



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VICTÓRIA AKEMI ITAKURA SILVEIRA

SOFOROLIPÍDIOS:
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E APLICAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS E FILMES
BIODEGRADÁVEIS ANTIMICROBIANOS

VICTÓRIA AKEMI ITAKURA SILVEIRA

SOFOROLIPÍDIOS:
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E APLICAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS E FILMES
BIODEGRADÁVEIS ANTIMICROBIANOS

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

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

Londrina
2023

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

S587s Silveira, Victória Akemi Itakura .
Soforolipídios: Produção sustentável e aplicação no desenvolvimento de nanopartículas e filmes biodegradáveis antimicrobianos / Victória Akemi Itakura Silveira. - Londrina, 2023.
137 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Biossurfactante - Tese. 2. *Stammerella bombicola* - Tese. 3. filmes biodegradáveis - Tese. 4. resíduos alimentares - Tese. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 68

VICTÓRIA AKEMI ITAKURA SILVEIRA

SOFOROLIPÍDIOS:
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E APLICAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS E FILMES
BIODEGRADÁVEIS ANTIMICROBIANOS

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Prof.^a Dr.^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a. Mayka Reghiany Pedrão
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 16 de fevereiro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos e pelo fomento das bolsas de pesquisa no Brasil e na Bélgica.

À minha orientadora, Maria Antonia, por esses quase 8 anos de parceria e amizade, pelos ensinamentos, disponibilidade e entusiasmo com a pesquisa. Obrigada pela paciência e incentivo à minha trajetória acadêmica.

Às professoras que compõem minha banca, Cristiani, Mayka, Renata e Suzana, por contribuírem com esse momento tão importante.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, que contribuíram direta e indiretamente com o projeto, pela atenção, colaboração e auxílios prestados.

Agradeço à Deus, por ter me concedido a força e a perseverança necessária para a realização desse sonho, como também pelas pessoas que colocou em meu caminho, tornando a jornada mais leve e alegre.

Aos meus pais Márcia e Eduardo e meu irmão Bruno, por sempre torcerem por mim, incentivando meus sonhos e dando todo o suporte para que eu trilhasse o meu caminho. A vocês toda a minha gratidão, reconhecimento e carinho.

Às minhas companheiras de laboratório, Beatriz, Talita, Giovanna, Gabrielly, Briani e Jéssica, pelo apoio diário, pelas risadas, pela ajuda nos experimentos e por estarem comigo partilhando as vitórias e também os dias difíceis.

Ao meu namorado George Luis, que acompanhou toda a minha jornada no doutorado, obrigada pela parceria, paciência e incentivo para a realização desse sonho.

“It always seems impossible until it’s done”

(Nelson Mandela)

Silveira, Victória Akemi Itakura. **Soforolipídios: Produção sustentável e aplicação no desenvolvimento de nanopartículas e filmes biodegradáveis antimicrobianos.** 2023. 137 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina, 2023.

RESUMO

Soforolipídios têm se destacado como a classe de biossurfactantes com maior potencial para aplicação comercial, devido seus altos rendimentos de produção e por apresentar múltiplas propriedades, destacando a sua potente ação antimicrobiana. Apesar disso, os altos custos relacionados ao seu processo de produção ainda são um obstáculo para sua competitividade econômica. Assim, a utilização de resíduos agroindustriais pode levar a uma queda considerável do valor, além de contribuir para uma economia circular e sustentável. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo produzir soforolipídios a partir de substratos de primeira e segunda geração, desenvolver nanopartículas de prata utilizando soforolipídios (AgNP-SL) e filmes biodegradáveis antimicrobianos de ácido polilático e amido, para aplicações em embalagens de alimentos. A melhor condição da hidrólise enzimática dos resíduos alimentares foi obtida com concentração de 1% (m/v) de amilase, protease e lipase por 2h a 30 °C, atingindo uma liberação máxima de glicose de 40 g/L. Esse hidrolisado foi utilizado para produção de soforolipídios, obtendo-se uma produção de 134,8 g/L, rendimento de 0,34 g/g e produtividade de 0,85 g/L/h ao final de 160 h, valores estes comparáveis com a fermentação de primeira geração que obteve 144,1 g/L de soforolipídios, rendimento de 0,23 g/g e produtividade de 0,79 g/L/h. Posteriormente, filmes de ácido polilático com soforolipídios foram desenvolvidos, demonstrando que o biossurfactante atuou como agente plastificante, melhorando a elasticidade e flexibilidade dos filmes, assim como conferiu propriedades antimicrobianas contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* A síntese de AgNP-SL gerou nanopartículas com boa estabilidade coloidal, distribuição homogênea e com atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *S. aureus*. A incorporação de AgNP-SL em filmes nanocompósitos de amido resultou em filmes com atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella spp.*, a qual foi potencializada pela adição combinatória com ácido tartárico. Os resultados encontrados comprovam a viabilidade e o enorme potencial dos resíduos de alimentos como substrato alternativo para a produção de soforolipídios, não apenas pelo custo-benefício, mas também para contribuir com um bioprocessos mais sustentável. Os soforolipídios também demonstraram seu carácter multifuncional, podendo atuar na síntese biológica de nanopartículas, como também como agente bioativo em filmes, sendo utilizado para melhorar as propriedades estruturais e antimicrobianas no controle eficaz de patógenos de origem alimentar.

Palavras-chave: biossurfactante; *Starmerella bombicola*; filmes biodegradáveis; resíduos alimentares.

Silveira, Victória Akemi Itakura. **Sophorolipids**: Sustainable production and application in the development of nanoparticles and antimicrobial biodegradable films. 2023. 137 p. PhD Thesis in Biotechnology - State University of Londrina, 2023.

ABSTRACT

Sophorolipids have aroused attention as the class of biosurfactants with the greatest potential for commercial application, due to their high production yields and for their multiple functions and properties, highlighting their potent antimicrobial action. Despite this, the high costs associated with production are still an obstacle to their economic competitiveness. The use of alternative substrates would lead to a considerable decrease in the value, in addition to contributing to a more circular and sustainable economy. Thus, this work aimed to produce sophorolipids from first and second generation substrates and to investigate the incorporation of sophorolipids and silver nanoparticles produced with this biosurfactant in polylactic acid and starch matrices, respectively, in order to develop films with improved structural and antimicrobial properties to be explored in food packaging applications. The best condition of enzymatic hydrolysis of food waste was obtained with a concentration of 1% (m/v) of amylase, protease and lipase for 2 h at 30 °C, reaching a maximum glucose release of 40 g/L. This hydrolysate was used for the production of sophorolipids, obtaining a production of 134.8 g/L, a yield of 0.34 g/g and a productivity of 0.85 g/L/h at the end of 160 h, values comparable to the fermentation with first generation substrates that obtained 144.1 g/L of sophorolipids, yield of 0.23 g/g and productivity of 0.79 g/L/h. Subsequently, polylactic acid films with sophorolipids were developed, demonstrating that the biosurfactant acted as a plasticizing agent, improving the elasticity and flexibility of the films, as well as conferring antimicrobial properties against the poultry pathogens *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* The green synthesis of silver nanoparticles with sophorolipids (AgNP-SL) generated highly stable nanoparticles, with homogeneous distribution and with antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. Thus, its incorporation into starch nanocomposite films exhibited antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella*. The addition of tartaric acid further improved the antibacterial action, demonstrating the great potential of using these films as active packaging for the control of foodborne pathogens. The results here found demonstrate the feasibility and enormous potential of food waste as an alternative substrate for the production of sophorolipids, not only from a cost-effectiveness point of view but also to contribute to a more sustainable bioprocess. Sophorolipids have also demonstrated their multifunctional character, being able to act in the biological synthesis of nanoparticles, as well as bioactive agent in films, being used to improve structural and antimicrobial properties for the effective control of foodborne pathogens.

Keywords: biosurfactant; *Starmerella bombicola*; biodegradable films; food waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Classificação dos biossurfactantes em relação a sua massa molecular	18
Figura 2.	Estruturas químicas dos sofrorolípídios nas principais formas produzidas pela cepa selvagem da levedura <i>S. bombicola</i> (1. ácido não-acetilado, 2. ácido mono-acetilado, 3. ácido di-acetilado, 4. lactônico não-acetilado, 5. lactônico mono-acetilado, 6. lactônico di-acetilado	21
Figura 3.	Via de biossíntese do sofrorolípídios	25
Figura 4.	Classificação dos polímeros biodegradáveis	38

Artigo 1

Figure 1.	Visual aspect of the polylactic acid-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.....	65
Figure 2.	SEM micrographs of sophorolipid (SL) and polylactic acid-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.	66
Figure 3.	FT-IR spectra of sophorolipid (SL) and polylactic acid-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.....	68
Figure 4.	DSC thermogram of sophorolipid (A) and polylactic acid-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.	69
Figure 5.	Antimicrobial activity of polylactic acid-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.	72

Artigo 2

Figure 1.	Characterization of the silver nanoparticles with sophorolipids (AgNP-SL): (A) UV-vis spectra at different temperatures and reaction times, (B) Color follow-up during reaction, (C) TEM images, and (D) DLS analysis.	88
Figure 2.	SEM micrographs of sophorolipid (SL) and polylactic acid-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.	90
Figure 3.	FT-IR spectra of sophorolipid (SL) and polylactic acid-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.....	92
Figure 4.	DSC thermograms of the produced starch nanocomposite films with the incorporation of AgNP-SL (A) and with the incorporation of AgNP-SL and tartaric acid (B) X-diffractograms of the produced starch nanocomposite films with the incorporation of AgNP-SL (C) and with the incorporation of AgNP-SL and tartaric acid (D).	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Empresas de biossurfactantes em nível comercial.....	19
Tabela 2.	Microrganismos produtores de soforolipídios	22
Tabela 3.	Produção de soforolipídios descrita na literatura variando as condições de fermentação	27
Tabela 4.	Composição dos meios para as fermentações com substratos de 1ª geração (FO1) e de 2ª geração com resíduos alimentares hidrolisados (FO2)	46
Tabela 5.	Composição das formulações dos filmes de amido incorporados com as nanopartículas de prata produzidas com soforolipídios (AgNP-SL) e ácido tartárico (TA).....	50
Tabela 6.	Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos filmes a base de ácido polilático (PLA) com adição de soforolipídios.....	51

Artigo 1

Table 1.	Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP) and mechanical properties of polylactic acid-sophorolipid films.....	67
-----------------	---	----

Artigo 2

Table 1.	Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), elongation at break (EB) and Young's modulus (YM) of the produced starch nanocomposite films with silver nanoparticles produced with sophorolipids (AM, AM + 0.25%, AM + 0.5%, AM + 1%, AM + 4%) and tartaric acid (AM5, AM5 + 0.25%, AM5 + 0.5%, AM5 + 1%, AM10, AM10 + 0.25%, AM10 + 0.5%).....	90
Table 2.	Antimicrobial activity of the produced starch nanocomposite films with silver nanoparticles produced with sophorolipids (AM, AM + 0.25%, AM + 0.5%, AM + 1%, AM + 4%) and tartaric acid (AM5, AM5 + 0.25%, AM5 + 0.5%, AM5 + 1%, AM10, AM10 + 0.25%, AM10 + 0.5%).	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1.	OBJETIVO GERAL	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	BIOSURFACTANTES.....	17
3.2	SOFOROLIPÍDIOS – CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA	19
3.3	SOFOROLIPÍDIOS – MICRORGANISMOS PRODUTORES E BIOSÍNTESE.....	21
3.4	SOFOROLIPÍDIOS – CONDIÇÕES DE CULTIVO E MEIOS DE PRODUÇÃO.....	25
3.4.1	Resíduos Alimentares: um Substrato Alternativo de Grande Potencial para Produção de Soforolipídios	31
3.5	SOFOROLIPÍDIOS – PROPRIEDADES E APLICAÇÕES.....	32
3.6.	EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS.....	37
3.7	EMBALAGENS ANTIMICROBIANAS.....	40
3.8	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1.	MICRORGANISMOS	43
4.2	PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS – DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA UEL	43
4.2.1	Ativação e Pré-inóculo da <i>S. Bombicola</i>	43
4.2.2	Fermentação em Biorreator de Bancada	43
4.2.3	Extração e Quantificação dos Soforolipídios	44
4.3	PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS – BIO BASE EUROPE PILOT PLANT (BÉLGICA)	44
4.3.1	Resíduos Alimentares.....	45
4.3.2	Testes de Hidrólise Enzimática dos Resíduos Alimentares	45
4.3.3	Geração e Purificação do Hidrolisado de Alimentos para Fermentação.....	45
4.3.4	Ativação e Pré-inóculo da <i>S. Bombicola</i>	46
4.3.5	Fermentações em Biorreator de Bancada.....	46
4.3.6	Métodos Analíticos.....	47

4.4	SÍNTESE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM SOFOROLIPÍDIOS (AGNP-SL).....	48
4.5	CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM SOFOROLIPÍDIOS (AGNP-SL)	49
4.6	PRODUÇÃO DE FILMES DE AMIDO INCORPORADOS COM AS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS COM SOFOROLIPÍDIOS (AGNP-SL).....	50
4.7	PRODUÇÃO DOS FILMES DE ÁCIDO POLILÁCTICO INCORPORADOS COM SOFOROLIPÍDIOS.....	51
4.8	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE AMIDO E PLA.....	51
4.8.1	Espessura.....	51
4.8.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
4.8.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada no Fourier (FTIR)	52
4.8.4	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	52
4.8.5	Solubilidade.....	52
4.8.6	Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	53
4.8.7	Propriedades Mecânicas	53
4.8.8	Difração de Raio X (DRX).....	54
4.8.9	Atividade Antibacteriana.....	54
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	56
5.1	ARTIGO 1: CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF BIOACTIVE PACKAGING FILMS BASED ON POLYLACTIC ACID-SOPHOROLIPID FOR THE CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS	58
5.2	ARTIGO 2: GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING SOPHOROLIPIDS FOR THE DEVELOPMENT OF ANTIMICROBIAL STARCH NANOCOMPOSITE FILMS.....	82
5.3	PATENTE 1: FILMES ANTIMICROBIANOS DE AMIDO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM SOFOROLIPÍDIOS PARA PRESERVAÇÃO DE BANANAS	107
5.4	PATENTE 2: PROCESSO DE SEPARAÇÃO DAS FORMAS ACÍDICAS E LACTÔNICAS DOS SOFOROLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR UMA CEPA DE STARMERELLA	108
5.5	PATENTE 3: USO DE SOFOROLIPÍDIOS DE STARMERELLA DURANTE A LAVAGEM DE CARÇAÇAS PARA REDUÇÃO MICROBIANA APÓS A ETAPA DE EVISCERAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	109

5.6	PATENTE 4: FILME MULTIFUNCIONAL COM AÇÃO PREBIÓTICA E ANTIMICROBIANA PARA REVESTIMENTO DE MORANGOS.....	110
5.7	ARTIGO DE REVISÃO: SOPHOROLIPIDS: A REVIEW ON PRODUCTION AND PERSPECTIVES OF APPLICATION IN AGRICULTURE.....	111
5.8	LIVRO: MICROBIAL SOPHOROLIPIDS: PRODUCTION, PROPERTIES AND INDUSTRIAL APPLICATIONS.....	112
5.9	CAPÍTULO DE LIVRO 1: PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIO MICROBIANO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	113
5.10	CAPÍTULO DE LIVRO 2: EXOPOLYSACCHARIDES IN FERMENTED FOODS AND THEIR POTENTIAL HEALTH BENEFITS.....	114
5.11	CAPÍTULO DE LIVRO 3: APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE CANDIDA BOMBICOLA EM FILMES ANTIMICROBIANOS.....	115
6	CONCLUSÕES.....	116
7	REFERÊNCIAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas químicas anfífilas que possuem porções hidrofílicas e hidrofóbicas em sua estrutura, o que as permite reduzir tensões superficiais e interfaciais de compostos, sendo dessa forma amplamente empregados nos diversos setores industriais. No entanto, a maioria dos surfactantes comerciais são derivados da indústria petroquímica, que utiliza rotas e produtos tóxicos para a sua produção. Isso tem despertado um alerta de pesquisadores, fazendo crescer a busca por alternativas mais sustentáveis e ambientalmente amigáveis, como os biossurfactantes.

Os biossurfactantes são moléculas totalmente naturais produzidas por microrganismos como metabólitos secundários e apresentam inúmeras vantagens frente aos análogos químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, alta especificidade de operação e estabilidade em condições adversas. Dentre os biossurfactantes, destacam-se os soforolipídios, que tem sido a classe de surfactantes microbianos que mais avança em direção a aplicação comercial devido seus altos rendimentos de produção e potencial de aplicações.

Os soforolipídios possuem a estrutura composta por um dissacarídeo de soforose unida a uma cadeia de ácido graxo, formada geralmente por 16 a 18 carbonos, e pode ser encontrado nas formas acídicas ou lactônicas. A sua produção ocorre por fermentação a partir de fontes renováveis, como carboidratos e lipídios, utilizando a levedura *Starmerella bombicola*. Apesar dessas vantagens, os soforolipídios encontram dificuldades para concorrer economicamente com os surfactantes químicos, devido ao seu alto custo de produção.

Dessa forma, pesquisas têm estudado a substituição de substratos convencionais, como a glicose e o ácido oleico, por fontes alternativas mais econômicas, através da utilização de subprodutos e resíduos industriais, visando remover esse obstáculo para a competitividade econômica, ao passo que contribui também para uma economia mais sustentável.

Recentemente, estudos sobre a utilização de resíduos alimentares para a produção de soforolipídios demonstraram resultados promissores e a sua utilização está como um dos tópicos de destaque para reduzir o impacto ambiental e o custo de produção de novos bioprodutos. Além disso, os resíduos alimentares são considerados uma excelente matéria-prima industrial, devido aos seus teores elevados de carboidratos, proteínas e lipídios.

Com a diminuição dos custos de produção, os soforolipídios teriam grandes oportunidades de aplicação nos mais diversos setores industriais, pois estes apresentam propriedades únicas e de grande interesse, como atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias e fungos, destacando os principais patógenos alimentares.

No entanto, a maioria dos estudos tem focado na atividade antimicrobiana dos soforolipídios na sua forma livre em solução, havendo a necessidade de compreender como esse composto ativo se comportaria incorporado em matrizes poliméricas, visando o desenvolvimento de filmes ativos antimicrobianos.

Além disso, sabe-se que os soforolipídios atuam como agente redutor na síntese de nanopartículas metálicas e que a sua utilização pode potencializar a ação antimicrobiana das nanopartículas. Apesar desta síntese já ter sido reportada na literatura, a posterior incorporação de nanopartículas produzidas com soforolipídios em matrizes poliméricas nunca foi descrita.

Dessa forma, considerando as propriedades antimicrobianas dos soforolipídios e o interesse da indústria por produtos de origem natural, este trabalho teve como objetivo, produzir soforolipídios de *Starmerella bombicola* utilizando substratos de primeira e segunda geração, para demonstrar a viabilidade de utilização de fontes alternativas de baixo custo, visando a diminuição dos custos e a aplicação do conceito de economia circular. Posteriormente, os soforolipídios foram empregados para a síntese de nanopartículas de prata e desenvolvimento de filmes biodegradáveis de amido e ácido polilático, avaliando os efeitos na estrutura polimérica, bem como a atividade antimicrobiana conferida com essa incorporação.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e aplicar soforolipídios da levedura *Starmerella bombicola* no desenvolvimento de nanopartículas e filmes biodegradáveis antimicrobianos.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir soforolipídios a partir da levedura *Starmerella bombicola* ATCC 22214 em biorreatores de bancada, utilizando substratos de primeira e segunda geração;
- Acompanhar os processos fermentativos em relação ao crescimento celular, consumo de substratos e produção de soforolipídios;
- Desenvolver filmes de ácido polilático (PLA) com soforolipídios quanto a atividade antimicrobiana e propriedades estruturais e termomecânicas;
- Otimizar a síntese e a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata utilizando soforolipídios;
- Produzir, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de filmes de amido com nanopartículas de prata, soforolipídios e ácido tartárico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossurfactantes

Surfactantes são moléculas químicas anfipáticas que possuem porções hidrofílicas e hidrofóbicas em sua estrutura, o que os permite reduzir tensões superficiais e interfaciais de compostos, além de formar microemulsões. Essa propriedade resulta na diminuição de forças repulsivas entre fases e permite que estas se misturem e interajam mais facilmente (SARUBBO *et al.*, 2022). Dessa forma, são utilizados nos mais diversos setores, como componentes de detergentes, dispersantes, agentes emulsificantes, umectantes e formadores de espuma (JIMÉNEZ-PENÁLVER *et al.*, 2019).

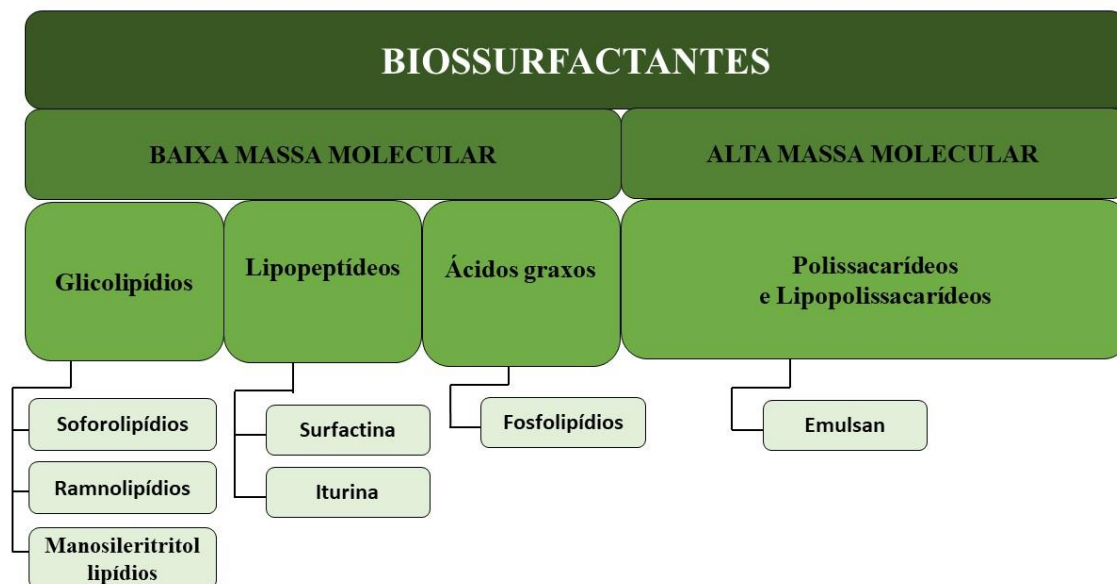
A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são derivados da indústria petroquímica e de fonte não renovável, levantando preocupações em relação a bioacumulação em solos e águas, devido sua alta toxicidade e baixa biodegradabilidade (REBELLO *et al.*, 2014). Os mais utilizados atualmente são os surfactantes nonilfenol etoxilado (NPE) e o alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), os quais têm sido relacionados a esses impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana, resultando em regulamentações mais restritivas sobre o seu uso e concentração permitida, além de instigar a busca por compostos alternativos (VILLARREAL-REYES *et al.*, 2022).

Assim, a crescente preocupação ambiental atrelada a busca por alternativas mais sustentáveis, fez expandir o interesse acerca dos surfactantes microbianos, os biossurfactantes. Estas são moléculas inteiramente naturais, produzidas por diversos microrganismos como produtos metabólitos durante a fermentação (NAUGHTON *et al.*, 2019). A função biológica desses compostos tensoativos ainda não é totalmente compreendida, porém sabe-se que a sua produção está associada a assimilação de substratos insolúveis, reserva de nutrientes, aumento de motilidade, desenvolvimento de biofilme, e fatores antimicrobianos (DE CLERCQ *et al.*, 2021; TWIGG *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes podem ser classificados em baixa e alta massa molecular, variando entre 500 Da a 1500 Da (Figura 1). Biossurfactantes de baixa massa molecular são mais efetivos na redução de tensões superficiais, enquanto os de alta massa, também conhecidos como bioemulsificantes, são direcionados para estabilização de emulsões (SHARMA; OBEROI, 2017). Dentre todas as classes, os glicolipídios são os mais extensivamente investigados, destacando a subclasse dos soforolipídios (WANG *et al.*, 2019).

Atualmente, estes biossurfactantes estão disponíveis comercialmente por diversas empresas (Tabela 1).

Figura 1. Classificação dos principais biossurfactantes em relação a massa molecular



Em comparação com os análogos químicos, os biossurfactantes são obtidos de fonte renovável, possuem baixa toxicidade, alta especificidade e eficiência de operação, além de estabilidade em condições ambientais adversas de temperatura, pH e salinidade, tornando-os adequados para uma ampla gama de aplicações industriais (MARCHANT; BANAT, 2012).

Em 2016, o mercado global de surfactantes biológicos foi avaliado em US\$ 3,99 bilhões, com um aumento projetado para US\$ 5,52 bilhões para 2022, devendo atingir a marca de US\$ 6,5 bilhões até 2027, representando uma taxa de crescimento anual de 5,6% (QAZI; WANG; DAI, 2022). Dessa forma, os biossurfactantes têm sido apontados como uma alternativa sustentável, biodegradável e biocompatível, que apresentam funcionalidades semelhantes aos análogos químicos, porém trazendo inovações e conceitos fundamentais para a adoção de uma economia circular.

Tabela 1. Empresas de biossurfactantes em nível comercial

Biossurfactantes	Empresas	País	Uso
Ramnolipídios	Iwata Chemical	Japão	
	MG Intobio	Coréia do Sul	Produtos de limpeza
	AGAE Technologies	Estados Unidos	Agricultura
	Jeneil Biosurfactant	Estados Unidos	Produtos alimentícios
	Rhamnolipids Company	Estados Unidos	Cosméticos
	BioFuture	Irlanda	Farmacêuticos
	Logos Technologies	Estados Unidos	Recuperação aprimorada de petróleo (EOR)
	TensioGreen	Estados Unidos	
Manosileritritol lipídios	Henkel	Alemanha	Produtos de limpeza Cosméticos
Soforolipídios	Ecover	Bélgica	
	Soliance	França	
	SyntheZyme	Estados Unidos	Agricultura
	Kaneka Co	Japão	Detergentes
	Kao Co	Japão	Produtos de limpeza
	Apollo Biolife	Índia	Cosméticos
	Holliferm	Reino Unido	Controle de pragas
	Bio Base Europe Pilot Plant	Bélgica	
	AmphiStar	Bélgica	
	Evonik	Alemanha	
Saraya	Japão		

3.2 Soforolipídios – Classificação e estrutura

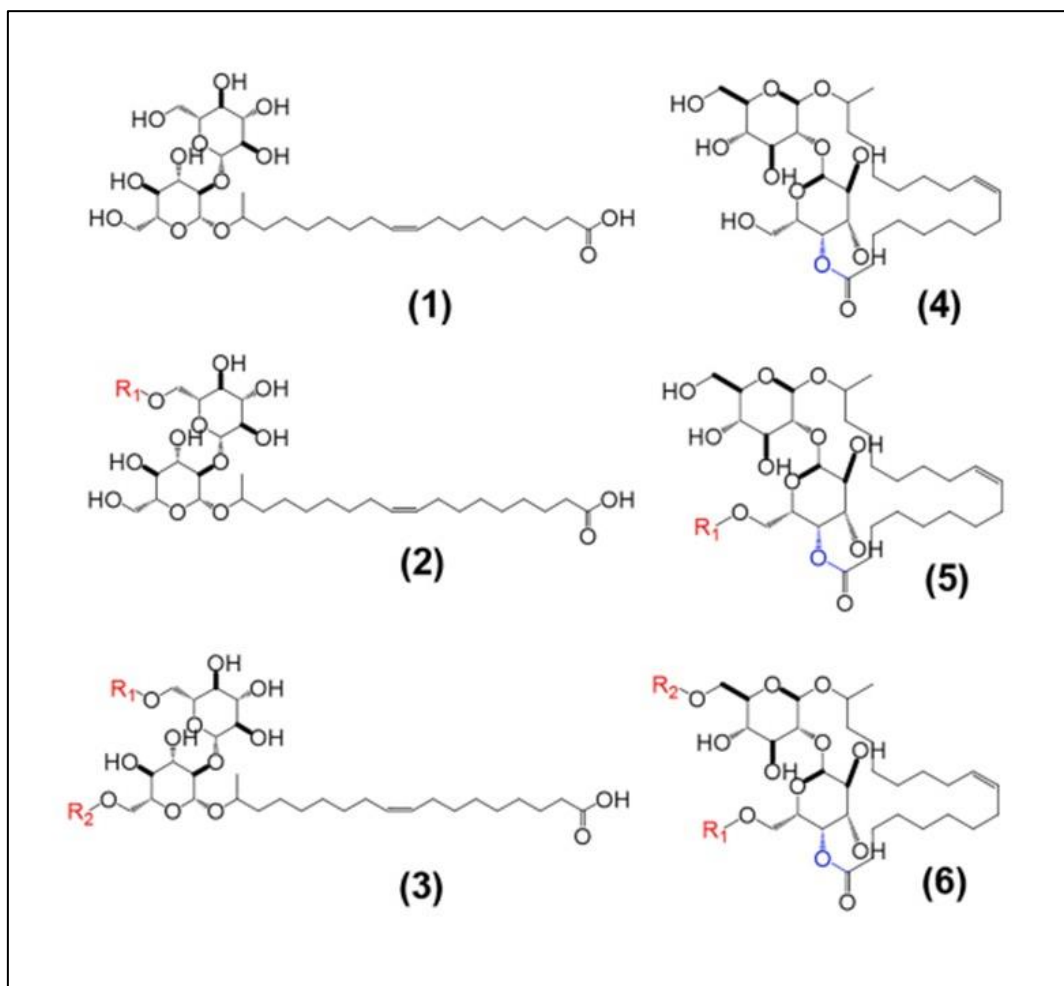
Soforolipídios são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídios e devido seus altos rendimentos de produção e seu potencial para uma ampla gama de aplicações, tem sido a classe de surfactantes microbianos que mais avança em direção à aplicação comercial (SARUBBO *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2019). Sua estrutura química é composta por um dissacarídeo de sofrorose (O β -D-glicopiranosil-2 \rightarrow 1- β -D-glicopiranosose) unida por ligação β -

glicosídica entre o carbono 1' e o carbono terminal (ω) ou sub-terminal ($\omega-1$) de uma cadeia de ácido graxo (ASHBY; SOLAIMAN, 2010; FELSE *et al.*, 2007).

Sabe-se que a sua produção ocorre como uma mistura de diferentes congêneres, dependendo das condições de cultivo e do microrganismo produtor, sendo divididos em formas lactônicas e acídicas (DIERICKX *et al.*, 2021). Na forma acídica, a extremidade do ácido carboxílico é livre, pois é ligado a apenas um monômero de glicose, apresentando uma estrutura de cadeia aberta. Já a estrutura lactônica é internamente esterificada na posição 4'' da soforose, o que a faz apresentar uma estrutura de anel fechado (ASMER *et al.*, 1988). Essas diferenças estruturais resultam em propriedades específicas, como boa solubilidade em água para os acídicos e baixa solubilidade para os lactônicos (DE CLERCQ *et al.*, 2021).

Essas duas formas podem ainda sofrer variações estruturais em relação ao grau e posição de acetilação da soforose (6' ou 6'') e na estrutura do ácido graxo sobre o seu comprimento da cadeia, grau de saturação e posição da hidroxilação (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). A Figura 2 apresenta algumas das principais formas encontradas do soforolipídios produzidos pela cepa selvagem da levedura *Starmerella bombicola*. Essas diferenças químicas podem ser reguladas geneticamente ou por variação das condições de fermentação, que ocasionarão diferentes propriedades físico-químicas e biológicas dos soforolipídios, refletindo em suas futuras aplicações (MA *et al.*, 2019; QAZI; WANG; DAI, 2022).

Figura 2. Estruturas químicas dos soforolipídios nas principais formas produzidas pela cepa selvagem da levedura *S. bombicola* (1. ácido não-acetilado, 2. ácido mono-acetilado, 3. ácido di-acetilado, 4. lactônico não-acetilado, 5. lactônico mono-acetilado, 6. lactônico di-acetilado)



Fonte: Qazi; Wang; Dai (2022)

3.3 Soforolipídios – Microrganismos produtores e biossíntese

Os soforolipídios são considerados metabólitos secundários, sendo produzidos no final da fase exponencial e início da fase estacionária do microrganismo (HOMMEL *et al.*, 1987). Foi primeiramente descrito em 1961, sintetizado pela levedura *Torulopsis magnoliae* (GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961), porém atualmente sabe-se da existência de vários microrganismos produtores de soforolipídios, como os descritos na Tabela 2. A levedura mais conhecida e estudada atualmente é a *Starmerella bombicola*, devido seus altos rendimentos de

produção (> 200 g/L) (DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1997; ZHANG *et al.*, 2018) atrelada a sua não patogenicidade, garantindo-lhe o status de segurança *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela agência americana Food and Drug Administration (FDA) (PAULINO *et al.*, 2016).

Tabela 2. Microrganismos produtores de soforolipídios

Microrganismos	Referências
<i>Candida albicans</i>	Yang <i>et al.</i> (2012); Zhang <i>et al.</i> 2018; Gaur <i>et al.</i> (2019)
<i>Candida bogoriensis</i>	Tulloch <i>et al.</i> (1968)
<i>Candida antarctica</i>	Accorsini <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida apicola</i>	Kurtzman <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida floricola</i>	Konish <i>et al.</i> (2018)
<i>Candida glabrata</i>	Gaur <i>et al.</i> (2019)
<i>Candida batistae</i>	Konish <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida kuoi</i>	Price <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida rugosa</i>	Chandran e Das (2011)
<i>Candida riiodocensis</i>	Kurtzman <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida stellata</i>	Kurtzman <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida tropicalis</i>	Chandran e Das (2011)
<i>Candida parapsilosis</i>	Garg; Priyaka; Chatterjee (2018)
<i>Starmerella bombicola</i>	Wadekar <i>et al.</i> (2012); Jadhav; Pratap; Kale (2019); Maddikeri <i>et al.</i> (2015); Silveira <i>et al.</i> (2019); Hipólito <i>et al.</i> (2020); Caretta <i>et al.</i> (2021); Minucelli <i>et al.</i> (2017)
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	Ma <i>et al.</i> (2014); Liu <i>et al.</i> (2017); Gonçalves <i>et al.</i> (2020)
<i>Wickerhamiella anomalus</i>	Souza <i>et al.</i> (2018)
<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	Sen <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Chandran e Das (2011)
<i>Pseudohyphozyma bogoriensis</i>	Wang <i>et al.</i> (2015)

A levedura *S. bombicola* foi isolada de néctar de flores silvestres (1954) e mel de abelhas (1964-1967) por Spencer *et al.* (1970), identificando-as inicialmente como *Torulopsis bombicola*. Posteriormente, a levedura foi reclassificada como *Candida bombicola* e mais recentemente renomeada para *S. bombicola* em 2012 (MCNEILL *et al.*, 2012). Seu *habitat* natural possui relação direta com a produção de soforolipídios, uma vez que se trata de um ambiente de alta pressão osmótica (baixa atividade de água) pela abundância de açúcares

presentes no mel, assim como disponibilidade de substratos hidrofóbicos, derivados da cera de abelha e óleos vegetais das sementes das flores (DE CLERCQ *et al.*, 2022).

Essas condições ambientais trazem respostas para compreender o motivo que a *S. bombicola* produz soforolipídios, já que estes são metabólitos secundários e não participam de funções essenciais relacionadas ao crescimento e manutenção celular (ASMER *et al.*, 1988; ROELANTS *et al.*, 2019). Além disso, foi observado que a levedura é capaz de catabolizar soforolipídios em condições desfavoráveis, como a falta de substratos disponíveis (HOMMEL *et al.*, 1994).

Assim, a produção de soforolipídios pela *S. bombicola* é explicada por fatores de proteção e competição: a levedura converte fontes de carbono que seriam facilmente degradadas por outros microrganismos, como açúcares e ácidos graxos, em compostos com atividade antimicrobiana, os soforolipídios. Dessa forma, a *S. bombicola* consegue armazenar extracelularmente um composto que poderá servir de fonte de carbono em momentos de estresse e escassez de nutrientes, competindo de forma muito mais eficiente com outros microrganismos do seu *habitat* (DE CLERCQ *et al.*, 2022).

Fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas são normalmente fornecidas para a produção de soforolipídios (ASMER *et al.*, 1988). Sabe-se, no entanto, que estes podem ser produzidos apenas com fontes hidrofílicas, porém, os melhores rendimentos são alcançados quando ambas as fontes são combinadas, devido ao direcionamento da fonte hidrofílica para formação da soforose e da hidrofóbica para a cauda lipídica (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012).

O ácido graxo da estrutura dos soforolipídios pode ser alterado pelo fornecimento de fontes hidrofóbicas alternativas (ASHBY *et al.*, 2008). Já a porção da soforose não sofre essa modificação, apesar do emprego de diversos açúcares, como sacarose, frutose e lactose (ZHOU; KOSARIC, 1993, 1995). Isso se deve ao fato de que as fontes hidrofílicas normalmente não são incorporadas de forma direta na estrutura dos soforolipídios, mas sim fornecidas como glicose-6-fosfato para glicogênese a partir da UDP-glicose ou em açúcares redutores, sendo direcionadas para a glicólise e ciclo de Krebs (HOMMEL *et al.*, 1994; WONGSIRICHOT; INGHAM; WINTERBURN, 2021).

A via metabólica de produção dos soforolipídios pela *S. bombicola* é apresentada na Figura 3. Os precursores podem ser ácidos graxos suplementados diretamente ao meio, ou pelo fornecimento de triacilgliceróis, alcanos, álcoois, e aldeídos, que sofrerão ação de lipase para obtenção do ácido graxo livre (COOPER; PADDOCK, 1984). Caso não seja disponibilizado uma fonte hidrofóbica, os ácidos graxos serão obtidos a partir do acetil-CoA derivado da

glicólise por síntese *de novo* (GUPTA, 2012). Já se a concentração de açúcares no meio for baixa, e a de ácidos graxos elevada, o metabolismo será direcionado para a via de β -oxidação, a fim de promover a manutenção celular, interrompendo a produção de sofrorolipídios (VAN BOGAERT *et al.*, 2007).

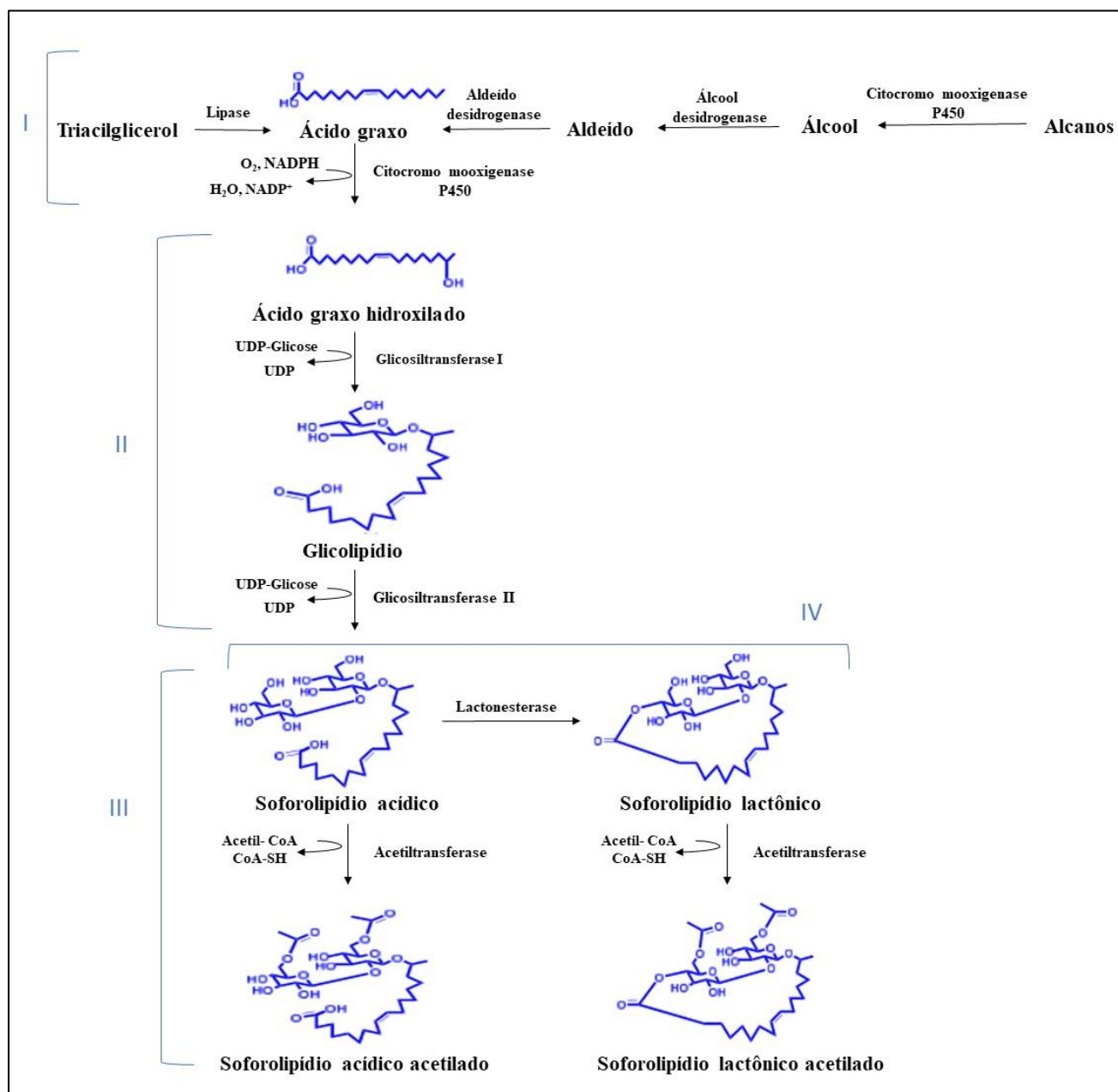
A biossíntese inicia-se com a hidroxilação do carbono terminal ou subterminal do ácido graxo pela enzima CYP52M1 citocromo P450 monooxigenase (Etapa I), resultando em uma cadeia de ácido graxo hidroxilado. Existe uma regiosseletividade desta enzima aos ácidos graxos de cadeia C16-C18, em especial aos monoinsaturados, o que leva a uma alta incorporação e produtividade (exemplo ácido oleico C18:1) (FELSE *et al.*, 2007). Ácidos graxos de cadeia maiores são direcionados para via de β -oxidação para produzir acetil-CoA, enquanto os de tamanho menor serão direcionados para a via síntese *de novo* para sofrer extensão (JEZIERSKA *et al.*, 2019; WONGSIRICHOT; INGHAM; WINTERBURN, 2021).

Esta etapa de hidroxilação é seguida pela adição de duas moléculas de UDP-glicose (doador do grupo glicosil), utilizando duas enzimas distintas, que resultarão na adição da sofrorose na cadeia lipídica (Etapa II). A primeira glicosilação será realizada pela enzima UGTA1 glicosiltransferase que acopla a glicose na posição C1' do grupamento hidroxila ω ou $\omega-1$ do ácido graxo; e a segunda glicose pela UGTB1 glicosiltransferase na posição C2' (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

A primeira estrutura formada é o sofrorolipídio ácido, que pode sofrer acetilação na porção da sofrorose pela enzima acetiltransferase, transferindo um grupo acetil para as posições 6' e/ou 6" da porção da sofrorose, resultando em sofrorolipídios ácidos mono e diacetilados (SAERENS *et al.*, 2011) (Etapa III). A biossíntese de sofrorolipídios ácidos ocorre intracelularmente, os quais serão transportados para fora das células por um transportador de sofrorolipídios específico (MDR), onde ocorrerá a última reação enzimática de esterificação da extremidade carboxílica livre com o C4' da sofrorose pela lactonesterase (SBLE), dando origem aos sofrorolipídios lactônicos (Etapa IV) (CIESIELSKA *et al.*, 2016).

O conhecimento acerca da via biossintética dos sofrorolipídios, juntamente com o desenvolvimento de ferramentas moleculares, permitiu o desdobramento de estratégias para direcionar a produção de produtos específicos ou com mais uniformidade química, como a criação da técnica de deleção ou superexpressão da enzima SBLE para a produção de sofrorolipídios 100% ácidos ou lactônicos, respectivamente (ROELANTS *et al.*, 2016).

Figura 3. Via de biossíntese dos sofrorolipídios



Fonte: Gupta (2012) modificado

3.4 Soforolipídios – Condições de cultivo e meios de produção

Soforolipídios são produzidos majoritariamente por fermentação submersa utilizando glicose e ácido oleico como fontes de carbono hidrofílica e hidrofóbica, respectivamente. No entanto, atualmente existe uma grande quantidade de estudos relatando o uso de fontes alternativas e resíduos industriais a esses substratos de primeira geração, objetivando a diminuição dos custos de produção e o aumento da competitividade econômica dos

soforolipídios (JIMÉNEZ-PENÁLVER *et al.*, 2019). Na Tabela 3 estão descritas algumas produções de soforolipídios variando as condições de cultivo e os substratos utilizados.

Os trabalhos da literatura relatam a utilização de monossacarídeos (glicose, frutose, manose), dissacarídeos e oligossacarídeos (sacarose, lactose, maltose, rafinose), sendo que mais de 60% dos artigos empregam glicose como fonte hidrofílica, seguido do melão de cana-de-açúcar com 17% das publicações (JIMÉNEZ-PENÁLVER *et al.*, 2019). Além da preferência metabólica comprovada pela glicose, este açúcar continua sendo muito empregado como fonte de referência para verificar os efeitos de substituição de substratos alternativos (MA *et al.*, 2019).

Em relação as fontes hidrofóbicas, pesquisas tem focado na substituição de ácido oleico por óleos vegetais mais baratos, como óleo de coco, milho, jatropha, neem, oliva, karanja, girassol, soja, entre outros (JIMÉNEZ-PENÁLVER *et al.*, 2019). Óleos que possuem uma alta composição em ácido oleico (C18:1) e esteárico (C18:0) também são muito utilizados, como óleo de girassol e de canola, pois resultam em uma alta produtividade devido a regioselectividade da enzima P450 monooxigenase por esses ácidos graxos (DAVILA; MARCHAL; VANDERCASTEELE, 1994).

Fontes de nitrogênio também são importantes para a produção, destacando o extrato de levedura que é o mais utilizado, pois é considerado um macronutriente de composição orgânica completa em relação a nitrogênio, íons metálicos e vitaminas (ROELANTS *et al.*, 2019). A sua adição ao meio tem se demonstrado benéfica, no entanto foi observado que baixas concentrações (1 g/L) promovem a produção de soforolipídios, enquanto concentrações altas (>10 g/L) desfavorecem a biossíntese, sendo principalmente direcionada para a produção de biomassa (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999; VAN RENTERGHEM *et al.*, 2019).

Íons metálicos também demonstraram importância na síntese de soforolipídios, participando como cofatores de diversas enzimas. Sabe-se que o íon Fe^{2+} é necessário para a atividade eficiente da enzima monooxigenase P450 e Mg^{2+} é cofator das enzimas glicosiltransferases UGTA1 e UGTB1 (ROELANTS *et al.*, 2019; SAERENS *et al.*, 2011). No entanto, um excesso de íons metálicos pode acarretar diminuição da produção de soforolipídios, devido aos efeitos de acúmulo e impacto negativo na formação de biomassa (FELSE *et al.*, 2007).

Tabela 3. Produção de soforolipídios variando as condições de fermentação

Microrganismo	Substratos	Tipo	Volume (L)	Tempo (h)	Soforolipídios (g/L)	Referências
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose e éster etílico	Batelada alimentada	4	192	320	Davila; Rémy; Vandecasteele (1992)
	Soro de leite desproteínizado e óleo de canola	Batelada alimentada	30	280	280	Daniel <i>et al.</i> (1998a)
	Soro de leite desproteínizado e óleo de canola	Batelada alimentada	3	580	422	Daniel <i>et al.</i> (1998b)
	Glicose, óleo de canola e licor de milho	Batelada alimentada	40	120	300	Rau <i>et al.</i> (2001)
	Resíduos do biodiesel	Batelada alimentada	2	168	60	Ashby <i>et al.</i> (2005)
	Mel e óleo de milho	Batelada alimentada	3	432	400	Pekin; Vardar-Sukan; Kosaric (2005)
	Glicose e óleo usado	Batelada simples	3,5	420	50	Fleurackers <i>et al.</i> (2006)
	Glicose e óleo usado	Batelada simples	0,9	240	34	Shah <i>et al.</i> (2007)
	Melaço de cana-de-açúcar, leite em pó, óleo ghee e óleo de soja	Erlenmeyer	0,05	192	38,76	Daverey; Pakshirajan (2009)
	Glicerol e ácido oleico	Batelada alimentada	0,05	168	12,7	Ashby; Solaiman (2010)
	Glicose, água residual de laticínios e óleo de soja	Erlenmeyer	0,05	240	62	Daverey; Pakshirajan (2011)
	Resíduo de glicerol e óleo de girassol	Erlenmeyer	0,05	200	6,36	Wadekar <i>et al.</i> (2012)
	Glicose e óleo de canola	Batelada alimentada	10		200	Gao <i>et al.</i> (2013)
	Glicerol e óleo de karanja	Erlenmeyer	0,05	200	5,91	Bhangale <i>et al.</i> (2014)
	Glicose e óleo usado	Batelada alimentada	2,25	240	55,6	Maddikeri <i>et al.</i> (2015)
	Glicose e óleo de peixe	Erlenmeyer	0,01	168	21,8	Hoa <i>et al.</i> (2017)
	Glicose e gordura de frango	Erlenmeyer	0,025	120	40	Minucelli <i>et al.</i> (2017)
	Hidrolisado de palha de milho e graxa amarela	Batelada alimentada	3	168	52,1	Samad <i>et al.</i> (2017)
	Glicose e óleo de canola	Integrada com recuperação de produto	1	1023	623	Dolman <i>et al.</i> (2017)

<i>C. albicans</i> O-13-1	Glicose e ácido oleico	Semicontínua	5	300	477	Zhang <i>et al.</i> 2018
<i>C. floricola</i> ZMI502	Resíduo de glicerol e éster de ácido graxo C18	Batelada alimentada	2	180	169	Konish <i>et al.</i> (2018)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose e óleo de cavalo	Batelada alimentada	5	168	71,7	Maeng <i>et al.</i> (2018)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose e óleo de canola	Batelada alimentada	2,5	119	226.7	Chen <i>et al.</i> (2019)
<i>S. bombicola</i> MTCC1910	Glicose e óleo de girassol usado	Batelada simples	2	192	51.5	Jadhav <i>et al.</i> (2019)
	Glicose e óleo de girassol usado	Erlenmeyer	0,05	192	41.6	Jadhav <i>et al.</i> (2019)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose, óleo de canola e licor de milho	Semicontínua/ Integrada com recuperação de produto	2,5	221	342	Liu <i>et al.</i> (2019)
	Hidrolisado de resíduo de alimentos, glicose e ácido oleico	Batelada alimentada	1,15/2	92	115.2	Kaur <i>et al.</i> (2019)
	Hidrolisado de resíduo de alimentos, glicose e ácido oleico	Semicontínua/ Integrada com recuperação de produto	1,5/2	240	874.6 g	Wang <i>et al.</i> (2019)
<i>C. batistae</i> KCTC 17,425 (CBS 8550)	Glicose e biodiesel	Batelada alimentada	2	216	224.2	Kim <i>et al.</i> (2020)
	Glicose e ácido oleico	Batelada simples	3,5	288	69.83	Silveira <i>et al.</i> (2019)
	Glicose e óleo de canola	Batelada alimentada	50	144	53.2	Kim <i>et al.</i> (2021a)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose e óleo usado	Batelada alimentada	2	288	315.6	Kim <i>et al.</i> (2021b)
<i>S. bombicola</i> ATCC 22214	Glicose e ácido oleico	Batelada simples	3,5	288	111.25	Caretta <i>et al.</i> (2021)
	Glicose e óleo de canola	Erlenmeyer	0,05	168	40	Ingham <i>et al.</i> (2022)

Além dos diferentes substratos e meios de cultivo empregados, os parâmetros como temperatura, pH, agitação, e modo de fermentação são muito importantes para a produção de soforolipídios, influenciando diretamente na produtividade. Na literatura, 70% dos estudos definiram a temperatura ótima de produção em 30 °C, no entanto sabe-se que a produção de soforolipídios não é impedida na faixa entre 21-30°C (JIMÉNEZ-PEÑALVER *et al.*, 2019; VAN BOGAERT *et al.*, 2011).

Em relação ao pH, existem dois momentos cruciais em que este parâmetro é importante. Durante a fase exponencial, para o crescimento da biomassa, é necessário que o pH esteja entre 4,5-6. Com o avanço da fermentação, ocorrerá a acidificação natural do meio e o pH cairá para 3-3,5, fase em que ocorre a produção de soforolipídios. No estudo de Daverey e Pakshirajan (2010) foi observado que o controle do pH inicial em 6 e posteriormente em 3,5 (após a queda natural), ocasionou em um aumento de 30% na produção de soforolipídios.

Para a agitação, a faixa de 150-210 rpm é a mais utilizada (JIMÉNEZ-PEÑALVER *et al.*, 2019). Maddikeri *et al.* (2015) estudaram o efeito de diferentes velocidades de agitação na produção de soforolipídios e relatou que altas velocidades (>350 rpm) tiveram um melhor desempenho do que as baixas (150 rpm), destacando que o meio de fermentação deve ser agitado vigorosamente.

Alguns estudos utilizaram de aeração em combinação com a agitação, através de fluxo de ar constante entre 1-2 vvm ou saturação de oxigênio definida entre 25-30%, utilizando um sistema de agitação em cascata (400-1200 rpm) (DIERICKX *et al.*, 2022). O fornecimento suficiente de oxigênio é um parâmetro importante a ser considerado durante o processo de fermentação, já que as células da levedura são extremamente sensíveis à limitação de O₂ e boas condições de aeração são importantes para a produção de soforolipídios, pois a enzima P450 monooxigenase utiliza oxigênio molecular (GUILMANOV, 2002; VAN BOGAERT 2007).

O modo de fermentação adotado também é um parâmetro importante para melhorar a produtividade. Os mais utilizados para produção de soforolipídios pela *S. bombicola* são fermentação submersa em batelada simples e alimentada. Estudos mais recentes têm demonstrado a viabilidade de utilizar fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo, palha de trigo, e bolo residual do óleo de girassol (JIMÉNEZ-PEÑALVER *et al.*, 2016, 2017). A maioria das fermentações foi conduzida em batelada simples (72%) (JIMÉNEZ-PEÑALVER *et al.*, 2019), no entanto os estudos utilizando batelada alimentada apresentaram resultados de rendimento e produtividade superiores (MA *et al.*, 2019; MADDIKERI *et al.*, 2015; PEKIN *et al.*, 2005).

A estratégia de batelada alimentada é mais eficiente que a batelada simples, pois consegue canalizar as fontes de carbono para construção do produto ao invés de CO₂ (MA *et al.*, 2020). A média de valores de rendimento e produtividade de bateladas simples são reportadas como 0,19 g/g e 0,41 g/L/h, respectivamente. Já para fermentações em batelada alimentada, a média para esses valores são de 0,36 g/g e 1,08 g/L/h (WANG *et al.*, 2019).

Além dessas estratégias, tecnologias integradas, como sistema de separação *in situ*, tem sido empregada para melhorar ainda mais a eficiência da produção (DOLMAN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). Nesses estudos, soforolipídios são constantemente separados do caldo de fermentação, dessa forma evitando problemas de acúmulo do produto que aumentam a viscosidade do caldo, e subsequentemente causam a diminuição do oxigênio dissolvido e inibição do produto. Com essa estratégia, valores superiores à 400 g/L de soforolipídios puderam ser obtidos.

Conforme demonstrado, muitos estudos já foram realizados acerca dos diferentes substratos e condições de cultivo que podem ser empregadas na produção de soforolipídios. No entanto, os altos custos relacionados ao seu processo produtivo ainda são um obstáculo para a competitividade econômica (ROELANTS *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020). Substratos convencionais, como glicose, ácido oleico e extrato de levedura, afetam consideravelmente o custo total de produção, podendo impactar em até 30% no valor do produto final (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

A principal dificuldade é o alto custo do quilo de produto, causado principalmente por produção em pequena escala e baixa eficiência (ROELANTS *et al.*, 2018; VAN RENTERGHEM *et al.*, 2018). Estima-se que o custo dos soforolipídios seja em torno de 20-30 €/kg, enquanto os surfactantes sintéticos são vendidos a valores entre 1-6 €/kg (DIERICKX *et al.*, 2021). Atualmente, os biosurfactantes contam apenas com 10% do mercado mundial de surfactantes, sendo a principal justificativa o alto custo de produção (SARUBBO *et al.*, 2022).

A utilização de matérias-primas renováveis mais baratas, ou até mesmo materiais residuais, levariam a uma queda considerável do valor da produção. Além disso, a utilização desses subprodutos contribuiria para a construção de uma economia circular: agregando valor econômico a estes resíduos ao passo que minimizaria a questão ambiental da sua destinação, objetivando o gerenciamento eficaz desses resíduos (HUAIMIN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

O desafio atual é aumentar a produtividade dos soforolipídios, diminuindo os custos de produção e os impactos ambientais (CLAUS; VAN BOGAERT, 2017; KAUR *et al.*, 2019; ROELANTS *et al.*, 2018), através da conversão de resíduos em produtos de alto valor, como

os soforolipídios (HUAIMIN *et al.* 2018; MA *et al.*, 2019). Um material que recentemente começou a ser explorado para a produção de soforolipídios são os resíduos alimentares (KAUR *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019, 2020).

Estes resíduos possuem grande potencial de utilização como substrato para fermentações devido sua enorme disponibilidade de matéria orgânica, como carboidratos, proteínas e lipídios (NG *et al.*, 2020). A pesquisa sobre o uso de resíduos alimentares como substrato alternativo está como um dos tópicos mais promissores para reduzir o impacto ambiental e o custo de produção de soforolipídios (WANG *et al.*, 2018).

3.4.1 Resíduos alimentares: um substrato alternativo de grande potencial para produção de soforolipídios

A perda e o desperdício de alimentos são um problema mundial. A rápida urbanização, crescimento econômico e a conseqüente geração indiscriminada de resíduos tornaram-se uma preocupação tanto para países desenvolvidos como em desenvolvimento (DAL'MAGRO; TALAMINI, 2019). Em 2013, foi estimado que um terço de toda produção de alimentos é perdida, atingindo 1,3 bilhões de toneladas de resíduos alimentares anualmente em todo o mundo (FAO, 2013). Mais recentemente, outro relatório divulgado pela FAO relatou que cerca de 14% dos alimentos produzidos são perdidos antes de chegar ao nível de varejo (FAO, 2019).

Conforme dados da Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais, a geração de resíduos sólidos urbanos no Brasil aumentou 1% em 2018, em relação ao ano anterior, contabilizando um total de 79 milhões de toneladas. Adicionalmente, o sistema de coleta apresenta diversas falhas, favorecendo o destino impróprio desses resíduos e trazendo enormes impactos ambientais. Apenas 59,5% desses resíduos foram destinados à aterros sanitários, sendo o restante despejado em locais inadequados, que não possuem medidas de prevenção à saúde humana e ambiental (ABRELPE, 2018).

Em 2008, o Brasil foi considerado um dos dez principais países em desperdício de alimentos no mundo (GOULART, 2008). Na cadeia produtiva são perdidos cerca de 45% das frutas e vegetais, 30% de cereais, 30% de peixes e frutos do mar e 20% de carnes e produtos lácteos. As fases em que ocorrem os maiores desperdícios são as de manuseio e transporte, porém as etapas de abastecimento e comercialização, produção no campo, venda em supermercados e os próprios consumidores também contribuem (EMBRAPA, 2022).

Paralelo a isso, o Brasil se comprometeu com a meta de desenvolvimento sustentável 12.3 do Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas, que almeja reduzir pela metade o

desperdício de alimentos global *per capita* nos níveis de produção e consumo até 2030 (UNEP, 2015). Dessa forma, estratégias de prevenção, redução e gerenciamento de resíduos alimentares se fazem necessárias. Nos últimos anos, a ideia de economia circular tem sido enaltecida, a qual possui como estratégia principal a prevenção e reutilização de resíduos de forma sustentável (SATPUTE; PŁAZA; BANPURKAR, 2017).

Processos têm sido desenvolvidos para converter resíduos alimentares em bioprodutos de valor agregado, como por exemplo os soforolipídios. A fermentação microbiana tem sido utilizada como uma estratégia emergente para a conversão de resíduos alimentares, que são considerados excelentes matérias-primas devido aos seus teores elevados de carboidratos, proteínas e lipídios (NG *et al.*, 2020).

Como relatado anteriormente, as matérias-primas utilizadas na produção de soforolipídios possuem um impacto muito grande no preço do produto final. Portanto, para superar esse problema, extensos estudos vêm investigando a substituição de substratos refinados por subprodutos e resíduos, não apenas do ponto de vista de custo-benefício, mas também para contribuir para um bioprocessamento mais sustentável (MA *et al.*, 2019; QAZI; WANG; DAI, 2022; WONGSIRICHOT; INGHAM; WINTERBURN, 2021).

Nesse sentido, os resíduos de alimentos têm sido recentemente investigados para a produção de soforolipídios, destacando seu potencial e resultados iniciais promissores comparáveis às matérias-primas de primeira geração. Já foram obtidos valores de produção e produtividades de 115,2 g/L e 1,25 g/L/h, respectivamente, o que incentiva novas pesquisas para melhorias e otimizações (HU *et al.*, 2021; KAUR *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019).

3.5 Soforolipídios – Propriedades e Aplicações

Os soforolipídios são moléculas anfifílicas que possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial de compostos, tornando-os potencialmente aplicáveis nas mais diversas áreas. Dentre as aplicações, destacam-se como agentes detergentes e emulsificantes na indústria de limpeza, em formulações cosméticas, recuperação de petróleo, biorremediação de solos e águas, agentes antimicrobianos, antivirais, anticâncer, anti-inflamatórios e cicatrizantes (BANAT, 1995; BORSANYIOVA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017; LYDON *et al.*, 2017; MAENG *et al.*, 2018; MINUCCELLI *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2018).

É importante salientar que as formas ácidas e lactônicas dos soforolipídios apresentam propriedades físico-químicas e biológicas diferentes, o que irão impactar em suas

futuras aplicações (VAN BOGAERT *et al.*, 2007). De forma geral, estruturas lactônicas são mais hidrofóbicas e possuem melhores ações antimicrobianas e mais eficiência na diminuição da tensão superficial (SILVEIRA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017). Já as formas acídicas apresentam boa solubilidade em água e são considerados bons agentes espumantes, demonstrando grande potencial em biorremediação e na indústria cosmética (NAUGHTON *et al.*, 2019).

Atualmente, 46,3% da produção de surfactantes no mundo é direcionada para compor a formulação de detergentes domésticos (RANJI; BABAJANZADEH; SHERIZADEH, 2019). Os soforolipídios possuem uma grande oportunidade nesse nicho comercial, apresentando vantagens como biodegradabilidade, baixa toxicidade e produção de base biológica e sustentável (DIERICKX *et al.*, 2021). Diversos trabalhos têm descrito o uso de soforolipídios em formulações para produtos de limpeza, como agentes desengordurantes, germicidas, desinfetantes e inibidores de biofilmes em superfícies e materiais (DEVELTER; JACOBS; RENKIN, 2003; DIAZ DE RIENZO, 2016; KARSTEN; DREJA; NOGLICH, 2010).

A empresa Belga *Ecover* comercializa seus produtos do segmento de limpeza, higiene pessoal, e lavanderia formulados com a adição de soforolipídios na sua composição. A empresa química *Evonik* da Alemanha recentemente também lançou em seu portfólio um produto a base de soforolipídios chamado *Rewoferm*[®]*SL*, o qual poderá ser utilizado para múltiplas funções.

O segundo maior segmento de mercado dos surfactantes se encontra nas aplicações cosmética e de higiene pessoal. Nos últimos anos, este mercado tem apresentado projetos mais sustentáveis, apostando em matérias-primas de fonte renovável, através da incorporação de compostos vegetais e de base biológica (DIERICKX *et al.*, 2021). Essa tendência atrelada ao preço de comercialização mais elevado destes tipos de produto, torna esse segmento ideal para a entrada de novas moléculas, como os soforolipídios.

O uso de soforolipídios em composições cosméticas e dermatológicas foi patenteado em 1994 (HILLION, 1994) e a sua comercialização ocorre desde o início dos anos 2000 (DIERICKX *et al.*, 2021). Atualmente a empresa *Givaudan* da Suíça e a *MG Intobio LTD* da Coreia do Sul comercializam os produtos *Sopholiance*[®] e *Sopholin Acne Soap*, respectivamente, explorando as propriedades bactericidas dos soforolipídios para controle de bactérias responsáveis por odor, acne e infecção, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, e *Cutibacterium acnes* (ASHBY *et al.*, 2011; YATIM; AHMAD; HASSAN, 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um trabalho sobre a incorporação de soforolipídios em formulações cosméticas com óleo de palmarosa, obtendo resultados

promissores sobre o controle de bactérias como *S. epidermidis*, *S. aureus* e *Cutibacterium acnes*. Além disso, as formulações apresentaram atividade antioxidante, ótima estabilidade e conservação sem a adição de conservante químico (FILIPE *et al.*, 2022).

Os soforolipídios também apresentam enorme potencial no setor da agricultura, que se utiliza muito de moléculas tensoativas para compor a formulação de pesticidas e herbicidas. A demanda por surfactantes biológicos e ambientalmente amigáveis tem aumentado nos últimos anos, devido a crescente preocupação da utilização de produtos tóxicos ao meio ambiente (CELLIGOI *et al.*, 2020). Dessa forma, os soforolipídios têm sido investigados para aplicações dentro da agricultura, dentre elas: função adjuvante, emulsificante, dispersante, aumento de produtividade, aumento na absorção foliar e atividade antimicrobiana (GIESSLER-BLANK *et al.*, 2012; SCHÖNHERR *et al.*, 2000; SIEVERDING, 2015; VAUGHN *et al.*, 2014).

Outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade antimicrobiana dos soforolipídios contra fungos fitopatogênicos do tomate, revelando eficácia no controle de *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*. A aplicação de soforolipídios na planta não apresentou fitopatogenicidade e o tratamento mais eficaz foi o preventivo. Os resultados apresentados neste estudo demonstram a possibilidade da implementação dos soforolipídios como substituintes promissores dos pesticidas químicos (CARETTA *et al.*, 2021).

Assim como nos setores descritos, os soforolipídios também estão sendo incorporados em produtos voltados para a agricultura, como o *Rewoform*[®]*SL* e o produto ACS-Sophor[®] da empresa Allied Carbon Solutions do Japão. É esperado que a sua presença nesse setor aumente nos próximos anos, devido ao seu potencial de aplicação durante todos os estágios de produção agrícola, desde bioestimulante para germinação, aumento da biodisponibilidade de micronutrientes, e lavagem de frutas e hortaliças (DENGLE-PULATE *et al.*, 2014; SHAH *et al.*, 2021; SINGH; GLICK; RATHORE, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2020).

Em relação a área médica e farmacêutica, os soforolipídios ainda não são aplicados em nível comercial, porém diversos estudos têm demonstrado seu potencial no setor, destacando suas atividades biológicas, como antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante no tratamento de queimaduras (LYDON *et al.*, 2017), ação anticâncer em células de fígado, pâncreas e cervical (CHEN *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2017), antiviral contra vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SHAH *et al.*, 2005), herpes (HSV) (BORSANYIOVA *et al.*, 2016) e recentemente também da COVID-19 (DAVEREY *et al.*, 2021). O biossurfactante tem demonstrado seguridade para uso em humanos, não apresentando toxicidade em aplicação

tópica (produtos cosméticos) e em aplicações intravenosas em modelos animais (DAVEREY *et al.*, 2021).

A biocompatibilidade e a baixa toxicidade dos sofrorolipídios também tem sido explorado pela indústria alimentícia (DEVELTER; LAURYSSSEN, 2010; SHARMA, 2016). Algumas pesquisas demonstraram sua aplicabilidade como modulador nas propriedades sensoriais do paladar (OZDENER *et al.*, 2019), emulsificante de alimentos (GAUR *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020), e principalmente como agente antimicrobiano contra diversos fungos e bactérias de origem alimentar (CHEN *et al.*, 2020; DENGLE-PULATE *et al.*, 2014; HIPÓLITO *et al.*, 2020; OLANYA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2017).

A propriedade antimicrobiana dos sofrorolipídios está relacionada à sua natureza anfifílica, a qual promove a diminuição da tensão interfacial e superficial de compostos, e assim altera a adesão de microrganismos (PONTES *et al.*, 2016; VALOTTEAU *et al.*, 2017). Sua ação também envolve mecanismos de desestabilização e alteração da permeabilidade da membrana do patógeno, o que pode levar à ruptura e extravasamento do conteúdo celular (DENGLE-PULATE *et al.*, 2014; FRACCHIA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Devido a sua especificidade de ação em membranas, os sofrorolipídios possuem ação mais eficaz contra as bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas (PONTES *et al.*, 2016; VAN BOGAERT *et al.*, 2007). Isso se deve pela diferença estrutural na parede celular de cada tipo de bactéria: Gram-positivas apresentam apenas uma membrana plasmática e uma espessa camada de peptidoglicano; enquanto em organismos Gram-negativos há a presença de duas membranas, o que dificulta o mecanismo de ação e entrada dos sofrorolipídios (SILVEIRA *et al.*, 2019).

Além disso, sabe-se que a atividade antimicrobiana dos sofrorolipídios é dependente de suas estruturas, sendo as formas lactônicas superiores em relação à atividade antimicrobiana (VAN BOGAERT *et al.*, 2007). Agentes antimicrobianos com caráter lipofílico, como os sofrorolipídios lactônicos, aumentam a permeabilidade da membrana celular, interferindo no transporte de íons, o que leva à inibição do crescimento microbiano, lise ou morte celular (SEN *et al.*, 2020). Outros estudos constataram que os sofrorolipídios podem causar possíveis interrupções na camada fosfolipídica da membrana celular devido ao seu caráter anfifílico (BORAH *et al.*, 2016; VALOTTEAU *et al.*, 2017).

Até o momento, as atividades antimicrobianas dos sofrorolipídios têm sido principalmente estudadas na sua forma livre em solução (KIM *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2019; SLEIMAN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2016). Pesquisas sobre a

incorporação de soforolipídios em matrizes poliméricas, especialmente direcionadas para aplicações em alimentos são escassas na literatura.

Salman *et al.* (2014) descreveram o uso de um biossurfactante produzido por *Lactobacillus rhamnosus* em filmes de poliacetato de vinila (PVA), relatando resultados antimicrobianos promissores contra as bactérias *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outro estudo reportou a produção de filmes de polietileno (PE) com a incorporação de ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa*, observando propriedades antimicrobianas e antiadesivas contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (HAJFARAJOLLAH *et al.*, 2015).

Também foi relatada a utilização de filmes de ácido poli (lático) (PLA) contendo diferentes glicolipídios: manosileritritollipídio (MEL), soforolipídio lactônico e celobiose lipídio, descrevendo os efeitos da incorporação desses biossurfactantes apenas nas propriedades de físico-químicas dos filmes (FUKUOKA *et al.*, 2018). Filmes de polihidroxialcanoato (PHA) e polihidroxibutirato (PHB) contendo soforolipídios foram reportados por sua ação antibacteriana contra a bactéria causadora de acnes *Cutibacterium acnes* (ASHBY *et al.*, 2011; SOLAIMAN *et al.*, 2015).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a incorporação dos soforolipídios em matrizes poliméricas para o desenvolvimento de filmes e revestimentos biodegradáveis com propriedades antimicrobianas. Hipólito *et al.* (2021) descreveram a produção de filmes de amido incorporados com soforolipídios, relatando que a adição do biossurfactante não somente conferiu atividade antimicrobiana contra o fungo *Botrytis cinerea*, como também melhorou a termoestabilidade e flexibilidade dos filmes. Outros estudos contendo soforolipídios em matrizes de amido e pululana também foram conduzidos, como o desenvolvimento de revestimentos ativos para aumentar a vida útil e qualidade de morangos, e filmes bioativos para o controle de patógenos de pele (dados não publicados).

Dessa forma, demonstra-se as inúmeras possibilidades da aplicação de soforolipídios em matrizes poliméricas, para o desenvolvimento de filmes ativos biodegradáveis, a fim de prolongar a vida de prateleira de alimentos perecíveis e reduzir a incidência de patógenos, gerando mais segurança alimentar para os consumidores. Arelado a isso, as características de natureza atóxica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e excelente atividade antimicrobiana fazem do soforolipídio uma biomolécula com grande potencial para o desenvolvimento de filmes antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2016).

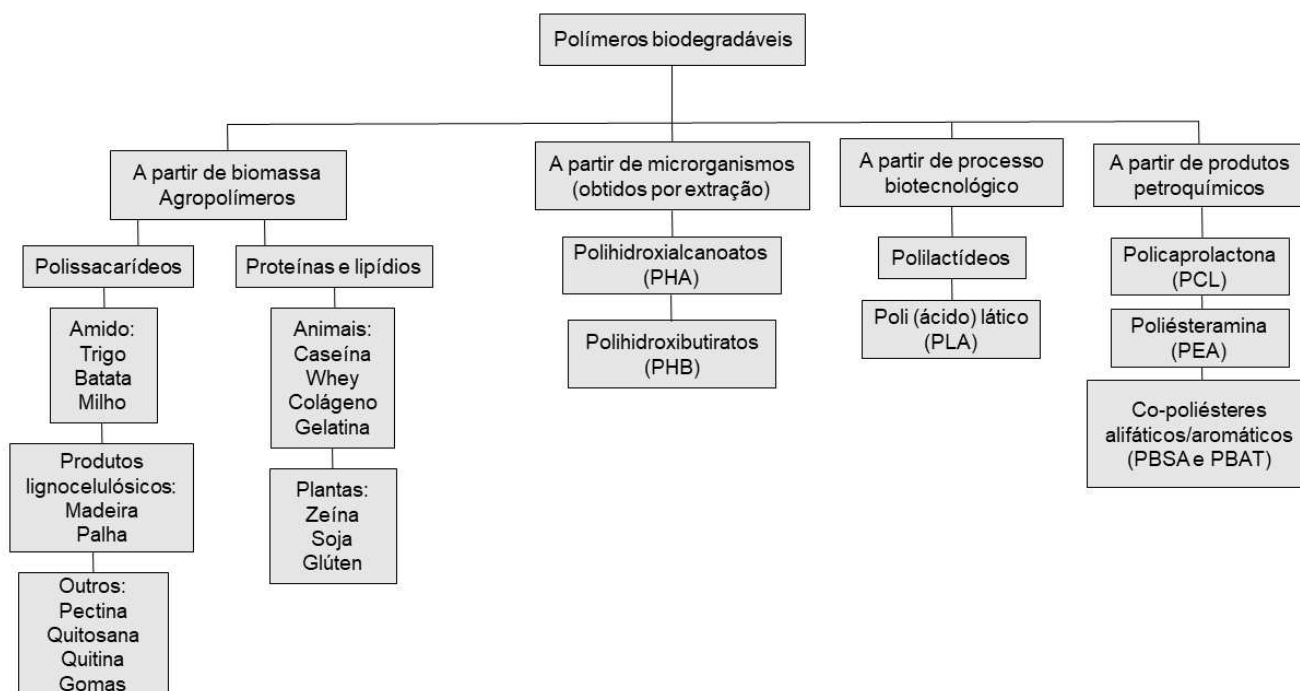
3.6. Embalagens biodegradáveis

As embalagens plásticas convencionais, derivadas do petróleo, geram grandes problemas ambientais, pois são altamente resistentes à degradação. Um desses impactos no ambiente é a contaminação do *habitat* dos seres vivos marinhos e terrestres durante a fotodecomposição, perturbando assim o ecossistema e a cadeia alimentar, podendo ocasionar a extinção de espécies (ONYEAKA *et al.*, 2022). Apesar dessas desvantagens associadas ao descarte plástico, cerca de 42% das embalagens são plásticas, seguido por papelão (31%), metal (15%), vidro (7%) e outros materiais (5%) (JEEVAHAN; CHANDRASEKARAN, 2019).

O Brasil é o 4º maior produtor de lixo plástico do mundo, atrás apenas de Estados Unidos, China e Índia. Além disso, recicla apenas 1,2% desse material (WORLDWIDE FUND FOR NATURE, 2019). Organizações regulamentadoras como a *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Commission* (EC) têm pressionado os países para uma mudança de mercado com soluções de embalagens mais sustentáveis, através do emprego de materiais biodegradáveis e recicláveis, como também a redução das embalagens plásticas tradicionais, almejando a implementação de um modelo de economia circular (MOTELICA *et al.*, 2020; UNIÃO EUROPÉIA, 2020).

Uma das soluções atualmente é o estudo sobre o desenvolvimento de filmes e embalagens biodegradáveis. Estes são obtidos a partir de fontes renováveis, e podem ser degradados a compostos simples como água, dióxido de carbono, biomassa e subprodutos, apenas pela exposição ao meio ambiente (GONZÁLEZ; IGARZABAL, 2013; MOTELICA *et al.*, 2020). Em comparação com os filmes de origem petroquímica, os filmes biodegradáveis apresentam enormes vantagens devido às suas características de biodegradabilidade, barreira e segurança (CHENG *et al.*, 2019; KE *et al.*, 2019; URANGA *et al.*, 2019).

Os polímeros biodegradáveis são classificados em quatro grupos: 1- agropolímeros, que são obtidos a partir da biomassa e compreendem os sintetizados a partir de polissacarídeos (amido, pectina), proteínas (gelatina, glúten) e lipídios (ceras); 2- poliésteres obtidos por fermentação microbiana, como polihidroxialcanoatos (PHA) e polihidroxibutirato (PHB); 3- poliésteres obtidos por via biotecnológica para síntese de monômeros a partir da biomassa, como ácido polilático (PLA); e 4- poliésteres sintetizados somente por via petroquímica (Figura 4) (AVÉROUS; BOQUILLON, 2004).

Figura 4. Classificação dos polímeros biodegradáveis

Fonte: AVEROUS; BOQUILLON (2004)

Dentre todos os biopolímeros, o amido se destaca pela sua abundância e baixo custo, podendo ser obtido a partir de fontes vegetais, como trigo, milho, arroz e batatas (KOLYBABA *et al.*, 2006). Além disso, suas propriedades de biodegradabilidade, disponibilidade anual, comestibilidade, e não toxicidade o fazem um material de grande interesse para aplicações em produtos alimentícios devido sua segurança para consumo (ONYEAKA *et al.*, 2022). O amido é um homopolissacarídeo composto por dois tipos de polímeros de glicose: a amilose, com cadeia linear, na qual as unidades de glicose são unidas por ligações do tipo $\alpha 1 \rightarrow 4$, e uma fração ramificada chamada de amilopectina com ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ e ramificações ligadas por $\alpha 1 \rightarrow 6$ (MALATHI *et al.*, 2014; MALI *et al.*, 2005).

Os filmes à base de amido exibem vários atributos físico-químicos semelhantes ou melhores que os plásticos à base de petróleo, incluindo transparência, características inodoras e insípidas, boa permeabilidade ao CO_2/O_2 , alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (ASHORI; BAHRAMI, 2014). No entanto, apresentam algumas características inferiores aos plásticos convencionais, como propriedades mecânicas pobres, baixa estabilidade da água, baixa barreira de umidade devido ao forte caráter hidrofílico, além de alta sensibilidade à contaminação microbiana, o que tem dificultado o seu uso em aplicações de embalagens de alimentos (ONYEAKA *et al.*, 2022; ORTEGA *et al.*, 2019).

No entanto, o amido apresenta grandes possibilidades de modificação química, física ou genética, originando filmes mais resistentes e com diversas propriedades adicionais para aplicação (GONTARD, GUILBERT, 1996; MALI *et al.*, 2005). Dessa forma, essas deficiências podem ser superadas por modificações na estrutura ou incorporação de compostos na matriz de amido, como materiais de carbono inorgânico, íons e nanopartículas metálicas ou ainda moléculas bioativas com atividades antimicrobianas e antioxidantes, como levana, soforolipídios, extratos de plantas e óleos essenciais (BABAPOUR *et al.*, 2021; BIGLIARDI *et al.*, 2019; COLLAZO-; KUMAR *et al.*, 2020; HIPÓLITO *et al.*, 2021; MENZEL *et al.*, 2019; SILVEIRA *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2022).

Outra estratégia para melhorar as propriedades mecânicas do amido é a adição de agentes de reticulação, o que causa a formação de ligações cruzadas entre as unidades de D-glicose na amilose e amilopectina, resultando na redução da retrogradação e aumento da resistência à temperatura e condições ácidas (MENDOZA, 2015). Normalmente, ácidos policarboxílicos são incorporados na formulação, como o ácido cítrico, málico, malônico, succínico e tartárico (DASTIDAR; NETRAVALI, 2012). A seleção apropriada desses aditivos funcionais pode ser usada para melhorar o desempenho de filmes à base de amido, afetando sua microestrutura, estado físico, químico e biológico (XU *et al.*, 2022).

Outro biopolímero de destaque é o ácido polilático (PLA), pois apresenta propriedades mecânicas similares à polímeros convencionais, como ao polietileno (PE) e ao poli (tereftalato de etileno (PET), além de alta compatibilidade e biodegradabilidade (GAO *et al.*, 2017; MARTIN; AVERÓUS, 2001). O PLA é um poliéster composto por monômeros alifáticos lineares, o qual é sintetizado em escala comercial através da abertura de anel da via de polimerização (*ring opening polymerization*) dos dímeros cíclicos do ácido láctico, ou obtido por fermentação microbiana a partir de fontes renováveis (AHMED *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, tem sido um polímero muito estudado, pois apresenta facilidade de produção, biodegradabilidade e aceitabilidade comercial em várias áreas, como em aplicações biomédicas, indústria automobilística e de alimentos (AHMED *et al.*, 2019; BAEK *et al.*, 2018; RISYON *et al.*, 2020; SUNG *et al.*, 2017; TAWAKKAL *et al.*, 2014). Possui carácter hidrofóbico e é considerado de custo relativamente baixo, possuindo excelentes propriedades de resistência mecânica, rigidez e de barreira à água e ao oxigênio (AHMED *et al.*, 2016; FORTUNATI *et al.*, 2012).

Embalagens à base de PLA são consideradas seguras (GRAS), o que impulsionou e colocou esse polímero em uma posição promissora para aplicações em alimentos (AURAS *et al.*, 2004; JIN; ZHANG, 2008). Em muitos países da Europa, Japão e América do Norte, esse

polímero é utilizado para fabricação de garrafas de bebidas e recipientes para saladas (AHMED; VARSHNEY, 2011). O PLA é considerado um dos materiais com grande potencial para a criação dessa nova geração de filmes e embalagens, pois além de possuir propriedades mecânicas, térmicas e ópticas adequadas, possui também ótima propriedade de liberação de agentes antimicrobianos (AHMED; HIREMATH; JACOB, 2016).

3.7 Embalagens Antimicrobianas

As embalagens de alimentos tradicionais possuem ação passiva em relação ao alimento, uma vez que servem apenas como isolamento do ambiente externo (WYRWA; BARSKA, 2017). No entanto, as embalagens antimicrobianas complementam as embalagens tradicionais com novos recursos (DAIRI *et al.*, 2019). Essas se caracterizam por alterarem as condições do ambiente que cercam o alimento embalado, visando prolongar a vida útil, melhorar ou manter as propriedades sensoriais, nutricionais e microbiológicas (GONZÁLEZ; IGARZABAL, 2013; TAKMA; KOREL, 2019).

A tecnologia das embalagens ativas pode envolver sistemas de atmosfera modificada, reguladores de umidade e a incorporação de vários tipos de componentes, como agentes antimicrobianos, antioxidantes e aromas, os quais expandem a funcionalidade das embalagens adicionando funções extras (HAN *et al.*, 2018). A embalagem antimicrobiana de alimentos visa reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes (AHMED; HIREMATH; JACOB, 2016).

A liberação de substâncias ativas por embalagens é uma forma de controle mais segura à adição direta no produto, pois esses compostos são liberados de forma controlada, e devido a isso, podem estar presentes em menores quantidades, além de que apenas superficialmente, onde a maior parte das contaminações microbianas ocorrem (DAIRI *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2007). Dessa forma, as embalagens ativas são uma solução eficiente que podem aliviar as perdas econômicas dos produtores, e garantir maior prazo de validade e segurança alimentar para os consumidores (MATHEW *et al.*, 2019; MULLA *et al.*, 2017).

Os principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens de alimentos são óxidos e nanopartículas metálicas, ácidos orgânicos, enzimas, nisina, natamicina, extratos de plantas, óleos essenciais e quitosana (AHMED; HIREMATH, JACOB, 2016; HAN, 2014; HAN *et al.*, 2018; MULLA *et al.*, 2017; NOORI; ZEYNALI; ALMASI, 2018). A incorporação de compostos antimicrobianos de origem natural tem ganhado atenção especial, pois

apresentam-se como uma alternativa ao uso de conservantes químicos para os consumidores exigentes (BAZARGANI-GILANI; ALIAKBARLU; TAJIK, 2015; TAKMA; KOREL, 2019).

Um composto natural que merece destaque por sua ação antimicrobiana é o soforolipídio. Esta molécula possui atividade comprovada contra diversos patógenos, destacando as principais bactérias contaminantes da indústria de alimentos. No entanto, sua atividade tem sido apenas relatada em ensaios em solução, havendo a necessidade de estudos direcionados sobre seu potencial na aplicação em embalagens ativas antimicrobianas.

3.8 Nanopartículas de prata

A nanotecnologia é a ciência que tem como objetivo de estudo a matéria em seu tamanho nanométrico, trabalhando com partículas entre 1 e 100 nm (SUBRAMANI; SUBBIAH; HUJA, 2019). A manipulação de materiais nesta escala, permite o desenvolvimento de sistemas e materiais com melhores propriedades físicas e biológicas e aplicabilidades em comparação com a escala micro ou macrométrica, pois ao formar a nanopartícula há um aumento na área superficial e de energia, o que confere melhorias nas propriedades existentes ou ainda nova funções e recursos (BAZMANDEH *et al.*, 2020; CHAUSALI; SAXENA; PRASAD, 2022).

As nanopartículas podem ser sintetizadas por métodos físicos, químicos e biológicos, sendo este último o mais atrativo atualmente devido a utilização de uma abordagem sustentável, segura e que pode ser empregada em larga escala, sem o uso de compostos químicos tóxicos, que facilita e expande as possibilidades de aplicações (KOWSALYA *et al.*, 2019; SALAM *et al.*, 2012). A síntese por via biológica utiliza materiais biodegradáveis e ecologicamente corretos, como extratos de plantas, microrganismos, ou metabólitos derivados de fermentação microbiana como agentes redutores de sais metálicos (DURÁN *et al.*, 2005; RAJAN *et al.*, 2015; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Nesse sentido, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm despertado atenção, não apenas por sua estabilidade ao calor e alta área superficial específica (ARDJOURM *et al.*, 2021), mas principalmente devido à sua efetiva atividade antimicrobiana, sendo explorada em diversos campos, como biomedicina (DURÁN *et al.*, 2016), agricultura (MISHRA; SINGH, 2015), materiais têxteis (BACKX *et al.*, 2018), cosmética (KOKURA *et al.*, 2010) e para fins alimentícios, com destaque para aplicações em embalagens de alimentos (CANO *et al.*, 2016; CEBALLOS *et al.*, 2021; ORTEGA *et al.*, 2017; SHANKAR *et al.*, 2018).

O nitrato de prata é normalmente empregado como precursor na síntese de AgNPs e o seu efeito antimicrobiano é relacionado à múltiplos mecanismos de ação. Estudos sugerem que os íons de prata são liberados pela oxidação do nanometal e danifiquem membranas celulares de patógenos, interagindo com grupos sulfidrilas das proteínas e afetando o funcionamento da cadeia respiratória, além de induzir a formação de radicais livres (FENG *et al.*, 2000; LIAU *et al.*, 1997).

As AgNPs tem ganhado enorme interesse para aplicação em embalagens devido suas propriedades únicas, como grande área de superfície, alta estabilidade térmica, não volatilidade e excelente atividade antimicrobiana, incluindo os principais patógenos de alimentos, além de ser aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicação em embalagens alimentares (AHMED; HIREMATH; JACOB, 2016; AHMED *et al.*, 2018). Neste contexto, a incorporação de AgNPs em embalagens surge como um potente antimicrobiano para impedir a proliferação microbiana nos alimentos (DAIRI *et al.*, 2019).

Os biossurfactantes foram recentemente apontados como candidatos alternativos para a síntese verde de AgNPs (GÓMEZ-GRANA *et al.*, 2017; KHALID *et al.*, 2018). A utilização de soforolipídios para a síntese de nanopartículas metálicas foi relatada pela primeira vez por Kasture *et al.* (2008), sendo também relatado por outros autores posteriormente (BASAK; DAS; DAS, 2014; KUMAR *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2008). Esses trabalhos descreveram que os soforolipídios atuaram como agentes redutores das nanopartículas de prata, e ainda potencializaram suas propriedades biológicas.

Embora a síntese de AgNPs por soforolipídios tenha sido relatada, não há estudos descrevendo a sua posterior incorporação no desenvolvimento de filmes nanocompósitos, visando melhorar as propriedades estruturais e funcionais. Em trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, a incorporação de soforolipídios em matrizes de filmes de PLA e amido melhoraram as propriedades estruturais dos filmes, assim como também conferiram atividade antimicrobiana ao material (HIPÓLITO *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2020). Dessa forma, a incorporação de nanopartículas de prata produzidas com soforolipídios (AgNP-SL) também poderiam trazer benefícios as características estruturais e potencializar a atividade antimicrobiana dos filmes nanocompósitos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

O microrganismo utilizado na produção de soforolipídios foi a levedura *Starmerella bombicola* ATCC 22214, obtida da American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, USA). Para os testes antimicrobianos foram utilizadas bactérias isoladas de carcaças de frango cedidas pela empresa JBS Foods – Abatedouro Big Frango: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*; e as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica serovar* Enteritidis ATCC 13076 pertencentes a coleção de microrganismos do Departamento de Microbiologia da UEL.

4.2 Produção de soforolipídios – Departamento de Biotecnologia UEL

4.2.1 Ativação e pré-inóculo da *S. bombicola*

A levedura foi mantida criopreservada em 25% de glicerol à -80 °C (GAO *et al.*, 2013). A manutenção da cepa foi realizada em placas de Petri contendo em g/L: glicose 10, extrato de levedura 3, peptona 5, extrato de malte 3 e ágar 20. Os repiques foram realizados a cada quatro semanas e mantidos sob refrigeração à 4 °C. A ativação do microrganismo ocorreu em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio contendo em g/L: glicose 100, extrato de levedura 10 e ureia 1, adicionado de 2 alças de platina do microrganismo em preservação, incubadas em shaker à 30 °C, 150 rpm por 24 h. O pré-inóculo consistiu na transferência de 10% (v/v) do meio de ativação para novo frasco Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio em g/L: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75, por 48h nas mesmas condições descritas (MINUCELLI *et al.*, 2016).

4.2.2 Fermentação em biorreator de bancada

Foi realizada fermentação em biorreator de bancada (FerMac 320 5L - Electrolab Biotech Ltda), volume operacional de 3,5 L contendo em g/L: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75, seguido de pulsos de 20 g/L de ácido oleico a cada 48 h até 192 h e adição de 90 g/L de glicose em 144 h e 192 h. As condições utilizadas foram: inóculo padronizado em 10% (v/v), temperatura de 30 °C, agitação de 450 rpm, aeração de 1 vvm, pH controlado em

3,5 por 288 h. A fermentação foi monitorada pela coleta de amostras à cada 24h, as quais eram centrifugadas a 9956 x g por 15 min. Para acompanhamento da biomassa, o pellet formado foi ressuspenso em água destilada, secos em estufa à 100 °C e determinado o peso seco por gravimetria. Do sobrenadante, foi quantificada a glicose e o ácido oleico residuais pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945) e por gravimetria da extração com hexano, respectivamente (MINUCELLI et al., 2016).

4.2.3 Extração e quantificação dos soforolipídios

O caldo fermentado foi centrifugado (9956 x g por 15 min) para remoção da biomassa e submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila (1:1) por 3x. A fração obtida foi submetida a nova extração em funil de separação com solução metanol água 4:1 (v/v) e hexano (v/v) nas proporções de 1:1 (v/v), a fim de se obter os soforolipídios retido na fração metanólica e remover as impurezas lipídicas presentes na fase hexânica. Após secagem do metanol, o soforolipídio foi submetido à três extrações com acetato de etila e água (3:1) por 40 minutos à 4 °C para eliminação de possíveis açúcares residuais na fase aquosa.

Por fim, a fração final contendo os soforolipídios foi liofilizada e as quantificações foram realizadas por gravimetria 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 250mm; 4,6mm; 12nm) 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 minutos (HU; JU, 2001; WADEKAR et al., 2012).

4.3 Produção de soforolipídios – Bio Base Europe Pilot Plant (Bélgica)

A produção de soforolipídios na Bélgica foi realizada durante o período de 6 meses do doutorado sanduíche PDSE na planta piloto da Universidade de Ghent, Bio Base Europe Pilot Plant (BBEPP). Essa colaboração foi realizada em parceria com o projeto *Waste2Func*, que tinha como objetivo a produção de biomoléculas de interesse industrial, como os soforolipídios, através da utilização de resíduos e materiais de segunda geração, objetivando diminuir os custos de produção, mantendo uma produtividade comparável com produtos comerciais e tornando o processo ainda mais sustentável.

Dessa forma, a viabilidade de utilização de resíduos alimentares provenientes de supermercados locais foi estudada. Primeiramente, foi realizado testes de hidrólise enzimática desses resíduos, para posterior utilização como substrato alternativo para fermentação.

4.3.1 Resíduos Alimentares

Os resíduos alimentares foram obtidos da empresa *Group Op de Beeck*, Antuérpia – Bélgica, que recolhe alimentos de origem vegetal e animal que já não são próprios para consumo, sendo compostos por um mix de produtos provenientes de supermercados com data de validade vencidas, com erro de composição ou recusados pelas autoridades públicas. As amostras de resíduos de alimentos foram armazenadas a -20°C até os experimentos.

4.3.2 Testes de hidrólise enzimática dos resíduos alimentares

A hidrólise enzimática foi realizada em duplicata utilizando tubos Falcon de 50 mL contendo aproximadamente 35 g de resíduos de alimentos, os quais foram colocados no equipamento ThermoMixer (Eppendorf, Bélgica) para agitação e controle de temperatura. O protocolo descrito por Kaur *et al.* (2019) foi usado como ponto de partida para os experimentos. Protease, lipase e glucoamilase comerciais foram empregadas na hidrólise, sendo padronizada inicialmente as concentrações das enzimas em 1% cada, matéria seca a 10%, temperatura de 48 °C, 1000 rpm por 16h. Posteriormente, as seguintes condições foram avaliadas em sequência: 1- tempo (2, 4, 6, 8 e 16h), 2- concentração da enzima (0, 0,5, 1 e 1,5%), 3- temperatura (30, 35, 48, 55 °C), e 4- porcentagem da matéria seca (sem e com ajuste para 10% m/v). Após a hidrólise, uma amostra de 5 mL foi coletada, centrifugada (14.000 rpm, 5 min) e o sobrenadante foi filtrado usando um filtro de polietersulfona (PES). As amostras foram analisadas por CLAE para quantificação de glicose, ácido lático e etanol.

4.3.3 Geração e purificação do hidrolisado de alimentos para fermentação

Após os experimentos de hidrólise, foram escolhidos os parâmetros mais adequados para os resíduos alimentares que seriam utilizados no processo de fermentação para produção de soforolipídios. Quatro quilos de resíduos alimentares foram usados como material inicial. A hidrólise enzimática foi realizada em biorreator de bancada para substratos sólidos e processos enzimáticos (Labfors 5 3,9 L, Infors HT, Suíça) e amostras foram coletadas ao longo do tempo

para acompanhar a reação. Ao final, os resíduos alimentares foram centrifugados (8000 rpm, 15 min), e o sobrenadante foi filtrado (0,5 μ m) usando um sistema de mini filtração (Buono Vino Super Jet wine filter, Canadá). O hidrolisado clarificado foi então armazenado a -20°C até o uso.

4.3.4 Ativação e pré-inóculo da *S. bombicola*

A cepa selvagem da levedura *S. bombicola* foi armazenada a -80 °C em 10% de glicerol e o inóculo foi preparado em duas etapas usando o meio de inóculo descrito por Lang *et al.* (2000) com modificações (Tabela 4). O primeiro cultivo foi realizado a partir do estoque de criopreservação da levedura para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio (2% inóculo (v/v), 30 °C, 200 rpm, 28 h) e, posteriormente, transferidos para frascos Erlenmeyer de 1L contendo 200 mL do mesmo meio (5% inóculo (v/v), 30 °C, 200 rpm, 28 h). Após, este último cultivo foi utilizado para a inoculação (5% inóculo (v/v)) dos fermentadores contendo 2L de volume de trabalho.

Tabela 4. Composição dos meios para as fermentações com substrato de 1ª geração (F01) e resíduos alimentares hidrolisados (F02)

Componentes (g/L)	Meio de inóculo	F01	F02
Glicose	150	40	-
Hidrolisado de alimentos	-	-	40
Ácido oleico	-	10	-
Óleo de cozinha usado	-	-	10
Citrato de Sódio	5	5	-
Extrato de levedura	4	13.93	-
NH ₄ Cl	1.5	0.42	-
KH ₂ PO ₄	1	1	-
K ₂ HPO ₄	0.16	0.16	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.7	0.7	-
NaCl	0.5	0.5	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.27	0.27	-

4.3.5 Fermentações em biorreator de bancada

Duas fermentações em batelada alimentada foram estudadas. A Fermentação 1 (F01) utilizou somente substratos de 1ª geração: glicose e ácido oleico, como principais fontes de carbono, enquanto a Fermentação 2 (F02) utilizou substratos de segunda geração (Tabela 4).

As F01 e F02 ocorreram em paralelo e em condições de cultivo idênticas para comparar o crescimento microbiano e a produção de soforolipídios em ambos os meios. As fermentações ocorreram em biorreatores de bancada (7,5L, Labfors, Infors, Suíça), com volume operacional de 2 L, a 30°C, sendo o pH controlado a 3,5 pela adição de NaOH após a queda natural. A taxa de aeração foi fixada em 2 L/min (1 vvm) e a agitação foi controlada para manter uma oxigenação constante a 30% (400-1200 rpm).

A concentração inicial de glicose foi de 40 g/L, sendo continuamente alimentada a 1,0 g/L/h. Uma concentração inicial de 10 g/L de ácido oleico foi fornecida como precursor da produção de soforolipídios e após 24 h, outra dose de 10 g/L de ácido oleico foi adicionada. Posteriormente, a adição de ácido oleico foi baseada na análise de cromatografia de camada delgada (CCD). A fase de alimentação iniciou-se com a suplementação de glicose e ácido oleico para F01 e resíduo de glicerol e óleo de cozinha usado para F02, quando a concentração da fonte hidrofílica atingiu menos de 30 g/L e a fonte hidrofóbica menos de 5 g/L.

4.3.6 Métodos analíticos

4.3.6.1 Análise e amostragem

Amostras de 10 mL das fermentações foram retiradas a cada 8h para determinar a biomassa, pH, consumo de substratos e produção de soforolipídios. As amostras foram analisadas por CLAE para permitir a alimentação adequada dos substratos.

4.3.6.2 Densidade óptica e gravimetria

As amostras foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl) e a densidade óptica (DO) foi medida a 600 nm usando espectrofotômetro (630 V Bio Jasco). A biomassa seca foi determinada por centrifugação (14.000 rpm, 5 min) de amostras de 5 mL, com posterior lavagem dos pellets com 5 mL de etanol 70%, seguido de lavagem com 5 mL de salina e ressuspensão em 5 mL água Milli-Q. Em seguida, a biomassa ressuspensa foi transferida para placas de alumínio e determinada utilizando analisador de umidade (MA37 Infrared, Sartorius, EUA).

4.3.6.3 Análises cromatográficas

A análise de CLAE (1260 Infinity, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) conectada a um detector de índice de refração (G1362A, Agilent) e com coluna de carboidrato Aminex® HPX-87H (300 mm × 7,8 mm) foi usada para determinar compostos, como glicose, glicerol, ácido láctico e etanol durante a fermentação. Amostras de 10 µL foram injetadas para a análise, usando uma solução de ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel isocrática a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min e com detecção de comprimento de onda em 410 nm (SAERENS, SAEY E SOETAERT, 2011).

A técnica de CCD foi utilizada para a estimativa de ácido oleico e óleo de cozinha consumido durante a fermentação. A CCD foi realizada em placas de sílica gel 60 F254 (VWR), usando a mistura de eluentes clorofórmio/metanol/água (65:15:2 v/v/v) para ácido oleico e hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:2 v/v/v) para o óleo de cozinha. A estimativa foi baseada na comparação com padrões preparados de cada composto. Após a eluição, as placas foram mergulhadas em H₂SO₄ a 10% (v/v) e aquecidas para o desenvolvimento da corrida (ASMER et al., 1988).

A análise de CLAE acoplada ao detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD) (Agilent Technologies 1260 Infinity) com coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, 4,6 x 100 mm) foi usada para quantificar e analisar a composição do soforolipídios produzido. Primeiramente, as amostras foram diluídas com 3 volumes de etanol, centrifugadas (14000 rpm, 5 min), e o sobrenadante foi coletado para análise. As amostras foram devidamente diluídas para quantificação e a eluição foi realizada com gradiente de acetonitrila/ácido acético (0,5% em água) (5/95–95/5 em 40 min), com vazão de 1 mL/min e temperatura de 30 °C. Os padrões foram utilizados em paralelo para comparação (VAN BOGAERT *et al.*, 2016). Com base nos resultados de CLAE-ELSD, a produção, a produtividade e o rendimento foram calculados de acordo com as equações 1 e 2 abaixo.

$$SL \text{ produtividade volumétrica (g/Lh)} = \frac{\text{Produção final (g/L)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Rendimento (g/g, \%)} = \frac{\text{SL produzido (g)}}{\text{Consumo total de substratos (g)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

4.4 Síntese biológica de nanopartículas de prata com soforolipídios (AgNP-SL)

Nanopartículas de prata foram sintetizadas usando soforolipídios produzidos no item 4.2 como agente redutor. O experimento foi conduzido em agitador magnético com

aquecimento de placa, usando frascos de Becker de 400 mL contendo 100 mL de solução aquosa de AgNO_3 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) de concentração 1×10^{-3} M e soforolipídios a 1×10^{-3} M. Para esta solução, 1 mL de KOH 1M (Diadema, Brasil) foi adicionado gota a gota e depois agitado nas condições apropriadas. Diferentes temperaturas (40, 60, 80, 90, 100 °C) e diferentes tempos (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min) foram avaliados para observar as mudanças de cor nestas faixas, indicando a formação das AgNP-SL. Alíquotas dos diferentes parâmetros foram retiradas e analisadas com espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-vis). Após a síntese, as amostras foram centrifugadas (9000 rpm por 20 min) e o pellet resultante foi coletado para secagem em estufa à temperatura ambiente, sendo este material utilizado para produção dos filmes.

4.5 Caracterização e atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata com soforolipídios (AgNP-SL)

A caracterização preliminar das AgNP-SL foi realizada usando espectrofotômetro UV-vis (BioTek Synergy HT, Winooski, EUA) pela medição da absorção na faixa de 300-700 nm. A medição do tamanho, o valor do índice de polidistribuição (PDI) e o potencial zeta das AgNP-SL foram analisados por dispersão de luz dinâmica (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Co., U.K.). As análises morfológicas foram realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (JEM 1400, JEOL) operando a uma voltagem de aceleração de 120 kV. O espectro de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi registrado por instrumento FTIR Shimadzu-8400 (Japão) usando o método de leitura em pastilha de brometo de potássio (KBr). As medições foram realizadas em triplicada na faixa de 4000–400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

Para verificar a ação antimicrobiana das AgNP-SL, os microrganismos *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizados como grupos representativos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. As cepas bacterianas foram preservadas em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) (Kasvi) suplementado com 25% (v/v) glicerol a -80 °C. Para ativação, as bactérias foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (MH) (Kasvi) e incubadas a 37 °C por 18 h. As suspensões bacterianas (solução salina a 0,9%) foram preparadas usando escala McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), diluídas em caldo MH e plaqueadas em microplaca de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC/poço, de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). As concentrações de AgNP-SL variaram de 225 a 3,51 μM e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a

menor concentração que inibiu o crescimento visível de bactérias. Os testes foram realizados em triplicata com controles positivos (bactérias não tratadas) e negativos (somente meio de cultura).

4.6 Produção de filmes de amido incorporados com as nanopartículas de prata sintetizadas com soforolipídios (AgNP-SL)

Filmes à base de amido foram produzidos pelo método *casting* e diferentes formulações foram preparadas com a incorporação das nanopartículas de prata produzidas com soforolipídios (AgNP-SL) e ácido tartárico (TA), como agente de ligação cruzada (Tabela 5).

As concentrações de AgNP-SL (0,25%, 0,5%, 1% e 4%) e TA (5% e 10%) foram calculadas com base na concentração de amido (3g/100 mL). Todos os compostos foram homogeneizados com água destilada e aquecidos de 30 °C a 95 °C, sob agitação constante, e mantidos a 95 °C por 10 min. Em seguida, as soluções filmogênicas foram sonicadas (Unique USC-1800) por 15 min, acondicionadas em placas de acrílico de 90x15 mm (40 g/placa), e então deixadas secar em estufa (TE-394-3 Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 30 °C por 24 h. Os filmes secos foram mantidos a 58% de umidade relativa (UR) e 25°C até o uso.

Tabela 5. Composição das formulações dos filmes de amido incorporados com as nanopartículas de prata produzidas com soforolipídios (AgNP-SL) e ácido tartárico (TA)

Formulações	Amido (g)	Glicerol (g)	AgNP-SL (g)	TA (g)	Água (g)
AM	3,00	0,6	-	-	96,4
AM + 0.25%	2,99	0,6	0,0075	-	96,4
AM + 0.5%	2,98	0,6	0,0150	-	96,4
AM + 1%	2,97	0,6	0,0300	-	96,4
AM + 4%	2,88	0,6	0,1200	-	96,4
AM5	2,85	0,6	-	0,15	96,4
AM5 + 0.25%	2,84	0,6	0,0075	0,15	96,4
AM5 + 0.5%	2,83	0,6	0,0150	0,15	96,4
AM5 + 1%	2,82	0,6	0,0300	0,15	96,4
AM10	2,70	0,6	-	0,30	96,4
AM10 + 0.25%	2,69	0,6	0,0075	0,30	96,4

4.7 Produção dos filmes de ácido polilático incorporados com soforolipídios

As soluções filmogênicas foram preparadas pelo método de *casting* a partir de ácido polilático (PLA 4043 D) dissolvidos em clorofórmio. Foram preparadas 5 formulações variando as concentrações de soforolipídios (Tabela 6), sendo empregado 4% (m/m) de sólidos em todos os filmes. As soluções foram preparadas sob agitação constante à temperatura ambiente por 6 h. Os soforolipídios foram adicionados após uma hora de agitação, em soluções homogêneas de PLA. Após a completa homogeneização, foram colocadas 40 g de cada formulação em placa de Petri de vidro de 13,5 cm de diâmetro para secagem, por aproximadamente 24 h, em temperatura ambiente, até a formação dos filmes. Os filmes foram acondicionados em 58% UR e 25 °C até o uso.

Tabela 6. Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos filmes a base de ácido polilático (PLA) com adição de soforolipídios

Formulações	PLA (g)	Soforolipídios (g)	Clorofórmio (g)
PLA	4,00	-	96
PLA-SL2.5	3,90	0,1	96
PLA-SL5	3,80	0,2	96
PLA-SL10	3,60	0,4	96
PLA-SL20	3,20	0,8	96

4.8 Caracterização dos filmes de amido e PLA

4.8.1 Espessura

A determinação das espessuras dos filmes foi realizada utilizando um Micrômetro (Mitutoyo®), a partir de dez pontos escolhidos aleatoriamente na superfície de cada filme.

4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microestrutura foi realizada por MEV (modelo FEI Quanta 200) para verificar a estrutura dos filmes após a incorporação dos compostos. As amostras foram mantidas em dessecador com sílica, depois foram recortadas a 5x5 mm, revestidas com ouro por um *Sputter Coater* e avaliadas com voltagem de aceleração de 20 kV.

4.8.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR)

O experimento foi realizado em triplicata e conduzido em aparelho Shimadzu FTIR-8300, na faixa de espectro de 4000 a 500 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1} , utilizado o método de leitura da amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr). Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR e as análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

4.8.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para as análises de DSC, cerca de 3 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio e submetidos ao programa de aquecimento controlado. Os ensaios foram realizados no equipamento Netzsch (modelo DSC-204), em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min. As faixas de temperatura foram de -15 a 300 °C para a amostra de soforolipídios, -15 a 100 °C para os filmes de PLA, e 30 a 100 °C para os filmes de amido. As análises foram realizadas no Laboratório ESPEC da Universidade Estadual de Londrina.

4.8.5 Solubilidade

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

$$\text{Solubilidade}(\%) = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

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

4.8.6 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A PVA foi determinada gravimetricamente de acordo com as normas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM E96-95 1996). Cada amostra (duplicata) foi colocada em uma cápsula de permeabilidade (0.00181 m^2), e seu interior foi parcialmente preenchido com CaCl_2 anidro, de modo a se obter 0% de UR no interior destas cápsulas, e seladas para garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme. O conjunto (cápsula + filme) foi pesado no 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 de 2h durante 24 h. A mudança de massa da cápsula de permeação foi registrada, e o ganho de massa (g) foi registrado 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) pela equação 4 abaixo:

$$TVA = \frac{g}{t.A} \quad (\text{Eq. 4})$$

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

Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada utilizando a equação 5 abaixo:

$$PVA = \frac{TVA.m}{\Delta P} \quad (\text{Eq. 5})$$

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

4.8.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando texturômetro TA.TX2 plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) de acordo com as Normas da ASTM (D882-91, 1996). Os filmes foram cortados (25 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 foi de 500 mm/min. Foram determinadas as seguintes propriedades de tração: resistência máxima à tração (MPa) e alongação na ruptura (%), calculadas pelas equações 6 e 7 a seguir:

$$\text{Resistência Máxima à Tração} = \frac{F_{max}}{A_{min}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde, F_{max} é a força máxima (N) registrada no equipamento e A_{min} é a área mínima inicial da amostra (m²).

$$\text{Alongação na Ruptura} = \frac{A_t}{D_G} * 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

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

4.8.8 Difração de raio X (DRX)

Os filmes de amido incorporados com nanopartículas de prata (AgNP-SL) e ácido tartárico foram ainda caracterizados quanto a cristalinidade pela DRX. A análise foi realizada usando um difratômetro PANalytical X'Pert PRO MPD (Almedo, Holanda) com radiação $CuK\alpha$ nas condições operacionais de 40 kV e 30 mA. Todos os ensaios foram realizados com um padrão de difração a $2\theta = 5-70^\circ$ com uma taxa de varredura de $1^\circ/\text{min}$.

4.8.9 Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana dos filmes PLA incorporados com sofrorolipídios foi avaliada contra os isolados de carne de frango *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella spp.* As cepas foram primeiramente cultivadas em ágar MH por 24 h a 37 °C. As bactérias foram ajustadas para 10^8 UFC/mL (0,9% NaCl) usando a escala 0,5 McFarland. Os filmes foram cortados em discos, e ambos os lados foram esterilizados com luz UV por 15 min. Primeiramente, 10 μ L (10^6) das suspensões bacterianas foram adicionados aos discos e deixados secar naturalmente na superfície dos filmes. Em seguida, os discos foram colocados em tubos com 1 mL de caldo MH, agitados em vórtex por 1 min, seguido de diluição seriada

com água peptonada tamponada e plaqueados em ágar nutriente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada. O teste foi feito em triplicata, e o filme de PLA serviu como controle.

Os filmes de amido incorporados de nanopartículas de prata (AgNP-SL) também foram avaliados pela mesma metodologia descrita acima contra as bactérias *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* ATCC 13076. No entanto, os discos de filmes contendo as bactérias foram incubados por 24 h nos tubos contendo 1 mL de MH a 37°C e 50 rpm. Cada tubo foi agitado em vórtex por 1 min, seguido de diluição seriada e plaqueados em ágar nutriente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada. O teste foi feito em triplicata, e o filme de amido puro serviu como controle.

4.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software Statistica STATISTICA 13.5 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, EUA), sendo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) empregado para comparação de médias.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados na forma de 2 artigos científicos, 4 patentes, 1 artigo de revisão bibliográfica, 1 livro e 3 capítulos de livro.

5.1 – Artigo 1: Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens

5.2 – Artigo 2: Green synthesis of silver nanoparticles using sophorolipids for the development of antimicrobial starch nanocomposite films

5.3 – Patente 1: Filmes antimicrobianos de amido e nanopartículas de prata com soforolipídios para preservação de bananas

5.4 – Patente 2: Processo de separação das formas acídicas e lactônicas dos soforolipídios produzidos por uma cepa de *Starmerella*

5.5 – Patente 3: Uso de soforolipídios de *Starmerella* durante a lavagem de carcaças para redução microbiana após a etapa de evisceração de frangos de corte

5.6 – Patente 4: Filme Multifuncional com ação prebiótica e antimicrobiana para revestimento de morangos

5.7 - Artigo de revisão: Sophorolipids: A review on production and perspectives of application in agriculture

5.8 – Livro: Microbial Sophorolipids: Production, Properties, and Industrial Applications

5.9 – Capítulo livro 1: Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos 3: Capítulo 12 – Perspectivas de Aplicação de soforolipídio microbiano na indústria de alimentos

5.10 – Capítulo livro 2: Bioactive Compounds in Fermented Foods: Health Aspects: Exopolysaccharides in Fermented Foods and Their Potential Health Benefits

5.11 – Capítulo livro 3: Aplicação de soforolipídios de *Candida bombicola* em filmes antimicrobianos.

5.1 Artigo 1: Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens

Publicado em: Food Packaging and Shelf-Life

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100591>



Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens

Victória Akemi Itakura Silveira^a, Beatriz Marjorie Marim^a, Amanda Hipólito^a, Marcellly Chue Gonçalves^b, Suzana Mali^a, Renata Katsuko Takayama Kobayashi^b, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, State University of Londrina, Mailbox 10.011, 86057-970, Londrina, Brazil
^b Department of Microbiology, State University of Londrina, Mailbox 10.011, 86057-970, Londrina, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Biofactant
 Green packaging
 Food packaging
 Pathogens
 Food safety
 Films

ABSTRACT

The objective of this study was to propose the development of antimicrobial packaging films based on polylactic acid and sophorolipid produced by *Sarauerella bombicola* for the control of foodborne pathogens. Films were produced by the casting method, and five formulations were prepared with different proportions of polylactic acid:sophorolipid: 100:0, 97.5:2.5, 95:5, 90:10 and 80:20. The addition of sophorolipid resulted in porous matrix films, and evident changes were observed, suggesting a chemical interaction between the biopolymer and the biofactant. The films showed good thermal stability, and the sophorolipid had a plasticizing effect, modifying the mechanical properties and improving the elasticity and flexibility. The films exhibited antimicrobial activity against the poultry pathogens *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Sophorolipid can be incorporated as a multifunctional agent in films, being used to improve thermomechanical properties and as a natural antimicrobial for the control of foodborne pathogens in the food industry.

1. Introduction

Petrochemical plastics generate major environmental problems, as they are highly resistant to degradation and release greenhouse gases, contributing to global warming and plastic pollution in landfills and waters (Royer, Ferrón, Wilson, & Kari, 2018). Packaging is the main application of plastics, highlighting their use in the food industry, which is mostly made of non-biodegradable materials (Rasyon, Othman, Basha, & Talib, 2020; Taitiele et al., 2019).

The extensive use of traditional petroleum-based plastics has taken many countries to establish restrictions and to develop alternatives (Heydari-Majid, Ghanbarzadeh, Shahidi-Noghabi, Najafi, & Hoseini, 2019). A trending strategy is to use environmentally friendly materials, such as biobased polymers, to substitute fossil-based plastics (Maniglia et al., 2019).

Polylactic acid (PLA) is a promising candidate for use in food packaging, being approved by the Food and Drug Administration and

classified as Generally Recognized as Safe (Ahmed, Hiremath, & Jacob, 2016). PLA can be obtained from renewable sources and is considered the most efficient biopolymer due to its high yield during production (Gao & Chow, 2018), in addition to presenting good mechanical properties, such as polyethylene (PE) and polyethylene terephthalate (PET) (Gao, Picot, Bilotti, & Peijs, 2017).

Traditional packaging has a passive action with food since it serves only as a barrier from the external environment (Wyrwa & Barska, 2017). Biodegradable packaging of natural biopolymers can be further enhanced with antimicrobial and other agents to create bioactive packaging, which is one of the options for reducing food deterioration (Sharma, Jafari, & Sharma, 2020). Thus, antimicrobial packaging brings new features, aiming to extend shelf life and food safety by controlling or preventing the growth of pathogenic and deteriorating microorganisms (Ahmed, Hiremath, & Jacob, 2016).

Studies have reported the incorporation of silver and zinc oxide nanoparticles, essential oils, chitosan, and plant extracts into

* Corresponding author.

E-mail addresses: vicoriakemi@hotmail.com (V.A.I. Silveira), beatrizmarjorie@gmail.com (B.M. Marim), a.hipolito@focmail.com (A. Hipólito), marcellly.chue@gmail.com (M.C. Gonçalves), smali@uel.br (S. Mali), kobayashikt@uel.br (R.K.T. Kobayashi), macelligoi@uel.br (M.A.P.C. Celligoi).

<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100591>

Received 22 May 2020; Received in revised form 27 July 2020; Accepted 19 October 2020

Available online 8 November 2020

2214-2894/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

5.1 Artigo 1: Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens

Victória Akemi Itakura Silveira¹, Beatriz Marjorie Marim¹, Amanda Hipólito¹, Marcelly Chue Gonçalves², Suzana Mali¹, Renata Katsuko Takayama Kobayashi², Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, ²Department of Microbiology, State University of Londrina, Mailbox 10.011, 86057-970, Londrina, Brazil

victoriiakemi@hotmail.com

beatrizmarjorie1@gmail.com

a.hipolito@hotmail.com

marcelly.chue@gmail.com

smali@uel.br

kobayashirkt@uel.br

macelligoi@uel.br

***Corresponding author:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Telephone: +55 4333714270

E-mail: macelligoi@uel.br

ORCID: 0000.0003.2217.8937

Abstract

The objective of this study was to propose the development of antimicrobial packaging films based on polylactic acid and sophorolipid produced by *Starmerella bombicola* for the control of foodborne pathogens. Films were produced by the casting method, and five formulations were prepared with different proportions of polylactic acid:sophorolipid: 100:0, 97.5:2.5, 95:5, 90:10 and 80:20. The addition of sophorolipid resulted in porous matrix films, and evident changes were observed, suggesting a chemical interaction between the biopolymer and the biosurfactant. The films showed good thermal stability, and the sophorolipid had a plasticizing effect, modifying the mechanical properties and improving the elasticity and flexibility. The films exhibited antimicrobial activity against the poultry pathogens *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* Sophorolipid can be incorporated as a multifunctional agent in films, being used to improve thermomechanical properties and as a natural antimicrobial for the control of foodborne pathogens in the food industry.

Keywords: biosurfactant; green packaging; food packaging; pathogens; food safety; films.

1. Introduction

Petrochemical plastics generate major environmental problems, as they are highly resistant to degradation and release greenhouse gases, contributing to global warming and plastic pollution in landfills and waters (Royer, Ferrón, Wilson & Karl, 2018). Packaging is the main application of plastics, highlighting their use in the food industry, which is mostly made of non-biodegradable materials (Taiatele et al., 2019; Risyon, Othman, Basha & Talib, 2020).

The extensive use of traditional petroleum-based plastics has taken many countries to establish restrictions and to develop alternatives (Heydari-Majda, Ghanbarzadeh, Shahidi-Noghabi, Najafi & Hosseini, 2019). A trending strategy is to use environmentally friendly materials, such as biobased polymers, to substitute fossil-based plastics (Maniglia et al., 2019).

Polylactic acid (PLA) is a promising candidate for use in food packaging, being approved by the Food and Drug Administration and classified as Generally Recognized as Safe (Ahmed, Hiremath & Jacob, 2016a). PLA can be obtained from renewable sources and is considered the most efficient biopolymer due to its high yield during production (Gan & Chow, 2018), in addition to presenting good mechanical properties, such as polyethylene (PE) and polyethylene terephthalate (PET) (Gao, Picot, Bilotti & Peijs, 2017).

Traditional packaging has a passive action with food since it serves only as a barrier from the external environment (Wyrwa & Barska, 2017). Biodegradable packaging of natural biopolymers can be further enhanced with antimicrobial and other agents to create bioactive packaging, which is one of the options for reducing food deterioration (Sharma, Jafari & Sharma, 2020). Thus, antimicrobial packaging brings new features, aiming to extend shelf life and food safety by controlling or preventing the growth of pathogenic and deteriorating microorganisms (Ahmed, Hiremath & Jacob, 2016b).

Studies have reported the incorporation of silver and zinc oxide nanoparticles, essential oils, chitosan, and plant extracts into biopolymer matrices for application in the food packaging industry (chicken, fish, oysters, pork, shrimp and sausages), which have been effective against *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus* and *Escherichia coli* (Mathew, Snigdha, Mathew & Radhakrishnan, 2019; Kanatt, 2020; Miao, Walton, Wang, Li & Wang, 2019; Cheng et al., 2019; Turalija, Bischof, Budimir & Gaan, 2016; Ejaz, Arfat, Mulla & Ahmed, 2018).

A natural antimicrobial compound is sophorolipid. It is mainly produced by *Starmerella bombicola* and belongs to the glycolipid class, being composed of a disaccharide sophorose linked to a hydroxy fatty acid fraction (Ashby & Solaiman, 2014). Sophorolipid has

been recognized as a biocompatible and low toxic molecule with great potential to be explored in the food industry (Develter & Lauryssen, 2010; Sharma, 2016).

Some researches demonstrated its applicability as modulator in taste-sensory properties (Ozdener et al., 2019), food emulsifier (Gaur et al., 2019; Silva et al., 2020), and as preservative and antibacterial agent against several pathogens, including the main foodborne bacteria *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E. coli O157:H7*, *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* (Dengle-Pulate, Joshi, Bhagwat & Prabhune, 2014; Olanya et al., 2017; Silveira et al., 2019; Zhang, Ashby, Solaiman, Uknalis & Fan, 2016; Chen, Lü, An, Ji & Liu, 2020).

Ashby, Zerkowski, Solaiman & Liu (2011) reported that polyhydroxybutyrate (PHB), pectin and alginate films containing sophorolipid had antibacterial action against *Propionibacterium acnes*, a causative acne bacterium. Other studies also demonstrated that sophorolipid can act as a plasticizer, enhancing the thermomechanical properties of PHB (Ashby & Solaiman, 2014), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and PLA films (Solaiman, Ashby, Zerkowski, Krishnama & Vasanthan, 2015).

There are few reports about sophorolipid incorporation into polymer matrices, especially directed towards food packaging applications. Characteristics such as nontoxic nature, biocompatibility, biodegradability and excellent antimicrobial activity (Zhang, Ashby, Solaiman, Uknalis & Fan, 2016) make sophorolipid a biomolecule with great potential for application in antimicrobial packaging, especially for highly perishable foods, such as chicken meat.

Chicken meat is easily affected by microbial spoilage and is highly associated with foodborne diseases. Bacteria such as *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are the main associated pathogens (Ahmed et al., 2018). Many attempts have been made to control these bacteria, drawing attention to the development of active antimicrobial food packaging, which not only provides food safety but also enhances the quality and shelf life of poultry products (Khan, Sadiq & Mehmood, 2020).

The objective of this study was to develop renewable and antimicrobial films combining PLA with sophorolipid to present a perspective in food packaging for the poultry industry, exploring both functional applications of antimicrobial and plasticizer/modifier properties.

2. Material and methods

2.1 Material and microorganisms

Polylactic acid (Ingeo™ Biopolymer 4043D) was obtained from NatureWorks, and chloroform was purchased from Synth (Labsynth, São Paulo, Brazil). *Starmerella bombicola* (ATCC® 22214™) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) and used for sophorolipid production. For the antimicrobial test, the poultry meat isolates *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* were obtained from a local poultry industry.

2.2 Methods

2.2.1 Sophorolipid production

The production of sophorolipid was carried out by *S. bombicola* in a bioreactor using glucose and oleic acid as substrates, based on the conditions described by Silveira et al. (2019). Sophorolipid was obtained by solvent extraction with ethyl acetate according to the protocol reported by Minucelli et al. (2016) and had been previously chemically characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), high-performance liquid chromatography (HPLC) and thin-layer chromatography (TLC), and the structural characterization analyses confirmed the predominance of the lactonic C18:1 diacetylated form (Silveira et al., 2019).

2.2.2 Preparation of polylactic acid-sophorolipid films

The filmogenic solutions were produced by the casting method from polylactic acid (PLA 4043 D) dissolved in chloroform. For each film, a fixed concentration of 4 % (w/w) of solids (PLA + sophorolipid) was used. Five formulations were prepared with different proportions of PLA:sophorolipid: 100:0, 97.5:2.5, 95:5, 90:10 and 80:20, labelled PLA, PLA-SL2.5 (3.9 g PLA + 0.1 g sophorolipid), PLA-SL-5 (3.8 g PLA + 0.2 g sophorolipid), PLA-SL10 (3.6 g PLA + 0.4 g sophorolipid), and PLA-SL20 (3.2 g PLA + 0.8 g sophorolipid), respectively. The solutions were prepared under constant stirring at room temperature for 6 h. After complete homogenization, 40 g of the prepared formulations were poured onto glass plates (13.5 cm in diameter) and then allowed to dry for approximately 24 h at room temperature. The dried films were stored at 58% relative humidity and 25 °C until use.

2.2.3 Film characterization and antimicrobial activity

2.2.3.1 Thickness

A Mitutoyo manual micrometer (São Paulo, Brazil) was used to determine the thickness of the films at 10 different positions with an accuracy of $\pm 1 \mu\text{m}$. The mean standard deviation within the film was approximately 5% of the average thickness.

2.2.3.2 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM analyses were conducted to observe the surface morphology of films utilizing a JEOL JSPM 100 electron microscope (Japan) at an accelerating voltage of 20 kV. Film samples and sophorolipid were mounted on bronze stubs using double-sided tape and then coated with a layer of gold (40-50 nm), allowing surface and cross-section visualization.

2.2.3.3 Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy

Film samples were cut, mixed with potassium bromide (KBr) and compressed into tablets. The FTIR measurements were obtained using a Shimadzu-8400 FTIR instrument (Japan). Measurements were performed in triplicate, and 100 scans were run in the spectral range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$. The spectral resolution was 4 cm^{-1} .

2.2.3.4 Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC analyses were run with the utilization of a Shimadzu DSC-60 calorimeter (Japan). Approximately 3.0 mg of samples were placed in platinum containers. The sophorolipid and film samples started at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and $0 \text{ }^\circ\text{C}$ and heated to $250 \text{ }^\circ\text{C}$ and $100 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively, at a heating rate of $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. The DSC calibration was performed with indium. The samples were subjected to two scans, and the glass transition temperature (T_g) was calculated as the inflection point of the baseline.

2.2.3.5 Solubility

Film solubility was measured as the percentage of dry matter of the film solubilized in water during a period of 24 h according to Gontard, Guilbert and Cuq (1992). Tests were performed in triplicate.

2.2.3.6 Water vapor permeability (WVP)

Tests were performed in triplicate, according to the ASTM method E96 (ASTM, 2000). Film samples were sealed in a permeation cell (0.00181 m²) at 25 °C in a desiccator. To keep a 75 % relative humidity (RH) gradient across the film, anhydrous calcium chloride was added to each cell (0 % RH), and a saturated sodium chloride solution was placed in the desiccator (75 % RH). The permeation cell was weighed every 2 h for 24 h, and the water vapor transport was quantified from the weight gain of the permeation cell. Changes in the weight of the cell were registered and plotted as a function of time. Linear regression was used to determine the slope of the straight line (g/s), which was divided by the transfer area (m²) to calculate the water vapor transmission rate (WVTR). The thickness of the films was measured, and the WVP (g Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹) was determined as $WVP = [WVTR/S (R_1 - R_2)]d$, where S is the saturation vapor pressure of water (Pa) at 25 °C, R₁ is the RH inside the desiccator, R₂ is the RH in the permeation cell, and d is the film thickness (m). The driving force [S (R₁ - R₂)] was 1753.55 Pa. under these conditions.

2.2.3.7 Mechanical properties

The parameters tensile strength (MPa) and elongation (%) were determined using an Instron 1141 (Instron Ltd., Canton – USA), according to ASTM D-882-91 (ASTM, 2002). Five sample strips (25×100 mm) of each formulation were clamped between pneumatic grips. The force (N) and deformation (mm) were recorded during extension at 50 mm min⁻¹ with an initial distance between the grips of 50 mm.

2.2.3.8 Antimicrobial activity of films

The antimicrobial activity of the PLA-sophorolipid films was evaluated against the poultry meat isolates *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *Salmonella spp.*

Strains were first grown in Mueller Hinton (MH) agar for 24 h at 37°C. Using a 0.5 McFarland scale, bacteria were adjusted to 10⁸ CFU/mL (0.9% NaCl). Films were cut into

discs using a hole puncher, and both sides were sterilized using UV light for 15 min. The antimicrobial activity of the films was assessed by a liquid culture test. First, 10 μL (10^6) of the bacterial suspensions were added to the discs and allowed to dry naturally on the surface of the films, which was around 30 min. Then, the discs were placed in microtubes with 1 mL of MH broth, vortex agitated for 1 min, followed by serial dilution with buffered peptone water and plated onto nutrient agar. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and the colony forming units (CFU) were counted. The test was performed in triplicate, and PLA film served as a control.

2.2.4 Statistical analysis

Tukey's test ($p \leq 0.05$) was employed for mean comparison and performed using STATISTICA 13.5 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, USA)

3. Results and discussion

3.1 Thickness and scanning electron microscopy (SEM)

The produced PLA-sophorolipid films are shown in Fig. 1. The incorporation of sophorolipid did not affect the appearance of the films, which can be related with the good dispersion of sophorolipid into PLA matrix. Arrieta, López, Ferrándiz and Peltzer (2013) produced PLA-limonene blends for food packaging and they also observed that limonene addition (15 and 20 % w/w) did not influenced the transparency of films. Qin, Yang and Xue (2015) reported that the appearance and transparency is one of the most important food packaging requirements for consumers. Therefore, sophorolipid has no effect on the appearance of PLA films, even at the highest concentration tested.



Fig. 1 Visual aspect of the poly(lactic acid)-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.

The addition of sophorolipid did not increase the thickness, and the films did not present a statistically significant difference ($p > 0.05$) (Table 1). The incorporation of sophorolipid in the PLA matrix was evident in the SEM micrographs (Fig. 2). The PLA film presented a homogeneous nonporous surface structure without bubbles or aggregates, indicating the PLA property of forming smooth surface films.

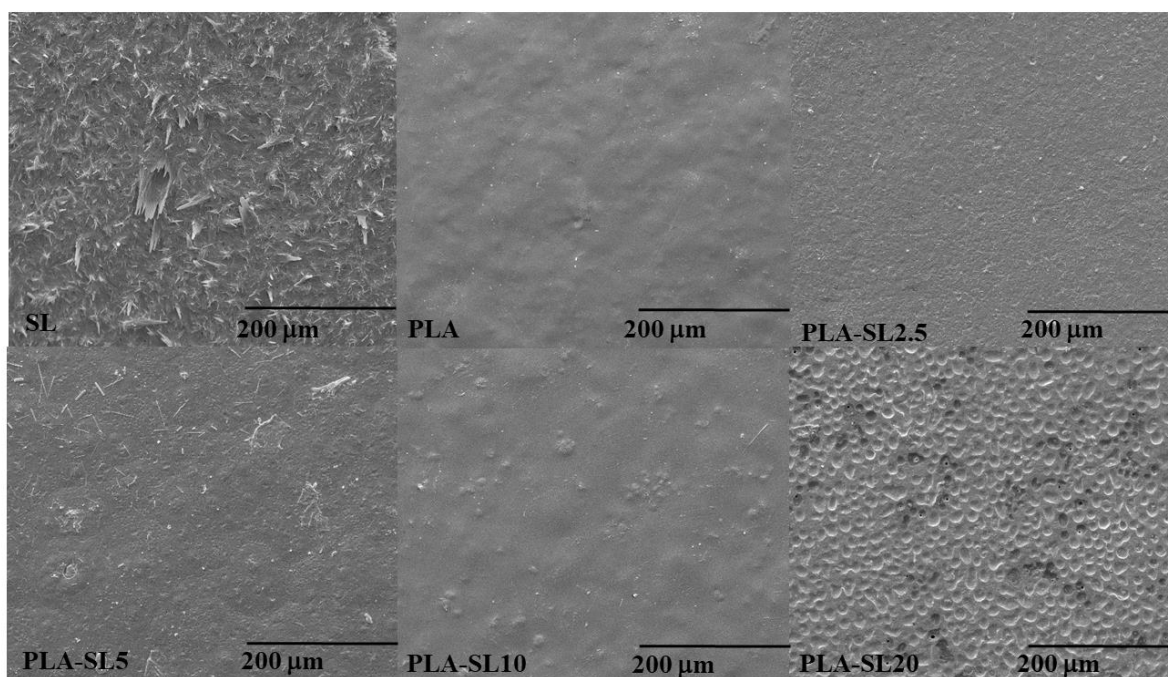


Fig. 2 SEM micrographs of sophorolipid (SL) and poly(lactic acid)-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20.

The addition of sophorolipid formed films with a rougher and more porous matrix, which was more visible as the concentration of sophorolipid increased. These results are similar to those reported by Ashby and Solaiman (2014), who observed that the introduction of sophorolipid in the PHA polymer resulted in a dimpled and porous surface morphology. A possible explanation for this porous formation is the solvent-cast method employed to produce the films. During the evaporation of chloroform, sophorolipid might create a thin layer in the PLA matrix, which decelerates the solvent evaporation rate and induces the formation of pores (Ahmed, Mulla & Arfat, 2016). Therefore, the development of a porous matrix with the incorporation of sophorolipid is attributed to phase separation between the solvent and the components of the films (Ashby & Solaiman, 2014).

Table 1. Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP) and mechanical properties of polylactic acid-sophorolipid films.

Formulations	Thickness (μm)	Solubility (%)	WVP $\times 10^{11}$ ($\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$)	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)
PLA	126 \pm 21 ^a	1.62 \pm 0.57 ^c	3.31 \pm 0.03 ^a	34.23 \pm 3.25 ^a	3.55 \pm 0.46 ^c
PLA-SL2.5	127 \pm 25 ^a	2.33 \pm 0.16 ^{bc}	4.26 \pm 0.55 ^a	28.51 \pm 2.93 ^{ab}	11.71 \pm 0.31 ^{ab}
PLA-SL5	124 \pm 28 ^a	2.47 \pm 0.60 ^{bc}	4.14 \pm 0.63 ^a	26.71 \pm 4.58 ^{ab}	9.03 \pm 2.61 ^b
PLA-SL10	126 \pm 14 ^a	3.25 \pm 0.06 ^{ab}	4.85 \pm 0.01 ^a	26.53 \pm 5.39 ^{ab}	14.46 \pm 2.03 ^a
PLA-SL20	129 \pm 1 ^a	4.58 \pm 0.68 ^a	4.99 \pm 0.01 ^a	19.21 \pm 1.41 ^b	1.29 \pm 0.06 ^c

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

3.2 Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy

The FT-IR spectra of the sophorolipid and PLA-sophorolipid films are presented in Fig. 3. All film samples exhibited a strong band proximate to 3419 cm^{-1} , ascribed to the stretching vibration of $-\text{O}-\text{H}$ groups presented in all compounds (Ahmed et al., 2019; Bersaneti, Mantovan, Magri, Mali & Celligoi, 2016; Wang, Rhim & Hong, 2016). Aliphatic hydrogens were also detected at 2928 and 2854 cm^{-1} (Minucelli et al., 2016). The PLA film presented expected characteristic bands at approximately 2854 and 1750 cm^{-1} , assigned to the stretching vibrations of the $-\text{CH}_3$ and $-\text{C}=\text{O}$ of the ester group, respectively (Al-Itry, Lamnawar, & Maazouz, 2012; Ahmed, Mulla & Arfat, 2016). The bands at approximately 1452 cm^{-1} and 1385 cm^{-1} are associated with the asymmetric and symmetric deformation of CH_3 of PLA, respectively. The bands observed at 867 and 752 cm^{-1} are attributed to the amorphous and crystalline phases of PLA, respectively (Ahmed et al., 2018; Al-Itry, Lamnawar & Maazouz, 2012).

The addition of sophorolipid showed visible changes in the FT-IR spectra of the films compared to the PLA film, presenting addition bands, which suggests a chemical interaction between the biopolymer and the biosurfactant. Sophorolipid presented a strong and large band proximate to the wavenumber 3419 cm^{-1} , which is attributed to the presence of hydroxyls. This band is more intense in the sophorolipid spectra compared to the films, suggesting that the number of free hydroxyls is decreased, which may be related to the participation of this group in hydrogen bonds between the biopolymer and the biosurfactant (Solaiman, Ashby, Zerkowski, Krishnama & Vasanthan, 2015). Additionally, an important band appears at approximately 1750 cm^{-1} , ascribed to the lactone carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$), present in the sophorolipid molecule (Minucelli et al., 2016).

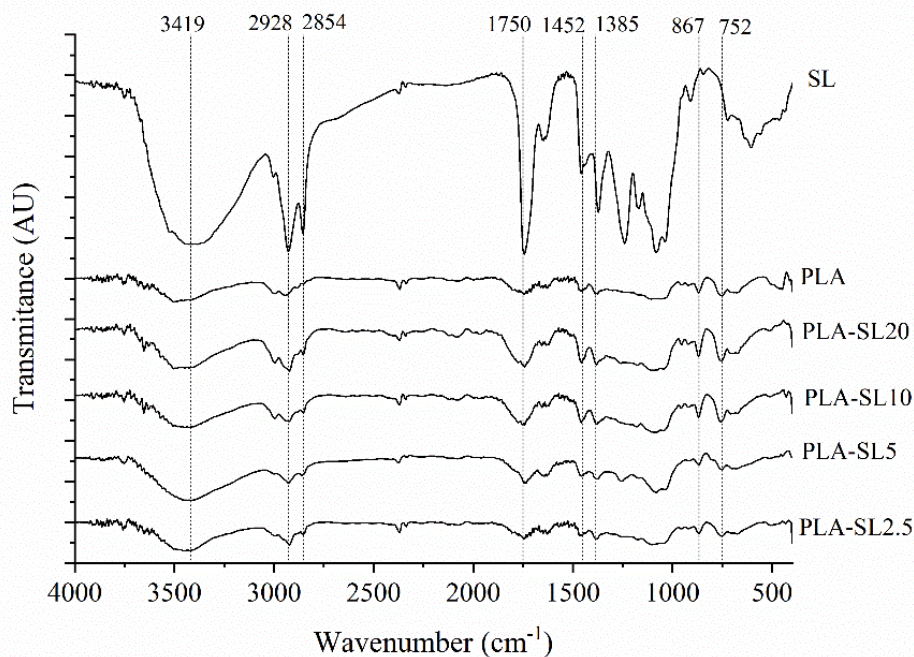


Fig. 3 FT-IR spectra of sophorolipid (SL) and poly(lactic acid)-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20

3.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermograms of sophorolipid and PLA-sophorolipid films are presented in Fig. 4. An endothermic peak was observed between 125-150 °C, which can be related to the melting point of the sophorolipid; Zini, Gazzano, Scandola, Wallner and Gross (2008) observed an endothermic peak at 123 °C, which was attributed to the melting of sophorolipids, while Peng et al. (2014) reported a melting temperature at 134 °C. Both analyses were conducted with lactonic sophorolipids, as well as in our study, although they employed a ring opening polymerization method to obtain poly(sophorolipid), which might explain the slight difference in the melting point. A second endothermic event at 230-240 °C can be observed for sophorolipid, and it can be attributed to its thermal degradation.

It is important to observe that these films were stable at a temperature range between 0 and 100 °C, showing no degradation observed by DSC, which is a good indication of their thermal stability. The PLA-SL2.5 and PLA-SL5 films presented small peaks at approximately 95 °C, which can be attributed to water evaporation. Solaiman, Ashby, Zerkowski, Krishnama and Vasanthan (2015) produced PLA films with sophorolipids and reported that the melting temperatures of these films were approximately 169-173 °C, and they also did not report any endothermic or exothermic effects below this temperature.

The glass transition temperature (T_g) values of the film samples are indicated in Fig. 4. The T_g of the PLA film was 40.1 °C, a very close value to the observed by Rhim, Mohanty, Singh and Ng (2006), who reported a T_g of 37.6 °C for PLA film prepared by solvent casting method, however these authors reported that PLA film prepared by thermocompression presented a T_g of 62.5 °C, which possibly can be attributed to the plasticizing effect of the solvent retained in the films prepared by solvent casting, resulting in lower T_g values. Asadi and Pirsá (2020) observed T_g values between 25-30 °C for films prepared by solvent casting, while Byun, Kim and Whiteside (2010) reported T_g values of 51-66 °C for films prepared by extrusion.

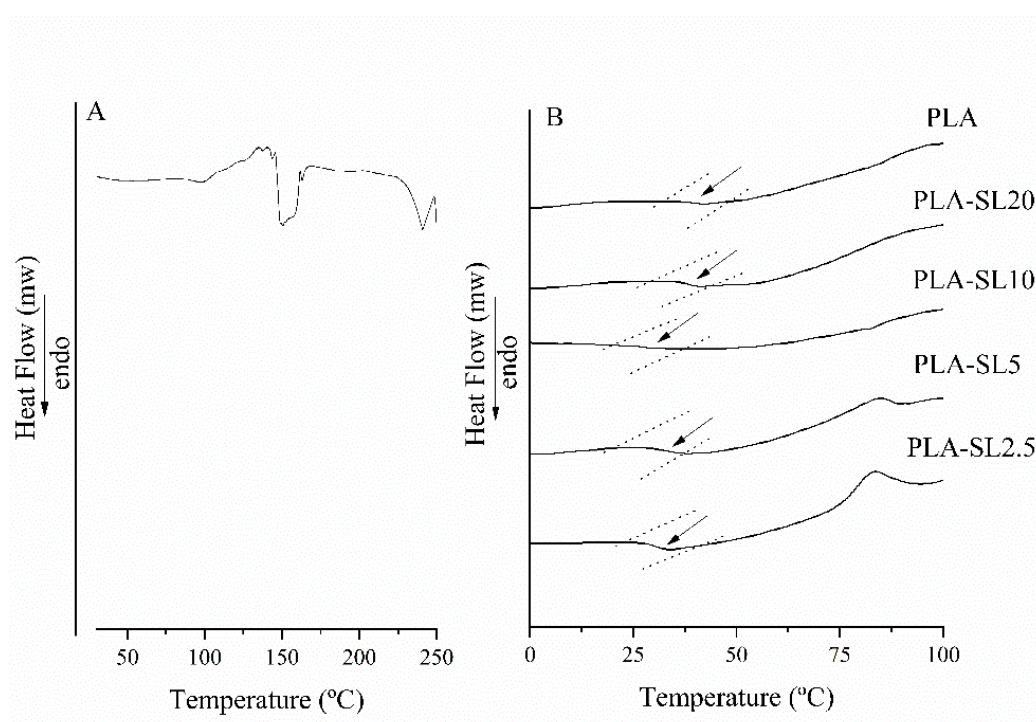


Fig. 4 DSC thermogram of sophorolipid (A) and poly(lactic acid)-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20

The T_g values of PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20 films were 30.2, 30.8, 28.5 and 37.5 °C, respectively, and all films with sophorolipid addition presented lower T_g values than the PLA film. According to Shirai et al. (2013), when amorphous and semicrystalline materials are submitted to temperatures below their T_g , they are in the glassy state, and above their T_g , the materials are in the elastomeric state, which is a state with increased chain mobility. Solaiman, Ashby, Zerkowski, Krishnama and Vasanthan (2015) reported that the addition of sophorolipid to PLA films seems to disrupt the intramolecular

forces between the polymer chains, acting as plasticizers, which can explain the decrease in T_g with its addition observed in this study.

3.4 Solubility and water vapor permeability (WVP)

The results of solubility and water vapor permeability of the films are shown in Table 1. The solubility increased with increasing concentrations of sophorolipid. Additionally, WVP values did not present statistically significant differences with increasing concentrations of sophorolipid ($P > 0.05$).

A study conducted by Ziembra et al. (2019) showed that the incorporation of lactonic sophorolipid into PLA electrospun fibers altered the hydrophobicity, imparting a more hydrophilic character to the material, possibly due to its sugar hydrophilic moiety, which might also explain this increase in solubility.

According to Solaiman, Ashby, Zerkowski, Krishnama & Vasanthan (2015), sophorolipid can also act as a plasticizer in film formulations. Therefore, its incorporation could affect the cohesive forces of polymer interactions, enhancing the free spaces in the network and thus favoring the penetration of water, which could result in higher solubility (Merci, Marim, Urbano & Mali, 2019).

Depending on the application of the film, an increase in solubility could be interesting. For example, for antimicrobial food packaging, an increase in solubility could result in a better release of the antimicrobial compound in the food surface, enhancing the protective effect against pathogens (Turalija, Bischof, Budimir & Gaan, 2016). Solaiman, Ashby, Zerkowski, Krishnama and Vasanthan (2015) compared the incorporation of sophorolipids into three different polymeric matrices, PLA, PCL and PHB, and they reported that PLA is the best matrix because it provides the high-level release of sophorolipid in aqueous solution compared to the other matrices.

3.5 Mechanical properties

The mechanical properties of the films are presented in Table 1. It can be observed that the tensile strength decreased with increasing concentration of sophorolipid, while the elongation had the inverse relationship under the same conditions. This might indicate that sophorolipid had a plasticizing effect on the films, increasing the polymer chain mobility, which resulted in the weakening of the polymeric matrix.

Plasticizers interfere in the polymer matrix by filling the volume of empty spaces, therefore causing a decrease in the intermolecular forces in the biopolymer (Arfat, Benjakul, Prodpran, Sumpavapol & Songtipya, 2014). It has been reported that the addition of lipid compounds into polymer matrices may interfere with polymer interactions, imparting a more heterogeneous and flexible film matrix (Ahmed, Mulla & Arfat, 2016). Another possible explanation could be because of the intensification of pores in the polymer matrix due to the incorporation of sophorolipid, as evidenced in the SEM micrographs (Ashby & Solaiman, 2014).

Regarding elongation, the addition of sophorolipid resulted in an increase for all formulations, except for the maximum amount of sophorolipid. This might indicate that adequate concentrations of sophorolipid led to an improvement in the mechanical properties of PLA films, although additional augmentation did not result in the same effect anymore. Similar performances were observed in films based on PHA with sophorolipid and PLA with cinnamaldehyde (Ashby & Solaiman, 2014; Qin, Yang & Xue, 2015).

Therefore, these results indicate that sophorolipid acted as a plasticizer and modified the mechanical properties of PLA films by reducing the tensile strength and stiffness while also helping to improve the elasticity and flexibility due to the increased resistance to deformations before rupture.

3.6 Antimicrobial activity

The results of the antimicrobial activity of PLA-sophorolipid films are shown in Fig. 5. As expected, the PLA film did not exhibit any antimicrobial effect against the tested bacteria. However, as the concentration of sophorolipid increased, an increase in the bactericidal action was also observed.

L. monocytogenes and *S. aureus* were completely inhibited with PLA-SL10 film, representing a sensitivity of more than >4 log reduction and >2 log reduction, respectively. Regarding *Salmonella spp.*, no bactericidal action was observed under the maximum concentration of sophorolipid, although it was possible to observe a significant bacterial population reduction of 50 %.

The antimicrobial activity of sophorolipid is attributed to its ability to cause changes in the permeability of the cell wall and membrane of the bacteria, which may result in lysis and release of the intracellular contents, followed by cell death (Dengle-Pulate, Chandorkar, Bhagwat & Prabhune, 2013; Silveira, Queiroz & Celligoi, 2018). This disruption of bacterial

cells may be related to surfactant interactions between the sophorose moiety and the fatty acid chain (Chen, Lü, An, Ji, & Liu, 2019).

Salmonella spp. was less sensitive in the presence of sophorolipid than *L. monocytogenes* and *S. aureus*. Usually, sophorolipid is more effective against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria due to the differences in the cell wall structure of each type. As the mechanism of action of sophorolipid is towards membrane cell damage, the presence of two membranes in Gram-negative organisms may hinder its action, which might explain the results obtained in this study (Silveira et al., 2019).

Additionally, it has been reported that lactonic forms of sophorolipid possess stronger antimicrobial action than acidic forms (Van Bogaert et al., 2007). In this study, the produced sophorolipid was characterized as a mainly lactonic C18:1 diacetylated form (Silveira et al., 2019). Therefore, directing the production of sophorolipid for specific structures could be interesting, because these will directly reflect in its properties and applications (Ozdener et al., 2019).

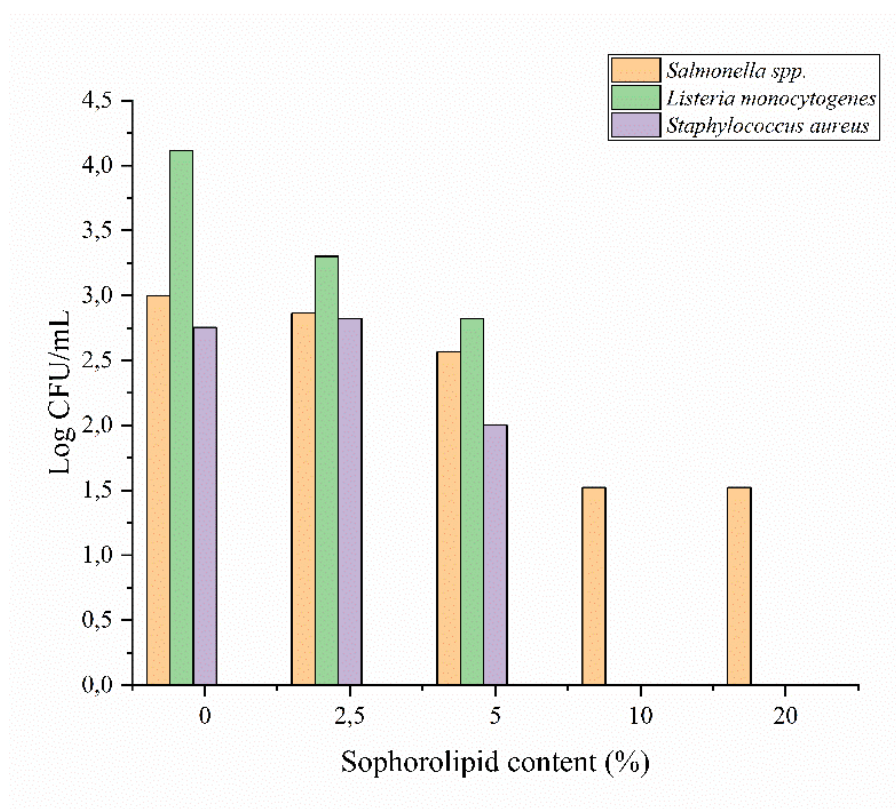


Fig. 5 Antimicrobial activity of poly(lactic acid)-sophorolipid films PLA, PLA-SL2.5, PLA-SL5, PLA-SL10 and PLA-SL20

4. Conclusions

The incorporation of sophorolipid into the PLA matrix significantly changed the thermomechanical properties of the films. FTIR analysis showed the chemical interaction between the sophorolipid and PLA structure, confirmed by the observation of additional peaks in the spectra of the produced films. Sophorolipid acted as a plasticizer agent, modifying the mechanical properties of the films, such as reducing tensile strength and stiffness and increasing hydrophilicity and flexibility. This could contribute to the application of the film as an antimicrobial packaging, since this change could impart a better release of the antimicrobial compound to the food matrix. The PLA-sophorolipid films exhibited antimicrobial activity against all the tested poultry isolate pathogens, being more effective against *L. monocytogenes* and *S. aureus* than *Salmonella spp.* In this study, we demonstrated that sophorolipid can be utilized as a multifunctional compound, being used to improve the thermomechanical properties of biopolymers and as an effective natural antimicrobial agent, with enormous potential in the food packaging industry for the control of foodborne pathogens.

Declarations of interest: none

Acknowledgements

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The authors wish to thank the Laboratory of Spectroscopy (ESPEC) and Laboratory of X-Ray Analysis (LARX) of the State University of Londrina for the analyses.

References

- Ahmed, J., Hiremath, N., & Jacob, H. (2016a). Antimicrobial efficacies of essential oils/nanoparticles incorporated polylactide films against *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* on contaminated cheese. *International Journal of Food Properties*, 20, 53-67. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1131165>
- Ahmed, J., Hiremath, N., & Jacob, H. (2016b). Efficacy of antimicrobial properties of polylactide/cinnamon oil film with and without high-pressure treatment against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* inoculated in chicken sample. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.10.003>
- Ahmed, J., Mulla, M. Z., & Arfat, Y. A. (2016). Thermo-mechanical, structural characterization and antibacterial performance of solvent casted polylactide/cinnamon oil composite films. *Food Control*, 69, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.013>
- Ahmed, J., Mulla, M., Arfat, Y. A., Bher, A., Jacob, H., & Auras, R. (2018). Compression molded LLDPE films loaded with bimetallic (Ag-Cu) nanoparticles and cinnamon essential oil for chicken meat packaging applications. *LWT- Food Science and Technology*, 93, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.051>
- Ahmed, J., Mulla, M., Jacob, H., Luciano, G., Bini, T.B., & Almusallam, A. (2019). Polylactide/poly(ϵ -caprolactone)/zinc oxide/clove essential oil composite antimicrobial films for scrambled egg packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100355. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100355>
- Al-Itry, R., Lamnawar, K., & Maazouz, A. (2012). Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1898–1914. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.06.028>
- Arfat, Y. A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., & Songtipya, P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil

- leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 41, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.023>
- Arrieta, M. P., López, J., Ferrándiz, S., & Peltzer, M. A. (2013). Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. *Polymer Testing*, 32, 760–768. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2013.03.016>
- Asadi, S., & Pirsa, S. (2020). Production of biodegradable film based on polylactic acid, modified with lycopene pigment and TiO₂ and studying its physicochemical properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 433–444. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01618-5>
- Ashby, R. D., & Solaiman, D. K. Y. (2014). Sophorolipid-induced dimpling and increased porosity in solvent-cast short-chain polyhydroxyalkanoate films: Impact on thermomechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 40609. <https://doi.org/10.1002/app.40609>
- Ashby, R. D., Zerkowski, J. A., Solaiman, D. K. Y., & Liu, L. S. (2011). Biopolymer scaffolds for use in delivering antimicrobial sophorolipids to the acne-causing bacterium *Propionibacterium acnes*. *New Biotechnology*, 28, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.08.001>
- Bersaneti, G. T., Mantovan, J., Magri, A., Mali, S., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Carbohydrate Polymers*, 151, 1132–1138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.081>
- Byun, Y., Kim, Y.T., & Whiteside, S. (2010). Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder, *Journal of Food Engineering*, 100, 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.005>
- Chen, J., Lü, Z., An, Z., Ji, P., & Liu, X. (2019). Antibacterial activities of sophorolipids and nisin and their combination against foodborne pathogen *Staphylococcus aureus*.

European Journal of Lipid Science and Technology, 1900333. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900333>

Chen, J., Lü, Z., An, Z., Ji, P., & Liu, X. (2020). Antibacterial activities of sophorolipids and nisin and their combination against foodborne pathogen *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 1900333. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900333>

Cheng, J., Wang, H., Kang, S., Xia, L., Jiang, S., Chen, M., & Jiang, S. (2019). An active packaging film based on yam starch with eugenol and its application for pork preservation. *Food Hydrocolloids*, 96, 546-554. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.007>

Dengle-Pulate, V., Chandorkar, P., Bhagwat, S., & Prabhune, A.A. (2013). Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17, 543–552. <https://doi.org/10.1007/s11743-013-1495-8>

Dengle-Pulate, V., Joshi, J., Bhagwat, S. & Prabhune, A. (2014). Application of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol as a germicide and fruit-vegetable wash. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 1630-1643.

Develter, D. W. G., & Laurysen, L. M. L. (2010). Properties and industrial applications of sophorolipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 628–638. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900153>

Ejaz, M., Arfat, Y. A., Mulla, M., & Ahmed, J. (2018). Zinc oxide nanorods/clove essential oil incorporated Type B gelatin composite films and its applicability for shrimp packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 15, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.12.004>

Gan, I., & Chow, W. S. (2018). Antimicrobial poly(lactic acid)/cellulose bionanocomposite for food packaging application: A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.012>

- Gao, Y., Picot, O. T., Bilotti, E., & Peijs, T. (2017). Influence of filler size on the properties of poly(lactic acid) (PLA)/graphene nanoplatelet (GNP) nanocomposites. *European Polymer Journal*, 86, 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.10.045>
- Gaur, V. K., Regar, R. K., Dhiman, N., Gautam, K., Srivastava, J. K., Patnaik, S., Kamthan, M., Manickam, N. (2019). Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida spp.*: Application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresource Technology*, 121314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121314>
- Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M., Najafi, M. A., & Hosseini, M. (2019). A new active nanocomposite film based on PLA/ZnO nanoparticle/essential oils for the preservation of refrigerated *Otolithes ruber* fillets. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.002>
- Kanatt, S. R. (2020). Development of active/intelligent food packaging film containing *Amaranthus* leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100506. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100506>
- Khan, M. R., Sadiq, M. B., & Mehmood, Z. (2020). Development of edible gelatin composite films enriched with polyphenol loaded nanoemulsions as chicken meat packaging material, *CyTA - Journal of Food*, 18, 137-146. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1720826>
- Maniglia, B. C., Laroque, D. A., de Andrade, L. M., Carciofi, B. A. M., Tenório, J. A. S., & de Andrade, C. J. (2019). Production of active cassava starch films; effect of adding a biosurfactant or synthetic surfactant. *Reactive and Functional Polymers*, 104368. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104368>
- Mathew, S., Snigdha, S., Mathew, J., & Radhakrishnan, E.K. (2019). Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.009>

- Merci, A., Marim, R. G., Urbano, A., & Mali, S. (2019). Films based on cassava starch reinforced with soybean hulls or microcrystalline cellulose from soybean hulls. *Food Packaging and Shelf Life*, 20, 100321. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100321>
- Miao, L., Walton, W. C., Wang, L., Li, L., & Wang, Y. (2019). Characterization of polylactic acids-polyhydroxybutyrate based packaging film with fennel oil, and its application on oysters. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100388. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100388>
- Minucelli, T., Ribeiro-Viana, R. M., Borsato, D., Andrade, G., Cely, M. V. T., de Oliveira, M. R., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*, 8, 743–753. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9592-3>
- Olanya, O. M., Ukuku, D. O., Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Niemira, B. A., & Mukhopadhyay, S. (2017). Reduction in *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro* and on tomato by sophorolipid and sanitiser as affected by temperature and storage time. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 1303–1315. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13711>
- Ozdener, M. H., Ashby, R. D., Jyotaki, M., Elkaddi, N., Spielman, A. I., Bachmanov, A. A., & Solaiman, D. K. Y. (2019). Sophorolipid biosurfactants activate taste receptor type 1 member 3-mediated taste responses and block responses to bitter taste *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22, 441–449. <https://doi.org/10.1002/jsde.12246>
- Peng, Y., Munoz-Pinto, D. J., Chen, M., Decatur, J., Hahn, M., & Gross, R. A. (2014). Poly(sophorolipid) structural variation: effects on biomaterial physical and biological properties. *Biomacromolecules*, 15, 4214–4227. <https://doi.org/10.1021/bm501255j>

- Qin, Y., Yang, J., & Xue, J. (2015). Characterization of antimicrobial poly(lactic acid)/poly(trimethylene carbonate) films with cinnamaldehyde. *Journal of Materials Science*, 50, 1150–1158. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8671-8>
- Rhim, J.-W., Mohanty, A. K., Singh, S. P., & Ng, P. K. W. (2006). Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: Thermocompression versus solvent casting. *Journal of Applied Polymer Science*, 101, 3736–3742. <https://doi.org/10.1002/app.23403>
- Risyon, N. P., Othman, S. H., Basha, R. K., & Talib, R. A. (2020). Characterization of polylactic acid/halloysite nanotubes bionanocomposite films for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 23, 100450. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100450>
- Royer, S. J., Ferrón, S., Wilson, S. T., & Karl, D. M. (2018). Production of methane and ethylene from plastic in the environment. *PLoS One*, 13, e0200574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200574>.
- Sharma, D. (2016). *Biosurfactants in Food* (1st ed.). Springer International Publishing.
- Sharma, R., Jafari, S. M., & Sharma, S. (2020). Antimicrobial bio-nanocomposites and their potential applications in food packaging. *Food Control*, 107086. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107086>
- Shirai, M. A., Olivato, J.B., Garcia, P. S., Müller, C. M. O., Grossmann, M. V. E., & Yamashita, F. (2013). Thermoplastic starch/polyester films: effects of extrusion process and poly (lactic acid) addition. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 4112-4117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.054>
- Silva, I.A., Veras, B.O., Ribeiro, B.G., Aguiar, J.S., Campos Guerra, J.M., Luna, J.M., & Sarubbo, L.A. (2020). Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. *PeerJ*, 8, e9064. <https://doi.org/10.7717/peerj.9064>

- Silveira, V. A. I., Nishio, E. K., Freitas, C. A. U. Q., Amador, I. R., Kobayashi, R. K.T., Caretta, T., Macedo, F., & Celligoi, M. A. P. C. (2019). Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101287. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101287>
- Silveira, V.A.I., Queiroz, C.A.U., & Celligoi, M.A.P.C. (2018). Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: a promising alternative to conventional drugs. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 6, 87-90. <https://doi.org/10.7324/jabb.2018.60614>.
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Zerkowski, J. A., Krishnama, A., & Vasanthan, N. (2015). Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.006>
- Taiatele, I., Dal Bosco, T.C., Faria-Tischer, P.C.S, Bilck, A.P., Yamashita, F., Bertozzi, J., Michels, R.N., & Mali, S. (2019). Abiotic hydrolysis and compostability of blends based on cassava starch and biodegradable polymers. *Journal of Polymers and the Environment*, 27, 2577–2587. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01541-9>
- Turalija, M., Bischof, S., Budimir, A., & Gaan, S. (2016). Antimicrobial PLA films from environment friendly additives. *Composites Part B: Engineering*, 102, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2016.07.017>
- Van Bogaert, I.N.A., Saelens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., & Vandamme, E.J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 23–34. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0988-7>. Van
- Wang, L.F., Rhim, J.W., & Hong, S.I. (2016). Preparation of poly(lactide)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.062>

- Wyrwa, J. & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market: active packaging. *European Food Research and Technology*, 243, 1681-1692.
<https://doi.org/10.1007/s00217-017-2878-2>
- Zhang, X, Ashby, R, Solaiman, D.K.Y., Uknalis, J., & Fan, X. (2016). Inactivation of *Salmonella spp.* and *Listeria spp.* by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02076>
- Ziemba, A. M., Lane, K. P., Balouch, B., D’Amato, A., Totsingan, F., Gross, R. A., & Gilbert, R. J. (2019). Lactonic sophorolipid increases surface wettability of poly-L-lactic acid electrospun fibers. *ACS Applied Bio Materials*, 2, 3153-3158. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00268>
- Zini, E., Gazzano, M., Scandola, M., Wallner, S. R., & Gross, R. A. (2008). Glycolipid biomaterials: solid-state properties of a poly(sophorolipid). *Macromolecules*, 41, 7463–7468. <https://doi.org/10.1021/ma800496f>

5.2 Artigo 2: Green synthesis of silver nanoparticles using sophorolipids for the development of antimicrobial starch nanocomposite films

AgNP-SL biosynthesis by sophorolipids and nanocomposite films development

Enviado para Food Packaging and Shelf Life

Victória Akemi Itakura Silveira¹, Giovanna Amaral Filipe¹, Briani Gisele Bigotto¹, Marcelly Chue Gonçalves², Cristiani Baldo¹, Suzana Mali¹, Renata Katsuko Takayama Kobayashi², Gerson Nakazato², Danielle Lazarin Bidóia³, Celso Vataru Nakamura³ and Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, ²Department of Microbiology, State University of Londrina, Mailbox 10.011, 86057-970, Londrina, Brazil

³Department of Health Basic Science, State University of Maringá, 87020-900, Maringá, Brazil

***Corresponding author:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Telephone: +55 4333714270; E-mail: macelligoi@uel.br; ORCID: 0000-0003-2217-8937

Abstract

This study aimed to synthesize silver nanoparticles with sophorolipids (AgNP-SL) and develop starch nanocomposite films with improved properties to be explored in food packaging applications. AgNP-SL were spherical and highly stable, with an average size of 61.46 nm. They also demonstrated potent antibacterial action against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, revealing its promising application for antimicrobial packaging. The addition of AgNP-SL into films resulted in color changes, which could contribute to a better UV-barrier capacity. The addition of nanoparticles and tartaric acid resulted in a heterogeneous matrix, suggesting chemical interactions between the compounds and the biopolymer. The nanocomposite films presented thermal stability, enhanced flexibility and antimicrobial action against *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *S. aureus*. The combination of AgNP-SL and tartaric acid resulted in pronounced bactericidal properties. The results demonstrate the great potential of these nanocomposite films as an effective packaging material against foodborne pathogens.

Keywords: silver nanoparticles; sophorolipids; green synthesis; nanocomposite films; antibacterial activity.

1. Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) have aroused great attention, due to their heat stability, high specific surface area (Ardjoum, Shankar, Chibani, Salmieri & Lacroix, 2021), and effective antimicrobial activity, being explored in diverse fields, such as biomedical (Durán *et al.*, 2016), agriculture (Mishra & Singh, 2015), textile materials (Backx *et al.*, 2018), cosmetic (Kokura *et al.*, 2010), and food packaging applications (Ceballos, Von Bilderling, Guz, Bernal & Famá, 2021; Shankar, Rhim & Won 2018; Yang *et al.*, 2022).

AgNPs can be synthesized by different methods, however, the biological way has become more attractive nowadays due to the clean approach and sustainable synthesis without the use of hazardous and toxic compounds (Kowsalya, MosaChristas, Balashanmugam, Selvi & Rani, 2019). Biological synthesis includes the utilization of plant extracts, microorganisms, or their metabolites as reducing agents of silver nitrate (Durán, Marcato, Alves, Souza & Esposito, 2005; Rajan, Chandran, Harper, Yun & Kalaichelvan 2015; Sharma, Yngard & Lin, 2009).

Biosurfactants have been pointed out as alternative candidates for AgNPs synthesis (Gómez-Graña *et al.*, 2017; Khalid *et al.*, 2018). Sophorolipids, produced through fermentation by *Starmerella bombicola*, are one of the most important biosurfactants in the market, being composed of a sophorose moiety linked to a fatty acid tail. (Silveira *et al.*, 2019). This biomolecule is well-recognized for its biocompatibility, low toxicity, and biological properties, showing potent antimicrobial activity (Caretta *et al.*, 2021; Hipólito *et al.*, 2020, 2021; Filipe *et al.*, 2022; Silveira, Queiroz & Celligoi, 2018; Silveira *et al.*, 2019, 2020, 2021).

Sophorolipids was already reported as reducing and capping agent in the metallic nanoparticles synthesis, and even enhanced their biological properties (Kasture *et al.*, 2008; Basak, Das & Das, 2014; Kumar *et al.*, 2010). Despite these previous reports about the synthesis of nanoparticles by sophorolipids, there is no work describing the incorporation of greenly synthesized AgNP-SL into matrix films, aiming to improve and expand the functionalities of nanocomposite films.

Starch is a widely used biopolymer, but its limited mechanical properties and its high sensitivity to bacterial contamination, impairs its further use in food packaging (Ortega, García & Arce, 2019). Therefore, the incorporation of AgNP-SL could promote improvements in these aspects. Another approach to enhance the structural properties of starch is the addition of crosslinking agents, such as polycarboxylic acids, that cause the formation of intermolecular bridges between the glucose units in amylose and amylopectin, increasing the resistance of the

material (Dastidar & Netravali, 2012; Mendoza, 2015). Thus, the addition of tartaric acid was also studied in this work.

Therefore, the objective was to optimize the conditions of a green synthesis of silver nanoparticles employing sophorolipids as reducing agent and to develop nanocomposite films incorporated with these produced AgNP-SL. Tartaric acid was also added in the formulations as a possible crosslinking agent, and the effect of incorporating these compounds was evaluated regarding morphology, physicochemical, thermomechanical, and antimicrobial action.

2. Material and methods

2.1 Material and microorganisms

Silver nitrate was obtained from Sigma-Aldrich and sophorolipids were produced by fermentation with *S. bombicola* as previously reported by Silveira *et al.* (2019). Cassava starch was purchased from Yoki Alimentos, tartaric acid, and potassium hydroxide (KOH) were obtained from Dinamica, and glycerol was acquired from Synth. *S. bombicola* (ATCC[®] 22214[™]), *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 were obtained from the American Type Culture Collection.

2.2 Synthesis of silver nanoparticles with sophorolipids (AgNP-SL)

Silver nanoparticles were biosynthesized using sophorolipid as the reducing agent as described in Kasture *et al.* (2008) with modifications. Briefly, the assay was conducted in a hot plate magnetic stirrer, using 400 mL beakers with 100 mL of 1×10^{-3} M concentration aqueous AgNO_3 solution with sophorolipid (1×10^{-3} M). Then, KOH was added dropwise and stirred in the appropriate conditions. Different times (5-60 min) and temperatures (40-100 °C) were carried out to observe the colour changes, which indicated the AgNP-SL formation. Samples from the different parameters were analysed with ultraviolet-visible spectrophotometer.

2.3 Characterization of silver nanoparticles with sophorolipids (AgNP-SL)

Characterization of AgNP-SL was performed using an UV–vis spectrophotometer (BioTek Synergy HT, Winooski, USA) in the range of 300–700 nm. Size, polydistribution index value (PDI), and zeta potential of AgNP-SL were obtained by dynamic light scattering (DLS) (Zetasizer Nano, Malvern Instruments). Morphological analysis of the AgNP-SL was

performed by transmission electron microscopy (TEM) (JEM 1400, JEOL) operating at an acceleration voltage of 120 kV. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrum was recorded by a Shimadzu-8400 instrument (Japan) using the KBr pellet method. Measurements were performed in triplicate in the spectral range of 4000–400 cm^{-1} and resolution of 4 cm^{-1} .

2.4 Preparation of starch nanocomposite films

The AgNP-SL (0.25%, 0.5%, 1% and 4%) and tartaric acid concentrations (5% and 10%) were calculated based on the starch mass (3g/100 mL). The compounds were dissolved in distilled water and heated until 95 °C, under constant stirring. After, the filmogenic solutions were homogenized by sonication for 15 min, poured onto acrylic plates of 90x15 mm, and allowed to dry in a ventilated oven at 30 °C for 24 h. The films were stored at 25 °C and 58 % relative humidity (RH) until use.

Starch-based films were produced by the casting method with the incorporation of the produced silver nanoparticles (AgNP-SL) and tartaric acid (TA), resulting in eleven formulations, labelled as AM (3 g starch), AM + 0.25% (2.99 g starch + 0.0075 g AgNP-SL), AM + 0.5% (2.98 g starch + 0.015 g AgNP-SL), AM + 1% (2.97 g starch + 0.03 g AgNP-SL), AM + 4% (2.88 g starch + 0.12 g AgNP-SL), AM5 (2.85 g starch + 0.15 TA), AM5 + 0.25% (2.84 g starch + 0.0075 g AgNP-SL + 0.15 g TA), AM5 + 0.5% (2.83 g starch + 0.015 g AgNP-SL + 0.15 g TA), AM5 + 1% (2.82 g starch + 0.03 g AgNP-SL + 0.15 g TA), AM10 (2.7 g starch + 0.3 g TA), AM10 + 0.25% (2.69 g starch + 0.0075 g AgNP-SL + 0.3 g TA).

2.5 Starch nanocomposite films characterization

2.5.1 Thickness and scanning electron microscopy (SEM)

Ten different thickness points were measured using a Mitutoyo manual micrometer with $\pm 1 \mu\text{m}$ accuracy. SEM analyses were carried out with a JEOL JSPM 100 microscope at an accelerating voltage of 20 kV.

2.5.2 X-ray diffraction (XRD)

The crystallinity of each sample was investigated using a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer equipped with CuK α radiation, operating at 40 kV and 30 mA. All assays were performed with a diffraction pattern at $2\theta = 5\text{-}70^\circ$ and a scan speed of $1^\circ/\text{min}$.

2.5.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

Film samples were analyzed with a Shimadzu DSC-60 calorimeter with a flow of 50 mL/min nitrogen gas, and heated from 30°C to 100°C , at a heating rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$. DSC calibration was performed with indium.

2.5.4 Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy

FTIR measurements were performed in triplicate and recorded by a Shimadzu-8400 instrument (Japan) in the spectral range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ with a resolution of 4 cm^{-1} .

2.5.5 Solubility and Water vapor permeability (WVP)

Solubility was calculated based on the solubilized dry matter of the film in water during 24 h (Gontard, Guilbert, 1992). WVP analysis was performed according to ASTM method E96 (ASTM, 1996) and the detailed protocol was previously described (Silveira et al., 2020).

2.5.6 Mechanical properties

The tensile properties were performed using a TA.TX2 plus texture analyser (Stable Micro Systems, Surrey-UK), based on the ASTM- D882-9 (1996) method. Film samples of $25\times 100\text{ mm}$ were clamped between pneumatic grips with an initial distance of 30 mm. The deformation (mm) and force (N) were determined during extension at 0.8 mm s^{-1} . Analyses were performed in triplicate.

2.5.7 Antimicrobial activity of AgNP-SL and the nanocomposite films

S. aureus ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922 were used to verify the antimicrobial action of the produced AgNP-SL. Bacteria were cultured in Mueller-Hinton (MH) agar and incubated at 37 °C for 18 h. Saline solution was used to prepare bacteria suspensions at 1.5×10^8 CFU/mL (0.5 McFarland scale), and plated in a 96-well microplate at a concentration of 5.0×10^5 CFU/well (CLSI, 2012). AgNP-SL concentrations ranged from 225 to 3.51 μ M and the MIC was determined as the lowest concentration that inhibited the visible growth of bacteria.

Afterwards, the antimicrobial action of the starch nanocomposite films was tested against *S. aureus*, *E. coli*, and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Silveira *et al.*, 2020). Bacteria were grown in MH agar at 37°C for 24 h and after, 10 μ L (10^6 CFU/mL) of the bacterial suspensions were added to previously sterilized film discs and allowed to dry at room temperature. Then, the discs were placed inside test tubes containing 1 mL of MH broth and incubated at 37°C, 50 rpm for 24 h. After the incubation, each test tube was vortex agitated, diluted with saline, and plated onto nutrient agar. Colony forming units (CFU) were determined after incubation at 37 °C for 24 h.

3. Results and discussion

3.1 Synthesis and characterization of AgNP-SL

Initially, the influence of temperature and reaction times in the nanoparticles synthesis by sophorolipids were evaluated by UV-Vis (Fig. 1A). Surface plasmon resonance (SPR) showed an increase of absorption in the range of 400-420 nm in higher temperatures, which is described as typical for spherical shaped silver nanoparticles (Bezza, Tichapondwa & Chirwa, 2020; Farias *et al.*, 2014).

The influence of temperature in nanoparticles synthesis is a well-studied phenomenon (Gómez-Graña *et al.*, 2017; Kasture *et al.*, 2008). At low temperatures the reaction is slow, which generates bigger and highly dispersed size particles. In the opposite, at high temperatures, the reaction rate accelerates, producing smaller particles with narrow size distribution. Moreover, silver reduction can be tracked by color change during the reaction (Fig. 1B). Before KOH addition, the solution was colorless, followed by the appearance of a yellowish-brown color as the temperature increased (Kasture *et al.*, 2008; Singh, Shaikh &

Rale, 2021). This is an important parameter as it can indicate the end of the reaction through its stability.

Since this reaction is time-dependent, we also evaluated the ideal reaction time for synthesis of nanoparticles. According to the results (Fig 1A), up to 5 min, the peak intensity is very low, followed by a sharp increase after 10 min. From 20 min onwards, the spectrum remains constant, with no significant change observed until 60 min ($p > 0.05$). Based on UV-Vis analysis, 100 °C and 20 min were defined as the best parameters for the synthesis of AgNP-SL.

DLS analysis showed that average size, PDI and zeta potential of AgNP-SL were 61.46 ± 0.46 nm, 0.375, and -41.0 mV, respectively (Fig.1C). Zeta potential measures the electric potential and surface charge of nanoparticles, and values close to zero lead to particles aggregation, while particles with negative values tend to be more stable (Antony *et al.*, 2013; Darne, Mehta, Agawane & Prabhune, 2016).

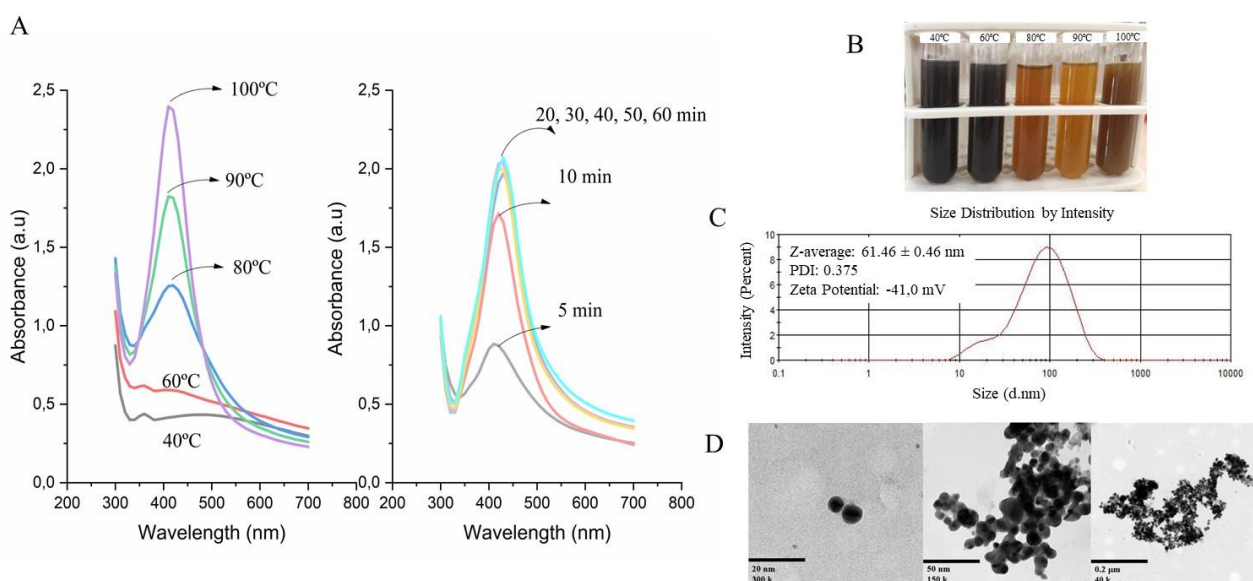


Fig.1 Characterization of the silver nanoparticles with sophorolipids (AgNP-SL): (A) UV-vis spectra at different temperatures and reaction times, (B) Color follow-up during reaction (40, 60, 80, 90 and 100 °C), (C) TEM images, and (D) DLS analysis.

PDI is related to colloidal stability and nanoparticle size distribution. Commonly a low PDI indicates good uniformity and monodispersed colloidal solution. Then, systems should have PDI values around 0.3 to be considered monodispersed, while values above this reveals a polydispersity distribution, in which precipitation may occur (Abdelsalam *et al.*, 2019; Brycki, Szulc & Babkova, 2020). The PDI value obtained here illustrated a good colloidal stability with narrow size distribution.

TEM images of the corresponding AgNP-SL are in accordance with the previous analyses, demonstrating spherical silver nanoparticles with homogeneous size distribution (Fig. 1D). Therefore, the produced and characterized AgNP-SL were incorporated into starch matrices to develop nanocomposite films. We hypothesized that this incorporation would improve the thermomechanical properties, as well as would impart antimicrobial action to the starch films due the presence of two well-known antimicrobial compounds: sophorolipids and silver nanoparticles.

3.2 Starch nanocomposite films

3.2.1 Appearance, thickness, and scanning electron microscopy (SEM)

The visual aspect of the starch films is provided as supplementary material (Fig. 1S). AM formulation = (neat starch film), presented a transparent and colorless appearance. Conversely, the addition of AgNP-SL resulted in color development, becoming more prominent as the concentration increased. Similar results were observed in the literature, and it was attributed to the characteristic SPR of silver nanoparticles (Arfat, Ahmed, Hiremath, Auras & Joseph, 2017; Cano, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2016).

The darkening of the films would help preventing the UV light penetration, which may contribute to nutritional and quality attributes of food products (Kumar Shukla, Baul, Mitra & Halder, 2018). As pointed out by Samira, Hadi and Mohsen (2021), transparency is not always a desirable feature for food packaging. Dairy, meat, and food products with high fatty content may be benefited by dark films, as it would help preventing oxidation process induced by light. Indeed, the addition of tartaric acid only affected the opacity of the films but did not result in color modification.

The incorporation of AgNP-SL and tartaric acid resulted in increased thickness values, ranging from $169 \pm 15 \mu\text{m}$ to $211 \pm 17 \mu\text{m}$ (Table 1). SEM micrographs of the produced films are shown in Fig. 2. The surface morphology of starch film was smoother and more homogeneous than those with AgNP-SL incorporation. The nanocomposite films presented a rough structure, in which white dots evidenced the incorporation of the nanoparticles, becoming more apparent as the concentration increased. These observations are in agreement with the literature, in which a coarser structure was formed due the AgNPs incorporation (Bang, Shankar & Rhim, 2019; Peighambardoust, Peighambardoust, Pournasir & Pakdel, 2019).

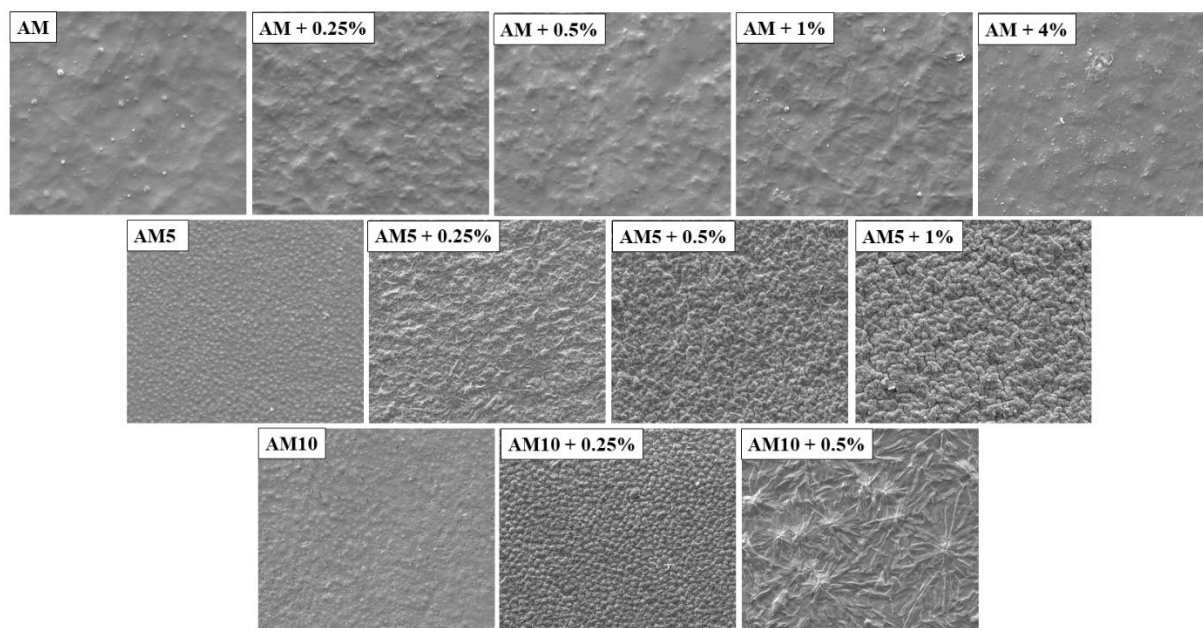


Fig. 2 SEM micrographs of the produced starch nanocomposite films with silver nanoparticles produced with sophorolipids and tartaric acid.

Table 1. Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), elongation at break (EB) and Young's modulus (YM) of the produced starch nanocomposite films with silver nanoparticles produced with sophorolipids (AM, AM + 0.25%, AM + 0.5%, AM + 1%, AM + 4%) and tartaric acid (AM5, AM5 + 0.25%, AM5 + 0.5%, AM5 + 1%, AM10, AM10 + 0.25%, AM10 + 0.5%).

Formulations	Thickness (μm)	Solubility (%)	WVP $\times 10^{11}$ ($\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$)	TS (MPa)	EB (%)	YM (MPa)
AM	169 ± 15^c	11.60 ± 0.97^b	2.40 ± 0.11^{ab}	11.81 ± 6.02^a	3.21 ± 1.61^d	475.77 ± 67.78^a
AM + 0.25%	173 ± 10^c	11.99 ± 2.71^b	1.69 ± 0.06^b	10.74 ± 1.57^a	3.66 ± 0.35^d	243.64 ± 33.47^b
AM + 0.5%	176 ± 10^{bc}	14.24 ± 2.84^b	1.65 ± 0.00^b	9.52 ± 1.14^{ab}	2.60 ± 1.64^d	273.40 ± 1.93^b
AM + 1%	175 ± 13^{bc}	14.29 ± 0.45^b	1.69 ± 0.06^b	8.87 ± 3.62^{abc}	3.88 ± 1.35^d	190.76 ± 65.33^{bc}
AM + 4%	203 ± 13^{ab}	14.56 ± 0.27^b	3.95 ± 0.11^a	6.50 ± 2.48^{abcd}	9.47 ± 4.25^d	167.80 ± 58.38^{bcd}
AM5	207 ± 7^{ab}	16.77 ± 0.97^{ab}	2.00 ± 1.40^b	4.63 ± 1.44^{bcd}	18.39 ± 10.14^{cd}	124.45 ± 50.91^{cde}
AM5 + 0.25%	199 ± 8^{abc}	16.05 ± 1.52^{ab}	1.94 ± 0.01^b	2.86 ± 0.48^d	30.65 ± 13.56^c	64.25 ± 14.45^{def}
AM5 + 0.5%	191 ± 8^{abc}	16.48 ± 1.81^{ab}	1.96 ± 0.04^b	2.74 ± 0.35^d	33.87 ± 10.97^c	41.97 ± 9.82^{ef}
AM5 + 1%	198 ± 16^{abc}	16.52 ± 1.74^{ab}	2.85 ± 0.07^{ab}	2.93 ± 0.67^d	66.40 ± 4.74^a	33.15 ± 1.54^{ef}
AM10	196 ± 8^{abc}	20.69 ± 0.89^a	1.93 ± 0.01^b	4.33 ± 1.95^{bcd}	39.15 ± 13.75^{bc}	29.64 ± 13.05^f
AM10 + 0.25%	211 ± 17^a	21.78 ± 0.08^a	2.10 ± 0.08^b	2.89 ± 0.43^{cd}	57.34 ± 12.8^{ab}	24.92 ± 4.43^f
AM10 + 0.5%	212 ± 15^a	21.89 ± 2.16^a	2.10 ± 0.13^b	2.93 ± 0.64^{bcd}	68.29 ± 2.90^a	19.48 ± 4.29^f

*TS: tensile strength; EB: elongation at break; YM: Young's modulus.

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

Carboxylic acids addition is also known to alter the surface structure of films, creating a more compact and rougher surface due to the new polymeric network introduced by the crosslink agent (Suganthi, Vignesh, Sundar & Raj, 2020; Wu *et al.*, 2019). Therefore, the association of tartaric acid and AgNP-SL resulted in an even more heterogeneous surface with increased roughness and significant morphological changes.

3.2.2 Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy

FTIR data of sophorolipids and AgNP-SL are shown in Fig. 3. A broad band around 3400 cm^{-1} corresponding to the presence of hydroxyl groups interacting by hydrogen bonds appeared in the sophorolipids spectrum. Interestingly, the same band appeared in AgNP-SL, indicating interactions between hydroxyls of the sophorolipids and AgNP. The band at 1750 cm^{-1} can be assigned to the lactone carbonyl group (C=O) in the sophorolipids molecule, the same band was reported previously by Minucelli *et al.* (2016) and Silveira *et al.* (2019) for sophorolipids.

In the FTIR spectrum of sophorolipids, we observed the =CH stretching vibration of the oleic acid moiety resonating at 3004 cm^{-1} , which disappears in the AgNP-SL spectrum. This event was also observed by Baccile, Noiville, Stievano & Van Bogaert (2013), which correlated with the complexation of the nanoparticles through the C=C double bond. They also observed that aliphatic hydrogens detected at 2940 and 2841 cm^{-1} in the sophorolipid sample were noticed in the AgNP-SL spectrum, showing that sophorolipids is present on the nanoparticle.

All The AgNP-SL FTIR spectra of the films were similar to the pure starch film (AM) and did not present any additional bands (Fig.5b and 5c). This result can be explained by the differences in concentration: in relation to starch, the concentration of AgNP-SL and tartaric acid was significantly smaller; thus, the predominance of the starch molecule was more evident. Nevertheless, the band at 3400 cm^{-1} , corresponded to the hydroxyls, was a bit less intense in the films with AgNP-SL incorporation (more evident in AM + 4%), possibly due to an interaction between the starch matrix to the nanoparticles, decreasing the -OH groups (Ceballos, Von Bilderling, Guz, Bernal & Famá, 2021).

The crosslinking effects of the carboxylic acid can be seen due the presence of carbonyl (C=O) band detected at 1725 cm^{-1} , attributed to the esterification of the tartaric acid and starch, and confirming their chemical interaction. Additionally, the band is intensified

with the increase of tartaric acid concentration, indicating an increase in the formation of ester bonds (crosslinking reactions) (Dastidar & Netravali, 2012; Wu *et al.*, 2019).

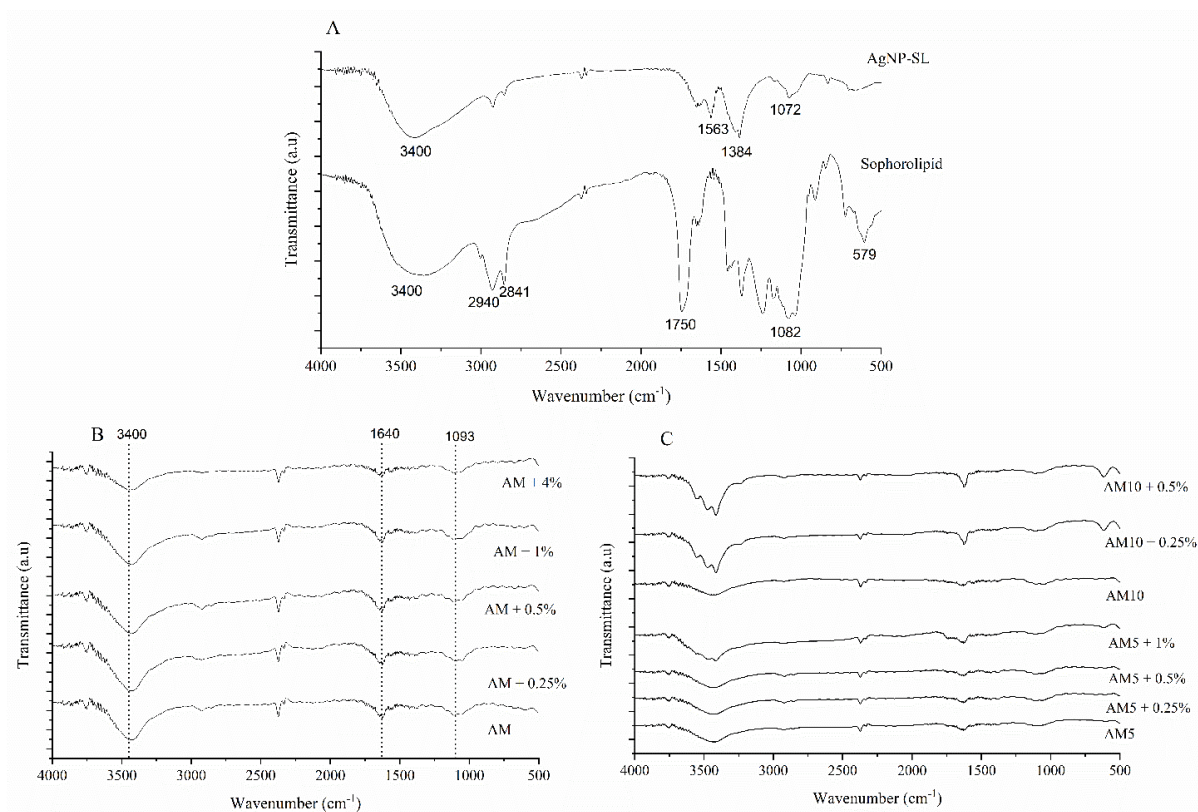


Fig.3 FT-IR spectra of the sophorolipids and the AgNP-SL (A) nanocomposite films with the incorporation of AgNP-SL (B) and with the incorporation of AgNP-SL and tartaric acid (C)

3.2.3 X-ray Diffraction (XRD)

The crystallinity of nanocomposite films was analyzed by XRD (Fig. 4A and 4B). The incorporation of AgNP-SL could be confirmed by the diffraction peaks at 38° and 44°, corresponding to the occurrence of crystalline silver nanoparticles (Bang, Shankar & Rhim, 2019; Mathew, Snigdha, Mathew & Radhakrishnan, 2019). These results were more easily detected in the formulations with higher AgNP-SL concentrations (AM + 1% and AM + 4%), which suggests that lower concentrations were more dispersed in the film matrix and, therefore, hardly detected. In addition, the crystallinity of the films was not affected by tartaric acid addition, keeping its amorphous character.

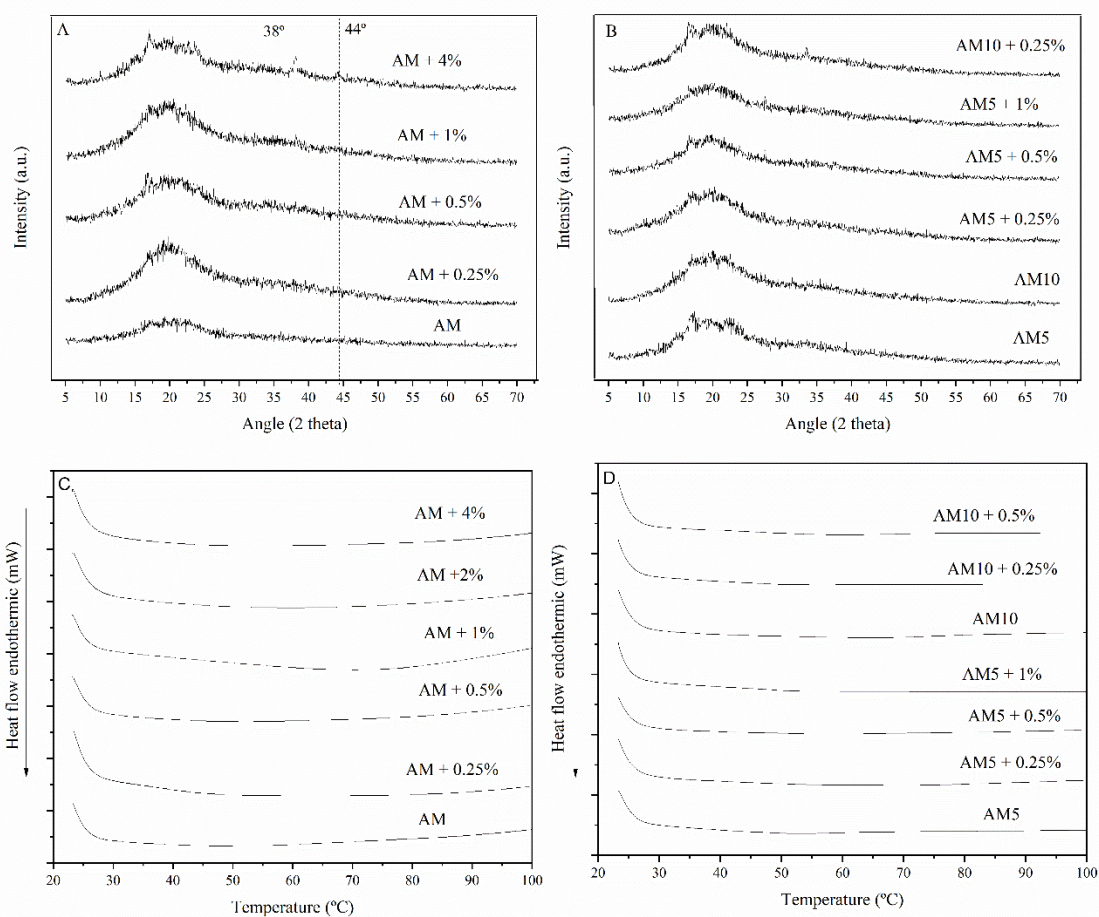


Fig.4 DSC thermograms of the produced starch nanocomposite films with the incorporation of AgNP-SL (A) and with the incorporation of AgNP-SL and tartaric acid (B) X-diffractograms of the produced starch nanocomposite films with the incorporation of AgNP-SL (C) and with the incorporation of AgNP-SL and tartaric acid (D)

3.2.4 Differential scanning calorimetry (DSC)

No thermal events were detected during the tested temperature range (20-100 °C), indicating a good thermal stability (Fig 4C and 4D). The possibly event that could be observed would be an endothermic peak due to water evaporation, since the degradation events and significantly weight loss are reported to occur at much higher temperatures (Garcia *et al.*, 2014). Still, the incorporation of AgNP and carboxylic acid, such as tartaric acid, are known to increase the thermal stability in films (Shankar, Rhim & Won, 2018; Suganthi, Vignesh, Sundar & Raj, 2020).

3.2.5 Solubility and water vapor permeability (WVP)

The results of solubility and WVP are showed in Table 1. data. The solubility was not influenced by the incorporation of AgNP-SL, although the addition of tartaric acid led to significant increased values. There was an augment in solubility with the compounds incorporation, but in general, the new films presented low solubility values.

Both AgNP-SL and tartaric acid led to a decrease in WVP values. Other studies reported that AgNPs incorporation generates electrostatic interactions with the matrix, decreasing the chain's mobility and creating a tortuous pathway that limited the diffusion of water vapor molecules (Shankar, Rhim & Won, 2018; Peighambardoust, Peighambardoust, Pournasir & Pakdel, 2019). A reduction in WVP could indicate a decrease in the moisture transfer between food and the environment, providing an increased shelf-life (Ramos *et al.*, 2016).

Interestingly, the addition of 4% of AgNP-SL led to an increase in WVP. Low concentration of silver nanoparticles also interfered in the matrix tortuosity, but at high amounts, a less compact structure might be obtained, where water molecules can be easily transferred (Cano, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2016).

3.2.6 Mechanical properties

Our results showed that TS values diminished with the increasing concentration of AgNP-SL, while EB had a slightly increase, but was not significantly influenced by the nanoparticle addition (Table 1). Previous studies also reported this same behavior with the addition of silver nanoparticles in film matrices (Basumatary *et al.*, 2018; Ortega, Giannuzzi, Arce & García, 2017). Since EB values shows the mechanical flexibility of films, this might indicate that AgNP-SL incorporation did not have an influence on it. In general, it is expected that TS increases with nanofillers incorporation, evidencing the matrix reinforcement (Bang, Shankar & Rhim, 2019; Shankar, Rhim & Won, 2018), although this trend was not observed in this study.

Tartaric acid addition had influence on the mechanical properties, presenting significantly lower values of TS and YM than those of AM formulation, however the EB increased significantly with increasing concentrations of the acid, indicating that the films became more flexible. Nandi, Tech and Guha (2021) also reported these events with the addition of different organic acids, which became more evident with increased acid

concentrations. They explained that the increased acidity in the films might have resulted in acid hydrolysis of the starch molecules, reducing the TS. Therefore, they affirmed that the addition of organic acids enhanced the mechanical properties by reinforcing the polymeric matrix.

We can also observe a synergism between AgNP-SL and tartaric acid regarding the influence in the mechanical properties. The combination effect of both compounds reduced even more the TS and YM, while EB was significantly higher in those cases, highlighting the formulations AM5 + 1% and AM10 + 0.5%.

3.2.7 Antimicrobial activity

The improvement of antimicrobial activity of nanoparticles with sophorolipids was previously reported. (Basak, Das & Das, 2014; Shikha, Chaudhuri & Bhattacharyya, 2020). Therefore, we synthesized AgNP-SL and obtained the MIC values of 28.12 and 56.25 μM for *E. coli* and *S. aureus*, respectively.

The antimicrobial properties of silver nanoparticles can be associated with pathogens cell membrane pore formation and the generation of reactive oxygen species (ROS), which causes lipid peroxidation of the phospholipids presented in the membrane layer. Interaction of silver with the DNA and enzymes, that leads to cell division inhibition was also described (Singh *et al.*, 2008).

Sophorolipids can mediate the disruption of cell membrane due its surfactant effect, helping the internalization of the AgNP-SL. In other words, the presence of sophorolipids on the surface of the nanoparticles, facilitate the entrance of the AgNP-SL into the pathogen cell, increasing the permeability (Basak, Das & Das, 2014; Shikha, Chaudhuri & Bhattacharyya, 2020).

Having this in mind, we hypothesized that the incorporation of AgNP-SL would attribute antimicrobial properties to the starch nanocomposite films. The results are shown in Table 2. AM formulation did not present antimicrobial action, although with the increase of the AgNP-SL content, the inhibition of bacteria growth became more prominent. *E. coli* was more sensitive to the nanocomposite films in comparison with *S. aureus*, and *Salmonella* was only inhibited at the maximum concentration of AgNP-SL tested.

The antimicrobial activity of tartaric acid was also evaluated, and the results showed interesting results when combined with the AgNP-SL. AM5 formulation had very poor effect

in inhibiting the bacteria. On the other hand, AM10 demonstrated good effectiveness against *E. coli* and *S. aureus*, reducing the growth in more than 5 logs.

The mechanism of action of organic acids involves cytoplasmatic acidification with subsequent energy production disruption (Ricke et al., 2003). Therefore, the combination of tartaric acid and AgNP-SL maximized the antimicrobial action of the nanocomposite films, being capable of reducing the bacteria with much less concentration of the nanoparticles.

Table 2. Antimicrobial activity of the produced starch nanocomposite films with silver nanoparticles produced with sophorolipids (AM, AM + 0.25%, AM + 0.5%, AM + 1%, AM + 4%) and tartaric acid (AM5, AM5 + 0.25%, AM5 + 0.5%, AM5 + 1%, AM10, AM10 + 0.25%, AM10 + 0.5%).

Formulations	Bacteria growth inhibition (log ₁₀ CFU/ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
AM	>10	>10	>10
AM + 0.25%	4.24 ± 0.23	9.85 ± 0.14	>10
AM + 0.5%	4.61 ± 0.40	9.81 ± 0.19	>10
AM + 1%	0	9.94 ± 0.04	>10
AM + 2%	0	8.70 ± 0.20	9.79 ± 0.09
AM + 4%	0	2.89 ± 0.07	0
AM5	>10	9.46 ± 0.43	9.82 ± 0.29
AM5 + 0.25%	0	>10	9.68 ± 0.34
AM5 + 0.5%	0	9.81 ± 0.19	9.74 ± 0.30
AM5 + 1%	0	9.79 ± 0.12	8.59 ± 0.42
AM10	4.14 ± 0.18	4.40 ± 0.26	8.36 ± 0.39
AM10 + 0.25%	0	0	0
AM10 + 0.5%	0	0	0

The results are expressed as the mean ± standard deviation.

4 Conclusions

Highly stable spherical shaped AgNP-SL were developed, presenting a good colloidal stability, homogeneous size distribution and antimicrobial activity against all tested bacteria. Chemical and physical modifications were observed by SEM, FTIR, and XRD analysis on the obtained nanocomposite films, indicating matrix interactions with the compounds. Nanocomposite films were thermally stable, although the mechanical properties were only influenced by tartaric acid incorporation, resulting in improvements in the films flexibility. Importantly, the nanocomposite films presented strong bactericidal action, mainly against the

Gram-negative bacteria. The addition of tartaric acid improved even more the antibacterial action, showing the great potential of using these nanocomposite films as active packaging system for food pathogens control.

Declarations of interest: none

Acknowledgements

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support and the Laboratory of Nanomedicine Research Unit (NANOMED) of the Federal University of ABC for the analyses.

References

- Abdelsalam, N.R., Fouda, M.M.G., Abdel-Megeed, A., Ajarem, J., Allam, A.A., & El-Naggar, M.E. (2019). Assessment of silver nanoparticles decorated starch and commercial zinc nanoparticles with respect to their genotoxicity on onion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 1008-1018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.134>
- Antony, J.J., Nivedheetha, M., Siva, D., Pradeepha, G., Kokilavani, P., Kalaiselvi, S., Sankarganesh, A., Balasundaram, A., Masilamani, V., & Achiraman, S. (2013). Antimicrobial activity of *Leucas aspera* engineered silver nanoparticles against *Aeromonas hydrophila* in infected *Catla catla*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.03.020>
- Ardjoum, N., Shankar, S., Chibani, N., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2021). In situ synthesis of silver nanoparticles in pectin matrix using gamma irradiation for the preparation of antibacterial pectin/silver nanoparticles composite films. *Food Hydrocolloids*, 121, Article 107000. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107000>
- Arfat, Y.A., Ahmed, J., Hiremath, N., Auras, R., Joseph, A. (2017). Thermo-mechanical, rheological, structural, and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 62, 191-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.009>
- 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
- 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
- Baccile, N., Noiville, R., Stievano, L., & Van Bogaert, I. (2013). Sophorolipids-functionalized iron oxide nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 1606-1620. <https://doi.org/10.1039/C2CP41977G>

Backx, B.P., Pedrosa, B.R., Delazare, T., Damasceno, R.D.C., Santos, & Dos, O.A.L. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles: a study of the dispersive efficiency and antimicrobial potential of the extracts of *Plinia cauliflora* for application in smart textiles materials for healthcare. *Journal of Nanomaterials and Molecular Nanotechnology*.

Bang, Y-J., Shankar, S., & Rhim, J-W. (2019). In situ synthesis of multi-functional gelatin/resorcinol/silver nanoparticles composite films. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, Article 100399. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100399>

Basak, G., Das, D., & Das, N. (2014). 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*, 24, 87-96. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1307.07081>

Basumatary, K., Daimary, P., Das, S.K., Thapa, M., Singh, M., Mukherjee, A., & Kumar, S. (2018). Lagerstroemia speciosa fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles and its application as filler in agar based nanocomposite films for antimicrobial food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.003>

Bezza, F.A., Tichapondwa, S.M., & Chirwa, E.M. (2020). Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. *Journal of Hazardous Materials*, 393, Article 122319. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122319>

Brycki, B., Szulc, A., & Babkova, M. (2020). Synthesis of silver nanoparticles with gemini surfactants as efficient capping and stabilizing agents. *Applied Sciences*, 11, Article 154. <https://doi.org/10.3390/app11010154>

Cano, A., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2016). Development and characterization of active films based on starch-PVA, containing silver nanoparticles. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.07.002>

Caretta, T.O., Silveira, V.A.I., Andrade, G., Macedo Jr, F., & Celligoi, M.A.P.C. (2021). Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against

phytopathogens from cherry tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102, 1245-1254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11462>

Ceballos, R.L., Von Bilderling, C., Guz, L., Bernal, C., & Famá, L. (2021). Effect of greenly synthesized silver nanoparticles on the properties of active starch films obtained by extrusion and compression molding. *Carbohydrate Polymers*, 261, Article 117871. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117871>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (M07-A9); Approved Standard (ninth ed.) <https://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>

Darne, P.A., Mehta, M.R., Agawane, S.B., & Prabhune, A.A. (2016). Bioavailability studies of curcumin–sophorolipid nano-conjugates in the aqueous phase: role in the synthesis of uniform gold nanoparticles. *RSC Advances – The Royal Society of Chemistry*, 6, 68504–68514. <https://doi.org/10.1039/C6RA13469F>

Dastidar, T.G., & Netravali, A.N. (2012). ‘Green’ crosslinking of native starches with malonic acid and their properties. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1620–1628. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.041>

Durán, N., Durán, M., Jesus, M.B., Seabra, A.B., Fávares, W.J., & Nakazato, G. (2016). Silver Nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12, 789-799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>

Durán, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., Souza, G.I.H., & Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*, 3, Article 8. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-8>

Farias, C.B.B., Silva, A.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Souza, J.E.G., & Sarubbo, L.A. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 122–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.04.003>

Filipe, G.A., Bigotto, B.G., Baldo, C., Gonçalves, M.C., Kobayashi, R.K.T., Lonni, A.A.S.G., Celligoi, M.A.P.C. (2022). Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil against acne-causing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 133, 1534-1542. <https://doi.org/10.1111/jam.15659>

Garcia, P.S., Grossmann, M.V.E., Shirai, M.A., Lazaretti, M.M., Yamashita, F., Muller, C.M.O., & Mali, S. (2014). Improving action of citric acid as compatibiliser in starch/polyester blown films. *Industrial Crops and Products*, 52, 305–312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.001>

Gómez-Graña, S., Perez-Ameneiro, M., Vecino, X., Pastoriza-Santos, I., Perez-Juste, J., Cruz, J., & Moldes, A. (2017). Biogenic synthesis of metal nanoparticles using a biosurfactant extracted from corn and their antimicrobial properties. *Nanomaterials*, 7, Article 139. <https://doi.org/10.3390/nano7060139>

Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.L. (1992). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food and Science*, 53, 206-211.

Hipólito, A., Silva, R.A.A., Caretta, T.O., Silveira, V.A.I., Amador, I.R., Panagio, L.A., Borsato, D., Celligoi, M.A.P.C. (2020). Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, Article 101797. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101797>

Hipólito, A., Caretta, T.O., Silveira, V.A.I., Bersaneti, G.T., Mali, S., & Celligoi, M.A.P.C. (2021). Active biodegradable cassava starch films containing sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* ATCC® 22214™. *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 3199–3209. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02103-8>

Kasture, M.B., Patel, P., Prabhune, A.A., Ramana, C.V., Kulkarni, A.A., & Prasad, B.L.V. (2008). Synthesis of silver nanoparticles by sophorolipids: Effect of temperature and sophorolipid structure on the size of particles. *Journal of Chemical Sciences*, 120, 515–520. <https://doi.org/10.1007/s12039-008-0080-6>

Khalid, H.F., Tehseen, B., Sarwar, Y., Hussain, S.Z., Khan, W.S., Raza, Z.A., Bajwa, S.Z., Kanaras, A.G., Hussain, I., & Rehman, A. (2018). Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. *Journal of Hazardous Materials*, 364, 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.049>

Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2010). Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetic. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6, 570-574. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.12.002>

Kowsalya, E., MosaChristas, K., Balashanmugam, P., Tamil Selvi, A., & Jaqueline Chinna Rani, I. (2019). Biocompatible silver nanoparticles/poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibers for potential antimicrobial food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, Article 100379. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100379>

Kumar, D.V.R., Kasture, M., Prabhune, A.A., Ramana, C.V., Prasad, B.L.V., & Kulkarni, A.A. (2010). Continuous flow synthesis of functionalized silver nanoparticles using bifunctional biosurfactants. *Green Chemistry*, 12, 609–615. <https://doi.org/10.1039/B919550E>

Kumar, S., Shukla, A., Baul, P.P., Mitra, A., & Halder, D. (2018). Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.008>

Mathew, S., Snigdha, S., Mathew, J., & Radhakrishnan, E.K. (2019). Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.009>

Mendoza, A. J. (2015). Tartaric acid cross-linking of starch: effects of reaction conditions on the maximum tensile strength of cast plastic films. *The Journal of Student Science and Technology*, 8, 41-47. <https://doi.org/10.13034 / JSST-2015-034>

Minucelli, T., Ribeiro-Viana, R. M., Borsato, D., Andrade, G., Cely, M. V. T., de Oliveira, M. R., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Sphorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*, 8, 743–753. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9592-3>

Mishra, S., & Singh, H.B. (2015). Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1097–1107. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6296-0>

Nandi, S., Tech, M., & Guha, P. (2021). Organic acid-compatibilized potato starch/guar gum blend films. *Materials Chemistry and Physics*, 268, Article 124714. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124714>

Ortega, F., Giannuzzi, L., Arce, V.B., & García, M.A. (2017). Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 70, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.036>

Ortega, F., García, M. A., & Arce, V.B. (2019). Nanocomposite films with silver nanoparticles synthesized in situ: Effect of corn starch content. *Food Hydrocolloids*, 97, Article 105200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105200>

Peighambardoust, S.J., Peighambardoust, S.H., Pournasir, N., & Pakdel, M.P. (2019). Properties of active starch-based films incorporating a combination of Ag, ZnO and CuO nanoparticles for potential use in food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, Article 100420. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100420>

Rajan, R., Chandran, K., Harper, S.L., Yun, S-I., & Kalaichelvan, P.T. (2015). Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*, 70, 356–373. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.015>

Ramos, M., Fortunati, E., Peltzer, M., Jimenez, A., Kenny, J.M., & Garrigós, M.C. (2016). Characterization and disintegrability under composting conditions of PLA-based nanocomposite films with thymol and silver nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, 132, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.015>

Ricke, S. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82, 632–639. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.632>

Samira, M., Hadi, A., & Mohsen, E. (2021). Physical and release properties of poly(lactic acid)/nanosilver-decorated cellulose, chitosan and lignocellulose nanofiber composite films. *Materials Chemistry and Physics*, 268, Article 124719. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124719>

Shankar, S., Rhim, J-W., & Won, K. (2018). Preparation of poly(lactide)/lignin/silver nanoparticles composite films with UV light barrier and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1724-1731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.038>

Sharma, V.K., Yngard, R.A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>

Shikha, S., Chaudhuri, S.R., & Bhattacharyya, M.S. (2020). Facile one pot greener synthesis of sophorolipid capped gold nanoparticles and its antimicrobial activity having special efficacy against gram negative *Vibrio cholerae*. *Scientific Reports*, 10, Article 1463. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57399-3>

Silveira, V.A.I., Kobayashi, R.K.T., de Oliveira Junior, A.G., Mantovani, S., Nakazato, G., & Celligoi, M.A.P.C. (2021). Antimicrobial effects of sophorolipid in combination with lactic acid against poultry-relevant isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 1769–1778. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00545-9>

Silveira, V.A.I., Marim, B.M., Hipólito, A., Gonçalves, M.C., Mali, S., Kobayashi, R.K.T., & Celligoi, M.A.P.C. (2020) Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, Article 100591. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100591>

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. (2019). Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, Article 101287. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101287>

Silveira, V.A.I., Queiroz, C.A.U., & Celligoi, M.A.P.C. (2018). Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: a promising alternative to conventional drugs. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 6, 87-90. <https://doi.org/10.7324/jabb.2018.60614>.

Singh, A.T., Shaikh, I.N., & Rale, M.V. (2021). Synthesis of gold and silver nanoparticles using *Phlogacanthus Thyriformis* extracts-its phytochemical screening and anti-oxidant studies. *Materials Today: Proceedings*, 43, 2805-2809. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.798>

Singh, S., Patel, P., Jaiswal, S., Prabhune, A.A., Ramana, C.V., & Prasad, B.L.V. (2008). A direct method for the preparation of glycolipid–metal nanoparticle conjugates: sophorolipids as reducing and capping agents for the synthesis of water re-dispersible silver nanoparticles and their antibacterial activity. *New Journal of Chemistry*, 33, 646-652. <https://doi.org/10.1039/B811829A>

Suganthi, S., Vignesh, S., Sundar, J.K., & Raj, V. (2020). Fabrication of PVA polymer films with improved antibacterial activity by fine-tuning via organic acids for food packaging applications. *Applied Water Science*, 10, Article 100. <https://doi.org/10.1007/s13201-020-1162-y>

Wu, H., Lei, Y., Lu, J., Zhu, R., Xiao, D., Jiao, C., Xia, R., Zhang, Z., Shen, G., Liu, Y., Li, S., & Li, M. (2019). Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films. *Food Hydrocolloids*, 97, Article 105208. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105208>

Yang, D., Liu, Q., Gao, Y., Wan, S., Meng, F., Weng, W., Zhang, Y. (2022). Characterization of silver nanoparticles loaded chitosan/polyvinyl alcohol antibacterial films for food

packaging. *Food Hydrocolloids*, Article 108305.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108305>

5.3 Patente 1: Filmes antimicrobianos de amido e nanopartículas de prata com soforolipídios para preservação de bananas

Autores: Victória Akemi Itakura Silveira, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Protocolada em: 15/02/2023 (processo BR 10 2023 002856 0)

Resumo: A presente invenção descreve um novo filme biodegradável à base de amido produzido de forma simultânea a sua incorporação com nanopartículas de prata e soforolipídios (AgNP-SL), que foram sintetizadas de forma biológica e sustentável, visando o desenvolvimento de revestimentos ativos antimicrobianos para frutas perecíveis, como a banana, visando aumentar a vida útil do produto e controlar patógenos alimentares. A formulação foi produzida pelo método de casting e o resultado da sua aplicação em bananas foi avaliado pelo acompanhamento visual do seu aspecto de preservação durante 5 dias de armazenamento. A adição do composto ativo AgNP-SL resultou em filmes uniformes e não quebradiços, que apresentaram propriedades multifuncionais melhoradas, como propriedades estruturais e biológicas superiores, devido a atividade antimicrobiana dos compostos incorporados. Para a aplicação nas bananas, os filmes foram resfriados à temperatura ambiente e as bananas assepsiadas com água destilada estéril. A aplicação foi realizada por imersão das frutas na solução filmogênica, deixadas secar à temperatura ambiente por 24h. Após a formação da película, os filmes foram avaliados durante 5 dias de armazenamento. Foi observado que o revestimento não alterou o aspecto original da banana e que a presença desta película na fruta permitiu um melhor estado de preservação, pela presença da fina camada do filme sobre a casca da banana, que minimizou a deterioração por trocas gasosas com o meio externo, a perda de água e a contaminação microbiana pela presença dos compostos soforolipídios e nanopartículas de prata. Sendo assim, o filme apresenta potencial inovador, sendo capaz de aumentar a vida útil das bananas pela barreira protetora formada pelo filme antimicrobiano, reduzindo os microrganismos contaminantes na fruta e as diminuindo as trocas gasosas que provocam o amadurecimento precoce dos frutos.

5.4 Patente 2: Processo de separação das formas acídicas e lactônicas dos sofrorolípídios produzidos por uma cepa de *Starmerella*

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

Protocolada em: 16/12/2019 (processo BR 10 2019 026810 7)

Resumo: A invenção refere-se a uma nova técnica de separação das estruturas lactônicas e acídicas do sofrorolípídio para direcionar às futuras aplicações industriais. O sofrorolípídio utilizado na técnica foi produzido por uma cepa de *Starmerella*, extraído e liofilizado. A amostra foi solubilizada em 100 mL de água destilada e corrigida para o valor de pH 11 pela adição de 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 sofrorolípídios da cepa de *Starmerella*, essa técnica demonstrou ser eficaz e viável, pela facilidade metodológica, baixo custo de operação e especificidade para futuras aplicações industriais.

5.5 Patente 3: Uso de soforolipídios de *Starmerella* durante a lavagem de carcaças para redução microbiana após a etapa de evisceração de frangos de corte

Autores: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Victória Akemi Itakura Silveira, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas.

Protocolada em: 30/06/2020 (processo BR 10 2020 013479 5)

Resumo: A invenção proposta tem como objetivo o uso de soforolipídio, produzido por uma espécie de *Starmerella*, como coadjuvante na água utilizada para lavar as carcaças após evisceração e avaliar sua efetividade como sanitizante, contra coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que os soforolipídios foram eficazes no controle dos patógenos, demonstrando ser um eficiente sanitizante, podendo ser usado como agente descontaminante nas indústrias avícolas, na etapa de evisceração na lavagem por aspersão das carcaças, reduzindo a contaminação, por coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.

5.6 Patente 4: Filme Multifuncional com ação prebiótica e antimicrobiana para revestimento de morangos

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

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

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

5.7 Artigo de revisão: Sophorolipids: A review on production and perspectives of application in agriculture

Autores: Maria Antonia P. C. Celligoi, Victória A. I. Silveira, Amanda Hipólito, Talita O. Caretta e Cristiani Baldo.

Publicado em: Spanish Journal of Agricultural Research, 2020.

DOI: 10.5424/sjar/2020183-15225

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

5.8 Livro: Microbial Sophorolipids: Production, Properties and Industrial Applications

Autores: Amanda Hipólito, Victória Akemi Itakura Silveira, Talita de Oliveira Caretta, Briane Gisele Bigotto, Eduarda Mendes Costa, Giovanna Amaral Filipe, Tania Regina Kaiser, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas, Cristiani Baldo, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Publicado em: ELIVA Press, 2022.

ISBN: 978-99949-8-144-1

Resumo: Sophorolipids are biosurfactants produced mainly by non-pathogenic yeast *Starmerella bombicola*. They are composed of a sugar moiety linked to a fatty acid chain and their structure depends on the producer microorganism and the fermentations condition. Sophorolipids present several advantages over chemical surfactants as high biodegradability, diversity of biological properties and renewable characteristics being synthesized as a mixture of different molecules. In general, they can be divided into two main forms: acidic and lactonic and may have acetyl groups in the sophorose with variation in physicochemical and biological properties. They have numerous properties including the antimicrobial and antioxidant activity that allow their application in several sector of industry. Besides, sophorolipids present good stability in the wide range of pHs, temperatures, and salinity, low-foaming and excellent detergent properties. Consequently, these compounds hold a wide range of applications in food, agriculture, cosmetics and medical industrial sectors. This book covers the current knowledge of microbial sophorolipids providing information on their structure, synthesis, production and the industrial application.

5.9 Capítulo de livro 1: Perspectivas de aplicação de soforolipídio microbiano na indústria de alimentos

Título do livro: Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos 3

Autores: Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas, Victória Akemi Itakura Silveira, Amanda Hipólito, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Publicado em: Atena Editora, 2019.

DOI: 10.22533/at.ed.98019091012

Resumo: Devido à crescente preocupação ambiental, a procura por alternativas de produtos naturais que possam ser utilizados como aditivos alimentares tem aumentado, abrindo uma nova oportunidade aos surfactantes produzidos por microrganismos. O soforolipídio é um biosurfactante 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 soforolipídio e as potenciais aplicações na indústria de alimentos.

5.10 Capítulo de livro 2: Exopolysaccharides in Fermented Foods and Their Potential Health Benefits

Título do livro: Bioactive Compounds in Fermented Foods: Health Aspects

Autores: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Gabrielly Terassi Bersanetti, Cristiani Baldo, Reginara Teixeira da Silva and Victoria Akemi Itakura Silveira.

Publicado em: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2022.

ISBN: 9780429027413

Resumo: Since ancient times, fermentation has been employed in food preparation all over the world. Exopolysaccharides (EPSs) in fermented food products have gained wide attention among functional food consumers due to their potential in improving texture, flavor and rheology. The fermented products reported to harbor EPSs-producing organisms include dairy products, bakery products and cereal-based beverages, vegetables and meat products. Lactic acid bacteria isolated from several fermented foods have been reported in the production of EPSs, which are recognized to have several health benefits, such as antioxidant, cholesterol-lowering, prebiotic, antitumor and immunomodulatory properties. These health benefits make EPSs enriched fermented foods as an important functional food for the future. This chapter provides an overview of EPSs-rich fermented foods and their health benefits.

5.11 Capítulo de livro 3: Aplicação de soforolipídios de *Candida bombicola* em filmes antimicrobianos

Título do livro: Agenda Global de Pesquisa em Ciências Biológicas 2

Autores: Briani Gisele Bigotto, Giovanna Amaral Filipe, Victoria Akemi Itakura Silveira, Eduarda Mendes Costa, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Publicado em: Atena Editora, 2022.

ISBN: 978-65-258-0177-3

Resumo: A herpes é a segunda infecção viral mais comum na população mundial, podendo gerar complicações para o indivíduo se não tratadas corretamente. A maioria dos medicamentos contra herpes são utilizados no alívio dos sintomas, sendo o aciclovir o fármaco de primeira escolha, entretanto o tratamento demonstra limitada eficácia e necessidade de múltiplas aplicações, dificultando assim a adesão ao tratamento. O uso de metabólitos primários e secundários a partir da fermentação, no conceito biotecnológico, representa grande interesse, pois são capazes de substituir os compostos sintéticos. Dentre esses ingredientes derivados da biotecnologia, destacam-se o soforolipídios, um biossurfactante que pertence à classe dos glicolipídios extracelulares compostos por um dissacarídeo de glicose, a soforose, (O β -Dglicopiranosil-2 \rightarrow 1- β -D-glicopiranosose) e unidos por ligação β -glicosídica entre o carbono 1' e o carbono terminal (ω) ou subterminal (ω -1) possuem uma cadeia de ácido graxo de 16 ou 18 carbonos que se destaca pela sua atividade antimicrobiana

6 CONCLUSÕES

- A melhor condição da hidrólise enzimática dos resíduos alimentares foi concentração de 1% (m/v) de amilase, protease e lipase por 2h a 30 °C, obtendo-se uma liberação máxima de glicose de 40 g/L.
- A produção de soforolipídios com os resíduos alimentares demonstrou ser possível, obtendo-se ao final de 160 h, uma produção de 134,8 g/L, rendimento de 0,34 g/g e produtividade de 0,85 g/L/h, valores comparáveis à fermentação com substratos de primeira geração de 144,1 g/L, rendimento de 0,23 g/g e produtividade de 0,79 g/L/h.
- A incorporação dos soforolipídios nos filmes de PLA aumentou a solubilidade, atuando como agente plastificante, reduzindo a resistência à tração e rigidez e aumentando a hidroflicidade e flexibilidade. A adição de soforolipídios nos filmes de PLA conferiram propriedades antimicrobianas contra todos os microrganismos isolados de frango, sendo mais eficaz contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*.
- As melhores condições de síntese das nanopartículas de prata por soforolipídios (AgNP-SL) foram 100 °C e 20 minutos. As nanopartículas apresentaram formato esférico, estabilidade, distribuição homogênea e tamanho médio de 61,46 nm, além de atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*.
- Os filmes nanocompósitos de amido produzidos com a adição das AgNP-SL e ácido tartárico apresentaram aspecto visual homogêneo e com desenvolvimento de cor devido à presença dos compostos. Os filmes também apresentaram estabilidade térmica, aumento de solubilidade e flexibilidade pela presença do ácido tartárico e diminuição à permeabilidade ao vapor de água;
- Os filmes nanocompósitos de amido com AgNP-SL exibiram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella spp*. A adição de ácido tartárico melhorou a ação antibacteriana, demonstrando o grande potencial do uso desses filmes nanocompósitos como embalagem ativa para o controle de patógenos de origem alimentar
- Dessa forma, o presente trabalho apresentou a viabilidade de produção de soforolipídios a partir de fontes alternativas, como os resíduos de alimentos, para diminuir os custos de

produção e adotar um sistema de economia sustentável e circular. Os soforolipídios demonstraram ter propriedades multifuncionais, podendo ser aplicados para a síntese verde de nanopartículas de prata, assim como no desenvolvimento de filmes com características estruturais e mecânicas aprimoradas, e como um agente antimicrobiano eficaz para controle de patógenos de origem alimentar.

7 REFERÊNCIAS

- ABRELPE. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS. Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2018/2019. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: < <http://abrelpe.org.br/panorama/>> Acesso em 04 de março de 2022.
- ACCORSINI, F.R.; ROSSINI, M.M.J.; MACEDO, L.E.G.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 116–125, 2012.
- AHMED, J.; ARFAT, Y.A.; BHER, A.; MULLA, M.; JACOB, H.; AURAS, R. Active chicken meat packaging based on polylactide films and bimetallic Ag-Cu nanoparticles and essential oil. **Journal of Food Science**, v. 83, p. 1299-1310, 2018.
- AHMED, J.; HIREMATH, N.; JACOB, H. Antimicrobial efficacies of essential oils/nanoparticles incorporated polylactide films against *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* on contaminated cheese. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 53-67, 2016.
- AHMED, J.; MULLA, M.Z.; ARFAT, Y.A. Thermo-mechanical, Structural Characterization and antibacterial performance of solvent casted polylactide/cinnamon oil composite films. **Food Control**, v. 69, p. 196-204, 2016.
- AHMED, J.; MULLA, M.Z.; JACOB, H.; LUCIANO, G.; BINI, T.B.; ALMUSALLAM, A. Polylactide/poly(ϵ -caprolactone)/zinc oxide/clove essential oil composite antimicrobial films for scrambled egg packaging. **Food Packaging and Shelf-Life**, v. 21, 100355, 2019.
- AHMED, J.; VARDHNEY, S.K. Polylactides – chemistry, properties and green packaging technology: A Review. **International Journal of Food properties**, v. 14, p. 37-58, 2011.
- ARDJOUR, N.; SHANKAR, S.; CHIBANI, N.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. In situ synthesis of silver nanoparticles in pectin matrix using gamma irradiation for the preparation of antibacterial pectin/silver nanoparticles composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 121, 107000, 2021.
- ASHBY, R.D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p. 625–630, 2005.
- ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Property control of sophorolipids: influence of fatty acid substrate and blending. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1093–1100, 2008.
- 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.
- ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J. A.; SOLAIMAN, D. K. Y.; LIU, L. S. Biopolymer scaffolds

- for use in delivering antimicrobial sophorolipids to the acne-causing bacterium *Propionibacterium acnes*. **New Biotechnology**, v. 28, p. 24–30, 2011.
- ASHORI, A.; BAHRAMI, R. Modification of physico-mechanical properties of chitosan-tapioca starch blend films using nano graphene. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 53, p. 312–318, 2014.
- 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, p. 1460-1466, 1988.
- AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 835-864, 2004.
- AVÉROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 111-122, 2004.
- BABAPOUR, H.; JALALI, H.; NAFCHI, A.M. The synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and fennel essential oil on physicochemical, mechanical, and antibacterial properties of potato starch films. **Food Science and Nutrition**, v. 9, p. 3893-3906, 2021.
- BACKX, B.P.; PEDROSA, B.R.; DELAZARE, T.; DAMASCENO, R.D.C.; SANTOS, O.A.L. Green synthesis of silver nanoparticles: a study of the dispersive efficiency and antimicrobial potential of the extracts of *Plinia cauliflora* for application in smart textiles materials for healthcare. **Journal of Nanomaterials and Molecular Nanotechnology**, 2018.
- BAEK, N.; KIM, Y.T.; MARCY, J.E.; DUNCAN, S.E.; O'KEEFE, S.F. Physical properties of nanocomposite polylactic acid films prepared with oleic acid modified titanium dioxide. **Food Packaging and Shelf-Life**, v. 17, p. 30-38, 2018.
- 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.
- 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**, v. 24, p. 87-96, 2014.
- BAZARGANI-GILANI, B.; ALIAKBARLU, J.; TAJIK, H. Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 280-287, 2015.
- BAZMANDEH, A.Z.; MIRZAEI, E.; FADAIE, M.; SHIRIAN, S.; GHASEMI, Y. Dual spinneret electrospun nanofibrous/gel structure of chitosan-gelatin/ chitosan-hyaluronic acid as a wound dressing: In-vitro and in-vivo studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 359-373, 2020.

- BHANGALE, A.P.; WADEKAR, S.D.; KALE, S.B.; PRATAP, A.P. Sophorolipids synthesized using non-traditional oils with glycerol and studies on their surfactant properties with synthetic surfactant. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 51, p. 387–396, 2014.
- BORSANYIOVA, M.; PATIL, A.; MUKHERJI, R.; PRABHUNE, A.; BOPEGAMAGE, S. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. **Folia Microbiologica**, v. 61, p. 85-89, 2015.
- BORAH, S.N.; DEKA, S.; SARMA, H.K. First report of *Fusarium verticillioides* causing stalk rot of maize in. **APS Publications**, v. 100, 2016.
- CANO, A.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Development and characterization of active films based on starch-PVA, containing silver nanoparticles. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 16–24, 2016.
- CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; ANDRADE, G.; MACEDO JR, F.; CELLIGOI, M.A.P.C. Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 3, p. 1245-1254, 2021.
- 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.
- CEBALLOS, R.L.; VON BILDERLING, C.; GUZ, L.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Effect of greenly synthesized silver nanoparticles on the properties of active starch films obtained by extrusion and compression molding. **Carbohydrate Polymers**, v. 261, 117871, 2021.
- CELLIGOI, M. A. P. COLABONE; SILVEIRA, V. A. I.; HIPÓLITO, A.; CARETTA, T. O. BALDO, C. Sophorolipids: a review on production and perspectives of application in agriculture. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.18, E03R01, 2020.
- CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant. **International Journal of Science Natural**, p. 63–71. 2011.
- CHAUSALI, N.; SAXENA, J.; PRASAD, R. Recent trends in nanotechnology applications of bio-based packaging. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, 100257, 2022.
- CHEN, Y.; LIN, Y.; TIAN, X.; LI, Q.; CHU, J. Real-time dynamic analysis with low-field nuclear magnetic resonance of residual oil and sophorolipids concentrations in the fermentation process of *Starmerella bombicola*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 157, p. 9–15, 2019.
- CHEN, J.; LÜ, Z.; AN, Z.; JI, P.; LIU, X. Antibacterial activities of sophorolipids and nisin and their combination against foodborne pathogen *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, 1900333, 2020.
- CHEN, J.; SONG, X.; ZHANG, H.; QU, Y.B.; MIAO, J.Y. Sophorolipid produced from the

- new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 52–59, 2006.
- CHENG, J.; WANG, H.; KANG, S.; XIA, L.; JIANG, S.; CHEN, M.; JIANG, S. An active packaging film based on yam starch with eugenol and its application for pork preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 546-554, 2019.
- CIESIELSKA, K.; ROELANTS, S.L.K.W.; VAN BOGAERT, I.N.A.; DE WAELE, S.; VANDENBERGHE, I.; GROENEBOER, S.; SOETAERT, W.; DEVREESE, B. Characterization of a novel enzyme—*Starmerella bombicola* lactone esterase (SBLE)—responsible for sophorolipid lactonization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 9529–9541, 2016.
- CLAUS, S.; VAN BOGAERT, I.N.A. Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 7811–7821, 2017.
- COLLAZO-BIGLIARDI, S.; ORTEGA-TORO, R.; CHIRALT, A. Improving properties of thermoplastic starch films by incorporating active extracts and cellulose fibres isolated from rice or coffee husk. **Food Packaging and Shelf-Life**, v. 22, 100383, 2019.
- 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.
- DAIRI, N.; FERFERA-HARRAR, H.; RAMOS, M.; GARRIGÓS, M.C. Cellulose acetate/AgNPs-organoclay and/or thymol nano-biocomposite films with combined antimicrobial properties for active packaging use. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 508-523.
- DAL' MAGRO, G.P.; TALAMINI, E. Estimating the magnitude of the food loss and waste generated in Brazil. **Waste management and research**, v. 37, p. 706-716, 2019.
- DANIEL, H.J.; OTTO, R.T.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 805–807, 1998a.
- DANIEL, H.J.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 1153–1156, 1998b.
- DASTIDAR, T.G.; NETRAVALI, A.N. 'Green' crosslinking of native starches with malonic acid and their properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p.1620–1628, 2012.
- DAVEREY, A.; DUTTA, K.; JOSHI, S.; DAVEREY, A. Sophorolipid: a glycolipid biosurfactant as a potential therapeutic agent against COVID-19, **Bioengineered**, v. 12, p. 9550-9560, 2021.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**,

v. 42, p. 499–504, 2009.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 79, p. 246–253, 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. **Clean Technologies and Environmental**, v. 13, p. 481–488, 2011.

DAVILA, A.M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrates. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 249–257, 1994.

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, A.M.; RÉMY, M.; 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.

DE CLERCQ, V.; ROELANTS, S.L.K.W.; CASTELEIN, M.G.; DE MAESENEIRE, S.L.; SOETAERT, W.K. Elucidation of the natural function of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola*. **Journal of Fungi**, v. 7, 917, 2021.

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

DEVELTER, D.; JACOBS, I.; RENKIN, M. **Detergent compositions**. Patent EP1445302A1, 2003.

DEVELTER, D.W.G.; LAURYSSSEN, L.M.L. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 628–638, 2010.

DIAZ DE RIENZO, M.A.; STEVENSON, P.S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm disruption using microbial surfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 868–876, 2016.

DIERICKX, S.; CASTELEIN, M.; REMMERY, J.; DE CLERCQ, V.; LODENS, S.; BACCILE, N.; DE MAESENEIRE, S.L.; ROELANTS, S.L.K.W.; SOETAERT, W.K. From bumblebee to bioeconomy: Recent developments and perspectives for sophorolipid biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 54, 107788, 2021.

DIERICKX, S.; MAES, K.; ROELANTS, S.L.K.W.; POMIAN, B.; MEULEBROEK, L.V.; DE MAESENEIRE, S.L.; VANHAECKE, L.; SOETAERT, W.K. A multi-omics study to boost continuous bolaform sophorolipid production. **New Biotechnology**, v. 66, 107-115, 2022.

- DOLMAN, B.M.; KAISERMANN, C.; MARTIN, P.J.; WINTERBURN, J.B. Integrated sophorolipid production and gravity separation. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 162–171, 2017.
- DURÁN, N.; DURÁN, M.; JESUS, M.B.; SEABRA, A.B.; FÁVARO, W.J.; NAKAZATO, G. Silver Nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, p. 789-799, 2016.
- DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; ALVES, O.L.; SOUZA, G.I.H.; ESPOSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, 3, 8, 2005.
- EMBRAPA. Perdas e desperdício de alimentos. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-perdas-e-desperdicio-de-alimentos/sobre-o-tema>> Acesso em 04 de março de 2022.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2013). **Food wastage footprint**. Summary report. FAO: Rome, Italy. Available at: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3347e/i3347e.pdf>> (Acesso em maio 2022).
- FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2019). **The State of Food and Agriculture 2019**. Moving forward on food loss and waste reduction. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <<https://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>> (Acesso em fevereiro 2023)
- FELSE, PA; SHAH, V; CHAN, J; RAO, KJ; GROSS, RA. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 316–323, 2007.
- FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N. KIM, J.O. A mechanist study of the antibacterial effects of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 662–668, 2000.
- FILIPE, G.A.; BIGOTTO, B.G.; BALDO, C.; GONÇALVES, M.C.; KOBAYASHI, R.K.T.; LONNI, A.A.S.G.; CELLIGOI, M.A.P.C. Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil against acne-causing bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 2022.
- FLEURACKERS, S.J.J. On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 5–12, 2006.
- FORTUNATI, E.; ARMENTANO, I.; ZHOU, Q.; IANNONI, A.; SAINO, E.; VISAI, L.; BERGLUND, L.A.; KENNY, J.M. Multifunctional bionanocomposite films of poly (lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1596-1605, 2012.
- FRACCHIA, L; BANAT, JJ; CAVALLO, M; CERESA, C; BANAT, IM. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 144–162, 2015.

- FU, S.L.; WALLNER, S.R.; BOWNE, W.B.; HAGLER, M.D.; ZENILMAN, M.E.; GROSS, R.; BLUTH, M.H. Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. **Journal of Surgical Research**, v. 148, p. 77–82, 2008.
- FUKUOKA, T.; MORITA, T.; SAIKA, A.; HABE, H. Application of glycolipid biosurfactants as surface modifiers in bioplastics. **Journal of Oleo Science**, v. 67, p. 1609-1616, 2018.
- GAO, R.; FALKEBORG, M.; XU, X.; GUO, Z. Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1103–1111, 2013.
- GAO, Y.; PICOT, O. T.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Influence of filler size on the properties of poly(lactic acid) (PLA)/graphene nanoplatelet (GNP) nanocomposites. **European Polymer Journal**, v. 86, p. 117–131, 2017.
- GARG, M; PRIYANKA; CHATTERJEE, M. Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. **Biotechnology Reports**, v. 18, e00251, 2018.
- GAUR, V.K.; REGAR, R.K.; DHIMAN, N.; GAUTAM, K.; SRIVASTAVA, J. K.; PATNAIK, S.; KAMTHAN, M.; MANICKAM, N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida spp.*: Application as food emulsifier and antibacterial agent. **Bioresource Technology**, v. 285, 121314, 2019.
- GISSLER-BLANK, S.; SCHILLING, M.; THUM, O.; SIEVERDING, E. Use of **sophorolipids and derivatives thereof in combination with pesticides as adjuvant/additive for plant protection and the industrial non-crop field**. Patent US. 2012/0220464 A1, 2012.
- GÓMEZ-GRAÑA, S.; PEREZ-AMENEIRO, M.; VECINO, X.; PASTORIZA-SANTOS, I.; PEREZ-JUSTE, J.; CRUZ, J.; MOLDES, A. Biogenic synthesis of metal nanoparticles using a biosurfactant extracted from corn and their antimicrobial properties. **Nanomaterials**, v. 7, 139, 2017.
- GONÇALVES, P.; GONÇALVES, C.; BRITO, P.; SAMPAIO, J. P. The *Wickerhamiella/Starmerella* clade – A treasure trove for the study of the Evolution of yeast metabolism. **Yeast Primer**, v. 37, p. 313-320, 2020.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim SBCTA**, v. 30, p. 3-15, 1996.
- GONZÁLEZ, A.; IGARZABAL, C.I.A. Soy protein and poly(lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v.33, p. 289-296, 2013.
- GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T.; TULLOCH, A.P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 6199, p. 846–855, 1961.

- GOULART, R.M.M. Desperdício de alimentos: um problema de saúde pública. **Integração**, v. 54 p. 285-288, 2008.
- GUPTA, R.; REETIKA, K. **Biosynthesis of novel sophorolipids using *Candida bombicola* ATCC 22214: characterization and applications**. Thesis, (Doctor of Philosophy in Biotechnology), The University of Pune, India, 2012.
- HAFARAJOLLAH, H.; MEHVARI, S.; HABIBIAN, M.; MOKHTARANI, B.; NOGHABI, K. A. Rhamnolipid biosurfactant adsorption on a plasma-treated polypropylene surface to induce antimicrobial and antiadhesive properties. **RSC Advances**, v. 5, p. 33089–33097, 2015.
- HAN, J.H. **Innovations in Food Packaging**. 2 ed. USA: Elsevier Academic Press, 2014.
- HAN, J. W.; RUIZ-GARCIA, L.; QIAN, J.P; YANG, X.T. Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 860-877, 2018.
- HILLION, G. **Use of a sophorolipid to provide free radical formation inhibiting activity or elastase inhibiting activity**. Patent 5.756.471, 1998.
- HIPÓLITO, A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; BERSANETI, G.T.; MALI, S.; CELLIGOI, M.A.P.C. Active biodegradable cassava starch films containing sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* ATCC® 22214™. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, p. 3199–3209, 2021.
- HIPÓLITO, A.; SILVA, R.A.A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; AMADOR, I.R.; PANAGIO, L.A.; BORSATO, D., CELLIGOI, M.A.P.C. Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.29, p.101797, 2020.
- HOA, N.L.H.; LOAN, L.Q.; SANG, V.T.; MINH, L.V.; DUNG, L.V.; HUONG, P.T.T.; DUONG, P.V.; DUNG, N.H. Production and characterization of sophorolipids by *Candida bombicola* using catfish fat. **Ho Chi Minh City University of Education - Journal of Science**, v. 14, p. 152, 2017.
- HOMMEL, R; STIIWER, O; STUBER, W; HAFERBURG, D; KLEBER, HP. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 199–205, 1987.
- 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, p. 147–155, 1994.
- HU, X.; SUBRAMANIAN, K.; WANG, H.; ROELANTS, S.L.K.W.; SOETAERT, W.; KAUR, G.; LIN, C.S.K.; CHOPRA, S.S. Bioconversion of food waste to produce industrial scale sophorolipid syrup and crystals: dynamic life cycle assessment (dLCA) of emerging biotechnologies. **Bioresource Technology**, v. 337, 125474, 2021.

- HUAIMIN, W.; ROELANTS, S.; TO, M.; PATRIA, R.; KAUR, G.; SZE LAU, N.; YIN LAU, C.; VAN BOGAERT, I.; SOETAERT, W.; LIN, C. *Starmerella bombicola*: recent advances on sophorolipid production and prospects of waste stream utilization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, p. 999–1007, 2018.
- INGHAM, B., WINTERBURN, J. Developing an understanding of sophorolipid synthesis through application of a central composite design model. **Microbial Biotechnology**, v. 15, p. 1744-1761, 2022.
- JADHAV, J.V.; PRATAP, A.P.; KALE, S.B. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 15-24, 2019.
- JEEVAHAN, J., CHANDRASEKARAN, M. Nanoedible films for food packaging: a review. **Journal of Materials Science**, v. 54, p. 12290–12318, 2019.
- JEZIEWSKA, S.; CLAUS, S.; LEDESMA-AMARO, R.; VAN BOGAERT, I. Redirecting the lipid metabolism of the yeast *Starmerella bombicola* from glycolipid to fatty acid production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 1697–1706, 2019.
- JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: optimization, monitoring and mixing effect. **Biochemical Engineering**, v. 115, p. 93–100, 2016.
- JIMÉNEZ-PEÑALVER, P. **Sophorolipids by solid-state fermentation: from lab-scale to pilot scale** (Ph.D. Thesis) Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, 2017.
- JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; RODRÍGUEZ, A.; DAVEREY, A.; FONT, X.; GEA, T. Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy: state of the art and perspectives. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 18, p. 413-435, 2019.
- JIN, T.; ZHANG, H. Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 127-134, 2018.
- KARSTEN, S.; DREJA, M.; NOGLICH, J. **Low-residue detergent for hard surfaces**. Patent WO2011051161A1, 2010.
- 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.
- KE, J.; XIAO, L.; YU, G.; WU, H.; SHEN, G.; ZHANG, Z. The study of diffusion kinetics of cinnamaldehyde from corn starch-based film into food simulant and physical properties of antibacterial polymer film. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 642-650, 2019.
- KHALID, H.F.; TEHSEEN, B.; SARWAR, Y.; HUSSAIN, S.Z.; KHAN, W.S.; RAZA, Z.A.; BAJWA, S.Z.; KANARAS, A.G.; HUSSAIN, I.; REHMAN, A. Biosurfactant coated silver

- and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Hazardous Materials**, v. 364, p. 441-448, 2018.
- KASTURE, M.B.; PATEL, P.; PRABHUNE, A.A.; RAMANA, C.V.; KULKARNI, A.A.; PRASAD, B.L.V. Synthesis of silver nanoparticles by sophorolipids: Effect of temperature and sophorolipid structure on the size of particles. **Journal of Chemical Sciences**, v. 120, p. 515–520, 2008.
- KIM, J-H.; OH, Y-R.; HAN, S-W.; JANG, Y-A.; HONG, S. H.; AHN, J.H.; EOM, G.T. Enhancement of sophorolipids production in *Candida batistae*, an unexplored sophorolipids producer, by fed-batch fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 831–839, 2021a.
- KIM, J-H.; OH, Y-R.; HWANG, J.; KANG, J.; KIM, H.; JANG, Y-A.; LEE, S.S.; HWANG, S.Y.; PARK, J.; EOM, G.T. Valorization of waste-cooking oil into sophorolipids and application of their methyl hydroxyl branched fatty acid derivatives to produce engineering bioplastics. **Waste Management**, v. 124, p. 195-202, 2021b.
- KIM, J-H.; OH, Y-R.; HWANG, J.; JANG, Y-A.; LEE, S.S.; HONG, S.H.; EOM, G.T. Value-added conversion of biodiesel into the versatile biosurfactant sophorolipid using *Starmerella bombicola*. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 1, 100027, 2020.
- KIM, K.; YOO, D.; KIM, Y.; LEE, B.; SHIN, D.; KIM, E.K. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 235-241, 2002.
- KOLYBABA, M.; TABIL, L.; PANIGRAHI, S.; CRERAR, W.; POWELL, T.; WANG, B. **Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future**; American Society of Agricultural and Biological Engineers: St. Joseph, MI, USA, 2006.
- KOKURA, S.; HANDA, O.; TAKAGI, T.; ISHIKAWA, T.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetic. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 570-574, 2010.
- KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; MORITA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. **Journal of Oleo Science**, v. 57, p. 359–369, 2008.
- KONISHI, M.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; UEMURA, S.; IWABUCHI, H.; KITAMOTO, D. Efficient production of acid-form sophorolipids from waste glycerol and fatty acid methyl esters by *Candida floricola*. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 4, p. 489–496, 2018.
- KOWSALYA, E.; MOSACHRISTAS, K.; BALASHANMUGAM, P.; SELVI, A.T.; RANI, J.C.I. Biocompatible silver nanoparticles/poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibers for potential antimicrobial food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, 100379, 2019.
- KUMAR, R.; GHOSHAL, G.; GOYAL, M. Development and characterization of corn starch based nanocomposite film with AgNPs and plant extract. **Materials Science for Energy**

Technologies, v. 3, p. 672-678, 2020.

KUMAR, D.V.R.; KASTURE, M.; PRABHUNE, A.A.; RAMANA, C.V.; PRASAD, B.L.V.; KULKARNI, A.A. Continuous flow synthesis of functionalized silver nanoparticles using bifunctional biosurfactants. **Green Chemistry**, v. 12, p. 609–615, 2010.

KUMAR, A.; SINGH, J.; BASKAR, C. **Lactic Acid Production and Its Application in Pharmaceuticals**. In: Bioactive Natural Products in Drug Discovery. Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2020.

KURTZMAN, C.P.; PRICE, N.P.J.; RAY, K.J.; KUO, T. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, n. 2, p. 140-146, 2010.

LI, H.; GUO, W.; MA, X.; LI, J.; SONG, X. In vitro and in vivo anticancer activity of sophorolipids to human cervical cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, p. 1372–1387, 2017.

LIAU, S.Y.; READ, D.C.; PUGH, W.J.; FURR, J.R.; RUSSELL, A.D. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 279-283, 1997.

LIU, X.; MA, X.; YAO, R.; PAN, C.; HE, H. Sophorolipids production from rice straw via SO₃ micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **AMB Express**, v. 6, p. 6-60, 2016, 2017.

LIU, Z.; TIAN, X.; CHEN, Y.; LIN, Y.; MOHSIN, A.; CHU, J. Efficient sophorolipids production via a novel in situ separation technology by *Starmerella bombicola*. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 1–10, 2019.

LYDON, H.L.; BACCILE, N.; CALLAGHAN, B.; MARCHANT, R.; MITCHELL, C.A.; BANAT, I.M. Adjuvant antibiotic activity of acidic sophorolipids with potential for facilitating wound healing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, p. 02547-02516, 2017.

MA, X.; LI, H.; WANG, D.; SONG, X. Sophorolipid production from delignified corncob residue by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 96219. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 475–483, 2014.

MA, X.; MENG, L.; ZHANG, H.; ZHOU, L.; YUE, J.; ZHU, H.; YAO, R. Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 77-100, 2019.

MADDIKERI, G.L.; GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal**, v. 263, p. 479–487, 2015.

MAENG, Y.; KIM, K.T.; ZHOU, X.; JIN, L.; KIM, K.S.; KIM, Y.H.; LEE, S.; PARK, J.H.; 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.

MALATHI, A.N.; SANTHOSH, K.S.;UDAYKUMAR, N. Recent trends of Biodegradable polymer: Biodegradable films for Food Packaging and application of nanotechnology in biodegradable food packaging. **Current Trends in Technology and Science**, v. 3, p. 73-79, 2014.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; GARCÍA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, 157-164, 2005.

MANTOVAN, J.; BERSANETI, G.T.; FARIA-TISCHER, P.C.S.; CELLIGOI, M.A.P.C.; MALI, S. Use of microbial levan in edible films based on cassava starch. **Food Packaging and Shelf Life**, v.18, p. 31–36, 2018.

MARCHANT, R; BANAT, IM. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 9, p. 1597–1605, 2012.

MARKETS AND MARKETS. **Biosurfactants market analysis | recent market developments | industry forecast to 2016–2022**. 2017. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactant-market-163644922.html>> (Acessado em 30 de julho 2022).

MARTIN, O.; AVÉROUS, L. Poly (lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. **Polymer**, v. 42, p. 6209-6219, 2001.

MATHEW, S.; SNIGDHA, S.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E.K. Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 155-166, 2019.

MCNEILL, J.; BARRIE, F.R.; BUCK, W.R.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTHS, D.L.; HERENDEEN, P.S.; KNAPP, S.; MARHOLD, K.; PRADO, J.; PRUD'HOMME VAN REINE, W.F.; SMITH, G.F.; WIERSEMA, J.H.; TURLAND, N.J. **International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants** (Melbourne Code) Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011; Koeltz Scientific Books: Königstein, Germany, v. 154, ISBN 9783874294256, 2012.

MENDOZA, A. J. Tartaric acid cross-linking of starch: effects of reaction conditions on the maximum tensile strength of cast plastic films. **The Journal of Student Science and Technology**, v. 8, p. 41-47, 2015.

MENZEL, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; VILAPLANA, F. Antioxidant starch films containing sunflower hull extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, p. 142-151, 2019.

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, 2016.

- MISHRA, S.; SINGH, H.B. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1097–1107, 2015.
- MORAES, A.R.F.; GOUVEIA, L.E.R.; SOARES, N.F.F.; SANTOS, M.M.S.; GOLÇALVES, M.P.J.C. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 33-36, 2007.
- MOTELICA, L.; FICAI, D.; FICAI, A.; OPREA, O.C.; KAYA, D.A.; ANDRONESCU, E. Biodegradable antimicrobial food packaging: Trends and Perspectives. **Foods**, v. 9, 1438, 2020.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p.509–515, 2006.
- MULLA, M.; AHMED, J.; AL-ATTAR, H.; CASTRO-AGUIRRE, E.; ARFAT, Y. A.; AURAS, R. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. **Food Control**, v. 73, p. 663-671, 2017.
- 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**, v. 127, n.1, p. 12-28, 2019.
- NG, H.S.; KEE, P.E.; YIM, H.S.; CHEN, P-T.; WEI, Y-H.; LAN, J.C-W. Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. **Bioresource Technology**, v. 302, 122889, 2020.
- NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidante efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**, v. 84, p. 312-320, 2018.
- OLANYA, OM; UKUKU, DO; SOLAIMAN, DKY; ASHBY, RD; NIEMIRA, BA; MUKHOPADHYAY, S. Reduction in *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli O157:H7* in vitro and on tomato by sophorolipid and sanitiser as affected by temperature and storage time. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1303–1315, 2018.
- OLIVEIRA, MR; MAGRI, A; BALDO, C; CAMILIOS-NETO, D; MINUCELLI, T; CELLIGOI, MAPC. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and its Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 16, n. 2, p. 161–174, 2015.
- ONYEAKA, H.; OBIKEKE, K.; MAKAKA, G.; NWOKOLO, N. Current research and applications of starch based biodegradable films for food packaging. **Polymers**, v. 14, 1126, 2022.
- ORTEGA, F.; GARCÍA, M.A.; ARCE, V.B. Nanocomposite films with silver nanoparticles synthesized in situ: Effect of corn starch content. **Food Hydrocolloids**, v. 97, 105200, 2019.

- ORTEGA, F.; GIANNUZZI, L.; ARCE, V.B.; GARCÍA, M.A. Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 152–162, 2017.
- OZDENER, M.H.; ASHBY, R.D.; JYOTAKI, M.; ELKADDI, N.; SPIELMAN, A.I.; BACHMANOV, A.A.; SOLAIMAN, D.K.Y. Sophorolipid biosurfactants activate taste receptor type 1 member 3-mediated taste responses and block responses to bitter taste in vitro and in vivo. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 22, p. 441-449, 2019.
- PAULINO, BN; PESSÔA, MG; MANO, MCR; MOLINA, G; NERI-NUMA, IA; PASTORE, GM. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 24, p. 10265–10293, 2016.
- PEKIN, G; VARDAR-SUKAN, F; KOSARIC, N. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 357–362, 2005.
- PONTES, C.; SANTOS, M.A.; RIBEIRO, M.H.; GONÇALVES, L.; BETTENCOURT, A.F.; RIBEIRO, I.A. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, p. 697-708, 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**, v. 348, p. 33-41, 2012.
- QAZI, M.A.; WANG, Q.; DAI, Z. Sophorolipids bioproduction in the yeast *Starmerella bombicola*: Current trends and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 346, 126593, 2022.
- RAJAN, R.; CHANDRAN, K.; HARPER, S.L.; YUN, S-I.; KALAICHELVAN, P.T. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 356–373, 2015.
- RANJI, H.; BABAJANZADEH, B.; SHERIZADEH, S. Detergents and surfactants: a brief review. **Open Access Journal of Science**, v. 3, p. 94–99, 2019.
- RAU, U; HAMMEN, 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.
- REBELLO, S.; ASOK, A.K.; MUNDAYOOR, S.; JISHA, M.S. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants, **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, p. 275–287, 2014.
- ROELANTS, S.L.K.W.; CIESIELSKA, K.; DE MAESENEIRE, S.L.; MOENS, H.; EVERAERT, B.; VERWEIRE, S.; DENON, Q.; VANLERBERGHE, B.; VAN BOGAERT, I.N.A.; VAN DER MEEREN, P. Towards the industrialization of new biosurfactants: biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, p. 550–559, 2016.

- ROELANTS, S., SOLAIMAN, D.K.Y., ASHBY, R.D., LODENS, S., VAN RENTERGHEM, L., SOETAERT, W. **Chapter 3- Production and Applications of Sophorolipids**. In: *Biobased surfactants (second edition). Synthesis, properties and applications*, p. 65-119. AOCS PRESS, 2019.
- ROELANTS, S.; VAN RENTERGHEM, L.; MAES, K.; EVERAERT, B.; REDANT, E.; VANLERBERGHE, B.; DEMAESENEIRE, S.; SOETAERT, W. **Taking biosurfactants from the lab to the market: hurdles and how to take them by applying an integrated process design approach**, CRC Press, 2018.
- SAERENS, K.M.J.; ROELANTS, S.L.K.W.; VAN BOGAERT, I.N.A.; SOETAERT, W. Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGT1A1, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214. **FEMS Yeast Research**, v. 11, p. 123–132, 2011.
- SALAM, H.A.; RAJIV, P.; KAMARAJ, M.; JAGADEESWARAN, P.; GUNALAN, S.; SIVARAJ, R. Plants: Green route for nanoparticle synthesis. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 85-90, 2012.
- SALMAN, J.A.S; KADHEMY, M.F.H.; SAMIJALEEL, M.; ABDAL, A.H. Effect of PVA, PVA/Biosurfactant on Some Pathogenic Bacteria in Glass and Plastic Plates. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, p. 301-309, 2014.
- SAMAD, A.; ZHANG, J.; CHEN, D.; CHEN, X.; TUCKER, M.; LIANG, Y. Sweet sorghum bagasse and corn stover serving as substrates for producing sophorolipids. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, p. 353–362, 2017.
- SARUBBO, L.A., SILVA, M.G.C.; DURVAL, I.J.B.; BEZERRA, K.G.O.; RIBEIRO, B.G.; SILVA, I.A.; TWIGG, M.S.; BANAT, I.M. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, 108377, 2022.
- SATPUTE, S.K.; PŁAZA, G.A.; BANPURKAR, A.G. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, p. 46-54, 2017.
- SCHÖNHERR, J.; BAUR, P.; UHLIG, B.A.; OBSTBAU, G.; OBSTBAU, A.; HANNOVER, U.; STEINBERG, A.; SARSTEDT, D. Rates of cuticular penetration of 1-Naphthylacetic Acid (NAA) as affected by adjuvants, temperature, humidity and water quality. **Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 61–74, 2000.
- SEN, S.; BORAH, S.N.; BORA, A.; DEKA, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Microbial Cell Factories**, v.16, n.1, 2017.
- SEN, S.; BORAH, S.N.; KANDIMALLA, R.; BORA, A.; DEKA, S. Sophorolipid biosurfactant can control cutaneous dermatophytosis caused by *Trichophyton mentagrophytes*. **Frontiers Microbiology**, v. 11, p. 329, 2020.
- SHAH, V; BADIA, D; RATSEP, P. Sophorolipids having enhanced antibacterial activity.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 397–400, 2007.
- SHAH, V.; DAVEREY, A. Effects of sophorolipids augmentation on the plant growth and phytoremediation of heavy metal contaminated soil. **Journal of Cleaner Production**, v. 280, 124406, 2021.
- SHAH, V.; DONCEL, GF; SEYOUM, T; EATON, KM; ZALENSKAYA, 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.
- SHAH, V., JURJEVIC, M., BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 512–515, 2007.
- SHANKAR, S.; RHIM, J-W.; WON, K. Preparation of poly(lactide)/lignin/silver nanoparticles composite films with UV light barrier and antibacterial properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1724-1731, 2018.
- SHARMA, D. **Biosurfactants in Food** (1st ed.). Part of the Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition book series (BRIEFSFOOD). Berlin: Springer International Publishing, p. 1-19, 2016.
- SHARMA, R.; OBEROI, H. S. Biosurfactant-aided bioprocessing: industrial applications and environmental impact. **Recent advances in Applied Microbiology II (eds)**, Chapter 3, p. 55-88, Springer, Singapore, 2017.
- SHARMA, V.K.; YNGARD, R.A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 83–96, 2009.
- SIEVERDING, E. **Increasing yields by the use of sophorolipids**. Patent WO2015172964A1, 2015.
- SILVA, I.A.; VERAS, B.O.; RIBEIRO, B.G.; AGUIAR, J.S.; CAMPOS GUERRA, J.M.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. **PeerJ**, v. 8, e9064, 2020.
- SILVEIRA, V.A.I.; MARIM, B.M.; HIPÓLITO, A.; GONÇALVES, M.C.; MALI, S.; KOBAYASHI, R.K.T.; CELLIGOI, M.A.P.C. Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, 100591, 2020.
- SILVEIRA, V. A. I.; NISHIO, E. K., URZEDO, C. A. Q.; AMADOR, I. R.; KOBAYASHI, R. T.; CARETTA, T. O.; MACEDO, F.; CELLIGOI, M. A. P. C. Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, 101287, 2019.
- SILVEIRA, V.A.I.; QUEIROZ, C.A.U.; CELLIGOI, M.A.P.C. Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: a promising alternative to conventional drugs. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 6, p. 87-90, 2018.

- SINGH, R.; GLICK, B.R.; RATHORE, D. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: a review. **Pedosphere**, v. 28, p. 170–189, 2018.
- SINGH, S.; PATEL, P.; JAISWAL, S.; PRABHUNE, A.A.; RAMANA, C.V.; PRASAD, B.L.V. A direct method for the preparation of glycolipid–metal nanoparticle conjugates: sophorolipids as reducing and capping agents for the synthesis of water re-dispersible silver nanoparticles and their antibacterial activity. **New Journal of Chemistry**, v. 33, p. 646–652, 2008.
- SLEIMAN, J. N.; KOHLHOFF, S. A.; ROBLIN, P. M.; WALLNER, S.; GROSS, R.; HAMMERSCHLAG, M. R.; ZENILMAN M.E.; BLUTH, M. H. Sophorolipids as antibacterial agents. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 39, p. 60–63, 2009.
- SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J. A.; KRISHNAMA, A.; VASANTHAN, N. Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 342–348, 2015.
- 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.
- SPENCER, J.F.; GORIN, P.A.; TULLOCH, A.P. *Torulopsis bombicola* sp.n. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 36, p. 129–133, 1970.
- SUBRAMANI, K.; SUBBIAH, U.; HUJA, S. Nanotechnology in orthodontics: The past, present, and a perspective of the future. **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry**, p. 279–298, 2019.
- SUNG, S. H.; CHANG, Y.; HAN, J. Development of polylactic acid nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals derived from coffee silverskin. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 495–503, 2017.
- TAKMA, D.K.; KOREL, F. Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. **Food Packaging and Shelf-Life**, v. 19, p. 210–217, 2019.
- TANG, J.; HE, J.; XIN, X.; HU, H.; LIU, T. Biosurfactants enhanced heavy metals removal from sludge in the electrokinetic treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 2579–2592, 2018.
- TAWAKKAL, I.S.; CRAN, M.J.; MILTZ, J.; BIGGER, S.W. A review of poly (lactic acid)-based materials for antimicrobial packaging. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 1477–1490, 2014.
- TO, M.H.; WANG, H.; LAM, T.N.; KAUR, G.; ROELANTS, S.L.K.W.; LIN, C.S.K. Influence of bioprocess parameters on sophorolipid production from bakery waste oil. **Chemical Engineering Journal**, v. 429, 132246, 2022.

- TULLOCH, A.P.; SPENCER, J.F.T.; DEINEMA, M.H. A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 46, p. 345–348, 1968.
- TWIGG, M.S.; BACCILE, N.; BANAT, I.M.; DÉZIEL, E.; MARCHANT, R.; ROELANTS, S.; VAN BOGAERT, I.N.A. Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 147-170, 2021.
- UNEP. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. 2015. **Sustainable Development Goals**. Disponível em: <<https://www.undp.org/content/undp/en/home/sustainable-development-goals.html>> Acesso em 04 de março de 2022.
- UNIÃO EUROPÉIA. Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003. **Official Journal of European Union**, v. 178, p. 24–27, 2003.
- UNIÃO EUROPÉIA. Circular Economy Action Plan. **A New Circular Economy Action Plan for a Cleaner and More Competitive Europe March 2020**. Disponível em: <https://ec.europa.eu/environment/circular-economy/index_en.htm> Acesso em 27 de agosto de 2022.
- URANGA, J.; PUERTAS, A.I.; ETXABIDE, A.; DUENAS, M.T.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Citric acid-incorporated fish gelatina/chitosan composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 235-242, 2019.
- VALOTTEAU, C; BANAT, IM; MITCHELL, CA; LYDON, H; MARCHANT, R; BABONNEAU, F; PRADIER, CM; BACCILE, N; HUMBLLOT, V. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 325–334, 2017.
- VAN BOGAERT, INA; SAERENS, K; DE MUYNCK, C; DEVELTER, D; SOETAERT, W; VANDAMME, EJ. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23–34, 2007.
- VAN BOGAERT, I.N.A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 821–833, 2011.
- VAN RENTERGHEM, L.; CLICQUE, H.; HUYST, A.; ROELANTS, S.L.K.W.; SOETAERT, W. Miniaturization of *Starmerella bombicola* fermentation for evaluation and increasing (novel) glycolipid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 4347-4362, 2019.
- VAN RENTERGHEM, L.; ROELANTS, S. L. K. W.; BACCILE, N.; UYTTERSROT, K.; TAELEMAN, M. C.; EVERAERT, B.; MINCKE, S.; LEDEGEN, S.; DEBROUWER, S.; SCHOLTENS, K.; STEVENS, C.; SOETAERT, W. From lab to market: An integrated bioprocess design approach for new-to-nature biosurfactants produced by *Starmerella bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 1195–1206, 2018.

- VASCONCELOS, G.M.D.; MULINARI, J.; DE SCHMIDT, V.K.; MATOSINHOS, R.D.; DE OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; DE ANDRADE, C.J. Biosurfactants as green biostimulants for seed germination and growth. **International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology**, v. 6, 2020.
- VAUGHN, S.F.; BEHLE, R.W.; SKORY, C.D.; KURTZMAN, C.P.; PRICE, N.P.J. Utilization of sophorolipids as biosurfactants for postemergence herbicides. **Crop Protection**, v. 59, p. 29–34, 2014.
- VILLARREAL-REYES, C.; LEÓN-MARTÍNEZ, L.D.; FLORES-RAMÍREZ, R.; GONZÁLEZ-LARA, F.; VILLARREAL-LUCIO, S.; VARGAS-BERRONES, K.X. Ecotoxicological impacts caused by high demand surfactants in Latin America and a technological and innovative perspective for their substitution. **Science of Total Environment**, v. 816, 151661, 2022.
- WADEKAR, S. D.; KALE, S.; LALI, A.; BHOWMICK, D. N. Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 125-142, 2012.
- WANG, H.; ROELANTS, S.L.K.W.; TO, M.H.; PATRIA, R.D.; KAUR, G.; LAU, N.S.; LAU, C.Y.; VAN BOGAERT, I.N.A.; SOETAERT, W.; LIN, C.S.K. *Starmerella bombicola*: recent advances on sophorolipid production and prospects of waste stream utilization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, p. 999–1007, 2019.
- WANG, H.; TSANG, C.-W.; TO, M. H.; KAUR, G.; ROELANTS, S. L. K. W.; STEVENS, C. V.; SOETAERT, W.; LIN, C. Techno-economic evaluation of a biorefinery applying food waste for sophorolipid production – a case study for Hong Kong. **Bioresource Technology**, v. 303, 122852, 2020.
- WANG, Q.M.; YURKOV, A.M.; GOKER, M.; LUMBSCH, H.T.; LEAVITT, S.D.; GROENEWALD, M.; THEELEN, B.; LIU, X.Z.; BOEKHOUT, T.; BAI, F.Y. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 149–189, 2015.
- WYRWA, J.; BARSKA, A. Innovations in the food packaging Market: active packaging. **European Food Research and Technology**, v. 243, p. 1681-1692.
- WONGSIRICHOT, P., INGHAM, B., WINTERBURN, J. A review of sophorolipid production from alternative feedstocks for the development of a localized selection strategy. **Journal of Cleaner Production**, v. 319, 128727, 2021.
- WORLDWIDE FUND FOR NATURE. **Solucionar a Poluição Plástica – Transparência e Responsabilização**. ISBN 978-2-940529-93-3. Disponível em: <<http://promo.wwf.org.br/solucionar-a-poluicao-plastica-transparencia-e-responsabilizacao>> Acesso em 25 novembro 2019.
- XIE, J.; HUANG, L.; WANG, R.; YE, S.; SONG, X. Novel visible light-responsive graphene oxide/Bi₂WO₆/starch composite membrane for efficient degradation of ethylene. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, 116640, 2020.

- XU, H.; CHENG, H.; MCCLEMENTS, D.J.; CHEN, L.; LONG, J.; JIN, Z. Enhancing the physicochemical properties and functional performance of starch-based films using inorganic carbon materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 295, 119743, 2022.
- YANG, X.; ZHU, L.; XUE, C.; CHEN, Y.; QU, L.; LU, W. Recovery of purified lactonic sophorolipids by spontaneous crystallization during the fermentation of sugarcane molasses with *Candida albicans* O-13-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 348–353, 2012.
- YATIM, A.R.; AHMAD, N.; HASSAN, Z.A.A. Application of a palm-based sophorolipid as a liquid deodorant. **Transfer Technology**, v. 461, p. 1–4, 2010.
- ZHANG, X.; ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; 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, p. 176-182, 2017.
- ZHANG, X.; FAN, X.; SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; LIU, Z.; MUKHOPADHYAY, S.; YAN, R. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on the surface of spinach leaves by biobased antimicrobial surfactants. **Food Control**, v. 60, p. 158–165, 2016.
- 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. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 455–464, 2018.
- 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.; 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.