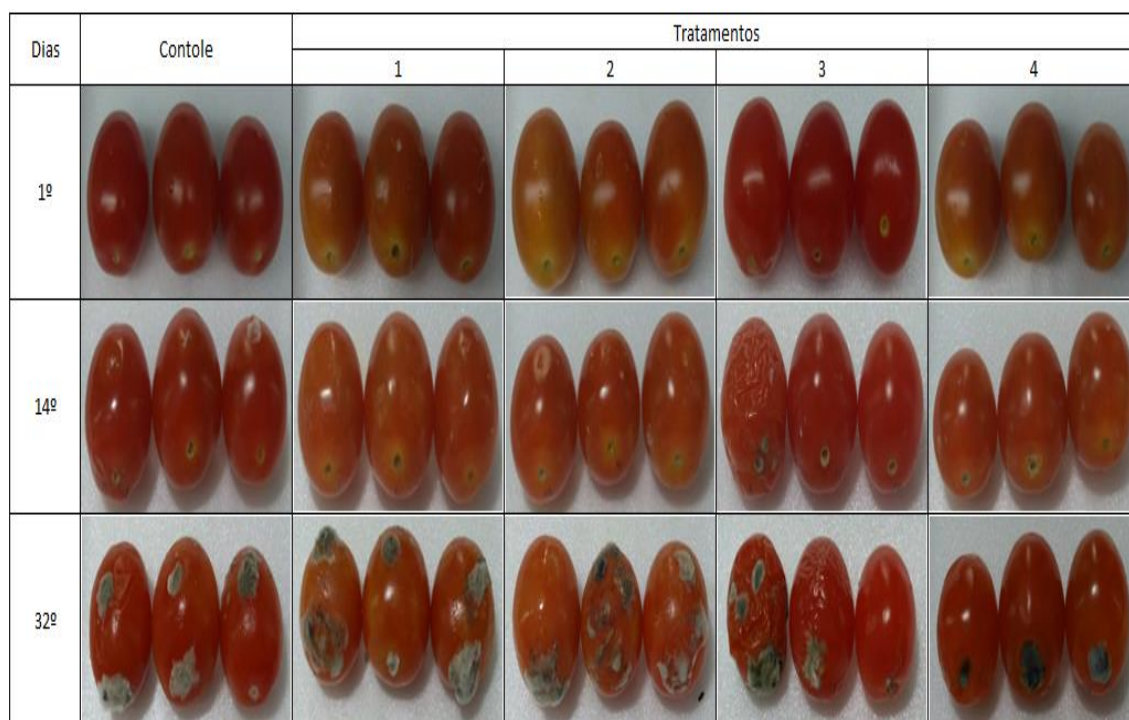
Os resultados são mostrados na Tabela 3, Soforolipídios inibidos o crescimento de *B. cinerea* em concentrações de 2 e 4 mg/mL dentro de 32 dias no experimento.

Tabela 3. Porcentagem da severidade e eficácia da solução sanitizante contendo soforolipídios no tomate.

Soforolipídios (mg/mL)	Severidade (%)	Eficácia (%)
0 (Controle fungo)	75 a	0 a
1 (Trat. fungo + Soforolipídio 2 mg/mL)	50.0 b	33.0 b
2 (Trat. fungo + Soforolipídio 4 mg/mL)	50.0 b	33.33 b
3 (Soforolipídio 2 mg/mL)	25.0 c	66.67 c
4 (Soforolipídio 4 mg/mL)	33.0 d	55.56 d

As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 6. Atividade de soforolipídios em concentrações de 2 e 4 mg.mL⁻¹ em tomate infectado e não infectado com *Botrytis cinerea* durante 32 dias de armazenamento em comparação com ao controle.



5.4 Efeito do sanitizante no morango

De acordo com Doving *et al.* (2005), a firmeza é uma característica importante do morango, porém altamente variável conforme a genética,

condições de crescimento e constituição da fruta no momento do teste (grau de amadurecimento, tamanho, manuseio pós-colheita, temperatura interna, entre outros), a estrutura frágil do morango devida a sua alta taxa metabólica durante o armazenamento, torna-o mais suscetível a danos nos tecidos e infecções causadas por fungos fitopatogênicos, bactérias e vírus. *Botrytis cinerea*, principal patógeno do morango, porém outros patógenos também atacam esse fruto, tais como o *Rhizopus stolonifera*, *Mucor ssp.*, *Colletotrichum spp.* e *Penicillium spp.* (GALVÃO *et al.* 2017).

Os frutos do morango foram inoculados com 1×10^6 esporos/mL do fungo *B. cinérea*. O efeito antimicrobiano do soforolipídio para o controle sobre *B. cinerea* inoculado nos morangos foi testado duas concentrações distintas de soforolipídios (2 e 4 mg/mL). A infecção foi observada 5 dias após inoculação apenas no controle com o fungo, onde a esporulação com o fungo se deu em todas as amostras após 8º dia, na qual foram analisados durante 16 dias até a sua degradação total.

Os morangos não tratados apresentaram um crescimento evidente de fungos após 5 dias em suas condições naturais (Fig. 7). A área de podridão em morangos tratados com *B. cinerea* foi avaliada onde a severidade e a eficácia foi calculada (Tabela 4). Os resultados mostram que o controle com o soforolipídio na concentração 4 mg/mL (Tabela 4) apresentando uma eficácia.

Os morangos foram armazenados durante 16 dias em condições sob refrigeração, após o 5º dia o controle com o fungo apresentou esporulação, onde os tratamentos com fungo + soforolipídio (2 e 4 mg/mL) e controle com soforolipídio (2 e 4 mg/mL) não apresentou danos visíveis e foram analisados para avaliação de seus parâmetros de qualidade e os resultados gerais são apresentados na (Fig. 7).

Para determinar o efeito do soforolipídio no crescimento de *B. cinerea*, foi testado a taxa de germinação de esporos em duas condições

diferentes, que são a disseminação do fungo e o amadurecimento do fruto. Os resultados mostraram que o sanitizante inibiu o crescimento de fungos, e o máximo de inibição do crescimento de esporos foi de até 16 dias. O tratamento com sanitizante com a concentração de 4 mg/mL demonstrou ser mais eficaz contra as concentrações tratamento fungo + soforolipídio 2, 4 mg/mL e soforolipídio 2 mg/mL em 16 dias pós tratamento contendo soforolipídio inibindo significativamente *B. cinérea* crescimento em comparação com o controle (Fig. 7).

Os morangos são altamente suscetíveis a perder peso, principalmente devido a uma rápida perda de água, o que produz danos ao fruto na qual demonstra enfraquecimento do tecido e encolhimento da fruta. Segundo Posé *et al.*, 2011, a textura é um dos parâmetros de qualidade de frutas frescas e o morango é caracterizado pela perda rápida da sua firmeza em poucos dias após o amadurecimento. Nesse processo, ocorre a despolimerização gradual das glucanas da matriz nas paredes das células e a dissolução da lamela média das células do parênquima cortical.

A rigidez diminui à medida que o morango amadurece levando ao amolecimento da fruta e após o tempo de armazenamento observou-se que firmeza exibe uma leve diminuição. Os valores dos morangos (medição de vermelhidão) geralmente diminuem com o tempo, perdendo a fruta sua cor vermelha saturada. Segundo PICHA, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2012; FELIZIANI *et al.*, 2016, o morango é altamente perecível e tem uma vida pós-colheita muito limitada devido às altas taxas metabólicas, a fragilidade do tecido, a suscetibilidade a danos mecânicos, a perda de água e a deterioração por fungos.

Segundo Amaral (2019), a incidência e a severidade da podridão em morangos das cvs. *San Andreas* e *Benicia* podem ser avaliadas a partir do surgimento dos sintomas, com 48 e 72 h após a inoculação do fungo, no entanto não diferiu significativamente das frutas não tratadas (controle).

Segundo Amaral (2019), o conteúdo químico da fruta e sua epiderme também podem influenciar o primeiro passo do processo de infecção, além disso, o teor de compostos voláteis, fenólicos e ácidos orgânicos na epiderme da fruta altera substancialmente à medida que se aproxima da maturidade (GARCIA-BENITEZ *et al.* (2017).

Camili *et al.* (2007) estudaram o crescimento micelial de *B. cinerea* em cachos de uva e verificaram inibição do fungo nas concentrações de quitosana de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0% durante o período de incubação de cinco dias a 22°C.

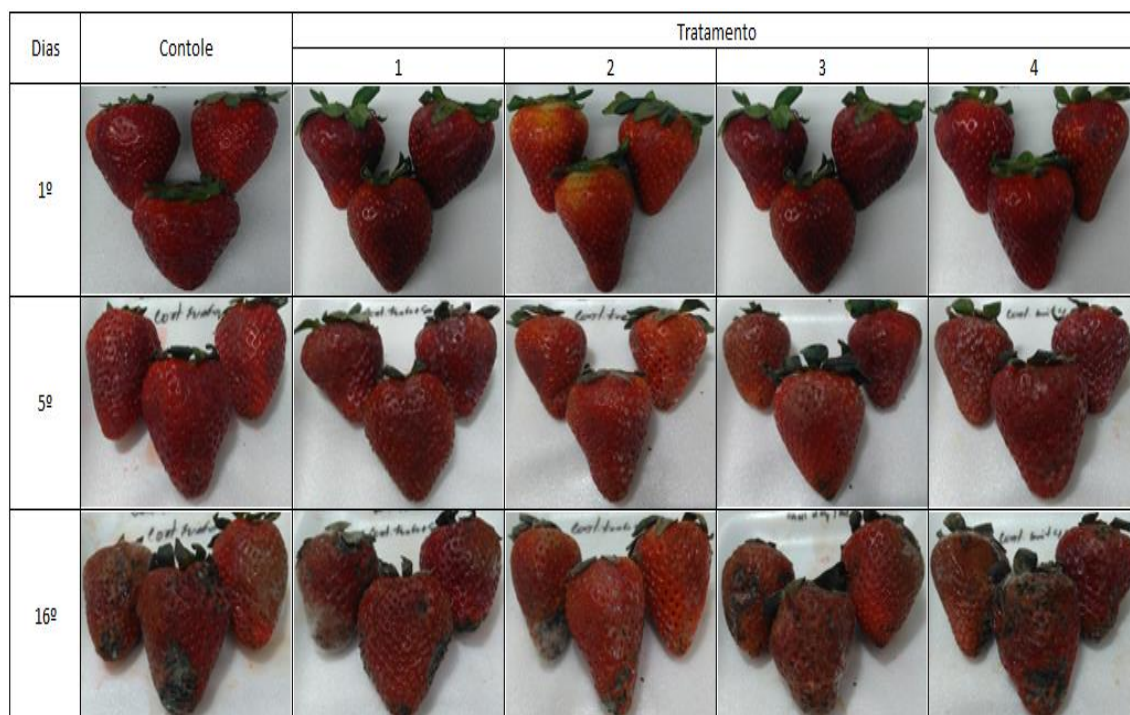
Segundo Betiol *et al.* (2008) que utilizaram um sanitizante contra os patógenos *B. cinerea* o *Trichoderma harzianum*, um produto é comercializado com o nome de Trichodex 25 WP pela empresa Proficol S.A., recomendado para o controle de *B. cinerea* em diversas culturas, aplicando uma concentração alvitrada do produto é de 0,2% e as aplicações foram cometidas por pulverizações na parte aérea das plantas.

Tabela 4. Porcentagem da severidade x eficácia do soforolipídio no morango.

Soforolipídios (mg/mL)	Severidade (%)	Eficácia (%)
0 (Controle fungo)	83.33 a	0 a
1 (Trat. fungo + Soforolipídio 2 mg/mL)	58.33 b	30.0 b
2 (Trat. fungo + Soforolipídio 4 mg/mL)	41.67 c	50.0 c
3 (Soforolipídio 2 mg/mL)	41.67 c	50.0 c
4 (Soforolipídio 4 mg/mL)	16.67 d	80.0 d

As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 7. Atividade de soforolipídios em concentrações de 2 e 4 mg.mL⁻¹ em morango infectado com *Botrytis cinerea* durante 16 dias de armazenamento em comparação com ao controle.



5.5 Efeito do sanitizante no pepino

Segundo Mermelstein (1999), as indústrias têm respondido ao desenvolvimento de tecnologia em processamentos mínimos que atinjam uma redução biológica significativa, que aumentem o tempo de prateleira do produto, e ainda mantenham as características delicadas de um produto fresco.

Após 11 dias após a inoculação com a suspensão de conídios de *B. cinerea*, os pepinos na qual foi aplicado o controle com o fungo começou a apresentar uma leve cor marrom-cinza e observou-se que o fungo invadiu o tecido e causou lesões necróticas, todavia, os pepinos onde foram aplicados o sanitizante contendo soforolipídios não apresentaram nenhuma variabilidade de esporulação do fungo (Figura 8).

Todos os pepinos inoculados com a suspensão de conídios apresentaram sintomas de podridão cinza-escura no 25º dia, além de esporulação abundante do fungo e apenas o pepino do grupo controle com soforolipídio na concentração de 2 mg/mL permaneceu livre da doença até o 24º dia.

As colônias de *B. cinerea* exibiam um pequeno crescimento micelial concêntrico, de consistência aveludada e cor branca (Figura 9). Após 25 dias, todos os pepinos dos controles e tratamentos apresentaram o micélio acinzentado. Os isolados mais antigos formaram um grande número de escleródios pretos de formato irregular, ramificados epicamente e com aglomerados de conídios (Figura 8).

Com base na escala de danos utilizada, foram determinados os percentuais de infecção da doença nos vegetais inoculadas e o percentual de eficácia dos tratamentos (Tabela 5). O tratamento dos pepinos inoculados apresentou 100% de infecção após 36 dias de análise, entretanto, o tratamento com o sanitizante com a concentração de 2 mg/mL demonstrou ser uma eficácia melhor comparados aos outros tratamentos, onde o controle com soforolipídio na concentração de 2 mg/mL demonstrou uma menor degradabilidade e uma melhor eficácia nos dias analisados (Tabela 5 e fig. 8).

Lundgren *et al.*, (2016), a necessidade de prolongar o tempo de vida de prateleira de um produto fresco, Carvalho *et al.*, (2013) em condições adequadas de resfriamento do pepino. Segundo Henriques (2012), o pepino é um fruto com alto percentual de umidade (cerca de 97% de água) sendo assim, Carvalho *et al.*, (2013), susceptível a sofrer perda de água, bem como a danos causados pelo estrago do resfriamento.

El Ghaouth *et al.* (1991); Camili *et al.* (2007), mostraram que os pepinos tratados com 1,0 e 1,5 % de quitosana apresentaram menor perda de massa quando armazenados a 13 ou 20 °C.

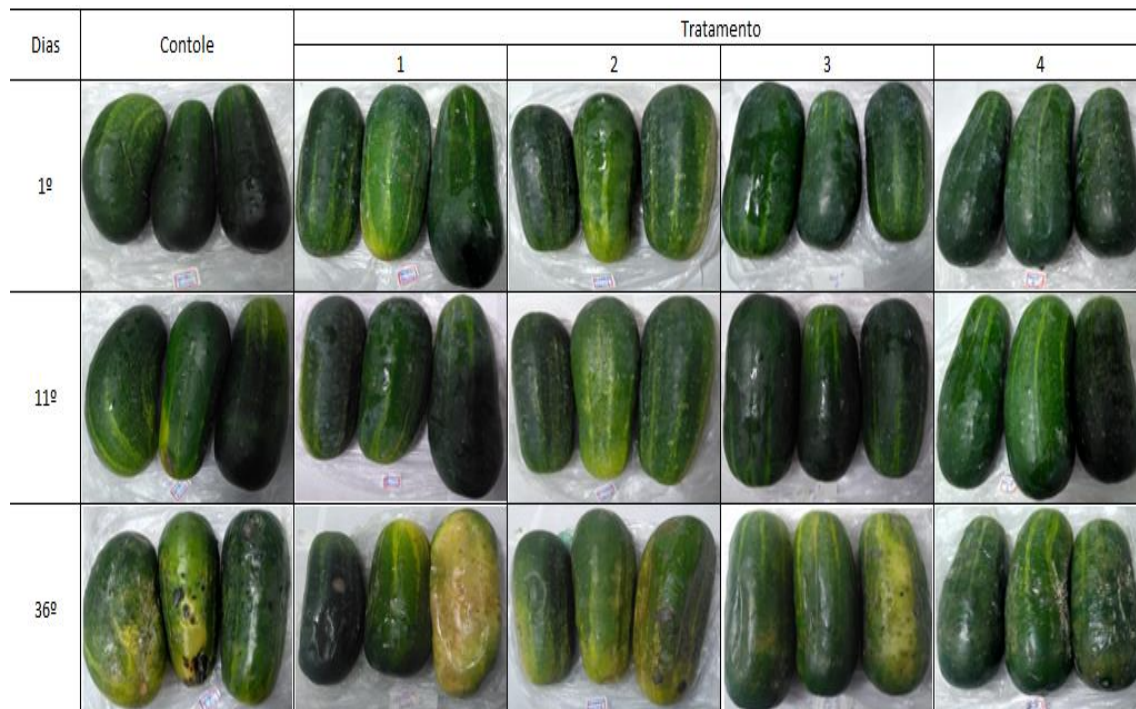
Dengle-Pulate *et al.* (2014), a empregabilidade de biossurfactante como uma solução sanitizante em uma concentração de 0,25 mg/mL, na qual os resultados demonstraram que o tratamento foi eficaz na prevenção da deterioração de chikoos (sapoti), tomates, pepinos e limões.

Tabela 5. Porcentagem da severidade x eficácia do soforolipídio no pepino.

Soforolipídios (mg/mL)	Severidade (%)	Eficácia (%)
0 (Controle fungo)	75.0 a	0 a
1 (Trat. fungo + Soforolipídio 2 mg/mL)	50.0 b	33.0 b
2 (Trat. fungo + Soforolipídio 4 mg/mL)	83.0 a	0 a
3 (Soforolipídio 2 mg/mL)	8.33 c	88.89 c
4 (Soforolipídio 4 mg/mL)	25.0 d	66.67 d

As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 8. Atividade de soforolipídios em concentrações de 2 e 4 mg.mL⁻¹ em pepino infectado com *B. cinerea* durante 36 dias de armazenamento em comparação com ao controle.



5.6 Efeito do sanitizante em abobrinha

Conforme Boas *et al.* (2006), os produtos minimamente processados são altamente perecíveis devido à exposição de seus tecidos internos, causado pelo descascamento e corte, Lundgren *et al.* (2016), durante o processamento podem apresentar alterações na composição química, produção de metabólitos secundários, perda de massa fresca, aumento no metabolismo e contaminação por microrganismos.

As abobrinhas foram inoculadas e tratadas e as infecções foram observadas 10 dias após inoculação. Após 10 dias, as abobrinhas com o tratamento fungo + soforolipídio 2 mg/mL apresentaram uma leve cor marrom-cinza e observou-se que o fungo invadiu o tecido e causou lesões necróticas. As abobrinhas com controle com fungo, tratamento fungo + soforolipídio 4 mg/mL e os controles com soforolipídio 2 e 4 mg/mL não

apresentaram nenhuma variabilidade de esporulação do fungo permanecendo livres da doença (Figura 9).

O controle com o fungo na abobrinha apresentou um crescimento evidente de fungos após 26 dias em suas condições naturais, até o 25º dia as abobrinhas do controle sofreram por podridão cinza-escura na concentração de 2 e 4 mg/mL não apresentaram nenhuma infecção do fungo. Por outro lado, todas as abobrinhas inoculadas com a suspensão de conídios apresentaram sintomas de podridão cinza-escura após 26 dias, além de esporulação abundante do fungo.

A área de podridão em abobrinha tratadas com *B. cinerea* foi avaliada e a área infectada total foi calculada e plotada sobre a severidade e a sua eficácia na tabela 6. A abobrinha com a aplicação do sanitizante com sofranolipídio na concentração 2 e 4 mg/mL demonstraram uma eficiência melhor em relação as outras aplicações, onde a atividade respiratória em maior grau devido a injúria causada, ficando o vegetal na tentativa de se manter vivo (Tabela 6 e Fig. 9).

Chitarra & Chitarra, (1990), observou que em temperatura de 12°C, a abóbora menina brasileira apresentou o máximo de 11 dias de vida útil de prateleira, enquanto que a mini paulista foi de 7 dias. Conforme a caracterização realizada nos frutos de abóbora, acondicionados em embalagens de bandeja e sacola plástica durante o armazenamento, o fruto ficou impróprio para o consumo, após os 12 dias para menina brasileira e 8 dias para mini paulista, submetidas a temperatura 12°C.

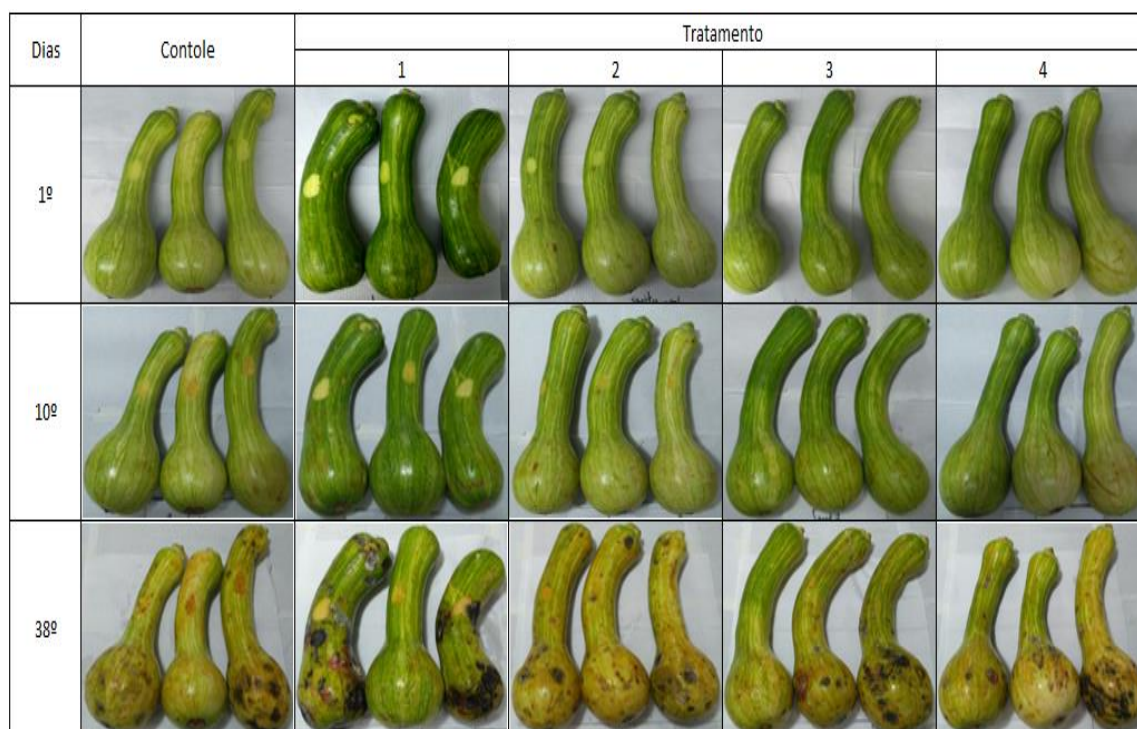
Lahkar *et al.* (2017), testou ramnolipídios em cultivo de pimenta para controlar a doença da antracnose, como resultado do fungo *Colletotrichum capsici*, determinou que a concentração de 0,5 e 4 mg/mL demonstrou-se suficiente para reduzir a gravidade da doença de 67,5% a 12,5%, onde o efeito germicida dos sofranolipídios foi aplicado em diferentes vegetais.

Tabela 6. Porcentagem da severidade x eficácia do soforolipídio na abobrinha.

Soforolipídios (mg/mL)	Severidade (%)	Eficácia (%)
0 (Controle fungo)	75.0 c	0 c
1 (Trat. fungo + Soforolipídio 2 mg/mL)	75.0 a, c	0 a, c
2 (Trat. fungo + Soforolipídio 4 mg/mL)	66.67 b, c	11,11 b, c
3 (Soforolipídio 2 mg/mL)	8.33 b	88.89 b
4 (Soforolipídio 4 mg/mL)	8.33 c	88.89 c

As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 9. Atividade do sanitizante com soforolipídios a 2 e 4 mg/mL em pepino infectado com *B. cinerea* durante 38 dias de armazenamento em comparação com ao controle.



6 CONCLUSÕES

A produção de soforolipídios em biorreator atingiu $53,16 \text{ g.L}^{-1}$ em 360 horas de fermentação e análises estruturais demonstraram a predominância de a forma lactônica C18:1 diacetilado.

Os resultados demonstraram que a solução sanitizante de soforolipídios mostrou atividade antimicrobiana contra o fungo *B. cinerea*. A eficácia de proteção da solução sanitizante contra o mofo cinzento causado pelo fungo *B. cinerea* foi de 66,67% no tomate-cereja, 80% no morango, 88,89% no pepino e 88,89% na abobrinha. Além disso, o tratamento com o sanitizante nos vegetais previamente infectados com *B. cinerea* resultou em um melhor tempo prateleira dos alimentos.

Os soforolipídios demonstraram ser um promissor sanitizante natural, sustentável contra o fitopatógeno *B. cinerea*, podendo ser uma alternativa aos pesticidas convencionais contra tomate, morango, pepino, abobrinha durante a colheita e no processo de pós-colheita.

7. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G. K.; KUBO, A.; RAKWAL, R.; SAJI, H.; TAMOGAMI, S.; YONEKURA, M. **Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v.40, n.12, p. 1061-1069, 2002.

ALMEIDA, J. S. G.; CAGNIN, R. F. **A indústria do futuro no brasil e no mundo.**

https://iedi.org.br/media/site/artigos/20190311_industria_do_futuro_no_brasil_e_no_mundo.pdf

AMARAL, D. D. **Podridão por *Lasiodiplodia theobromae* em morango: epidemiologia e manejo alternativo.** 2019.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. **Adesão e formação de biofilmes microbianos.** In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.

ASMER, H.; LANG, S.; WAGNER, F. *et al.* **Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids.** *J Am Oil Chem. Soc.* **65**, 1460-1466 (1988). <https://doi.org/10.1007/BF02898308>

BAJAJ, V. *et al.* **Enhanced production of bioactive sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by design of experiment approach with successive purification and characterization.** *J. Oleo Sci.* **61**, 377–386 (2012)

BANAT, I. **Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation.** Bioresource Technology, 51 (1), 1-12.

BARRETO, T. *et al.* **A Chitosan Coating Containing Essential Oil from *Origanum vulgare* L. to Control Postharvest Mold Infections and Keep the Quality of Cherry Tomato Fruit.** Frontiers in Microbiology, 7: 1724. (2016).

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. **Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Coiletotricum museo* em banana.** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 25, n. 5, p. 555-557, Set./Out. 2004.

BERNARDI, A. O. *et al.* **Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry.** LWT, v. 97, p. 25-30, 2018.

BERNARDI, A. O. *et al.* **Sensitivity of food spoilage fungi to a smoke generator sanitizer.** International journal of food microbiology, v. 289, p. 72-76, 2019.

BERNAT, M.; SEGARRA, J.; XU, X. M.; CASALS, C.; USALL, J. **Influence of temperature on decay, mycelium development and sporodochia production caused by *Monilinia fructicola* and *M. laxa* on stone fruits.** Food Microbiology, London, v. 64, p. 112-118, 2017.

BETTIOL, W. *et al.* **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes.** Embrapa Meio Ambiente-Circular Técnica (INFOTECA-E), 1998.

BETTIOL, W. *et al.* **Controle biológico de doenças de plantas na América Latina.** Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE), 2008.

BETTIOL, W. *et al.* **Produtos comerciais à base de *Trichoderma*.** *Trichoderma*, p. 445, 2019.

BRAIDA, João Alfredo *et al.* **Resíduos vegetais na superfície e carbono orgânico do solo e suas relações com a densidade máxima obtida no ensaio Proctor.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p. 605-614, 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 14 de 28 de fevereiro de 2007. **Aprova o Regulamento 326 Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 329 DF, 05 mar. 2007. < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de orientações técnicas para elaboração de propostas para o programa de resíduos sólidos – FUNASA.** Brasília: Funasa, 2014.

CAMILI, E. C. *et al.* **Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinerea*.** *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.33, n.3, p. 215-221, 2007.

CARETTA, T. DE O., SILVEIRA, VAI, ANDRADE, G., MACEDO, F., & CELLIGOI. **Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021.

CARVALHO, A.D.F., AMARO, G.B., LOPES, J.F., VILELA, N.J., FILHO, M.M., ANDRADE, R. **A cultura do pepino.** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Circular Técnica, v. 113, p. 1-18, 2013.

CAVALCANTI, L.S., RESENDE, M.L.V. *et al.* **Ativadores de resistência disponíveis comercialmente.** In. II Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas. Lavras, UFLA. p. 82-97, 2004.

CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada; CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **PIB do agronegócio.** 2021.

CHAOUACHI, M. *et al.* **Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*.** Postharvest Biology and Technology, v. 172, p. 111389, 2021.

CHITARRA MIF; CHITARRA AB. 1990. **Pós-colheita de Frutos e Hortaliças.** Lavras: UFLA. 320p.

CIESIELSKA, K. *et al.* **SILAC-based proteome analysis of *Starmerella bombicola* sophorolipid production.** Journal of Proteome Research, v. 12, n. 10, p. 4376–4392, 2013.

D'AMBROSIO, J. M. *et al.* **The sesquiterpene botrydial from *Botrytis cinerea* induces phosphatidic acid production in tomato cell suspensions.** *Planta*, v. 247, n. 4, p. 1001–1009, 2018.

DA FONTOURA, I. C. C. *et al.* **Antibacterial activity of sophorolipids from *Candida bombicola* against human pathogens.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 63, p. 1–10, 2020.

DAGNAS, S.; MEMBRÉ, J. M. **Predicting and preventing mold spoilage of food products.** *J. Food Prot.* 76, 538-551.

DE OLIVEIRA, M. R. *et al.* **Biosynthesis and Production Of Sophorolipids.** *International Journal of Scientific & Technology Research*, v. 3, n. 11, p. 133-143, 2014.

DEAN, R., VAN KAN, J.A.L., PRETORIUS, Z.A., HAMMOND-KOSACK, K.E., DI PIETRO, A., SPANU, P.D., *et al.* **The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology.** *Mol Plant Pathol* 13: 414–430 (2012).

DENGLE-PULATE V. *et al.* **Application of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol as a germicide and fruit-vegetable wash.** *J Pharm Pharm Sci* 3:1630–1643 (2014).

DHINGRA, O. D. *et al.* **Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery.** *Fitopatologia brasileira*, v. 29, n. 6, p. 683-686, 2004.

DIOTTI, Raffaella; ESPOSITO, Michelle; SHEN, Chang Hui. **Telomeric and Sub-Telomeric Structure and Implications in Fungal Opportunistic Pathogens.** *Microorganisms*, v. 9, n. 7, p. 1405, 2021.

DISKIN, S.; FEYGENBERG, O.; MAURER, D.; DROBY, D.; PRUSKY, D.; ALKAN, N. **Microbiome alterations are correlated with occurrence of postharvest stem-end rot in mango fruit.** *Phytobiomes*, Saint Paul, v. 1, n. 3, p. 117-127, 2017.

EL GHAOUTH, A. *et al.* **Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries.** *Journal of Food Science*, Chicago, v. 56, n. 6, p. 1618-1620, 1991.

ELAD, Y., PERTOT, I., PRADO, A.M.C., AND STEWART, A. (2016) **Plant hosts of Botrytis spp. In Botrytis–The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems:** Cham: Springer, pp. 413–486.

FACHIN, D. **Temperature and pressure inactivation of tomato pectinases: a kinetic study.** 2003. 133 p. Proefschrift (Doctoraats in de Toegepaste Biologische Wetenschappen door). Katholieke Universiteit Leuven.

FAO. **Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention.** Rome. 2011

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2019.** Safeguarding against economic slowdowns and downturns. Rome, FAO. 2019

FAZLARA, A.; EKHTELAT, M. **The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens.** American-Eurasian. Journal of Agricultural & Environmental Sciences, v. 12, p. 23-29, 2012.

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

FELSE, A. P. *et al.* **Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues.** Enzyme Microb. Technol. 40, 316–332 (2007) 19. Deshpande, M., Daniels, L.: Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. Bioresour. Technol. 54, 143–150 (1995).

FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, R. J. S., LAZZARI, E. N. (2004). **Padrão de identidade e qualidade do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de mesa.** Ciência Rural, 34(1), 329-335. 10.1590/S0103-84782004000100054

FREITAS, C. A. U. Q.; SILVEIRA, V. A. I.; BORSATO, D.; BIZ, G.; PEDRÃO, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C. **Sophorolipids by the *Starmerella bombicola* as sanitizer in carcass washing by aspersion and immersion in slaughtering and poultry processing.** Research, Society and Development, [S. l.], v. 10, n. 8, p. e13110815210, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i8.15210.

GALVÃO, A.G; RESENDE, L.V.; MALUF, W.R.; RESENDE, J.T.V.; FERRAZ, A.K.L.; MARODIN, J.C. **Breeding new improved clones for**

strawberry production in Brazil. Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá, v. 39, n. 2, p. 149-155, 2017.

GARCIA-BENITEZ, C.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. **Fruit maturity and post-harvest environmental conditions influence the pre-penetration stages of *Monilinia* infections in peaches.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 241, p. 117-122, 2017.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 4^a ed., Editora Manole, Barueri-SP, 2011, 1034p.

GOUGOULLI, M.; KALANTZI, K.; BELETSIOTIS, E.; & KOUTSOUMANIS, K.P. **Development and application of predictive models for fungal growth as improve to quality control in yogurt production.** Food Microbiology, 28, 1453-1462.

GUERRA, I. *et al.* **Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit.** International Journal of Food Microbiology, 214: 168–178. (2015).

GUERRA, I. *et al.* **The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha* (*piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella.** Innovative Food Science & Emerging Technologies, 34(February): 112–121. (2016).

GUPTA, R.,; PRABHUNE, A. A. **Structural determination and chemical esterification of the sophorolipids produced by *Candida bombicola***

grown on glucose and α -linolenic acid. *Biotechnology letters*, v. 34, n. 4, p. 701-707, 2012.

GURGEL, L.M.S.; OLIVEIRA, S.M.A.; COÊLHO, R.S.B. **Resistência induzida contra a murcha de fusário do tomateiro com indutores abióticos.** *Summa Phytopathologica*, v. 31, p. 158-164, 2005.

HENRIQUES, F. S. S. C. **Efeito da secagem sobre as propriedades das cucurbitáceas.** 2012. Tese de Doutorado. Instituto Politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária.

HIPÓLITO, A. *et al.* **Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 29, n. September, p. 101797, 2020.

HIPÓLITO, A., CARETTA, T. DE 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*, 29(10), 3199–3209. doi:10.1007/s10924-021-02103-8

KHAN, FAZLURRAHMAN *et al.* **Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds.** *Biofouling*, v. 37, n. 6, p. 626-655, 2021.

KLUGE, R. A.; MINAMI, K. **Efeito de esters de sacarose no armazenamento de tomates Santa Clara.** *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 54. n. 1-2, p. 39-44, jan./ago. 1997.

KLUGE, R. A.; RODRIGUES, D. S.; MINAMI, K. **Aquecimento intermitente de tomates: efeito sobre injúrias pelo frio.** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 16, n. 1, p. 4-6, maio, 1998.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P. *et al.* **Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing.** Volume 115, 15 de novembro de 2016, páginas 93-10015 de novembro de 2016 , páginas 93-100.

KAUR, K., SANGWAN, S., KAUR, H. **Biosurfactant production by yeasts isolated from hydrocarbon polluted environments,** Environmental monitoring and assessmentv. 189, n. 12, p. 603, 2017.

LAHKAR J. *et al.* **Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: the causal organismo of early blight of tomato.** BioControl 60:401–411 (2015).

LAHKAR J. *et al.* **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).

LE MOS, O.L.; REBOUÇAS, T.N.H.; JOSÉ, A.R.S.; VILA, M.T.R.; SILVA, K.S.; SILVA, D.S.; BARRETO, A.P.P.; BOMFIM, M.P. **Conservação do pimentão “magali” em duas condições de armazenamento associada à atmosfera modificada.** Magistra, Cruz das Almas - BA, v. 20, n. 1, p. 06-15, jan./mar, 2008.

LI, J. *et al.* **Identification and characterization of a long-chain fatty acid transporter in the sophorolipid-producing strain *Starmerella bombicola*.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, n. 16, p. 7137–7150, 2016.

LI, ZHENBIAO; CAO, ZIDAN; CHEN, Yi; JIANG, SHU, SHAO, XINGFENG; WEI, YINGYING. **The Jasmonic Acid Signaling Pathway is Associated with Terpinen-4-ol-Induced Disease Resistance against *Botrytis cinerea* in Strawberry Fruit.** J. Agric. Food Chem. 2021, 69, 10678–10687.

LI, Y. *et al.* **Sophorolipid Production Using Lignocellulosic Biomass by Co-culture of Several Recombinant Strains of *Starmerella bombicola* with Different Heterologous Cellulase Genes from *Penicillium oxalicum*.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020.

LIU, J. *et al.* **Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit.** Postharvest Biology and Technology, v. 44, n. 3, p. 300-306, 2007.

LIU Z. *et al.* (2019) **Efficient sophorolipids production via a novel in situ separation technology by *Starmerella bombicola*.** Process Biochem 81(2018):1–10.

LIU, J. *et al.* **Identification and characterization of a protein Bro1 essential for sophorolipids synthesis in *Starmerella bombicola*.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 47, n. 4–5, p. 437–448, 2020.

LODENS, S. *et al.* **Unraveling and resolving inefficient glucolipid biosurfactants production through quantitative multiomics analyses of *Starmerella bombicola* strains.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 117, n. 2, p. 453–465, 2020.

LUNDGREN, W. J. C. *et al.* **ANÁLISE VISUAL DE ABOBRINHA MINIMAMENTE PROCESSADA EM ATMOSFERA MODIFICADA ATIVA, UMA APLICAÇÃO GEOESTATÍSTICA.** *Revista Agroecossistemas*, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2016.

MA, XIAOJING *et al.* **Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 104, n. 1, p. 77-100, 2020.

MERCIER, S.; VILLENEUVE, S.; MONDOR, M.; UYSAL, I. **Time–Temperature Management along the food cold chain: a review of recent developments.**

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v.16, n.4, p.647–667, 2017.

MERMELSTEIN, N. H. **Annual meeting papers address minimal processing.** *Food Technology*, v. 53, n. 9, p. 118-122, 1999.

MINUCELLI, T. *et al.* **Produção de sofrorolipídios de *cândida bombicola* atcc 22214 em substratos industriais de baixo custo e aplicação em biorremediação.** 2015.

MINUCELLI, T; RIBEIRO-VIANA, RM; BORSATO, D; ANDRADE, G; CELY, MVT; DE OLIVEIRA, MR; BALDO, C; CELLIGOI, MAPC. **Soforolipids production of *Candida bombicola* ATCC 22214 on low-cost industrial substrates and application in bioremediation** Valorização de Resíduos e Biomassa, v. 8, n. 3, p. 743–753, 2017. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-380>

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. **Mycotoxins: An underhand food problem.** Mycotoxigenic fungi, p. 3-12, 2017.

MOTA, W.F.; SALOMÃO, L.C.C; PEREIRA, M.C.T.P; CECON, P.R. **Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticabas.** Revista Brasileira de Fruticultura, v.24, n.1, 2002.

MOURA, M. L.; MOURA, M. A.; PINTO, C. M. F.; FINGER, F. L. **Amadurecimento de frutos do tomateiro cv. Santa Clara e de seu mutante natural firme.** Revista Brasileira do Armazenamento, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 03-08, 2002.

MUTSCHLER, M. A.; WOLFE, D. W.; COBB, E, D.; YOURSTONE, K. **S. Tomato fruit quality and shelf life in hybrids heterozygous for the alc ripening mutant.** HortScience, Alexandria, v. 27, n. 4, p. 352-355, 1992.

NELSON, N. **A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose.** Journal of Biological Chemistry, v. 153, p. 375–80, 1944.

NÚÑEZ-RIOS, T. *et al.* **Etiología y control de la necrosis de flores y pudrición de frutos de pepino en Morelos, México.** Revista Chapingo. Serie horticultura, v. 19, n. 2, p. 255-255, 2013.

OLANYA, O.M. *et al.* **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).

OLIVA M, H. E.; KUMAR V.; GALSURKER O.; SISIM-LEVI A.; OVADIA R *et al.*, **Increased phenylalanine levels ins plant leaves reduces susceptibility to *Botrytis cinerea*.** Plant Sci 290:110289 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110289>.

PAIVA, E.; LIMA, M.S.; PAIXÃO, J.A. **Pectina: propriedade químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação.** Revista Iberoamericana de Polímero, 2009.

PAULINO, BN; PESSÔA, MG; MANO, MCR; MOLINA, G; NERINUMA, IA; PASTORE, GM. **Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, n. 24, p. 10265–10293, 2016.

PASINI, C; D'AQUILA, F; CURIR, P; GULLINO ML. 1997. **Effectiveness of anti|ungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa var. rosae*) in glasshouses.** Crop Protection 16: 251-256.

PICHA, D. **Guide to post harvest care of strawberries in moldova.** Washington: USAID, 2006. 23 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage, third. ed.** Springer, New York, 2009.

PONTES, C., ALVES, M., SANTOS, C., RIBEIRO, M. H., GONÇALVES, L., BETTENCOURT, A. F. & RIBEIRO, I. A. C. (2016). **Can**

Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes?
International Journal of Pharmaceutics, 513 (1–2), 697–708.

POSÉ, S.; GARCÍA-GAGO, J. A.; SANTIAGO-DOMÉNECH, N.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.; MERCADO, J. **Strawberry fruit softening: role of cell wall disassembly and its manipulation in transgenic plants.** Genes, Genomes and Genomics, Rockville, v. 5, p. 40–48, 2011.

RAPPUSSI, M. C. C. *et al.* **Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest 'Valencia' oranges.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52, n. 3, p. 513–521, 2009.

RAU, U.; HAMMEM, S.; HECKMANN, R.; WRAY, V.; LANG, S. **Soforolipids: a source for new compounds.** Industrial Crops and Products, v. 13, n. 2, p. 85–92, 2001.

RIBES, SUSANA *et al.* **Use of oil-in-water emulsions to control fungal deterioration of strawberry jams.** Food chemistry, v. 211, p. 92–99, 2016.

RIBES, SUSANA *et al.* **Combination of different antifungal agents in oil-in-water emulsions to control strawberry jam spoilage.** Food Chemistry, v. 239, n. 1, p. 704–711, 2018.

RIBEIRO, I. A. *et al.* **Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS methods for identification and characterization of sophorolipids.** Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 899, p. 72–80, 2012.

RIGHINI, H.; DI FOGGIA, M.; FRANCIOSO, O.; QUINTANA, A. M.; ROBERTI, R. **Assessing the Potential of the Terrestrial Cyanobacterium *Anabaena minutissima* for Controlling *Botrytis cinerea* on Tomato Fruits.** *Horticulturae* 2021, 7, 210. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7080210>

RISTOW, L. P. *et al.* **Fatores relacionados à saúde ocupacional de agricultores expostos a agrotóxicos.** *Saúde e Sociedade*, v. 29, p. e180984, 2020.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* **Agro-wastes and Inert Materials as Supports for the Production of Biosurfactants by Solid-state Fermentation.** *Waste and Biomass Valorization*, n. 0123456789, 2020.

SAMARAS, A., HADJIPETROU, C., & KARAOGLANIDIS, G. (2020). ***Bacillus amyloliquefaciens* strain QST713 may contribute to the management of SDHIs resistance in *Botrytis cinerea*.** *Pest Management Science*. doi: 10.1002/ps.6145. Volume 77, Edição 3. Março de 2021, Páginas 1316-1327

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C.; HOEKSTRA, E. S. **Introduction to Food and Airborne Fungi.** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2004.

SANINO, A.; CORTEZ, L.A.B.; MEDEROS, B.T. **Vida de prateleira do tomate (*Lycopersicum esculentum*), variedade "Débora", submetido a diferentes condições de resfriamento.** *Encontro de Energia no Meio Rural*, 2002.

SIGRIST, J.M.M. **Estudos Fisiológicos e Tecnológicos de Couve-Flor e Rúcula minimamente processadas.** 2002.112f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Área de concentração em Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, SP. 2002.

SHAH, M. U. H. *et al.* **Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 127, p. 60–67, 2017.

SILVEIRA, V. A. I. *et al.* **Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, p. 101287, 2019.

SOMOGYI, M. **A New Reagent for Determination of Sugars.** *A new Sugar Reagent*, p. 61–68, 1945.

STAMELOU, M.-L.; SPERDOULI, I.; PYRRI, I.; ADAMAKIS, I.-D.S.; MOUSTAKAS, M. **HORMETIC. Responses of Photosystem II in Tomato to *Botrytis cinerea*.** *Plants* 2021, 10, 521.
<https://doi.org/10.3390/plants10030521>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TEIXEIRA, I.; GARCIA, L. A. F. **Fatores determinantes da demanda de produtos orgânicos no município de Cascavel–PR.** *Revista Ciências Sociais em Perspectiva*, v. 12, n. 23, 2013.

SÁNCHEZ, M.T.; HABA, M. J. D. L.; BENÍTEZ-LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ-NOVALES, J.; GARRIDO-VARO, A; PÉREZ-MARÍN, D. **Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data.** Journal of Food Engineering, Essex, v. 110, n. 1, p. 102-108, 2012.

SARDELLA, D; GATT, R.; VALDRAMIDIS, V. P. **Modelling the growth of pear postharvest fungal isolates at different temperatures.** Food Microbiology, London, v. 76, p. 450-456, 2018.

SILVEIRA, V. A. I. *et al.* **Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 21, p. 101287, 2019.

STROE, M. C. *et al.* **Targeted induction of a silent fungal gene cluster encoding the bacteria-specific germination inhibitor fumigermin.** Elife, v. 9, p. e52541, 2020.

VALOTTEAU, C., BANAT, I. M., MITCHELL, C. A., LYNDON, H., MARCHANT, R., BABONNEAU, F., PRADIER, C. M., BACCILE, N. & HUMBLLOT, V. (2017). **Antibacterial properties of sophorolipid - modified gold surfaces against Gram positive and Gram-negative pathogens.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 157, 325 – 334.

VAN RENTERGHEM, L. *et al.* **From lab to market: An integrated bioprocess design approach for new-to-nature biosurfactants produced**

by *Starmerella bombicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 115, n. 5, p. 1195–1206, 2018.

VINCENZI, D.; DE JESUS MENDES, L.; MOTA, V. M. **ADITIVOS COMO CONSERVANTES QUÍMICOS**. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 7, n. 9, p. 821-849, 2021.

ZAHID, M.; ABBASI, M. K.; HAMMED, S.; & RAHIM, N. **Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalyan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutriente contentes of maize (*Zea mays L.*)**. *Frontiers in microbiology* 2015.

WADEKAR, S. D.; KALE, S. B.; LALI, A. M.; BHOWIMICK, D. N.; PRATAP, A. P. **Jatropha oil and karanja oil as carbon sources for production of sophorolipids**. *European jornal of Lipids Science and Technology*, v.114, n. 7, p. 823-832, 2012.

ZAIN, M. E. **Impact of mycotoxins on humans and animals**. *Journal of Saudi chemical society*, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

XIN, Y., MA, B., ZENG, Q., HE, W., QIN, M., & HE, N. (2021). **Dynamic changes in transposable element and gene methylation in mulberry (*Morus notabilis*) in response to *Botrytis cinerea***. *Horticulture Research*, 8(1). doi:10.1038/s41438-021-00588-x

8.Anexo 1.

FORMULÁRIO DE DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

O Formulário de Declaração de Invenção (FDI) deve ser usado por professores, funcionários e alunos da UEL e pelas empresas da Intuel/Aintec para declarar a criação de uma invenção e solicitar sua propriedade intelectual.

Após o preenchimento do FDI, protocole na UEL (na SAUEL) endereçando-o para:

AINTEC/UEL

Escritório de Propriedade Intelectual – EPI

Com isto sua Declaração de Invenção fica oficialmente registrada e será enviada ao Escritório de Propriedade Intelectual (EPI) da Aintec para análise, parecer e outras providências.

Os inventores devem ler a resolução nº 251/2003 que regulamenta sobre a participação de docentes, servidores e alunos no resultado financeiro da exploração dos direitos de propriedade intelectual, no endereço www.aintec.uel.br/aintec/legislação.

Havendo dúvidas no preenchimento da FDI contate o EPI da Aintec pelo e-mail: aintecsec@uel.br

1. INFORMAÇÃO PESSOAL
Nome para contato: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
Empresa/Instituição: Universidade Estadual de Londrina
Centro: Centro de Ciências Exatas – CCE
Departamento: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Tel: (43) 999957993 e-mail: macelligoi@uel.br
2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO: "Desenvolvimento de solução sanitizante para vegetais com soforolipídios de <i>starmerella bombicola</i> "
3. A INVENÇÃO APRESENTA NOVIDADE*? (X) SIM () NÃO <p>A novidade desta invenção é a produção de uma solução sanitizante natural para vegetais. O sanitizante possui propriedades antimicrobianas devido à incorporação de soforolipídios produzidos por <i>S. bombicola</i>, podendo assim ser aplicado em vegetais após a colheita prolongando o tempo de prateleira e aumentando a segurança desses alimentos. Essa novidade é de fácil aplicação com resultados inovadores e sustentáveis. O modelo aqui desenvolvido foi em morangos, abobrinha, tomate-cereja e pepino por serem alimentos facilmente perecíveis e muito consumidos pela população Brasileira.</p>
4. A INVENÇÃO APRESENTA ATIVIDADE INVENTIVA*? (X) SIM () NÃO <p>Soluções sanitizantes à base de substâncias naturais já são descritas na literatura, porém a atividade inventiva desta proposta é a utilização de soforolipídios com ação antimicrobiana contra o fungo <i>Botrytis cinerea</i>. <i>B. cinerea</i> é um fungo necrófilo que afeta muitas plantas e frutas macias causando enormes prejuízos econômicos. Desta forma, a incorporação de soforolipídios à solução sanitizante poderá ser direcionada para aplicação em vegetais perecíveis, como morangos, pepino, tomate-cereja e abobrinha, proporcionando um aumento de tempo de prateleira e segurança alimentar, por serem moléculas reconhecidas como seguras que não trazem danos à saúde, como os agrotóxicos atualmente disponíveis no mercado. Os soforolipídios possuem propriedades químicas e biológicas únicas, tornando-o moléculas relevantes para aplicação no combate de diversas doenças em muitos setores. Nessa vertente, uma das principais propriedades investigadas atualmente é a respeito das suas atividades antimicrobianas, haja vista a importância e necessidade da descoberta de possíveis substituintes de antibióticos e sanitizantes convencionais por compostos naturais e biodegradáveis, como os soforolipídios, em razão da preocupação do consumidor com o uso de antimicrobianos sintéticos, afim de melhorar a segurança alimentar.</p>

5. A INVENÇÃO APRESENTA APLICAÇÃO INDUSTRIAL*? (x) SIM () NÃO

A proposta apresentada possui potencial de aplicação industrial no setor alimentício, especificamente a cadeia produtiva agroindustrial do tomate-cereja, abobrinha, pepino e morango. Esses legumes são muito perecíveis e apresentam altas taxas metabólicas que limitam seu prazo de validade, gerando rápida deterioração e perdas no pós-colheita. Apesar de serem armazenados sob baixas temperaturas, é recomendado que outras técnicas sejam associadas para reduzir a contaminação microbiana, prolongar a vida útil e preservar seus atributos de qualidade. Assim, a solução sanitizante desenvolvida nessa patente, pode contribuir de forma eficaz na preservação e qualidade de frutas e legumes, sendo associado ao armazenamento refrigerado.

6. RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta o desenvolvimento de uma nova formulação sanitizante com ação antimicrobiana usando soforolipídios de *Starmerella*. Os soforolipídios foram produzidos por fermentação usando a levedura *S. bombicola* em meio de fermentação contendo ácido oleico, glicose e extrato de levedura. A formulação sanitizante foi desenvolvida usando soforolipídios nas concentrações de 2 mg.mL⁻¹ e 4 mg.mL⁻¹, carbonato de sódio (1,5%), silicato de sódio (1%) e PEG polietilenoglicol 1%, água destilada q.s.p. A eficácia do sanitizante em tecidos vegetais de tomate, morango, pepino e abobrinha foi avaliada através da aspersão do sanitizante antes e após a contaminação dos vegetais com o fungo *B. cinerea*. Os resultados demonstraram que a solução sanitizante de soforolipídios mostrou atividade antimicrobiana contra o fungo *B. cinerea*. A eficácia de proteção da solução sanitizante contra o mofo cinzento causado pelo fungo *B. cinerea* foi de 66,67% no tomate-cereja, 80% no morango, 88,89% no pepino e 88,89% na abobrinha. Além disso, o tratamento com o sanitizante nos vegetais previamente infectados com *B. cinerea* resultou em um melhor tempo prateleira dos alimentos. Assim, este produto pode ser promissor no segmento da indústria de alimentos para o controle natural de fitopatógenos, sendo uma alternativa aos pesticidas convencionais do tomate-cereja, morango, pepino, abobrinha.

7. DESCREVA O PROBLEMA OU DESAFIO TÉCNICO QUE A INVENÇÃO SE PROPÕE A SOLUCIONAR.

A população mundial está mudando seus hábitos alimentares e o aumento da aquisição de legumes e verduras higienizados e prontos para o consumo, ou minimamente processados é uma realidade cada vez mais presente. Isto se dá, em função da busca por uma maior praticidade, diante de um ritmo de vida muito acelerado reduzindo o tempo destinado ao preparo de alimentos.

O uso intensivo de agrotóxicos na agricultura tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, desequilíbrios biológicos e redução da biodiversidade. A sociedade tem se preocupado com a qualidade de vida, exigindo produtos livres de agrotóxicos e comercializados

de forma transparente buscando uma alimentação saudável e equilibrada, com todos os nutrientes tais como carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, além do consumo por alimentos frescos e sem contaminação microbiana.

O aumento de fungos indesejáveis ocasiona grandes impactos econômicos negativos para os produtores, aumentando as perdas e os custos de produção, além de problemas à saúde do consumidor decorrentes da exposição às micotoxinas, produzidas com o crescimento de fungos toxigênicos (Moretti *et al.*, 2017; Zain *et al.*, 2011).

O Morango é uma fruta altamente perecível (Trevino-Garza *et al.*, 2015), e apresenta um prazo de validade curto devido à perda de firmeza dos frutos, susceptibilidade a lesões mecânicas, distúrbios fisiológicos e infecções fúngicas causadas principalmente por fungos como *Botrytis cinerea*. Outros vegetais como a abobrinha, tomate-cereja e pepino também são susceptíveis às infecções por *Botrytis cinerea*. Problemas como estes podem causar uma perda de até 40% da produção durante o armazenamento destes alimentos, gerando desafios para sua comercialização (Vu *et al.*, 2011, Peretto *et al.*, 2014).

Assim, o desenvolvimento de um sanitizante natural, eficiente e biodegradável é importante para conter a disseminação de microrganismos resistentes e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos minimamente processados.

8. DESCREVA AS CONHECIDAS SOLUÇÕES PARA O PROBLEMA OU DESAFIO, SEUS LIMITES OU DEFICIÊNCIAS.

Para controlar a deterioração pós-colheita, existem algumas técnicas prevalentes, como o resfriamento e armazenamento dos vegetais em baixas temperaturas logo após a colheita (Yoon *et al.*, 2020). Embora bastante utilizada durante a estocagem, é trabalhoso manter o controle de temperatura durante o transporte desses alimentos, e além disso, para a preservação das características físicas, químicas e biológicas dos vegetais em armazenamento prolongado, apenas a redução de temperatura não é suficiente (Li ; Yu, 2000; Campaniello *et al.*, 2008).

Outra técnica tradicionalmente utilizada é a aplicação de fungicidas, que gera resíduos com riscos potenciais tanto para o consumidor quanto para o ambiente (Gol *et al.*, 2013). Há uma crescente conscientização com relação ao consumo de alimentos saudáveis, gerando a necessidade de manter qualidade dos alimentos sem uso de conservantes químicos.

9. DESCREVA COMO SUA INVENÇÃO SUPERA ESSES LIMITES E DEFICIÊNCIAS, DESTACANDO SUAS VANTAGENS E GANHOS.

A invenção aqui apresentada é uma solução sanitizante de vegetais capaz de retardar a deterioração e conferir maior firmeza à parede de frutas e legumes. Além disso, é capaz de controlar o crescimento microbiano devido à sua atividade antifúngica contra um dos principais fungos contaminantes desses alimentos.

Os soforolipídios são biossurfactantes de atividade antimicrobiana comprovada contra uma gama de microrganismos deteriorantes de alimentos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea* e *Mucor* (Yuan et al., 2012), *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Sen et al., 2017), sendo capazes de aumentar a vida útil de vegetais através de seu mecanismo de ação, que envolve o rompimento da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular de patógenos (Silveira et al., 2019). Nessa patente, foi observado que a solução sanitizante de soforolipídios mostrou atividade antimicrobiana contra o fungo *B. cinerea*. A eficácia de proteção da solução sanitizante contra o mofo cinzento causado pelo fungo *B. cinerea* foi de 66,67% no tomate-cereja, 80% no morango, 88,89% no pepino e 88,89% na abobrinha. Além disso, o tratamento com o sanitizante em tomate-cereja, morango, pepino e abobrinha previamente infectados com *B. cinerea* resultou em um melhor tempo prateleira dos alimentos.

Os soforolipídios de origem biotecnológica são naturais, não tóxicos e apresentam alto rendimento de produção. Sendo assim, a nova solução sanitizante com ação antimicrobiana possui características requeridas pela indústria alimentar, e sua aplicação é capaz de manter a qualidade de frutas e legumes por um período prolongado de tempo.

10. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO*

As etapas da invenção foram: **A** - produção e extração dos soforolipídios; **B** - preparação da solução sanitizante, **C** - Infecção dos legumes com o fungo **D**- Aplicação da solução sanitizante em frutas e legumes. **Etapas E**: Avaliação da eficácia da solução sanitizante.

ETAPA A – Produção e separação dos soforolipídios

A produção dos soforolipídios foi realizada por uma levedura do gênero *Starmerella* em meio de fermentação contendo em (gL⁻¹): glicose, 100; ácido oleico, 100; extrato de levedura 2,5. A fermentação foi em Erlenmeyer (1 L) com volume de 250 mL de meio; a 150 rpm; 30°C por 264 horas. A fermentação foi interrompida por centrifugação e do sobrenadante extraído os soforolipídios com acetato de etila (1:1) e rotaevaporado. A fração obtida foi submetida a nova extração em funil de separação com solução metanol água 4:1 (v/v) e hexano (v/v) nas proporções de 1:1 (v/v), a fim de se obter os soforolipídios, esse foi seco em estufa até eliminação completa do solvente (MINUCELLI et al., 2017).

ETAPA B – Preparação da solução sanitizante

Para o desenvolvimento do sanitizante foi utilizado silicato de sódio (Na₂SiO₃), carbonato de sódio (Na₂CO₃). O polietilenoglicol (PEG) foi usado como um antiespumante, para ajudar a formar um revestimento liso, permitindo evaporação sem deixar resíduo gorduroso.

As concentrações de soforolipídios utilizadas no desenvolvimento do sanitizante foram baseadas nos resultados previamente definidos por Caretta et al (2021). A formulação foi desenvolvida usando concentrações de soforolipídios nas concentrações de 2mg/mL e 4

mg/ml, carbonato de sódio 1,5%, silicato de sódio 1%, PEG 1%, água destilada q.s.p. O pH da solução foi mantido em 6,0, pois refere-se a melhor faixa de solubilidade dos sofrorolípídios em solução aquosa.

ETAPA C – Contaminação com *Botrytis cinerea*

O fungo *B. cinerea* foi usado para induzir as contaminações nos vegetais. Os testes foram realizados em tomate, pepino, morango e abobrinha. Os vegetais foram feridos na casca com uma agulha estéril e contaminados com 10 µL de 1×10^6 esporos de *B. cinerea* na ferida. Em seguida, os vegetais foram secos à temperatura ambiente e acondicionados em sacos plásticos, até o momento da aplicação do sanitizante.

ETAPA D – Aplicação da solução sanitizante

Foram realizados 4 tratamentos: Tratamento 1 e 2 onde a solução sanitizante foi aspergida nos vegetais após a infecção por *B. cinerea*, nas concentrações de 2 e 4 mg.mL⁻¹, respectivamente. Os tratamentos 3 e 4 onde a onde a solução sanitizante foi aspergida nos vegetais não infectados, nas concentrações de 2 e 4 mg.mL⁻¹, respectivamente. Os frutos e vegetais foram tratados com solução de sofrorolípídios com 5 borrifadas até estarem totalmente umedecidos por completo. Após a aplicação do sanitizante os vegetais foram armazenados em sacos plásticos estéreis e mantidos sob refrigeração a 5°C. Os vegetais foram analisados por até 32 dias. Os controles foram realizados com a aspersão água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

ETAPA D – Avaliação da eficácia da solução sanitizante

Os índices de severidade da doença e da eficácia da solução sanitizante foram calculados usando a fórmula de GAO *et al.* (2018).

Onde o índice de gravidade da doença foi classificado em uma escala de 0 a 100%:

0 - sem sintomas; 1 - 0,1% a 5%; 2 - 5,1% a 20%; 3 - 20,1% para 40%; 4 - 40,1% a 100%.

A gravidade da doença foi calculada usando:

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

onde o SD: Severidade da doença, FD: número de folhas doentes, GD: índice de gravidade da doença, FA: número de folhas avaliadas.

A eficácia da solução sanitizante de sofrorolípídios foi calculada usando a formula:

$$\% \text{ de Eficácia} = (C - T)/Cx100$$

na qual o C: SD do controle, T: SD de cada tratamento.

Os resultados demonstraram que a solução sanitizante de soforolipídios foi capaz de diminuir a severidade da doença em todos os tratamentos (Tabela 1). Em tomate-cereja a infecção pelo *B. cinerea* foi capaz de danificar o tomate induzindo lesão que resultou em 100% da severidade nos frutos controles tratados somente com água destilada. Por outro lado, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle, sendo que sanitizante contendo 4 mg.mL⁻¹ de soforolipídios demonstrou mais eficiência contra as lesões necróticas. O tratamento dos tomates com a solução sanitizante reduziu significativamente a incidência de doenças após a inoculação com *B. cinerea* em 20 dias após o tratamento (Figura 1). Os frutos de tomate inoculados com *B. cinerea* e tratados com o sanitizante mostraram tempo de prateleira elevado. Em temperatura ambiente, o tempo de prateleira do tomate é variada, dependendo do grau de maturação, cultivo, manejo pós-colheita e embalagem (Ferreira *et al.*, 2004).

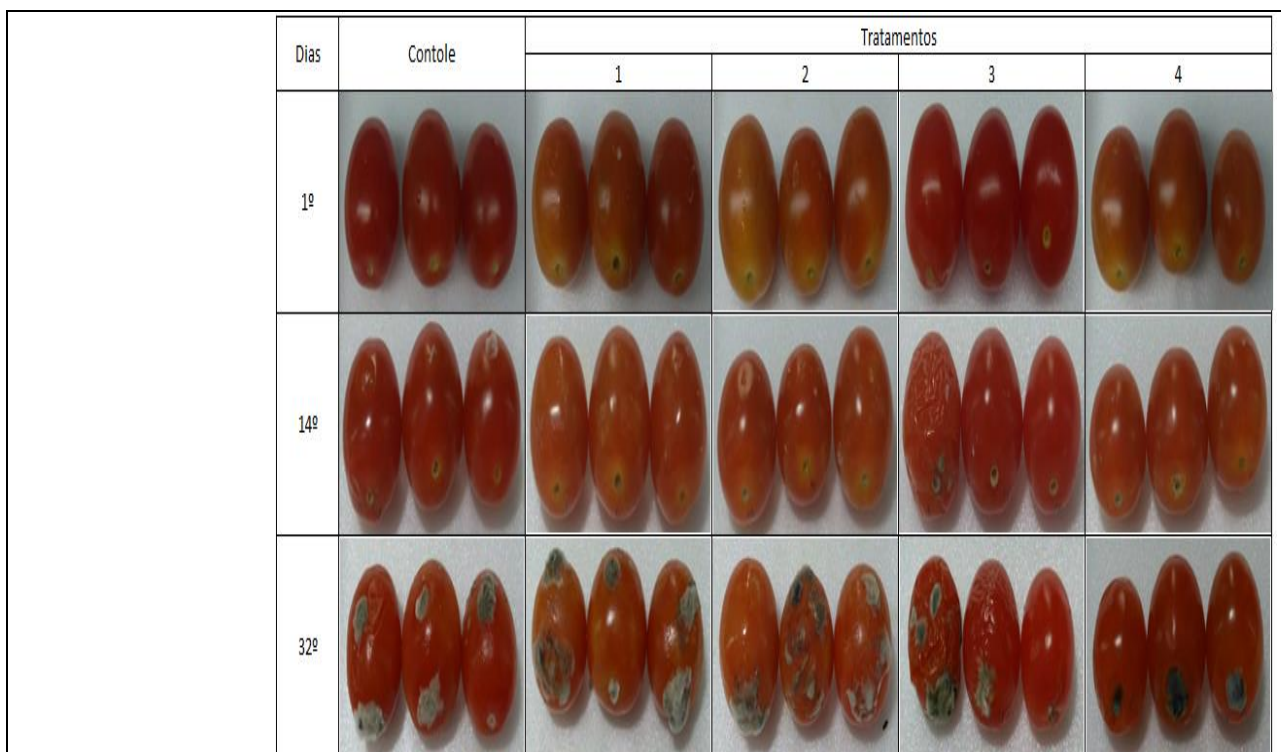
Em morangos, os resultados mostraram que o sanitizante inibiu o crescimento do fungo, e o máximo de inibição do crescimento de esporos foi de até 16 dias. O tratamento com sanitizante com a concentração de 4 mg.mL⁻¹ demonstrou ser mais eficaz em 16 dias pós tratamento inibindo significativamente o crescimento de *B. cinerea* em comparação com o controle (Figura 2). Os morangos são altamente suscetíveis a perder peso, principalmente devido a uma rápida perda de água, o que produz danos à pele na qual demonstra enfraquecimento do tecido e encolhimento da fruta. Segundo Posé *et al.*, 2011, a textura é um dos parâmetros de qualidade de frutas frescas e o morango é caracterizado pela perda rápida da sua firmeza em poucos dias após o amadurecimento.

Tabela 1- Porcentagem da severidade e eficácia da solução sanitizante de soforolipídios em frutas e legumes

	Tratamentos	Severidade (%)	Eficácia (%)
TOMATE	controle	75.0 ^a	0 ^a
	1	50.0 ^b	33.0 ^b
	2	50.0 ^b	33.33 ^b
	3	25.0 ^c	66.67 ^c
	4	33.0 ^d	55.56 ^d
MORANGO	controle	83.33 ^a	0 ^a
	1	58.33 ^b	30.0 ^b
	2	41.67 ^c	50.0 ^c
	3	41.67 ^c	50.0 ^c
	4	16.67 ^d	80.0 ^d
PEPINO	controle	75.0 ^a	0 ^a
	1	50.0 ^b	33.0 ^b
	2	83.0 ^a	0 ^a
	3	8.33 ^c	88.89 ^c
	4	25.0 ^d	66.67 ^d
ABOBRINHA	controle	75.0 ^c	0 ^c
	1	75.0 ^{a, c}	0 ^{a, c}
	2	66.67 ^{b, c}	11,11 ^{b, c}
	3	8.33 ^b	88.89 ^b
	4	8.33 ^c	88.89 ^c

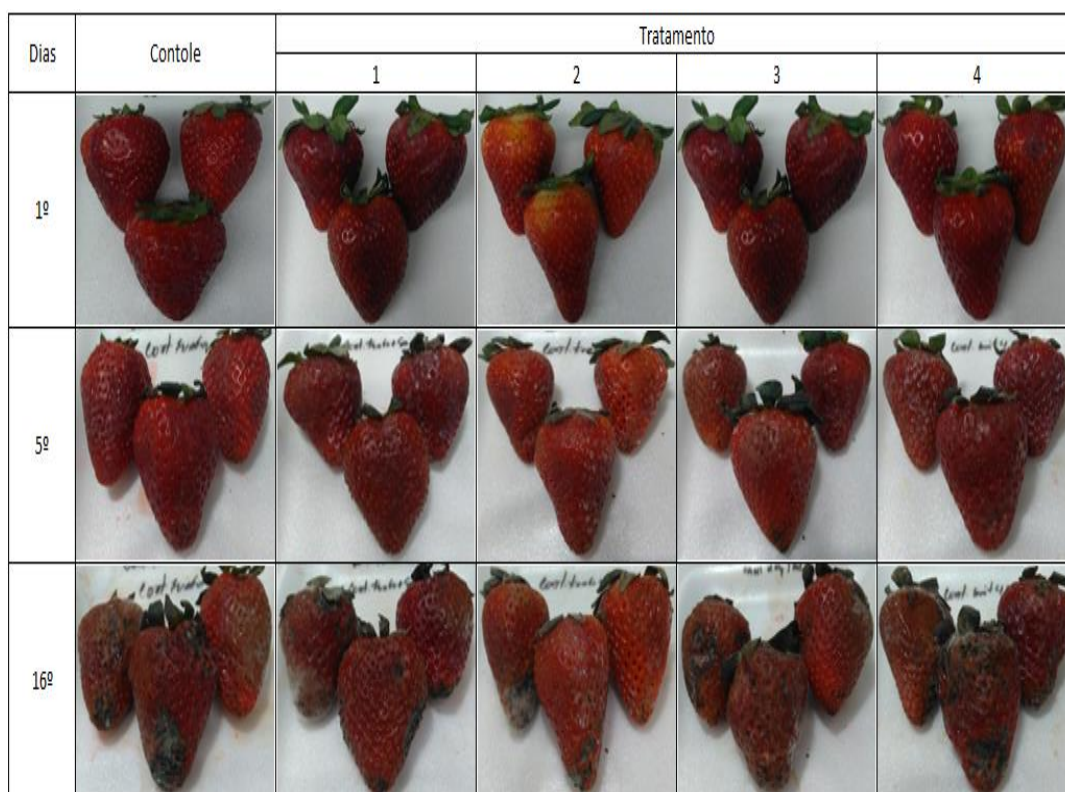
Tratamentos 1 e 2: solução sanitizante foi aspergida nos vegetais após a infecção por *B. cinérea*, nas concentrações de 2 e 4 mg.mL⁻¹, respectivamente. Tratamentos 3 e 4: onde a solução sanitizante foi aspergida nos vegetais não infectados, nas concentrações de 2 e 4 mg.mL⁻¹, respectivamente. O controle foi realizado somente com aspersão de água destilada. As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 1. Atividade sanitizante de soforolipídios em tomate infectado e não infectado com *Botrytis cinerea* durante 32 dias de armazenamento.



Os resultados mostraram a redução significativa da incidência de doenças após a inoculação com *B. cinerea* em até 20 dias após o tratamento (Fig. 1). A solução sanitizante contendo 4 mg.mL⁻¹ de soforolipídio demonstrou melhor resultado até o 20^o dia em comparação com os outros tratamentos (Fig.1). Por ser um fruto climatérico, a taxa de respiração do tomate se eleva no início do amadurecimento, resultando uma série de transformações físico-químicas (Kluge *et al.*, 1997) caracterizadas por alterações fisiológicas e bioquímicas no fruto tais como: degradação do amido, produção de glicose e frutose, diminuição da clorofilam síntese dos pigmentos, aumento na síntese de etileno, aumento de pectinas solúveis e, conseqüentemente, amolecimento das paredes celulares (Fachin, 2003).

Figura 2. Atividade sanitizante de soforolipídios em morango infectado com *Botrytis cinerea* durante 16 dias de armazenamento.



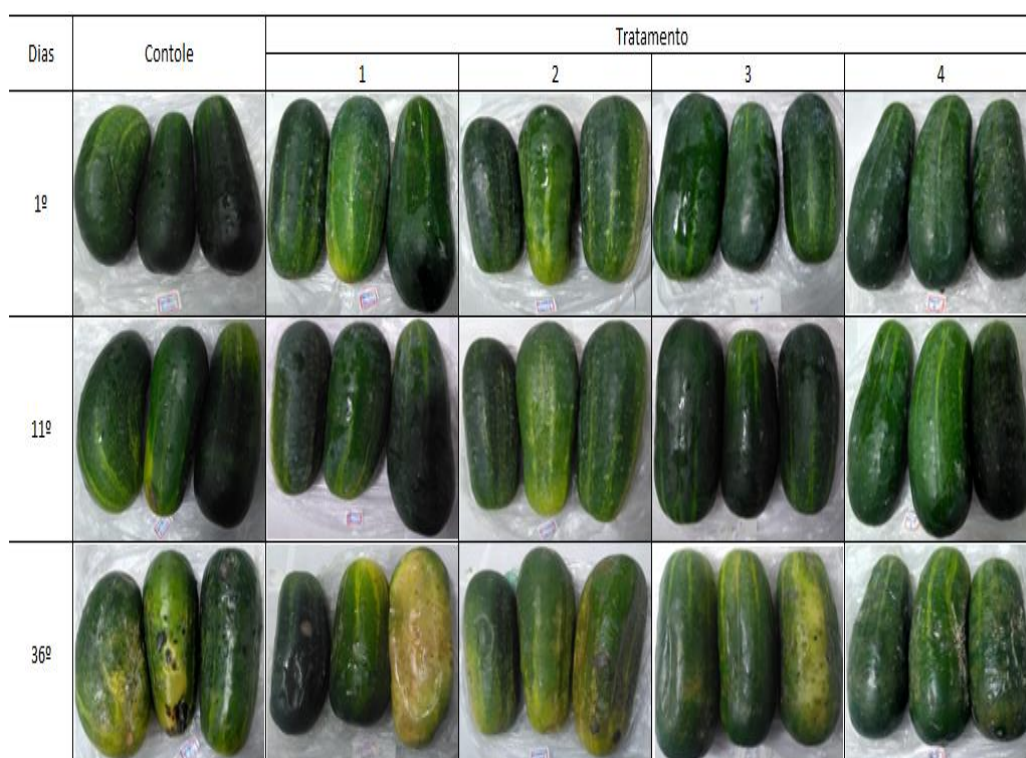
Os morangos não tratados apresentaram um crescimento evidente de fungos após 5 dias em suas condições naturais (Fig. 2). A área de podridão em morangos tratados com *B. cinerea* foi avaliada onde a severidade e a eficácia foi calculada (Tabela 1). Os resultados

mostram que o tratamento com soforolipídio na concentração 4 mg.mL^{-1} apresentaram melhor eficácia (Tabela 1).

De acordo com Doving *et al.* (2005), a firmeza é uma característica importante do morango, porém altamente variável conforme a genética, condições de crescimento e constituição da fruta no momento do teste (grau de amadurecimento, tamanho, manuseio pós-colheita, temperatura interna, entre outros). Assim, a estrutura frágil do morango devida a sua alta taxa metabólica durante o armazenamento, torna-o mais suscetível a danos nos tecidos e infecções causadas por fungos fitopatogênicos, bactérias e vírus.

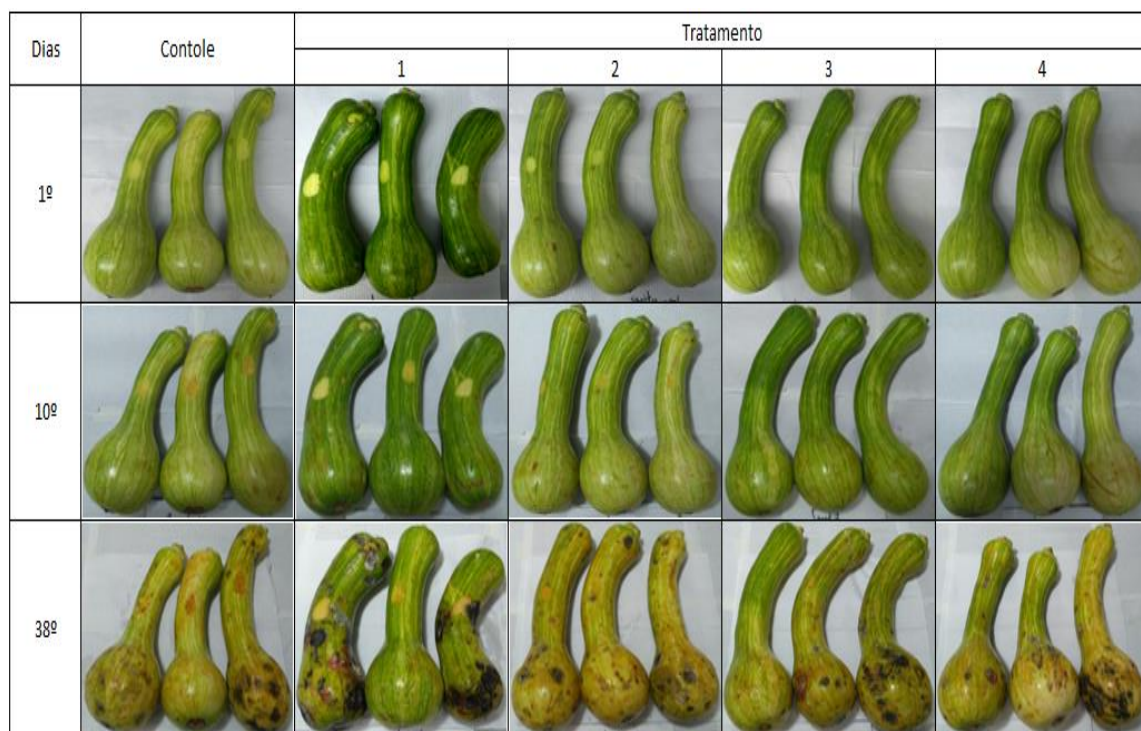
Após 11 dias após a inoculação com a suspensão de conídios de *B. cinerea*, os pepinos inoculados com o fungo apresentaram uma leve coloração marrom-cinza e com a presença de lesões necróticas. No entanto, os pepinos tratados com sanitizante contendo soforolipídios não apresentaram esporulação do fungo (Figura 3). Segundo Henriques (2012), o pepino é um fruto com alto percentual de umidade (cerca de 97% de água) sendo assim, susceptível a sofrer perda de água, bem como a danos causados pelo estrago do resfriamento (Carvalho *et al.*, 2013). O tratamento com o sanitizante com a concentração de 2 mg. mL^{-1} demonstrou maior eficácia melhor comparados aos outros tratamentos (Tabela 1).

Figura 3. Atividade sanitizante de soforolipídios em pepino infectado com *Botrytis cinerea* durante 16 dias de armazenamento.



Após 10 dias, as abobrinhas infectadas com o fungo e tratadas com o sanitizante na concentração de 2 mg.mL⁻¹ de soforolipídios apresentaram uma leve cor marrom-cinza e observou-se que o fungo invadiu o tecido e causou lesões necróticas. As abobrinhas onde foram aplicados apenas o sanitizante não apresentaram variabilidade de esporulação do fungo, os controles permaneceram livres da doença (Figura 4). A aplicação do sanitizante com soforolipídio na concentração 2 mg. mL⁻¹ demonstrou uma eficiência melhor em relação as outras aplicações (Tabela 1).

Figura 4. Atividade sanitizante de soforolipídios em pepinos infectado com *B. cinerea* durante 38 dias de armazenamento.



11. QUAL A PRINCIPAL APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA? *

A tecnologia apresentada compreende o desenvolvimento solução sanitizante para aplicação em vegetais, visando prolongar o tempo de prateleira desses alimentos perecíveis através da incorporação de soforolipídios como agente antifúngico. Assim, a principal aplicação da tecnologia é a sanitização de vegetais durante o pós-colheita, a fim de trazer maior qualidade e segurança ao consumidor e diminuir as perdas devido sua perecibilidade.

12. INVENTORES

12.1. INVENTOR 1

Nome completo: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

12.2. INVENTOR 5
Nome completo: Talita de Oliveira Caretta
Vínculo do Inventor: (X) UEL () Inventor Independente
Departamento onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE
Endereço residencial completo: Rua Reverendo João Batista Ribeiro Neto, nº75, ap.1303- torre 1. Gleba Fazenda Palhano - Londrina
Tel: (43)99868-6872 e-mail: talita_oca@hotmail.com
Atividade na UEL/Empresa/Instituição: Doutoranda
Percentual da participação na invenção: 10% Tempo de participação: 2 anos
12.2. INVENTOR 6
Nome completo: Geissiane Feitosa da Fonseca
Vínculo do Inventor: (X) UEL () Inventor Independente
Departamento onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE
Endereço residencial completo: Madre Henriqueta Dominici n. 750
Tel: (43)99208716 e-mail: geissiane.feitosa@uel.br
Atividade na UEL/Empresa/Instituição: aluna de graduação
Percentual da participação na invenção: 5% Tempo de participação: 2 anos

14. DIVULGAÇÃO EXTERNA DA INVENÇÃO
14.1. Houve alguma divulgação pública da invenção? () SIM (X) NÃO
14.2. Se sim, quando e como?
14.3. Neste caso, foi assinado um acordo de sigilo ou de não-divulgação? () SIM () NÃO

15. DIVULGAÇÃO INTERNA DA INVENÇÃO
15.1. Houve alguma divulgação interna da invenção, por exemplo, para alunos, funcionários, docentes, palestra, eventos? () SIM (X) NÃO
15.2. Se sim, a divulgação foi tecnicamente detalhada? () SIM () NÃO

16. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E TÉCNICAS

16.1. Foram publicados artigos, no quais um dos inventores aparece com como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção?

() SIM (X)

NÃO

17. COMUNICAÇÕES

17.1. Foram realizadas comunicações orais (palestras, aulas), no qual um dos inventores aparece com como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção?

() SIM (X) NÃO

17.2. Foram realizados comunicados da invenção à imprensa, ou a jornais internos da UEL, de empresas, de agências de fomento ou outro instrumento de divulgação? Não

18. COTITULARIDADE

18.1. HOUVE PARTICIPAÇÃO DE OUTRA INSTITUIÇÃO/EMPRESA NO DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA? ()SIM (X) NÃO

18.2. CASO A TECNOLOGIA TENHA SIDO DESENVOLVIDA COM A COLABORAÇÃO CONJUNTA DE OUTRA INSTITUIÇÃO/EMPRESA, DE QUE FORMA OCORREU ESTA COOPERAÇÃO? NÃO

19. TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA

A tecnologia do desenvolvimento da solução sanitizante poderia ser transferida para agroindústrias comercializadoras de frutas e legumes, como a Frubelle, Desfrut e DeMarchi, Horti Prático-Vegetais e frutas, Yokozana e Silva LTDA.

20. DIVULGAÇÕES FORA DA EMPRESA (APLICÁVEL ÀS EMPRESAS)

20.1. Houve alguma divulgação da invenção fora da empresa, nas formas escrita, oral ou expositiva? () SIM (X) NÃO

<p>20.2. As divulgações foram realizadas sob algum instrumento legal de sigilo ou confidencialidade?</p> <p>NÃO</p>	<p>() SIM (X)</p>
---	-----------------------------

21. BUSCA DE ANTERIORIDADE

Anexar a esse formulário o relatório de busca de patentes feito com base no manual disponibilizado pelo INPI (<http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/informacao/guia-pratico-para-buscas-de-patentes>). O relatório deve conter as bases consultadas, as palavras-chave utilizadas, as patentes encontradas com uma breve descrição e os diferenciais entre as patentes encontradas e a invenção aqui proposta.

22. DECLARAÇÃO

Declaro que as informações acima prestadas são verdadeiras e de minha inteira responsabilidade. Concordo que este é um pedido de proteção intelectual e industrial e isento a UEL, a AINTEC e todo seu pessoal de toda e qualquer responsabilidade, direta ou indireta, se a referida proteção não for concedida integral ou parcialmente pelo INPI ou por outro órgão a que for submetido.

INVENTOR 1

Nome: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
CPF: 040.984.648-10

INVENTOR 2

Nome: Elba Ferreira Junior
CPF: 04550332930

INVENTOR 3

Nome: Cristiani Baldo da Rocha

CPF: 098.314.389-73

INVENTOR 4

Nome: Galdino de Andrade Filho

CPF: 449.573.009.68

INVENTOR 5

Nome: Talita de Oliveira Caretta

CPF: 058.224.129-47

Londrina, 22 de março de 2022

INVENTOR 6

Nome: Geissiane Feitosa da Fonseca

CPF: 103757269-69

REFERÊNCIAS

CAMPANIELLO, D.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R. Chitosan: antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. **Food Microbiology**, v.25, p. 992– 1000, 2008.

CARETTA, T. DE O., SILVEIRA, VAI, ANDRADE, G., MACEDO, F., & CELLIGOI. Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2021.

CARVALHO, A.D.F., AMARO, G.B., LOPES, J.F., VILELA, N.J., FILHO, M.M., ANDRADE, R. A cultura do pepino. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Circular Técnica, v. 113, p. 1-18, 2013.

DOVING, A.; MÅGE, F.; VESTRHEIM, S. Methods for testing strawberry fruit firmness: a review. **Small Fruits Review**, v. 4, n. 2, p. 11-34, 2005.

FACHIN, D. Temperature and pressure inactivation of tomato pectinases: a kinetic study. 2003. 133 p. Proefschrift (Doctoraats in de Toegepaste Biologische Wetenschappen door). Katholieke Universiteit Leuven.

FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, R. J. S., & LAZZARI, E. N. (2004). Padrão de identidade e qualidade do tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) de mesa. *Ciência Rural*, 34(1), 329-335. 10.1590/S0103-84782004000100054

GOL, N.B.; PATEL, P.R.; RAO, T.V.R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, p. 185-195, 2013.

HENRIQUES, F. S. S. C. Efeito da secagem sobre as propriedades das cucurbitáceas. 2012. Tese de Doutorado. Instituto Politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária.

KLUGE, R. A.; MINAMI, K. Efeito de esters de sacarose no armazenamento de tomates Santa Clara. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 54. n. 1-2, p. 39-44, jan./ago. 1997.

LI, H. YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p.269-274, 2000.

LI, Y. *et al.* Sophorolipid Production Using Lignocellulosic Biomass by Co-culture of Several Recombinant Strains of *Starmerella bombicola* with Different

Heterologous Cellulase Genes from *Penicillium oxalicum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2020.

MINUCELLI, T; RIBEIRO-VIANA, RM; BORSATO, D; ANDRADE, G; CELY, MVT; DE OLIVEIRA, MR; BALDO, C; CELLIGOI, MAPC. **Soforolipids production of *Candida bombicola* ATCC 22214 on low-cost industrial substrates and application in bioremediation** Valorização de Resíduos e Biomassa, v. 8, n. 3, p. 743–753, 2017.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. **Mycotoxins: An underhand food problem.** Mycotoxigenic fungi, p. 3-12, 2017.

PAULINO, B. N.; PESSÔA, M. G.; MANO, M.C.R.; MOLINA, G. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100 (24), p.10265- 10293, 2016.

PERETTO, G.; DU, W.X.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; SARREAL, S.B.; HUA, S.S.T.; SAMBO, P.; MCHUGH, T.H. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. **Postharvest Biology and Technology**, v.89, p. 11– 18, 2014.

POSÉ, S.; GARCÍA-GAGO, J. A.; SANTIAGO-DOMÉNECH, N.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.; MERCADO, J. **Strawberry fruit softening: role of cell wall disassembly and its manipulation in transgenic plants.** Genes, Genomes and Genomics, Rockville, v. 5, p. 40- 48, 2011.

SEN, S.; BORAH, S. N.; BORA, A.; DEKA, S. Production, characterization and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjvae* YS3. **Microbial Cell Factories**. v. 16, n. 1, p. 95, 2017.

SILVA, P.B.; GARCIA, S.; BALDO, C.; CELLIGOI, M.A.P.C. Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus Subtilis* Natto CCT 7712. **Acta Alimentaria**, v. 46(2), p. 145-151, 2017.

SILVEIRA, V. A. I; NISHIO, E. K, URZEDO, C. A. Q. F.; AMADOR, I.R, KOBAYASHI, R. K. T.; CARETTA, T. O.; 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**. 2019.

TREVIÑO-GARZA, M. Z.; GARCÍA, S.; FLORES-GONZÁLEZ, M.S.; 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**, v.80(8), p. 1823-1830.

VU, K.D.; HOLLINGSWORTH, R.G.; LEROUX, E.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, v. 44, p.198– 203, 2011.

ZAIN, M. E. **Impact of mycotoxins on humans and animals**. Journal of Saudi chemical society, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

YOON, Y.S.; Ameer, K.; Song, B.S.; Kim, J. K.; Park, H. Y. Lee, K.C. Eun, J.B. Park, J. H. Effects of X-ray irradiation on the postharvest quality characteristics of 'Maehyang' strawberry (*Fragaria x ananassa*). **Food Chemistry**, v. 325, p.126817, 2020.

YUAN, B.; YANG, S.; CHEN, J. Antimicrobial activity of sophorolipids on pathogenic fungi isolated from fruits. **Chinese Journal of Applied Environmental Biology**, v. 17, n. 3, p. 330–333, 2012.