



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

AMANDA HIPÓLITO

**PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE SOFOROLIPÍDIOS DE  
*STARMERELLA BOMBICOLA* COM POTENCIAL  
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA**

---

Londrina  
2020

AMANDA HIPÓLITO

**PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE SOFOROLIPÍDIOS DE  
*STARMERELLA BOMBICOLA* COM POTENCIAL  
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA**

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

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

Londrina  
2020

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

H667 HIPOLITO, AMANDA.  
PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE SOFOROLIPÍDIOS de *Stamerella bombicola* COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA / AMANDA HIPOLITO. - Londrina, 2020.  
102 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Soforolipídios - Tese. 2. Antimicrobiano - Tese. 3. Indústria Alimentícia - Tese. I. Pedrine Colabone Celligoi, Maria Antonia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

AMANDA HIPÓLITO

**PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE SOFOROLIPÍDIOS DE  
*STARMERELLA BOMBICOLA* COM POTENCIAL  
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa Dr<sup>a</sup> Caroline Maria Calliari  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

---

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

Londrina, 17 de fevereiro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora por me guiarem e auxiliarem nesta trajetória e por me abençoarem com tantos presentes!

À Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

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

Meu agradecimento especial a minha orientadora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pela pessoa e profissional que és. Obrigada pela sua dedicação, compreensão e paciência. Agradeço por todo aprendizado, oportunidade e crescimento que me proporcionou e principalmente por ter depositado sua confiança em mim ao longo desses anos.

Ao professor Luciano Panagio pela disponibilidade do seu laboratório que contribuíram muito com este trabalho e ao Ricardo Augusto da Silva pela paciência, parceria e grande aprendizado.

Agradeço ao Nelson e Ismael do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pela acessibilidade, auxílio e colaboração com essa pesquisa.

Agradeço aos meus pais Ademir e Edilene e ao meu irmão Hugo pelo profundo apoio. Obrigada por sempre me desejarem o melhor e por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse chegar onde estou. Á vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou e por tudo que conquistei até aqui!

À minha grande amiga Victória Akemi Itakura Silveira, por todo incentivo desde o início, ombro amigo e por sempre caminhar ao meu lado. Obrigada pela paciência e por todo aprendizado que me cedeu de coração aberto!

Aos presentes que ganhei durante o mestrado e sei que levarei no coração, Talita, Reginara, Eloisi, Gabrielly, Beatriz e Leticia por deixarem este caminho mais leve e florido! Obrigada pelo companheirismo, amizade e parceria, foi muito melhor com vocês!

Ao meu namorado e parceiro Guilherme, por todo carinho, amor e paciência nos meus momentos difíceis e por sempre segurar a minha mão diante de tudo. Obrigada por ser meu porto seguro!

Às minhas queridas amigas Nagila, Jacqueline, Izabelli e Caroline por se fazerem presentes, por torcerem por mim e pela compreensão diante das minhas

faltas e falhas. Vocês são essenciais em minha caminhada, muito obrigada pelo amor, carinho e amizade!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu eterno agradecimento.

“Existe uma versão sua num futuro não muito distante orgulhosa de você ter enfrentado tudo sem desistir.”

(Edilene Catori Hipólito)

HIPÓLITO, Amanda. **Propriedade antifúngica de soforolipídios de *Starmerella bombicola* com potencial aplicação na indústria alimentícia.** 2020. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

A deterioração de alimentos causada por microrganismos, principalmente por fungos, tem acarretado perdas significativas para as indústrias por alterações indesejáveis e riscos à saúde do consumidor. A pesquisa por novos agentes antifúngicos é de grande importância, chamando atenção para os biossurfactantes da classe dos soforolipídios. Esses pertencem à classe de glicolipídios extracelulares, e são produzidos por microrganismos, com destaque para a levedura *Starmerella bombicola*, que produz uma mistura de formas acídicas e lactônicas. Estas diferenças estruturais influenciam diretamente em suas características físico-químicas e biológicas que direcionam para as diversas aplicações industriais. A ação antimicrobiana tem chamado atenção devido à atividade contra uma ampla gama de bactérias e fungos que prejudicam a indústria de alimentos. Considerando esses aspectos, o presente trabalho teve como objetivo produzir, caracterizar e verificar a ação antifúngica de soforolipídios de *S. bombicola* contra os principais contaminantes de alimentos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Brotrytis cinerea* e *Rhizopus* spp. Também desenvolver e caracterizar filmes de amido comestíveis com adição desse biossurfactante para aplicação industrial. A produção dos soforolipídios foi realizada em meio contendo glicose e o ácido oleico e a melhor condição foi transferida para biorreator onde atingiu 67 g/L, com uma produtividade 0,56 g/L h<sup>-1</sup> em 120 h. A caracterização estrutural dos soforolipídios confirmou predominância da forma lactônica, a qual apresentou ação antifúngica contra todos os fungos contaminantes testados. Os filmes produzidos com soforolipídios apresentaram boa aparência, sem poros ou bolhas, e os resultados de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) confirmaram a presença do biossurfactante nos filmes. Os filmes tiveram uma maior resistência a tração e um decréscimo na permeabilidade ao vapor de água e alongamento com a adição de 10 % de soforolipídios na matriz polimérica. Soforolipídios de *S. bombicola* podem ser uma alternativa para aplicações industriais como um agente antifúngico inovador reduzindo a deterioração microbiana, aumentando assim a produtividade industrial.

**Palavras-chave:** Soforolipídios. *Starmerella bombicola*. Patógenos de alimentos. Atividade antifúngica. Filmes comestíveis.

HIPOLITO, Amanda. **Antifungal property of sophorolipids from *Starmerella bombicola* with potential application in the food industry**. 2020. 99 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

The deterioration of food caused by microorganisms, especially by fungi, has caused significant losses for the industries due to undesirable changes and risks to the health of the consumer. The search for new antifungal agents is of great importance, drawing attention to the biosurfactant sophorolipids. These belong to the class of extracellular glycolipids, and are produced by microorganisms, especially the yeast *Starmerella bombicola*, which produces a mixture of acidic and lactonic forms. These structural differences directly influence their physical-chemical and biological characteristics that lead to the various industrial applications. The antimicrobial action has attracted attention due to its activity against a wide range of bacteria and fungi that affect the food industry. Considering these aspects, the present study aimed to produce, characterize and verify the antifungal action of sophorolipids from *S. bombicola* against the main food contaminants *Aspergillus flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Brotrytis cinerea* and *Rhizopus* spp. Additionally, the development and characterization of edible starch films with the addition of this biosurfactant for industrial application was made. The production of sophorolipids was performed with glucose and oleic acid and the best condition was transferred to the bioreactor, where it reached 67 g/L, with a productivity of 0.56 g/Lh<sup>-1</sup> in 120 h. The structural characterization of sophorolipids confirmed the predominance of the lactonic form, which presented antifungal action against all pathogenic fungi tested. The films produced with sophorolipids showed good appearance, without pores or bubbles, and the results of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed the presence of the biosurfactant in the films. The films had a higher tensile strength and a decrease in water vapor permeability and elongation. Sophorolipids from *S. bombicola* showed to be a potential alternative for industrial applications as an innovative antifungal agent reducing microbial deterioration, and thus increasing industrial productivity.

**Key words:** Sophorolipids. *Starmerella bombicola*. Food pathogens. Antifungal activity. Edible films.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Formas estruturais dos soforolipídios: (A) acídica e (B) lactônica.....18
- Figura 2** – Etapas da via metabólica da biossíntese de soforolipídios .....22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais microrganismos produtores de soforolipídios .....	19
<b>Tabela 2</b> – Produção de soforolipídios descritas por diferentes autores com variações das condições de cultivo .....	25
<b>Tabela 3</b> – Planejamento Box Behnken 3 <sup>3</sup> para avaliação do ácido oleico e da glicose na produção e soforolipídios por <i>Starmerella bombicola</i> .....	34
<b>Tabela 4</b> – Formulações para o desenvolvimento dos filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de soforolipídios de <i>Starmerella bombicola</i> nas concentrações de 2, 5 e 10 % .....	39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1	CONTAMINAÇÕES FÚNGICAS EM ALIMENTOS .....	15
3.2	BIOSURFACTANTE: SOFOROLIPÍDIOS.....	17
3.3	PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS .....	19
3.4	APLICAÇÕES DOS SOFOROLIPÍDIOS .....	25
3.4.1	Atividade Antifúngica .....	26
3.5	FILMES COMESTÍVEIS .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1	MATERIAL.....	32
4.1.1	Microrganismos .....	32
4.1.2	Meios de Cultura .....	32
4.1.2.2	Meio de fermentação .....	32
4.1.2.3	Meios para os ensaios de atividade antifúngica .....	32
4.2	MÉTODOS .....	33
4.2.1	Preservação e Inóculo da <i>Starmerella bombicola</i> .....	33
4.2.2	Avaliação do Ácido Oleico e Glicose na Produção de Soforolipídios por <i>S. Bombicola</i> .....	33
4.2.3	Fermentação em Biorreator de Bancada.....	34
4.2.4	Determinação da Biomassa.....	34
4.2.5	Extração e Quantificação dos Soforolipídios .....	35
4.2.6	Determinação de Substratos Residuais .....	35
4.2.7	Caracterização dos Soforolipídios .....	35
4.2.7.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	36
4.2.7.2	Espectroscopia de infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FTIR) .....	36

4.2.7.3	Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	36
4.2.8	Avaliação do Potencial Antifúngico dos Soforolipídios .....	36
4.2.8.1	Concentração inibitória mínima (CIM) .....	37
4.2.8.2	Concentração fungicida mínima (CFM) .....	37
4.2.8.3	Método de diluição em ágar .....	37
4.2.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
4.3	PRODUÇÃO DOS FILMES DE AMIDO COMESTÍVEIS .....	38
4.3.1	Caracterização dos Filmes .....	39
4.3.1.1	Espessura.....	39
4.3.1.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR) .....	39
4.3.1.3	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	40
4.3.1.4	Solubilidade em água .....	40
4.3.1.5	Permeabilidade ao vapor de água (PVA) .....	41
4.3.1.6	Propriedades mecânicas .....	41
4.3.1.7	Microestrutura.....	42
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1	PATENTE .....	43
5.2	CAPÍTULO DE LIVRO .....	44
5.3	ARTIGO 1 – APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE STARMERELLA BOMBICOLA CONTRA FUNGOS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS .....	44
5.4	ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DE UM NOVO FILME COMESTÍVEL COM AMIDO DE MANDIOCA ACRESCIDO DE SOFOROLIPÍDIOS LACTÔNICOS DE STARMERELLA BOMBICOLA .....	68
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A deterioração microbiana de alimentos tem sido uma das maiores causas de perdas nas indústrias, diminuindo a produtividade e causando danos à saúde humana. Diante disto, para a prevenção da contaminação microbiana tem sido uma tendência a utilização de aditivos naturais em substituição aos aditivos sintéticos, atendendo uma demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis, de fontes renováveis e biodegradáveis. Portanto, pesquisas são de fundamental importância para encontrar substâncias naturais, que sejam capazes de substituir os aditivos sintéticos e tradicionais de forma efetiva e segura.

Os microrganismos deteriorantes podem estar veiculados à água e em alimentos de origem animal e vegetal, frescos ou processados. Estes microrganismos causam alterações químicas e físicas nos alimentos, alterando o aspecto, cor, odor, textura e sabor. Os principais responsáveis pela deterioração de produtos alimentícios são os fungos. Eles são eucariotos, quimiorganotróficos, reproduzem-se por meio de esporos, salvo algumas exceções, e têm alto potencial de crescimento, relacionados aos fatores extrínsecos e intrínsecos do alimento. Durante a germinação dos esporos, algumas espécies de fungos podem produzir micotoxinas, que constituem um perigo natural na cadeia de produção alimentícia. Assim, se tornam necessárias medidas de controle do desenvolvimento destes microrganismos com a finalidade de garantir a segurança desses alimentos.

Os fungos se desenvolvem principalmente em alimentos com teor de umidade intermediário, como produtos de panificação, entretanto, apresentam capacidade de crescimento em uma ampla escala de atividade de água, pH e temperatura e utilizam grande variedade de substratos como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos orgânicos.

Diante desse contexto, abre-se uma nova oportunidade a incorporação de biossurfactantes como aditivos alimentares, uma vez que estes possuem características que correspondem à atividade antifúngica. Podendo ser utilizados indiretamente, como sanitizantes de superfícies de contato com o alimento ou diretamente, como aditivos alimentares.

Os soforolipídios são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolípídeos, que têm propriedades similares aos surfactantes petroquímicos, além de apresentarem baixa toxicidade, biodegradabilidade, menor impacto ambiental, alta seletividade e atividade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Também dispõem de características físico-químicas atrativas para aplicações biotecnológicas industriais como ação emulsificante, espumante, umectante, solubilizante, são agentes anti adesivos e antimicrobianos, o que pode contribuir para diversos setores industriais.

Os soforolipídios podem ser utilizados como agentes antimicrobianos e a sua incorporação em filmes de amido pode ser considerada uma alternativa para várias aplicações na indústria alimentícia. Essa matriz polimérica tem baixo custo e pode agregar valor ao produto pelo aumento da vida útil e da qualidade.

Considerando a capacidade metabólica da *Starmerella bombicola*, as propriedades do soforolipídios e as possíveis aplicações industriais, este trabalho visa produzir, caracterizar e testar a capacidade antifúngica dos soforolipídios em fungos deteriorantes de produtos alimentícios, bem como desenvolver um filme comestível como proposta para potencial aplicação na conservação de alimentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar a capacidade antifúngica do soforolipídios de *Starmerella bombicola* contra fungos contaminantes de alimentos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção de soforolipídios de *S. bombicola* variando as concentrações do ácido oleico e glicose em frascos de Erlenmeyer;
- Acompanhar o processo fermentativo pelo consumo de ácido oleico e glicose, crescimento microbiano e produção de soforolipídios, durante 120 h de fermentação, em biorreator na condição otimizada anteriormente;
- Extrair, quantificar e caracterizar os soforolipídios produzidos por técnicas gravimétricas, cromatográficas e ressonância magnética nuclear;
- Avaliar o efeito dos soforolipídios contra contaminantes de alimentos *Aspergillus flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Brotrytis cinerea* e *Rhizopus* spp.;
- Produzir filmes de amido comestíveis com adição de soforolipídios;
- Caracterizar e verificar a ação antifúngica dos filmes com soforolipídios para potencial uso na indústria de alimentos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CONTAMINAÇÕES FÚNGICAS EM ALIMENTOS

Aspectos gerais de qualidade e higiene sanitárias são cruciais na aceitação de qualquer produto alimentício. A principal forma de deterioração dos alimentos é de origem microbiológica, principalmente por fungos, o que traz uma enorme preocupação relacionada à segurança alimentar e saúde do consumidor (OLIVEIRA et al., 2015). Os fungos são organismos eucarióticos, multicelulares e filamentosos, são decompositores e parasitas facultativos que podem obter nutrientes através de organismos mortos ou vivos pela decomposição de sua matéria orgânica (BROOKS et al., 2012). Estão amplamente distribuídos na natureza e apresentam diferentes condições de multiplicação, capacidade de esporulação e disseminação (PITT; HOCKING, 2009).

Essa contaminação pode ocorrer durante a formação das sementes, no armazenamento, no solo e principalmente por apresentarem substratos adequados para o seu desenvolvimento como, carboidratos, proteínas e lipídeos e possuem elevado teor de água livre (ROSSETTO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2015). Os fungos contaminantes mais frequentes pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus* e *Botrytis*. (PITT; HOCKING, 2009; SARANHAJ; GUEETHA, 2012; NJOBEH et al., 2010; TERZI et al., 2014).

A contaminação dos alimentos por fungos fica visível a partir do aparecimento do micélio visível oriundo de esporos na superfície do produto, que pode ocorrer após o término da germinação e antes do final da vida útil do produto, gerando rejeição pelo consumidor (BAERT et al., 2007). Além da aparência indesejável, os fungos são capazes de provocar alterações no sabor e na qualidade dos alimentos, promovendo odores desagradáveis ocasionados por diferentes graus de deterioração, ou ainda, trazer riscos à saúde humana e animal, devido à produção de micotoxinas (SOUZA et al., 2017).

Micotoxinas são metabólitos secundários proeminentes produzidos por espécies que pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* e são produzidas de forma natural em produtos agroalimentares, sendo tóxicas para animais e humanos mesmo quando ingeridas em pequenas quantidades. As mais expressivas são as

aflatoxinas, ocratoxina A, patulina e fumonisina, sendo as duas primeiras de grande preocupação em armazenamento incorretos de cereais e grãos (ANFOSSI et al., 2016 ; NJOBEH et al., 2010 ; TERZI et al., 2014; SOARES; ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2013; YEHA, 2014). Os produtos passíveis de contaminação por aflatoxinas são: amendoim, figo, milho, sementes oleaginosas, frutas, vegetais, sorgo, cacau e especiarias. A ocratoxina é identificada em diversos tipos de grãos e cereais, tais como: café, cacau, soja, nozes, uva, vinho e cerveja (MAKUN et al., 2012; HAIGHTON et al., 2012 ; STREIT et al., 2012; BELLVER-SOTO et al., 2014). A patulina encontra-se em frutas em geral, pães, queijo, produtos cárneos e cereais e a fumonisina é bem evidente em grãos de milho (PUDEL et al., 2010; VARGA et al., 2011; MOGENSEN et al., 2011; SOARES et al., 2012; MOGENSEN, 2012).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são caracterizados pela presença de conidióforo que dão origem às estirpes e apresentando seu crescimento simultâneo e sincrônico. Quando na superfície dos alimentos, apresentam coloração verde, azul, preta ou amarelada e estão associadas principalmente com a deterioração pós-colheita de produtos agrícolas, como cereais e oleaginosas (PITT; HOCKING, 2009).

O gênero *Fusarium* é caracterizado por possuir micélios aéreos e ramificados. Uma indicação de que esteja envolvido na contaminação do alimento, é a presença de esporulação com coloração variando de laranja a amarela (MACIEL, 2012; FRIAS, 2014; GORDON et al., 2015). Está associado à podridão de raízes, caules e frutas (MENEZES et al., 2010).

Fungos da classe de Zigomicetos, como os *Rhizopus spp.* apresentam como características a rápida multiplicação e produção de micélios aéreos não septados (PITT; HOCKING, 2009). Resistem a condições extremas, como baixa atividade de água, tratamentos térmicos e químicos e seus bolores possuem coloração esverdeada, que produzem enzimas pectinolíticas, responsáveis por deteriorar alimentos de origem vegetal causando a podridão (GAVA et al., 2008; PITT; HOCKING, 2009)

Os fungos do gênero *Botrytis* apresentam conidióforos longos, hifas ramificadas de cor marrom acinzentada. As infecções causadas por esse gênero são geralmente iniciadas por conídios, provocando mofos densos de cor cinza. Causam deterioração em uma ampla variedade de frutas, hortaliças e culturas ornamentais (WALKER et al., 2011 ; PLESKEN et al., 2015)

Devido a essas contaminações, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é de grande relevância, pois, existem fungos resistentes aos biocidas atuais e o uso excessivo de agroquímicos e deslocamento da população fúngica, favorece a seleção de mutantes resistentes, o que torna necessária a produção de novos antifúngicos que contenham principalmente características eco amigável (DEISING et al., 2008 ; GUILGER et al., 2017; NYILASI et al., 2010).

### 3.2 BIOSURFACTANTE: SOFOROLIPÍDIOS

A crescente preocupação ambiental entre os consumidores, a deterioração dos alimentos e as atuais legislações têm incentivado a indústria a buscar produtos alternativos para a substituição dos surfactantes sintéticos, como os produzidos por microrganismos, que são conhecidos como biossurfactantes (NAUGHTON et al., 2019).

Devido à demanda entre os consumidores em reduzir o uso de compostos sintéticos de fonte não renovável por ingredientes e aditivos naturais, os surfactantes microbianos surgem como uma alternativa eco amigável aos surfactantes sintéticos (MOHAN, et al. 2006). Apresentam estabilidade em temperaturas extremas, variações de pH e salinidade permitindo o direcionamento em diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, petrolífera, alimentícia e agrícola (SOUZA et al., 2018; NAUGHTON et al, 2019).

Os biossurfactantes exibem uma variedade de propriedades para a indústria alimentícia, como ação emulsionante, espumante, umectante, solubilizante e antimicrobiana, além de apresentarem fonte renovável, serem biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade (SINGH; CAMEOTRA, 2004; MULLIGAN, 2005; BANAT, et al. 2014).

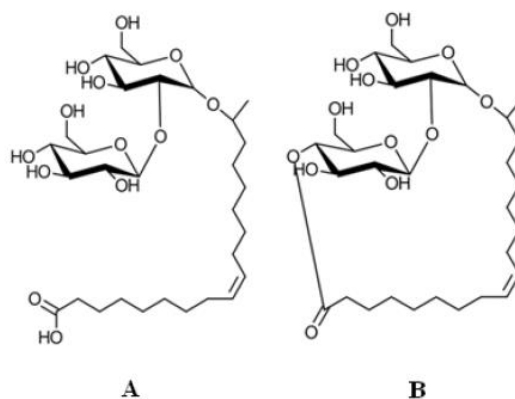
Fazem parte de um grupo estruturalmente diversificado de moléculas de superfície, obtidos a partir do metabolismo secundário e produzidas por uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. São categorizados em grupos de baixa (glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros) e alta massa molecular, os poliméricos. Os glicolipídios exibem grande potencial comercial, devido sua alta produtividade (PEREIRA, 2017).

Os soforolipídios são biossurfactantes classificados como glicolípidos extracelulares. É uma molécula constituída por um dissacarídeo sofrorose (2'-O-β-D-glicopiranosil-1-β-D-glicopiranoose), unidos por uma ligação β-glicosídica entre o carbono 1' e o carbono terminal ( $\omega$ ) ou sub-terminal ( $\omega-1$ ) à uma longa cadeia hidrofóbica de ácido graxo que geralmente, contém 16 ou 18 carbonos (ASHBY; SOLAIMAN, 2010; ROELANTS et al., 2019).

Esses metabólitos são produzidos de duas formas estruturais principais, acídica (A) e lactônica (B) (Figura 1). Na forma acídica, é ligado apenas um dímero de glicose na extremidade do ácido carboxílico, exibindo uma cadeia aberta. A estrutura lactônica é esterificada internamente na posição 4" da sofrorose, resultando em uma cadeia fechada. Ambas as formas podem dispor de grupos acetil em sua porção da sofrorose nas posições 6' e/ou 6" e de diversidades na estrutura do ácido graxo como o número de carbono, a hidrogenação e as insaturações, devido às condições e substratos utilizado no processo fermentativo, que podem resultar em alterações nas propriedades físico-químicos e biológicas, acarretando em diferentes aplicabilidades desses compostos (MORYA et al., 2013; ASMER et al., 1988; CAVALERO; COOPER, 2003; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015; ASHBY; SOLAIMAN, 2010; PAULINO et al., 2016).

Em geral, os soforolipídios lactônicos diacetilados ou monoacetilados apresentam melhor atividade antimicrobiana e possuem tensão superficial mais baixa quando comparados com moléculas de lactônicos não acetilados e acídicas. (SOLAIMAN; ASHBY; UKNALIS, 2017).

**Figura 1.** Formas estruturais dos soforolipídios: (A) acídica e (B) lactônica



**Fonte:** Solaiman, D. K.Y.; Ashby, R. D.; Uknalis, J., (2017).

Nas décadas de 60 e 70 vários microrganismos produtores de soforolipídios foram identificados, destacando *Torulopsis magnolia* (*Candida apicola*), *Torulopsis gropengiesseri*, *Torulopsis bombicola* e *Candida bogoriensis* (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011; PAULINO et al., 2016). Entretanto, hoje existem novas cepas produtoras (Tabela 1), porém as melhores produções são com a levedura chamada *Starmerella bombicola* (*Candida bombicola*) (PAULINO et al., 2016).

**Tabela 1.** Principais microrganismos produtores de soforolipídios

<b>Microrganismos</b>	<b>Referências</b>
<i>Candida albicans</i>	Gaur et al., 2019
<i>Candida apicola</i>	Kurtzman et al., 2010
<i>Candida floricola</i>	Konish et al., 2017
<i>Candida kuoi</i>	Price et al., 2012
<i>Candida riidocensis</i>	Kurtzman et al., 2010
<i>Candida stellata</i>	Kurtzman et al., 2010
<i>Candida tropicalis</i> Y9	Chandran; Das, 2011
<i>Candida parapsilosis</i>	Garg, Priyanka, Chatterjee, 2018
<i>Cryptococcus</i> VITGBN2	Basak et al., 2014
<i>Starmerella bombicola</i>	Silveira et al., 2019; Kaur et al., 2019
<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	Van Bogaert; Zhang; Soetaert, 2011
<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	Sen et al., 2017; Garay et al., 2017
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Dolman et al., 2016; Jia et al., 2016; Jiménez-Penalver et al., 2017
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	Wang et al., 2019
<i>Wickerhamomyces (Pichia) anomalus</i>	Van Bogaert; Zhang; Soetaert, 2011
<i>Wickerhamiella anomalus</i>	Souza et al., 2017

### 3.3 PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS

Para a produção de soforolipídios são necessárias uma fonte hidrofóbica e uma hidrofílica fornecida ao meio, sendo geralmente ácido graxo e glicose, respectivamente. Se nenhum substrato hidrofóbico estiver presente, os ácidos graxos serão formados pela via de síntese de novo a partir de derivados de acetil-CoA vinda

da via da glicólise. Se a concentração de glicose for baixa, uma parcela dos ácidos graxos será dirigida para a via de  $\beta$ -oxidação para realizar a manutenção das células e não para a síntese de soforolipídios (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

A biossíntese dos soforolipídios começa com a hidroxilação do ácido graxo, através de duas possíveis vias: síntese de novo e incorporação direta. A síntese de novo ocorre quando o ácido graxo entra na via de  $\beta$ -oxidação e o substrato oxidado libera um acetil-CoA que, mesmo estando envolvido em diversas rotas, neste caso, será destinado a formação de uma nova cadeia longa de ácidos graxos, que posteriormente serão hidroxilados e incorporados aos soforolipídios. Na incorporação direta não acontece oxidação do substrato na via de  $\beta$ -oxidação e sim a hidroxilação obtendo o mesmo comprimento da cadeia do substrato, integrando-se no soforolipídios (CAVALERO; COOPER, 2003; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

Diferente dos ácidos graxos, não há evidências da incorporação direta de açúcares nos glicolipídios. Dessa forma, independente do açúcar utilizado como substrato, sendo eles glicose, frutose, manose, sacarose ou maltose, a porção hidrofílica dos soforolipídios será sempre soforose (duas moléculas de glicose). Grande parte do substrato hidrofílico (geralmente a glicose) presente no meio é metabolizada pela via glicolítica, assim, o carbono presente na estrutura dos soforolipídios é oriundo da gliconeogênese (HOMMEL et al., 1994).

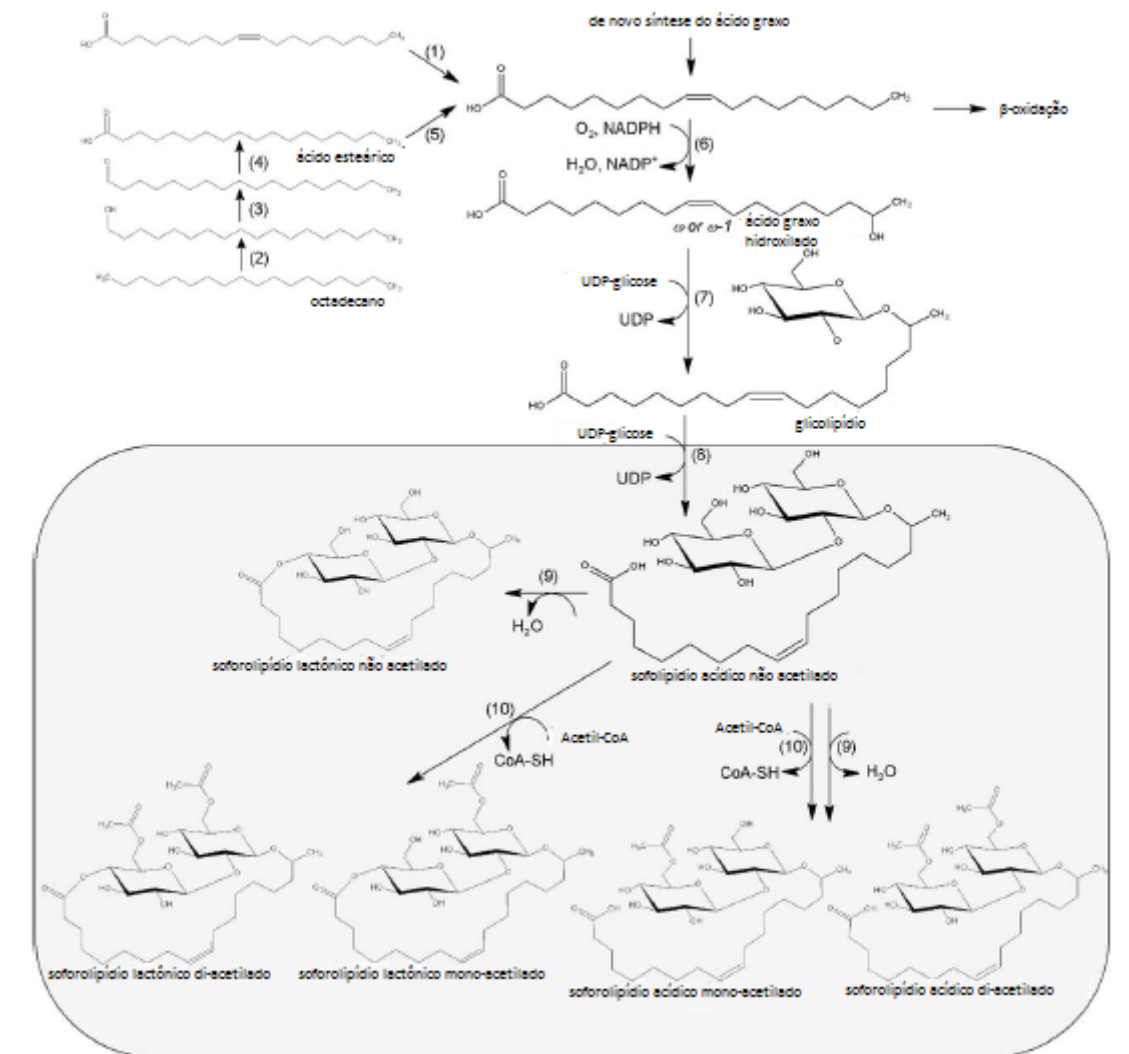
A enzima citocromo P450 monooxigenase NADPH dependente, está presente em leveduras, sendo responsáveis pela hidroxilação no carbono terminal ( $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ) dos ácidos graxos ou alcanos. Desta forma, podem ser metabolizados pela via da  $\beta$ -oxidação ou iniciar a síntese dos soforolipídios. (HOMMEL et al., 1994; VAN BOGAERT et al., 2009; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

A síntese de soforolipídios pode ser exemplificada pela a Figura 2 onde as etapas 1 a 5 são o fornecimento de diferentes fontes lipídicas, alcanos, álcool (2) ou aldeídos (3) formando o ácido graxo esteárico (C18:0) (4), ou também de um triacilglicerol, que anteriormente necessitam ser degradados pelas enzimas lipases possibilitando a liberação dos ácidos graxos (C18:1). O oleico (1), esteárico (5) e o gerado pela síntese de novo resultam no ácido oleico, que pode ser oxidado ou ser utilizado para a síntese de soforolipídios (COOPER; PADDOCK, 1984; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). Nas etapas seguintes (6 e 7) é onde ocorre direcionamento do ácido graxo, o que depende das condições metabólicas da célula,

disponibilidade de substratos para a manutenção celular e da síntese de biomoléculas. Assim, o ácido graxo poderá sofrer  $\beta$ -oxidação gerando energia para a célula ou hidroxilação através da redução do NADPH pela enzima (etapa 6) que resultará em uma cadeia de ácido graxo hidroxilado (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

Nas etapas 7 e 8, após a formação do ácido graxo hidroxilado, duas moléculas de glicose (UDP-glicose) serão adicionadas através das enzimas glicosiltransferase I e II. Uma molécula de glicose liga-se na posição C1' ao grupamento hidroxila  $\omega$  ou  $\omega$ -1 do ácido graxo e a segunda glicose na posição C2' (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011), tendo na etapa 9 a perda de uma molécula de água e a formação dos soforolipídios lactônicos, através da ação da enzima lactonesterase. Na etapa 10, os acídicos não acetilados obtidos, podem formar soforolipídios lactônicos mono e di acetilados, que ocorre devido a ação da enzima acetiltransferase com a adição de uma molécula de acetilCoA.

**Figura 2.** Etapas da via metabólica da biossíntese de sofrorolipídios



**Fonte:** Van Bogaert; Zhang; Soetaert (2011).

Os sofrorolipídios são sintetizados principalmente na fase estacionária, sendo a quantidade e os tipos produzidos dependentes de alguns fatores como microrganismo, fonte de carbono, nitrogênio e sais utilizados e as condições de temperatura, agitação e pH no processo fermentativo (TULLOCH; SPENCER; GORIN, 1962; DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1992).

Os substratos constituem o fator de grande importância para a biossíntese dos sofrorolipídios e são necessárias fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas (ASMER et al., 1988; COOPER; PADDOCK, 1984; DAVILA; RÉMY; VANDECASTEELE, 1992). Assim, cultivos são efetuados com uma fonte primária hidrofílica os carboidratos e uma fonte secundária hidrofóbica os lipídios,

hidrocarbonetos, óleos vegetais e gorduras animais (BAJAJ; TILAY; AMAPURE, 2012; COOPER; PADDOCK, 1984; HOMMEL et al, 1994; RAU et al., 2001).

Várias fontes de carbono foram relatadas para a produção desse metabólito, como glicose, sacarose, frutose, manose, maltose, rafinose, lactose, galactose e xilose. Entretanto, a glicose é a principal fonte de carbono hidrofílica utilizada e com melhores rendimentos (BADIA; SHAH, 2010; BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012).

Dolman et al. (2016) estudaram a produção de sofrorolipídios utilizando glicose e atingiram 623 g/L em 1.023h. Solaiman et al. (2007), utilizaram melaço de soja refinado como carboidrato e atingiram 75 g/L demonstrando que outros mono e dissacarídeos podem diminuir a produção de sofrorolipídios, porém é viável devido à utilização de resíduos como substrato, acarretando na diminuição do custo de produção. Satpute et al. (2017) e Roelants et al. (2019) destacaram que a produtividade foi reduzida com a aplicação de subprodutos em comparação com substratos puros.

Diversas fontes hidrofóbicas como alcanos, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos e óleos vegetais influenciam diretamente na estrutura dos sofrorolipídios formados (acídico e lactônico). Dentre as fontes lipídicas, Felse et al. (2007) mostraram que as maiores produções ocorreram com a utilização dos ácidos graxos C16 e C18 e as menores com os C14 e C20, isso ocorre porque cadeias maiores restringem a biodisponibilidade enquanto as cadeias médias são metabolizadas mais facilmente pela via da  $\beta$ -oxidação, deixando de ser incorporadas devido à enzima citocromo P450 monooxigenase (MORYA et al., 2013; CLAUS; VAN BOGAERT, 2017).

Zhang et al. (2018) estudaram diversas fontes hidrofóbicas alternativas em comparação com o ácido oleico e descreveram uma produção de 477 g/L nesta fonte. Gogate e Pandit (2015) reaproveitaram o óleo de soja e atingiram uma produção de 72 g/L. Morya et al. (2013) utilizaram óleo de coco na composição do meio e obtiveram resultado de 54 g/L. Autores observaram também que o grau de insaturação pode afetar a produção dos sofrorolipídios: ácidos graxos monoinsaturados (C18:1) resultaram em maiores produção do que os ácidos graxos C18:2 ou C18:3 (CLAUS; VAN BOGAERT, 2017).

Entre as fontes de nitrogênio utilizadas encontram-se o extrato de levedura, extrato de malte, peptona bacteriológica, peptonas de soja e milhocina. O extrato de levedura é considerado a melhor fonte para as produções de sofrorolipídios e

biomassa, por apresentar vitaminas, elementos traços como zinco, magnésio, ferro entre outros (RISPOLI; BADIA; SHAH, 2010; VEDARAMAN; VENKATESH, 2010). Estudos apontam que altas concentrações são favoráveis para a biomassa, entretanto, isso diminui a produção de soforolipídios, devido ao esgotamento das fontes de energia através do crescimento celular. Desta forma, por serem produzidos ao final da fase exponencial e início da fase estacionária, a síntese ocorre sob condições limitantes de nitrogênio, levando a um aumento da atividade das enzimas que estão envolvidas na biossíntese desse metabólito (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999; ZHOU; KOSARIC, 1995; RAU et al., 2001; VEDARAMAN; VENKATESH, 2010). Jiménez-Peñalver et al. (2017) relataram que quando a glicose é substituída por outro substrato como melão de cana-de-açúcar ou melão de soja, que são ricos em açúcar e nitrogênio, isso pode permitir a exclusão do extrato de levedura ou ureia no meio de fermentação, baixando o custo final de produção.

O controle de pH na produção de soforolipídios pode ser importante, pois quando controlado pode haver um aumento de até 27,6% na produção, sendo o pH ótimo descrito em 3,5. Durante a fermentação o pH inicial é mantido entre 5,0 e 6,0 para promover o crescimento celular, posteriormente na fase estacionária o pH é mantido em 3,5, estimulando assim a produção dos soforolipídios (HU; JU, 2001; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010; MORYA et al., 2013). Entretanto, alguns autores como Minucelli et al. (2017) não controlaram o pH devido à queda natural de 6,0 para 3,5 durante a fase estacionária.

A oxigenação é essencial na biossíntese dos soforolipídios, pois na fase estacionária a enzima citocromo P450 monooxigenase necessita de oxigenação molecular para a sua atividade. Porém, altas concentrações de substratos podem intervir nas taxas de transferência do oxigênio, tornando-o insuficiente e afetando assim o crescimento celular e a produção dos soforolipídios (VEDARAMAN; VENKATESH, 2010; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

Vederaman e Venkaesk (2010) demonstram que a temperatura ótima para a produção de soforolipídios foi de 30°C, porque estimula o crescimento celular e o consumo de substratos. Também o tipo de processo fermentativo influencia na produção, podendo ser utilizados processos fermentativos em batelada, batelada alimentada e contínua. Os soforolipídios convencionais são produzidos através de fermentação em batelada submersa, tendo poucos estudos da fermentação em estado sólido (KIM; YUN; KIM, 2009; KOH; GROSS, 2016).

A Tabela 2 reúne dados de produção de soforolipídios com diferentes fontes e condições de cultivo.

**Tabela 2.** Produção de soforolipídios variando as condições de cultivo

Soforolipídios (g/L)	Fonte hidrofílica e hidrofóbica	T (°C)	Agitação (rpm)	Tempo (h)	Referência
125	Resíduos agroindustriais	30	200	92	Kaur et al., 2019
69,83	Glicose e oleico	30	450	288	Silveira et al., 2019
477	Glicose e oleico	30	-	300	Zhang et al., 2018
60,4	Glicose	19	200	72	Sen et al., 2017
39,81	Gordura de frango e glicose	30	150	120	Minucelli et al., 2017
10	Melaço de cana óleo de coco	25	180	168	Hoa et al., 2017
32, 26, 21 e 19 respectivamente	Palma, tapis, ratawi, melita e glicose	30	180	120	Shah et al., 2017
484	Oleico e glicose	30	450	320	Jia et al., 2016
199	Oleico e glicose	25	350	220	Delbeke et al., 2016
623	Canola e glicose	25	-	1.023	Dolman et al., 2016
72	Óleo de cozinha e glicose	30	300	240	Meddikeri; Gogat; Pandit, 2015
54	Óleo de coco e glicose	25	250	192	Morya et al., 2013
95,4	Oleico	25	200	168	Kurtzman et al., 2010

### 3.4 APLICAÇÕES DOS SOFOROLIPÍDIOS

Os soforolipídios dispõem de características físico-químicas atrativas para aplicações industriais e biotecnológicas, pois possuem propriedades anfífilas capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial de inúmeros compostos. Essas características conferem alto valor agregado como: agente de limpeza, ação emulsificante, espumante, umectante, solubilizante, agente anti adesivo e antimicrobiano para várias cepas bacterianas e fúngicas, o que pode ser importante para diversos setores industriais (ROELANTS et al., 2019; BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012).

Atualmente são os biossurfactantes mais aplicados na indústria e seus produtos são disponíveis em nível comercial. Destacam-se as aplicações em formulações de cosméticos (MAENG et al., 2018; MORYA et al., 2013), recuperação de petróleo (BANAT, 1995; BROWN; ROBINSON; SPRINGHAM, 1986; PESCE, 2002), biorremediação ( MINUCELLI et al., 2017; TANG et al., 2018), na indústria de alimentos como estabilizantes e emulsificantes (AKARI; AKARI, 1987; NITSCHKE; COAST, 2007; NITSCHKE; SILVA, 2017), na indução de enzimas (LO; JU, 2009; GROSS; SHAH, 2007) e na área da saúde como antivirais, anticâncer e anti-inflamatórios (SHAH et al., 2005; CHEN et al., 2006; RASHAD et al., 2014; SHAO et al., 2012; JOSHI-NAVARE; SHIRAS; PRABHUNE, 2011; ZIEMBA et al., 2017).

São aceitos e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) (GUPTA, 2012). Também exibem diversos efeitos terapêuticos, como agentes antitumorais, anti-inflamatórias, antivirais e lise de microrganismos patogênicos da pele e cabelo (BORSANYIOVA et al., 2015; DEY et al., 2015; DIAZ DE RIENZO et al., 2015; MAGAR; ROTH LISBERGER; WZGNER, 1987), atuam como biopesticidas e agentes antifúngicos contra patógenos de plantas e alimentos (YOO; LEE; KIM, 2005; SEN et al., 2017). A atividade biológica antimicrobiana está relacionada com mecanismos que envolvem a alteração da permeabilidade de membranas celulares dos patógenos (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002; SHAH et al., 2007; ZARAGOZA et al. 2009).

As formas lactônicas e acídicas de soforolipídios apresentam aplicações específicas. A forma lactônica tem sido utilizada como aditivo em xampus, sabonetes e detergentes (ASHBY et al., 2013); em cosméticos, promove maior síntese de colágeno e estimula o metabolismo de fibroblastos, além de apresentarem melhores propriedades de tensão superficial e atividade antimicrobiana (GLENNIS; COOPER, 2006). As formas acídicas têm sido descritas com efeito terapêutico em tratamentos de pele, como agente hidratante, melhorando a solubilidade e formação de espuma (PAULINO et al., 2016). A presença de grupos acetil melhora a atividade antiviral e a comunicação celular, melhorando as propriedades biológicas e físico-químicas do metabólito (SHAH et al., 2005)

#### 3.4.1 Atividade Antifúngica

A utilização dos biossurfactantes como agente antifúngico tem se mostrado promissora (CHUNG et al., 2000; ABALOS et al., 2001). A atividade antifúngica tem sido apresentada para as classes dos glicolipídios, como ramnolipídios e soforolipídios

(DEBODE et al., 2007; VARNIER et al., 2009), e para os lipopeptídeos (TRAN et al. 2008), que inclui a surfactina, iturina e fengicina (VELMURUGAN et al., 2009; ARGUELLES-ARIAS et al., 2009; CHEN et al., 2009; SNOOK et al., 2009; MOHAMMADIPOUR et al., 2009; GROVER et al.2010).

Embora a ação contra fungos contaminantes em alimentos tenha sido pouco estudada, existe um crescente interesse entre os consumidores em reduzir o uso de produtos químicos sintéticos e substituí-los por produtos de origem natural (BANNAT et al., 2010; DAS et al., 2010). Diante dessa preocupação, os soforolipídios se destacam por possuírem baixa toxicidade e propriedades biológicas e químicas particulares que ganham a atenção dos pesquisadores. Entretanto, a atividade antifúngica dos soforolipídios depende de fatores como a sua forma molecular (acídicas e lactônicas), o microrganismo que o produz, a espécie de patógeno e a concentração utilizada (SHARMA; SAHARAN; KAPIL, 2016; ZHANG et al., 2017).

A ação antimicrobiana dos soforolipídios acontece devido ao mecanismo de desestabilização da membrana do microrganismo, o que leva a ruptura e aumento de permeabilização. Esse mecanismo está relacionado com a diminuição da tensão superficial e interfacial de compostos e materiais, que dependem da natureza anfifílica do metabólito, ou seja, interações sinérgicas entre as porções da soforose e o ácido graxo que produzem o efeito surfactante (VALOTTEAU et al., 2017; SEN et al., 2017).

As características antifúngicas de soforolipídios e ramnolipídios foram avaliadas contra fungos patogênicos de plantas por Yoo et al. (2005) que observaram que 8 % do crescimento micelial de fitopatógenos (*Phytophthora* sp. e *Pythium* sp.) foi inibido por soforolipídios a uma concentração de 500 mg/L, e a motilidade zoósporo de *Phytophthora* sp. diminuiu 80 % na presença de 100 mg/L de soforolipídios. Para a ruptura do zoósporo foram necessárias concentrações duas vezes superiores.

Sen et al. (2017) também avaliaram a atividade antifúngica de soforolipídios produzido por *Rhodotorula babjevae* YS3 e observaram efeito inibitório contra um grupo amplo de fungos patogênicos, tais como: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *Corynespora cassiicola* e *Trichophyton rubrum*. A atividade foi verificada através da concentração inibitória mínima (CIM) de 62 µg/mL, 125 µg/mL, 125 µg/mL, ≥2000 µg/mL, e ≥1000 µg/mL, respectivamente.

A ação inibitória de soforolipídios também foi observada contra biofilmes fúngicos. Haque et al. (2016) verificaram que os soforolipídios de *S.bombicola*

MTCC1910 tiveram ação inibitória contra a formação de biofilme de *Candida albicans* e efeito na redução da viabilidade de biofilmes pré-formados. Posteriormente, os autores visualizaram em microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser o efeito dos sorfolipídios na formação de filmes de *C. albicans*.

Yuan, Yang e Cheng (2012) estudaram a atividade antimicrobiana de sorfolipídios produzidos por *Wickerhamiella domercqiae* Y2A contra patógenos que causam podridão em frutas *in natura*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea* (Grey mold) e *Mucro*. Os resultados mostraram que com a concentração de 2,0 g/L de sorfolipídios, a taxa de inibição dos esporos foi superior a 75%. Quando a concentração atingiu 4,0 g/L, a inibição foi superior a 85%, sendo quase completa quando a concentração utilizada foi 10,0 g/L, apresentando 95%.

Estes estudos demonstram o grande potencial desse biossurfactante como agente antifúngico alternativo, agindo como sanitizante, antimicrobiano ou germicida em diversos setores industriais. Considerando a importância do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra fungos contaminantes da indústria alimentícia, as propriedades dos sorfolipídios possuem grande potencial para aplicação industrial.

### 3.5 FILMES COMESTÍVEIS

Filmes comestíveis são definidos como uma fina camada de material que proporciona uma barreira contra umidade, oxigênio e aromas, sendo utilizados na proteção dos alimentos a fim de aumentar sua vida útil (McHUGH, 2000; CAO; FU; HE, 2007). O filme pode ainda desempenhar uma ação coadjuvante auxiliando na manutenção de textura e valor nutricional dos alimentos (ASSIS; BRITTO, 2014).

Diversos materiais têm sido investigados no desenvolvimento dos filmes comestíveis, principalmente de fontes renováveis (BAHRAM et al., 2014). Os polissacarídeos, proteínas, lipídios e derivados são os mais utilizados, adicionados ou não de plastificantes, como o sorbitol e glicerol. Dentre os polissacarídeos, o amido é o biopolímero mais empregado na produção dos filmes pelo seu baixo custo e elevada disponibilidade (MALI et al., 2005).

Segundo Luvielmo e Lamas (2012), o amido de mandioca é uma matéria-prima abundante com elevado potencial para elaboração de filmes e revestimentos

comestíveis, pois forma películas resistentes e transparentes, apresenta baixo custo e proporciona uma barreira eficiente contra gases.

Estruturalmente, os grânulos de amido são constituídos por amilose e amilopectina, cuja proporção difere com base na fonte botânica. O teor de amilose da maioria dos amidos está entre 20 e 30%, podendo variar, o que irá conferir características distintas para cada tipo de amido. A amilose é composta basicamente por ligações ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) de resíduos de D-glicopirranose (HOOVER et al., 2010) e possui excelente capacidade de formar filmes (CAMPOS et al., 2011). A amilopectina constitui-se de uma grande molécula ramificada, composta de ligações lineares ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) e ligações ramificadas ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) de D-glicopirranose (HOOVER et al., 2010).

Os filmes comestíveis podem ser produzidos de diversas maneiras, sendo as principais por extrusão e técnica de *casting* (FENG et al., 2016; GHANBARI et al., 2018). O filme de amido pode ser obtido através da solubilização do polímero em solvente, geralmente água, sob temperaturas entre 65 e 100 °C, ocorrendo a gelatinização (desestruturação dos grânulos nativos) e a formação da matriz polimérica do filme (KIM; JANE; LAMSAL, 2017; ZHONG et al., 2009).

A gelatinização do amido é o processo da quebra das ligações de hidrogênio que ocorrem entre as cadeias de amilose e amilopectina, no qual os grânulos incham, dependendo da quantidade de água disponível (CARVALHO, 2008). Assim, após a produção de uma solução formadora de filme, coloca-se sobre uma base para a secagem (KIM; JANE; LAMSAL, 2017). A espessura do filme dependerá da quantidade de suspensão inserida sobre o suporte e da quantidade de sólidos empregados na formulação da solução filmogênica. Após a secagem e completa evaporação do solvente, o suporte com o filme deve ser armazenado em umidade relativa controlada para padronização das condições de caracterização do material (MARTINEZPARDO et al., 2017).

Após a gelatinização do amido, aditivos podem ser incorporados, tais como enzimas, prebióticos e aromatizantes, que visam melhorar a qualidade e características sensoriais dos alimentos (BERSANETI et al., 2016; LUVIELMO; LAMAS, 2012). Assim como ingredientes que contenham agentes antimicrobianos e antioxidantes a fim de melhorar a proteção que o filme já fornece, acarretando aumento da *shelf-life* do produto (JIMENÉS et al., 2012).

Trabalhos com o uso de agentes antimicrobianos incorporados aos filmes biodegradáveis têm se destacado (BAHRAM et al., 2014). Isso porque o aumento da

exigência do consumidor por alimentos naturais, saudáveis e sem adição de ingredientes químicos, faz com que haja modificações e investimentos em tecnologias nas indústrias, garantindo assim um produto similar ao *in natura* para o consumidor final (POSSER, 2016). Diante disso, diferentes antimicrobianos foram testados em filmes comestíveis, como biossurfactantes e óleos essenciais.

Maniglia et al. (2019), testaram filmes comestíveis de amido de mandioca com propriedades tensoativas, preparados com a utilização do biossurfactante manosileritritol lipídico (MEL) e surfactante sintético dodecil-sulfato de sódio (SDS). O estudo demonstrou que os filmes contendo MEL tiveram maior solubilidade e permeabilidade ao vapor de água, e foram mais flexíveis quando comparados com os filmes contendo SDS e com o padrão de amido, pois os filmes contendo somente SDS em sua composição apresentaram maior rigidez, sendo mais resistentes a ruptura, com menor solubilidade e permeabilidade ao vapor de água. Ambos os surfactantes apresentaram efeitos antimicrobianos, entretanto os autores relataram que o filme contendo SDS apresentaram halos de inibição bem definidos contra bactérias gram positivas, como *Weissella viridescens* e *Staphylococcus aureus* enquanto os filmes de amido contendo MEL não apresentaram halos de inibição definidos.

Adetunji et al. (2018) avaliaram a associação de quitosana e ramnolipídeo em revestimentos comestíveis a fim de prolongar a vida útil de laranjas. Os autores concluíram que o tratamento combinado de ramnolipídeo com quitosana analisados em oito semanas retardou significativamente o amadurecimento, a perda de vitamina C e firmeza da laranja. A ação antimicrobiana do filme também foi testada através do armazenamento das laranjas revestidas por um período de oito semanas. Durante a primeira semana, os tratamentos reduziram o crescimento de bactérias mesófilas e após as oito semanas foram reduzidas as contagens de leveduras e bolores quando comparado ao controle, ou seja, todos os tratamentos testados reduziram significativamente o crescimento microbiano nas laranjas durante o armazenamento.

Revestimentos comestíveis de quitosana com nanoemulsões de timol foram produzidos com o intuito de avaliar a atividade antifúngica contra *B. cinerea* através de revestimento em tomates cerejas. Os revestimentos contendo nanoemulsão de timol apresentaram uma estrutura porosa e heterogênea. Os tomates cereja foram revestidos e armazenados a 5 ° C por 7 dias e seu uso levou a inibição do crescimento do fungo *B. cinerea* no 7° dia, o que pode estar relacionado à liberação controlada de timol do filme para o fruto (ROBLEDO et al., 2018).

Song, Zuo e Chen (2018) desenvolveram filmes de amido de milho e trigo incorporados com óleo essencial de limão e dos surfactantes Span 80 e Tween 80. Os filmes com óleo essencial de limão demonstraram uma diminuição da permeabilidade a vapor de água, da solubilidade e das propriedades mecânicas, porém apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Já os filmes com óleo essencial de limão em conjunto com surfactante (Span 80 ou Tween 80) aumentaram significativamente a atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados e a solubilidade concluindo que os filmes compostos pelos dois ingredientes ativos possuem boas propriedades para futuras aplicações industriais.

Escamilla-Garcia et al. (2017) desenvolveram filmes comestíveis com matriz de quitosana com zeína, acrescidos de três óleos essenciais: anis, laranja e canela. A atividade antifúngica dos filmes foi testada pelo método de disco difusão com concentração de 15,6 ppm. e todos os filmes com adição dos óleos essenciais apresentaram halos com efeitos inibitórios contra *Rhizopus* sp. e *Penicillium* sp..

A indústria alimentícia apresenta um grande apelo no que diz respeito à inovação que possa ser voltada ao consumidor, como a busca filmes e revestimentos comestíveis com o intuito de agregar valor ao produto aumentando sua vida útil e mais que isso auxiliando na preservação do meio ambiente (TRAVALINI, 2019).

Considerando as vantagens e aplicações dos biosurfactantes como agentes antimicrobianos, a experiência do nosso grupo de pesquisa da área, com os estudos de produção, caracterização e aplicações dos soforolipídios em biorremediação e ação antimicrobiana (MINUCELLI et al., 2017; SILVEIRA et al., 2019), e o pequeno número de publicações disponíveis quanto ao uso desse metabólito contra fungos deteriorantes de alimentos, essa pesquisa tem o objetivo de estudar a aplicação dos soforolipídios produzidos por *Starmerella bombicola*, contra fungos contaminantes da indústria alimentícia, e desenvolver um filme como uma alternativa inovadora para evitar perdas pela contaminação microbiana.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Microrganismos

Para a produção de soforolipídios foi utilizada a levedura *Starmerella bombicola* obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA. Para os testes da ação antifúngica *in vitro* foram utilizadas as cepas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Brotrytis cinerea* e *Rhizopus* spp., cedidas pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.1.2 Meios de Cultura

##### 4.1.2.1 Meio de preservação, ativação e pré-inóculo para *Starmerella bombicola*

Meio de preservação em g/L: glicose 10, extrato de levedura 3, peptona 5, extrato de malte 3 e ágar 20.

Meio de ativação em g/L: glicose 100, extrato de levedura 10 e ureia 1.

Meio de pré-inóculo em g/L: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75 (MINUCELLI et al., 2017).

##### 4.1.2.2 Meio de fermentação

Glicose e ácido oleico nas concentrações estabelecidas no planejamento Box Behnken 3<sup>3</sup> (Item 4.2.3.1) e extrato de levedura a 6 g/L (concentração definida em experimentos prévios pelo grupo).

##### 4.1.2.3 Meios para os ensaios de atividade antifúngica

Todas as cepas foram inicialmente cultivadas em meio ágar batata dextrose (ABD). Para a concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado meio RPMI 1640

(contendo glutamina, vermelho fenol, sem bicarbonato de sódio; Sigma Aldrich®) tamponado com ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS; INLAB São Paulo, Brasil) com pH de 7,2 - 7,4; para o teste de diluição em ágar foi utilizado o meio ágar sabouraud dextrose (ASD).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preservação e Inóculo da *Starmerella bombicola*

A levedura foi mantida criopreservada em 25 % glicerol à - 80 ° C (GAO et al., 2013). A manutenção da cepa foi realizada em placas de Petri, sendo os repiques realizados a cada quatro semanas e mantidos sob refrigeração a 4 °C. O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio adicionado de 2 alças de platina com o microrganismo, sendo incubados em shaker a 30 ° C, 150 rpm por 48h. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 4° C, 9.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de solução salina (NaCl 0,9 %). O inóculo foi padronizado em 0,5 g/L de células, relacionada à absorbância em 600 nm com a curva de biomassa em g/L.

### 4.2.2 Avaliação do Ácido Oleico e Glicose na Produção de Soforolipídios por *S. bombicola*

O efeito do ácido oleico e glicose na produção de sofrorolipídio foi realizado utilizando um planejamento Box Behnken 3<sup>3</sup> com 8 combinações, três repetições no ponto central, consistindo em 11 ensaios (Tabela 4). As variáveis testadas foram (X<sub>1</sub>) ácido oleico (125, 188 e 251 g/L) e (X<sub>2</sub>) glicose (100, 150 e 200 g/L). As variáveis codificadas e decodificadas estão na Tabela 3. As fermentações foram realizadas em fracos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL dos diferentes meios de fermentação, a 150 rpm e 30 °C por 120 h. A variável resposta foi sofrorolipídios g/L.

**Tabela 3.** Planejamento Box Behnken 3<sup>3</sup> para avaliação do ácido oleico e da glicose na produção de sofrorolipídios por *S. bombicola*

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Oleico (g/L)	Glicose (g/L)
1	-1	-1	125	100
2	-1	0	125	150
3	-1	1	125	200
4	0	-1	188	100
5	0	1	188	200
6	1	-1	251	100
7	1	0	251	150
8	1	1	251	200
9	0	0	188	150
10	0	0	188	150
11	0	0	188	150

#### 4.2.3 Fermentação em Biorreator de Bancada

A melhor condição obtida pelo planejamento foi transferida para um biorreator de bancada modelo FerMac 320 (Electrolab Biotech Ltda.) com capacidade de 5,0 L e com volume operacional de 3,5 L. O inóculo foi padronizado em 0,5 g/L de células. As condições do reator foram agitação de 450 rpm, oxigenação de 1 vvm, pH foi controlado em 3,5 após 48 h até 120h (SILVEIRA et al, 2019). Amostras foram coletadas a cada 24 h, centrifugadas a 9.000 rpm por 15 min a 4 °C. Nas amostras foram quantificados os sofrorolipídios, o crescimento celular e o consumo de substratos.

#### 4.2.4 Determinação da Biomassa

Foi realizada uma curva a partir do cultivo da *S. bombicola* por 48 h a 30° C e 150 rpm. Após o crescimento celular, o meio foi centrifugado a 9.000 rpm por 15 min a 4 °C e as células ressuspensas em 5 mL de solução salina 0,9 % (m/v). Uma alíquota de 1 mL foi submetida a uma série de diluições que foram submetidas a espectrofotometria a 600 nm. Simultaneamente, três alíquotas de 1 mL foram distribuídas em recipientes de alumínio previamente tarados e encaminhados à estufa

(70°C), até atingir peso constante. Em seguida, foi desenvolvido o gráfico correlacionando os valores da absorbância x peso seco (g/L) encontrando o fator de calibração.

#### 4.2.5 Extração e Quantificação dos Soforolipídios

Os sobrenadantes das fermentações foram submetidos à extração com acetato de etila (1:1), formando duas fases: fase aquosa (descartada) e fase orgânica, contendo os sofrorolipídios e o ácido oleico residual, que em seguida foi rotaevaporada. A fração orgânica obtida foi encaminhada para uma nova extração com os solventes hexano (1:1) para a remoção da fração lipídica e metanol:água (4:1) para extração dos sofrorolipídios brutos. Após evaporação do metanol, os sofrorolipídios brutos foram submetidos a três extrações em funil de separação com acetato de etila e água (3:1) por 40 minutos a 4 °C para eliminação de possíveis açúcares residuais. Posteriormente, os sofrorolipídios foram secos em estufa, para total eliminação do solvente e então liofilizados (MINUCELLI et al., 2017).

A quantificação dos sofrorolipídios foi realizada por método gravimétrico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em comparação com o padrão 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma Aldrich, USA), utilizando detector de arranjo de iodo, coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 da Shimadzu (4,6 x 250 mm; 4,6 mm; 12 nm) e fase móvel em gradiente composto por 30 % de acetonitrila e 70 % de água por 5 minutos, aumentando para 80 % de acetonitrila e 20 % de água por 50 min (MINUCELLI et al., 2017; HU; JU, 2001; WADEKAR et al., 2012).

#### 4.2.6 Determinação de Substratos Residuais

Ao final da fermentação, a glicose e o ácido oleico residuais foram quantificados pelos métodos de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945) e gravimétrico, respetivamente.

#### 4.2.7 Caracterização do Soforolipídios

Os sofrorolipídios obtidos ao final da fermentação foram separados e liofilizados para posterior determinação estrutural. Para isso foi utilizado

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

#### 4.2.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Foi feita a 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 250 mm; 4,6 mm; 12 nm) e fase móvel em gradiente composto por 30 % de acetonitrila e 70 % de água por 5 min, aumentando para 80 % de acetonitrila e 20 % de água por 50 min (HU; JU, 2001; WADEKAR et al., 2012).

#### 4.2.7.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A identificação e caracterização dos grupos funcionais dos soforolipídios foi feita por FTIR no espectrômetro IR Prestige 21 (Shimadzu) equipado com o software OriginPro 8.0. Após a purificação, 1 mg dos soforolipídios foram misturados com 100 mg de KBr e pressurizados a 7.500 Kg por 30 segundos para obtenção de pastilhas translúcidas. As leituras foram conduzidas em transmitância, sistema com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>, faixa de 400-4000 cm<sup>-1</sup> com 32 scans (CHANDRAN; DAS, 2011).

#### 4.2.7.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise estrutural dos soforolipídios foi verificada por Espectrômetro de RMN Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para <sup>1</sup>H equipado com uma sonda multinuclear inversa (BBI) de 5 mm. As amostras purificadas de soforolipídios foram analisadas utilizando os métodos <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e espectros bidimensionais HSQC e HMBC. O sistema de solvente foi clorofórmio deuterado 0,05 % v/v TMS e o espectro foi expresso por ppm a partir do padrão de referência interno.

#### 4.2.8 Avaliação do Potencial Antifúngico do Soforolipídios

A avaliação da atividade antifúngica dos soforolipídios de *S. bombicola* foi realizada pela concentração inibitória mínima, método de diluição em ágar e a alteração da estrutura foi verificada por microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.2.8.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Foi realizada pelo método de microdiluição em caldo em placa de 96 poços de acordo com o documento M38-A2 do CLSI (2008), com adaptações. As concentrações de soforolipídios testadas foram de 1.800 µg/mL a 7,03 µg/mL. Meio contendo apenas soforolipídios foi utilizado como controle.

As cepas *Aspergillus flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, foram previamente cultivadas em meio ABD a 30 °C por 5 dias e *Rhizopus* spp. por 24 h. As suspensões fúngicas foram preparadas em solução tampão fosfato-salino (PBS), foi realizada a contagem em câmara hematócitológica e ajustado o inóculo para 10<sup>4</sup> de esporos/mL em meio RPMI 1640 e adicionadas alíquotas de 100 µL da suspensão fúngica em cada poço, incubada a 30 °C por 24 h para a leitura visual do *Rhizopus* spp. e por 48 h para a leitura visual dos demais fungos.

A CIM foi definida como a menor concentração de soforolipídio capaz de inibir o crescimento fúngico.

#### 4.2.8.2 Concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima foi determinada de acordo com Espinel-Ingroff et al. (2002). Foram retirados 10 µL dos poços (teste CIM) onde a inibição do crescimento dos fungos foi completa, transferidas e cultivadas em placas com ABD por 72 h a 30 °C. O CFM foi definido pela menor concentração dos soforolipídios capazes de produzir efeito fungicida ou fungistático.

#### 4.2.8.3 Método de diluição em ágar

O desenvolvimento micelial dos fungos foi determinado em triplicata por teste de diluição em ágar. Em placas de Petri de 60 mm, foram adicionados 9 mL de meio ABD e 1 mL de soforolipídios em diferentes concentrações (1800 µg/mL a 112,5 µg/mL). Após solidificar, foi adicionado no centro de cada placa um disco de 7 mm de diâmetro dos micélios fúngicos anteriormente cultivados em meio ABD por 24 h em estufa a 28 ± 2 °C. As placas foram incubadas em estufa por 48 h e 24 h para o *Rhizopus* spp. Placas contendo apenas meio ABD e os fungos sem soforolipídios

foram utilizadas como controle. O halo de crescimento micelial foi medido com paquímetro e os tratamentos comparados com o controle para aferição da porcentagem de inibição.

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

As amostras das colônias fúngicas do teste de diluição em ágar foram utilizadas para a microscopia. Para o teste de diluição em ágar, foram cortados discos de 7 mm de diâmetro, entre o limite de crescimento e o meio de cultura, colocados em placas de 24 poços contendo 2,5 % de glutaraldeído, 2 % de paraformaldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), mantidos a 4 °C, *overnight* (16-18 h).

Após esse período as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) três vezes por 10 minutos, seguido de pós fixação em OsO<sub>4</sub> a 1 % por 30 minutos. As amostras foram desidratadas seriadamente em álcool etílico (30 %, 50 %, 70 %, 90 %) durante 10 min e a concentração etílica de 100 % foi administrada três vezes por 10 min. As amostras foram levadas ao ponto crítico em CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 critical point dryer), revestidas por ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI Quanta 200) operando a 30 kV.

#### 4.3 PRODUÇÃO DOS FILMES DE AMIDO COMESTÍVEIS

Os filmes foram obtidos a partir do preparo de uma solução filmogênica com adição de amido de mandioca (Yoki® Paranaíba-PR), soforolipídios e glicerol nas concentrações descritas na Tabela 4, pelo método de casting (SIPOS et al., 2008; TARANTILI; KOUMOULOS, 2008), empregando água como solvente. Foram preparadas quatro formulações de solução filmogênica com variação das concentrações de soforolipídios, empregando 3 % (m/v) de sólidos. Em todas as formulações 20 g de glicerol/100 g de sólidos foram adicionados como plastificante.

**Tabela 4.** Formulações para o desenvolvimento dos filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de soforolipídios de *S. bombicola* nas concentrações de 2, 5 e 10% com volume total final de 400 g.

<b>Formulações</b>	<b>Amido (g)</b>	<b>Soforolipídios (g)</b>	<b>Glicerol (g)</b>	<b>Água (g)</b>
<b>AM-PURO</b>	12,00	-	2,40	385,6
<b>AM-SLP (2 %)</b>	11,76	0,24	2,40	385,6
<b>AM-SLP (5 %)</b>	11,40	0,60	2,40	385,6
<b>AM-SLP (10 %)</b>	10,80	1,20	2,40	385,6

AM: amido de mandioca (yoki®); SLP: soforolipídios de *S. bombicola*

O amido, o glicerol e a água foram aquecidos a 90 °C com agitação constante (7 a 8 min) até obter uma solução homogênea, em seguida foram adicionadas à cada formulação as quantidades estabelecidas dos soforolipídios. Após completa homogeneização, as soluções foram sonicadas (Unique USC-1800) durante 10 min para completa eliminação das bolhas formadas no processo. Em seguida, foram colocadas 30 g de cada formulação em placa de Petri de acrílico 60 mm para secagem em estufa de circulação de ar a 30 °C, por aproximadamente 24 h, até a formação dos filmes. Os filmes selecionados foram acondicionados em BOD com 58 % de umidade relativa (UR) e 25 °C até o momento da realização das análises de caracterização.

#### 4.3.1 Caracterização dos Filmes

##### 4.3.1.1 Espessura

As espessuras dos filmes foram determinadas pelo Micrômetro (Mitutoyo - Japão), a partir de três pontos escolhidos aleatoriamente na superfície de cada filme.

##### 4.3.1.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR)

A análise foi conduzida em aparelho Shimadzu FTIR-8300 (Japão) com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, utilizando uma escala de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram incorporadas ao Brometo de Potássio (KBr) e pressurizadas para a produção das pastilhas. Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR. As

análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.3.1.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para as análises de DSC, cerca de 10 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio com tampa furada e submetidos a programa de aquecimento controlado. Os ensaios foram realizados no equipamento Netzsch (modelo DSC-204 - Japão), em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A amostra de sofrorolipídios foi aquecida de 30 a 325 °C e as amostras de filme de 20 a 100 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.3.1.4 Solubilidade em água

As análises foram realizadas de acordo com o método de Gontard, Guilbert e Cuq, (1992). As amostras (duplicata) foram cortadas em corpos de prova com 3x3 cm e secas em estufa com circulação de ar (Marconi, Brasil) a 60 °C por 24 h. Em seguida, foram pesadas para determinar o peso seco inicial e mergulhadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de água destilada. Os frascos foram vedados e encaminhados para incubadora orbital (Shaker Marconi MA 420), a 50 rpm, 25 °C por 24 h. Após este período, as amostras foram removidas cuidadosamente e secas em estufa com circulação de ar por 24 h a 60 °C, para determinar a massa do material não solubilizado (peso final). A solubilidade foi expressa por porcentagem de material seco solubilizado conforme a equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = ((m_i - m_f) / m_i) * 100 \quad (1)$$

Onde,  $m_f$  é a massa final da amostra e  $m_i$  é a massa inicial da amostra, ambos em base seca.

#### 4.3.1.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Foi determinada gravimetricamente de acordo com as normas da American Society for Testing and Materials (ASTM E96-95 1996) com modificações. Cada amostra (duplicata) foi colocada em uma cápsula de permeabilidade e seu interior foi parcialmente preenchido com  $\text{CaCl}_2$  anidro, de modo a se obter 0% de UR no interior destas cápsulas, que foram seladas para garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme. O conjunto (cápsula + filme) foi pesado em tempo zero e armazenado em dessecador a temperatura ambiente, contendo em seu interior uma solução saturada de NaCl que proporcionou um ambiente com 75% de UR. Após um período de equilíbrio de 2 h as células foram pesadas em intervalos regulares durante 24 h. A mudança de massa da cápsula de permeação foi registrada e o ganho de massa (g) foi inserido em um gráfico em função do tempo (t). Da reta obtida por regressão linear foi determinado o coeficiente angular e calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TVA):

$$\text{TVA} = \frac{g}{t.A} \quad (2)$$

Onde, g/t é o coeficiente angular da reta (regressão linear) e A é a área de permeação ( $\text{m}^2$ ) da cápsula. Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{PVA} = \frac{\text{TVA}.m}{\Delta P} \quad (3)$$

Onde, m é a espessura média do filme ( $\text{m}^2$ ),  $\Delta P$  é a diferença de pressão de vapor de água do ambiente contendo  $\text{CaCl}_2$  anidro (0% de UR) e solução saturada de NaCl (75% de UR).

#### 4.3.1.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando texturômetro TA TX2 de acordo com as Normas da ASTM (D882-91, 1996). Os filmes

foram cortados (24,4 x 100 mm) e ajustados entre as garras pneumáticas do equipamento. A distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de tração de 500 mm/min. Foram determinadas as seguintes propriedades de tração: resistência máxima à tração (MPa) e alongação na ruptura (%), calculadas pelas equações a seguir:

$$\text{Resistência máxima à tração} = \frac{F_{\max}}{A_{\min}} \quad (4)$$

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

$$\text{Alongação da ruptura} = \frac{A_T}{DG} \quad (5)$$

Onde,  $A_T$  é a alongação total da amostra até a ruptura (m) e o  $DG$  é a distância inicial entre as garras (m).

#### 4.3.1.7 Microestrutura

A análise de microestrutura foi realizada por microscopia eletrônica de varredura - MEV (modelo FEI Quanta 200). Para verificar a estrutura dos filmes, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e submetidas a um congelamento rápido, depois foram fraturadas com auxílio de uma pinça e secas em estufas por cinco dias a 50 °C. Após estes procedimentos as amostras secas foram revestidas de ouro por um Sputter Coater (BAL-TEC SCD 050) e avaliadas com voltagem de aceleração de 30.0 kV.

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa STATISTICA 7.0 (STATISTICA Inc. Tulsa – USA, 2004). Os resultados do planejamento estatístico foram submetidos à análise de variância com nível de significância de 0,05, e metodologia de superfície de resposta. Para PVA e propriedades mecânicas dos filmes foi realizado o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados em forma de uma patente, um capítulo de livro e dois artigos científicos.

5.1 – Patente protocolada: “Processo de separação das formas acídicas e lactônicas dos soforolipídios produzidos por uma cepa de *Starmerella*”.

5.2 – Capítulo de livro publicado: Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ed. Atena.

5.3 – Artigo 1: “Aplicação de soforolipídios de *Starmerella bombicola* contra fungos contaminantes de alimentos”, que será submetido ao periódico Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.

5.4 – Artigo 2: “Avaliação de um novo filme comestível com amido de mandioca acrescido de soforolipídios lactônicos de *Starmerella bombicola*”, que será submetida ao periódico Carbohydrate Polymers

### 5.1 PATENTE

**Título:** “Processo de separação das formas acídicas e lactônicas dos soforolipídios produzidos por uma cepa de *Starmerella*”

**Autores:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Amanda Hipólito, Victória Akemi Itakura Silveira, Gabrielly Terassi Bersaneti, Ismael Rodrigues Amador e Fernando Cesar de Macedo Júnior.

**Protocolada em:** 17/ 10/ 2019 (processo BR 10 2019 026810 7)

**Resumo:** A invenção refere-se a uma nova técnica de separação das estruturas lactônicas e acídicas dos soforolipídios, para direcionar às futuras aplicações industriais. Os soforolipídios utilizados na técnica foram produzidos por uma cepa de *Starmerella*, extraído e liofilizado. A amostra foi solubilizada em 100 mL de água destilada e corrigida para pH 11 com NaOH (1 M). A amostra foi submetida a funil de

separação, com adição de acetado de etila, obtendo a fase orgânica lactônica e a fase aquosa. Essa fase foi ajustada a pH 2 com HCl (1 M), e submetida a uma nova extração, com adição de acetado de etila, obtendo na fase orgânica a estrutura acídica. As fases orgânicas lactônica e acídica foram submetidas a identificação estrutural através de cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). Os resultados encontrados nessa invenção demonstram uma nova metodologia de separação, de estruturas acídicas e lactônicas, dos soforolipídios da cepa de *Starmerella*, essa técnica demonstrou ser eficaz e viável, pela facilidade metodológica, baixo custo de operação e especificidade para futuras aplicações industriais.

## 5.2 CAPÍTULO DE LIVRO

**Título do livro:** Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Título do capítulo:** Perspectivas de aplicação de soforolipídio microbiano na indústria de alimentos. ISBN 978-85-7247-698-0 – Doi: 10.22533/at.ed.980190910

**Autores:** Christiane Aparecida Urzedo de Queiroz, Victória Akemi Itakura Silveira, Amanda Hipólito, e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

**Publicado em:** Atena Editora, 2019.

**Resumo:** Devido à crescente preocupação ambiental, a procura por alternativas de produtos naturais que possam ser utilizados como aditivos alimentares têm aumentado, abrindo uma nova oportunidade aos surfactantes produzidos por microrganismos. O soforolipídio é um biossurfactante produzido principalmente pela levedura *Starmerella bombicola*, que se destaca por apresentar alta produtividade. O soforolipídio tem capacidade emulsificante, atividade antimicrobiana e antiadesiva, que são características com potencial para aplicação na indústria de alimentos. Sendo assim, o objetivo dessa revisão foi descrever a produção e caracterização de soforolipídios e as potenciais aplicações na indústria de alimentos.

## 5.3 ARTIGO 1

### **Aplicação de soforolipídios de *Starmerella bombicola* contra fungos contaminantes de alimentos**

Amanda Hipólito<sup>1</sup>, Ricardo Augusto Alves da Silva<sup>2</sup>, Talita de Oliveira Caretta<sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Ismael R. Amador<sup>1</sup>, Luciano Aparecido Panagio<sup>2</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas,  
<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

**\*Corresponding author:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi  
Telephone: +55 4333714270, Fax: +55 4333714054  
E-mail: macelligoi@uel.br  
ORCID: 0000.0003.2217.8937

1 **Aplicação de soforolipídios de *Starmerella bombicola* contra fungos contaminantes de**  
2 **alimentos**

3  
4 Amanda Hipólito<sup>1</sup>, Ricardo Augusto Alves da Silva<sup>2</sup>, Talita de Oliveira Caretta<sup>1</sup>, Victória  
5 Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Ismael R. Amador<sup>1</sup>, Luciano Aparecido Panagio<sup>2</sup>, Maria Antonia  
6 Pedrine Colabone Celligoi<sup>1\*</sup>

7  
8  
9 <sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, <sup>2</sup>Departamento de  
10 Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina, Paraná,  
11 Brasil.

12  
13 a.hipolito@hotmail.com  
14 ricardoasilva71@hotmail.com  
15 talita\_oca@hotmail.com  
16 victoriiaakemi@hotmail.com  
17 ir.amador@hotmail.com  
18 lapanagio@uel.br  
19 macelligoi@uel.br  
20

21 **\*Corresponding author:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi  
22 Telephone: +55 4333714270  
23 E-mail: macelligoi@uel.br  
24 ORCID: 0000.0003.2217.8937  
25

26 **Resumo**

27  
28 A deterioração dos alimentos por microrganismos acarreta enormes perdas econômicas para a  
29 indústria e causam riscos à saúde humana e animal, abrindo espaço para o desenvolvimento de  
30 antimicrobianos de origem natural. Soforolipídios pertencem a uma classe de biossurfactantes  
31 produzidos por *Starmerella bombicola*, que apresenta potencial aplicação em diversas áreas  
32 industriais, com destaque para ação antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi produzir,  
33 caracterizar e aplicar os soforolipídios de *S. bombicola* contra fungos contaminantes de  
34 alimentos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus*  
35 *parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Brotrytis cinerea* e *Rhizopus* spp. A  
36 produção de soforolipídios foi avaliada em glicose e ácido oleico e a melhor condição foi  
37 transferida para um biorreator atingindo 67 g/L com uma produtividade 0,56 g/L h<sup>-1</sup> em 120 h,  
38 com predominância estrutural da forma lactônica. Os soforolipídios demonstraram atividade  
39 antifúngica contra todos os fungos testados e se configura como uma alternativa para aplicações  
40 industriais, como um agente sanitizante inovador, reduzindo a deterioração microbiana dos  
41 principais alimentos.

42  
43 **Palavras-chave:** Patógenos de alimentos, atividade antifúngica, soforolipídios, caracterização  
44 estrutural.  
45  
46  
47  
48  
49  
50

## 51 1. Introdução

52

53 Ao longo do armazenamento, os alimentos estão sujeitos às alterações  
54 microbiológicas, físicas e químicas (Cauvain e Young, 2007). Tais alterações estão  
55 relacionadas com parâmetros intrínsecos e extrínsecos como, a temperatura de estocagem,  
56 umidade, pH, embalagem, atividade de água do produto, entre outros. Alimentos como, pães,  
57 frutas, hortaliças e produtos agrícolas, têm como principal forma de deterioração a de origem  
58 microbiológica, principalmente por fungos (Oliveira et al., 2015), acarretando em perdas nas  
59 indústrias devido à aparência indesejável, alterações nas características sensoriais e riscos à  
60 saúde do consumidor devido à produção de micotoxinas (Baert et al., 2007; Souza et. al, 2017).

61 As principais espécies deteriorantes incluem fungos dos gêneros *Aspergillus*,  
62 *Fusarium*, *Rhizopus* e *Botrytis* (Anfossi et al., 2016; Njobeh et al., 2010; Terzi et al., 2014). Os  
63 fungos do gênero *Aspergillus* estão associados com a deterioração em produtos agrícolas na  
64 pós-colheita, apresentando crescimento na superfície dos alimentos com coloração verde, azul,  
65 preta ou amarelada (Pitt e Hocking, 2009). O gênero *Fusarium* está associado à podridão de  
66 raízes, milhos e frutas, apresentando esporulação alaranjada e amarela (Menezes et al., 2010;  
67 Gordon et al., 2015). Ambos os gêneros possuem fungos produtores de micotoxinas, sendo  
68 aflatoxinas, ocratoxina A e fumosina as mais expressivas (Soares, Abrunhosa e Venâncio,  
69 2017). O gênero *Rhizopus* é responsável por causar podridão em alimentos de origem vegetal e  
70 apresentam rápida multiplicação com bolores esverdeados (Gava et al., 2008; Pitt e Hocking,  
71 2009). Os fungos do gênero *Botrytis* causam deterioração em uma ampla variedade de frutas,  
72 hortaliças e culturas ornamentais, provocada por mofos densos de cor cinza (Walker et al.,  
73 2011; Plesken et al., 2015).

74 Devido a essas contaminações, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é de  
75 grande importância, pois, além do uso excessivo de agroquímicos, existem fungos resistentes  
76 aos biocidas atuais. Diante disso, os biossurfactantes tem recebido grande atenção visto que  
77 apresentam vantagem frente aos surfactantes sintéticos como, melhor compatibilidade  
78 ambiental, permitindo diversas aplicações industriais e biotecnológicas (Souza et al., 2018;  
79 Naughton et al, 2019).

80 Uma das classes mais promissoras de biossurfactantes são os soforolipídios,  
81 classificados como glicolípidos extracelulares e produzidos por diversos microrganismos,  
82 destacando a *Starmerella bombicola*. São constituídos por um dissacarídeo soforose (2'-O-β-  
83 D-glicopiranosil-1-β-D-glicopiranosose), ligado a uma cadeia de ácido graxo terminal (ω) ou sub-  
84 terminal (ω-1), geralmente com 16 ou 18 carbonos (Ashby e Solaiman, 2010; Roelants et al.,

85 2019). Durante a produção, dois congêneres principais são formados, estrutura acídica e  
86 lactônica. Os sofrorolipídios também podem dispor de variações de acetilações na porção  
87 sofrorose além de hidrogenação e insaturação na cadeia de ácido graxo (Asmer et al., 1988;  
88 Cavaleiro e Cooper, 2003; Díaz de Rienzo et al., 2015).

89 Essas moléculas exibem inúmeras aplicações industriais, como agente de limpeza,  
90 biorremediação, formulações de cosméticos, estabilizante e emulsificante na indústria de  
91 alimentos, ação anticâncer, antiviral e anti-inflamatória na área da saúde e tem se destacado por  
92 suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Morya et al., 2013; Minucelli et al., 2017;  
93 Nitschke e Silva, 2017; Shah et al., 2005; Chen et al., 2006; Rashad et al., 2014; Shao et al.,  
94 2012; Sen et al., 2017, Silveira et al. 2019).

95 A ação antimicrobiana dos sofrorolipídios é caracterizada pelo mecanismo de  
96 desestabilização da membrana do microrganismo que leva a ruptura e aumento de  
97 permeabilização, devido a sua natureza anfifílica que provoca a diminuição da tensão  
98 superficial e interfacial dos compostos, produzindo o efeito surfactante (Valloteau et al., 2017;  
99 Sen et al., 2017). Embora pouco estudada, a ação antifúngica dos sofrorolipídios foi descrita  
100 para algumas espécies de fungos patógenos de plantas e alimentos (Yoo et al, 2005; Yuan;  
101 Tang; Cheng, 2012; Sen et al., 2017).

102 Portanto, considerando a importância do desenvolvimento de novos agentes  
103 antimicrobianos contra fungos contaminantes de alimentos e as propriedades dos sofrorolipídios,  
104 este trabalho teve como objetivo produzir sofrorolipídios de *Starmerella bombicola* e testar sua  
105 atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*,  
106 *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Brotrytis cinerea* e *Rhizopus*  
107 sp, como uma alternativa eco-amigável em potencial aplicação como agente antimicrobiano na  
108 indústria alimentícia.

109

## 110 **2. Material e métodos**

111

### 112 *2.1 Microrganismo e inóculo*

113

114 A *Starmerella bombicola* ATCC 22214 foi obtida da American Type Culture Collection  
115 (ATCC), Manassas, EUA e mantida criopreservada em soluções estoque contendo 25 % (v/v)  
116 de glicerol a -80 °C (Gao et al., 2013). As células foram ativadas em meio contendo g/L: glicose,  
117 100; extrato de levedura, 10; ureia, 0,1, por 24h, 30 °C e 150 rpm. Em seguida, 10 % (v/v) do  
118 meio anterior foi adicionado a um novo Erlenmeyer contendo g/L: glicose, 77,5; extrato de

119 levedura, 2,5 e ácido oleico, 75, por 48 h, 150 rpm e 30 °C. Os inóculos foram padronizados  
120 em 0,5 g/L de células, a 600 nm, correlacionados com a curva de biomassa em g/L.

121

## 122 *2.2 Avaliação dos substratos e produção de soforolipídios*

123

124 Foi realizado um planejamento Box Behnken 3<sup>3</sup> com 11 combinações, 3 pontos  
125 centrais (Tabela 1). As variáveis testadas foram (X<sub>1</sub>) ácido oleico (125, 188 e 251 g/L) e (X<sub>2</sub>)  
126 glicose (100, 150 e 200 g/L). As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de  
127 125 mL contendo 25 mL dos diferentes meios de fermentação, por 120 h, 150 rpm a 30 °C. Os  
128 resultados foram analisados pela metodologia da superfície de resposta e análise de variância  
129 (ANOVA) pelo STATISTICA 7.0 (STATISTICA Inc. Tulsa - EUA).

130 A melhor condição do planejamento foi transferida para biorreator de bancada  
131 (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda.), com volume operacional de 3,5 L, 0,5 g/L de células,  
132 a 450 rpm, 1 vvm, 30 °C, pH foi controlado em 3,5 após 48 h até 120 h (Silveira et al, 2019).  
133 Amostras foram coletadas a cada 24 h durante a fermentação e quantificado os soforolipídios,  
134 crescimento celular e o consumo de substratos.

135

## 136 *2.3 Extração e determinação de substratos residuais e biomassa*

137

138 Após a fermentação, o caldo foi centrifugado e submetido à extração com acetato de  
139 etila, formando duas fases. A fase orgânica foi coletada, rotaevaporada e lavada com hexano:  
140 metanol (1:1) para remoção do ácido oleico residual. O ácido oleico residual foi quantificado  
141 por gravimetria a partir da extração com hexano e após secagem do metanol. Os soforolipídios  
142 foram submetidos à nova extração com água e acetato de etila (3:1) para eliminação dos  
143 açúcares residuais. Após rotoevaporar os soforolipídios esses foram liofilizados e quantificados  
144 por gravimetria. Para a determinação da biomassa, o pellet de células foi ressuspenso em  
145 solução salina a 0,9 % (m/v) e submetida a espectrofotometria com absorbância a 600 nm, os  
146 valores foram correlacionados com a curva de biomassa (g/L). A glicose residual foi  
147 quantificada pelo método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945) a partir do  
148 sobrenadante.

149

150

## 151 *2.4 Caracterização do soforolipídios*

152

153 Os soforolipídios foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência  
154 (CLAE), realizada em comparação com o padrão 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma  
155 Aldrich, USA), utilizando detector de arranjo de iodo, com coluna Shim-pack CLC-ODS(M)®  
156 C18 da Shimadzu (4,6 x 250 mm; 4,6 mm; 12 nm) e fase móvel em gradiente composto por 30  
157 % de acetonitrila e 70 % de água por 5 minutos, aumentando para 80 % de acetonitrila e 20 %  
158 de água por 50 minutos (Hu e Ju, 2001; Wadekar et al., 2012).

159 Espectroscopia de Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR) também  
160 foi utilizada para caracterização. Os espectros de infravermelho foram registrados por FT-IR  
161 ao espectrômetro Prestige 21 (Shimadzu), com soforolipídios pressurizado com KBr. Foram  
162 realizadas 32 varreduras com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e faixa de 400-4000 cm<sup>-1</sup> de transmissão  
163 (Chandran e Das, 2011).

164 A Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) foi utilizada para  
165 confirmar a estrutura soforolipídica através dos métodos <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e espectros bidimensionais  
166 HSQC e HMBC que foram registrados por espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz usando  
167 sonda inversa (BBI - 5 mm). Os espectros foram expressos por ppm a partir do padrão referência  
168 e o solvente utilizado no sistema foi CDCl<sub>3</sub> a 0,05 % v/vTMS.

169

## 170 2.5 Avaliação da propriedade antifúngica

171

172 O potencial antifúngico dos soforolipídios foi testado contra *Aspergillus flavus*, *A.*  
173 *melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *B. cinerea* e *Rhizopus* spp

174

### 175 2.5.1 Concentração Inibitória e Fungicida Mínima

176

177 Foi realizada pelo método de microdiluição em caldo utilizando meio RPMI 1640  
178 tamponado, em placa de 96 poços (CLSI 2008 – adaptado). As concentrações de soforolipídios  
179 testadas foram de 1.800 µg/mL a 7,03 µg/mL. Meio contendo apenas soforolipídios foi utilizado  
180 como controle. As cepas *A. flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger* e *B.*  
181 *cinerea*, foram previamente cultivadas em meio Ágar Batata Dextrose (ABD) à 30 °C por 5 dias  
182 e *Rhizopus* spp. por 24 h. As suspensões fúngicas foram preparadas em solução tampão fosfato-  
183 salino (PBS), realizada a contagem em câmara hematocitométrica e ajustado o inóculo para 10<sup>4</sup>  
184 de esporos/mL em meio RPMI 1640 e adicionadas alíquotas de 100 µL da suspensão fúngica  
185 em cada poço, incubada a 30 °C por 24 h para a leitura visual do *Rhizopus* spp. e por 48 h para  
186 a leitura visual dos demais fungos. A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a

187 menor concentração de soforolipídios capaz de inibir o crescimento fúngico.

188 Para avaliar a Concentração Fungicida Mínima, frações de 10 µl dos poços que não  
189 mostraram crescimento na análise anterior foram transferidas para placas com Ágar Batata  
190 Dextrose (ABD) incubadas a 30 °C por 72 h. O CFM foi definido como a menor concentração  
191 de soforolipídios capaz de promover ausência de crescimento dos fungos.

192

### 193 2.5.2 Método de Diluição em Ágar

194

195 Diferentes concentrações de soforolipídios foram preparadas (1.800 µg/mL a 112,5  
196 µg/mL), adicionadas ao meio Ágar Batata Dextrose (ABD) e colocados em placas de 60 mm  
197 de diâmetro. Discos de 7 mm dos micélios fúngicos foram transferidos para o centro das placas.  
198 Foram incubadas a 28 ± 2 °C, por 48 h. Placas contendo apenas meio ABD e fungos foram  
199 utilizadas como controle. O halo de crescimento micelial foi medido com paquímetro e os  
200 tratamentos comparados com o controle.

201

### 202 2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

203

204 As amostras das colônias fúngicas do teste de diluição em ágar foram utilizadas para  
205 a microscopia. Para a análise foram cortados discos de 6 mm de diâmetro, colocados em placas  
206 de 24 poços contendo 2,5 % de glutaraldeído, 2 % de paraformaldeído em tampão de cacodilato  
207 de sódio 0,1 M (pH 7,2), mantidos a 4 °C, *overnight* (16-18 h). Após esse período as amostras  
208 foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) três vezes por 10 minutos,  
209 seguido de pós fixação em OsO<sub>4</sub> a 1 % por 30 minutos. Subsequentemente, as amostras foram  
210 desidratadas seriadamente em álcool etílico (30 %, 50 %, 70 %, 90 %) durante 10 min e a  
211 concentração etílica de 100 % foi administrada três vezes por 10 min. As amostras foram  
212 levadas ao ponto crítico em CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 critical point dryer), revestidas por ouro  
213 (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura  
214 (FEI Quanta 200) operando a 30 kV.

215

216

217

### 218 2.8 Análises Estatísticas

219

220 As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software Statistica 7.0 (2004) e

221 valores foram considerados significativos em  $p < 0,05$ .

222

### 223 3. Resultados e discussão

224

#### 225 3.1 Produção do soforolipídios

226

227 As maiores produções de soforolipídios, de acordo com o planejamento Box Behnken  
228  $3^3$ , foram 55,28 g/L, 53,92 g/L, 52,40 g/L (188 g/L de ácido oleico e 150 g/L de glicose) e 50,92  
229 g/L (251 g/L de ácido oleico e 150 g/L de glicose) (Tabela 1). O ácido oleico teve um efeito  
230 significativo ( $p=0,004$ ), demonstrando que o ácido graxo com cadeia C18 é importante na  
231 produção, pois segundo Felse et al. (2007) são incorporados diretamente na porção hidroxila  
232 dos soforolipídios. De acordo com a análise de variância ANOVA, as variáveis glicose ( $p=$   
233  $0,03$ ) e ácido oleico ( $p=0,02$ ) foram significativas, isso porque a utilização conjunta de fontes  
234 hidrofílica e hidrofóbica fornecidas ao meio promove um aumento significativo na produção  
235 (Van Bogaert, 2011). A otimização das variáveis apresentou valores ótimos de produção de  
236 soforolipídios em 150 g/L para glicose e 219,5 g/L de ácido oleico (Fig. 1), demonstrando um  
237 elevado coeficiente de determinação experimental 93,27% com um desvio da regressão não  
238 significativo ( $p = 0,24$ ), o que confirma a validade do modelo para fins preditivos.

239 Com base nos resultados experimentais, uma equação foi desenvolvida para estimar a  
240 produção de soforolipídios:

241

$$242 Y = 45.88 * 8.89x_1 + 4.53x_2 + 0.49x_1^2 + 6.49x_2^2 - 1.88 x_1x_2 \quad (6)$$

243

244 Onde Y é a resposta (produção de soforolipídios),  $x_1$  e  $x_2$  são valores codificados de oleico e  
245 glicose, respectivamente.

246

247 A partir da condição otimizada, a produção de soforolipídios foi realizada em  
248 biorreator de bancada com volume operacional de 3,5 L. A produção atingiu 67 g/L com uma  
249 produtividade  $0,56 \text{ g/L h}^{-1}$  em 120 h. O consumo de glicose e ácido oleico aumentaram  
250 progressivamente com o tempo de fermentação, assim como o crescimento celular (Fig. 2). A  
251 produção de soforolipídios teve um aumento de 22 % na fermentação em biorreator, isso deve  
252 ser pelo melhor controle das condições operacionais como aeração, temperatura, agitação e pH  
253 (Jadhav, Pratap e Kale, 2019). A oxigenação é essencial no processo de fermentação, não  
254 apenas durante o crescimento exponencial da levedura, mas também para a biossíntese dos  
255 soforolipídios, pois a monooxigenase do citocromo P450 requer a utilização de moléculas de  
oxigênio (Van Bogaert, 2011). O controle de pH é fundamental durante a fermentação

256 normalmente se inicia em 5,0 e 6,0 que é o ótimo para o crescimento celular e posteriormente  
257 na fase estacionária, próximo de 48 h o pH 3,5 estimula a produção dos soforolipídios (Daverey  
258 e Pakshirajan, 2010; Morya et al., 2013).

259

### 260 *3.2 Caracterização dos soforolipídios*

261

262 O meio de produção e as condições da fermentação influenciam diretamente nas  
263 proporções acídicas e lactônicas do soforolipídios (Claus e Van Bogaert, 2017). Desta forma,  
264 direcionar a fermentação para a produção de estruturas específicas é de suma importância, pois  
265 as aplicações são específicas para cada forma, sendo a lactônica empregada em atividades  
266 antimicrobianas (Paulino et al, 2016; Cerasa et al., 2020).

267 A análise por CLAE mostrou que o perfil soforolipídico produzido, em comparação  
268 com o padrão di-acetato de SL 1', 4''-Soforolactona 6', 6'' (Sigma Aldrich), foi lactônico  
269 diacetilado C18:1, com tempo de retenção em 42,90 min (Fig. 3).

270 O espectro de FT-IR mostrou uma banda a  $3400\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a ligações de  
271 hidrogênio, as hidroxilas da estrutura. Bandas típicas de compostos alifáticos ( $\text{CH}_2$ ) foram  
272 observadas em  $2920$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , uma faixa de carbono insaturado é observada  
273 ( $\text{C}=\text{C}$ ). A banda mais importante do espectro aparece em  $1740\text{ cm}^{-1}$  e corresponde ao grupo  
274 carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) presente na forma lactônica e  $1175\text{ cm}^{-1}$  com presença de ligação éster,  
275 correspondendo ao alongamento da forma lactônica presente na molécula. Outra banda em  $1300$   
276  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a ligação éster encontrada no carboidrato da estrutura. (Fig. 4).

277 A estrutura dos soforolipídios foi confirmada pela análise combinada  
278 monodimensional ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensional (HSQC e HMBC) de RMN. O espectro de  $^1\text{H}$   
279 RMN (Fig. 5) mostrou sinais atribuídos aos prótons anoméricos da porção da soforose em 4,52  
280 e 4,48 ppm, O espectro de HSQC apresentou correlações que são correspondentes a esses sinais  
281 de prótons anoméricos, a 102,0 e 104,8 ppm, e outros sete prótons de glicose CH foram  
282 observados entre 3,48 e 3,81 ppm. Sinais de dois carbonos acetilados foram identificados por  
283 sinais HSQC em fases negativas em 4,25 e 4,18 ppm. Na análise de HMBC foi possível  
284 observar um pico em 4,97 ppm x 170 ppm, indicando a ligação entre o próton H-400 e o  
285 carbonil, demonstrando que a molécula é cíclica e na forma lactônica. As análises estruturais  
286 HPLC, FT-IR e RMN corroborando com a literatura, confirmam que os soforolipídios  
287 produzidos eram predominantemente lactônico (Minucelli et al, 2017; Silveira et al., 2019).

288

### 289 *3.3 Atividade antifúngica*

290

291 A atividade antifúngica *in vitro* dos soforolipídios foi testada contra os patógenos  
292 *Aspergillus flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *B. cinerea* e  
293 *Rhizopus* spp, com base nos valores de CIM, MFC e crescimento micelial. Os resultados da  
294 CIM e MFC foram obtidos na faixa de 225-729 µg/mL (Tabela 2). A concentração fungicida  
295 mínima testada demonstrou que nas concentrações descritas na Tabela 2, os soforolipídios um  
296 foram considerados fungicidas para os esporos dos fungos testados. Yuan, Yang e Cheng (2012)  
297 mostraram 95% de inibição de esporos dos fungos *A. niger*, *A. flavus* e *Botrytis cinérea*, com a  
298 utilização de 10,0 g/L de soforolipídios produzidos por *Wickerhamiella domercqiae* Y2A,  
299 diferindo dos resultados apresentados neste trabalho, onde a concentração utilizada dos  
300 soforolipídios produzido por *S. bombicola* contra os mesmos patógenos, não ultrapassou 729  
301 µg/mL, sendo cem mil vezes menor que o apresentado pelos autores. Sen et al. (2017),  
302 observaram efeito inibitório de *F. oxysporum* através da CIM de 125 µg/mL. Porém, a atividade  
303 antifúngica dos soforolipídios contra os fungos *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* e  
304 *Rhizopus* sp ainda não foram relatadas.

305 Concentrações de 1.800 µg/mL a 112,5 µg/mL de soforolipídios foram utilizadas para  
306 determinar a inibição do crescimento micelial dos fungos (Fig. 6). Inibições acima de 50%  
307 foram encontradas para *A. ochraceus* e *B. cinerea* na maior concentração testada. A ação  
308 antifúngica dos soforolipídios está relacionada com a diminuição da tensão superficial,  
309 ocorrendo desestabilização, ruptura e permeabilização da membrana do microrganismo  
310 (Valotteau et al., 2017).

311 Embora a ação contra fungos patogênicos em alimentos tenha sido pouco estudada,  
312 estes resultados podem acarretar novas possibilidades para a aplicação de soforolipídios na  
313 indústria alimentícia, sendo implementado como antifúngico natural e alternativo.

314

### 315 3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

316

317 As imagens do MEV dos micélios controle (sem tratamento com soforolipídios),  
318 revelaram morfologias normais, células com estrutura superficial intacta e tamanho uniforme (Fig.  
319 7-A, 8-A, 9-A e 10-A), enquanto as imagens dos micélios tratados com os soforolipídios  
320 exibiram irregularidades em sua superfície, apresentando aspecto marcescente e deformação  
321 das estruturas celulares dos micélios dos microrganismos (Fig. 7-B, 8-B, 9-B e 10-B).

322 O micélio é a estrutura do microrganismo que apresenta uma função essencial em sua  
323 reprodução, portanto, qualquer dano à integridade celular pode afetar a patogenicidade dos

324 fungos, demonstrando que os soforolipídios podem alterar significativamente a morfologia dos  
325 micélios fúngicos, resultando em possíveis interrupções na camada fosfolipídica da membrana  
326 celular devido a sua atividade anfifílica (Borah et al., 2016; Valotteau et al., 2017)

327

#### 328 **4. Conclusão**

329

330 A melhor produção de soforolipídios foi de 67 g/L com uma produtividade 0,56 g/L h<sup>-1</sup>  
331 em 120 h em biorreator com as concentrações de 150 g/L de glicose e 219,5 g/L de ácido  
332 oleico. Os soforolipídios foram caracterizados com predominância da forma lactônica C18:1  
333 diacetilada e tiveram boa atividade antifúngica contra os patógenos de alimentos estudados:  
334 *Aspergillus flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*  
335 e *Rhizopus* spp. o que foi comprovado pela MEV. Essa atividade confirma que os soforolipídios  
336 produzidos por *S. bombicola*, pode ser uma inovação tecnológica para aplicação industrial,  
337 como um novo agente sanitizante sustentável.

338

#### 339 **Conflicts of interest**

340

341 The authors declare no competing interests.

342

#### 343 **Acknowledgements**

344

345 This work was supported by the National Council for Scientific and Technological  
346 Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel  
347 (CAPES).

348

349

350

351

352

#### 353 **Referências**

354

355 Anfossi, L., Giovannoli, C., Baggiani, C. 2016. Mycotoxin detection. Current Opinion in

356 Biotechnology, 37, 120–126. doi:10.1016/j.copbio.2015.11.005

- 357 Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. 2010. The influence of increasing media methanol  
358 concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks.  
359 Biotechnology Letters, 32(10), 1429–1437. doi:10.1007/s10529-010-0310-0
- 360 Asmer, H.-J., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. 1988. Microbial production, structure  
361 elucidation and bioconversion of sophorose lipids. Journal of the American Oil  
362 Chemists' Society, 65(9), 1460–1466. doi:10.1007/bf02898308
- 363 Baert, K., Valero, A., De Meulenaer, B., Samapundo, S., Ahmed, MM, Bo, L., Devlieghere,  
364 F. 2007. Modelagem do efeito da temperatura na taxa de crescimento e na fase de atraso  
365 de *Penicillium expansum* em maçãs. International Journal of Food Microbiology, 118  
366 (2), 139-150. doi: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2007.07.006
- 367 Borah,S.N., Deka,S., Sarma,H.K. 2016. Firstreportof *Fusarium verticillioides* causing stalk  
368 rot of maizein Assam, India. Plant Dis. 100, 1501. doi: 10.1094/PDIS-01-16-0074-PDN
- 369 Cauvain, S.P., Young, L.S. Bread spoilage and staling. 2007. In: Technology of breadmaking,  
370 2ed. Springer international publishing, NY. 272-292.
- 371 Cavaleiro, D. A., Cooper, D. G. 2003. The effect of medium composition on the structure and  
372 physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. Journal of  
373 Biotechnology, 103(1), 31–41. doi:10.1016/s0168-1656(03)00067-1
- 374 Ceresa, C., Fracchia, L., Williams, M., Banat, I. M., & Díaz De Rienzo, M. A. 2020. The  
375 effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. Journal of  
376 Biotechnology, 309, 34–43. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.12.019
- 377 Chandran, P.; Das, N. 2011. Characterization of sophorolipid biosurfactant. International  
378 journal of science natural. 63–71.

- 379 Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., Borriss, R.  
380 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for  
381 biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140(1-2), 27–  
382 37. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.10.011
- 383 Claus, S; Van Bogaert, I.N.A. 2017. Sophorolipid production by yeasts: a critical review of  
384 the literature and suggestions for future research. *Applied Microbiology and*  
385 *Biotechnology*, 101 (21),7811–7821.
- 386 Daverey, A., Pakshirajan, K., & Sumalatha, S. 2010. Sophorolipids production by *Candida*  
387 *bombicola* using dairy industry wastewater. *Clean Technologies and Environmental*  
388 *Policy*, 13(3), 481–488. doi:10.1007/s10098-010-0330-4
- 389 Díaz De Rienzo, M.A., Banat, I.M., Dolman, B., Winterburn, J., Martin, P.J., 2015.  
390 Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *N.*  
391 *Biotechnol.* 32, 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.009>
- 392 Felse, P. A., Shah, V., Chan, J., Rao, K. J., Gross, R. A. 2007. Sophorolipid biosynthesis by  
393 *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme and Microbial*  
394 *Technology*, 40(2), 316–323. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.04.013
- 395 Gao, R., Falkeborg, M., Xu, X., Guo, Z. 2012. Production of sophorolipids with enhanced  
396 volumetric productivity by means of high cell density fermentation. *Applied*  
397 *Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1103–1111. doi:10.1007/s00253-012-4399-z
- 398 Gordon, T. R., Swett, C. L., Wingfield, M. J. 2015. Management of *Fusarium* diseases  
399 affecting conifers. *Crop Protection*, 73, 28–39. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.018
- 400 Hu, Y., Ju, L.K., 2001. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with  
401 LC-MS. *Enzyme Microb. Technol.* 29, 593–601. <https://doi.org/10.1016/S0141->

402 0229(01)00439-2

403 Jadhav, J. V., Pratap, A. P., & Kale, S. B. 2019. Evaluation of sunflower oil refinery  
404 waste as feedstock for production of sophorolipid. *Process*  
405 *Biochemistry*. doi:10.1016/j.procbio.2019.01.015

406 Menezes, J. P., Lupatini, M., Antonioli, Z. I., Blume, E., Junges, E., Manzoni, C. G. 2010.  
407 Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp.  
408 (*Biocontrolador*) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. *Ciência e Agrotecnologia*,  
409 34(1), 132–139. doi:10.1590/s1413-70542010000100017

410 Minucelli, T., Ribeiro-Viana, R.M., Borsato, D., Andrade, G., Cely, M.V.T., de Oliveira,  
411 M.R., Baldo, C., Celligoi, M.A.P.C., 2017. Sophorolipids production by *Candida*  
412 *bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste*  
413 *Biomass Valorization*. 8, 743–753. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9592-3>

414 Morya, V.K.; Park, J.H.; Kim, T.J.; Jeon, S.; Kim, E.K. 2013. Production and characterization  
415 of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. *Bioresource Technology*,  
416 143, 282–288. doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.094.

417 Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V., Banat, I. M. 2019. Microbial Biosurfactants:  
418 Current trends and applications in Agricultural and Biomedical industries. *Journal of*  
419 *Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14243

420 Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of  
421 glucose. *J.Biol.Chem.* 153, 375–80.

422 Njobeh, B. P.; Dutton, F. M.; Makun, H. A. 2010. Mycotoxins and human health:  
423 significance, prevention and control. *Smart biomolecules in medicine*.

- 424 Nitschke, M., Silva, S. S. e. 2017. Recent food applications of microbial surfactants. *Critical*  
425 *Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 631–638.  
426 doi:10.1080/10408398.2016.1208635
- 427 Oliveira, A. V., Nuñez Del Prado, C. C., Modesto, N. G., Lucena, G. D. 2015. Detecção  
428 molecular de fungos com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no  
429 comércio varejista de Maringá/PR, Brasil. *Biotemas*, 28(1), 13. doi:10.5007/2175-  
430 7925.2015v28n1p13
- 431 Paulino, B. N., Pessôa, M. G., Mano, M. C. R., Molina, G., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G.  
432 M. 2016. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid  
433 biosurfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), 10265–10293.  
434 doi:10.1007/s00253-016-7980-z
- 435 Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food spoilage*. Springer.
- 436 Plesken, C., Weber, R. W. S., Rupp, S., Leroch, M., & Hahn, M. 2015. *Botrytis*  
437 *pseudocinerea* Is a Significant Pathogen of Several Crop Plants but Susceptible to  
438 Displacement by Fungicide-Resistant *B. cinerea* Strains. *Applied and Environmental*  
439 *Microbiology*, 81(20), 7048–7056. doi:10.1128/aem.01719-15
- 440 Rashad, M. M., Nooman, M. U., Ali, M. M., Al-kashef A. S., & Mahmoud, A. E. 2014.  
441 Production, characterization and anticancer activity of *Candida bombicola* sophorolipids  
442 by means of solid state fermentation of sunflower oil cake and soybean oil. *Grasas y*  
443 *Aceites*, 65(2), e017. doi:10.3989/gya.098413
- 444 Roelants, S.; Solaiman, S. K. Y.; Ashby, R. D.; Lodens, S.; Van Renterghem, L.; Soetaert, W.  
445 2019. Production and applications of sophorolipids. *Biobased surfactants*, 65–119.

- 446 Sen, S., Borah, S. N., Bora, A., & Deka, S. 2017. Production, characterization, and antifungal  
447 activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microbial Cell*  
448 *Factories*, 16(1). doi:10.1186/s12934-017-0711-z
- 449 Shah, V., Doncel, G. F., Seyoum, T., Eaton, K. M., Zalenskaya, I., Hagver, R., Gross, R.  
450 2005. Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus  
451 and Sperm-Immobilizing Activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10),  
452 4093–4100. doi:10.1128/aac.49.10.4093-4100.2005
- 453 Shao, L., Song, X., Ma, X., Li, H., Qu, Y. 2012. Bioactivities of Sophorolipid with Different  
454 Structures Against Human Esophageal Cancer Cells. *Journal of Surgical Research*,  
455 173(2), 286–291. doi:10.1016/j.jss.2010.09.013
- 456 Silveira, V. A. I, Nishio, E. K., Urzedo Queiroz Freitas, C. A., Amador, I. R., Takayama  
457 Kobayashi, R. K., de Oliveira Caretta, T., Pedrine Colabone Celligoi, M. A.  
458 2019. Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium*  
459 *perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid.  
460 *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101287. doi:10.1016/j.bcab.2019.101287.
- 461 Soares, C.; Abrunhosa, L.; Venâncio, A. 2017. Fungos produtores de micotoxinas: impacto na  
462 segurança alimentar. *Portuguese Society for Microbiology Magazine*.
- 463 Souza, K. S. T.; Gudiña, E. J.; Schwan, R. F.; Rodrigues, L. R.; Dias, D. R.; Teixeira, J. A.  
464 2018. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA  
465 0358 and its potential application in bioremediation. *Journal of hazardous materials*. 346,  
466 152-158.
- 467 Souza, K. S. T., Gudiña, E. J., Azevedo, Z., de Freitas, V., Schwan, R. F., Rodrigues, L. R.,  
468 Teixeira, J. A. 2017. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain

- 469 *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154,  
470 373–382. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.041
- 471 Somogyi, M., 1945. A new reagent for determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61–68.
- 472 Terzi, V., Tumino, G., Stanca, A. M., & Morcia, C. 2014. Reducing the incidence of cereal  
473 head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science*,  
474 59(3), 284–293. doi:10.1016/j.jcs.2013.10.005
- 475 Valotteau, C., Banat, I.M., Mitchell, C.A., Lydon, H., Marchant, R., Babonneau, F., Pradier,  
476 C.M., Baccile, N., Humblot, V., 2017. Antibacterial properties of sophorolipid-modified  
477 gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. *Colloids Surf. B*  
478 *Biointerfaces*. 157, 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.072>
- 479 Van Bogaert, I.N.A., Zhang, J., Soetaert, W., 2011. Microbial synthesis of sophorolipids.  
480 *Process Biochem.* 46, 821–833. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.010>
- 481 Wadekar, S., Kale, S., Lali, A., Bhowmick, D., Pratap, A. 2012. Sophorolipid production by  
482 *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects  
483 of activated earth treatment of the waste oils. *JAOCS, Journal of the American Oil*  
484 *Chemists' Society*, 89(6), 1029–1039.
- 485 Walker, A.-S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Fournier, E.  
486 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a New Cryptic Species Causing Gray Mold in French  
487 Vineyards in Sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 101(12), 1433–1445.  
488 doi:10.1094/phyto-04-11-0104
- 489 Yoo, D.S; Lee, B.S; Kim, E.K. 2005. Characteristics of microbial biosurfactant as an  
490 antifungal agent against plant pathogenic fungus. *Journal of microbiology*  
491 *biotechnology*, 15, 1164–1169.

492 Yuan, B.; Yang, S.; Chen, J. 2012. Antimicrobial activity of sophorolipids on pathogenic  
 493 fungi isolated from fruits. Chinese journal of applied environmental biology, 17(3),  
 494 330–333.

495

496

497 **Tabela 1** - Resultado do Planejamento Box Behnken  $3^3$  para avaliação do ácido oleico e da glicose na produção e  
 498 sofrorolipídios por *Starmerella bombicola*

Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		Resposta
Ensaio	$X_1$	$X_2$	Oleico (g/L)	Glicose (g/L)	Produção de sofrorolipídios (g/L)
1	-1	-1	125	100	35,52
2	-1	0	125	150	44,56
3	-1	1	125	200	39,68
4	0	-1	188	100	47,32
5	0	1	188	200	44,24
6	1	-1	251	100	47,56
7	1	0	251	150	50,92
8	1	1	251	200	47,95
9	0	0	188	150	52,40
10	0	0	188	150	53,92
11	0	0	188	150	55,28

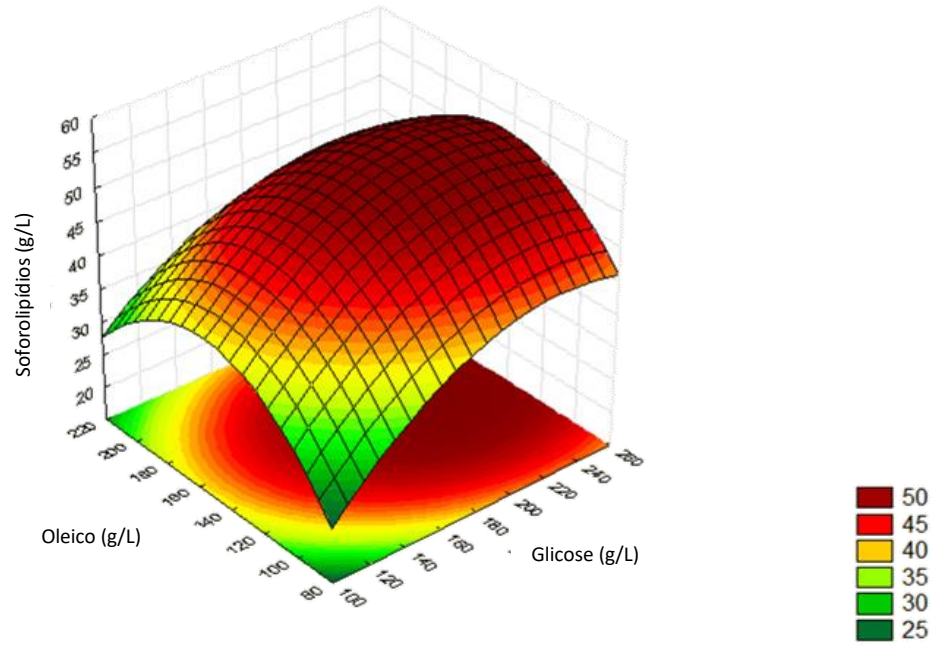
499

500 **Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (MIC) de sofrorolipídios de *S. bombicola* contra os fungos  
 501 contaminantes de alimentos

Fungos	MIC/MFC sofrorolipídios(µg/mL)
<i>A. flavus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. parasiticus</i> <i>A. niger</i> .	729,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	729,0
<i>Botrytis cinerea</i>	478,0
<i>Rhizopus</i> spp,	225,0

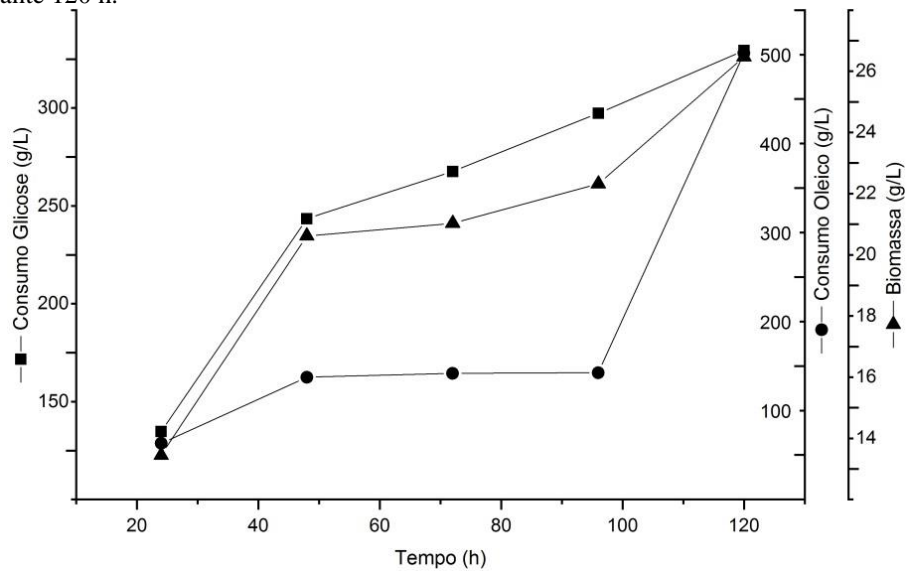
502

503 **Fig. 1** - Superfície de resposta da produção de sofrorolipídios por *S. bombicola* otimizada, relacionando  
 504 diferentes concentrações de ácido oleico e glicose.



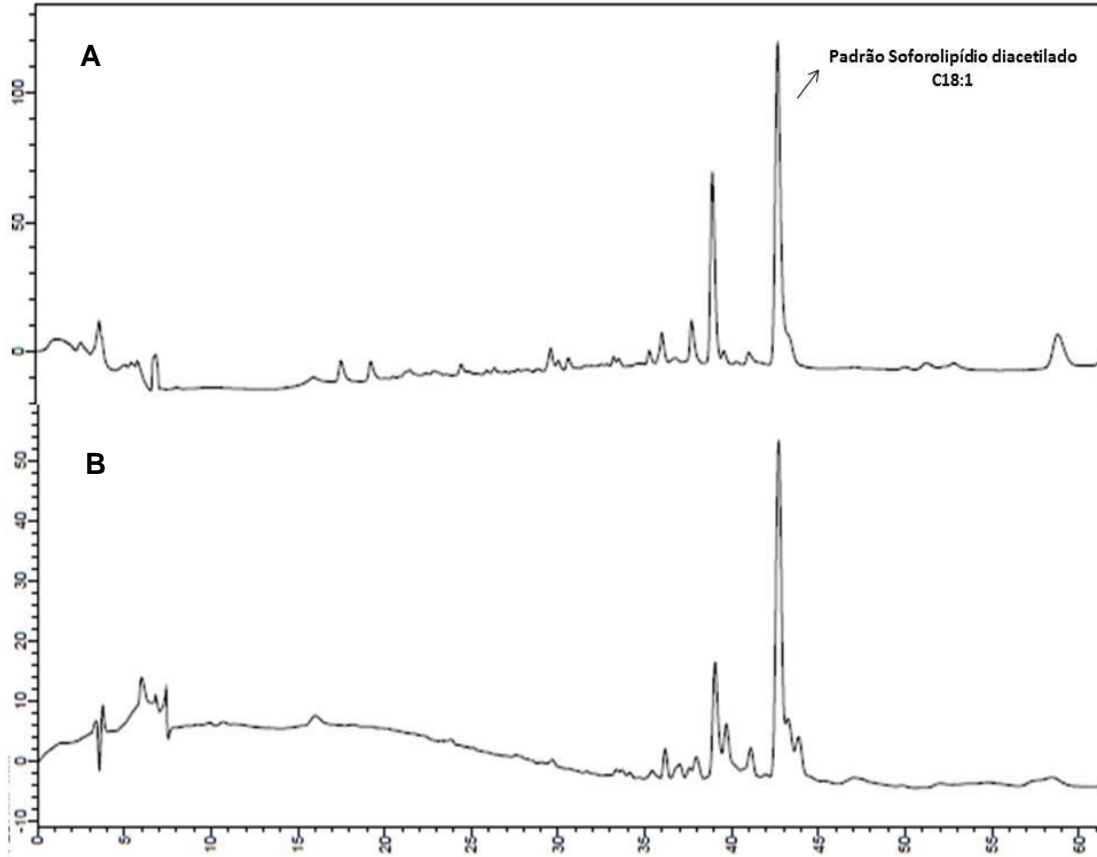
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511

**Fig. 2** - Biomassa, consumo de glicose e ácido oleico (g/L) na produção de sofrorolipídios por *S. bombicola* em biorreator durante 120 h.



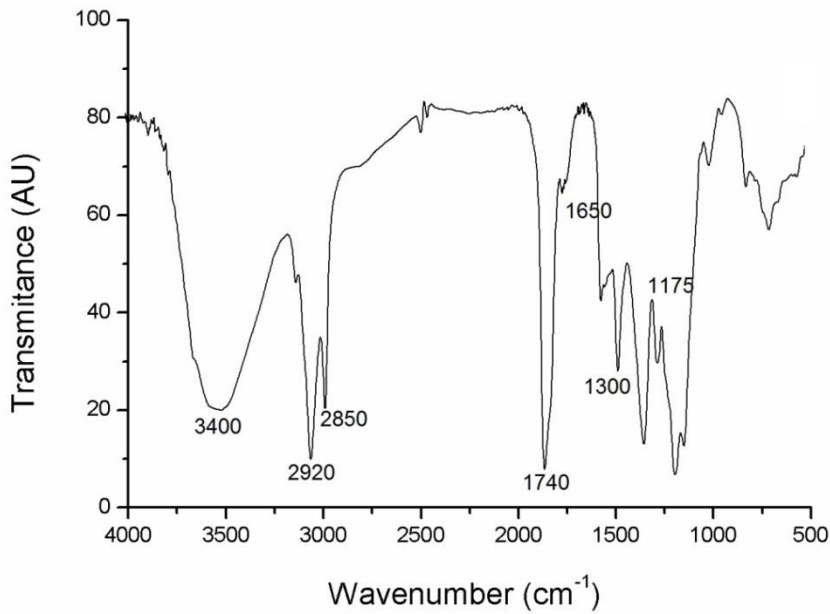
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526

527 **Fig. 3** - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do sofrorolipídios padrão (A) e da amostra  
528 produzida em glicose e ácido oleico por *S. bombicola* (B)



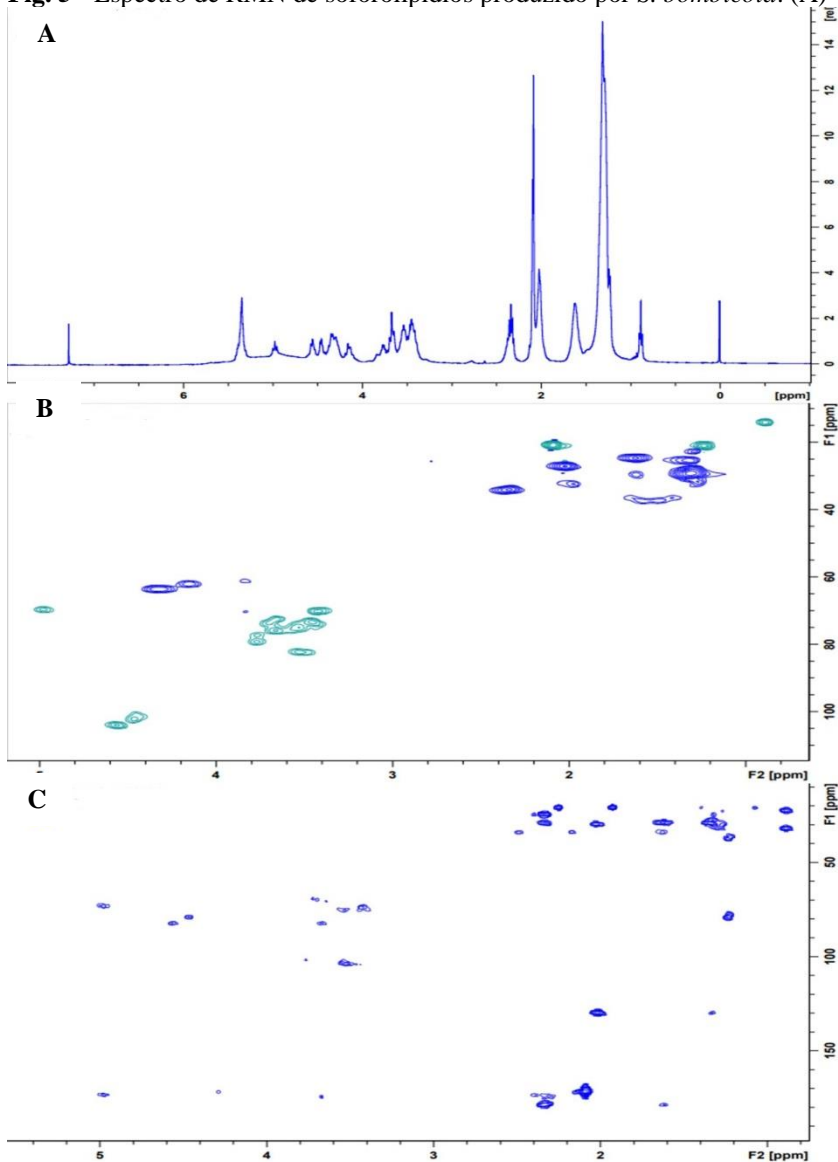
529  
530  
531

**Fig. 4** - Espectro de FT-IR de sofrorolipídios produzido por *Starmerella bombicola* com ácido oleico e glicose.

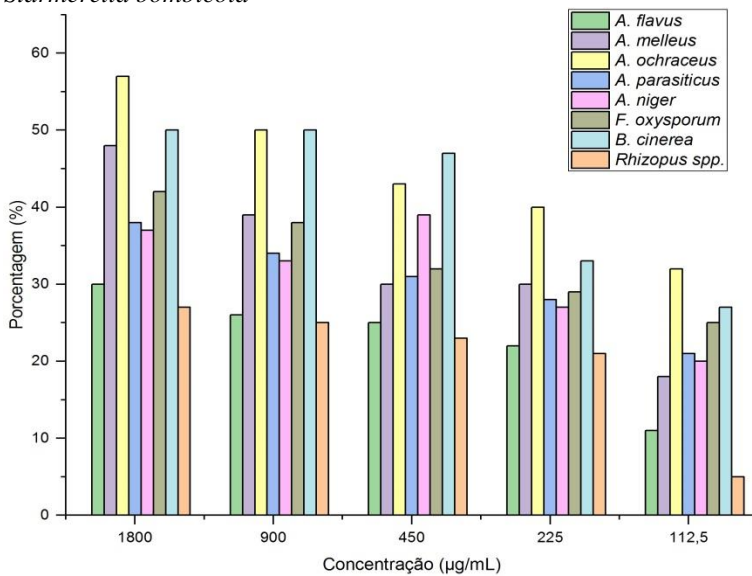


532

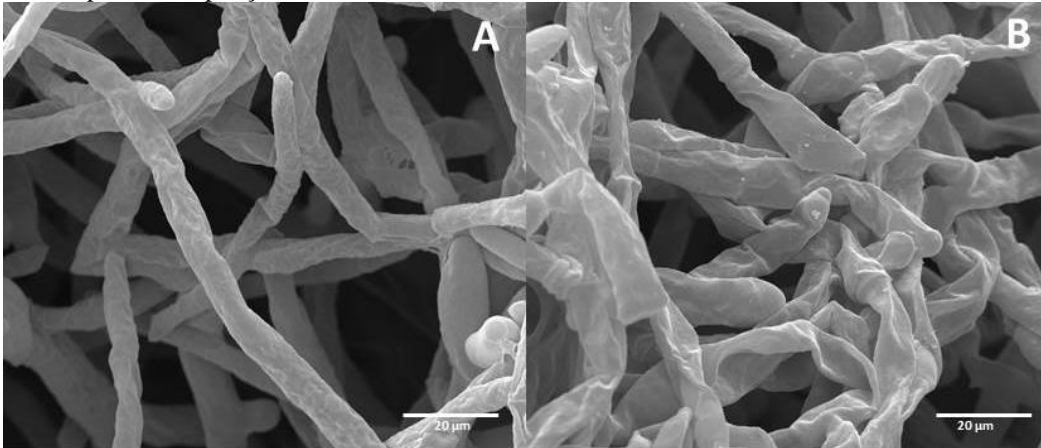
533 **Fig. 5** - Espectro de RMN de sofrorolipídios produzido por *S. bombycola*. (A) <sup>1</sup>H, (B) HSQC e (C) HMBC.



534 **Fig. 6** - Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fungos variando a concentração do sofrorolipídios de  
 535 *Starmerella bombycola*  
 536

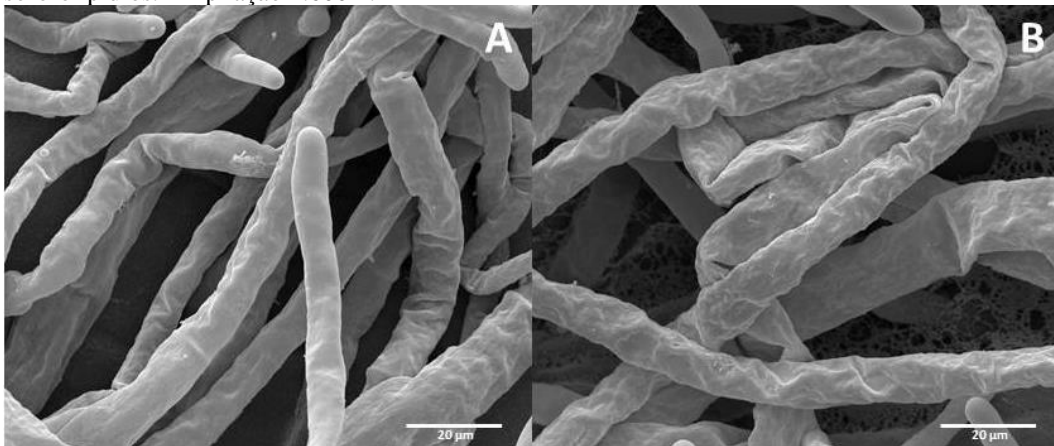


539 **Fig. 7** – Imagens do MEV de micélios do *F. oxysporum*: A – Controle, B – Tratamento com 1800 µg/mL de  
540 soforolipídios. Ampliação 1.600 x.



541  
542

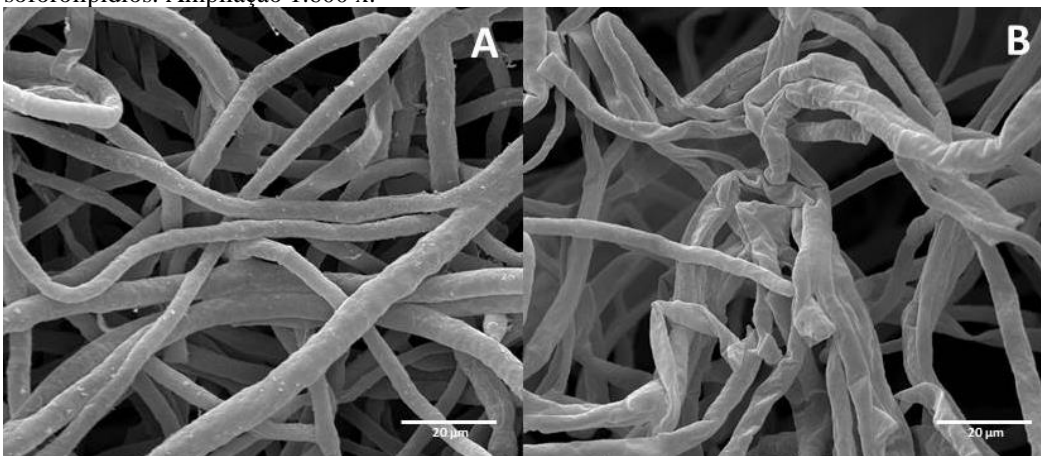
543 **Fig. 8** – Imagens do MEV de micélios do *A. niger*: A – Controle, B – Tratamento com 1800 µg/mL de  
544 soforolipídios. Ampliação 1.600 x.



545  
546

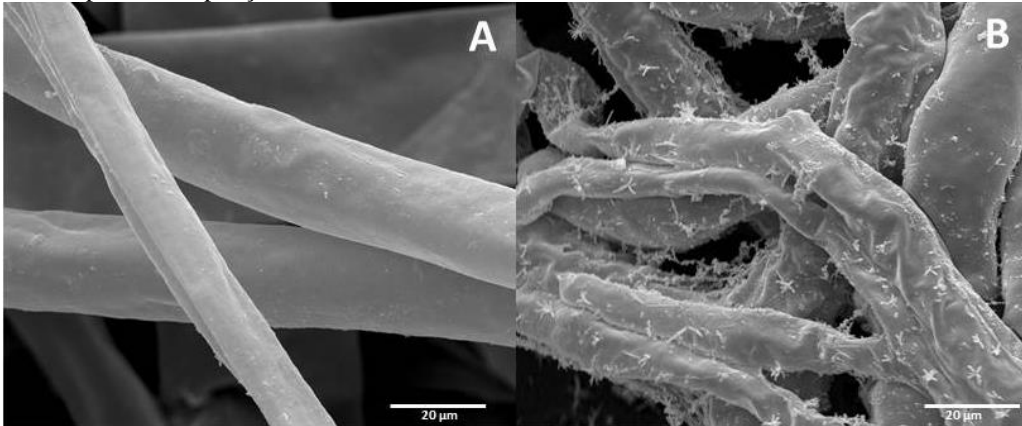
547

548 **Fig. 9** – Imagens do MEV de micélios do *B. cinerea*: A – Controle, B – Tratamento com 1800 µg/mL de  
549 soforolipídios. Ampliação 1.600 x.



550  
551  
552  
553  
554  
555

556 **Fig. 10** - Imagens do MEV de micélios do *Rhizopus* spp.: A – Controle, B – Tratamento com 1800 µg/mL de  
557 soforolipídios. Ampliação 1.600 x.



558  
559  
560

## 5.4 ARTIGO 2

### **Avaliação de um novo filme comestível com amido de mandioca acrescido de soforolipídios lactônicos de *Starmerella bombicola***

Amanda Hipólito<sup>1</sup>, Gabrielly Terassi Bersaneti<sup>1</sup>, Suzana Mali<sup>1</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi\*

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

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

#### **Resumo**

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de soforolipídios lactônicos produzidos por *Starmerella bombicola* com ação antifúngica, bem como avaliar as propriedades mecânicas dos filmes para futura aplicação industrial. Os soforolipídios foram adicionados aos filmes nas concentrações de 0, 2, 5 e 10 g/100 g sólidos e esses foram desenvolvidos pela técnica de casting. Os filmes obtidos apresentaram com boa aparência, sem poros, bolhas ou rachaduras. A incorporação dos soforolipídios foi investigada por técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) e demonstraram a presença da interação entre o amido e o soforolipídios adicionado. A maior concentração de soforolipídios levou ao decréscimo da permeabilidade ao vapor de água, mostrando ser um ingrediente promissor e compatível com a matriz de amido, o que pode ser aplicados na indústria de alimentos como um agente antimicrobiano.

*Palavras-chave:* Antimicrobiano, propriedades mecânicas, permeabilidade, solubilidade, revestimento, filmes de amido.

## 1. Introdução

A embalagem é um dos métodos mais estudados para preservação dos alimentos ao longo de sua vida útil e como resposta às necessidades do consumidor, existe um crescente interesse no desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis que sejam funcionais, ativos e biodegradáveis (Navarro et al., 2016; Debiagi et al., 2014).

Nos últimos anos criou-se uma demanda dos consumidores por alimentos sem adição de ingredientes químicos e o investimento em tecnologias nas indústrias tem levado ao surgimento de embalagens ativas que prolongam a vida útil dos produtos, mas são obtidos de fontes renováveis, produzidos com menor impacto ambiental e alinhados ao conceito de sustentabilidade, tão preconizados na atualidade. Com esse objetivo, agentes antimicrobianos naturais são bastante estudados e podem ser incorporados diretamente nas embalagens de alimentos (Campos et al., 2011; Sipahi et al. 2013; Posser, 2016). A finalidade da embalagem ativa com antimicrobiano natural é impedir ou inibir o crescimento de microrganismos nos alimentos, onde o agente ativo é liberado gradualmente na superfície do produto contra patógenos que os afetam (Balaguer et al., 2013; Ribeiro-Santos et al., 2017).

Os soforolipídios são biossurfactantes classificados como glicolípidos extracelulares, produzidos por diversos microrganismos, destacando-se o uso da *Starmerella bombicola*. São constituídos por um dissacarídeo soforose (2'-O-β-D-glicopiranosil-1-β-D-glicopiranosose), unidos por uma ligação β-glicosídica entre o carbono 1' e o carbono terminal (ω) ou sub-terminal (ω-1) à uma longa cadeia hidrofóbica de ácido graxo que geralmente, contém 16 ou 18 carbonos (Ashby; Solaiman, 2010; Roelants et al., 2019). São biomoléculas não tóxicas, obtidas de fonte renovável e podem ser considerados como uma alternativa eco-amigável para diferentes aplicações (Naughton et al., 2019).

Possuem diversas aplicações em produtos farmacêuticos, cosméticos, detergentes e alimentos (Maeng et al., 2018; Nitschke e Silva, 2017) e atualmente se destacam por possuírem ação antimicrobiana contra diversos microrganismos contaminantes e patógenos de origem agrícola e alimentar, como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Sen et al., 2017), *Clostridium perfringens* e *Campylobacter jejuni* (Silveira et al., 2019), *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea* e *Mucor* (Yuan, Yang e Cheng, 2012).

Vários autores relataram o uso de antimicrobianos em filmes comestíveis como, por exemplo, os óleos essenciais (Song, Zuo e Chen, 2018; Escamilla-Garcia et al., 2017) e biossurfactantes (Adetunji et al., 2018; Maniglia et al., 2019). Porém o uso de soforolipídios com esta finalidade ainda é pouco explorado na literatura. Considerando as vantagens de

produção, a sustentabilidade do processo de obtenção e as possíveis aplicações dos sofrorolipídios como agente antimicrobiano, o objetivo desse trabalho foi empregar sofrorolipídios produzidos por *Starmerella bombicola*, como ingrediente ativo e eco-amigável em filmes comestíveis de amido para aplicação na indústria de alimentos. Para isso os filmes foram produzidos e caracterizados de acordo com sua microestrutura, propriedades de barreira e mecânicas.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Material

O amido de mandioca foi adquirido em comercio local, da marca Yoki Alimentos S.A (Paraná, Brasil) e o glicerol da Synth (Labsynth, São Paulo, Brasil).

Para a produção de sofrorolipídios foi utilizada a levedura *Starmerella bombicola* obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA.

### 2.2 Produção de sofrorolipídios

Os sofrorolipídios foram produzidos pela levedura *Starmerella bombicola* ATCC 22214 em biorreator de 5 L (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda) contendo 3,5 L de volume operacional com meio de fermentação (g/L): 150, glicose; 6, extrato de levedura; 219,5, oleico, com as seguintes condições: inóculo a 0,5 g/L de células, 120 h, 30 °C, 450 rpm, 1 vvm e controle de pH em 3,5. Ao final da fermentação o caldo foi centrifugado e o sobrenadante submetido à extração com acetato de etila. O acetato de etila foi removido por rotaevaporação e a fase obtida foi lavada com hexano e metanol para remover o ácido oleico residual. Os sofrorolipídios bruto foram coletados da fase contendo metanol, rotaevaporado e liofilizado (Silveira et al., 2019). Os sofrorolipídios foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 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) (Hu e Ju, 2001; Wadekar et al., 2012).

### 2.3 Produção dos filmes de amido

Os filmes de amido foram preparados com amido de mandioca, soforolipídios e glicerol (plastificante). Para cada formulação, os filmes foram preparados empregando 3 % (m/v) de sólidos (amido + FOSs) e 20 g de glicerol/ 100 g de sólidos. Os filmes foram preparados pelo método de *casting* e quatro concentrações de soforolipídios foram adicionadas nas soluções filmogênicas: 0, 2, 5 e 10 g de soforolipídios/100 g de sólidos, rotulados como AM, AM-SLP2, AM-SLP5 e AM-SLP10, com formulações descritas na Tabela 1.

O amido e o glicerol foram misturados com a água destilada e mantidos a 90 °C por 10 min com agitação constante. Após a gelatinização, foram adicionadas em cada formulação as quantidades estabelecidas do soforolipídios, homogeneizadas e sonicadas (Unique USC-1800).

**Tabela 1** - Formulações para o desenvolvimento dos filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de soforolipídios de *Starmarella bombicola* nas concentrações de 2, 5 e 10%.

<b>Formulações</b>	<b>Amido (g)</b>	<b>Soforolipídios (g)</b>	<b>Glicerol (g)</b>	<b>Água (g)</b>
<b>AM</b>	12,00	-	2,40	385,6
<b>AM-SLP2</b>	11,76	0,24	2,40	385,6
<b>AM-SLP5</b>	11,40	0,60	2,40	385,6
<b>AM-SLP10</b>	10,80	1,20	2,40	385,6

AM: amido de mandioca (yoki®); SLP: soforolipídios de *S. bombicola*

As soluções filmogênicas foram vertidas sobre placas de Petri de 60 mm (30 g/placa) e encaminhadas para secagem em estufa de circulação de ar TE-394-3 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 30 °C, por aproximadamente 24 h, até a formação dos filmes. Os filmes selecionados foram acondicionados em BOD com 58 % de umidade relativa (UR) e 25 °C até o momento da realização das análises de caracterização.

## 2.4 Caracterização dos filmes

### 2.4.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando um micrômetro (Mitutoyo - Japão) a partir de três pontos aleatórios dos filmes.

### 2.4.2 Microestrutura

A análise de microestrutura foi realizada por microscópio eletrônico de varredura - MEV (modelo FEI Quanta 200). As amostras foram revestidas de ouro por um Sputter Coater (BAL-TEC SCD 050) e avaliadas com voltagem de aceleração de 30 kV, permitindo a visualização da superfície do filme.

#### *2.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR)*

A análise foi conduzida em aparelho Shimadzu FTIR-8300 (Japão) com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , utilizando uma escala de  $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ . As amostras foram incorporadas ao KBr e pressurizadas para a produção das pastilhas. Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR.

#### *2.4.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)*

As análises de DSC foram realizadas no calorímetro Netzsch (modelo DSC-204 - Japão). Cerca de 10 mg de cada amostra foram colocados em recipientes de alumínio. A amostra de soforolipídios foi aquecida de 30 a 300 °C e as amostras de filme de 20 a 100 °C, todas com uma taxa de aquecimento de 10 °C /min em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min.

#### *2.4.5 Solubilidade*

A solubilidade do filme em água foi medida como a porcentagem de matéria seca do filme solubilizado em água durante um período de 24 h (Gontard, Guilbert e Cuq, 1992). A matéria seca inicial de cada filme foi obtida após a secagem em estufa com circulação de ar (Marconi, Brasil) a 60 °C por 24 h. As amostras foram pesadas e imersas em 80 mL de água destilada a 25 °C com agitação constante (50 rpm). Os filmes não solubilizados foram removidos e secos para determinar o peso da matéria seca.

#### *2.4.6 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)*

Os testes PVA foram realizados usando o método ASTM E96-95 1996. Cada amostra foi colocada em uma cápsula de permeabilidade, pesada (tempo zero) e armazenada a 25 ° C em dessecador. No interior das capsulas foi adicionado cloreto de cálcio anidro para obter 0% de UR e uma solução saturada de cloreto de sódio (75%) foi utilizada no dessecador para manter 75% de UR. Após o período de equilíbrio (aproximadamente 2 h), as cápsulas foram pesadas a cada 2 h por 24 h. O transporte de vapor de água foi determinado a partir da curva de ganho de massa (g) da cápsula de permeação, atribuído por regressão linear, determinando o coeficiente angular. A taxa de permeabilidade ao vapor de água foi calculada a partir do coeficiente angular da reta (g/t) dividida área de permeação (m<sup>2</sup>). Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada como  $PVA = TVA.m / \Delta P$ , onde m é a espessura média do filme (m<sup>2</sup>),  $\Delta P$  é a diferença de pressão de vapor de água do ambiente contendo CaCl<sub>2</sub> anidro (0% de UR) e solução saturada de NaCl (75% de UR).

#### *2.4.7 Propriedades mecânicas*

As propriedades mecânicas foram determinadas utilizando texturômetro TA TX2 de acordo com a norma ASTM D882-91 (1996). Corpos de prova (25 × 100 mm) de cada formulação foram cortados e ajustados entre as garras pneumáticas. A distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de tração de 500 mm/min. Foram determinadas a resistência máxima à tração (MPa) e alongação na ruptura (%).

#### *2.4.8. Análise estatística*

O teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) foi empregado para comparação da média e realizado com o STATISTICA 7.0 (Statsoft, Oklahoma).

### **3. Resultados e discussão**

Todas as formulações empregadas neste trabalho resultaram em filmes facilmente removíveis das placas, sem bolhas ou rachaduras, indicando que a concentração de sólidos na solução filmogênica (3 % p/v) utilizada para a produção era adequada.

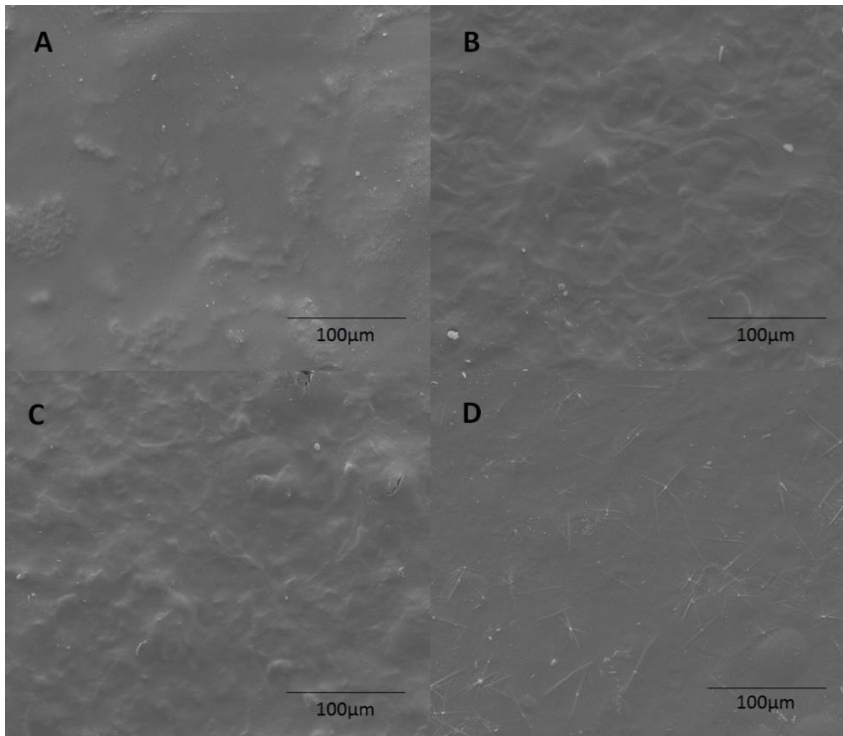
### *3.1 Espessura e microestrutura*

As espessuras das amostras variaram de 153 a 178  $\mu\text{m}$  (Tabela 2), apresentando diferença significativa entre o filme de amido (AM) e AM-SLP2 com menores espessuras, em comparação com os filmes AM-SLP5 e AM-SLP10 com resultados maiores. A espessura dos filmes produzidos por Escamilla-Garcia et al. (2017) também se alterou com a adição de óleo essencial (aniz, laranja e canela), atingindo valores de espessura mais altos quando comparados à amostra controle, alteração essa que pode estar parcialmente relacionada a densidade da suspensão filmogênica em decorrência da maior heterogeneidade na sua composição.

As superfícies dos filmes produzidos foram visualizadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 1). O filme controle (filme AM - Figura 1A) mostrou uma superfície mais homogênea e a adição de soforolipídios resultou em superfícies mais ásperas para os filmes AM-SLP2 e AM-SLP5 (Figura 1B e C). Song, Zuo e Chen (2018) relataram que filmes incorporados de surfactantes Tween e Span 80 nas concentrações de 0,1%, afetaram suas microestruturas, apresentando filmes menos homogêneos devido a provável migração dos surfactantes para a superfície do filme durante a secagem.

Filmes com concentrações mais altas de soforolipídios (AM-SLP10) mostraram superfícies mais suaves, o que pode estar relacionado à concentração de soforolipídios aplicada (Figura 1D). Maniglia et al. (2019) relataram estruturas similares, onde os filmes de amido adicionados do surfactante SDS (dodecilsulfato de sódio) eram mais suaves e homogêneos, como o apresentado nesse estudo (AM-SLP10) e continham menos imperfeições quando comparado com os filmes de amido controle. Embora as superfícies dos filmes AM-SLP2 e AM-SLP5 apresentaram-se mais ásperas, não foi observada aglomeração ou migração dos soforolipídios para a superfície do filme, indicando boa interação com a matriz de amido.

**Figura 1** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície dos filmes: (A) filme de amido (AM); (B) filme amido com 2% soforolipídios (AM-SLP2); (C) filme amido com 5% de soforolipídios (AM-SLP5) e (D) filme amido com 10% de soforolipídios (AM-SLP10).



**Tabela 2** - Resultados de espessura, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes comestíveis à base de amido de mandioca e sofrorolipídios

<b>Formulação</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Solubilidade (%)</b>	<b>PVA x 10<sup>11</sup> (g/msPa)</b>
<b>AM</b>	153 $\pm$ 3,53 <sup>b</sup>	17,06 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	1,48 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
<b>AM-SLP2</b>	160 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	18,76 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>	1,16 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup>
<b>AM-SLP5</b>	173 $\pm$ 3,54 <sup>a</sup>	16,80 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	1,29 $\pm$ 0,63 <sup>ab</sup>
<b>AM-SLP10</b>	178 $\pm$ 3,53 <sup>a</sup>	21,08 $\pm$ 1,71 <sup>a</sup>	0,85 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

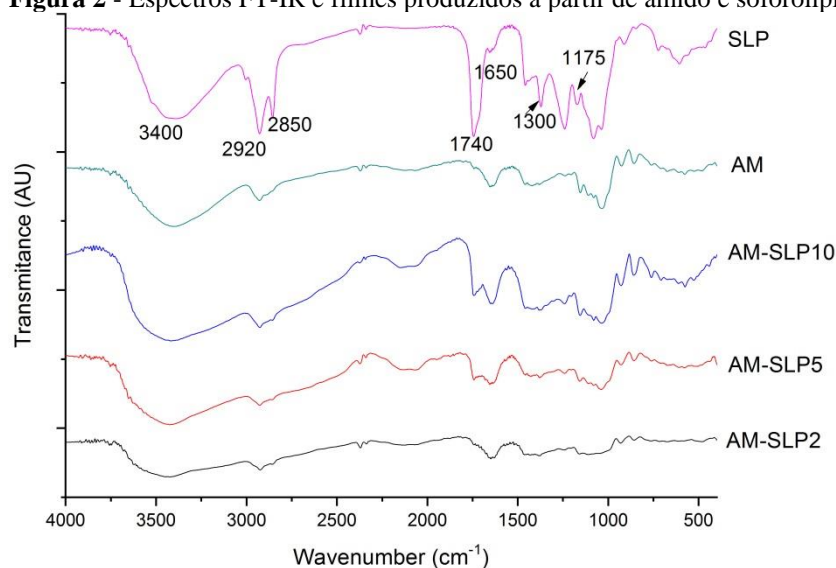
### 3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR)

Os espectros FT-IR dos sofrorolipídios e dos filmes produzidos com amido e sofrorolipídios estão apresentados na Figura 2 e foi observada uma forte banda próxima a 3400  $\text{cm}^{-1}$  em todas as amostras, que pode ser relacionada com o estiramento vibracional das hidroxilas (OH) presentes em todos os compostos empregados na formulação dos filmes (amido, glicerol e sofrorolipídios) (Romano et al., 2016; Santos et al., 2014). Pode-se perceber que esta banda apareceu menos intensa nos espectros dos filmes em comparação com o do sofrorolipídios, o que pode estar relacionado ao decréscimo das hidroxilas livres nos filmes, uma vez que possivelmente estes grupamentos estejam participando de ligações de hidrogênio nos

filmes, que são responsáveis pela manutenção da matriz polimérica de amido (Maniglia et al., 2019).

O espectro em  $1740\text{ cm}^{-1}$  com banda mais aparente no sofrorolipídios e nos filmes com sofrorolipídios corresponde ao grupo carbonila ( $\text{C} = \text{O}$ ) de ésteres e da forma lactônica presente na amostra. As bandas próximas a  $2920\text{ cm}^{-1}$  foram observadas em todas as amostras e correspondem a compostos alifáticos ( $\text{CH}_2$ ) e a banda foi mais intensa no sofrorolipídios do que nos filmes por conta da cadeia dos sofrorolipídios. A banda a  $1650\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída às moléculas de água incorporadas na matriz polimérica de amido e em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , uma faixa de carbono insaturado foi observada nos espectros de sofrorolipídios e dos filmes incorporados com sofrorolipídios. A banda próxima a  $1300\text{ cm}^{-1}$  foi relacionada com a deformação simétrica dos grupos CH (Bersaneti et al., 2016; Santos et al. 2014). As bandas que nas regiões entre  $1300\text{--}1175\text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações de C-H no anel aromático e O-H do fenol (Zhao et al., 2018), e aparecem nesta região com maior intensidade no sofrorolipídios, indicando a presença do composto nos filmes AM-SLP2, AM-SLP5 e AM-SLP10.

**Figura 2** - Espectros FT-IR e filmes produzidos a partir de amido e sofrorolipídios em diferentes concentrações



SLP: sofrorolipídios de *S. bombicola*

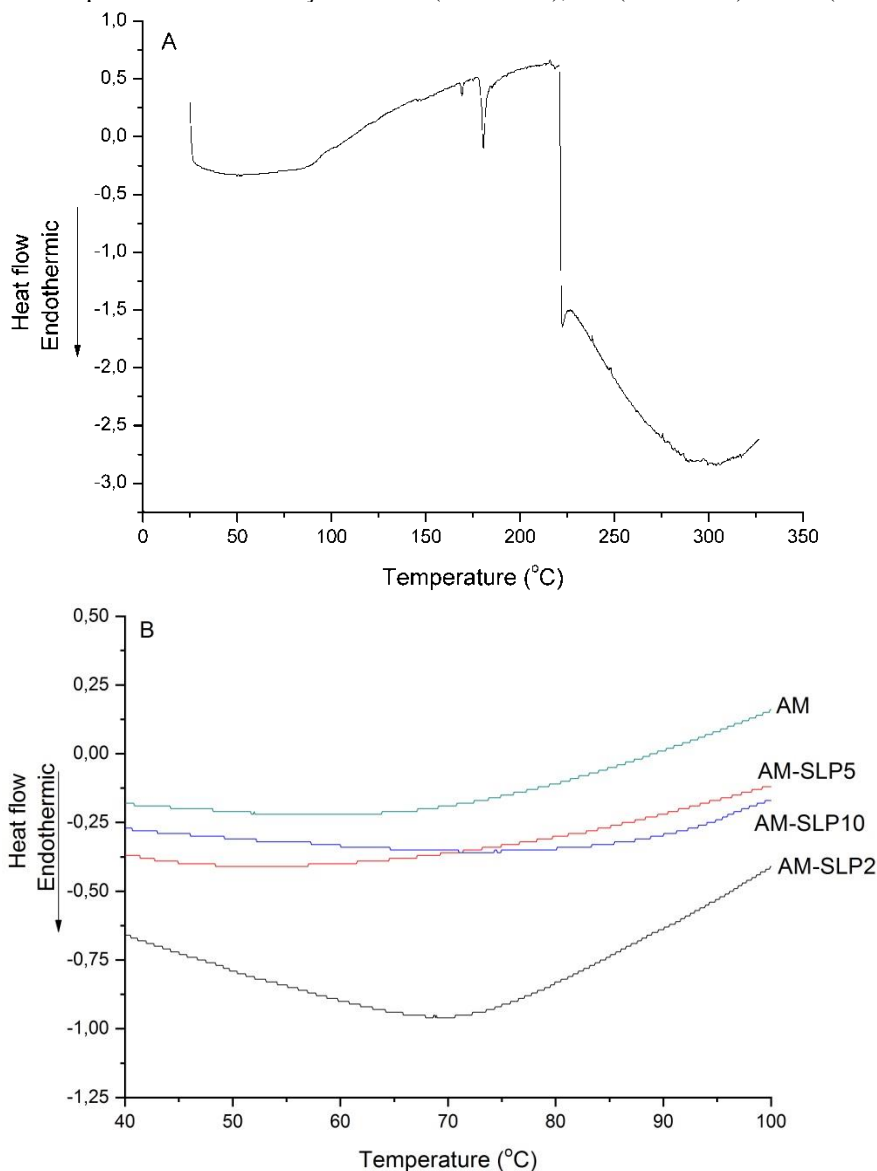
### 3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os termogramas de sofrorolipídios puro (A) e filmes (B) estão representados na Figura 3, no termograma de sofrorolipídios puro a temperatura variou de 30 a 325 °C e foram observados picos discretos em 168 °C e 178 °C e um grande pico endotérmico a 221 °C, que estão possivelmente relacionados com a degradação térmica dos sofrorolipídios. Os picos

atribuídos à degradação térmica dos sofrorolipídios estão localizados em temperaturas muito mais altas do que os observados Abdulkadir et al. (2015), que testaram a estabilidade térmica do sofrorolipídios em uma faixa de temperatura de 20 a 100 °C, menor que a estudada neste trabalho, e demonstraram que o biossurfactante não sofreu nenhum tipo de degradação até o máximo da temperatura testada, indicando que o sofrorolipídios permaneceu estável durante a produção da solução filmogênica, visto que foram incorporados à temperatura de 90 °.

Os filmes de amido produzidos não apresentaram nenhum pico durante a análise de DSC nas temperaturas testadas. Esse resultado foi confirmado por Mali et al. (2002), que fizeram análise de calorimetria em filmes de amido de inhame em uma faixa de temperatura entre -40 °C a 120 °C e não obtiveram nenhum pico de degradação.

**Figura 3** - Termogramas de DSC de sofrorolipídios puro (A) e filmes produzidos a partir de amido e mistura com sofrorolipídios nas concentrações de 2% (AM-SLP2), 5% (AM-SLP5) e 10% (AM-SLP10) (B).



### *3.4 Solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA)*

A solubilidade e a permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos estão apresentadas na Tabela 2. A solubilidade dos filmes de amido não foi afetada significativamente com a adição dos soforolipídios, sendo 17,07% para o filme de amido (AM), 18,76%, 16,80% e 21,08% para AM-SLP2, AM-SLP5 e AM-SLP10, respectivamente. A tendência de aumento na solubilidade observada para o filme AM-SLP10, pode ser atribuída a natureza hidrofílica dos soforolipídios. De acordo com Song, Zuo e Chen (2018) filmes de amido de milho adicionados de Tween apresentaram um notável aumento na solubilidade em comparação com o filme de amido controle. Maniglia et al. (2019) também observaram que em filmes de amido adicionados de biossurfactante e surfactante sintético, a solubilidade aumentou devido à hidrofiliabilidade dos compostos, aumentando assim a superfície de contato entre a água e o filme.

A adição do soforolipídios nos filmes apresentou diminuição na permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes, obtendo diferença significativa entre o filme padrão (AM), os filmes com 2 e 5 % de soforolipídios (AM-SLP2 e AM-SLP5) e filme com 10 % de soforolipídios (AM-SLP10). A diminuição do PVA devido à adição de surfactantes tem sido observada em diferentes matrizes, como o amido de tapioca com sacarose (Chen, Kuo e Lai, 2009), hidroxipropilmetilcelulose com span 60 e sacarose (Villalobos, Hernandez-Muñoz e Chiralt, 2006), filmes à base de amido e ácido ascórbico com Tween 20 (Zhong e Li, 2011) e filmes de amido de milho com ésteres de sorbitano de diferentes ácidos graxos (Ortega-Toro, Jiménez e Talents, 2014). Maniglia et al. (2019) apresentou menores resultados de permeabilidade ao vapor de água quando os filmes foram adicionados de surfactante SDS, devido ao aumento da interação entre o surfactante e os polímeros do amido, reduzindo assim a passagem de vapor de água. O decréscimo das PVA pode ser uma característica interessante aos filmes comestíveis com ação antimicrobiana, uma vez que a contaminação de alimentos fica favorecida com o aumento da umidade e atividade de água do alimento.

### *3.5 Propriedades mecânicas*

A adição de 2 e 5 % de soforolipídios aos filmes não afetou a sua resistência mecânica no entanto, a adição de 10 % levou ao seu decréscimo significativo (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com Rodríguez et al. (2006) também observaram a diminuição da resistência a tração nos filmes de amido na presença de glicerol e surfactantes (Span 80 e Tween 20). Assim

como Ortega-Toro et al. (2014), que mostraram diminuição nas propriedades mecânicas quando Span 40, 60 e 80 foi adicionado em filmes de amido de milho.

A adição de 2 e 5 % de soforolipídios levou ao decréscimo do alongamento dos filmes em comparação ao filme controle, no entanto, quando adicionou-se 10 % do biossurfactante, o alongamento aumentou, apresentando valores similares a amostra controle (Tabela 3). Maniglia et al. (2019) relataram que o uso do biossurfactante afetou a resistência a tração e o alongamento dos filmes, assim como demonstrado no resultado desse estudo com adição de 10 % de soforolipídios. Isso porque a interação do biossurfactante nessa concentração com a matriz polimérica de amido pode aumentar a distância entre as cadeias de amido, promovendo um efeito sinérgico entre o biossurfactante e o glicerol, resultando em filmes mais flexíveis (Maniglia et al., 2019).

**Tabela 3** - Propriedades mecânicas de filmes comestíveis à base de amido de mandioca e soforolipídios

<b>Formulações</b>	<b>Resistência à tração (Mpa)</b>	<b>Alongamento (%)</b>
<b>AM</b>	9,21 ± 2,40 <sup>ab</sup>	36,10 ± 0,42 <sup>a</sup>
<b>AM-SLP2</b>	10,54 ± 1,99 <sup>a</sup>	18,19 ± 0,47 <sup>b</sup>
<b>AM-SLP5</b>	8,81 ± 1,63 <sup>ab</sup>	7,65 ± 0,21 <sup>b</sup>
<b>AM-SLP10</b>	4,52 ± 1,31 <sup>b</sup>	37,77 ± 1,62 <sup>a</sup>

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

#### 4. Conclusão

Os soforolipídios de *Starmarella bombicola* foram produzidos por fermentação e empregados como aditivo com finalidade antimicrobiana em filmes comestíveis de amido de mandioca. A obtenção dos filmes em todas as concentrações de soforolipídios resultou em filmes facilmente removíveis das placas, sem bolhas e rachaduras. A adição do soforolipídios resultou em menores permeabilidades ao vapor de água (PVA), concluindo assim que os soforolipídios são um ingrediente promissor para filmes com potencial antimicrobiano, sendo uma alternativa eco-amigável para uso em embalagens de alimentos agregando a propriedade como um antimicrobiano natural.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brasil) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio.

## Referências

- Abdulkadir E. E., Sanket J. J., Yahya M. A., Ali S. A., Saif N. A., Dua'a A., Ibrahim M. B. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **Frontier Microbiology**, 2015 doi:10.3389/fmicb.2015.01324
- Adetunji, C. O.; Adejumo, I. O.; Afolabi, I. S.; Adetunji, J. B.; Ajisejiri, E. S. Prolonging the shelf life of 'Agege Sweet' orange with chitosan-rhamnolipid coating. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, 2018. doi:10.1007/s13580-018-0083-2
- Ashby, R. D.; Solaiman, D. K. Y. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. **Biotechnology Letters**, v. 32, n.10, p.1429–1437, 2010. doi:10.1007/s10529-010-0310-0
- ASTM.(1996). Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. Annual Book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM.(1996). Standard test methods for water vapor transmission of material, E96 95. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials
- Balaguer, M.P., Lopez-Carballo, G., Catala, R., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P., Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**. v. 166, p.369–377, 2013
- Bersaneti, G. T., Mantovan, J. Magri, A., Mali, S. Celligoi, M. A. P. C. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p.1132-1138. 2016 doi: 10.1016 / j.carbpol.2016.06.081.
- Campos, C. A.; Gerschenson, L. N.; Flores, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 849–875, 2011. doi:10.1007/s11947-010-0434-1
- Chen C.H., Kuo W.S., Lai, L.S. Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsaio leaf gum films. **Food Hydrocolloids**. v.23, p.714–721, 2009. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.06.006
- Debiagi, F., Kobayashi, R. K. T., Nakazato, G., Panagio, L. A., & Mali, S. Biodegradable active packaging based on cassava bagasse, polyvinyl alcohol and essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.52, p.664–670, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.032>

- Escamilla-García, M.; Calderón-Domínguez, G.; Chanona-Pérez, J.; Mendoza-Madrigal, A.; Di Pierro, P.; García-Almendárez, B.; Regalado-González, C. Physical, Structural, Barrier, and Antifungal Characterization of Chitosan–Zein Edible Films with Added Essential Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, 18 (11). 2017. doi: 10.3390 / ijms18112370
- Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 206-211, 1992.
- Hu, Y., Ju, L.K., 2001. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 29, p.593–601.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00439-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00439-2)
- Maeng, Y; Kim, KT; Zhou, X; Jin, L; Kim, KS; Kim, YH; Lee, S; Park, JH; Chen, X; Kong, M; Cai, L; Li, X. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 917–929, 2018. doi: 10.1111 / 1751-7915.13297
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.379–386, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00058-9)
- Maniglia, B. C.; Laroque, D. A.; Andrade, M.; Carciofi, B. A., M.; Tenório, A. S.; Andrade, C. J. Production of active cassava starch films; effect of adding a biosurfactant or synthetic surfactante. **Reactive and Functional Polymers**. 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104368>
- Naughton, P. J.; Marchant, R.; Naughton, V.; Banat, I. M. Microbial Biosurfactants: Current trends and applications in Agricultural and Biomedical industries. **Journal of Applied Microbiology**. 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14243>
- Navarro, F., Fratianni, F., Cozzolino, A., Granese, T., & Coppola, R. Active carbohydrates. In M. W. Sidiqi, J. F. A. Zavala, & C. A. Hwang (Eds.), Postharvest management approaches for maintaining quality of fresh produce. **Switzerland: Springer International Publishing**, 2016.
- Nitschke, M; Silva, SS. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, p. 1–8, 2017. doi: 10.1080 / 10408398.2016.1208635
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens,P., Chiralt, A. Starch-based Blends, Composites and Nanocomposites.**Food Hydrocoll**. v.38, p.66–75, 2014.
- Posser, Y. M. **Degradação da cafeína através de processos oxidativos avançados feton e foto feton**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande de Sul. Porto Alegre, 2016.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N.R.d., Sanches-Silva, A.,. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. **Trends Food Science Technology**. v.61, p.132–140, 2017

Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Mate, J.I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films, **Food Research International**, v. 39, p. 840–846, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.04.002>

Roelants, S.; Solaiman, D. K. Y.; Ashby, R. D.; Lodens, S.; Van Renterghem, L.; Soetaert, W. Production and Applications of Sophorolipids. **Biobased Surfactants**, p.65–119. 2019.

Romano, N., Santos, M., Mobili, P., Vega, R., Gómez-zavaglia, A. Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructooligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 202, p.467–475, 2016.doi: 10.1016 / j.foodchem.2016.02.002

Santos, M. I., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, A. Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugars using a combined approach of near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Food Research International**, v.64, p.514–519, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.040>

Sen, S.; Borah, S. N.; Bora, A.; Deka, S. Production, characterization and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjavae* YS3. **Microbial Cell Factories**. v. 16, n. 1, p. 95, 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. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101287>

Sipahi RE, Perez MEC, Moreira RG, Gomes C, Castillo A. Improved multilayered antimicrobial alginate based edible coating extends the shelf life of fresh cut watermelon (*Citrullus lanatus*). **Food Science Technology**, v.51 (1), p. 9–15, 2013. doi: 10.1016 / j.lwt.2012.11.013

Song, X.; Zuo, G.; Chen, F. Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.107, p.1302-1309, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.114>

Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A. Effect of surfactants on water barrier and sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films, **Food Hydrocoll.** v.20, p.502–509, 2006. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.04.006

Wadekar, S., Kale, S., Lali, A., Bhowmick, D., Pratap, A. Sophorolipid production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89(6), p.1029–1039. 2012

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, 1 fev. 2012.

Zhao, Y., Teixeira, J.S., Ganzle, Saldaña, M.D.A. Development of Antimicrobial Films Based on Cassava Starch, Chitosan and Gallic Acid Using Subcritical Water Technology. **Journal**

**of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 101-110, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.010>

Zhong Y., Li Y., Effects of surfactants on the functional and structural properties of kudzu (Pueraria lobata) starch/ascorbic acid films, **Carbohydrate Polymers**. v.85, p.622–628, 2011.  
doi: 10.1016 / j.carbpol.2011.03.031

## 6 CONCLUSÕES

- As variáveis glicose e ácido oleico foram significativas e otimizadas em 150 g/L e 219,5 g/L respectivamente com uma produção máxima de 55,28 g/L em frascos de Erlenmeyer.
- A produção dos sofrorolipídios em biorreator atingiu 67 g/L, correspondendo um aumento de 21% em relação ao frasco de Erlenmeyer. Os consumos de glicose e ácido oleico aumentaram progressivamente durante o período da fermentação. A biomassa atingiu 27,47 g/L em 120h.
- As análises de caracterização estrutural (CLAE, FT-IR e RMN) demonstraram, em comparação com o padrão que a estrutura formada pela *S. bombicola* foi predominantemente lactônica.
- Os sofrorolipídios produzidos neste estudo tiveram efeito inibitório e fungicida contra esporos dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Brotrytis cinerea* e *Rhizopus* spp, em 48 h. A atividade antifúngica do sofrorolipídios contra os fungos *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* e *Rhizopus* spp. ainda não tinham sido relatada.
- Os filmes produzidos com sofrorolipídios de *S. bombicola* e amido apresentaram boa aparência, sem a presença de bolhas, poros ou rachaduras. A adição do sofrorolipídios levou ao decréscimo na permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes produzidos.

## REFERÊNCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**. 2001.
- ADETUNJI, C. O.; ADEJUMO, I. O.; AFOLABI, I. S.; ADETUNJI, J. B.; AJISEJIRI, E. S. Prolonging the shelf life of 'Agege Sweet' orange
- ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**. 2016.
- ARGUELLES-ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factory**. 2009
- ASHBY, R. D.; MACLOON, A. J.; SOLAIMAN, D. K. Y.; YEE, W. C.; REED, M. A Process Model for Approximating the Production Costs of the Fermentative Synthesis of Sophorolipids. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2013
- ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. **Biotechnology Letters**, v. 32, n.10, p.1429–1437, 2010.
- ASMER, H. J.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n.9, p.1460–1466, 1988.
- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014. Doi:10.1590/bjft.2014.019
- BAERT, K., VALERO, A., DE MEULENAER, B., SAMAPUNDO, S., AHMED, M.M., BO, L., DEBEVERE, J., DEVLIEGHERE, F.. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. **International Journal of Food Microbiology**. v. 118,p.139-150. 2007
- BAHRAM, S. et al. Whey protein concentrate edible film effects of essential oils. **Journal Food Process**. 2014.
- BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced production of bioactive sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by design of experiment approach with successive purification and characterization. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 7, p. 377–386, 2012.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2010.

BANAT, I.M.; SATPUTE, S.K.; CAMEOTRA, S.S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N.V. Cost effective technology and renewable substrates for biosurfactants production. **Frontiers in Microbiology**. 2014.

BASAK, G.; DAS, D.; DAS, N., Dual role of acidic diacetate sophorolipid as biostabilizer for ZnO nanoparticle synthesis and biofunctionalizing agent against *Salmonella enterica* and *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. p.87–96. 2014.

BELLVER-SOTO, J.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; RUIZ, M. J.; JUAN-GARCÍA, A. Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern European countries: wine and beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2014.

BERSANETI, G. T.; MANTOVAN, J. MAGRI, A., MALI, S. CELLIGOI, M. A. P. C. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.081> 0144-8617

BRITO, G. F., AGRAWAL, P., ARAÚJO, E.M., MÉLO, J.J.A., Biopolímero, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.6, n.2, p.127-139, 2011.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 849–875, 2011.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p.1153-62, 2007.

CARVALHO, A. J. F. Starch: major sources, properties and applications as thermoplastic materials. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Eds.), *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. p. 321–342, 2008.

CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488–494, 1999.

CAVALERO, D. A.; COOPER, D. G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 31–41, 2003.

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

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; PIEL, J.; BORRISS, R. Genome analysis of *Bacillus*

amyloliquefaciens FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal Biotechnology** 2009

CHUNG, Y. R.; KIM, C. H.; HWANG, I.; CHUN, J. *Paenibacillus koreensis* sp. nov. A new species that produces an iturin-like antifungal compound. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2000

CIESIELSKA, K.; VAN BOGAERT, I. N.; CHEVINEAU, S.; LI, B.; GROENEBOER, S. SOETAERT, W.; VAN DE PEER, Y.; DEVREESE, B. Exoproteome analysis of *Starmerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids. **Journal of Proteomics**. v. 98, p. 159 – 174, 2014

CLAUS, S; VAN BOGAERT, INA. Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 21, p. 7811–7821, 2017.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis-Bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173–176, 1984.

DANIEL, H. J.; OTTO, R.Y.; BINDER, M.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 40–45, 1999.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Microbial surfactants of marine origin: potentials and prospects. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K.; SUMALATHA, S. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 13, n. 3, p. 481–488, 2010.

DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Kinetics and Balance of a Fermentation Free from Product Inhibition - Sophorose Lipid Production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 6–11, 1992.

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

DAVILA, AM; MARCHAL, R; VANDECASTEELE, JP. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology of Biotechnology**. v. 38, p. 6-11, 1992.

DE ALMEIDA, D.G.; RITA DE CÁSSIA, F.; SILVA, J.M.L.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V.A.; BANAT, I.M.; SARUBBO, L.A.; Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**. 2016.

DEBODE, J.; DE MAEYER, K.; PERNEEL, M.; PANNECOUCQUE, J.; DE BACKER, G.; HÖFTE, M.; Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp. **Journal of Applied Microbiology**. 2007

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2008

DELBEKE, E. I. P.; ROELANTS, W.K.L; MATTHIJS, N.; EVERAERT, B.; SOETAERT, W.; COENYE, T.; GREEM, V.M.K.; STEVENS, V. C. Sophorolipid amine oxide production by a combination of fermentation scale-up and chemical modification Sophorolipid amine oxide production by a combination of fermentation scale-up and chemical modification. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2016

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

DOLMAN, B. M.; KAISERMANN, C.; MARTIN, J. P.; WINTERBURN, J. B. Integrated sophorolipid production and gravity separation. **Process Biochemistry**. v. 54, p. 162-171, 2017

DOLMAN, M. B.; KAISERMANN, C.; MARTIN, J. P.; WINTERBURN, B. J. Integrated sophorolipid production and gravity separation. **Process Biochemistry**, 2016.

ESCAMILLA-GARCÍA, M.; CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, G.; CHANONA-PÉREZ, J.; MENDOZA-MADRIGAL, A.; DI PIERRO, P.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.; REGALADO-GONZÁLEZ, C. Physical, Structural, Barrier, and Antifungal Characterization of Chitosan–Zein Edible Films with Added Essential Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017. doi: 10.3390 / ijms18112370

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

FENG, X.; VO, A.; PATIL, H.; TIWARI, R. V; ALSHETALI, A. S.; PIMPARADE, M. B.; REPKA, M. A. The effects of polymer carrier, hot melt extrusion process and downstream processing parameters on the moisture sorption properties of amorphous solid dispersions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 692–704, 2016.

FRIAS, A. G. **Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* e *f.sp. lactucae* obtidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo. p. 56, 2014.

GARAY, L.A.; SITEPU, I.R.; CAJKA, T.; CATHCART, E.; FIEHN, O.; GERMAN, J.B.; BLOCK, D.E.; BOUNDY-MILLS, K.L. Simultaneous production of intracellular triacylglycerols and extracellular polyol esters of fatty acids by *Rhodotorula babjevae*

and *Rhodotorula aff. paludigena*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. p.1397–1413, 2017.

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

GAUR, V. K., REGAR, R. K., DHIMAN, N., GAUTAM, K., SRIVASTAVA, J. K., PATNAIK, S., MANICKAM, N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. **Bioresource Technology**, 2019. 121314. doi:10.1016/j.biortech.2019.121314

GHANBARI, A.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; MASHKOUR, M. Preparation and characterization of thermoplastic starch and cellulose nanofibers as green nanocomposites: Extrusion processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 442–447, 2018.

GLENNS, R. N.; COOPER, D. G. Effect of substrate on sophorolipid properties. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 83, n. 2, p. 137–145, 2006.

GÖBBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 4, p. 225–230, 1984.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 206-211, 1992.

GORDON, T. G.; SWETT, C. L.; WINGFIELD, M. J. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. **Crop Protection**, n. 73, p. 28-39, 2015.

GROVER, M.; NAIN, L.; SINGH, S. B.; SAXENA, A. K.; Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. **Current Microbiology** 2010

GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I. TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture médium. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 1-7, 2015

GUILDER, M.; PASQUOTO-STIGLIANI, T.; BILESKY, N.; GRILLO, R.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F.; DE LIMA, R. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. **Scientific Reports**, 2017.

GUPTA, R. **Biosynthesis of novel sophorolipids using *Candida bombicola* ATCC 22214: characterization and applications**. June, 2012. Disponível em: <[http://ncl.csircentral.net/1032/1/Thesis\\_Reetika\\_Gupta\\_June\\_2012.pdf](http://ncl.csircentral.net/1032/1/Thesis_Reetika_Gupta_June_2012.pdf)>

HAIGHTON, L. A.; LYNCH, B. S.; MAGNUSON, B. A.; NESTMANN, E. R. A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. **Critical Reviews in Toxicology**. 2012.

HOA, H. L. N.; LOAN, Q. L.; EUN-KI, K.; HA, T. T.; DUY, D. N.; KHANH, Q. H.; DUNG, H. N. Production and characterization of sophorolipids produced by *Candida bombicola* using sugarcane molasses and coconut oil. v. 22, n. 2, p. 66–75, 2017.

HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RILKE, O.; KLEBER, H.-P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 147–155, 1994

HOOVER, R.; HUGHES, T.; CHUNG, H. J.; LIU, Q. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 399–413, 2010.

HU, Y.; JU, L. K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 10, p. 593–601, 2001.

HUNTER, R. J. **Introduction to Modern Colloid Science**. New York: Oxford University Press, 1992.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/eng/classification/classificationsalphaorder>>. Acesso em: 27 de nov. de 2018.

JIA, X.; QI, L.; ZHANG, Y.; YANG, X.; WANG, H.; ZHAO, F.; LU, W. Computational fluid dynamics simulation of a novel bioreactor for sophorolipids production. **Chemical Engineering**. 2016

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 302–310, 2012.

JIMÉNEZ-PENALVER, P.; CASTILLEJOS, M.; KOH, A.; GROSS, R.; SANCHEZ, A.; FONT, X.; GEA, T. Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. **Journal of Cleaner Production**. 2017

JOSHI, S.J.; GEETHA, S.J.; DESAI, A.J. Characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* R2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2015.

KAUR, G.; WANG, H.; TO, M. H.; ROELANTS, S. L. K. W.; SOETAERT, W.; LIN, C. S. K.. Efficient sophorolipids production using food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 232, p.1–11, 2019. doi:10.1016/j.jclepro.2019.05.326

KIM, H. Y.; JANE, J. LIN; LAMSAL, B. Hydroxypropylation improves film properties of high amylose corn starch. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 175–183, 2017.

KIM, YB; YUN, HS; KIM, EK. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6028–6032, 2009.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187–201, 2002.

KOH, A; GROSS, R. A versatile family of sophorolipid esters: Engineering surfactant structure for stabilization of lemon oil-water interfaces. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 507, p. 152–163, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.07.089>>

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

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

LEE, S. C.; KIM, S. H; PARK, I. H.; CHUNG, S. Y.; CHOI Y. I. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. **Archives of Microbiology**. 2007.

LIU, X.; MA, X.; YAO, R.; PAN, C.; HE, H. Sophorolipids production from rice straw via SO<sub>3</sub> micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **AMB Express** v. 6, n. 1, p. 60, 2016.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Jurnal of Cosmetic Science**. 2009.

LUVIELMO, M. M. LAMAS, S. V. Revestimento comestível em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v.8, n.1, p.8-15. 2012.

MA, X.; LI, H.; WANG, D.; SONG, X. Sophorolipid production from delignined corncob residue by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 96219. **Environmental Biotechnology**. 2013

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associados a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. p. 94. 2012.

MADDIKERI, G. L.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. Improved synthesis of Sophorolipids from waste frying oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal**. 2015

MAENG, Y; KIM, KT; ZHOU, X; JIN, L; KIM, KS; KIM, YH; LEE, S; PARK, JH; CHEN, X; KONG, M; CAI, L; LI, X. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 917–929, 2018.

MAENG, Y; KIM, KT; ZHOU, X; JIN, L; KIM, KS; KIM, YH; LEE, S; PARK, JH; CHEN, X; KONG, M; CAI, L; LI, X. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 917–929, 2018.

MAGAR, H.; ROTH LISBERGER, R.; WZGNER, F. Use of sophorose-lipid lactone for the treatment of dandruffs and body odor, **European Patent 0209783**, 1987.

MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**. v. 52, p. 101-121, 2003.

MAKUN, H. A.; DUTTON, M. F.; NJOBEH, P. B.; GBODI, T. M.; OGBADU, G. H. Aflatoxin contamination in foods and feeds: A special focus on Africa. **Trends in Vital Food and Control Engineering, InTech**. 2012.

MALI, S.; SAKANAKA, L. S.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 3, p. 283–289, 2005.

MANIGLIA, B. C.; LAROQUE, D. A.; ANDRADE, M.; CARCIOFI, B. A., M.; TENÓRIO, A. S.; ANDRADE, C. J. Production of active cassava starch films; effect of adding a biosurfactant or synthetic surfactante. **Reactive and Functional Polymers**. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104368>

MARTINEZ-PARDO, I.; SHANKS, R. A.; ADHIKARI, B.; ADHIKARI, R. Thermoplastic starch-nanohybrid films with polyhedral oligomeric silsesquioxane. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 170–177, 2017.

MCHUGH, T. H. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. **Nahrung**, v. 44, p.148-151, 2000.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E. J.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MINUCELLI, T; RIBEIRO-VIANA, RM; BORSATO, D; ANDRADE, G; CELY, MVT; DE OLIVEIRA, MR; BALDO, C; CELLIGOI, MAPC. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 743–753, 2017.

MOGENSEN, J. M. Significance and occurrence of fumonisins from *Aspergillus niger*. **Center for Microbial Biotechnology**, Department of Systems Biology, Technical University of Denmark. 2012.

MOGENSEN, J. M.; MOLLER, K.; FREIESLEBEN, P.; LABUDA, R.; VARGA, E.; SULYOK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; THRANE, U.; ANDERSEN, B.; NIELSEN, K. Production of fumonisins B and B in *Tolypocladium* species. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 2011.

- MOHAMMADIPOUR, M.; MOUSIVAND, M.; SALEHI JOUZANI, G.; ABBASALIZADEH, S. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Canadian Journal of Microbiology**. 2009
- MOHAN, P. K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Research**. p. 533-540. 2006
- MORYA, V.K.; PARK, J.H.; KIM, T.J.; JEON, S.; KIM, E.K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fedbatch culture. **Bioresource Technology**. 2013.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85, n. 1-2, p. 111–125, 2001.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**. 2005.
- NAUGHTON, P. J.; MARCHANT, R.; NAUGHTON, V.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants: Current trends and applications in Agricultural and Biomedical industries. **Journal of Applied Microbiology**. 2019. doi:10.1111/jam.14243
- NITSCHKE, M.; COASTA, S. G. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**., 2007
- NJOBEB, B. P.; DUTTON, F. M.; MAKUN, H. A. Mycotoxins and human health: Significance, prevention and control. **Smart Biomolecules in Medicine**. 2010.
- NYILASI, I.; KOCSUBÉ, S.; KRIZSÁN, K.; GALGÓCZY, L.; PEST, M.; PAPP, T.; VÁGVOLGYI, C. *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 2010.
- OHAMA, T.; SUZUKI, T.; MORI, M.; OSAWA, S.; UEDA, T.; WATANABE, K. Nonuniversal decoding of the leucine codon cug in several *Candida* species. **Nucleic Acids Research**.1993.
- OLIVEIRA, A. V.; DEL PRADO, C. C. N.; MODESTO, N. G.; LUCENA, G. Detecção molecular de fungos com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista de Maringá/PR, Brasil. **Biotemas**. 2015
- PAULINO, B.N.; PESSÔA, M.G.; MANO, M.C.; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.
- PEREIRA, D. D. F.; DUVOISIN JR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. Study of biosurfactants productino by amazona fungi. **The Jornal of Enginnering and Exact Sciences – JCEC**. 2017

PITT, J.I., HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. **Springer**. 2009

PLESKEN, C.; WEBER, R. W. S.; RUPP, S.; LEROCH, M.; HAHN, M.. *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v.81, p.7048–7056, 2015.doi: 10.1128/AEM.01719-15

POSSER, Y. M. **Degradação da cafeína através de processos oxidativos avançados feton e foto feton**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande de Sul. Porto Alegre, 2016.

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

PUEL, O., GALTIER, P. AND OSWALD, I. P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**. 2010

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

RISPOLI, F. J.; BADIA, D.; SHAH, V. Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 938–44, 2010

ROBLEDO, N.; VERA, P.; LÓPEZ, L.; YAZDANI-PEDRAM, M.; TAPIA, C.; ABUGOCH, L.. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v.246, p.211-219, 2018. doi: 10.1016 / j.foodchem.2017.11.032

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J. AND OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2006

ROELANTS, S.; SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; LODENS, S.; VAN RENTERGHEM, L.; SOETAERT, W. Production and Applications of Sophorolipids. **Biobased Surfactants**, p.65–119. 2019. doi:10.1016/b978-0-12-812705-6.00003-4

ROMERO, D.; VICENTE, A.; OLMOS, J.L.; DAVILA, J.C.; PEREZ-GARCIA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultra-structure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. **Journal of Applied Microbiology**. 103, p.969-976. 2007.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249–252, 2002.

ROSA, C.A; LACHANCE, M.A. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer,

Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 1998.

ROSSETTO, C. A. V.; VIEGAS, E. C.; LIMA, T. M. Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e das épocas de amostragem. **Bragantia**, Campinas, v. 62, 2003.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. SANTOS, D. K. F.; RESENDE, A. H. M.; ALMEIDA, D. G. SILVA, R. C. F. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: Potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product. **Frontiers in Microbiology**. v.8, p. 1-11, 2017

SARANHAJ, P.; GEETHA, M. Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. **International Journal of Pharmaceutical e Biological Archives**. p.38-48. 2012

SCHIPPERS, C. GEßNER, K.; MÜLLER, T.; SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 189–198, 2000.

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**. 2017

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

SHAH, S.; PRABHUNE, A. A. Purification by silica gel chromatography using dialysis tubing and characterization of sophorolipids produced from *Candida bombicola* grown on glucose and arachidonic acid. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 2, p. 267–272, 2007.

SHAH, V.; DOCEL, F.G.; SEYOUM, T.; EATON, K.M.; ZALENSKAYAI, I.; HAGVER, R.; AZIM, A.; GROSS, R. Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4093–4100, 2005.

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S.; KAPIL, S. Propriedades estruturais dos biossurfactantes do laboratório. Em: Biossurfactantes de bactérias do ácido láctico. **SpringerBriefs em Microbiologia**. Springer, Cham, 2016.

SHARMA, R.; OBEROI, H. S. Biosurfactant-Aided Bioprocessing: Industrial Applications and Environmental Impact. **Recent advances in Applied Microbiology**, Chapter 3, 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. doi: 10.1016 / j.bcab.2019.101287

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**. p. 142-146. 2004

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

SNOOK, M. E.; MITCHELL, T.; HINTON, D. M.; BACON, C. W. Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 2009.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas: impacto na segurança alimentar. **Portuguese Society for Microbiology Magazine**. 2017.

SOARES, C.; RODRIGUES, P.; PETERSON, S. W.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycologia**. 2012

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **Biosurfactants: from genes to applications**. Münster, Germany: Springer, p. 220, 2010.

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

SOLAIMAN, DKY; ASHBY, RD; ZERKOWSKI, JA; FOGLIA, TA. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1341–1347, 2007.

SONG, X.; ZUO, G.; CHEN, F. Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2018. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.114

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

SOUZA, K.S.T.; GUDIÑA, E.J.; AZEVEDO, Z.; DE FREITAS, V.; SCHWAN, R.F.; RODRIGUES, L.R.; DIAS, D.R.; TEIXEIRA, J.A. New glycolipid biosurfactants

produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.154, p.373–382. 2017

STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I. P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe **Toxins**, 2012.

SUN, X., WU, L., LUO, Y. Application of organic agents in remediation of heavy metals-contaminated soil. **The Journal of Applied Ecology**. 2006.

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

TERZI, V.; TUMINO, G.; STANCA, M. A.; MORICA, C. Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. **Journal of Cereal Science**, 2014.

TRAN, H.; KRUIJT, M.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam. **Journal of applied Microbiology**. 2008

TRAVALINI, A. P.; **Filmes de Amido de Mandioca Reforçados com nanopartículas de Celulose Visando Aplicação em Embalagens Alimentícias “ecofriendly”**.2019. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

TULLOCH, A. P.; SPENCER, J. F. T.; GORIN, P. A. J. Fermentation of long chain compounds by *Torulopsis magnoliae* III. Preparation of dicarboxylic acids from hydroxy fatty acid sophorosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1326–1338, 1962.

VAN BOGAERT, I. N. A.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E.J. Importance of the cytochrome P450 monooxygenase CYP52 family for the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 1, p. 87–94, 2009.

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

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

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies Micology**. 2011.

- VARNIER, A. L.; SANCHEZ, L.; VATSA, P.; BOUDESOCQUE, L.; GARCIA-BRUGGER, A.; RABENOELINA, F.; SOROKIN, A.; RENAULT, J. H.; KAUFFMANN, S.; PUGIN, A.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell & Environment**. 2009
- VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 12, n. 2, p. 9–13, 2010.
- VELMURUGAN, N.; CHOI, M. S.; HAN, S. S.; LEE, Y. S. Evaluation of antagonistic activities of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* against wood-staining fungi: in vitro and in vivo experiments. **Journal Microbiology**. 2009
- WAELE, S.; VANDENBERGHE, I.; LAUKENS, B.; PLANCKAERT S.; VERWEIRE, S.; VAN BOGAERT, I. N. A.; SOETAERT, W.; DEVREESE, B.; CIESIELSKA, K. Optimized expression of the *Starmerella bombicola* lactone esterase in *Pichia pastoris* through temperature adaptation, codon-optimization and co-expression with HAC. **Protein Expression and Purification**. 2017
- WALKER, A. S.; GATIER, A.; CONFAIS, J.; MARTINHO, D.; VIAUD, M.; LE PÊCHEUR, P. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, 2011. doi: 10.1094/PHYTO-04-11-0104
- WANG, R.; FENG, Y.; AN, Z.; CHEN, J.; LIU, X. Tap water and distilled water can affect the production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domercqiae* Y2A. **International Symposium on the Frontiers of Biotechnology and Bioengineering**, 2019. doi:10.1063/1.5110823 with chitosan–rhamnolipid coating. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. v.59, p. 687–697. 2018.
- YEHIA, R. S. Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus* Braz. **Journal of Microbiology**. 2014.
- YOO, DS; LEE, BS; KIM, EK. Characteristics of Microbial Biosurfactant as an Antifungal Agent Against Plant Pathogenic Fungus. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 15, p. 1164–1169, 2005.
- 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, 1 fev. 2012.
- ZARAGOZA, A.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; TERUEL, J.A.; MARQUÉS, A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. **Langmuir**, v. 25, n. 14, p. 7892–8, 21 jul. 2009.
- ZHANG, X., ASHBY, R.D., SOLAIMAN, D., LIU, Y., FAN, X. Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactonic and free acid sophorolipids against *Escherichia*

*coli* O157:H7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 11, n. July, p. 176–18, 2017

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

ZHONG, F.; LI, Y.; IBANZ, A. M.; OH, M. H.; MCKENZIE, K. S.; SHOEMAKER, C.  
The effect of rice variety and starch isolation method on the pasting and rheological  
properties of rice starch pastes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 406–414, 2009.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Effect of Lactose and Olive Oil on Intra and Extracellular  
Lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 5, p. 477–482, 1993.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to produce  
biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal of the American Oil Chemists  
Society**, v. 72, n. 1, p. 67–71, 1995.