



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CHRISTIANE APARECIDA URZEDO QUEIROZ FREITAS

**SOFOROLIPÍDIOS DE *STARMERELLA BOMBICOLA* COMO  
SANITIZANTE NAS ETAPAS DE ABATE E  
PROCESSAMENTO DE AVES**

---

Londrina  
2021

CHRISTIANE APARECIDA URZEDO QUEIROZ FREITAS

**SOFOROLIPÍDIOS DE *STARMERELLA BOMBICOLA* COMO  
SANITIZANTE NAS ETAPAS DE ABATE E  
PROCESSAMENTO DE AVES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito ao título de Doutorado em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mayka Reghiany Pedrão

Londrina  
2021

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

F866    Aparecida Urzedo Queiroz Freitas, Christiane .  
Soforolipídios de *Starmarella bombicola* como sanitizante nas etapas de abate e processamento de aves / Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas. - Londrina, 2021.  
156 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.  
Coorientador: Mayka Reghiany Pedrão.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Biossurfactante - Tese. 2. Soforolipídios - Tese. 3. Sanitizante - Tese. 4. Indústria Avícola - Tese. I. Pedrine Colabone Celligoi, Maria Antonia. II. Pedrão, Mayka Reghiany . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

CHRISTIANE APARECIDA URZEDO QUEIROZ FREITAS

**SOFOROLIPÍDIOS DE *STARMERELLA BOMBICOLA* COMO  
SANITIZANTE NAS ETAPAS DE ABATE E  
PROCESSAMENTO DE AVES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito ao título de Doutorado em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Fábio Augusto Garcia Coró  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Márcio de Barros  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiani Baldo da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Guillen Moreira Gasparim  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de março 2021.

Dedico este trabalho a nosso Senhor Jesus Cristo,  
a nossa Mãe Maria Santíssima e a minha amada  
família.

## **AGRADECIMENTOS**

**À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi**, pelo carinho, amizade, dedicação, orientação, apoio e incentivo durante estes 4 anos... “A minha Mãe da Pesquisa”.

**À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mayka Reghiany Pedrão**, pela força, incentivo e sempre acreditar e mim... “A minha Madrinha da Pesquisa”.

**À minha parceira e amiga de pesquisa Victória...** você foi muito importante em todos estes anos.... “O meu anjo da guarda”.

**Ao meu esposo Sérgio**, que sempre incentivou e acreditou em mim.... “Amor, você é muito especial...”.

**Às minhas filhas Barbara e Izadora**, pela compreensão e carinho...

**Aos meus pais, Divina e Irizon**, sem vocês eu nada seria...

**Aos professores que compõe minha banca**, vocês são especiais nesta trajetória...

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

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

**Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia**, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e concretização de um sonho.

*“Ame o Senhor, o seu Deus, de todo o seu coração, de toda a sua alma, de todas as suas forças e de todo o seu entendimento...”*

**Lucas 10:27**

FREITAS, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz. **Soforolipídios de *Starmarella bombicola* como sanitizante nas etapas de abate e processamento de aves.** 2021. 154 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de exportações de carne de frango, porém exigências dos importadores são rígidas no controle da qualidade higiênico e sanitário dos produtos brasileiros. Dessa forma, a preocupação das empresas com os níveis de contaminação nas indústrias culmina em estudos para utilização de sanitizantes nas diversas etapas do processo de abate e processamento de aves para reduzir a contaminação e consequentes perdas econômicas. O sofrólipídio possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias contaminantes de alimentos. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram produzir sofrólipídios pela levedura *Starmarella bombicola* e utilizar como sanitizante nas etapas de abate e processamento de aves por aspersão, simulando a etapa de lavagem de carcaças no processo de evisceração e imersão, a etapa de lavagem das carcaças no pré resfriamento. A produção de sofrólipídios foi em biorreator de bancada, utilizando glicose e ácido oleico, como substratos e posteriormente aplicado como controles: água de torneira clorada (0,2 a 2,0ppm) (A) e água de torneira clorada + etanol 45% (B) soluções sanitizantes: - solução com água de torneira com 45% etanol (v/v) com 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (C, D e E) de sofrólipídios, respectivamente. No tratamento por imersão as amostras foram expostas a solução em diferentes tempos (30, 60 e 90 minutos. A produção máxima de sofrólipídios atingiu 69,83  $\text{g.L}^{-1}$  que foi caracterizado principalmente como forma lactônica C18:1 diacetilada. Os sofrólipídios apresentaram efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos. Na sanitização por aspersão a redução mais significativa foi com 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo a redução de 1,32 para *S. aureus*, 1,47 para *E. coli*, 1,43 para coliformes termotolerantes e 1,05 para aeróbios mesófilos. Na água de imersão, a ação sanitizante aumentou gradativamente com o tempo de exposição, 90 minutos com a concentração de 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 30 minutos de exposição a concentração de 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  levou a redução total das células viáveis dos microrganismos estudados. Os sofrólipídios demonstraram potencial inovador com grande perspectiva para a indústria avícola, como agente descontaminante, trazendo maior segurança alimentar aos produtos e diminuição das perdas por contaminação.

**Palavras-chave:** biossurfactante; sofrólipídios; sanitizante; indústria avícola.

FREITAS, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz. **Sophorolipids from *Starmerella bombicola* as a sanitizer in the poultry slaughter and processing stages**. 2021. 154 p. Thesis (Doctorate in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Brazil is in the first position in the world ranking of exportation of chicken meat, however importers require very strict measures in the control of hygienic and sanitary quality of Brazilian products. In this sense, the concern of companies with the levels of contamination in the industries culminates in studies for the use of sanitizers in the various stages of poultry processing, aiming to reduce contamination and consequent economic losses. Sophorolipids possess a well-known antimicrobial action against foodborne bacteria. Therefore, the objectives of this work were to produce sophorolipids by the yeast *Starmerella bombicola* and to use this biosurfactant as a sanitizer in the slaughter and poultry processing stages by spraying, simulating the carcass washing step in the evisceration, and by immersion, simulating the carcass washing step pre-cooling. The sophorolipids production was performed in a bench bioreactor, using glucose and oleic acid as substrates, and consequently applied as controls: chlorinated tap water (0.2 to 2.0 ppm) (A) and chlorinated tap water + 45% ethanol (B). The sanitizing solutions were: solution with tap water with 45% ethanol (v/v) with 500, 2,250 and 4,000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (C, D and E) of sophorolipids, respectively. In the immersion treatment, the samples were exposed to the solution at different times (30, 60 and 90 minutes). The maximum production of sophorolipids reached 69.83  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , which was characterized mainly as a C18: 1 diacetylated lactonic form. Sophorolipids had an antimicrobial effect against *S. aureus*, *E. coli*, thermotolerant coliforms and mesophilic aerobes. In spray sanitization, the most significant reduction was achieved with 4,000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , with a reduction of 1.32 for *S. aureus*, 1.47 for *E. coli*, 1.43 for thermotolerant coliforms and 1.05 for mesophilic aerobes. In immersion water, the sanitizing action gradually increased with the exposure time. The treatments of 90 minutes with the concentration of 2,250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 30 minutes of exposure to the concentration of 4,000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  led to the total reduction of viable cells of the studied microorganisms. Sophorolipids demonstrated an innovative potential with great prospects for the poultry industry, as a sanitizing agent, bringing improved food security to products and reducing losses due to contamination.

**Keywords:** biosurfactant; sophorolipids; sanitizing agent; poultry industry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Via da biossíntese de soforolipídios.....	36
<b>Figura 2</b>	Formas estruturais principais dos soforolipídios. (A – Forma acídica; B – Forma lactônica).....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Agentes sanitizantes aplicados em aves para redução de carga microbiológica .....	29
<b>Tabela 2</b>	Concentração Mínima Inibitória (CMI) de soforolipídios para diferentes bactérias .....	42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVO GERAL .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1	AVICULTURA NO BRASIL .....	16
3.2	ABATE E PROCESSAMENTO DE FRANGO.....	17
3.3	MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EM CARNE DE FRANGO .....	21
3.4	SANITIZANTES UTILIZADOS NA INDÚSTRIA AVÍCOLA.....	26
3.5	SURFACTANTES E BIOSURFACTANTES .....	30
3.6	SOFOROLIPÍDIOS: BIOSÍNTESE E ESTRUTURA .....	33
3.7	ATIVIDADES ANTIMICROBIANA DOS SOFOROLIPÍDIOS.....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
4.1	MATERIAIS.....	44
4.1.1	Microrganismos .....	44
4.1.2	Meios De Preservação, Ativação, Pré Inoculo E Fermentação Da S. Bombicola.....	44
4.1.3	Meios De Identificação E Contagem De Bactérias .....	44
4.2	MÉTODOS.....	45
4.2.1	Preservação, Ativação E Pré-Inoculo Da S. Bombicola.....	45
4.2.2	Produção De Soforolipídios .....	45
4.2.3	Extração, Quantificação E Identificação De Soforolipídios .....	46
4.2.4	Crescimento Microbiano E Consumo De Substratos.....	46
4.2.5	Avaliação Da Ação De Soforolipídios Como Sanitizante Aplicados Por Aspersão E Imersão Em Carcaças E Cortes De Frango .....	47
4.2.5.1	Amostragem .....	47
4.2.5.2	Tratamento das amostras com soforolipídios .....	47
4.2.5.3	Análises microbiológicas .....	50
4.2.6	Análise Estatística .....	52

4.2.6.1	Estatística descritiva .....	52
4.2.6.2	Redes neurais artificiais (RNA ou ANN) .....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
5.1	PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS .....	54
5.2	SOFOROLIPÍDIOS COMO SANITIZANTE, APLICADOS POR ASPERSÃO E IMERSÃO EM CARÇAÇAS E CORTES DE FRANGO .....	54
5.2.1	Artigo Científico .....	54
5.2.2	Patente 1 .....	82
5.2.3	Patente 2 .....	82
5.2.4	Patente 3 .....	83
5.2.5	Patente 4 .....	84
5.2.6	Artigo De Revisão .....	84
5.2.7	Capítulo De Livro .....	84
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>110</b>
	APÊNDICE A – Patente 1 .....	111
	APÊNDICE B – Patente 2 .....	121
	APÊNDICE C - Patente 3 .....	133
	APÊNDICE D – Patente 4 .....	145

## INTRODUÇÃO

A avicultura no país se desenvolveu e ocupa uma posição de destaque na economia, representado por um total de exportação de 4,2 milhões de toneladas de carne de frango sendo o Brasil o maior exportador do mundo.

Dentro desta cadeia produtiva estão dezenas de agroindústrias espalhadas por diversos estados brasileiros, em regiões que se destacam pela presença de colônias de países da Europa e do Japão. A indústria brasileira de carne de aves está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, sendo que o estado do Paraná contribui para 34,32% do volume abatido no país. O consumo per capita de carne de frango em 2019 foi de 42,84 Kg/hab., superando o consumo 2018.

A qualidade do produto brasileiro é reconhecida internacionalmente, e o fez ser um dos mais concorridos do mercado mundial, com sabor e textura única. Entretanto, as restrições diante da presença de microrganismos patogênicos bem como a utilização de produtos químicos de forma indevida dentro da cadeia de produção avícola são severas e abrangentes, com regulamentações e avaliações técnicas que apontam os impactos à sanidade, à produtividade animal e principalmente na segurança dos alimentos. Ademais, por se tratar de um alimento altamente perecível, assim como os demais produtos cárneos, a conservação e transporte inadequados da carne de frango podem afetar de forma negativa seus atributos de qualidade, tornando-a indesejável do ponto de vista do consumidor e sendo um entrave na sua comercialização. Os desafios em preservar as características do produto e prolongar sua vida de prateleira devem ser compreendidos e considerados nas várias etapas do processo que se inicia no campo e termina na mesa do consumidor.

A automação nas fábricas proporciona agilidade elevando a produtividade, melhorando fluxos e, conseqüentemente reduzindo o tempo de permanência da carne no processamento. Assim sendo, o melhor fluxo de processo, leva a uma garantia do principal ponto crítico de controle (PCC) no abate de aves “Resfriamento da carne em 4°C no período máximo de 4 horas”. Mas, por outro lado, a operação fica dependente de algumas variáveis como:

manutenções preditivas e preventivas, uniformidade da matéria prima e treinamento de operadores, fatores críticos que podem levar a um descumprimento de procedimentos sanitários operacionais (PSO), com consequente contaminações entéricas nas carcaças de frango, propiciando assim a colonização de bactérias como aeróbios mesófilos, *Salmonella* spp., coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. Estes contaminantes devem ser controlados e monitorados devido a segurança alimentar, bem como qualidade da carne de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019, Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

A contaminação microbiológica nas carcaças de frango, provém das aves vivas ou pela incorporação em alguma fase do abate, com rompimento do trato gastrointestinal, destacando-se a evisceração. Estes microrganismos aderidos a pele das carcaças, em temperatura corporal das aves e ambiente não refrigerado, confere a esta etapa do processamento de aves uma grande importância, visto que a manipulação para inspeção das mesmas e retirada das contaminações através de toaletes com faca intensificam ainda mais a proliferação das culturas.

A preocupação das empresas com os níveis de contaminação nas indústrias culmina em diferentes estudos para utilização de coadjuvantes nas diversas etapas do processo de abate e processamento de aves com objetivo de reduzir a contaminação nos produtos e equipamentos, para diminuição da contagem de microrganismos tanto nas instalações quanto na carne, sendo a contagem total de aeróbios mesófilos o indicativo para tal redução.

Os sofrorolipídios, biossurfactantes microbianos e atóxicos, possuem características físico-químicas desejáveis para diversas aplicações industriais e biotecnológicas, sendo de maior destaque atualmente, a sua potencial aplicação como agente antimicrobiano, para uma série de cepas bacterianas e fúngicas, no tratamento de infecções hospitalares, combate a microrganismos causadores de cáries, aumento do rendimento de plantações por seu emprego no controle de pragas, componente de misturas germicidas para a limpeza de frutas e vegetais devido a sua ação sanitizante de grande destaque.

Os sofrorolipídios são glicolipídios, metabólitos secundários, produzidos por muitas leveduras não patogênicas, destacando a levedura *Starmerella*

*bombicola*, a partir de açúcares e lipídios, secretados para o meio extracelular como uma mistura de compostos de estruturas químicas relacionadas que possuem ação antibacteriana comprovada em diversos estudos, incluindo bactérias contaminantes do processo de abate e processamento de aves.

Diante do exposto, este estudo propôs o uso de um novo agente sanitizante, os soforolipídios de *S. bombicola*, para a melhoria das condições microbiológicas das carcaças de frango em diferentes etapas do abate e processamento de aves, utilizado como coadjuvante juntamente com a água aspergida no primeiro chuveiro, para a lavagem de carcaças após a evisceração e também na água dos tanques de imersão, na etapa de pré resfriamento, para redução logarítmica de contaminantes e prevenção de contaminação cruzada e manutenção da inocuidade das carcaças.

## OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar soforolipídios produzidos pela levedura *Starmerella bombicola*, como sanitizante na água utilizada para lavar carcaças de frango, simulando diferentes etapas do abate e processamento de aves.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter soforolipídios de *S. bombicola* em biorreator de bancada, acompanhando pelo consumo de glicose e ácido oleico, crescimento microbiano;
- Avaliar a ação antimicrobiana dos soforolipídios contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos, em carcaças de frango e aplicados pelo sistema de aspersão e imersão e em cortes de frango, contra aeróbios mesófilos aplicados pelo sistema de imersão;
- Analisar, o efeito do tempo de exposição e da concentrações do soforolipídios como agente descontaminante por estatística descritiva;
- Avaliar os resultados através de redes neurais.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 AVICULTURA NO BRASIL

A produção brasileira de carne de frango alcançou 13,245 milhões de toneladas em 2019, ocupando a terceira posição no *ranking* mundial em produção, sendo 4,214 milhões de toneladas exportadas, volume este que dá o Brasil o primeiro lugar em exportação de carne de aves mundialmente. O Paraná é o estado brasileiro líder na produção de carne de frango, representando 34,69% do total de frangos abatidos em 2019, seguido por Santa Catarina (15,40%), Rio Grande do Sul (14,32%) e São Paulo (8,26%) (ABPA, 2019).

Os principais fatores relacionados a este aumento de produção são melhoramento genético, nutrição, ambiência, bem como manejo e o aumento da densidade populacional nas granjas de frango de corte (ZIECH, 2015), levando a problemas com a qualidade das carcaças e, conseqüentemente, relevante número de condenações, que provocam significativas perdas no setor avícola em todo o país (EBLING; BASURCO, 2011). Além disso, a intensificação da produção colaborou com a produtividade e eficiência da indústria avícola, mas em contrapartida aumentou o risco de disseminação de doenças infecciosas e a necessidade de um maior controle da qualidade dos produtos (LANSINI, 2010), sendo a contaminação gastrointestinal é a fonte de disseminação de microrganismos e uma das causas de condenações totais de carcaças e a mais frequente dentre os motivos de condenações parciais (EBLING; BASURCO, 2011).

A abertura de novos mercados e o aumento da preocupação dos consumidores com a inocuidade dos produtos avícolas tem exercido grande influência no aprimoramento dos sistemas de controle da sua qualidade em toda a cadeia produtiva, a começar pelo setor industrial. Nesse contexto, o programa APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) tem papel importante, pois foi desenvolvido para controlar perigos potenciais ao consumidor, dentre eles os microbiológicos, através do monitoramento de microrganismos indicadores de qualidade e patogênicos (SILVA; NÄÄS;

MOURA, 2009).

As análises de microrganismos patogênicos como *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* é onerosa, diante disso microrganismos indicadores são monitorados como indicativo de processo no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus sp.* são alguns dos grupos de microrganismos frequentemente analisados nas carcaças nos abatedouros como indicadores de processo (SILVA ; NÄÄS; MOURA, 2009).

A contagem total de bactérias aeróbias mesófilas tem sido usada como indicador de qualidade, determinando se a limpeza, a desinfecção e o controle de temperaturas durante os processos industriais foram realizados de forma adequada, além de fornecer informações sobre a vida útil do produto (PENTEADO & ESMERINO, 2011).

A presença de bactérias do grupo dos coliformes, cujo habitat é o trato intestinal do homem e dos animais, indica contaminação de origem ambiental e fecal nos produtos, já a presença de alto número de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes em alimentos é indicativo da presença de patógenos intestinais, visto que a população deste grupo é constituída de alta proporção de *Escherichia coli*. (CARVALHO et al., 2005).

### 3.2 ABATE E PROCESSAMENTO DE FRANGO

No Brasil, o abate de aves deve ocorrer conforme o estabelecido no RIISPOA: Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (2017) e Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves - Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998, da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA (BRASIL, 1998). Nesses regulamentos são tratadas questões referentes ao pré-abate, que engloba a apanha e transporte dos animais e abate que consiste nas seguintes etapas: Pendura, Insensibilização, Sangria, Escaldagem, Depenagem, Evisceração, Pré-resfriamento, Gotejamento, Espostejamento ou Corte, Classificação, Embalagem, Resfriamento ou Congelamento e Armazenamento.

No processo de abate e processamento de frango, as aves são abatidas com idade variando entre 38 a 52 dias de criação, sendo procedentes de granjas integradas, e transportadas em caminhões com contentores. Quando chegam ao abatedouro, os frangos são recepcionados na área de espera que obedece aos critérios de bem-estar animal, e posteriormente, são abatidos, passando pelos processos de descarga, pendura, insensibilização, sangria, escaldagem, depenagem, evisceração, pré-resfriamento e gotejamento, e posteriormente corte, embalagem, resfriamento ou congelamento, estocagem e expedição (BRASIL, 1998).

Neste trabalho estaremos dando foco as etapas de evisceração, (lavagem de carcaças) e pré resfriamento, etapas responsáveis pela minimização ou aumento da disseminação dos microrganismos contaminantes no processo de abate e processamento de aves.

As contaminações visíveis, quando presentes nas carcaças, devem ser eficientemente removidas, a fim de minimizar as contaminações bacterianas oriundas do trato intestinal. A microbiota das carcaças de aves é constituída de patógenos, bactérias indicadoras de contaminação fecal e microrganismos deteriorantes (STEFANI et al., 2011) e apesar de todos os esforços, que vão desde o adequado jejum alimentar até o treinamento e conscientização dos operadores na regulagem correta dos equipamentos, a contaminação das carcaças por conteúdo gastrintestinal ocorre, em maior ou menor grau, independentemente do método de evisceração (manual ou automática) (DEPNER, 2015). A contaminação de carcaças devido a rupturas das vísceras durante os processos de evisceração pode ser reduzida com a melhoria na regulagem dos equipamentos de evisceração em função do peso dos lotes e velocidade de abate (SILVA, R. B. T. R. Da; NÄÄS; MOURA, 2009).

O critério de tolerância zero para contaminação gastrintestinal visível antes do pré-resfriamento tem sido adotado como padrão de desempenho nos planos de APPCC ao redor do mundo. O Brasil também estabelece o critério de ausência de contaminação visual interna e externa nas carcaças antes da entrada do chiller (BRASIL, 1998). Embora contestada, essa regra se baseia no pressuposto de que o material gastrintestinal é fonte primária de patógenos de origem alimentar e, quando presente nas carcaças na entrada do pré-

resfriamento, pode ser uma fonte de contaminação cruzada dentro do chiller (BRIZIO, A.P.D.R.; ISOLAN, L.W.; SALLES, B.; PRENTICE, 2013).

A lavagem das carcaças, como alternativa ao refile à faca das partes contaminadas da carcaça, no processamento de aves, é permitida e utilizada nos Estados Unidos desde 1978, porque estudos mostraram a equivalência dos dois sistemas em remover a contaminação gastrointestinal (BASHOR et al., 2004), e atualmente, esta técnica é também legalizada no Canadá e nos Estados-membros europeus. Estes países utilizam lavadores de carcaças a fim de cumprir o limite crítico de tolerância zero para contaminação gastrointestinal visível (SMITH et al., 2005). Além disso a lavagem de carcaças é indicada e aceita como equivalente ao sistema de refile, por órgãos internacionais como Codex Alimentarius.

Trata-se de um sistema de bicos aspersores com pressão e vazão controladas de água que lava as carcaças externa e internamente. Assim, além da contaminação visível, que tem como padrão a sua ausência, a lavagem pode contribuir para a redução das contagens bacterianas e para a melhoria da qualidade do produto final (USDA, 2016; HUGAS & TSIGARIDA, 2008; CFIA, 2013). A redução da população microbiana superficial da carcaça pela lavagem depende da pressão, da temperatura, do tempo e do volume de água gasto na lavagem, além da utilização ou não de coadjuvantes com ação sanitizante, onde alguns já são aprovados e amplamente utilizados, como Estados Unidos e Europa (BOLDER, 1997), trazendo assim vantagens que podem resultar em maior segurança dos alimentos.

No Brasil, em 2011, foi aprovada uma resolução autorizando o emprego do sistema de lavagem de carcaças no processo de abate de aves para remover a contaminação por conteúdo gastrointestinal visível presente nas superfícies internas e externas das carcaças, como alternativa à prática do refile tradicional e sua publicação gerou insegurança quanto a possíveis prejuízos à inocuidade do produto (DEPNER, 2015; BRASIL, 2011).

No sistema tradicional de remoção da contaminação gastrointestinal visível, na técnica de refile, as carcaças contaminadas têm suas partes afetadas cortadas e, posteriormente, condenadas. Além das perdas econômicas advindas das condenações e da depreciação das carcaças que deixam de ser comercializadas inteiras, o processo envolve diversos

operadores, que devem estar altamente instruídos para a identificação correta das contaminações e evitar contaminação cruzada entre as carcaças pelas próprias mãos e pelo material de trabalho. Além disso, frequentemente, as carcaças precisam ser removidas da linha de abate e colocadas em linha paralela para que sejam recortadas adequadamente e posteriormente recolocadas na linha principal. Essa etapa aumenta a manipulação e o tempo de processamento das carcaças, podendo implicar em multiplicação microbiana (DEPNER, 2015; STEFANI et al., 2011).

O procedimento de lavagem de carcaças reduz o número de funcionários na etapa de revisão e conseqüentemente os riscos de falhas humanas na identificação de contaminações visíveis e a manipulação no processo de abate. Além disso, melhora o fluxo nas linhas de evisceração e reduz o risco de contaminação devido a eliminação de facas e luvas nessa etapa. Somado a estas vantagens operacionais, esse sistema também elimina perdas econômicas por condenação de partes de frango. Aproximadamente 2% da produção nacional poderiam ser revertidas em carne comercializável, além de evitar perdas econômicas devido as avarias e depreciação de carcaças, que impedem que as mesmas sejam comercializadas inteiras, sendo destinadas a cortes com menor valor agregado, como frango a passarinho, acrescido do ganho pela redução do número de funcionários na linha de revisão e seleção (STEFANI et al., 2011).

Outro fator de relevância é a velocidade das linhas de abate, que tendem a aumentar em função da mecanização das atividades e podem estar comprometendo a confiabilidade dos exames visuais por parte dos operadores, exigindo mais funcionários para a realização da tarefa e, às vezes, prejudicando a qualidade visual e microbiológica das carcaças que entram no chiller. A maior exposição dos músculos na carcaça é outro problema do refile, já que a pele é removida para a retirada da contaminação. A exposição do músculo favorece a aderência de microrganismos e a conseqüente veiculação destes para outras carcaças (STEFANI et al., 2011).

Após a evisceração e inspeção das aves, as carcaças são destinadas ao pré resfriamento, que visa reduzir rapidamente a temperatura da carcaça e assim, inibir a multiplicação de bactérias mesófilas, sejam deteriorantes, ou patogênicas, como por exemplo *E. coli* e *Salmonella* (DAMASCENO;

GUAHYBA; DE CAMPOS, 2013). Nesta etapa as carcaças são imersas, em tanques denominados chillers, contendo água a temperatura máxima de 16°C no primeiro estágio e máximo 4°C no último estágio, sendo a permanência nestes tanques de imersão, por um período que varia de 50 a 70 minutos. A renovação de água nos tanques, contendo cloro máximo 5 ppm é constante em sentido contracorrente a movimentação das carcaças na proporção mínima de 1,5 L por carcaça no primeiro estágio e 1,0 L por carcaça no último estágio. A temperatura das carcaças no final do processo de pré-resfriamento deve ser igual ou inferior a 7°C intramuscular. A temperatura do sistema é obtida por água gelada e gelo produzido com instalações e equipamentos dentro da premissa higiênico-sanitária (BRASIL, 1998).

Após saírem do pré-resfriamento, as carcaças seguem para o gotejamento, onde ficam gotejando, sendo que a absorção total do início ao final do sistema de Pré-Resfriamento é de no máximo 8,0% de água referente ao peso inicial da carcaça. O pré-resfriamento é um das principais etapas, no processo de abate e processamento de frangos, para prevenção de contaminação cruzada por microrganismos patogênicos e deteriorantes em produtos. Esta etapa é monitorada conforme prevê o Programa de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Procedimentos Sanitários Operacionais (PSO) (BRASIL, 1998). A carne de frango pode se tornar fonte de veiculação de microrganismos patogênicos quando produzida, manipulada ou armazenada sem os devidos cuidados higiênico-sanitários. A ingestão de alimentos contaminados com patógenos, provenientes de manipulação e processamento inadequados, torna-se um dos riscos mais importantes à saúde coletiva.

### 3.3 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES EM CARNE DE FRANGO

A incidência de microrganismos na carne de frango varia de acordo com as condições de manejo durante a criação dos animais e com os cuidados higiênico-sanitários nas operações de abate e manipulação das carcaças, e estão diretamente relacionados à segurança alimentar e à vida de prateleira do produto. Os microrganismos encontrados nas carcaças são provenientes da

pele e das penas das aves vivas, das vias respiratórias, do trato intestinal desses animais e do ambiente de processamento na indústria. O trato intestinal das aves, especialmente de frango, galinhas e perus, é um dos principais reservatórios naturais de microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. Porém, além desses, outras bactérias mesófilas, responsáveis por toxinfecções alimentares, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, também podem ser isoladas da carne de aves (OLIVEIRA et al., 2016). A ruptura do trato gastrointestinal durante as etapas da evisceração é grande fonte de contaminação, que infecta externa e/ou internamente as carcaças com material fecal visível e também com microrganismos que podem ser patogênicos. As bactérias, incluindo patógenos, que entram nas plantas de abate com os frangos, são contaminantes potenciais dos equipamentos, o que pode resultar na contaminação cruzada das carcaças à medida que essas se movem pela fábrica (BOLDER, 1997).

As taxas mundiais de condenação de carcaças de aves variaram de 0,41 a 4,13 %, e no Brasil chegam até 8,97 %, porcentagens superiores à média mundial (OLIVEIRA et al., 2016). Dentre as principais causas dessas condenações está a contaminação microbiológica, que provém tanto das aves vivas como por incorporação em alguma fase do abate. Os microrganismos que entram nas plantas de abate com os frangos, são contaminantes potenciais dos equipamentos, o que pode resultar na contaminação cruzada das carcaças à medida que essas se movem pela fábrica (DEPNER, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

A carne de frango é uma importante *commodity* alimentar e a previsão de produção é que se atinja 134,5 milhões de toneladas até 2026, assegurando a liderança entre todos os tipos de produção de carne (AHMED; HIREMATH; JACOB, 2016a). Em contrapartida com esse cenário de crescimento econômico, há também um aumento no risco de contaminações e preocupação com a transmissão de patógenos, assim como a necessidade de um maior controle da qualidade higiênico e sanitário dos produtos. Além disso, atualmente os parâmetros microbiológicos da carne de frango são requisitos de grande importância e exigidos pelas legislações relacionadas a exportação da carne de aves, sendo um requisito técnico usado como barreira econômica.

Segundo Holley e Gill (2005), o interior do produto cárneo é considerado estéril até o momento do corte, e a deterioração da carne está relacionada ao crescimento de bactérias em sua superfície, pois algumas bactérias como a *Salmonella* spp., se aderem fortemente na pele de carcaças de frango, sendo dificilmente eliminadas apenas por lavagem com água.

Os alimentos de origem animal, com destaque para as aves, são os maiores responsáveis pela disseminação de microrganismos causadores de toxinfecções alimentares (MAHAMI et al., 2019). Os principais patógenos encontrados são *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (AHMED, HIREMAT, JACOB, 2016b; JAMES, PRUCHA, BREWER, 1993; SILVA, 1998). Microrganismos deteriorantes também podem estar presentes diminuindo a shelf-life de produtos avícolas *in natura* e dessa forma, impactar negativamente nos lucros.

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas tem sido usada como indicador de qualidade, determinando se a limpeza, a desinfecção e o controle de temperaturas durante os processos industriais foram realizados de forma adequada, além de fornecer informações sobre a vida útil do produto. A presença de bactérias do grupo coliformes indica contaminação de origem ambiental e fecal nos produtos, já a presença de alto número de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes em alimentos é indicativo da presença de patógenos intestinais (FRANCO, LANDGRAF, 2002; GILL, 1998). No Brasil, o padrão microbiológico para carne de aves é definido pela INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019, Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitárias (BRASIL, 2019).

Surtos de doenças alimentares são um problema de saúde pública, causando anualmente 600 milhões de doenças e 420.000 mortes em todo o mundo (WHO, 2015). *Salmonella* spp., *Campylobacter* e *Listeria* estão entre os principais patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos, sendo os principais fatores de risco o manejo e o consumo de frango cru ou mal cozido e outras carnes, leite cru e águas contaminadas (AHMED et al., 2018).

Segundo os dados do World Health Organization (WHO, 2010), casos de salmonelose em humanos são uma preocupação de ordem global, por apresentarem uma significativa mortalidade, além de estarem presentes em todos os continentes. Esta disseminação é desigual entre as diferentes partes

do mundo, sendo mais significativa nos países subdesenvolvidos. Ainda assim, na América do Norte este número é superior a um milhão de casos por ano e na América do Sul, o que inclui o Brasil, ultrapassa os oito milhões de casos. De fato, a base de cálculo do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) demonstra que o agente causador do maior número de surtos alimentares entre os anos de 2000 e 2014 foi a *Salmonella* spp. (1564 surtos ou 38,2 %) ficando bem à frente do segundo colocado (*Staphylococcus aureus*; 798 surtos; 19,5 %). Dentre os surtos causados por alimentos contaminados, a carne de aves, incluindo processados e miúdos foi responsável pelo significativo número de 239 surtos alimentares durante estes anos. Apesar de ser uma estimativa bem abaixo dos números globais, estes dados são alarmantes e destacam a importância de estudos frente a microrganismos patogênicos, tais como a *Salmonella*, e frente ao alimento, como a carne de frango.

A *Salmonella* spp. é uma bactéria Gram-negativa que causa gastroenterite em humanos, sendo classificada como uma DTA (Doença Transmitida por Alimento). Nas aves, a *Salmonella* está normalmente presente no trato intestinal (CORRIER et al., 1999), sendo que os sorotipos que causam a salmonelose em humanos não mostram sintomas evidentes de infecções nestes animais (POPE; CHERRY, 2000). Os sorotipos de *Salmonella* mais comuns que causam a DTA pertencem à subespécie *entérica* (*Salmonella enterica*), sendo que *enteritidis* e *typhimurium* são os principais sorovares isolados e estão entre as primeiras posições nos surtos alimentares nos Estados Unidos (USDA, 2012), países da União Europeia (EFSA, 2011) e Brasil (BRASIL, 2014). Além do mais, a presença de *Salmonella* spp. nas aves se constitui em importante barreira ao comércio internacional de alimentos, se tornando um entrave para a expansão da avicultura. São muitos os pontos críticos que favorecem a presença de *Salmonella* nas aves, como manejo sanitário e transporte dos animais, o cuidado nas etapas no frigorífico que, se não executados corretamente, favorecem a contaminação microbiana na carne (DELAZARI, 2001), além da comercialização no varejo e higiene no preparo dos pratos no dia a dia, demonstrando a necessidade de um controle em toda a cadeia produtiva.

A formação de biofilmes por *Salmonella* e *Listeria* é outra preocupação para a indústria de alimentos devido à sua forte aderência nas superfícies e

risco de contaminação constante do produto. Nas salas de corte das indústrias de abate e processamento de aves utilizam-se esteiras condutoras dos produtos, sendo importante caracterizar os microrganismos isolados a partir deste local. No processo de sanitização de superfícies, método utilizado para prevenir contaminação cruzada, existem algumas evidências de que as práticas atualmente aplicadas são menos efetivas sobre microrganismos aderidos, sésseis, do que sobre células planctônicas, ou seja, células livres e devido à importância dos biofilmes, novos produtos são constantemente desenvolvidos para melhorar a eficiência de limpeza das superfícies, que entram em contato com o alimento durante o processamento, dentre estes produtos, destacam-se os surfactantes (KANASHIRO et al., 2007; ZEICH, 2015).

*Listeria monocytogenes* é um importante patógeno na cadeia de produção da carne de frango que deve ser monitorado na rotina da fiscalização e inspeção, pois é um microrganismo que possui habilidade de formar biofilmes e de se propagar indefinidamente dentro de uma indústria. Segundo Barbalho et al. (2007), *Listeria spp.* suporta condições adversas mais facilmente que outros microrganismos, e mesmo indústrias mais tecnificadas, com uma rotina de higienização bem estruturada, não estão livres da contaminação por este microrganismo.

Embora a legislação brasileira não estabeleça parâmetros para coliformes totais em carne de frango in natura, estes microrganismos são importantes visto que permitem inferir sobre sua qualidade de processamento, armazenamento, distribuição para consumo, sua vida de prateleira e os potenciais riscos para a saúde pública. Nesse contexto, a pesquisa de coliformes pode fornecer informações sobre as condições higiênico-sanitárias as quais o alimento foi submetido, pois este grupo dos coliformes é composto pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*. De acordo com a temperatura de fermentação da lactose com produção de gás, este grupo pode ser dividido em dois: os coliformes totais e os termotolerantes. A identificação de coliformes totais em água e alimentos não necessariamente irá indicar contaminação fecal uma vez que esse grupo de bactérias não possui origem exclusivamente entérica. Dessa forma, podem ser contaminadas devido

a práticas inadequadas de manipulação. Em relação aos coliformes termotolerantes, a identificação desse grupo de microrganismos nos alimentos pode ser interpretada como indicador de contaminação fecal visto que a esse grupo pertencem as estirpes de *Escherichia coli* e essas bactérias têm origem exclusiva no trato intestinal de homens e animais. Cepas de *E. coli* podem contaminar os alimentos a partir de manipuladores infectados, da água contaminada por matéria fecal humana, de embalagens, equipamentos e utensílios mal higienizados. A presença de *E. coli* no alimento pode representar risco à saúde coletiva, visto que algumas linhagens possuem potencial patogênico e são consideradas agentes causadores de gastroenterites em humanos.

#### 3.4 SANITIZANTES UTILIZADOS NA INDÚSTRIA AVÍCOLA

A aprovação da utilização de chuveiros pressurizados para lavagem de carcaças nos abatedouros de aves dos Estados Unidos (SMITH et al., 2005), e resolução autorizando o emprego da metodologia no Brasil para remover a contaminação por conteúdo gastrintestinal visível presente nas superfícies internas e externas das carcaças, como alternativa à prática do refile tradicional (BRASIL, 2011; DEPNER, 2015), está abrindo caminho para novas pesquisas e concomitantemente a lavagem, várias estratégias têm sido aplicadas ao longo de todo o processo produtivo, a fim de controlar os patógenos de origem alimentar, porém, esses tratamentos possuem vantagens e desvantagens (HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

As legislações europeia e americana, prevê o uso de descontaminantes químicos, como o hipoclorito de sódio, ozônio e ácido láctico, que são utilizados para a redução da contagem bacteriana da superfície das carnes, carcaças de aves ou de bovinos (HUGAS; TSIGARIDA, 2008). A legislação americana permite o uso de concentrações superiores a 20 ppm de cloro na água de uso comum da indústria e 50 ppm de cloração na água de imersão dos pré resfriadores, com objetivo de prevenir a contaminação cruzada entre as carcaças e os equipamentos do processo produtivo. Dessa forma, o

cloro mantém a atividade antimicrobiana por um longo período de tempo, controlando o crescimento e a proliferação bacteriana na água tratada. No entanto, o tempo de contato e a carga orgânica dos sistemas de lavagem de aves são amplamente variáveis (BASHOR et al., 2004). Além disso o uso frequente dos compostos clorados pode levar a uma ineficiência dos mesmos, pois o uso prolongado resulta em tolerância aos compostos pelos microrganismos (MOKGATLA et al., 1998).

Além do cloro, outros compostos como ácido láctico e ozônio também são comuns nas indústrias avícolas americanas e europeias. Nos Estados Unidos soluções com até 5 % de ácido láctico são aspergidas em carcaças de frango após a etapa de pré-resfriamento, além da utilização de ozônio para todos os produtos de carne de frango (COMISSÃO, 2013; U.S.A., 2016). Por outro lado, a comunidade europeia regulamenta o uso de solução de ácido láctico, de 2 a 5% e níveis de cloração de até 5 ppm de cloro livre na água do chiller (COMISSÃO, 2013; EFSA, 2011).

O uso de ácidos orgânicos apresenta uma potencial desvantagem que é a possível descoloração da carne de frango, podendo ser temporária ou permanente, dependendo das variáveis: concentração, tempo e temperatura de aplicação (TOLDRÁ, 2009), porém com alta performance quando combinado com outros compostos (SILVEIRA et al., 2019)

Dentre os sanitizantes mencionados, o cloro é um dos agentes mais utilizados nos processos de descontaminação de carcaças, tendo seu efeito comprovado por diferentes pesquisas (DUARTE et al., 2009; PANG, YUK, 2018). Em contrapartida, a utilização desse composto é limitada quando a carne se destina à exportação para União Europeia, pois este mercado tolera a utilização de cloro a no máximo 5 ppm. Outro país que possui restrição referente ao cloro é a Rússia. A legislação russa limita o uso de cloro a 0,5 ppm para a água de entrada do sistema de pré resfriamento, embasada pela possibilidade da oxidação do cloro produzindo agentes cancerígenos. Do mesmo modo, a utilização da lavagem das carcaças com água ativada eletroquimicamente ou água eletrolisada é limitada, pois possui alta concentração de ácido hipocloroso (RUSSEL, 2005). No Brasil não é permitido a utilização de qualquer adjunto ou compostos descontaminantes no processamento de abate das aves, sendo utilizado somente cloração da água

de no máximo 1 ppm de cloro livre e a água de renovação dos resfriadores até 5 ppm (BRASIL, 1998).

É importante salientar que a aplicação de certas “intervenções” nas carcaças durante as etapas do processo de abate, removeria ou inativaria a contaminação bacteriana, melhorando a segurança da carne (OF, 2003). Vários tipos intervenções vêm sendo estudados, especialmente no exterior, e alguns já são aplicados na rotina dos abatedouros. Tais tratamentos incluem além do refil a lavagem de carcaças, rinsagem com água quente, cloro e derivados, ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico, fumárico), TSP (fosfato trisódico), sorbatos e benzoatos, bacteriocinas (nisina), bacteriófagos, culturas de lactobacilos e lactococcus, peróxido de hidrogênio, ozônio, pressão hidrostática ultra alta, irradiação gama, eletricidade por campo pulsado, energia ultrassônica e luz ultravioleta, amônia quaternária, sendo o tratamento químico antibacteriano mais utilizado para carcaças nas indústrias, o ácido lático (HUGAS, TSIGARIDA, 2008; OF, 2003).

Northcutt et al. (2007) afirmam que a redução das contagens bacterianas das carcaças através do uso de lavadores pode ser melhorada com uma cloração mais consistente da água, sendo a redução destas contagens de grande importância, pois a carne de aves destaca-se entre os alimentos que estão relacionados com maior frequência nos surtos de doenças transmitidas por alimentos, devido ao seu consumo aumentado nos últimos anos. A presença de bactérias nos alimentos, além de favorecer a deterioração e/ou redução da vida útil desses produtos, possibilita a veiculação de patógenos, acarretando potenciais riscos à saúde do consumidor (CARVALHO et al., 2005).

Na Tabela 1 apresenta estudos de diferentes compostos utilizados como sanitizantes, por aplicados pelos sistemas de aspersão/pulverização e imersão contra microrganismos contaminantes do abate e processamento de aves.

**Tabela 1** - Agentes sanitizantes aplicados em aves para redução de carga microbiológica

Desinfetante	Aplicação	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Tempo de exposição	Redução		Referência
				(Log UFC/g)	Microrganismo	
Hipoclorito de Sódio	Imersão e Pulverização	50	5 min	0,87-0,90	Células viáveis	Sinhamahapatra & Bhattacharyya (2004)
	Imersão e Pulverização	50	15 s	0,30 - 1,17	Células viáveis	Fabrizio & Cutter (2002)
	Imersão	100 a 200	5 min	0,41 - 0,83	<i>Salmonella</i>	Lee et al. (2014)
Dióxido de Cloro	Imersão	50	15 min	0,25 - 0,79	<i>Listeria monocytogenes</i>	Alonso-Hernando & Capita (2009)
	Pulverização	10	15,30 s	0,13- 0,51	<i>Campylobacter e Enterobacteriaceae</i>	Purnell (2014)
Ácido Lático	Imersão	10.000 a 20.000	1,3 min	2,05 a 5,01	<i>Salmonella</i>	Zaki & El-sherif (2015)
Água ácida eletrolisada	Imersão e Pulverização	50	3 min	0,35 - 1,31	<i>Campylobacter</i>	Hermans et al. (2011)
	Imersão e Pulverização	50	15 s	0,19 - 1,31	Células viáveis	Fabrizio et al. (2002)
Água eletrolizada baixa acidez	Imersão	10	10 min	1,39 - 2,32	<i>Listeria monocytogenes</i>	Rahman et al. (2010)
	Imersão	10	10 min	1,92	<i>Salmonella typhimurium</i>	

**Fonte:** Próprio autor

Por se tratar de um alimento altamente perecível, assim como os demais produtos cárneos, o desafio em preservar as características do produto e prolongar sua vida de prateleira devem ser compreendidos e considerados nas várias etapas do processo que se inicia na fazenda e termina no prato do consumidor (VENTURINI; SARCIELLI; SILVA, 2007). Uma das medidas utilizadas na produção animal para minimizar estes desafios na comercialização da carne de frango é o uso de aditivos sintéticos, como os antimicrobianos e antioxidantes adicionados nas dietas das aves e nas etapas de abate, industrialização e preparo dos alimentos embutidos e prontos para consumo (ALAHAKOONA et al., 2015; LUCERA et al., 2012), motivando a indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos e estratégias que sejam alternativas. Com isso, tanto empresas como universidades têm orientado seus

esforços na busca por produtos naturais que substituam de forma efetiva estes compostos sintéticos.

Dessa forma, estudos que busquem o desenvolvimento e aplicação de novos sanitizantes são fundamentais para atrair a atenção dos órgãos de regulamentação do Brasil sobre a necessidade de mudanças e adesão de novos procedimentos para diminuição dos prejuízos na produção de frangos. Pesquisas sobre agentes antimicrobianos naturais, como os soforolipídios, são de grande relevância para a tentativa de melhorias no produto, tanto na questão de saúde na substituição de aditivos químicos, quanto na redução da carga microbiológica e aumento da vida de prateleira, bem como na redução dos custos de produção e contaminação do meio ambiente.

### 3.5 SURFACTANTES E BIOSURFACTANTES

A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada quimicamente a partir de derivados de petróleo. Com uma produção anual estimada de 13,0 milhões de toneladas, metade deste volume é utilizado como detergente doméstico e de lavanderia e a outra metade em uma variedade de setores industriais como químico, têxtil, papel e celulose, cosméticos, farmacêutico, higiene pessoal, agrícola e alimentos (VAN BOGAERT et al., 2011).

O mercado global de surfactantes em termos de volume de produção, é um dos maiores maior e mais importante dentro da classe dos compostos químicos industriais. Este mercado foi avaliado em US\$30,65 bilhões em 2015, com um crescimento constante de 4,4% nos próximos anos chegando a US\$39,69 bilhões em 2021 e próximo a US\$ 45,16 bilhões em 2024 (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2014). A maioria dos surfactantes disponíveis atualmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo e devido a grande utilização uma considerável quantidade de surfactantes é liberada no meio ambiente após o uso e estes compostos frequentemente são tóxicos para o meio ambiente e acabam por produzir grandes problemas de poluição. Apesar das medidas regulatórias tomadas para evitar o impacto nos sistemas aquáticos, a ecotoxicidade, a bio-acumulação e biodegradabilidade de

surfactantes tradicionais continuam a ser questões de grande preocupação, como demonstrado por alguns autores que relatam uma baixa taxa de biodegradação e uma alta toxicidade aquática dos surfactantes tradicionais (MAKKAR, CAMEOTRA, BANAT, 2011; NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Os surfactantes são compostos anfipáticos ou anfifílicos constituídos de uma porção hidrofóbica/apolar e uma porção hidrofílica/polar. Estas porções particionam-se na interface entre duas fases (óleo/água ou ar/água), levando a redução da tensão superficial (água/ar) ou interfacial (água/óleo) e consequente formação de micelas onde a fase apolar pode ser solubilizada na fase polar ou vice-versa. Estas propriedades de superfície ativa conferem aos surfactantes diversas propriedades como detergentes, dispersantes, umectantes, espumantes, estabilizantes, emulsificantes, solubilizantes e lubrificantes (DESAI, BANAT, 1997; GAUTA, TYAGI, 2006).

As propriedades de redução da tensão superficial e interfacial apresentadas pelos surfactantes estão relacionadas diretamente com a estrutura química e da forma com que estas moléculas se ordenam entre a interface de duas fases líquidas imiscíveis (propriedades interfaciais – tensão interfacial), ou entre a interface de uma fase líquida e outra gasosa (propriedades superficiais – tensão superficial). Dependendo do tipo de interação e da forma do ordenamento das moléculas, os surfactantes apresentam diversas propriedades como emulsificação, lubrificação, formação de micelas, detergentia, emulsificantes, dispersantes, molhantes e espumantes (OLIVEIRA et al., 2015).

Embora, nos últimos anos surfactantes com um melhor perfil ambiental tenham sido produzidos como os alquil poliglucosídeos, alquil poliglucamidas e ésteres metílicos de ácidos graxos, sua produção não é sempre baseada em recursos renováveis e implicam em etapas de síntese química (VAN BOGAERT et al., 2011). Assim, existe uma tendência nos países industrializados de substituir os surfactantes de origem petroquímica por surfactantes naturais ou biosurfactantes, motivados pelas vantagens que esses apresentam frente a crescente preocupação ambiental, leis mais rígidas e utilização de recursos renováveis (DESAI, BANAT, 1997; NITSCHKE, PASTORE, 2003).

O interesse pelos biossurfactantes tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas devido a sua importância no controle de biofilmes, a aplicação dos mesmos como agentes antimicrobianos e anticorrosivos em indústrias alimentícias. Biossurfactantes são surfactantes naturais produzidos por bactérias, fungos e leveduras. A porção hidrofóbica é uma longa cadeia de ácido graxo, hidroxi-ácido graxo ou  $\alpha$ -alquil  $\beta$ -hidroxi-ácido graxo e a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool. Os biossurfactantes são compostos com propriedades tensoativas, produzidos, principalmente, por microrganismos, e possuem propriedades muito semelhantes aos surfactantes de origem petroquímica, sendo superiores especialmente pela sua natureza ecológica e sustentável (CHEN et al. 2011; NGUYEN et al. 2010).

Podem apresentar atividade antimicrobiana e antiadesiva simultaneamente, sendo uma alternativa viável (NITSCHKE; COAST, 2007). Os biossurfactantes parecem ser um substituto promissor e sustentável para produtos químicos surfactantes, vantagens abrangentes como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, alta especificidade, diversidade química e funcional, inativação rápida e controlada, capacidade de produção a partir de matérias-primas econômicas renováveis e em grande parte disponíveis, relativa facilidade de preparação e funcionalidade em condições adversas (LOVAGLIO et al., 2015).

As vantagens adicionais incluem estabilidade a temperaturas relativamente altas, bem como em ambientes extremos, especificidade e natureza prontamente biodegradável no meio ambiente. Pode ser produzido a partir de recursos não renováveis, bem como de matérias-primas renováveis econômicas. A diversidade estrutural e funcional, a natureza biodegradável e a menor toxicidade destes compostos, em comparação com os surfactantes sintéticos, levaram a um maior impulso para pesquisas para atender a crescente demanda por esses compostos (PANJIAR, SACHAN, SACHAN, 2017; SHETE et al., 2006; UZOIGWE et al., 2015)

São classificados principalmente pela sua composição bioquímica e origem microbiana em dois grandes grupos, biossurfactantes de baixo peso molecular e de alto peso molecular e em cinco classes: glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, ácidos graxos e lipídeos neutros,

biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados (DESAI, BANAT, 1997; KAUR SEKHON, KHANNA, CAMEOTRA, 2012) .

Geralmente, os biossurfactantes desempenham diversas funções fisiológicas, o que promove diferentes vantagens fisiológicas e ambientais para os microrganismos produtores. Dentre estas funções podemos relatar: patogenicidade, adesão celular, motilidade, sinalização e diferenciação celular, formação de biofilmes, biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, amensalismo, sequestrante de compostos tóxicos, fonte de armazenamento de fonte de carbono, captação gênica via transinfecção, maturação celular e quórum sensing (HAMME, SINGH, 2006; NITSCHKE, PASTORE, 2002).

### 3.6 SOFOROLIPÍDIOS: BIODISPOSIÇÃO E ESTRUTURA

Os sofrorolipídios pertencem a classe dos glicolipídios, são metabólitos secundários produzidos por muitas leveduras não patogênicas, a partir de açúcares e lipídeos, secretados para o meio extracelular como uma mistura de compostos de estruturas químicas relacionadas (COOPER, D. G.; PADDOCK, 1983). O principal microrganismo produtor é a levedura não patogênica *Starmerella bombicola*, devido aos seus rendimentos de produção bastante expressivos e seu status GRAS (Generally recognized as safe), o que a faz ser a mais utilizada e estudada atualmente para essa produção (PAULINO et al., 2016).

São moléculas anfipáticas ou anfifílicas formadas por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A fração hidrofílica é composta de um dissacarídeo sofrorose (2'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -glicopiranosose) ligados a uma fração hidrofóbica composta de uma longa cadeia de ácido graxo através de uma ligação  $\beta$ -glicosídica (ASMER et al., 1988).

Os sofrorolipídios são sintetizados em altas concentrações tornando esse grupo de moléculas particularmente atrativo para produções comerciais e futuras aplicações, considerando os aspectos de segurança (PAULINO et al., 2016; VAN BOGAERT et al., 2007). Os substratos normalmente empregados na síntese da molécula de sofrorolipídios são carboidratos e ácidos graxos.

Os substratos normalmente empregados na construção da molécula de sofrorolípido são glicose e ácidos graxos. Se nenhuma fonte hidrofóbica estiver presente do meio, os ácidos graxos serão formados por síntese de novo a partir da acetil-CoA derivada da glicólise. Por outro lado, se a concentração de glicose for baixa, parte dos ácidos graxos serão conduzidos para a via de  $\beta$ -oxidação para manutenção celular, ao invés da síntese de SLP (VAN BOGAERT et al., 2007).

A via metabólica de produção dos sofrorolípídios pode ocorrer de duas formas: por síntese de novo ou incorporação direta. Na síntese de novo, os substratos lipídicos são primeiramente oxidados à ácidos graxos, quebrados em moléculas menores, hidroxilados e incorporados a molécula de sofrorolípido. Essa quebra ocorre pela via da  $\beta$ -oxidação, sendo os substratos metabolizados a cada 2 carbonos, liberando um acetil-CoA a cada vez. O acetil-CoA poderá ser utilizado na respiração celular ou participar na síntese de biomoléculas maiores. A segunda via de síntese de ácidos graxos hidroxilados é a incorporação direta, a qual o substrato oxidado não é quebrado, e sim imediatamente hidroxilado e incorporado ao sofrorolípido. Dessa forma, o comprimento da cadeia do ácido graxo será igual ao do substrato lipídico (GUPTA, 2012; VAN BOGAERT et al., 2007).

Existem diversos relatos de incorporação direta e síntese de novo de ácidos graxos hidroxilados por espécies de *Candida*.

A segunda via de síntese é a incorporação direta, a qual o substrato oxidado não é quebrado, e imediatamente hidroxilado e incorporado ao sofrorolípido. Dessa forma, a cadeia do ácido graxo terá o mesmo comprimento da cadeia do substrato lipídico (GUPTA, 2012). A incorporação direta é aumentada quando substratos adicionais são fornecidos, como glicose, que pode ser utilizada para manutenção da respiração celular. Não há evidência de incorporação direta de outros açúcares na biossíntese de glicolípídios por *Starmerella bombicola*. Apesar do emprego diversos açúcares, como sacarose, frutose, galactose e lactose, apenas a sofrorose foi observada no glicolípídios, independentemente do tipo de açúcar utilizado (ZHOU; KOSARIC, 1993, 1995).

Em leveduras, as enzimas da citocromo monooxigenase P450 estão presentes e são responsáveis pela hidroxilação dos ácidos graxos ou alcanos na posição terminal ( $\omega$ ) ou sub-terminal ( $\omega-1$ ). Assim os ácidos graxos sofrem a

ação da enzima citocromo monooxigenase P450 (NADP), sendo convertidos a ácidos graxos hidroxilados (VAN BOGAERT et al., 2011). Após a formação do ácido graxo hidroxilado, duas moléculas de glicose uridina difosfato ativada (UDP-glicose) são adicionadas em série para completar a síntese de soforolipídios.

A glicose é acoplada glicosidicamente (posição C1') ao grupo hidroxila do ácido graxo através da ação da glicosiltransferase específica I. A ação da transferase exige a molécula de glicose ativada por nucleotídeos (UDP-glicose) como doador de grupo glicosil. Em seguida, uma segunda glicose é adicionada na posição C2' da primeira porção da glicose pela glicosiltransferase II (VAN BOGAERT et al., 2007). O produto obtido após a ação da glicosiltransferase II é classificado como moléculas de soforolipídios acídicas não-acetiladas (GUPTA, 2012).

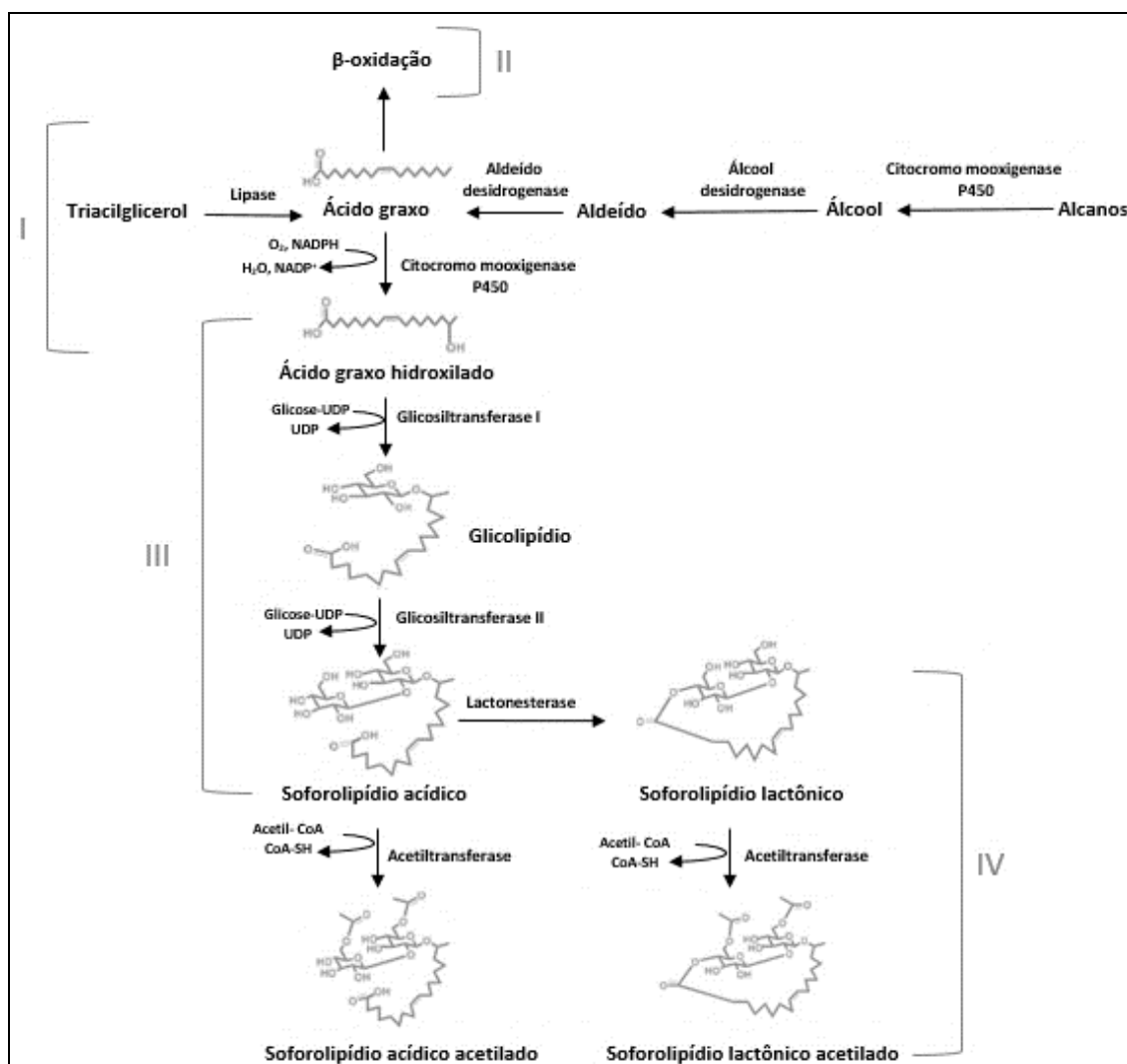
Além disso, modificações na estrutura do soforolipídios podem ocorrer tanto por esterificação interna (lactonização) como por acetilação da soforose. Soforolipídios lactônicos são formados por uma reação de esterificação, catalisada por uma esterase lactônica específica (ASMER et al., 1988). A acetilação na posição 6' e/ou na posição 6'' é realizada pela acetil transferase dependente de acetil-CoA (ESDERS; LIGHT, 1972).

A Figura 1 apresenta a via metabólica da síntese de soforolipídios por *Starmerella bombicola* proposta por Asmer et al. (1988). Na etapa I, a síntese pode ser iniciada pelo fornecimento de diferentes fontes lipídicas, a partir de alcanos, álcoois ou aldeídos para obtenção do ácido graxo livre, ou ainda vindo de triacilgliceróis, que precisam ser degradados pelas lipases liberando os ácidos graxos (COOPER, PADDOCK, 1984; VAN BOGAERT, ZHANG; SOETAERT, 2011). O ácido graxo poderá sofrer  $\beta$ -oxidação (Etapa II) ou hidroxilação (Etapa III), resultado em uma cadeia de ácido graxo hidroxilado (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). O caminho que o ácido graxo será direcionado dependerá das condições metabólicas da célula e da disponibilidade de substratos para manutenção celular e síntese de biomoléculas.

Na etapa III, com a formação do ácido graxo hidroxilado, duas moléculas de UDP-glicose serão adicionadas através das enzimas, glicosiltransferase I que acopla a glicose na posição C1' ao grupamento

hidroxila  $\omega$  ou  $\omega-1$  do ácido graxo e a segunda glicose pela glicosiltransferase II na posição C2' (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). Por fim, na etapa IV as moléculas de sofrorolípídios acídicos não acetilados são obtidas, podendo sofrer ações das enzimas lactonesterase e acetiltransferase, formando estruturas lactônicas não acetiladas ou acetiladas e acídicas acetiladas, respectivamente.

**Figura 1** - Via da biossíntese de sofrorolípídios



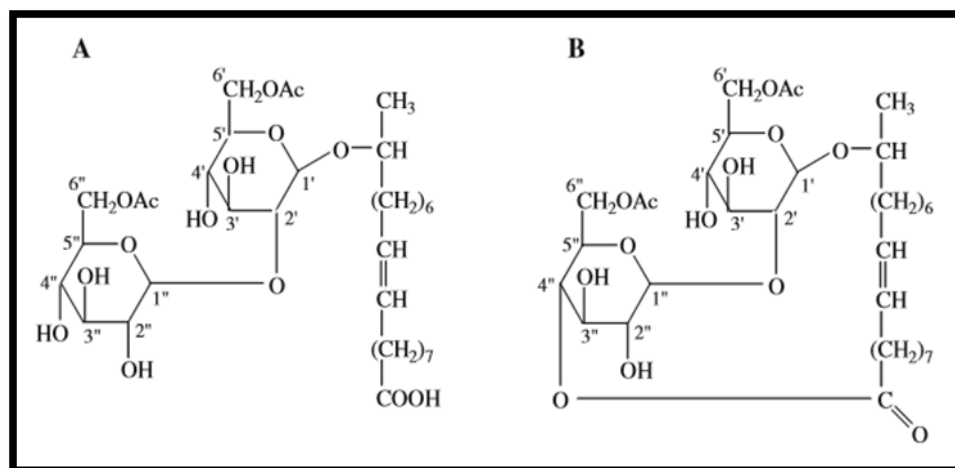
Fonte: Gupta (2012) modificado

Estes biossurfactantes são sintetizados como uma mistura de moléculas diferentes e podem ser divididos em duas formas principais, A- acídica e B- lactônica (Figura 2), e podem ter grupos acetil na sua unidade de

soforose com variação nas propriedades físico-químicas e biológicas (ASMER et al., 1988; BOGAERT, I. N. A. VAN; ZHANG, J.; SOETAERT, 2011). Além disso, a estrutura da cadeia de ácidos graxos (número de carbono, insaturação e hidroxilação) presente em soforolipídios pode variar de acordo com o substrato utilizado como fonte de carbono hidrofóbico no processo de fermentação (DÍAZ DE RIENZO et al., 2015). Na forma ácida, a extremidade do ácido carboxílico é livre, enquanto que a lactônica é internamente esterificada na posição 4" da porção da soforose.

Essas duas formas ainda podem sofrer variações estruturais em termos de acetilação das posições 6' e 6" em sua porção da soforose e de diferenças na estrutura do ácido graxo (número de carbonos, insaturações e hidrogenação), de acordo com os substratos utilizados no processo fermentativo, sofrendo alterações nos aspectos físico-químicos e em suas propriedades biológicas (ASMER et al., 1988; ASHBY, SOLAIMAN, 2010; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015).

**Figura 2** - Formas estruturais principais dos soforolipídios. (A – Forma ácida; B – Forma lactônica).



Fonte: ASHBY e SOLAIMAN (2010)

As proporções ácidas e lactônicas variam com as condições de crescimento e fornecimento de substrato lipídico. As misturas geralmente apresentam-se na forma castanha viscosa, sendo esta mais densa que a água. Quando a forma lactônica está presente em maior concentração, resulta em

formação de cristais, ao invés do óleo viscoso (CLAUS; BOGAERT, I. N. A. VAN, 2017). A diversidade natural encontrada na mistura de soforolipídio pode ser justificada pela variância nos padrões de acetilação, a ocorrência de esterificação interna e a natureza da hidroxilação do ácido graxo, podendo 20 ou mais congêneres estarem presentes numa única amostra de soforolipídio (DAVILA et al., 1997). Contudo, mesmo com os componentes clássicos dos soforolipídio bem caracterizados e documentados, apenas em 2011 formas poliméricas foram descritas (PRICE et al., 2012), provavelmente devido à sensibilidade insuficiente dos métodos de detecção utilizados em estudos anteriores.

A composição da mistura irá influenciar em suas propriedades físicas, químicas e biológicas (ASHBY, SOLAIMAN, FOGLIA, 2008 ; MORYA et al., 2013). Diferentes microrganismos produtores de soforolipídios produzem diferentes perfis de compostos, embora estes perfis de produção também possam ser alterados variando as condições do processo fermentativo, como o fornecimento de diferentes substratos lipofílicos durante o processo fermentativo (CAVALERO, COOPER, 2003; MORYA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2019).

Devido a estrutura anfifílica, apresentam propriedades de superfície ativa e encontram aplicações em diversas áreas como: biorremediação (MAO et al., 2015); indústria alimentícia (FREITAS, SILVEIRA, CELLIGOI, 2018; SAHARAN, SAHU, SHARMA, 2011); embalagens (SILVEIRA et al, 2020 ); agricultura (CELLIGOI et al., 2020), indústria de cosméticos, detergentes e emulsificantes (NGUYEN; SABATINI, 2011); farmacêutica (agente citotóxico) (GROSS; SHAH, 2007); atividade antimicrobiana (ABBAS et al., 2015; SHAH, BADIA, RATSEP, 2007; SILVEIRA et al., 2019); atividade anti-HIV e espermicida (SHAH et al., 2005).

A espécies produtoras *Candida apícola* e *Starmerella bombicola* foram descobertas em 1961 e 1970, respectivamente, sendo a levedura *S. bombicola* a mais estudada devido aos seus rendimentos de produção expressivos. o que torna esse grupo de moléculas particularmente atrativo para produções comerciais e futuras aplicações, considerando os aspectos de segurança (PAULINO et al., 2016; VAN BOGAERT et al., 2007).

A levedura *S. bombicola* tem sido estudada pelo nosso grupo de pesquisa quanto as produções e aplicações, como Minucelli et al. (2016) obtiveram a produção significativas em gordura residual da indústria de frango e aplicação na biorremediação de solos contaminados. Silveira et al. (2019) avaliaram a produção e a atividade antimicrobiana dos soforolipídios produzidos em ácido oleico e comprovaram a ação contra microrganismos contaminantes da indústria avícola (*Clostridium perfringens* e *Campylobacter jejuni*). Fontoura et al. (2020) produziram soforolipídios neste mesmo substrato e avaliaram a ação dos contra patógenos humanos, mostrando eficiente resultados contra bactérias Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica subsp. enterica*) e Gram-positivas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*). Hipólito et al. (2020) confirmaram a ação antimicrobiana dos soforolipídios produzidos em ácido oleico contra fungos da área de alimentos (*Aspergillus flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Rhizopus* spp.). Hipólito et al. (2021) comprovaram a ação contra o fungo *Botrytis cinerea* em filmes de amido de mandioca.

### 3.7 ATIVIDADES ANTIMICROBIANA DOS SOFOROLIPÍDIOS

Soforolipídios possuem propriedades biológicas tais como atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anticancerígenas que tornam estas moléculas relevantes para aplicações no combate a muitas doenças e como agentes terapêuticos (VAN BOGAERT et al., 2007). Além disso, os soforolipídios têm características contra vírus e ação antibiótica (JOSHI-NAVARE; PRABHUNE, 2013; SHAH et al., 2005) e podem ter aplicações potenciais em infecções, cicatrização de feridas ou contextos anti-inflamatórios (HARDIN et al., 2007).

Os soforolipídios possuem atividade contra algas (SUN et al., 2004), leveduras (ITO; INOUE, 1982) e bactérias (SHAH; BADIA; RATSEP, 2007a) através da desestabilização e alteração da membrana lipídica (AZIM et al., 2006) conferindo-lhes atividade antimicrobiana. Esse mecanismo biocida pode

servir um processo de competição interespecies, como é verificado com outros biossurfactantes (DESAI; BANAT, I M, 1997).

O uso de biossurfactante como agente antimicrobiano ainda é limitado em escala comercial devido ao baixo custo de produção de antibióticos sintetizados quimicamente em comparação aos biológicos (AZIM et al., 2006; SHAH et al., 2005; SHAH; BADIA; RATSEP, 2007b; SINGH et al., 2009). No entanto, a ocorrência de agentes patogênicos resistentes a antibióticos aumentou a atenção para outros tipos de agentes antimicrobianos (RODRIGUES et al., 2006).

Os soforolipídios possuem propriedades adicionais a antimicrobianos, como reprodução de células de fibroblasto, atividades anticancerígenas e antivirais que poderiam aumentar ainda mais seus valores comerciais (VAN BOGAERT et al., 2007; BORSANYIOVA et al., 2015; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015; DEY et al., 2015; KIM, K. et al., 2002; LANG, KATSIWELA, WAGNER, 1989).

A ação antimicrobiana dos soforolipídios está relacionada à sua natureza anfifílica, a qual através de interações sinérgicas entre as porções da soforose e ácido graxo produz o efeito surfactante, sendo capaz de diminuir a tensão interfacial e superficial de compostos e materiais, e assim promover alterações da adesão de microrganismos (PONTES et al., 2016; VALOTTEAU et al., 2017). Sua ação envolve mecanismos de desestabilização e alteração da permeação da membrana, o que leva a ruptura e extravasamento do conteúdo celular (DE OLIVEIRA et al., 2015; DENGLE-PULATE et al., 2014; FRACCHIA et al., 2015).

Lydon et al. (2017) destacam que os efeitos antimicrobianos dos soforolipídios dependem da sua estrutura e da classe da bactéria, fato inter-relacionado à sua especificidade de ação em membranas, uma vez que existem diferenças estruturais nesses dois grupos de bactérias. A membrana celular de bactérias Gram-negativas é mais complexa do que a bactéria Gram-positivas. Em Gram-positivas, a parede celular é constituída por uma membrana citoplasmática circundada por uma espessa camada de peptídeoglicano, enquanto que em Gram-negativas é composta de uma membrana externa de lipopolissacarídeo e de fosfolipídio antes da camada peptídeoglicano e membrana plasmática interna (VALOTTEAU et al., 2017),

tornando o envelope celular de bactérias Gram-negativas mais complexo de interagir (DENGLE-PULATE et al., 2014; ZHANG et al., 2016a), assim os soforolipídios são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (FONTOURA et al., 2020; HOA et al., 2017).

Os soforolipídios são eficazes como agente bactericida e são capazes de induzir morte células planctônicas tanto de bactérias quanto de fungos, sendo comparável aos antimicrobianos convencionais (HIPÓLITO. et al., 2020; SILVEIRA, FREITAS, CELLIGOI, 2018). Os soforolipídios interferem na formação de biofilmes em concentrações superiores a 5% (v/v) (DÍAZ DE RIENZO et al., 2015), e sua atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares (ZHANG et al., 2016) e bactérias degradantes em curtumes de couro (SOLAIMAN et al., 2016) já foi evidenciada quando utilizado na limpeza e sanitização nestas indústrias.

Além destes estudos, outros relataram atividade antimicrobiana do biossurfactante, soforolipídios, contra células de outros como de *C. necrose* ATCC 17699, *B. subtilis* BBK006, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* bactérias responsáveis por infecções nosocomiais, além de poder inibir o crescimento de outras bactérias Gram-positivos e Gram-negativas. Gram-positivas formadoras de endosporos (*Bacillus licheniformis*, *B. pumilus* e *B. mycoides*), bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus xylosus*, *S. cohnii* e *S. equorum*), bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii* e *Vibrio fluvialis*) e também podem ser usados para interrupção e remoção do biofilme.(LANG, KATSIWELA, WAGNER, 1989; LYDON et al., 2017; SOLAIMAN et al., 2016).

A Tabela 2 apresenta os resultados de diferentes trabalhos de aplicação de soforolipídios como agente microbiano, evidenciando a gama de microrganismos, bactérias, fungos e leveduras, contra os quais este metabólito é efetivo.

**Tabela 2** - Concentração Mínima Inibitória (CMI) de soforolipídios para diferentes bactérias

<b>Microrganismo</b>	<b>CMI de Soforolipídios (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	5.000	Díaz de Rienzo et al., 2015; Hoa et al., 2017
<i>Bacillus licheniformis</i>	19,5	Solaiman et al., 2016
<i>Bacillus pumilus</i>	19,5	
<i>Campylobacter jejuni</i>	10.000	Silveira et al., 2019
<i>Clostridium perfringens</i>	30	Silveira et al., 2019
<i>Enterobacter cloacae</i>	19,5	Solaiman et al., 2016
<i>Enterobacter sakazakii</i>	19,5	
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	Lydon et al., 2017
	50	Valotteau et al., 2017
<i>Enterococcus faecium</i>	19,5	Solaiman et al., 2016
	500	Fontoura et al., 2020
<i>Escherichia coli</i>	30	Dengle-Pulate et al., 2014
	50	Valotteau et al., 2017
	750	Pontes et al., 2016
	2.000	Fontoura et al., 2020
	10.000	Hoa et al., 2017; Zhang et al., 2017
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	50.000	Solaiman; Ashby; Uknalis, 2017
<i>Lactobacillus orais</i>	50.000	
<i>Listeria sp.</i>	5.000	Zhang et al., 2016
<i>Proteus mirabilis</i>	2.000	Fontoura et al., 2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	Valotteau et al., 2017
	10.000	Hoa et al., 2017
<i>Pseudomonas luteola</i>	4,88	Solaiman et al., 2016
<i>Salmonella spp.</i>	2.000	Fontoura et al., 2020
	10.000	Zhang et al., 2016
<i>Salmonella typhimurium</i>	50	Valotteau et al., 2017
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	Dengle-Pulate et al., 2014
	50	Pontes et al., 2016
	15-150	Joshi-Navare; Khanvilkar; Prabhune, 2013
	500	Fontoura et al., 2020
	4500	Hoa et al., 2017
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50	Valotteau et al., 2017
<i>Staphylococcus mutans</i>	50.000	Solaiman; Ashby; Uknalis, 2017
<i>Streptococcus mutans</i>	500	Fontoura et al., 2020
<i>Streptococcus pyogenes</i>	50	Valotteau et al., 2017

**Fonte:** Próprio autor

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, evidenciaram ação antimicrobiana de soforolipídios associados a filmes para envoltório de alimentos. Silveira et al. (2020) apresentou resultados antimicrobianos de soforolipídios em filmes de ácido polilático, apresentando efetividade contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.*, patógenos de origem alimentar e Hipólito et al. (2021) comprovaram a ação contra o fungo *Botrytis cinerea* em filmes de amido de mandioca. Assim é possível verificar a ação antimicrobiana desse composto com muitas aplicações.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado na produção de soforolipídios foi a levedura *Starmerella bombicola* ATCC 22214, obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA.

#### 4.1.2 Meios De Preservação, Ativação, Pré Inoculo E Fermentação Da *S. Bombicola*

Os meios de preservação, ativação, pré inóculo e fermentação utilizados foram os seguintes: Preservação em g.L<sup>-1</sup>: glicose 10, extrato de levedura 3, peptona 5, extrato de malte 3 e ágar 20. Ativação em g.L<sup>-1</sup>: glicose 100, extrato de levedura 10, e ureia 1. Pré-inoculo em g.L<sup>-1</sup>: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75 (MINUCELLI et al., 2017). Fermentação em g.L<sup>-1</sup>: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75, seguido de pulsos de 20 g.L<sup>-1</sup> de ácido oleico a cada 48h até 192h e adição de 90 g.L<sup>-1</sup> de glicose em 144h e 192h (FELSE et al., 2007; MINUCELLI et al., 2017; SILVEIRA et al., 2019).

#### 4.1.3 Meios De Identificação E Contagem De Bactérias

Os meios de identificação e contagem para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos utilizados estão descritos a seguir:

*Staphylococcus aureus*: Placas Petrifilm 3M<sup>TM</sup> contendo um o meio para contagem destes microrganismos e um gel solúvel em água fria adicionado de meio seletivo cromo gênico Baird-Parker.

*Escherichia coli*: Placas Petrifilm 3M™ contendo nutrientes contém cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e glucuronidase, um indicador que forma um precipitado azul

Coliformes termotolerantes: Placas Petrifilm 3M™ contendo um o meio para contagem destes microrganismos e um gel solúvel em água fria adicionada de nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB) e um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólico que facilita a enumeração das colônias.

Aeróbios mesófilos: Placas Petrifilm 3M™ contendo nutrientes e o 2,3,5-trifeniltetrazólio cloreto como um indicador do crescimento bacteriano.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preservação, Ativação E Pré-Inoculo Da *S. Bombicola*

A levedura foi mantida crio preservada em 25% glicerol à - 80°C (GAO et al., 2013). A manutenção da cepa foi realizada em placas de Petri, sendo os repiques realizados a cada quatro semanas e mantidos sob refrigeração à 4°C. A ativação ocorreu em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio adicionado de 2 alças de platina com o microrganismo, sendo incubadas em shaker à 30°C, 150 rpm por 24h. O pré-inoculo consistiu na transferência de 10% (v/v) do meio de ativação para novos frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio, sendo incubado em shaker à 30°C, 150 rpm por 48h.

### 4.2.2 Produção de Soforolipídios

As fermentações foram realizadas em biorreator de bancada com capacidade máxima de 5L (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda), volume operacional de 3,5L, 450 rpm de agitação, 1 vvm de aeração, pH controlado em 3,5 30 °C, inóculo padronizado em 10 % (v/v) por 288h (MINUCELLI et al., 2017; SILVEIRA et al., 2019). Do sedimentado foi avaliado o crescimento

microbiano e do sobrenadante foi realizada a quantificação dos soforolipídios e o consumo dos substratos utilizados.

#### 4.2.3 Extração, Quantificação e Identificação de Soforolipídios

Ao final do tempo de 288h, a fermentação foi interrompida por centrifugação (9956 x g por 15 min). O pellet formado foi lavado três vezes com acetato de etila na proporção de 1:1 (v/v) para remoção de impurezas. O sobrenadante foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila (1:1) e logo após, rotaevaporado. A fração obtida foi submetida a nova extração em funil de separação com solução metanol água 4:1 (v/v) e hexano (v/v) nas proporções de 1:1 (v/v), afim de se obter o soforolipídio bruto retido na fração metanólica e remover as impurezas lipídicas presentes na fase hexânica. Após secagem do metanol, o soforolipídio bruto 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 de acordo com Silveira et al. (2019).

Após a etapa de extração, o soforolipídio foi seco em estufa até eliminação completa do solvente e liofilizado (MINUCELLI et al., 2017). As quantificações dos soforolipídios foram realizadas por gravimetria (MINUCELLI et al., 2017) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em comparação com o padrão 1',4"-sophorolactona 6', 6"- diacetato (Sigma Aldrich, USA), usando coluna Shim-pack Shimadzu CLC-ODS (M) ® C18 (4,6 x 250 mm; 4,6 µm; 12 nm) e detector de matriz de iodo SPD-M20A (± 207 nm). Foi utilizado um gradiente de água e acetonitrila, iniciando 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).

#### 4.2.4 Crescimento Microbiano e Consumo de Substratos

Para acompanhamento da biomassa, o pellet formado da centrifugação foi resuspenso em 5 mL de água destilada, secos em estufa à 100°C e determinado o peso seco por gravimetria (MINUCELLI et al., 2017). A glicose e o ácido oleico residuais foram quantificados para determinar o consumo desses

substratos pelo microrganismo durante e ao final da fermentação. A glicose residual foi quantificada pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), a partir do sobrenadante. O ácido oleico foi quantificado por gravimetria, a partir da extração com hexano.

#### 4.2.5 Avaliação Da Ação De Soforolipídios Como Sanitizante Aplicados Por Aspersão E Imersão Em Carcaças E Cortes De Frango

##### 4.2.5.1 Amostragem

As carcaças de frango foram coletadas da indústria avícola de Rolândia, situada no norte do Paraná, Brasil de forma aleatória na etapa de evisceração, imediatamente anterior ao processo a ser avaliado, em um período máximo 60 segundos. Os cortes de peito sem osso e sem pele, foram coletados na mesa de refile de filé de peito, na mesma unidade produtiva referida, em um período máximo de 60 segundos.

As amostras foram coletadas levando em consideração a origem, ou seja, pertencerem ao mesmo lote de aves vivas e as condições de processo, mesma regulagem de equipamentos, garantindo assim um menor desvio.

Posteriormente foram acondicionadas em embalagem plástica e após cada tratamento as amostras, de carcaças, água de lavagem e cortes foram acondicionadas, individualizadas, em sacos plásticos estéreis e mantidas congeladas a temperatura máxima  $-12^{\circ}\text{C}$  até o transporte para laboratório de análise microbiológicas. O transporte até o laboratório foi realizado em caixa térmica.

##### 4.2.5.2 Tratamento das amostras com soforolipídios

Os soforolipídios, produzidos por *Starmerella bombicola*, com formas lactônicas predominantes, foram liofilizados e utilizados para o tratamento das amostras. Foi realizado teste de solubilidade dos soforolipídios, sendo o composto solúvel em concentrações de etanol  $\geq 45\%$  em água (v/v). Posteriormente, o composto foi solubilizado em 45% de etanol em água para compor as soluções dos tratamentos. Cinco tratamentos foram aplicados, sendo dois controles água (A) e água + etanol 45% (B) e soluções sanitizantes

contendo água + 45% etanol com 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de sofrorolipídios (C, D e E), respectivamente. As soluções foram submetidas a banho de ultrassom por 20 minutos.



Sofrorolipídios  
concentrado



Sofrorolipídios  
liofilizados

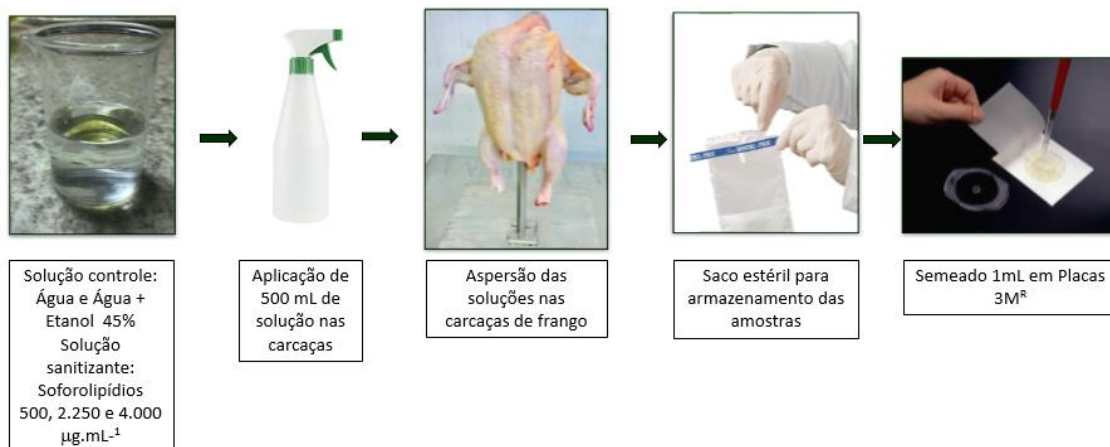


Solução Sanitizante 500,  
2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

As soluções, A, B, C, D e E foram aplicadas em três processos diferentes, sendo estes: i) Lavagem por aspersão de carcaças de frango, com água contendo sofrorolipídios como agente sanitizante, simulando a lavagem de carcaças pelo chuveiro de aspersão, anterior ao primeiro ponto crítico de controle biológico, na etapa de evisceração; ii) Lavagem por imersão de carcaças de frango, com água contendo sofrorolipídios como agente sanitizante, simulando a lavagem das carcaças nos tanques de pré resfriamento; iii) Lavagem por imersão de cortes de frango, com água contendo sofrorolipídios como agente sanitizante.

i) Lavagem por aspersão de carcaças de frango, com água contendo sofrorolipídios como sanitizante, simulando a lavagem na etapa de evisceração

A lavagem por aspersão de carcaças, com sofrorolipídios, simulando a lavagem de carcaças pelo chuveiro de aspersão, anterior ao primeiro ponto crítico de controle biológico, na etapa de evisceração consistiu na aplicação de 500mL das soluções A, B, C, D e E, por aspersão, utilizando frascos descartáveis, nas amostras de carcaças, com três repetições para cada tratamento para avaliar o efeito sanitizante dos sofrorolipídios aplicados por aspersão.



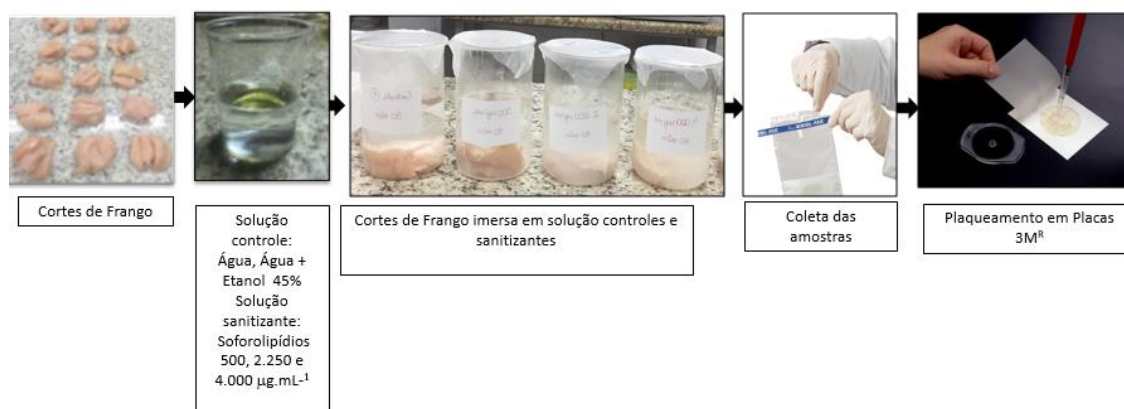
ii) Lavagem por imersão de carcaças de frango, com água contendo soforolipídios como sanitizante, simulando a lavagem das carcaças nos tanques de pré resfriamento.

A lavagem por imersão de carcaças, com soforolipídios como sanitizante, que simulou a lavagem das mesmas nos tanques de pré resfriamento, consistiu na imersão das carcaças em 500mL das soluções A, B, C, D e E, para cada amostra, sendo três carcaças por tratamento, permanecendo 30, 60 ou 90 minutos, e três repetições por tratamentos. Os tempos de exposição foram determinados levando em consideração os tempos dos tanques de pré resfriamento, pré chiller, chiller 1 e chiller 2.



iii) Lavagem de cortes de frango, por imersão, com solução contendo soforolipídios como agente descontaminante.

O teste consistiu na imersão de cortes de frango “peito sem osso e sem pele” (100 g cortadas em quadrados de 2cm x 2cm) em 500mL das soluções A, B, C, D e E, em frascos de Erlenmeyers, permanecendo 30, 60 ou 90 minutos, e três repetições por tratamentos. Ao final de cada tempo de tratamento, as amostras de cortes foram coletadas em sacos plásticos estéreis e destinadas ao congelamento.



#### 4.5.2.3 Análises microbiológicas

Ao final dos tratamentos, as amostras de carcaças, água de lavagem e cortes de frango, foram coletadas, individualizadas, em sacos plásticos estéreis e mantidas sob congelamento a temperatura máxima de -12°C e as análises microbiológicas foram realizadas com 25 g de cada amostra (carcaça / água de lavagem). As análises microbiológicas foram realizadas com 25 g de cada amostra (carcaça, água ou corte), sendo as amostras de carcaças compostas por um pool de pele do pescoço e de peito e parte da cloaca. As porções de 25 g foram homogeneizadas em stomacher por 2 minutos com 225 mL de água peptonada tamponada à 35-37 °C por 24h e semeadas em placas para o isolamento e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos.

##### *Staphylococcus aureus*

A contagem de *S. aureus* foi realizada utilizando placas Petrifilm 3M<sup>™</sup> contendo o meio cromogênico Baird-Parker modificado, o qual é seletivo e

diferencial para *S. aureus*. Para o teste, foi adicionado 1 mL da amostra de 25 g com água peptonada diretamente sobre a placa e realizada pressão para que a alíquota espalhar de forma uniforme sobre a área da placa. Após a solidificação do gel da placas, as mesmas foram incubadas na posição horizontal, com o lado transparente para cima, em pilhas de até 20 placas a 35° C por 24h. Após o período de incubação, foi observado as cores da colônia. As placas sem crescimento de colônias, placas contendo somente colônias vermelha-violeta e placas contendo somente colônia azul-esverdeada não foram submetidas ao procedimento de confirmação através de discos. Os discos de confirmação foram utilizados nas placas que apresentavam colônias vermelha-violeta, e logo após foram contadas as colônias vermelha-violeta e expressas como unidades formadoras de colônia de *S. aureus*. Foi expresso como negativo para *S. aureus* as demais colônias com as características de descritas.

#### *Escherichia coli*

A contagem de *E. coli* foi realizada utilizando placas Petrifilm 3M™ que continham nutrientes cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e glucuronidase, que é um indicador que forma um precipitado azul em torno da colônia de *E. coli*. Para o teste, foi adicionado 1 mL da amostra de 25 g com água peptonada diretamente sobre a placa e realizada pressão para que a alíquota espalhar de forma uniforme sobre a área da placa. As placas foram incubadas na posição horizontal, com o lado transparente para cima, em pilhas de até 20 placas a 35 °C por 24h. A análise e contagem de colônias foi realizada após o tempo de incubação calculando assim o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama da amostra, multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada.

#### Coliformes termotolerantes

A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada utilizando placas Petrifilm 3M™ contendo nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB), um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólico que facilita a enumeração das colônias. Para o teste, foi adicionado 1 mL da amostra de 25 g com água peptonada diretamente sobre a placa e realizada pressão para a alíquota espalhar de forma uniforme sobre a área da placa. Após a solidificação do gel das placas, as mesmas foram incubadas na posição

horizontal, com o lado transparente para cima, em pilhas de até 20 placas a  $44 \pm 1$  °C por 24h, com umidificação da estufa. Coliformes termotolerantes produzem colônias vermelhas associadas a bolhas de gás. Assim sendo, colônias características que crescem na placa de coliformes termotolerantes produzem ácido, fazendo com que o indicador de pH torne a cor do gel vermelho mais escuro. O gás retido ao redor das colônias vermelhas indica a presença de coliformes. Colônias não associadas ao gás (uma distância maior do que uma colônia de diâmetro entre a colônia e a bolha de gás) não foram consideradas coliformes termotolerantes. Usando este critério, foi calculado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama da amostra, multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada.

#### Aeróbios mesófilos

A contagem de aeróbios mesófilos foi realizada utilizando placas Petrifilm 3M™, contendo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio como indicador do crescimento bacteriano. No caso de resultado positivo para o grupo aeróbios mesófilos, há o aparecimento de colônias de cor vermelha, em placas prontas em forma de cartão, cobertas por um filme plástico impregnado de meio de cultura na forma de gel solúvel. Para o teste, foi adicionado 1 mL da amostra de 25 g com água peptonada diretamente sobre a placa e realizada pressão para que a alíquota espalhar de forma uniforme sobre a área da placa. Após a secagem as placas foram incubadas à 35 °C por 48 h. A análise e contagem de colônias positivas foi realizada após o tempo de incubação calculando assim o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama da amostra, multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada.

### 4.2.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através de Estatística Descritiva e Redes Neurais Artificiais (RNA).

#### 4.2.6.1 Estatística descritiva

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas através do software STATISTICA For Windows Versão 10.0 (STATSOFT, 2010).

#### 4.2.6.2 Redes neurais artificiais (RNA ou ANN)

A rotina de RNA do tipo SOM desenvolvida foi aplicada usando a rotina do software Matlab, topologia da rede 12x12 hexagonal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS

A produção de sofrorolipídios realizada em biorreator obteve um rendimento de 46,41% e atingiu 69,83 g.L<sup>-1</sup> em 288 h de fermentação. Os parâmetros fermentativos influenciam a produção de sofrorolipídios e as estruturas formadas, afetando as proporções de formas acídicas e lactônicas (RIBEIRO et al., 2015; VAN BOGAERT et al., 2011). As análises de caracterização estrutural, evidenciaram a predominância das estruturas lactônicas, resultados correspondentes aos de Silveira et.al. (2019). Casas e García-Ochoa (1999), Davila et al. (1992) e Hu e Ju (2001) relataram que as estruturas lactônicas são altamente produzidas durante a fase estacionária após 100-250 h de fermentação. Portanto, o tempo de fermentação é um parâmetro substancial para direcionar a produção de estruturas sofrorolípídicas específicas, que definir aplicações específicas, como atividade antimicrobiana (VAN BOGAERT et al., 2007; ZHANG et al., 2016<sup>a</sup>).

### 5.2 SOFOROLIPÍDIOS COMO SANITIZANTE, APLICADOS POR ASPERSÃO E IMERSÃO EM CARÇAÇAS E CORTES DE FRANGO

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de artigo científico (1), patentes (4), artigo de revisão (1) e capítulo de livro (1).

#### 5.2.1 Artigo Científico

Artigo submetido “RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT”

## **Soforolipídios de *Starmerella bombicola*, como sanitizante, na lavagem de carcaças por aspersão e imersão, no abate e processamento de aves.**

Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas <sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Dionísio Borsato<sup>1</sup>, Guilherme Biz<sup>1</sup>, Mayka Reghiany Pedrão<sup>2</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, Londrina State University, Paraná-Brazil, <sup>2</sup> Federal Technological University of Paraná, Paraná-Brazil.

### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo aplicar sofrólipídios produzidos pela levedura *Starmerella bombicola*, como sanitizante, na água de lavagem de carcaças de frango, simulando as etapas do abate e processamento por aspersão e imersão de aves contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos. Para essa avaliação foram aplicadas soluções de sofrólipídios a 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para verificar o efeito antimicrobiano. Os resultados avaliados demonstraram que a sanitização por aspersão a redução mais significativa foi com a solução de sofrólipídios a 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com a redução de 1,32 para *S. aureus*; 1,47 para *E. coli*; 1,43 para coliformes termotolerantes e 1,05 para aeróbios mesófilos. Na água de imersão, a ação sanitizante aumentou gradativamente com o tempo de exposição. Ocorreu a redução total das células viáveis com 90 minutos com 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de sofrólipídios e com 30 minutos na concentração de 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os sofrólipídios mostraram um potencial inovador contra os microrganismos contaminantes da indústria avícola, podendo ser um novo agente sanitizante trazendo maior segurança alimentar aos produtos da indústria avícola.

**Palavras chaves:** Biossurfactante; Qualidade microbiológica; Indústria avícola; Antimicrobianos.

## **SOPHOROLIPIDS by the *Starmerella bombicola* AS SANITIZER IN CARCASS WASHING BY ASPERSION AND IMMERSION IN SLAUGHTERING AND POULTRY PROCESSING**

### **ABSTRACT**

This work aimed to apply sophorolipids produced by the yeast *Starmerella bombicola*, as a sanitizer, in the washing water of poultry carcasses, simulating stages of slaughter and processing by spray and immersion of birds against the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, thermotolerant coliforms and mesophilic aerobes. For this evaluation, solutions of sophorolipids at 500, 2,250 and 4,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  applied to verify the antimicrobial effect. The evaluated results demonstrated that the most significant reduction in spray the most significant reduction was obtained when the solution containing 4,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  was sprayed, with a reduction of 1.32 for *S. aureus*, 1.47 for *E. coli*, 1.43 for thermotolerant coliforms and 1 .05 for mesophilic aerobes. In immersion water, the sanitizing action gradually increased exposure time. There was a total reduction of viable cells at 90 minutes with 2,250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of sophorolipids and 30 minutes of exposure to the concentration of 4,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Sophorolipids showed an innovative potential against contaminating microorganisms in the poultry industry, and could be a new sanitizing agent bringing greater food security to products of the poultry industry.

**Key words: Biosurfactant; Microbiological quality; Poultry industry; Antimicrobials**

## **SOFOROLÍPIDOS LA *Starmerella bombicola* COMO DESINFECTANTE EN LAVADO DE CANALES POR ASPERSIÓN E INMERSIÓN EN SACRIFICIO Y TRATAMIENTO DE AVES**

### **RESUMEN**

Este trabajo tuvo como objetivo aplicar soforolípidos producidos por la levadura *Starmerella bombicola*, como desinfectante, en el agua de lavado de canales de pollo, simulando dos etapas de sacrificio y procesamiento por aspersión e inmersión de aves contra los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes y contaminación aeróbica mesófila. Para esta evaluación, se aplicaron la solución de soforolípidos a 500, 2.250 y 4.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para verificar el efecto antimicrobiano. Los resultados evaluados demostraron que la reducción más significativa de la aspersión se obtuvo cuando se asperjó la solución que contenía 4.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , con una reducción de 1,32 para *S. aureus*, 1,47 para *E. coli*, 1,43 para coliformes termotolerantes y 1 .05 para aerobios mesófilos. En agua de inmersión, la acción higienizante aumenta gradualmente con el tiempo de exposición. Hubo una reducción total de células viables a los 90 minutos con la concentración de 2250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 30 minutos de exposición a la concentración de 4,000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Los soforolípidos mostraron un potencial innovador contra los microorganismos contaminantes en la industria avícola y podrían ser un nuevo agente desinfectante que brinde mayor seguridad alimentaria a los productos de la industria avícola.

**Palabras clave: Biosurfactante; Calidad microbiológica; Industria avícola; Antimicrobianos.**

## 1. INTRODUÇÃO

Maior exportador e segundo maior produtor mundial de carne de frango, o Brasil enfrenta rígidas exigências sanitárias dos países importadores. Assim a preocupação das empresas com os níveis de contaminação nas indústrias leva a estudos para utilização de novos sanitizantes, nas etapas de abate e processamento de aves, para reduzir a contaminação na carne e consequentes perdas econômicas (ABPA, 2019). Segundo Holley e Gill (2005), o interior do produto cárneo é considerado estéril até o momento da exposição, sendo a contaminação de carcaças devido a rupturas das vísceras durante os processos de evisceração (Silva, Nääs, Moura, 2009).

O Brasil estabelece o critério de ausência de contaminação visual interna e externa nas carcaças antes da entrada do chiller (Brasil, 1998). Embora contestada, essa regra se baseia no pressuposto de que o material gastrointestinal é fonte primária de patógenos de origem alimentar e, quando presente nas carcaças na entrada do pré-resfriamento, pode ser uma fonte de contaminação cruzada dentro do chiller (Brizio, Isolani, Salles, Prentice, 2013). Os abatedouros de aves dos Estados Unidos utilizam lavadores de carcaças, a fim de cumprir o limite crítico de tolerância zero para contaminação gastrointestinal visível (Northcutt et al. 2005).

A lavagem das carcaças no abate de aves, como alternativa ao refile à faca para remover a contaminação por conteúdo gastrointestinal visível no processamento de aves é permitida e utilizada nos Estados Unidos, Canadá e nos Estados-membros europeus, e indicada e aceita como equivalente ao sistema de refile, por órgãos internacionais como Codex Alimentarius (USDA, 2016; Hugas e Tsigarida, 2008; CFIA, 2013) e foi adotado no Brasil, sendo o sistema de lavagem de carcaças considerado superior tanto o aspecto microbiológico quanto operacional (FSIS, 1998; Brasil, 2011; Depner, 2015; Isolani et al. 2019).

A redução da população microbiana superficial da carcaça pela lavagem depende da pressão, da temperatura, do tempo e do volume de água utilizado na lavagem, além da aplicação ou não de coadjuvantes com ação sanitizante, onde alguns já foram aprovados e utilizados nos Estados Unidos e

Europa, trazendo assim vantagens que podem resultar em maior segurança dos alimentos (Bolder, 1997; Isolan et al. 2019).

O sistema de lavagem de carcaças é utilizado em plantas processadoras de aves nos Estados Unidos, como um chuveiro final na linha de evisceração, objetivando o atendimento das diretrizes governamentais, que determinam tolerância zero para contaminação fecal em carcaças que entram no sistema de resfriamento. No Canadá e em países membros da Comunidade Europeia, o sistema de lavagem de carcaças também é aceito, bem como em organismos internacionais como o *Codex Alimentarius* (FSIS, 1998; Brasil, 2011; Meat, 2013; Isolan et al. 2019). Agentes antimicrobianos naturais, como os soforolipídios, são de grande relevância para a tentativa de melhorias no produto, tanto na questão de saúde na substituição de aditivos químicos, quanto na redução da carga microbiológica e aumento da vida de prateleira, bem como na redução dos custos de produção e contaminação do meio ambiente. Os soforolipídios pertencem a classe dos glicolipídios, são metabólitos secundários produzidos por muitas leveduras não patogênicas, a partir de açúcares e lipídeos, secretados para o meio extracelular como uma mistura de compostos de estruturas químicas relacionadas (Cooper e Paddock, 1983). O principal microrganismo produtor é a levedura não patogênica *Starmerella bombicola*, devido aos seus altos rendimentos de produção bastante expressivos e baixa toxicidade (Hipólito et al. 2020; Silveira et al. 2020).

Os soforolipídios são moléculas anfipáticas ou anfifílicas formadas por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A fração hidrofílica é composta de um dissacarídeo sefarose (2'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -glicopiranosose) ligados a uma fração hidrofóbica composta de uma longa cadeia de ácido graxo através de uma ligação  $\beta$ -glicosídica (Asmer et al.1988). São sintetizados em altas concentrações tornando esse grupo de moléculas particularmente atrativo para produções comerciais e futuras aplicações, considerando os aspectos de segurança (Paulino et al. 2016; Van Bogaert et al. 2007). Os substratos normalmente empregados na síntese da molécula de soforolipídios são carboidratos e ácidos graxos (Van Bogaert et al. 2007).

A ação antimicrobiana dos soforolipídios está relacionada à sua natureza anfifílica, a qual através de interações sinérgicas entre as porções da

soforose e ácido graxo produz o efeito surfactante, sendo capaz de diminuir a tensão interfacial e superficial de compostos e materiais, e assim promover alterações da adesão de microrganismos (Pontes et al. 2016; Valotteau et al. 2017). Sua ação envolve mecanismos de desestabilização e alteração da permeação da membrana, o que leva a ruptura e extravasamento do conteúdo celular (De Oliveira et al. 2015; Dengle-Pulate et al. 2014; Fracchia et al. 2015; Silveira et al. 2019). Lydon et al. (2017) destacam que os efeitos antimicrobianos dos soforolipídios dependem da sua estrutura e da classe da bactéria, fato inter-relacionado à sua especificidade de ação em membranas, uma vez que existem diferenças estruturais nesses dois grupos de bactérias.

Os soforolipídios são eficazes como agente bactericida independentemente de seu conteúdo ácido e/ou lactônico, capaz de induzir morte células planctônicas tanto de bactérias quanto de fungos, sendo comparável aos antimicrobianos convencionais (Hipólito et al. 2020; Silveira, Freitas, Celligoi, 2018). Os soforolipídios interferem na formação de biofilmes em concentrações superiores a 5% (v/v) (Díaz de Rienzo et al. 2015), e sua atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares (Zhang et al. 2016) e bactérias degradantes em curtumes de couro (Solaiman et al. 2016) já foi evidenciada quando utilizado na limpeza e sanitização nestas indústrias.

A levedura *S. bombicola* tem sido estudada pelo nosso grupo de pesquisa quanto as produções e aplicações, como Minucelli et al. (2017) obtiveram a produção significativas em gordura residual da indústria de frango e aplicação na biorremediação de solos contaminados. Silveira et al. (2019) avaliaram a produção e a atividade antimicrobiana dos soforolipídios produzidos em ácido oleico e comprovaram a ação contra microrganismos contaminantes da indústria avícola (*Clostridium perfringens* e *Campylobacter jejuni*). Fontoura et al. (2020) produziram soforolipídios neste mesmo substrato e avaliaram a ação dos contra patógenos humanos, mostrando eficiente resultados contra bactérias Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Salmonella enterica subsp. enterica*) e Gram-positivas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*). Hipólito et al. (2020) confirmaram a ação antimicrobiana dos soforolipídios produzidos em ácido oleico contra fungos da área de alimentos (*Aspergillus flavus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e

*Rhizopus* spp.). Hipólito et al. (2021) comprovaram a ação contra o fungo *Botrytis cinerea* em filmes de amido de mandioca.

Diante do exposto este trabalho teve como objetivo aplicar sofrorolipídios produzidos pela levedura *Starmerella bombicola*, como sanitizante, na água de lavagem de carcaças de frango, simulando as etapas do abate e processamento, para redução de contaminantes bem como manutenção da inocuidade das carcaças contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos, pelos tratamentos de aspersão e imersão.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. AMOSTRAGEM**

As carcaças de frango foram coletadas da indústria avícola de Rolândia, situada no norte do Paraná, Brasil de forma aleatória na etapa de evisceração, imediatamente anterior ao processo a ser avaliado, em um período máximo 60 segundos, com cuidado das mesmas pertencerem ao mesmo lote de aves vivas e com mesma regulagem de equipamentos, garantindo assim uma semelhança. Após coletadas, foram acondicionadas em embalagem plástica. Após cada tratamento as amostras de água e as carcaças, foram acondicionadas, individualizadas, em sacos plásticos estéreis e mantidas congeladas a temperatura máxima de -12°C até o transporte para laboratório de análise microbiológicas. O transporte até o laboratório foi realizado em caixa térmica.

### **2.2. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM SOFOROLIPIDIOS**

Os sofrorolipídios, produzidos por *S. bombicola*, foram caracterizados com predominância de formas lactônicas, foram liofilizados e utilizados para os diferentes tratamentos. Foi realizado teste de solubilidade dos sofrorolipídios,

sendo que foi solúvel em concentrações de etanol  $\geq 45\%$  em água (v/v). Posteriormente, os sofrorolipídios foram solubilizado em etanol a 45% de para compor as soluções dos tratamentos. Cinco soluções foram preparadas sendo dois controles: água (A); água + etanol 45% (B) e três soluções sanitizantes etanol com de 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de sofrorolipídios em etanol a 45% (C, D e E), respectivamente. As soluções foram submetidas a banho de ultrassônico por 20 minutos.

As soluções, A, B, C, D e E foram aplicadas em dois diferentes tratamentos, aspersão e imersão sendo aspersão das carcaças simulando a lavagem de carcaças pelo chuveiro de aspersão, anterior ao primeiro ponto crítico de controle biológico, na etapa de evisceração e imersão de carcaças, por 30, 60 e 90 minutos, simulando a lavagem das carcaças nos tanques de pré resfriamento.

#### 2.2.1. Lavagem por aspersão de carcaças

A aspersão de carcaças, com sofrorolipídios, simulando a lavagem de carcaças pelo chuveiro, anterior ao primeiro ponto crítico de controle biológico, na etapa de evisceração consistiu na aplicação de 500mL das soluções A, B, C, D e E, por aspersão, utilizando frascos descartáveis, nas 15 amostras de carcaças, com três repetições para cada tratamento.

#### 2.2.2. Lavagem por imersão de carcaças

A imersão das carcaças, em solução contendo sofrorolipídios como sanitizante, simulou a lavagem das carcaças nos tanques de pré resfriamento, consistiu na imersão das carcaças em 500mL das soluções A, B, C, D e E, para cada amostra, sendo três carcaças por tratamento, permanecendo 30, 60 ou 90 minutos, e três repetições por tratamentos. Os tempos de exposição foram determinados levando em consideração os tempos dos tanques de pré resfriamento, pré chiller, chiller 1 e chiller 2.

### 2.3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Ao final dos tratamentos, as amostras de água e das carcaças, foram coletadas, individualizadas, em sacos plásticos estéreis e mantidas sob congelamento a temperatura máxima de  $-12^{\circ}\text{C}$  e as análises microbiológicas foram realizadas com 25 g de cada amostra de carcaça e com a água de lavagem. As amostragem consistiu de pele do pescoço, peito e cloaca. As amostras foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada à 35 a 37 °C por 24h. Para a análise dos microrganismos, 1 mL da água peptonada foi semeado em placas petrifilm 3M™ para o isolamento e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos com meio de identificação seletivo específico para cada microrganismo. Os meios seletivos adicionado para *S. aureus* foi cromo gênico Baird-Parker. Para *E. coli* foram usadas as placas contendo cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e glucuronidase. Para coliformes termotolerantes as placas continham o meio em os nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB) e um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólico que facilita a enumeração das colônias. Para aeróbios mesófilos as placas continham nutrientes e o 2,3,5-trifeniltetrazólio cloreto como um indicador do crescimento bacteriano. As análises foram realizadas em triplicata.

### 2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através da Estatística Descritiva e Redes Neurais Artificiais (RNA). A rotina de RNA do tipo SOM desenvolvida foi aplicada usando a rotina do software Matlab, topologia da rede 12x12 hexagonal. e a estatística descritiva foi realizada através do software STATISTICA For Windows Versão 10.0 (Statsoft, 2010), na qual os resultados obtidos são analisados e comparados numericamente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. SOFOROLIPÍDIOS COMO SANITIZANTE APLICADOS POR ASPERSÃO EM CARCAÇAS DE FRANGO

A aplicação dos, soforolipídios, em diferentes concentrações, mostrou eficácia no controle de *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos, os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Pelas análises foi possível verificar um incremento da ação antimicrobiana com o aumento da concentração do biossurfactante soforolipídios. Após a aspersion das soluções sanitizantes foi observado uma redução da população de células viáveis, em ciclos logarítmicos para os quatro grupos dos microrganismos estudados. A redução mais significativa foi obtida quando aspergida a solução contendo  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo que ocorreu uma redução de 1,32 para *S. aureus*; 1,47 para *E. coli*; 1,43 para coliformes termotolerantes e 1,05 para aeróbios mesófilos.

**Tabela 1** – Efeito de sofrorolipídios a 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  aplicados por aspersão, em carcaças de frango contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos

Tratamento	Água	Água + Etanol	Sofrorolipídios ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
			500	2.250	4.000
<i>S.aureus</i> (log UFC/g)	3,03±0,05 <sup>a</sup>	2,99±0,03 <sup>b</sup>	2,97±0,07 <sup>b</sup>	1,97±0,09 <sup>c</sup>	1,71±0,14 <sup>d</sup>
<i>E. coli</i> (log UFC/g)	3,09±0,02 <sup>a</sup>	2,96±0,02 <sup>b</sup>	2,62±0,07 <sup>c</sup>	1,96±0,08 <sup>d</sup>	1,62±0,15 <sup>e</sup>
Coliformes termotolerantes (log UFC/g)	3,20±0,01 <sup>a</sup>	3,06±0,02 <sup>b</sup>	2,85±0,08 <sup>c</sup>	2,05±0,07 <sup>d</sup>	1,77±0,09 <sup>e</sup>
Aeróbios mesófilos (log UFC/g)	5,19±0,03 <sup>a</sup>	5,09±0,04 <sup>b</sup>	5,06±0,03 <sup>bc</sup>	5,08±0,03 <sup>c</sup>	4,14±0,06 <sup>d</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Krsukal-wallis ( $p \leq 0,05$ ) para cada microrganismo. As letras correspondem a comparação de cada tratamento para um determinado microrganismo.

Os resultados para *S. aureus* evidenciam que as soluções controles e a solução contendo 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de sofrorolipídios apresentaram efeitos antimicrobianos semelhantes, ou seja, não diferiram entre si, todavia ao aumentar as concentrações de sofrorolipídios nas soluções sanitizantes para 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , ocorre uma diminuição das unidades formadoras de colônias. O tratamento com 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de sofrorolipídios apresentou o melhor efeito sanitizante.

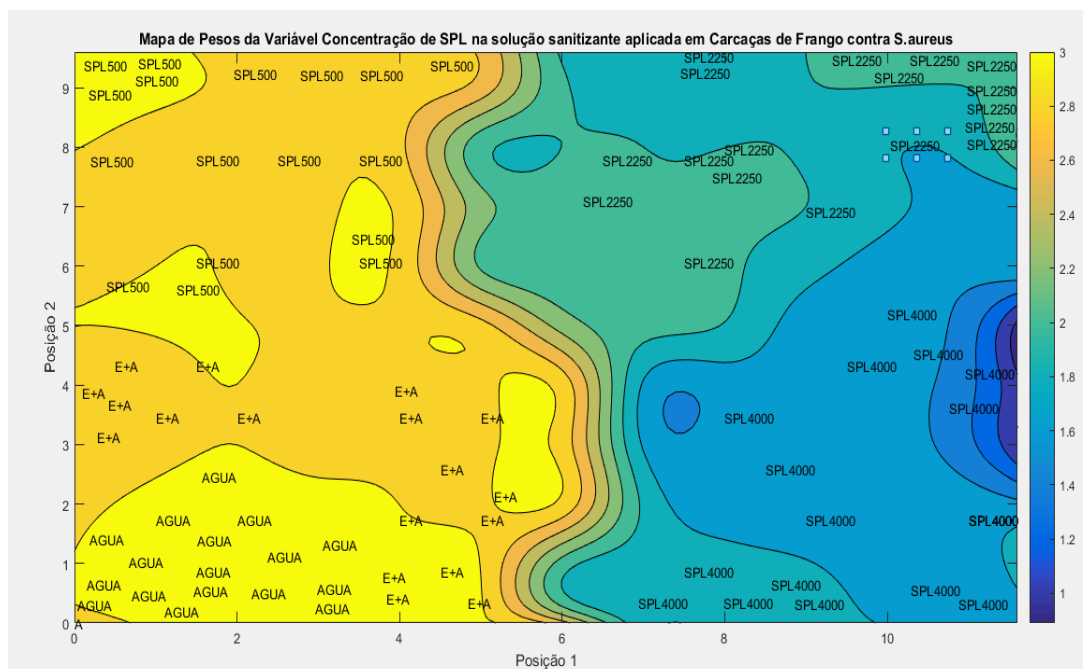
Os dados da Tabela 1, demonstram que o efeito antimicrobiano das soluções a 500 e 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , contra aeróbios mesófilos foi baixa, com redução de 0,1 log de unidades formadoras de colônias por grama de amostra, entretanto o tratamento com a solução a 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou redução mais significativa.

Os mapas obtidos por redes neurais, apresentados na Figura 1A, 1B, 1C e 1D, validam os resultados apresentados na Tabela1, e evidenciam a

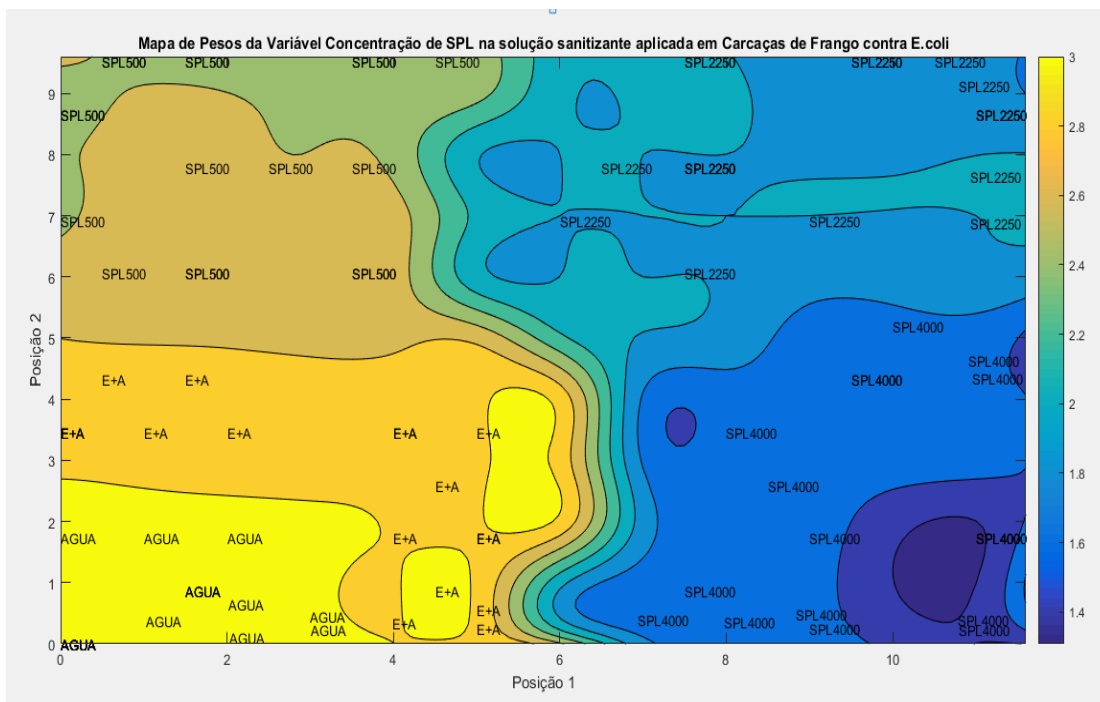
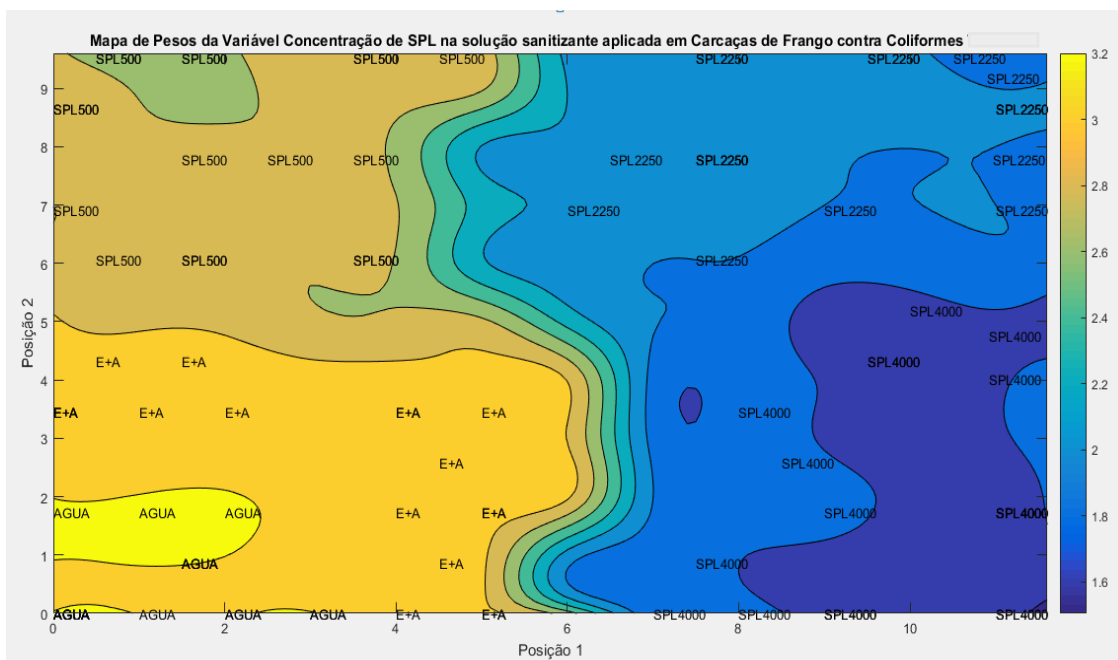
suscetibilidade das quatro cepas estudadas diante do sanitizante, soforolipídios.

A ação sanitizante dos soforolipídios nas carcaças é indicado pelas cores, ou seja, os tratamentos contidos na região de uma mesma cor no mapa, não apresentam diferenciação, propondo semelhanças, por outro lado, quanto mais distantes geograficamente, conseqüentemente, grupos com maior diferenciação,

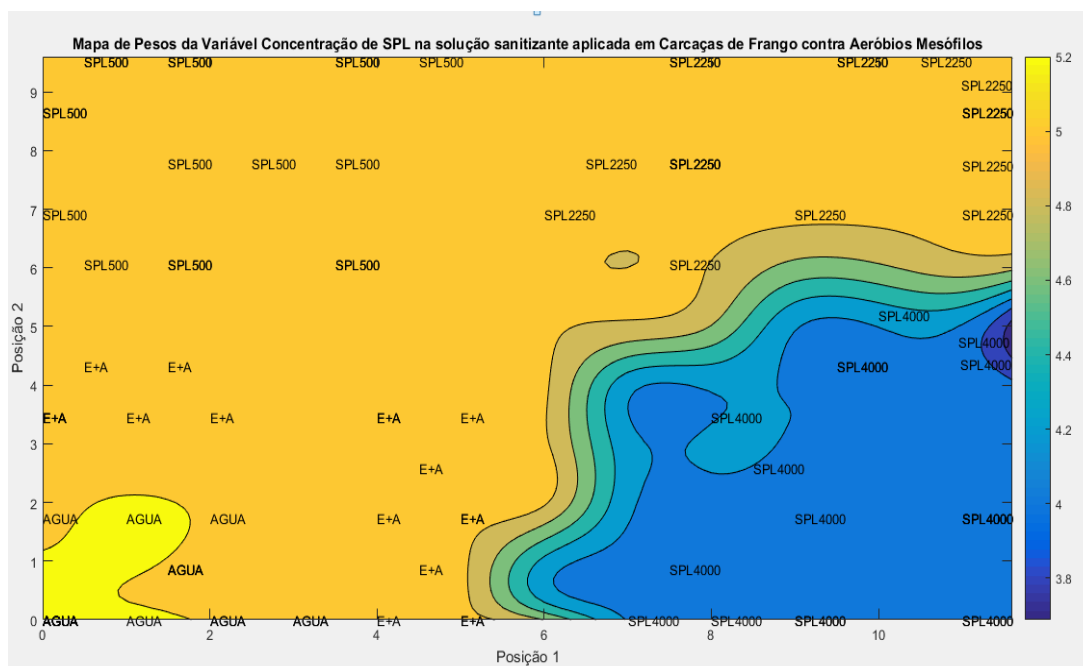
**Figura 1** - Efeito dos soforolipídios a 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  aplicados por aspersão em carcaças de frango contra *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B), coliformes termotolerantes (C) e aeróbios mesófilos (D).



(A) *Staphylococcus aureus*

(B) *Escherichia coli*

(c) Coliformes termotolerantes



(D) Aeróbios mesófilos

O mapa referente ao *S. aureus* permite verificar que os tratamentos com água, água + etanol (E+A) e solução 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (SPL 500), apresentam similaridade e são diferentes dos tratamentos contendo soforolipídios em concentrações de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (SPL 2.250 e SPL 4000). Fica comprovado que existe uma tendência gradativa na eficiência de ação antibacteriana com o aumento da concentração do composto na solução, sendo as bactérias aeróbias mesófilas mais susceptíveis, seguidas do *S. aureus*, coliformes termotolerantes, e finalmente *E. coli* com maior resistência, ratificando os achados pela estatística descritiva. A diferente suscetibilidade dos microrganismos aos soforolipídios pode ser explicada pelo efeito surfactante da molécula. Esse efeito envolve interações sinérgicas entre a porção da soforose e os ácidos graxos, resultando na desestabilização da membrana dos patógenos e respectiva alteração na sua permeabilidade, caracterizada pela ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular (Dengle-Pulate et al. 2013; Fracchia et al. 2015; Oliveira et al. 2015; Valotteau et al. 2017).

Todos os microrganismos estudados foram afetados proporcionalmente com o aumento da concentração de soforolipídios. A maior suscetibilidade das bactérias aeróbias mesófilas é explicada pelo perfil Gram-positivas das

mesmas. Por outro lado, os coliformes termotolerantes e *E. coli*, foram os grupos nos quais o soforolipídios apresentou menor efetividade, ação esperada devido a maior complexidade da parede celular dos referidos microrganismos. A parede celular das bactérias Gram-negativas é composta por uma fina camada de peptidoglicano e duas membranas, dificultando a interação do soforolipídio com o envelope celular, por outro lado, a parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por uma camada de membrana envolvida por uma espessa camada de peptidoglicano. (Dengle-Pulate et al. 2014; Zhang et al. 2016). Essas diferenças no envelope celular também conferem cargas diferentes às bactérias, onde as gram-negativas têm características menos hidrofóbicas e mais negativas, tornando-as menos afetadas pelas alterações superficiais promovidas pelo soforolipídio, possivelmente explicando a menor suscetibilidade deste grupo.

Os resultados obtidos no nosso estudo, seguem o mesmo perfil que os achados de Valotteau et al. (2017) que aplicaram soforolipídios a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em bactérias Gram-positivas e Gram negativas e comprovando melhor ação nas Gram-positivas. Hoa et al. (2017), utilizaram em seus estudos concentrações expressivamente maiores na inibição dos referidos microrganismos.

### 3.2. SOFOROLIPÍDIOS COMO SANITIZANTE APLICADOS POR IMERSÃO EM CARÇAÇAS DE FRANGO

A etapa de pré resfriamento visa a redução da carga microbiológica das carcaças, no abate e processamento de aves. A lavagem das carcaças de frango nos tanques pré resfriadores, chillers, no Brasil, atualmente é realizada utilizando cloro, com o máximo de 5 ppm na água de entrada (Brasil, 1998). Assim, a utilização de soforolipídios como agente sanitizante é uma alternativa que pode ser usada, para melhorar a qualidade microbiológica e sensorial da carne por ser um antimicrobiano natural, não apresentando resíduos tóxicos como produtos clorados.

Os resultados da aplicação dos soforolipídios, como agente sanitizante, na água utilizada para a lavagem por imersão das carcaças, estão

apresentados na Tabela 2 e evidenciam a ação bactericida contra os microrganismos, *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos, presentes em carne de frango.

**Tabela 2** - Efeito dos soforolipídios a 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  aplicados na água de imersão, em carcaças de frango, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos em diferentes tempos de exposição.

Parâmetros	Tratamento	Soforolipídios ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
		Água	Água + Etanol	500	2.250	4.000
<i>S.aureus</i> (log UFC/g)	30'	3,09±0,022 <sup>aA</sup>	3,03±0,043 <sup>bB</sup>	2,92±0,026 <sup>cA</sup>	2,15 ±0,046 <sup>dA</sup>	0±0,00 <sup>eA</sup>
	60'	3,34±0,037 <sup>aB</sup>	3,26±0,021 <sup>bA</sup>	2,87±0,014 <sup>cA</sup>	0±0,00 <sup>dB</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>
	90'	3,44±0,022 <sup>aC</sup>	3,24±0,016 <sup>bA</sup>	2,53±0,049 <sup>cB</sup>	0±0,00 <sup>dB</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>
<i>E.coli</i> (log UFC/g)	30'	3,05±0,014 <sup>aC</sup>	2,89 ±0,028 <sup>bC</sup>	2,85±0,031 <sup>bA</sup>	0±0,00 <sup>cA</sup>	0±0,00 <sup>cA</sup>
	60'	3,26±0,011 <sup>aB</sup>	3,25±0,009 <sup>aA</sup>	2,80±0,036 <sup>bB</sup>	0±0,00 <sup>cA</sup>	0±0,00 <sup>cA</sup>
	90'	3,40±0,010 <sup>aA</sup>	3,14±0,029 <sup>bB</sup>	2,63±0,051 <sup>cC</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>
Coliformes termotolerantes (log UFC/g)	30'	3,21±0,023 <sup>aB</sup>	3,04±0,036 <sup>bC</sup>	2,96±0,024 <sup>bA</sup>	2,36 ±0,070 <sup>cA</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>
	60'	3,49±0,013 <sup>aA</sup>	3,38±0,022 <sup>bA</sup>	2,91±0,020 <sup>cA</sup>	2,09±0,089 <sup>dB</sup>	0±0,00 <sup>eA</sup>
	90'	3,47±0,018 <sup>aA</sup>	3,29±0,041 <sup>bB</sup>	2,75±0,022 <sup>cB</sup>	0±0,00 <sup>dC</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>
Aeróbios mesófilos (log UFC/g)	30'	3,14±0,016 <sup>aB</sup>	3,07±0,032 <sup>aB</sup>	3,11±0,066 <sup>aA</sup>	2,01±0,151 <sup>bA</sup>	0±0,00 <sup>cA</sup>
	60'	3,59±0,017 <sup>aA</sup>	3,59±0,040 <sup>aA</sup>	2,99±0,022 <sup>bA</sup>	1,60±0,173 <sup>cB</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>
	90'	3,73±0,074 <sup>aA</sup>	3,53±0,018 <sup>bA</sup>	2,57±0,080 <sup>cB</sup>	0±0,00 <sup>dC</sup>	0±0,00 <sup>dA</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Krsukal-wallis e Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos em um tempo específico (Krsukal-wallis) e Letras maiúsculas compram os diferentes tempos para um tratamento específico (Tukey).

Soforolipídios a 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  erradicou todos os microrganismos em estudo, em carcaças de frango submetida à imersão, nos três diferentes tempos de exposição. Ao aplicar a concentração de 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , as células

viáveis foram eliminadas após o 60 minutos de exposição para *S. aureus*, 30 minutos para *E. coli* e 90 minutos para coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos.

Fontoura et al. (2020) demonstraram a ação dos soforolipídios de *S. bombicola* contra patógenos humanos, tanto em Gram-positivos, como *S. aureus* e *S. mutans* quanto em Gram-negativos, como *Escherichia coli* e *Salmonella entérica*, quando utilizado as concentrações de 500 e 2.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Silveira et al., 2020 relataram ação antimicrobiana de soforolipídios incorporados em filmes biodegradáveis de ácido polilático contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella entérica*.

Resultados anteriores de Joshi-Navare, Khanvilkar e Prabhune (2013) que aplicaram soforolipídios de *S. bombicola* com predominância de formas lactônicas, nas concentrações 1.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e verificaram a inibição de *E.coli* e *S.aureus* respectivamente.

Neste trabalho os resultados demonstram a eliminação total da contaminação presente na água de imersão, a partir de 30 minutos de exposição, nas concentrações de soforolipídios de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo totalmente efetivas na redução da contagem das células de *E. coli* na água de lavagem, em quaisquer tempos de exposição. Água + etanol e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentaram diferença significativa comprovando a não interferência do etanol, que são correspondentes aos achados de Hoa et al. (2017), que em estudos em carnes, ovos, molhos e cremes, obtiveram uma concentração mínima inibitória de 4.500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídios lactônicos diacetilados contra *S. aureus*.

A ação dos soforolipídios também foi estudada por Olanya et al. (2018) que reportaram ação antibacteriana do soforolipídio de *C. bombicola in vitro* em tomate pós colheita, obtendo resultados de inibição de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* em concentrações a partir de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Outros autores investigaram seu efeito em folhas de espinafre contaminadas com *Escherichia coli* O157:H7, obtendo reduções de 1,4 log UFC/folha logo após tratamento com 1% de soforolipídio e 3.6 log UFC/folha após 7 dias de armazenamento a 4°C (Zhang et al. 2016). Dengle-Pulate et al. (2014) testaram soforolipídios de *C. bombicola* para a limpeza de frutas e vegetais, verificando que o tratamento resultou em 90% de redução das células de *Salmonella*

*typhimurium* ATCC 23564 e 99% em *Escherichia coli* ATCC 8739 após 10 minutos. *Erwinia chrysanthemi* ATCC 11663 e *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 foram reduzidas totalmente após 10 minutos.

Pela Tabela 2, após 30 minutos de exposição na solução de soforolipídios a 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  eliminou a contaminação de coliformes termotolerantes presente na água de imersão. O controle água e água + etanol e as soluções de soforolipídios 500 e 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, apresentaram diferenças significativas, com resultados decrescentes de contagem, após 30 minutos de imersão. Ao analisar a exposição por 60 minutos, os resultados seguem a mesma tendência de redução apresentada no tempo de 30 minutos, ou seja, uma redução linear com aumento da concentração. No tempo de 90 minutos, as soluções com concentrações 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentam a maior eficiência antibacteriana, eliminando toda a contaminação presente na água de lavagem, seguida da solução de soforolipídios 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Zhang et al. (2017) investigaram os mecanismos de ação dos soforolipídios e do etanol, como composto padrão, contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* O157:H7. Os resultados mostraram que utilizando o padrão de etanol 20% ou o soforolipídios de formas isoladas, não houve redução significativa da população da bactéria. Na presença de 10% de etanol, nenhuma das formas acídicas e lactônicas obtiveram resultados promissores. Contudo, reduções significativas foram observadas em todos os soforolipídios na presença de 20% de etanol, sugerindo um efeito sinérgico entre eles e a necessidade dessa concentração no aumento da atividade antimicrobiana do soforolipídios.

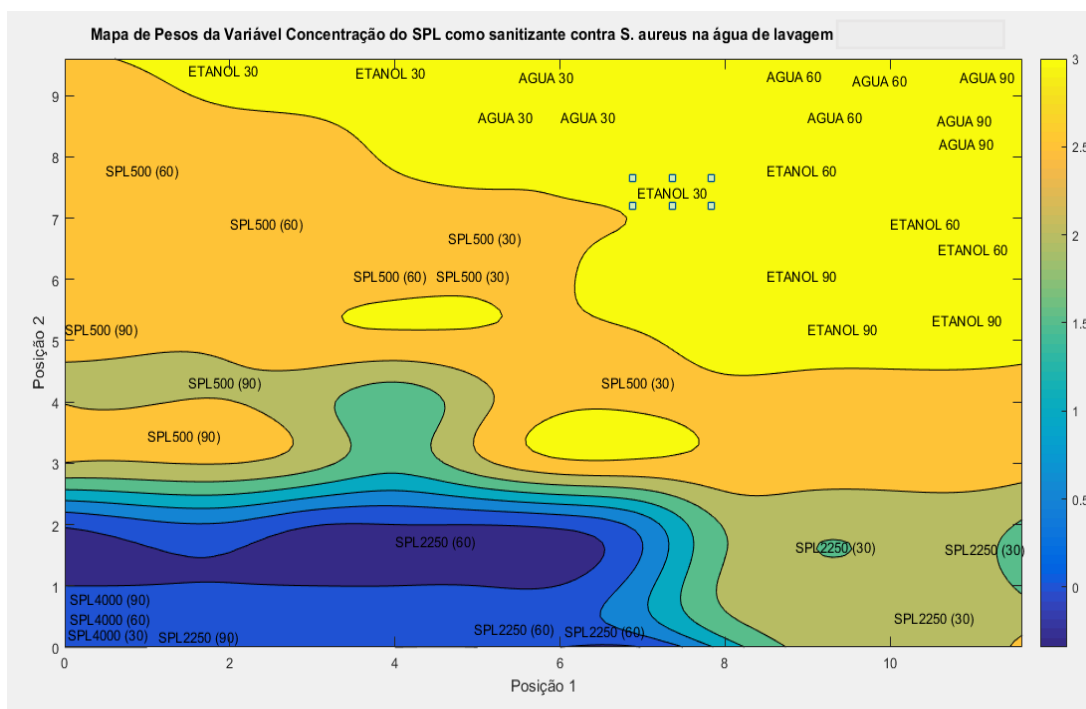
Embora o etanol seja um desinfetante de uso comum, sua interação com soforolipídios ainda não é bem claro. Algumas hipóteses são pela capacidade do etanol de auxiliar na solubilização do soforolipídios na água, e aumentar a interação com as membranas celulares. Outros possíveis mecanismos podem estar relacionados com a desnaturação proteica provocada pelo etanol, com consequentes danos à membrana, permitindo maior ação do biossurfactante; e a maior fluidez da membrana ocasionada pela presença de etanol, que incentiva a troca do conteúdo lipídico bacteriano por ácidos graxos mais fortes e complexos. Assim, na presença de soforolipídios,

as bactérias, na tentativa de manter a rigidez da membrana celular, podem incorporá-lo, resultando na destruição da função bacteriana normal (Glover et al. 1999; Lang et al. 1989; Soufi et al. 2015).

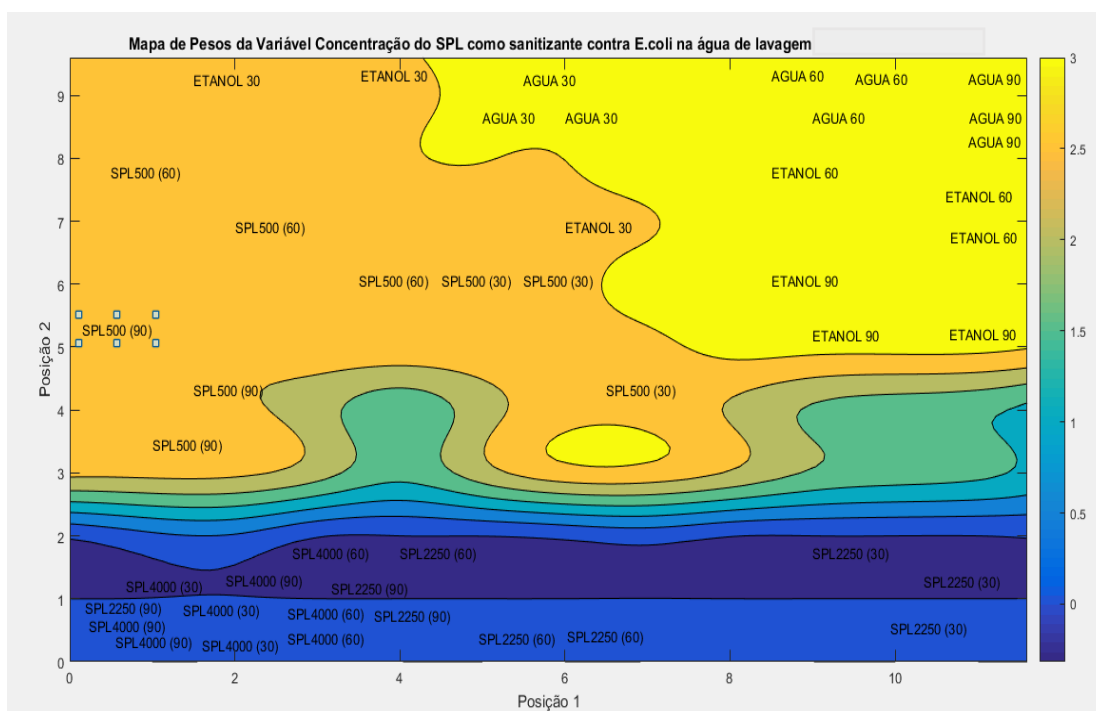
As bactérias aeróbias mesófilas também foram suscetíveis a ação dos soforolipídios e foram reduzidas quando submetidas a concentrações superiores a  $2.250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo mínimo de 30 minutos e após este tempo concentração de  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ocorreu ausência total de contaminação. Com as concentrações de 500, 2.250 e  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídios a 30 minutos de exposição a, houveram diferenças significativas e com resultados decrescentes. Com 60 minutos de tratamento a redução foi mais efetiva e em 90 minutos a  $2.250$  e  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram uma total eficiência, eliminando toda a contaminação presente na água de lavagem.

Os mapas obtidos por redes neurais, apresentados na Figura 2A, 2B, 2C e 2D, confirmam os resultados. Diante da exposição às soluções contendo soforolipídios é evidente a suscetibilidade das quatro cepas estudadas a este metabólito, que foi indicada pelas regiões de diferentes cores, e que pode se visualizar as concentrações e tempos de exposição com ação semelhantes pelas cortes iguais. Os tratamentos com  $2.250$  e  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram uma tendência a diferenciação para todos os microrganismos estudados, demonstrando a eficiência dessas concentrações como um agente sanitizante.

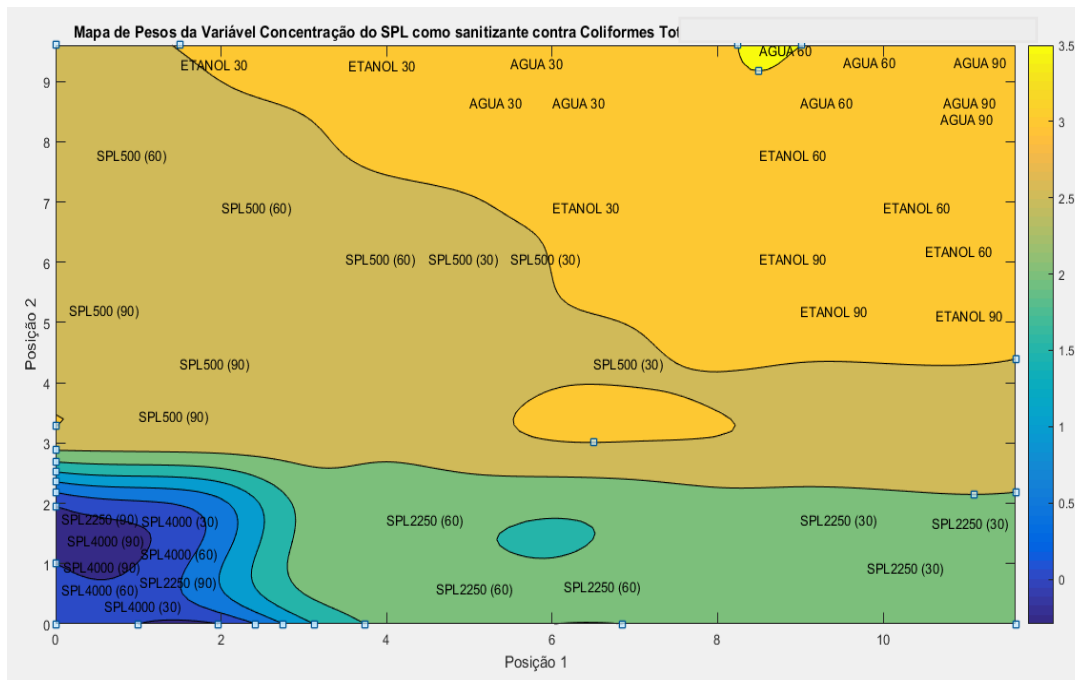
**Figura 2** - Efeito dos soforolipídios a 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  aplicados por imersão em carcaças de frango nos tempos de 30, 60 e 90 minutos contra *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B), coliformes termotolerantes (C) e aeróbios mesófilos (D)



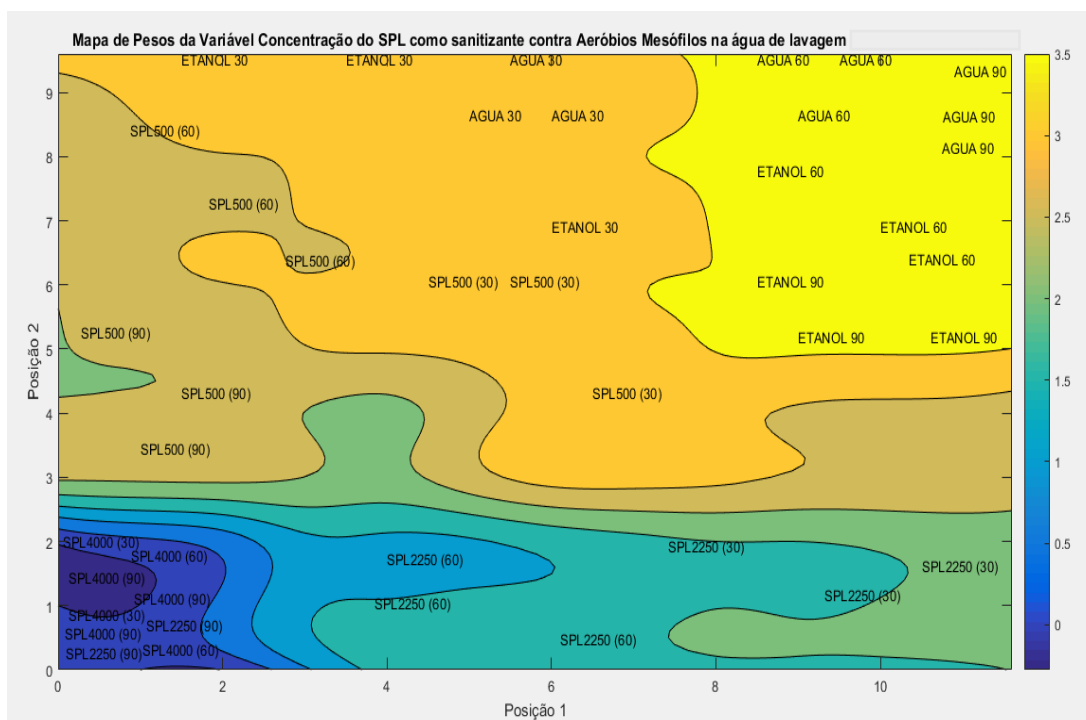
(A) *Staphylococcus aureus*



(B) *E. coli*



(c) Coliformes termotolerantes



(D) Aeróbios mesófilos

Os mapas (Figura 2) descrevem o perfil antimicrobiano das diferentes soluções em tempos específicos de ação, sendo possível verificar pelas regiões de diferentes cores existência ou não de similaridade dos tratamentos.

Analisando o mapa referente ao microrganismo *S. aureus*, é possível verificar que os tratamentos com água e água + etanol (ETANOL) apresentaram

a mesma ação contra o microrganismos estudado, nos diferentes tempos de exposição, e está próxima da área apresentada para a solução com concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (SPL 500), para os tempos de 30 e 60 minutos. O perfis se distanciam, sendo possível afirmar que com ação intermediária está a concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com 90 minutos (SPL 500 (90)), solução com concentração de  $2.250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com 30 e 60 minutos, (SPL 2250 (30) e (SPL 2250(60))). Os melhores foram com as soluções de  $2.250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  por 90 minutos (SPL 2250 (90)) e  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em qualquer tempo de exposição. Assim sendo, há uma tendência de eficiência de ação bactericida com o aumento da concentração do composto em solução, bem como, tempo de exposição, confirmando os achados na estatística descritiva.

O comportamento da *E. coli* diante dos diferentes tratamentos e tempos está demonstrado na Figura 2B, que apresenta quatro diferentes zonas de atuação das soluções aplicadas, ficando totalmente evidente que os tratamentos  $2.250$  e  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (SPL 2250 (90) e SPL 4000 (30), (60) e (90)) em qualquer tempo de exposição possuem similaridade e possuem resultados de ação antimicrobiana próximas a SPL  $2.250$  (30) e (60). Diante dos mapas tem-se que a concentração de  $2.250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídios, é um ponto de referência para ação antibacteriana contra *E. coli* (Figura 2B), sendo este dado correspondente a coliformes termotolerantes (Figura 2C).

Aeróbios mesófilos por se tratarem de cepas menos específicas, apresentaram cinco diferentes regiões (Figura 2D). As regiões referentes das soluções  $2.250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (90) e  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , (30), (60) e (90) são semelhantes e mais opostas aos controles, demonstrando efetividade na ação antimicrobiana.

#### **4. CONCLUSAO**

Os soforolipídios de *S. bombycola* apresentaram efeito antimicrobiano contra os principais contaminantes da indústria avícola, *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos, sugerindo sua utilização como sanitizante na água de lavagem de carcaças de frango, para melhorar o

controle da contaminação nas diferentes etapas do processo de abate e processamento de aves

A aspersão da solução com concentração de 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídios de *S. bombicola* foi eficaz na redução log UFC /g, sendo 1,32 para *S. aureus*, 1,47 para *E. coli*, 1,43 para coliformes termotolerantes e 1,05 para aeróbios mesófilos.

Soforolipídios *S. bombicola* a 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a partir 30 minutos e a 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por 90 minutos erradicaram *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos em carcaças de frango por imersão.

O tratamento por imersão, contendo soforolipídios como sanitizante, foi mais eficiente na redução dos microrganismos contaminantes de carcaças de frango.

A estatística descritiva e as redes neurais completaram o entendimento e confirmaram o efeito do tempo e do aumento das concentrações do soforolipídios como um agente antimicrobiano efetivo, e com perspectiva inovadora de aplicação de um novo sanitizante no abate e processamento de aves.

## REFERÊNCIAS

ABPA. *Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal*. (2019). Retrieved from: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>.

Asmer, H. J. Hans, J; Lang, S; Wagner, F; Wray, V. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65 (9), 1460–1466.

Bashor, M. P.; Curtis, P. A.; Keener, K. M.; Sheldon B.W.; Kathariou S.; Osborne, J.A. (2004). Effects of Carcass Washers on *Campylobacter* Contamination in Large Broiler Processing Plants. *Poultry Science*, 83 (7), 1232–1239.

Bolder, N. M. (1997). Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science and Technology*, 8 (7), 221–227.

Brasil.(1998). Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portaria nº 210, de 10

de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves. *Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil*, Seção 1, 226. Brasília, DF.

Brasil. (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 4, de 4 de Outubro de 2011. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.

Brizio, A.P.D.R.; Isolani, L.W.; Salles, B.; Prentice, C. (2013). Correlação entre contaminação gastrointestinal e presença de salmonella spp. em carcaças de frango industrializadas no Rio Grande do Sul, 0, 12–17.

Cooper, D. G.; Paddock, D. A. (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (6), 1426–1429.

Depner, R. (2015) Contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refilê.

Dengle-Pulate, V.; Joshi, J.; Chandorkar, P.; Bhagwat, S.; Prabhune, A.A. (2014). Application of Sophorolipids Synthesized Using Lauryl Alcohol As a Germicide and Fruit-Vegetable Wash. *Prabhune et al. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (7), 1630–1643.

De Oliveira, M.R.; Magri, A; Baldo, C; Camilios-Neto, D; Minucelli, T; Celligoi, M.A.P.C. (2015). Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 16 (2), 161–174.

Diaz de Rienzo, M.A.; Stevenson, P.S.; Marchant, R.; Banat, I.M. (2015). Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram positive and negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 44 (0), 1–22.

Fontoura, I. C. C.; Saikawa, G.I.A.; Silveira, V.A.I.; Pan, N.C.; Amador, I.R.; Baldo, C.; Rocha, S.P.D.; Celligoi, M.A.P.C. (2020). Antibacterial activity of sophorolipids from *Candida bombicola* against human pathogens. *Brazilian Archives as Biology and Technology*, 63.

Fracchia, L.; Banat, J.J.; Cavallo, M; Ceresa, C.; Banat, I.M. (2015). Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. *AIMS Bioengineering*, 2 (3), 144–162.

Glover, R. E.; R.R.; Jones, M.V.; Jackson, S.K.; Rowlands, C.C. (1999). An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. *FEMS Microbiology Letters*, 177 (1), 57–62.

Hipólito, A.; Caretta, T.O.; Silveira, V.A.I.; Bersaneti, G.T.; Mali, S. Celligoi, M. A. P. C. (“in press” 2021). Active biodegradable cassava starch films containing sophorolipids produced by *Starmarella bombicola* ATCC® 22214™. *Journal of Applied Polymer Science*.

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 *Starmarella bombicola* against food spoilage fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29 (10.1797).

Hoa H.L.N, Loan Q.L, Eun-ki K., Ha T.T., Duy D.N., Khanh Q.H., Dung H.N. (2017). Production and characterization of sophorolipids produced by *Candida bombicola* using sugarcane molasses and coconut oil. *Asia Pac J Sci Technol*. 22(2), 66-75.

Holley, R.A.; Gill, C.O. (2005). Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. ITAL – III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. Retrieved from: <[www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro\\_congresso/5.doc](http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro_congresso/5.doc), 2005>.

Hugas, M.; Tsigarida, E. (2008). Meat Pros and cons of carcass decontamination. *European Food Safety Authority*. 78, 43–52.

Isolan, L.W.; Perdoncini. G.; Todeschini. B.; Santos L. R.; Guahyba A. S.; Depner R.; Nascimento. V. P. (2019). Carcass washing system and *Salmonella* spp. control in poultry slaughterhouses. *Arq. Brasileira Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71, 1.

Joshi-Navare, K.; Khanvilkar, P.; Prabhune, A. (2013). *Jatropha* oil derived sophorolipids: Production and characterization as laundry detergent additive. *Biochemistry Research International*.

Lang, S.; Katsiwela, E.; Wagner, F. (1989). Antimicrobial effects of biosurfactants. *Lipid / Fett*, 91 (9), 363–366.

Lydon, H. L.; Baccile, N.; Callaghan, B.; Marchant, R.; Mitchell, C.A.; Banat, I.M.. (2017). Adjuvant antibiotic activity of acidic sophorolipids with potential for facilitating wound healing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61 (5).

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.(2017) Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*, 8, (3), 743–753.

- Mokgatla, R.M.; Brozel, V.S.; Gouws, P.A. (1998). Isolation of Salmonella resistant to hypochlorous acid from a poultry abattoir. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 379–382.
- Northcutt, J.K.; Smith, D.P.; Musgrove, M.T.; Ingram, K.D.; Hinton, A. (2005). Microbiological impact of spray washing broiler carcasses using different chlorine concentrations and water temperatures. *Poultry Science*, 84 (10), 1648-1652.
- Olanya, O.M.; Ukuku, D.O.; Solaiman, D.K.Y.; Ashby, R.D.; Niemira, B.A.; Mukhopadhyay, S. (2018). 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*, 53 (5), 1303–1315.
- Paulino, B.N.; Pessoa, M.G.; Mano, M.C.R.; Molina, G.; Neri-Numa, I.A.; Pastore, G.M. (2016). Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (24), 10265–10293.
- Pontes, C.; Alves, M.; Santos, C.; Ribeiro, M.H.; Gonçalves, L.; Bettencourt, A.F.; Ribeiro, I.A.C... (2016). Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes?. *International Journal of Pharmaceutics*, 513 (1–2), 697–708.
- Shah, V. ; Badia, D.; Ratsep, P. (2007). Sophorolipids having enhanced antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (1), 397–400.
- Silva, R. B. T. R. Da; Nääs, I. D. A.; Moura, D. J. De. (2009). Broiler and swine production: animal welfare legislation scenario. *Scientia Agricola*, 66 (6), 713–720.
- Silveira V.A.I.; Freitas C.A.U.Q.; Celligoi M.A.P.C. (2018). Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: A promising alternative to conventional drugs. *J App Biol Biotech*, 6 (6), 87-90.
- Silveira, V. A. I.; Nishio, E.K.; Freitas, C.A.U.Q.; Amador, I.R.; Kobayashi, R.K.T., Caretta, T.O.; Macedo, F.; Celligoi, M.A.P.C. (2019). Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101287.
- Silveira, V. A. I.; Marim, B. M.; Hipólito, A.; Gonçalves, M. C.; Celligoi, M.A.P.C. (2020). Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging

films based on poly(lactic acid-sophorolipid) for the control of foodborne pathogens. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100591.

Solaiman, D. K. Y.; Ashby, R.D.; Zerkowski, J.A.; Foglia, T.A.; Uknalis, J. (2016). Antibacterial Activity of Sophorolipids Produced by *Candida bombicola* on Gram-positive and Gram-negative Bacteria Isolated from Salted Hides. *Jalca*, 111 (November), 358–364.

Solaiman, D. K. Y.; Ashby, R. D.; Uknalis, J. (2017). Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. *Journal of Microbiological Methods*, 136, 21–29. Retrieved from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.012>>.

Soufi, B.; Krug, K.; Harst, A.; Macek, B. (2015). Characterization of the *E. coli* proteome and its modifications during growth and ethanol stress. *Frontiers in Microbiology*, 6.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. (2014). *Food Safety and Inspection Service – FSIS*. Laboratory Guidebook: notice of change. Athens, GA. 1-19.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. (2016). *Food Safety and Inspection Service – FSIS*. FSIS Directive 7120, Revision 33. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC, USDA, 1-89.

Valotteau, C.; Banat, I.M.; Mitchell, C.A.; Lyndon, H.; Marchant, R.; Babonneau, F.; Pradier, C.M.; Baccile, N.; Humblot, V. (2017). Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 325–334.

Van Bogaert, I. N. A.; Saerens, 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.

Zhang, X.; Ashby, R.D.; 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 (December), 1–11.

Zhang, X.; Ashby, R.D.; Solaiman, D.K.Y.; Liu, Y.; Fan, X. (2017). Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactic and free acid sophorolipids against *Escherichia coli* O157:H7. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 176–182.

Zhang, X.; Fan, X.; Solaiman, D.K.Y.; Ashby, R.D.; Liu, Z.; Mukhopadhyay, S.; Yan, R. (2016). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on the surface of spinach leaves by biobased antimicrobial surfactants. *Food Control*, 60, 158–165.

### 5.2.2 Patente 1

**Título:** “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, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas, Victória Akemi Itakura Silveira.

**Protocolada em:** 30/06/2020 (processo **BR 10 2020 013479 5**) (3)

**Resumo:** A invenção proposta tem como objetivo o uso de soforolipídios, 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*.

### 5.2.3 Patente 2

**Título:** “Aplicação de soforolipídios como sanitizante no sistema lavagem de carcaças de frango por aspersão para redução de contaminação de aeróbios mesófilos”.

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

**Protocolada em:** 12/03/2019 (processo **BR 10 2019 004754 2**) (2)

**Resumo:** A invenção refere-se à aplicação sofrorolipídios, produzido a partir de uma levedura do gênero *Starmerella* contra aeróbios mesófilos contaminantes em carcaças de frango. Os resultados demonstraram que a concentração de 4.000 µg.mL<sup>-1</sup> de sofrorolipídio foi eficaz em diminuir a população de aeróbios mesófilos em carcaças de frango, obtendo-se redução de 1 log da contaminação presente desse grupo. Os resultados encontrados nessa invenção demonstraram viabilidade e facilidade de aplicação deste composto, na lavagem de carcaças, durante o processo industrial controlando os mesófilos, que são os principais indicativos de qualidade na indústria avícola.

#### 5.2.4 Patente 3

**Título:** “Efetividade do sofrorolipídio como descontaminante na redução de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* na etapa de pré resfriamento de aves”.

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

**Protocolada em:** Outubro 2020 (**processo BR 10 2021 004173 0(4)**)

**Resumo:** A invenção tem como objetivo utilizar sofrorolipídios, produzidos por *Starmerella*, como agente descontaminante, na água de lavagem na etapa de pré resfriamento de aves, local onde ocorre a lavagem propriamente dita das carcaças, e verificar a interferência das variáveis, tempo de exposição e concentração, na efetividade da ação sanitizante deste composto, ou seja, a redução logarítmica dos contaminantes das carcaças, especificamente, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que o sofrorolipídio, foi eficaz no controle da população de coliformes termotolerantes e *E.coli* na água de lavagem, sendo que quanto maior o tempo de exposição dos microrganismos a este antimicrobiano, maior a eficiência do mesmo.

### 5.2.5 Patente 4

**Título:** “Aplicação de soforolipídios para redução de contaminação de aeróbios mesófilos em cortes de frango”.

**Autores:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas, Victória Akemi Itakura Silveira, Mayka Reghiany Pedrão, Alexandre Rodrigo Coelho, Amanda Hipólito, Nicole Pan.

**Protocolada em:** 01/11/2018 (processo **BR 10 2018 072522 (1)**)

**Resumo:** A invenção tem como objetivo a avaliação da atividade antibacteriana de soforolipídios, produzidos por espécie de *Candida*, em aeróbios mesófilos em cortes de frango. O soforolipídio produzido foi liofilizado e os testes conduzidos em triplicada. Os resultados demonstraram que a utilização de soforolipídios no controle da população de mesófilos aeróbios foi eficaz. O aumento da concentração de soforolipídios reduziu o crescimento dos mesófilos em 10%, 41% e 72% com 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, demonstrando ser um eficiente sanitizante não tóxico. Assim, a possibilidade de aplicação deste composto no processo de abate de aves para o controle de mesófilos pode ser de grande relevância.

### 5.2.6 Artigo de Revisão

**Título:** “Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: A promising alternative to conventional drugs”.

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

**Publicado em:** Journal of Applied Biology & Biotechnology

**DOI:** 10.7324/JABB.2018.60614

**Link:** [https://www.jabonline.in/admin/php/uploads/308\\_pdf.pdf](https://www.jabonline.in/admin/php/uploads/308_pdf.pdf)

### 5.2.7 Capítulo de Livro

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

**Título do capítulo:** Perspectivas de aplicação de soforolipídio microbiano na indústria de alimentos.

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

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

**DOI:** 10.22533/at.ed.98019091012

**Link:** <https://www.atenaeditora.com.br/post-artigo/23745>

**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 biossurfactante produzido principalmente pela levedura *Starmerella bombicola*, que se destaca por apresentar alta produtividade. O soforolipídio tem capacidade emulsificante, atividade antimicrobiana e antiadesiva, que são características com potencial para aplicação na indústria de alimentos. Sendo assim, o objetivo dessa revisão foi descrever a produção e caracterização de soforolipídio e as potenciais aplicações na indústria de alimentos.

## CONCLUSÕES

- A produção de soforolipídio em reator obteve um rendimento de 46,41% e atingiu 69,83 g.L<sup>-1</sup> e os parâmetros fermentativos influenciaram a produção de soforolipídios e as estruturas formadas, predominando as formas lactônicas.
- Os soforolipídios produzidos pela *Starmerella bombicola* apresentaram efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e os grupos indicativos de contaminação coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos;
- A sanitização de carcaças por aspersão, com soforolipídio como coadjuvante foi eficaz no controle da população de *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos. A concentração de 4.000 µg.mL<sup>-1</sup> soforolipídios foi a mais eficaz e reduziu o crescimento de *E. coli* e coliformes termotolerantes em 47,6% e 45% respectivamente, evidenciando a potencial ação antibacteriana deste composto.
- A ação antibacteriana de soforolipídios, utilizando como coadjuvante na água de lavagem por imersão, aumenta gradativamente com o tempo de exposição, podendo-se concluir que em um tempo de exposição de 90 minutos, é possível utilizar a concentração de 2.250 µg.mL<sup>-1</sup> para uma redução logarítmica semelhante a obtida por 4.000 µg.mL<sup>-1</sup> em 30 minutos de exposição.
- Os soforolipídios são agente descontaminantes, podendo ser utilizado como coadjuvantes, no sistema de lavagem de carcaças, tanto por aspersão como por imersão, para o controle de *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos, em diferentes etapas do processo de abate e processamento de aves.
- Os soforolipídios são eficazes na redução logarítmica de aeróbios mesófilos em cortes de frango, pós espostejamento.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. H. et al. Using of biosurfactant and bacterial enzymes for treatment of the oily polluted soils. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 5, p. 741–748, 2015.

ABPA. **Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal**. 2019. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: jan. 2020.

ABU-LAIL, N. I.; CAMESANO, T. A. Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *Escherichia coli* JM109. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 10, p. 2173–2183, 2003.

AHMED, J; HIREMATH, N; JACOB, H. Properties of Plasticized Polylactide Films Incorporated with Essential Oils to Inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Science**, v. 81, n.2, 2016.

AHMED, J; HIREMATH, N; JACOB, H. 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**, v. 10, p. 72–78, 2016.

ALAHAKOONA, A. U., et al. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 37–49, 2015.

ALONSO-HERNANDO A. et al. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. **Food Control**, v. 20, n. 12, p. 0-1111, 2009.

ALONSO-HERNANDO, A., ALONSO-CALLEJA, C., & CAPITA, R. Growth kinetic parameters of Gram-positive and Gram-negative bacteria on poultry treated with various chemical decontaminants. **Food Control**, v.33, p. 429–432, 2013.

ANDERSON, ME; MARSHALL, RT; STRINGER, WC; NAUMANN, HD. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 2, p. 326–329, 1977.

- 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.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Property control of sophorolipids: Influence of fatty acid substrate and blending. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 6, p. 1093–1100, 2008.
- ASMER, H. J. HANS, J; LANG, S; WAGNER, F; WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 9, p. 1460–1466, 1988.
- AZIM, A.; SHAH, V.; DONCEL, G. F.; PETERSON, N.; GAO, W.; GROSS, R. *AMINO ACID CONJUGATED SOP*. Amino Acid Conjugated Sophorolipids : A New Family of Biologically Active Functionalized Glycolipids, p. 1523–1529, 2006.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresour Technol**, v. 51, p. 1–12, 1995.
- BANAT, I. M. SATPUTE, SK; CAMEOTRA, SS; PATIL, R; NYAYANIT, NV.. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BANAT, I. M.; SATPUTE, SK; CAMEOTRA, SS; PATIL, R; NYAYANIT, NV. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–18, 2014.
- BARBALHO, T. C. F.; Almeida, P. F.; Almeida, R. C. C.; Hofer, E. Prevalence of *Listeria* spp., at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v. 16, p. 211-216, 2005. doi:10.1016/j.foodcont.2004.01.014
- BASHOR, M. P.; Curtis, P. A.; Keener, K. M.; Sheldon B.W.; Kathariou S.; Osborne, J.A. Effects of Carcass Washers on *Campylobacter* Contamination in Large Broiler Processing Plants. **Poultry Science**, v.83, n.7, p. 1232–1239, 2004.
- BERGSTROM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. Pyolipic acid, a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*, active against *Mycobacterium*

*tuberculosis*. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 10, p. 165–166, 1946.

BLEVINS, RE; KIM, SA; PARK, SH; RIVIERA, R; RICKE, SC. **Food and Feed Safety Systems and Analysis**, Chapter 18: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00018-X>>

BLUTH, M. H.; Kandil, E.M.; Catherine M.; Shah, V.; Lin, Y.; Zhang, H.; Dresner, L.; Lempert, L.; Nowakowski, M.; Gross, R.; Schulze, R.; Zenilman, M. E. Sophorolipids block lethal effects of septic shock in rats in a cecal ligation and puncture model of experimental sepsis\*. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 1, p. E188, 2006.. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-200601000-00026>>.

BOGAERT, I. N. A. VAN; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.010>>.

BOGER, Z. Selection of quas-optimal inputs in chemometrics modeling by artificial neural network analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.490, p.31-40, 2003.

BOLDER, NM. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 7, p. 221–227,1997.

BORSANYIOVA, M. et al. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. **Folia Microbiologica**, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p. 226. Brasília, DF,1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 4, de 4 de Outubro de 2011. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 out. 2011.

BRASIL. Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, 30/03/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitárias. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 dez.2019.

BREITHAUPT, TB; LIGHT, RJ. Affinity chromatography and further characterization of the glucosyltransferases involved in hydroxydocosanoic acid sophoroside production in *Candida bogoriensis*. **J Biol Chem**, v. 16, p. 9622–9628, 1982.

BRIZIO, A.P.D.R.; ISOLAN, L.W.; SALLES, B.; PRENTICE, C. Correlação entre contaminação gastrointestinal e presença de salmonella spp. em carcaças de frango industrializadas no Rio Grande do Sul, v. 0, p.12–17, 2013.

CASAS, J. A.; GARCÍA DE LARA, S.; GARCÍA-OCHOA, F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 3, p. 221–229, 1997.

CASAS, J., & GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 5. p. 488-494, 1999.

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

CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVEIRA, V.A.I.; HIPÓLITO, A.; CARETTA, T.O.; BALDO, C. Sophorolipids: A Review on production and perspectives of the application in agriculture. **Spanish Journal of Agriculture Research**, v. 18, n.3, 2020.

CHEN, J; SONG, X; ZHANG, H; QU, Y. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 501–506, 2006.

CHIN, N.; WEITZMAN, I; DELLA-LATTA, P. **In Vitro Activity of Fluvastatin , a Cholesterol-Lowering Agent , and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against Candida Species and Cryptococcus neoformans**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n.4, p.850-852, 1997.

CLAUS, S.; BOGAERT, I. N. A. VAN. Sophorolipid production by yeasts: a

critical review of the literature and suggestions for future research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 21, p. 7811–7821, 2017.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, M07-A8 — Ninth Edition. **Wayne, PA, USA**, 2012.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (EU) nº 101/2013 da Comissão de 4 de fevereiro de 2013 relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, L 34. 5 fev., 2013.

COMMO, Frederic; BOT, Briant M. **R package nplr n-parameter logistic regressions**. p. 1–11, 2016.

CONCAIX, F. Use of Sophorolipids Comprising Diacetyl Lactones as Agent for Stimulating Skin Fibroblast Metabolism, **U S Patent 6596**, 2003.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1426–1429, 1983.

CORNEY, D. Food Bytes: intelligent systems in food industry. **British Food Journal**, v.104, n.10, p.787-805, 2002.

CREMASCO, H; BORSATO, D.; ANGILELLI, K.G.; GALÃO, O.F.; BONA, E. and VALLE, M.E. Application of shelf-organising maps towards segmentation of soybean samples by determination of inorganic compounds content. **Jounal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.306-310, 2016.

DAMASCENO, T. E. F.; GUAHYBA, A. DA S.; DE CAMPOS, R. M. L. Contaminação resultante de falhas tecnológicas durante o abate de frangos de corte em frigorífico com o serviço de inspeção federal (SIF) no Rio Grande do Sul. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 3, p. 51-51, 11, 2013.

DANIEL, HJ; 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, n. 12, p. 1153–1156, 1998.

DAVEREY, A; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast

*Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 499–504, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.014>>

DAVILA, A.M.; RÉMY, M.; VANDECASTEELE, J.P. Microbiology Biotechnology. **1992**;38:6–11.

DAVILA, AM., MARCHAL, R. & VANDECASTEELE, JP. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. **Appl Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 496–501, 1997. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s002530050962>>

DEISINGH, A. K., STONE, D.C., THOMPSON, M. Applications of electronic noses and tongues in food analysis. **International journal of Food Science and Technology**, v.39, n.6, p.587-604, 2004.

DE OLIVEIRA, MR; MAGRI, A; BALDO, C; CAMILIOS-NETO, D; MINUCELLI, T; CELLIGOI, MAPC. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 16, n. 2, p. 161–174, 2015.

DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: **CONFERÊNCIA APINCO**, p. 191-203, 2001.

DENGLE-PULATE, V.; JOSHI, J.; et al. Application of Sophorolipids Synthesized Using Lauryl Alcohol As a Germicide and Fruit-Vegetable Wash. **Prabhune et al. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1630–1643, 2014.

DENGLE-PULATE, V.; CHANDORKAR, P.; et al. Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2014. v. 17, n. 3, p. 543–552.

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

DEPNER, R. Contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refilê. 2015.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/cgi/content/abstract/61/1/47%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DEY, G.; BHARTI, R.; SEN, R.; MANDAL, M. Microbial amphiphiles: A class of promising new-generation anticancer agents. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 136–146, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.006>>.

DÍAZ DE RIENZO, M. A.; STEVENSON, P.S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram positive and negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 44, n. 0, p. 1-22, 2015.

DOLMAN, BM; KAISERMANN, C; MARTIN, PJ; WINTERBURN, JB. Integrated sophorolipid production and gravity separation. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 162–171, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.021>>

DUARTE, A.M.D.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SANTOS, S.B.; SILVA, J.V.D.; ANDRADE, P.L.A.DE; FALCÃO, L.S.P.D.C.DE A. Occurrence of Salmonella spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.

EBLING, P. D.; BASURCO, V. Análise das perdas econômicas oriundas da condenação de carcaças nos principais estados brasileiros produtores de frangos de corte. 2011.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. **EFSA Journal**, v. 9, n.7, p. 2317, 2011.

ESDERS, TW; LIGHT, RJ. Glucosyl- and acetyltransferases involved in the biosynthesis of glycolipids from *Candida bogoriensis*. **Journal Biology Chemistry**, v. 247, p. 1375– 1386, 1972.

FABRIZIO, K., SHARMA, R., DEMIRCI, A., & CUTTER, C. Comparison of

electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. **Poultry Science**, v.81, n.10, p.1598–1605, 2002.

FDA. Food and Drug Administration. **FDA Takes Significant Steps to Address Antimicrobial Resistance**. Estados Unidos, 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/>>. Acesso em: 20 de outubro de 2019.

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.

FONTES, GC; AMARAL, PFF; COELHO, MAZ. Produção de biossurfactante por levedura. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008.

FONTOURA, I. C. C.; SAIKAWA, G.I.A.; SILVEIRA, V.A.I.; PAN, N.C.; AMADOR, I.R.; BALDO, C.; ROCHA, S.P.D.; CELLIGOI, M.A.P.C. Antibacterial activity of sophorolipids from *Candida bombicola* against human pathogens. **Brazilian Archives os Biology and Technology**, 2020. v. 63. doi: 10.1590/1678-4324-2020180568.

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. Disponível em: <<http://www.aimspress.com/article/10.3934/bioeng.2015.3.144>>

FRANCO, BDGM; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

FREITAS, C. A. U. Q.; SILVEIRA, V.A.I.; CELLIGOI, M.A.P.C; HIPÓLITO, A. Perspectivas de aplicação de sofrolipídio microbiano na indústria de alimentos. In: Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos 3. Curitiba. **Editora Athena**, 2019. doi: 10.22533/at.ed.98019091012. Disponível em: <<https://www.atenaeditora.com.br/post-artigo/23745>>.

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, n. 3, p. 1103–1111, 2013.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155–166, 2006.

GILL, C.O. Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological condition of meat. **J. Food Protect.**, v.67, p.413-419, 2004.

GLOVER, R. E.; SMITH, R.R.; JONES, M.V.; JACKSON, S.K.; ROWLANDS, C.C. An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes, **FEMS Microbiology Letters**, v.177, n.1, p.57–62, 1999. DOI: 10.1016/s0378-1097(99)00289-x.

GORIN, PAJ; SPENCER, JFT; TULLOCH, AP. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 6199, p. 846–855, 1961. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/v61-104>>

GROSS, R. A.; SHAH, V. **Anti-herpes virus properties of various forms of sophorolipids. World patent 2007130738 A1.**

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

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

HAMME, J. D. VAN; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 604–620, 2006.

HAQUE, F; ALFATAH, MD; GANESAN, K; BHATTACHARYYA, MS. Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep23575>>

HARDIN, R.; PIERRE, J.; SCHULZE, R.; MUELLER, C. M.; FU, S.L.; WALLNER, S. R.; STANEK, A.; SHAH, V.; GROSS, R.A.; WEEDON J.; NOWAKOWSKI, M.; ZENILMAN, M.E.; BLUTH, M.H. Sophorolipids Improve Sepsis Survival: Effects of Dosing and Derivatives. **Journal of Surgical Research**, v. 142, n. 2, p. 314–319, 2007.

HERMANS, D.; DAVID HERMANS; VAN DEUN, K.; MESSENS, W.; AN MARTEL; VAN IMMERSEEL, F.; HAESEBROUCK, F.; RASSCHAERT, G.; HEYNDRIX, M.; PASMANS, F. Campylobacter control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. **Veterinary Microbiology**, v.152, n.3-4, p.219–228, 2011.

HILLION, G. Use of a sophorolipid to provide free radical formation inhibiting

activity or elastase inhibiting activity, **US 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 Applied Polymer Science**, “in press” 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, 10.1797, 2020. doi:10.1016/j.bcab.2020.101797

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

HOLLEY, R.A.; GILL, C.O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. ITAL – **III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes**. Disponível em: <www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro\_congresso/5.doc, 2005>.

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. MEAT Pros and cons of carcass decontamination : The role of the **European Food Safety Authority**. 2008. v. 78, p. 43–52.

HU, Y.; JU, L. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization, v. 87, p. 263–272, 2001.

ITO, S.; INOUE, S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: Possible relation to alkane uptake. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1278–1283, 1982.

JAMES, W. O.; PRUCHA, J. C.; BREWER, R. L. Cost-Effective techniques to control human enteropathogens on fresh poultry. **Poultry Science**, v. 72, n. 1174–1176, 1993.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P; GEA, T; SÁNCHEZ, A; FONT, X. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 115, p. 93–100, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.08.006>

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; CASTILLEJOS, M.; KOH, A.; GROSS, R.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; GEA, T. Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. **Journal of Cleaner Production**, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652617328111>>

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v.45, n.2, p.0–830, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.014

JOSHI-NAVARE, K.; KHANVILKAR, P.; PRABHUNE, A. Jatropha oil derived sophorolipids: Production and characterization as laundry detergent additive. **Biochemistry Research International**, 2013.

JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

JOSHI-NAVARE, K.; SHIRAS, A.; PRABHUNE, A. Differentiation-inducing ability of sophorolipids of oleic and linoleic acids using a glioma cell line. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 5, p. 509–512, 2011.

KANASHIRO, A.M.I. Salmonella em swabes de superfície em abatedouro avícola. Descalvado: **Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola**, 2007.

KAUR SEKHON, K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 7, 2012.

KIM, K.; KIM, YB; LEE, BS; KIM, EK. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 235–241, 2002.

KIM, HS; KIM, YB; LEE, BS; KIM, EK. Sophorolipid production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing byproduct. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 55–58, 2005.

KIM, Y.B.; YUN, H.S.; KIM, E.K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6028–6032, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.053>>

KOLMAN, E.; MARGALLOT, M. Are artificial neural networks white boxes? **Transactions on neural networks**, v.16, n.4, p.884-852, 2005.

KONISHI, M; YOSHIDA, Y; HORIUCHI, JI. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 317–322, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.08.007>>

KOVÁCS, Z.L. **Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo, Editora Acadêmica, 163p, 1996.

KULAKOVSKAYA, E.; BASKUNOV, B.; ZVONAREV, A. The Antibiotic and Membrane-damaging Activities of Cellobiose Lipids and Sophorose Lipids. **Journal of Oleo Science**, v. 63, n. 7, p. 701–707, 2014. Disponível em: <<http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jos/ess14037?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>.

LANG, S.; KATSIWELA, E.; WAGNER, F. Antimicrobial effects of biosurfactants. **Lipid / Fett**, v. 91, n. 9, p. 363–366, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/lipi.19890910908>>.

LANSINI, V. Eficiência do TIMSEN® nas etapas de escaldagem e pré-resfriamento em abatedouro de aves, Universidade Federal de Pelotas. 2010.

LEE N.Y.; PARK, S. Y.; KANG, I. S.; HA, S. D. The evaluation of combined chemical and physical treatments on the reduction of resident microorganisms and Salmonella Typhimurium attached to chicken skin. **Poultry Science**, v. 93, n. 1, p. 208-215, 2014.

LIAO, S. Expert system methodologies and applications - A decada Review from 1995 to 2004. **Expert Systems with Applications**, v. 28, n.1, p.93-109, 2005.

LO, CM; JU, LK. Sophorolipids-induced cellulose production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C 30 and *Candida bombicola*. **Enzyme Microb Technol**, v. 44, p. 107–111, 2009.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V.L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1715–1726, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.09.002>>.

LUCERA, A.; COSTA, C.; CONTE, A.; DEL NOBILE, A.A. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, artigo 287, 2012.

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, n. 5, 2017.

MA, X. J.; LI, H.; SHAO, L.; SHEN, J.; SONG, X. Effects of nitrogen sources on production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1623–1632, 2011.

MAHAMI, T.; TORGBY-TETTEH, W.; KOTTOH, D. I.; AMOAKOAH TWUM, L. A.; GASU, E.; ANNAN, S. N. Y.; LARBI, D.; ADJEI, I.; ADU-GYAMFI, A. CORRIGENDUM TO “MICROBIAL FOOD SAFETY RISK TO HUMANS ASSOCIATED WITH POULTRY Feed: The Role of Irradiation.” **International Journal of Food Science**, v.1, n.1, 2019. doi:10.1155/2019/2780520

MAINGAULT, M. Utilization of sophorolipids as therapeutically active substances or cosmetic products, in particular for the treatment of the skin. **US Patent 5.981.497**, 1999. p. 7. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US5981497>>.

MAKKAR, RS; CAMEOTRA, SS; BANAT, IM. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011. Disponível em: <<http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/2191-0855-1-5>>

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W.; YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 419–435, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>>.

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

MASARU, K; TAKASHI, N; YOJI, A; KAZUO, N; TATSU, N; SUMIKO, T; JOTARO, N. Composition for high-density cold storage transportation, **Japanese Patent**

MILLER, RM. Biosurfactant-facilitated remediation of metal contaminated soils.

**Environ Health Perspect**, v. 103, p. 59–62, 1995.

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

MOISET, G.; LÓPEZ, C. A.; BARTELDIS, R.; SYGA, L.; RIJPKEMA, E.; CUKKEMANE, A.; BALDUS, M.; POOLMAN, B.; MARRINK, S.J. Disaccharides impact the lateral organization of lipid membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 46, p. 16167–16175, 2014.

MOKGATLA, R.M.; BROZEL, V.S.; GOUWS, P.A. Isolation of *Salmonella* resistant to hypochlorous acid from a poultry abattoir. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27. p 379–382, 1998.

MORSHEDY, A. E. M. A.; SALLAM, K. I. Improving the microbial quality and shelf life of chicken carcasses by trisodium phosphate and lactic dipping. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.7, p.645-650, 2009.

MORYA, V. K.; PARK, J.; KIM, T. J.; JEON, S.; KIM, E.-K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 282–288, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413008626>>.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**. Approved Guideline, M26-1, v. 19, n. 18, Wayne, PA, USA: CLSI.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **J.Biol.Chen.** v. 153, p. 375–80, 1944.

NGUYEN, T. T.; SABATINI, D. A. Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 2, p. 1232–1244, 2011.

NITSCHKE, M.; COAST, SG. Biosurfactants in food industry. **Trends Food Sci Technol**, v. 18, p. 252–259, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NITSCHKE, M; SILVA, SS. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, p. 1–8, 2017.

NORTHCUTT, J.; SMITH, D.; INGRAM, K. D.; HINTON, A.; MUSGROVE, M. Recovery of bacteria from broiler carcasses after spray washing with acidified electrolyzed water or sodium hypochlorite solutions. **Poultry Science**, v. 86, n. 10, p. 2239-2244, 2007.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Prudent Practices in the Laboratory: handling and disposal of chemicals**. Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications. National Academy Press. Washington, D.C. 1995.

OF, N. Small plant intervention treatments to reduce bacteria, v. 1, p. 1–7, 2003.

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, A. A.; MARIA AUXILIADORA ANDRADE, M.A.; ARMENDARIS, M.; BUENO, P.H.S. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 79–89, 2016.

OLIVEIRA, MR; MAGRI, A; BALDO, C; CAMILIOS-NETO, D; MINUCELLI, T; CELLIGOI, MAPC. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 16, n. 2, p. 161–174, 2015.

PANJIAR, N.; SACHAN, S. G.; SACHAN, A. Microbial Applications, v.2. n. 2, p. 213–229, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-52669-0>>.

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; ALVES, M; SANTOS, C; RIBEIRO, MH; GONÇALVES, L; BETTENCOURT, AF; RIBEIRO, IAC. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 697–708, 2016.

PRICE, N. P. J.; RAY, K.J.; KARL E. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.07.016>>.

PURNELL, G. et al. Comparison of Acidified Sodium Chlorite, Chlorine Dioxide, Peroxyacetic Acid and Tri-Sodium Phosphate Spray Washes for Decontamination of Chicken Carcasses. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2093–2101, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1211-8>

QUIOCHO, F. A. Carbohydrate-Binding Proteins: Tertiary Structures and Protein-Sugar Interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 287–315, 1986. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.55.070186.001443>>.

RAHMAN, S.M.E; DING, T.; OH, D. H. Inactivation effect of newly developed low concentration electrolyzed water and other sanitizers against microorganisms on spinach. **Food Control**, v.21, n.10, p. 0 -1387, 2010.

RASHAD, MM; NOOMAN, MU; ALI, MM; MAHMOUD, AE. Production, characterization and anticancer activity of *Candida bombicola* sophorolipids by means of solid state fermentation of sunflower oil cake and soybean oil. **Grasas Aceites**, v. 65, n. 2, p. 1–11, 2014.

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.

RIBEIRO, I.A.C., FAUSTINO, C.M.C., GUERREIRO, P.S., FRADE, R.F.M., BRONZE, M.R., CASTRO, M.F., RIBEIRO, M.H.L.. Development of novel sophorolipids with improved cytotoxic activity toward MDA-MB-231 breast cancer cells. **Journal of Molecular Recognition**, v. 28. n. 3, p. 155–165, 2015.

RIENZO, MADD; DOLMAN, B; GUZMAN, F; KAISERMANN, C; WINTERBURN, J; BANAT, IM; MARTIN, P. Antimicrobial properties of sophorolipids produced by *Candida Bombicola* ATCC 22214 against gram positive and Gram-negative bacteria. **New Biotechnology**, v. 31, n. July, p. S66–S67, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678414018305>>

RISPOLI, FJ.; BADIA, D; SHAH, V. Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 938–944, 2010.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 109–116, 2006.

RUSSELL, S.M.; AXTELL, S.P. Monochloramine versus sodium hypochlorite as antimicrobial agents for reducing populations of bacteria on broiler chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 758-763, 2005.

RUSSEL, S. **Chlorine: Still the Most Popular Sanitizer in the Poultry Industry**. 2007.

SAERENS, KMJ;ROELANTS, SL; VAN BOGAERT, IN; SOETAERT, WIM. Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGTA1, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 1, p. 123–132, 2011.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on biosurfactants: fermentation, applications, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. GEBJ-29, p. 1–42, 2011.

SAMAD, A; ZHANG, JI; CHEN, D; CHEN, X; TUCKER, M; LIANG, Y. Sweet sorghum bagasse and corn stover serving as substrates for producing sophorolipids. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 353–362, 2017.

SATPUTE, SK; PŁAZA, GA; BANPURKAR, AG. Biosurfactants' Production from Renewable Natural Resources: Example of Innovative and Smart Technology in Circular Bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, 2017. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/mspe.2017.25.issue-1/mspe-2017-0007/mspe-2017-0007.xml>

SEN, S; SUPARNA, BORAH; SIDDHARTHA, 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, p. 95, 2017. Disponível em: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017->

[0711-z](#)

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 ; BADIA, D.; RATSEP, P. Sophorolipids having enhanced antibacterial activity [1]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 397–400, 2007a.

SHAH, V ; BADIA, D.; RATSEP, P. Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity Letters to the Editor Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity, v. 51, n. 1, 2007b.

SHAO, L.; SONG, X.; MA, X.; LI, H.; QU, H. Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. **Journal of Surgical Research**, v. 173, n. 2, p. 286–291, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2010.09.013>>.

SHARMA, R.; OBEROI, H. S. Biosurfactant-Aided Bioprocessing: Industrial Applications and Environmental Impact. **Recent advances in Applied Microbiology**, Chapter 3, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-5275-0>>

SHETE, A. M.; WADHAWA,G.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 65, n. 2, p. 91–115, 2006.

SHIN, J. D.; LEE, J.; KIM, Y.B.; HAN, I.S.; KIM, E.K.. Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22-carbon-fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3170–3174, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.019>>.

SILVA, JA. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. *Higiene Alimentar*, v. 12, n. 58, p. 9–14, 1998.

SILVA, R. B. T. R. Da; NÄÄS, I. D. A.; MOURA, D. J. De. Broiler and swine production: animal welfare legislation scenario. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 6,

p. 713–720, 2009.

SILVEIRA V.A.I.; FREITAS C.A.U.Q.; CELLIGOI M.A.P.C. Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: A promising alternative to conventional drugs. **J App Biol Biotech**, v. 6. n. 6, p. 87-90, 2018. doi: 10.7324/JABB.2018.60614.

SILVEIRA, V. A. I.; NISHIO, E.K.; FREITAS, C.A.U.Q.; AMADOR, I.R.; KOBAYASHI, R.K.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**, 2019, 101287. doi:10.1016/j.bcab.2019.101287

SILVEIRA, V. A. I.; MARIM, B. M.; HIPÓLITO, A.; GONÇALVES, M. C.; 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. doi:10.1016/j.fpsl.2020.100591.

SINGH, S.; PATEL, P.; JAISWAL, S.; PRABHUNE, A.A.; RAMANA, C.V.; PRASAD, 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 J. Chem.**, v. 33, n. 3, p. 646–652, 2009. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=B811829A>>.

SINHAMAHPATRA. M.; BISWAS. S.; A.K. DAS; BHATTACHARYYA. D. Comparative study of different surface decontaminants on chicken quality. **British Poultry Science**, v.45, n.5, pp. 624–630, 2004. doi:/10.1080/00071660400006552

SMITH, D. P.; CASON, J.A.; BERRANG, M.E. Efeito descontaminação fecal e contaminação cruzada em números de coliformes, *Escherichia coli*, *Campylobacter* e *Salmonella* em carcaças de frango resfriadas por imersão. **Journal of Food Protection**, v.68, n.7, p.1340-1345, 2005.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R.D. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 15, p. 1241–1245, 2004.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R.D.; ZERKOWSKI, J.A.; FOGLIA, T.A.;

UKNALIS, J. Antibacterial Activity of Sophorolipids Produced by *Candida bombicola* on Gram-positive and Gram-negative Bacteria Isolated from Salted Hides. **Jalca**, v. 111, n. November, p. 358–364, 2016.

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

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; UKNALIS, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 136, p. 21–29, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.012>>.

SOUFI, B.; Krug, K.; HARST, A.; MACEK, B. Characterization of the *E. coli* proteome and its modifications during growth and ethanol stress. *Frontiers in Microbiology*, v.6, 2015. doi:10.3389/fmicb.2015.00103

STEFANI, L. M.; FARIA, G.A.; BIFFI, C.P.; KRYSTINE, H; BASSI, G; LANGARO, . Trimming and washing poultry carcass to reduce microbial contamination : A comparative study. **Processing , Products and Food Safety**, p. 1–4, 2011.

STEFANI, LM; BACKES, R.G.; FARIA, G.A.; BIFFI, C.P.; ALMEIDA, J.M.; KRYSTINE, H.; BASSI, G.; LANGARO, A. Trimming and washing poultry carcass to reduce microbial contamination: a comparative study. **Poultry Science**, v.93, p.3119-3122, 2014.

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

SUN, X. X.; LEE, Y.J.; CHOI J.K.; KIM, E.K. Synergistic effect of sophorolipid and loess combination in harmful algal blooms mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 9–10, p. 863–872, 2004.

THOMAS, C.J.; McMeekin, T.; Effect of water immersion on the microtopography of the skin of chicken carcasses. *J. Sci. Food Agric.*, v.33, p.549- 554, 1982.

TOLDRÁ, F. Safety of meat and processed meat. University of Georgia, U.S.A. Ed. Springer. 699 p. 2009.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Microbial Biosurfactants Market (Rhamnolipids, Sophorolipids, Mannosylerythritol Lipids (MEL) and Other for Household Detergents, Industrial & Institutional Cleaners, Personal Care, Oilfield Chemicals, Agricultural Chemicals, Food Processing, Textile and. **Transparency Market Research**, v. 4, p. 74, 2014. Disponível em: <<http://www.transparencymarketresearch.com/surfactants-market.html>>

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. **Food Safety and Inspection Service – FSIS**. Laboratory Guidebook: notice of change. Athens, GA. p. 1-19. 2014a.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. **Food Safety and Inspection Service – FSIS**. FSIS Directive 7120, Revision 33. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC, USDA, p. 1-89, 2016.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C.J.; RAHMAN, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–6, 2015.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.072>>.

VAN BOGAERT, I. N. A.; SAERENS, K.; De MUYNCK C.; DEVELTER D.; SOETAERT W.; VANDAMME E. J. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 23–34, 2007. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s00253-007-0988-7>. Van.>

VAN BOGAERT, I. N. A., ZHANG, J., & SOETAERT, W.. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46. n. 4, p. 821–833, 2011. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.010>>

VENTURINI, K.S.; SARCIELLI, M.; SILVA, L.C. Características da carne de frango. Vitória: PIEUFES, 2007. 7p. (Boletim Técnico 01307).

VON RUCKERT, D.A.S.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, B.M. et al. Pontos críticos de controle de Salmonella spp. no abate de frangos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootc., v.61, p.326-330, 2009.

WADEKAR, S; KALE, S; LALI, A; BHOWMICK, D; PRATAP, A. Sophorolipid production by *Starmarella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 6, p. 1029–1039, 2012.

WANG, H.; JUN, Q.; DUAN, D. et al. Combination of a novel designed spray cabinet and electrolyzed water to reduce microorganisms on chicken carcasses. **Food Control**, v.86, p.200-206, 2018.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 216: Disinfectants and disinfectant by-products. In: WHO. **Chemistry of disinfectants and disinfectant by-products**. Geneva. 2000.

WHO/FAO. WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Risk assessment of Salmonella in eggs and broiler chickens. **Microbiological Risk Assessment Series**. EUA: WHO, 2002.

WHO/FAO. WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Codex Alimentarius: International Food Standards**. In: WHO. Guidelines for the control of Campylobacter and Salmonella in chicken meat. 2-26. CAC/GL 78-2011. 2011.

YOO, DS; LEE, BS; KIM, EK. Characteristics of Microbial Biosurfactant as an Antifungal Agent Against Plant Pathogenic Fungus. **J Microbiol Biotechnol**, v. 15, p. 1164–1169, 2005.

ZABOT, S. et al. Ácidos Orgânicos e Compostos Clorados para Controle de Salmonella spp. em frangos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, SP, 2020. v. 25, n. 1, p. 76-84, 2018. DOI: 10.20396/san.v25i1.8651123. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8651123>. Acesso em: 18 nov. 2020.

ZAKI, H.M.B.A.; MOHAMED, H.M.H.; EL-SHERIF, AMAL M.A. Improving the antimicrobial efficacy of organic acids against Salmonella enterica attached to chicken skin using SDS with acceptable sensory quality. **Food Science and Technology**, v.64, n.2, p.558–564, 2015. doi:10.1016/j.lwt.2015.06.012

ZHANG, X; ASHBY, R; SOLAIMAN, DKY; UKNALIS, J; FAN, X. Inactivation of *Salmonella spp.* and *Listeria spp.* by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. DEC, p. 1–11, 2016a.

ZHANG, X; FAN, X; SOLAIMAN, DKY; ASHBY, RD; 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, 2016b. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.026>>

ZHANG, X; ASHBY, RD; SOLAIMAN, DKY; 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.002>>

ZHANG, X ; 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. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1111/1751-7915.13028>>

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.

ZIECH, R. E. Caracterização de *Salmonella* sp. isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos. 2015. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/37368>>.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – Patente 1

**“Uso de sofrorolipídios de *Starmarella* durante a lavagem de carcaças para redução microbiana após a etapa de evisceração de frangos de corte”.**

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas<sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>.

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

**1. INTRODUÇÃO**

A lavagem de carcaças na etapa de evisceração, é uma alternativa legal no controle de patógenos no abate de aves, ou seja, remoção da contaminação visível por água, através de chuveiros, com vazão e pressão controladas, instalados nas linhas, pós ação fiscal. Este procedimento visa a remoção do conteúdo gastrointestinal interno e externo das aves, exceto contaminação biliar, e foi fundamento em estudos pelas entidades privadas em que o processo de lavagem é mais eficiente que o refile das carcaças na retirada das contaminações, com menores perdas e também fundamentado legalmente por legislações de países como Canadá, EUA e União Europeia. Diante assim, a Resolução nº 4 de 04 de outubro de 2011 (BRASIL, 2011) autoriza a lavagem de carcaças no abate de aves, sendo que qualquer outra tentativa a indústria estaria infringindo as legislações de tal segmento.

Diversos estudos têm sido direcionados na busca de novos agentes sanitizantes e antimicrobianos, no entanto, no Brasil ainda não é permitida a utilização de qualquer adjunto ou composto descontaminantes no processamento de abate das aves, sendo utilizado somente cloração da água de 0,2 a 2,0 ppm de cloro livre e máximo 5 ppm na água de renovação dos pré resfriadores (chillers) (BRASIL, 1998).

Estudos com agentes sanitizantes como cloro, derivados de ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico, fumárico), sorbatos e benzoatos, fosfato

trisódico (TSP), bactericidas (nisina), culturas starter (*Lactobacillus* e *Lactococcus*), peróxido de hidrogênio, ozônio, têm sido constantes a fim de legalizar tais coadjuvantes no abate e processamento de aves, com objetivo de reduzir a contaminação de microrganismos presentes nas carcaças devido ao rompimento do trato-intestinal nas etapas desde a apanha até evisceração (ANDERSON et al., 1977; BOLDER et al., 1997; HUGAS; TSIGARIDA, 2008; DEPNER, 2015).

Os soforolipídios são biossurfactantes compostos por um dissacarídeo de soforose unidos a uma cadeia de ácido graxo (ASHBY; SOLAIMAN, 2010). Suas propriedades antimicrobianas estão intimamente relacionadas com sua estrutura química formada, que podem ser divididas em dois grupos principais, as formas acídicas e lactônicas. As formas lactônicas são mais eficazes como agente bactericida sendo capaz de induzir a morte de células planctônicas e biofilmes, podendo ser comparável aos antimicrobianos convencionais (PAULINO et al., 2016).

Diversos resultados na literatura mostram seu grande potencial como agente antimicrobiano alternativo no combate de microrganismos patogênicos (SILVEIRA et al., 2019, PONTES et al., 2016; SLEIMAN et al., 2009; MORYA et al., 2013; HOA et al., 2017; VALOTTEAU et al., 2017; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Já foram comprovadas ações para bactérias de extrema importância no controle higiênico sanitário das indústrias de abate e processamento de aves, tanto Gram-positivas e negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria Monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Salmonella typhimurium*, entre outras. As atividades antimicrobianas dos soforolipídios envolvem mecanismos de desestabilização e alteração da permeação da membrana celular, o que leva a ruptura e extravasamento do conteúdo celular (FRACCHIA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

Considerando a importância do desenvolvimento de novas estratégias e agentes para o controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos, frequentemente presentes nas indústrias de abate de aves, os soforolipídios podem ser vistos como importante sanitizante nesta perspectiva.

Dessa forma, a presente invenção tem como objetivo avaliar, a ação sanitizante do soforolipídio, “*in vivo*”, para redução de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* presentes em carcaças de frango.

## 2. METODOLOGIA

Foram desenvolvidas 3 etapas da invenção sendo: Etapa 1: produção e extração dos soforolipídios de uma espécie de *Starmerella*; Etapa 2: aplicação de diferentes concentrações de soforolipídios em carcaças visando a redução de coliformes termotolerantes e *E. coli*, Etapa 3: análises microbiológicas pelo sistema Petrifilm™C (3M®).

**ETAPA 1** – A produção dos soforolipídios foi realizada por uma levedura do gênero *Starmerella* em meio de fermentação inicial contendo em (g.L<sup>-1</sup>): glicose, 77,5; ácido oleico, 75; extrato de levedura 2,5, por batelada alimentada, com adições de 20 g.L<sup>-1</sup> de ácido oleico a cada 48h e porção única de 90 g.L<sup>-1</sup> de glicose quando a biomassa atingiu seu máximo (estimado por leitura 600 nm). A fermentação foi em biorreator de bancada (5 L) com volume operacional de 3,5 L; pH controlado em 3,5; 450 rpm; 30°C por 288h. A fermentação foi interrompida por centrifugação e do sobrenadante extraído os soforolipídios com acetato de etila (1:1) e rotaevaporado. A fração obtida foi submetida a nova extração em funil de separação com solução metanol água 4:1 (v/v) e hexano (v/v) nas proporções de 1:1 (v/v), a fim de se obter os soforolipídios, esse foi seco em estufa até eliminação completa do solvente e liofilizado (MINUCELLI et al., 2017).

**ETAPA 2** – Aplicação dos soforolipídios como sanitizante na população de coliformes termotolerantes e *E. coli* nas carcaças de frango. Previamente foi realizado teste de solubilidade do soforolipídio, sendo o composto solúvel em solução contendo ≥45% de etanol em água (v/v). Os tratamentos testados foram:

- I) Controle com água de torneira clorada (0,2 a 2,0ppm),
- II) Água + Etanol (45%),

- III) Solução com Etanol 45% + 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídio,
- IV) Solução com Etanol 45% + 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídio,
- V) Solução com Etanol 45% + 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídio.

Foram preparadas soluções estoque para cada tratamento em 45% etanol (v/v) e colocadas em banho de ultrassom por 20 minutos.

O teste consistiu na aspersão de 500mL das soluções com as diferentes concentrações nas amostras de carcaças utilizando borrifadores. Ao final de cada tempo de tratamento, as amostras de frango foram coletadas em sacos plásticos estéreis e mantidas congeladas até a análise microbiológica. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

**ETAPA 3** - Análises microbiológicas para determinação de coliformes termotolerantes e *E. coli* foram realizadas em placas Petrifilm™C (3M®). Amostras contendo 25 g da pele da carcaça de diferentes partes, dorso, peito coxas e asas, foram coletadas e acondicionados em sacos de polietileno estéreis, contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 1% e estéril. Logo após foram homogeneizadas em parelho stomacher por 3 minutos, na diluição  $10^{-1}$  e diluições subsequentes foram realizadas em solução salina 0,85%, estéril. Para a cálculo de coliformes termotolerantes, 1 mL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foram semeadas em placas Petrifilm™C (3M®), específicas para coliformes termotolerantes e *E. coli* e com incubação a 45°C por 48 horas. Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmo decimal (Log10) e expressas em Log UFC/ 25g.

No presente experimento foram avaliadas 45 amostras, sendo realizado 9 repetições para cada tratamento exposto anteriormente.

Para análise estatística dos dados, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e as variáveis resposta observada foi a contagem de coliformes termotolerantes e contagem de *E. coli* em  $\log_{10}$  (UFC/25g).

### 3. RESULTADOS

Os resultados das análises microbiológicas estão expostos abaixo na Tabela 1.

**Tabela 1** – Coliformes termotolerantes e *E. coli* ( $\log_{10}$ UFC/g) de carcaças de frango tratadas com diferentes concentrações de soforolipídios

Tratamentos	Coliformes termotolerantes	<i>E. coli</i>
Controle (Água)	3,20 <sup>a</sup>	3,09 <sup>a</sup>
Etanol 45%	3,05 <sup>b</sup>	2,96 <sup>b</sup>
Soforolipídio 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,85 <sup>c</sup>	2,61 <sup>c</sup>
Soforolipídio 2.250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,05 <sup>d</sup>	1,96 <sup>d</sup>
Soforolipídio 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,76 <sup>e</sup>	1,62 <sup>e</sup>

Letras iguais não diferiram entre si no Teste de Kruskal-wallis.

De acordo com os testes de Shapiro-Wilk a 5% de significância, os resíduos não podem ser considerados normais ( $p\text{-valor} = 2,218\text{e-}05$ ). Diante de tal resultado foi utilizado o Teste de Kruskal-wallis para comparação de médias.

Em relação aos tratamentos testados, todos diferiram entre si ao nível de significância de 5% (Tabela 1). O aumento da concentração de soforolipídios reduziu o crescimento tanto de coliformes termotolerantes como de *E. coli* comparado ao controle.

O aumento da concentração de soforolipídios reduziu o crescimento de coliformes termotolerantes em 10,9%, 35,9% e 45% com 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, e para *E.coli* em 15,5%, 36,6% e 47,6% com 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente demonstrando uma significativa redução quando comparada ao tratamento com água (controle).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os sofrólipídios 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*.

#### REFERÊNCIAS

ABPA. Relatório Anual da ABPA 2019. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, 2019. p. 68. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/>>.

ANDERSON, M. E.; MARSHALL, R. T.; STRINGER, W. C.; NAUMANN, H. D. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. **Journal of Food Science**, v.42, n.2, p.326-329, 1977.

ASHBY, Richard D.; SOLAIMAN, Daniel K. Y. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1429–1437, 2010.

BOLDER, N.M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, n. 7, p.221-227, jul.1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1998**. Seção 1, p. 226.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 4, de 4 de Outubro de 2011. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília. 10 jan. 2001. Seção 1, p.46- 53.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (EU) nº 101/2013 da Comissão de 4 de fevereiro de 2013 relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, 5 fev, 2013. L 34.

DEPNER, R. F. R. **Comparação dos resultados da contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refile e lavagem de carcaças em abatedouros de frangos do Rio Grande do Sul**. 2015. 53f. Dissertação (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

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

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performances objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n.4, p. 2105, 2011.

FRACCHIA, L.; BANAT, J.J.; CAVALLO, M.; CERESA, C.; BANAT, I.M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **Bioengineering**. 2 (3), 144-162, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p.118-157.

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

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, v. 78, p. 43-52, 2008.

JAMES, W. O.; PRUCHA, J. C.; BREWER, R. L. Cost-Effective techniques to control human enteropathogens on fresh poultry. **Poultry Science**, v.72, p.1174-1176, 1993.

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella spp.* e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p. 465-476, jul./set. 2007.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MORSHEDY, A. E. M. A.; SALLAM, K. I. Improving the microbial quality and shelf life of chicken carcasses by trisodium phosphate and lactic dipping. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.7, p.645-650, 2009.

MORYA, V. K.; PARK, J.H.; KIM, T.J.; JEON, S.; KIM, E.K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 282–288, 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Prudent Practices in the Laboratory: handling and disposal of chemicals**. Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications. National Academy Press. Washington, D.C. 1995.

OFFICIAL method. *Escherichia coli* O157:H7 in selected foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** v. 88, p.1334, 2005b, 2005.

OFFICIAL method. Simplate coliform and *E. coli* color indicator: detection and confirmed quantitation of coliforms and *E. coli* in foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** v.88, p.1318, 2005a, 2005.

OFFICIAL methods of analysis. 18.ed. Gaithersburg: **AOAC**. v.88, chap.17, p.233-234, 2005.

OLIVEIRA, M.R.; MAGRI, A.; BALDO, C.; CAMILIOS-NETO, D.; MINUCELLI, T.; CELLIGOI, M.A.P.C. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **Intl. J. of Adv. Biotec. and Res.** v.6, 161-174, 2015.

OLIVEIRA, A.V.B.; SILVA, R.A.; ARAÚJO, A.S. et al. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte – referencial teórico. **Rev. Verde**, v.6, p.1-16, 2011.

PAULINO, B.N.; PESSOA, M.G.; MANO, M.C.; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 24, p. 10265–10293, 2016.

PONTES, C.; ALVES, M.; SANTOS, C.; RIBEIRO, M.H.; GONÇALVES, L.; BETTENCOURT, A.F.; RIBEIRO, I.A. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 513, n. 1–2, p. 697–708, 2016.

Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2019>>.

RUSSEL, S. **Chlorine: Still the Most Popular Sanitizer in the Poultry Industry**. 2007.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.9-14, 1998.

SILVEIRA V.A.I.; FREITAS C.A.U.Q.; CELLIGOI M.A.P.C. Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: A promising alternative to conventional drugs. **J App Biol Biotech**, v. 6. n. 6, p. 87-90, 2018. doi: 10.7324/JABB.2018.60614.

SILVEIRA, V. A. I.; NISHIO, E. K.; QUEIROZ, C. A. U.; AMADOR, I. R.; KOBAYASHI, R. K. 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.

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. **Ann Clin Lab Sci**. 39 (1), 60-63, 2009.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; UKNALIS, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 136, p. 21–29, 2017.

TOLDRÁ, F. **Safety of meat and processed meat**. University of Georgia, U.S.A. Ed. Springer. 699 p. 2009.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. **Food Safety and Inspection Service** – FSIS. FSIS Directive 7120.1 Revision 33. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC. 2016.

VALOTTEAU, C.; BANAT, I.M.; MITCHELL, C.A.; LYDON, H.; MARCHANT, R.; BABONNEAU, F.; PRADIER, C.M.; BACCILE, N.; HUMBLLOT, V. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 157, p. 325–334, 2017.

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**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 176–182, 2017.

## APÊNDICE B – Patente 2

**“Aplicação de sofrorolipídios como sanitizante no sistema lavagem de carcaças de frango por aspersão para redução de contaminação de aeróbios mesófilos”.**

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas<sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Nicole Pan<sup>2</sup>.

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

## **1. INTRODUÇÃO**

A avicultura se desenvolveu e ocupa uma forte posição na economia brasileira atingindo posição de maior exportador de carne de frango do mundo. Hoje mais de 150 países são importadores da carne de frango brasileira (ABPA, 2016). Frente a importância mundial da avicultura brasileira, e as exigências dos mercados importadores estão cada vez mais severas. No comércio internacional, a qualidade é o aspecto que mais influencia a decisão de consumo e as características sanitárias da produção o que melhor traduz essa qualidade.

Os órgãos competentes do governo brasileiro, visando a produção e manutenção de alimentos seguros instituíram legislação específica, portarias, resoluções sobre procedimentos de controle à redução e eliminação dos riscos de contaminações de alimentos, desde seu preparo, processamento, passando pelo transporte, distribuição, armazenamento, até seu consumo. Uma destas alternativas é a remoção da contaminação por água, através de chuveiros instalados nas linhas de Evisceração, procedimento este fundamentado legalmente por legislações de países como Canadá, EUA e União Europeia. E com a legislação brasileira Resolução nº 4 de 04 de Outubro de 2011 (BRASIL,

2011) que por sua vez autoriza a lavagem de carcaças no abate de aves com intuito de remover o conteúdo gastrintestinal das superfícies internas e externas das carcaças.

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas (AM) tem sido usada como indicador de qualidade, determinando se a limpeza, a desinfecção e o controle de temperaturas durante os processos industriais foram realizados de forma adequada, além de fornecer informações sobre a vida útil do produto. Níveis de contaminação por AM de  $10^2$  a  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> em carnes podem indicar condições higiênicas adequadas no abate, já contagens entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> podem significar início do processo de deterioração e comprometimento da vida de prateleira. Com contagens iguais ou superiores a  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, limosidade já pode ser evidenciada (GILL, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Apesar da legislação atual não estabelecer limites para AM, as contagens podem sugerir se houve deficiência no processamento do abate. Pesquisas apontam que o uso de agentes sanitizantes na lavagem de carcaças de frango são capazes de reduzir os riscos de contaminação, contudo, a legislação brasileira atual permite somente a lavagem das carcaças com água clorada, sem a utilização de qualquer tipo de antimicrobiano (BRASIL, 2011).

Os soforolipídios são biossurfactantes compostos por um dissacarídeo de soforose unidos a uma cadeia de ácido graxo (ASHBY; SOLAIMAN, 2010), com grande potencial antimicrobiano contra microrganismos patogênicos (PONTES et al., 2016; SLEIMAN et al., 2009; MORYA et al., 2013; HOA et al., 2017; SOLAIMAN; ASHBY; UKNALIS, 2017; VALOTTEAU et al., 2017; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Já foram comprovadas ações para bactérias de extrema importância no controle higiênico sanitário das indústrias de alimentos, tanto Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria Monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonela spp.* e *Salmonela typhimurium*, entre outras.

Diante do exposto, a utilização desse biossurfactante, na redução de contaminação microbiológica em carcaças de frango é extremamente promissora para as indústrias avícolas do Brasil, visto a importância do controle

microbiológico, não apenas para a saúde pública, mas também para os órgãos de regulamentação, promovendo a adoção de novas metodologias, afim de diminuir prejuízos no setor avícola.

## 2. METODOLOGIA

As etapas da invenção foram a produção e extração do soforolipídio produzido por espécie de *Candida*; aplicação de diferentes concentrações de soforolipídio em teste de aspersão com carcaças de frango para análise da influência na população de aeróbios mesófilos.

### ETAPA 1 – Produção de Soforolipídios.

A produção do soforolipídio foi realizada por uma levedura do gênero *Candida* em meio de fermentação inicial contendo em (g.L<sup>-1</sup>): glicose, 77,5; ácido oleico, 75; extrato de levedura 2,5. Seguido de adições de 20 g.L<sup>-1</sup> de ácido oleico a cada 48h e porção única de 90 g.L<sup>-1</sup> de glicose quando a biomassa atingiu seu máximo (estimado por leitura 600 nm). A *Candida* foi cultivada em biorreator de bancada (5 L) com volume operacional de 3,5 L, pH controlado em 3,5, 450 rpm, 30 °C por 288h. O cultivo foi centrifugado e do sobrenadante obtido a fração do soforolipídio. O processo de extração do biossurfactante consistiu na lavagem da biomassa com acetato de etila (3x), rotaevaporação e extração com solução metanol: água (4:1) e hexano. Após a obtenção da fração do soforolipídio, o mesmo foi liofilizado.

**ETAPA 2** – Aplicação dos soforolipídios produzidos como possível agente antibacteriano contra a população de mesófilos aeróbios nas carcaças de frango.

Previamente o soforolipídio foi solubilizado em solução 45% de etanol em água (v/v). Três tratamentos foram avaliados: A – Controle com água de torneira, B - Água + Etanol 45%, C, D e E – 500, 2.250 e 4.000 µg.mL<sup>-1</sup> de soforolipídios, respectivamente preparadas em 45% etanol (v/v) e submetidas em banho de ultrassom por 20 minutos. Para avaliar o efeito do soforolipídio, as carcaças foram aspergidas com 500 mL das soluções A, B, C, D e E,

utilizando frascos de aspersão descartáveis, com 9 repetições para cada tratamento. Ao final da aplicação do soforolipídio, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob congelamento para análise microbiológica.

**ETAPA 3** - Análises microbiológicas determinação de aeróbios mesófilos.

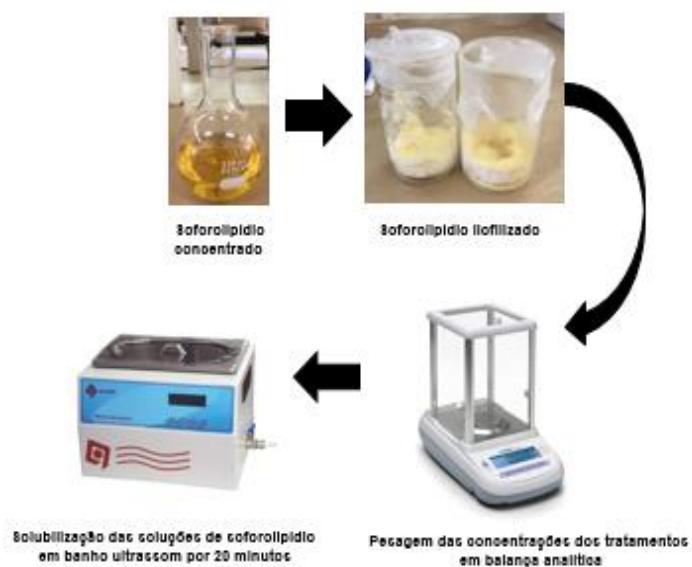
De cada carcaça foram coletadas amostras assepticamente composta por 25g de pele e músculos das regiões do pescoço, asa e cloaca e acondicionadas em sacos de polietileno estéreis contendo 225mL de água peptonada tamponada a 1% e estéril. Estas amostras foram homogeneizadas em aparelho stomacher (diluição inicial  $10^{-1}$ ). As diluições subsequentes foram realizadas em solução salina 0,85%, estéril. Para contagem das colônias de aeróbios mesófilos da carcaça, 1 mL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foram semeadas em placas Petrifilm™C (3M®), com incubação a 35°C por 48 horas. Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmo decimal (Log10) e expressas em Log UFC/25g.

O esquema demonstra as etapas do experimento desde a Produção do Soforolipídio (A), o preparo das amostras de soforolipídio e sua solubilização nas soluções em etanol 45% (B), Aspersão das carcaças com as soluções com os diferentes tratamentos (C) e verificação da atividade do soforolipídio em aeróbios mesófilos através de sistema Petrifilm específico para o crescimento desse grupo de bactérias (D).

### A- Produção do sofrorolipídio



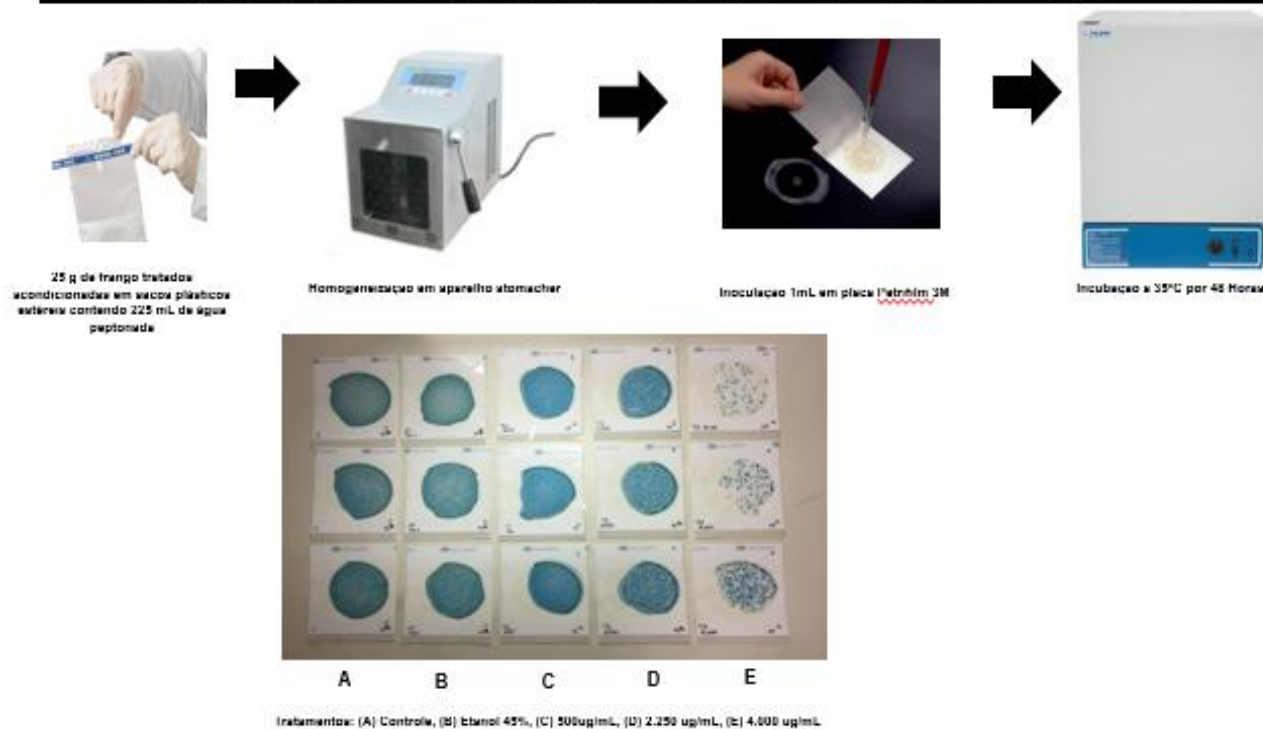
### B - Preparo da solução com sofrorolipídio



### C - Aspersão da solução contendo Sofrorolipídio nas carcaças



### D- Análise da atividade de sofrorolipídios em aeróbios mesófilos por sistema Petrifilm



O experimento totalizou 45 amostras, sendo realizado 9 repetições para cada tratamento, sendo eles: A - controle com água de torneira, B - etanol 45 %, C, D E – com soffrolipídio 500, 2.250 e 4.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para análise dos dados, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e a variável resposta observada foi a contagem de mesófilos aeróbios em  $\log_{10}$  (UFC/25g).

### 3. RESULTADOS

Os resultados de contagem dos mesófilos através do sistema Petrifilm estão expostos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Médias logarítmicas de mesófilos aeróbios ( $\log_{10}$  UFC/25g) em carcaças nos diferentes tratamentos.

<b>Tratamentos</b>	<b><math>\log_{10}</math> (UFC/25g)</b>
Controle	5,18 ( $\pm 0,0028$ ) <sup>a</sup>
Etanol 45%	5,09 ( $\pm 0,0020$ ) <sup>b</sup>
Soforolipídio 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5,08 ( $\pm 0,0009$ ) <sup>b</sup>
Soforolipídio 2.250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5,06 ( $\pm 0,0053$ ) <sup>b</sup>
Soforolipídio 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4,15 ( $\pm 0,0007$ ) <sup>c</sup>

Médias seguidas de letras iguais, não diferiram entre si no Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A análise de variância mostrou que o tratamento controle diferiu de todos os tratamentos testados ao nível de significância de 5%. Os tratamentos etanol 45 %, soforolipídio 500 e 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentaram diferença estatisticamente. O tratamento soforolipídio 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  diferiu de todos os tratamentos testados e apresentou a maior redução na população de aeróbios mesófilos, sendo capaz de reduzir 1 log da carga microbiana da carcaça em comparação com o controle. Como observado, com exceção da maior concentração testada de soforolipídio, os outros tratamentos apresentaram reduções mínimas em relação ao controle. Isso pode ser explicado pelo fato da metodologia utilizada para realização do experimento ser por aspersão, o que implica em pouco tempo de contato entre a solução sanitizante e a superfície da carcaça, em comparação com outras formas de tratamento, como imersão (BR10201807252).

#### 4. CONCLUSÃO

O presente estudo foi capaz de demonstrar redução logarítmica significativa de bactérias indicativas de contaminação, aeróbios mesófilos, com o tratamento de 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o qual poderia ser introduzido facilmente no processamento de abate de frigoríficos tradicionais, os quais já dispõem em

sua estrutura, bicos aspersores de água para limpeza externa nas carcaças de frango.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. E.; MARSHALL, R. T.; STRINGER, W. C.; NAUMANN, H. D. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. **Journal of Food Science**, v.42, n.2, p.326-329, 1977.

ASHBY, Richard D.; SOLAIMAN, Daniel K. Y. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1429–1437, 2010.

BACKES, R. G. Utilização da lavagem de carcaças para redução microbiana após a evisceração de frangos de corte Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Mestrado em Ciência Animal, Lages, 2013.

BOLDER, N.M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, n. 7, p.221-227, jul.1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF,1998. Seção 1, p. 226.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 4, de 4 de Outubro de 2011. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Circular n. 668 de 19 de Setembro de 2006. **Diretrizes para Preparação de Plano de APPCC (HACCP) para o Processo de Abate de Aves.**

BRASIL. Resolução DIPOA nº 4, de 4 de outubro de 2011. Autoriza o emprego do sistema de lavagem de carcaças no abate de aves. **Diário Oficial da União**, Seção 1, nº 206, p.3, 2011

BRASIL. Resolução DIPOA nº 8, de 19 de junho de 2018. Altera a Resolução 04 de 4 de outubro de 2011. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.3, 2018.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (EU) nº 101/2013 da Comissão de 4 de fevereiro de 2013 relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, 5 fev, 2013. L 34.

DEPNER, R. F. R. **Comparação dos resultados da contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refil e lavagem de carcaças em abatedouros de frangos do Rio Grande do Sul**. 2015. 53f. Dissertação (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

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

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performances objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n.4, p. 2105, 2011.

FRACCHIA, L.; BANAT, J.J.; CAVALLO, M.; CERESA, C.; BANAT, I.M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **Bioengineering**. 2 (3), 144-162, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p.118-157.

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

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, v. 78, p. 43-52, 2008.

JAMES, W. O.; PRUCHA, J. C.; BREWER, R. L. Cost-Effective techniques to control human enteropathogens on fresh poultry. **Poultry Science**, v.72, p.1174-1176, 1993.

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella spp.* e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p. 465-476, jul./set. 2007.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MORSHEDY, A. E. M. A.; SALLAM, K. I. Improving the microbial quality and shelf life of chicken carcasses by trisodium phosphate and lactic dipping. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.7, p.645-650, 2009.

MORYA, V. K.; PARK, J.H.; KIM, T.J.; JEON, S.; KIM, E.K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 282–288, 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Prudent Practices in the Laboratory: handling and disposal of chemicals**. Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications. National Academy Press. Washington, D.C. 1995.

OLIVEIRA, M.R.; MAGRI, A.; BALDO, C.; CAMILIOS-NETO, D.; MINUCELLI, T.; CELLIGOI, M.A.P.C. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **Intl. J. of Adv. Biotec. and Res.** 6, 161-174, 2015.

PAULINO, B.N.; PESSOA, M.G.; MANO, M.C.; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Current status in biotechnological production and applications

of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 24, p. 10265–10293, 2016.

PONTES, C.; ALVES, M.; SANTOS, C.; RIBEIRO, M.H.; GONÇALVES, L.; BETTENCOURT, A.F.; RIBEIRO, I.A. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 513, n. 1–2, p. 697–708, 2016.

Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016>>.

RUSSEL, S. **Chlorine: Still the Most Popular Sanitizer in the Poultry Industry**. 2007.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.9-14, 1998.

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. **Ann Clin Lab Sci**. 39 (1), 60-63, 2009.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; UKNALIS, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 136, p. 21–29, 2017.

TOLDRÁ, F. **Safety of meat and processed meat**. University of Georgia, U.S.A. Ed. Springer. 699 p. 2009.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. **Food Safety and Inspection Service** – FSIS. FSIS Directive 7120.1 Revision 33. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC. 2016.

VALOTTEAU, C.; BANAT, I.M.; MITCHELL, C.A.; LYDON, H.; MARCHANT, R.; BABONNEAU, F.; PRADIER, C.M.; BACCILE, N.; HUMBLLOT, V. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 157, p. 325–334, 2017.

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**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 176–182, 2017.

## APÊNDICE C - Patente 3

**“Efetividade do soforolípido como descontaminante na redução de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* na etapa de pré resfriamento de aves”.**

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas<sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>.

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

## 1. INTRODUÇÃO

Estimativas para os próximos anos indicam um crescimento do número de habitantes, da urbanização e da renda da população mundial. Estes índices impulsionam o consumo de carne que, segundo as estatísticas da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), entre os anos de 2015 e 2030 representará, em média, uma taxa de crescimento mundial de 1,5%. Neste cenário, o Brasil vem se destacando, pois se tornou o maior exportador mundial de carne de frangos desde 2004 (ABPA, 2019).

Entretanto, diante da presença de microrganismos patogênicos e produtos químicos usados de forma indevida dentro da cadeia de produção avícola, apresentam-se restrições severas e abrangentes, cujas regulamentações e avaliações técnicas apontam impactos à sanidade, à produtividade animal e principalmente à segurança dos alimentos (LONGO; FIGUEIREDO, 2014). O desafio para preservar as características do produto e prolongar sua vida de prateleira deve ser compreendido e considerado nas várias etapas do processo, que se inicia na fazenda e termina no prato do consumidor (LOGUE et al., 2003).

Nesse contexto, a avaliação microbiológica constitui um dos parâmetros crucial para se determinar a qualidade e a inocuidade das carnes, verificando se padrões e especificações microbiológicos nacionais e internacionais estão sendo atendidos adequadamente. Diante disso, pesquisas

que buscam inovação no desenvolvimento de compostos eficazes na redução da contaminação microbiológica são fundamentais para despertar a atenção dos órgãos de regulamentação do Brasil sobre a necessidade, de mudanças e adesão de novos procedimentos para diminuição dos prejuízos na produção de frango, especialmente com agentes antibacterianos naturais, tais como os soforolipídios, que apresentam baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade.

Diversos estudos têm sido direcionados na busca de novos agentes descontaminantes e antimicrobianos, no entanto, no Brasil ainda não é permitida a utilização de qualquer adjunto ou composto descontaminante no processamento de abate das aves (BRASIL, 1998).

O altivo potencial como agente antimicrobiano alternativo do soforolipídio, no combate de microrganismos patogênicos, evidenciados recentemente na literatura (HIPÓLITO et al., 2020; SILVEIRA et al., 2019; HOA et al., 2017; SOLAIMAN; ASHBY; UKNALIS, 2017; VALOTTEAU et al., 2017; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015; ZHANG et al., 2017) e a comprovada ação para bactérias de extrema importância no controle higiênico sanitário das indústrias de abate e processamento de aves, tanto Gram-positivas e negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Salmonella typhimurium*, entre outras, sugere que este composto seja uma alternativa de agente descontaminante para aplicação na água de imersão do pré resfriamento em abate e processamento de aves.

Os soforolipídios são biossurfactantes compostos por um dissacarídeo de soforose unidos a uma cadeia de ácido graxo (ASHBY; SOLAIMAN, 2010). Possuem inúmeras vantagens frente aos compostos sintéticos, como biodegradabilidade e natureza ecológica, baixa toxicidade, alta seletividade devido à presença de grupos funcionais específicos e eficiência de operação em condições ambientais extremas de temperatura, pH e salinidade, o que os torna adequados para uma ampla gama de aplicações industriais (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Considerando a importância do desenvolvimento de novas estratégias e agentes para o controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos, os soforolipídios podem ser vistos como os biossurfactantes mais vantajosos nesta perspectiva. Apesar da ação bem elucidada, a aplicação desse composto

em produtos alimentares de origem animal nunca foi testada para coliformes termotolerantes, em especial a *Escherichia coli*. Dessa forma, a presente invenção tem como objetivo avaliar a ação do soforolipídio “in vivo”, na população de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* presentes nas carcaças e conseqüentemente na água de lavagem de frango, simulando a ação antimicrobiana para redução logarítmica dos microrganismos pesquisados na água do sistema de pré resfriamento.

## 2. METODOLOGIA

A invenção foi dividida em três etapas: Etapa 1: produção e extração do soforolipídio de *Starmerella*; Etapa 2: aplicação de diferentes concentrações de soforolipídio e diferentes tempos de exposição por imersão em água, das carcaças de frango e Etapa 3: análise microbiológica da influência na população de coliformes termotolerantes e *E. coli* por sistema Petrifilm.

**ETAPA 1** – A produção dos soforolipídios foi realizada por uma levedura do gênero *Starmerella* em meio de fermentação inicial contendo em (g.L<sup>-1</sup>): glicose, 77,5; ácido oleico, 75; extrato de levedura 2,5, por batelada alimentada, com adições de 20 g.L<sup>-1</sup> de ácido oleico a cada 48 h e porção única de 90 g.L<sup>-1</sup> de glicose quando a biomassa atingiu seu máximo (estimado por leitura 600 nm). A fermentação foi em biorreator de bancada (5 L) com volume operacional de 3,5 L; pH controlado em 3,5; 450 rpm; 30 °C por 288h. A fermentação foi interrompida por centrifugação e do sobrenadante extraído os soforolipídios com acetato de etila (1:1) e rotaevaporado. A fração obtida foi submetida a nova extração em funil de separação com solução metanol água 4:1 (v/v) e hexano (v/v) nas proporções de 1:1 (v/v), a fim de se obter os soforolipídios, esse foi seco em estufa até eliminação completa do solvente e liofilizado (MINUCELLI et al., 2017).

**ETAPA 2**– Aplicação dos soforolipídios como sanitizante na água de lavagem das amostras, a fim de controlar a população de coliformes termotolerantes e *E. coli*. Previamente foi realizado teste de solubilidade do soforolipídio, sendo o

composto solúvel em solução contendo  $\geq 45\%$  de etanol em água (v/v). Os tratamentos testados foram:

- I) Controle com água de torneira clorada (0,2 a 2,0ppm),
- II) Etanol 45%,
- III) Solução com Etanol 45% +  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídios,
- IV) Solução com Etanol 45% +  $2.250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídios,
- V) Solução com Etanol 45% +  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de soforolipídios.

Foram preparadas soluções estoque para cada tratamento em 45% etanol (v/v) e colocadas em banho de ultrassom por 20 minutos.

O teste consistiu na preparação de 500 mL das soluções com os diferentes concentrações, nas quais as amostras de carcaças de um mesmo lote, coletadas aleatoriamente em um mesmo instante, foram imersas, uma carcaça por tratamento e por tempo, em três diferentes tempos de exposição (30, 60 e 90 minutos). Ao final de cada tempo de tratamento, as amostras de água foram coletadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob congelamento  $-12 \text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise microbiológica. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

**ETAPA 3** - Análises microbiológicas para determinação de coliformes termotolerantes e *E. coli* foram realizadas em placas Petrifilm. De cada tratamento foram removidos assepticamente 25 mL de água, e acondicionados em sacos de polietileno estéreis, contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 1% e estéril. Estas amostras foram homogeneizadas em aparelho stomacher por 3 minutos, na diluição  $10^{-1}$  e diluições subsequentes foram realizadas em solução salina 0,85%, estéril. Para o cálculo das unidades formadoras de colônia de coliformes termotolerantes, 1 mL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foram semeadas em placas Petrifilm™C (3M®), específicas para coliformes termotolerantes e *E. coli* e com incubação a  $45^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmo decimal (Log10) e expressas em Log UFC/ 25mL.

No presente experimento foram avaliadas 45 amostras, sendo realizada 9 repetições para cada tratamento exposto anteriormente.

Para análise dos dados, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e as variáveis resposta observada foi a contagem de coliformes termotolerantes e contagem de *E. coli* em log<sub>10</sub> (UFC/25mL).

### 3. RESULTADOS

Os resultados das análises microbiológicas obtidos através do sistema Petrifilm estão expostos abaixo na Tabela 1.

**Tabela 1** – *E. coli* e coliformes termotolerantes log<sub>10</sub> (UFC/mL) em amostras de água de lavagem com diferentes concentrações de soforolipídios.

Microrganismos	<i>E. coli</i>			Coliformes termotolerantes		
	30'	60'	90'	30'	60'	90'
Controle	3,06 <sup>aC</sup>	3,26 <sup>aB</sup>	3,40 <sup>aA</sup>	3,21 <sup>aB</sup>	3,49 <sup>aA</sup>	3,47 <sup>aA</sup>
Etanol 45%	2,89 <sup>bC</sup>	3,25 <sup>aA</sup>	3,14 <sup>bB</sup>	3,04 <sup>bC</sup>	3,386 <sup>bA</sup>	3,29 <sup>bB</sup>
Soforolipídio 500 µg.mL <sup>-1</sup>	2,85 <sup>bA</sup>	2,80 <sup>bB</sup>	2,63 <sup>cC</sup>	2,96 <sup>bA</sup>	2,91 <sup>cA</sup>	2,75 <sup>cB</sup>
Soforolipídio 2.250 µg.mL <sup>-1</sup>	0 <sup>cA</sup>	0 <sup>cA</sup>	0 <sup>dA</sup>	2,36 <sup>cA</sup>	2,09 <sup>dB</sup>	0 <sup>dC</sup>
Soforolipídio 4.000 µg.mL <sup>-1</sup>	0 <sup>cA</sup>	0 <sup>cA</sup>	0 <sup>dA</sup>	0 <sup>dA</sup>	0 <sup>eA</sup>	0 <sup>dA</sup>

Letras iguais não diferiram entre si no Teste de Tukey.

Na análise dos dados de *E. coli* e coliformes termotolerantes, os resíduos não podem ser considerados normais, de acordo com o Teste de Shapiro-Wilk. Deve-se considerar a interação entre a concentração de soforolipídios aplicada e o tempo de permanência na solução, sendo desdobrada as interações. Desdobrando a variável tempo para cada tratamento, comparasse-se as médias dos tempos de 30, 60 e 90 minutos pelo Teste de Tukey.

Para *E. coli*, no tempo de 30 minutos de imersão, as soluções com concentrações de sofrorolipídios de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  eliminaram toda a contaminação presente na água de lavagem. As soluções Etanol 45% e sofrorolipídios 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentaram diferença significativa e apresentaram resultados parecidos ao controle (água de torneira). Ao analisar as solução com 60 minutos após a imersão, as soluções com concentrações de sofrorolipídios de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  continuam apresentando a maior eficiência, eliminando toda a contaminação presente na água de lavagem, seguida da solução de sofrorolipídios 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (2,80 log), que diferiu dos tratamentos Etanol 45% (3,25 log) e controle (3,26 log). Após 90 minutos de exposição ao sanitizante com concentrações de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , obtivemos a maior eficiência, eliminando toda a contaminação presente na água de lavagem, seguida da solução de sofrorolipídios 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (2,62 log), a qual diferiu dos tratamentos Etanol 45% (3,14 log), que também apresentou diferença significativa em relação ao controle (3,40 log).

Ao analisar os dados de coliformes termotolerantes, desdobrando a variável tempo de exposição em cada tratamento com diferentes concentrações do agente sanitizante, e comparando cada tratamento em diferentes tempos de exposição, a comparação de médias também foi realizada pelo Teste de Tukey e evidenciados na Tabela 1. Com exposição de 30 minutos de imersão, a solução sanitizante com concentração de sofrorolipídios de 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  eliminou completamente a contaminação de coliformes termotolerantes presente na água de lavagem. As soluções controle, Etanol 45%, sofrorolipídios 500 e 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentaram diferença significativa, com resultados decrescentes de contagem, 3,21; 3,04; 2,96; 2,36 mL, respectivamente após 30 minutos de imersão. Ao analisar a solução com 60 minutos de exposição após a imersão, os resultados seguem a mesma tendência de redução que após 30 minutos de exposição, ou seja, uma redução linear com aumento da concentração. Com 90 minutos pós tratamento, as soluções com concentrações 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentam a maior eficiência antibacteriana, eliminando toda a contaminação presente na água de lavagem, seguida da solução de sofrorolipídios 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (2,75  $\log_{10}\text{UFC/mL}$ ),

que apresentou diferença significativa com os tratamentos Etanol 45% (3,29 log), que também se diferencia da solução controle (3,47 log).

As soluções com concentrações de soforolipídios de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  são totalmente efetivas na redução da contagem das células de *E. coli* na água de lavagem, em quaisquer tempos de exposição. Por outro lado, ao analisarmos coliformes termotolerantes, somente a solução com concentração de soforolipídios de 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  é efetiva na redução total da contagem das células na água de lavagem, em qualquer tempo de exposição. Porém este resultados também pode ser alcançado com a concentração de 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por um tempo de exposição de 90 minutos, seguido por excelentes resultados nos tempo de exposição de 60 e 30 minutos com 2,09 e 2,36 log, respectivamente.

Ao comparar os resultados obtidos da água de lavagem contendo apenas etanol 45% e das soluções contendo soforolipídios a concentrações de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  temos que o soforolipídio é capaz de eliminar o crescimento de coliformes termotolerantes, especificamente *E. coli* comparado ao controle, demonstrando ser um potencial sanitizante a ser aplicado na água de imersão no pré resfriamento para descontaminação das carcaças.

#### 4. CONCLUSÃO

Os soforolipídios em concentrações de 2.250 e 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em 30 minutos de exposição, foram eficazes no controle *E. coli* na água de lavagem, e a concentração de 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em 90 minutos de exposição zerou a contagem de coliformes termotolerantes.

Assim, conclui-se que a aplicação de solução de soforolipídio como agente descontaminante, pode ser utilizado como sanitizante no sistema de lavagem de carcaças por imersão, na etapa de pré resfriamento, no processo de abate, e no processamento de aves, para o controle de coliformes termotolerantes, *E. coli*.

## REFERÊNCIAS

ABPA. Relatório Anual da ABPA 2019. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, 2019. p. 68. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/>>.

ANDERSON, M. E.; MARSHALL, R. T.; STRINGER, W. C.; NAUMANN, H. D. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. **Journal of Food Science**, v.42, n.2, p.326-329, 1977.

ASHBY, Richard D.; SOLAIMAN, Daniel K. Y. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1429–1437, 2010.

BOLDER, N.M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, n. 7, p.221-227, jul.1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1998.** Seção 1, p. 226.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 4, de 4 de Outubro de 2011. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 out. 2011.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União. Brasília. 10 jan. 2001. Seção 1, p.46- 53.**

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (EU) nº 101/2013 da Comissão de 4 de fevereiro de 2013 relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, 5 fev, 2013. L 34.**

DEPNER, R. F. R. **Comparação dos resultados da contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refile e lavagem de carcaças em abatedouros de frangos do Rio Grande do Sul.** 2015. 53f. Dissertação (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

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

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performances objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n.4, p. 2105, 2011.

FRACCHIA, L.; BANAT, J.J.; CAVALLO, M.; CERESA, C.; BANAT, I.M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **Bioengineering**. 2 (3), 144-162, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p.118-157.

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, 10.1797, 2020. doi:10.1016/j.bcab.2020.101797

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

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, v. 78, p. 43-52, 2008.

JAMES, W. O.; PRUCHA, J. C.; BREWER, R. L. Cost-Effective techniques to control human enteropathogens on fresh poultry. **Poultry Science**, v.72, p.1174-1176, 1993.

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella spp.* e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p. 465-476, jul./set. 2007.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MORSHEDY, A. E. M. A.; SALLAM, K. I. Improving the microbial quality and shelf life of chicken carcasses by trisodium phosphate and lactic dipping. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.7, p.645-650, 2009.

MORYA, V. K.; PARK, J.H.; KIM, T.J.; JEON, S.; KIM, E.K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 282–288, 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Prudent Practices in the Laboratory: handling and disposal of chemicals**. Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications. National Academy Press. Washington, D.C. 1995.

OFFICIAL method. *Escherichia coli* O157:H7 in selected foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** v. 88, p.1334, 2005b, 2005.

OFFICIAL method. Simplate coliform and *E. coli* color indicator: detection and confirmed quantitation of coliforms and *E. coli* in foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** v.88, p.1318, 2005a, 2005.

OFFICIAL methods of analysis. 18.ed. Gaithersburg: **AOAC**. v.88, chap.17, p.233-234, 2005.

OLIVEIRA, M.R.; MAGRI, A.; BALDO, C.; CAMILIOS-NETO, D.; MINUCCELLI, T.; CELLIGOI, M.A.P.C. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **Intl. J. of Adv. Biotec. and Res.** v.6, 161-174, 2015.

OLIVEIRA, A.V.B.; SILVA, R.A.; ARAÚJO, A.S. et al. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte – referencial teórico. **Rev. Verde**, v.6, p.1-16, 2011.

PAULINO, B.N.; PESSOA, M.G.; MANO, M.C.; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 24, p. 10265–10293, 2016.

PONTES, C.; ALVES, M.; SANTOS, C.; RIBEIRO, M.H.; GONÇALVES, L.; BETTENCOURT, A.F.; RIBEIRO, I.A. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 513, n. 1–2, p. 697–708, 2016.

Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2019>>.

RUSSEL, S. **Chlorine: Still the Most Popular Sanitizer in the Poultry Industry**. 2007.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.9-14, 1998.

SILVEIRA, V. A. I.; NISHIO, E. K.; QUEIROZ, C. A. U.; AMADOR, I. R.; KOBAYASHI, R. K. 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.

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. **Ann Clin Lab Sci**. 39 (1), 60-63, 2009.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; UKNALIS, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 136, p. 21–29, 2017.

TOLDRÁ, F. **Safety of meat and processed meat**. University of Georgia, U.S.A. Ed. Springer. 699 p. 2009.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. **Food Safety and Inspection Service** – FSIS. FSIS Directive 7120.1 Revision 33. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC. 2016.

VALOTTEAU, C.; BANAT, I.M.; MITCHELL, C.A.; LYDON, H.; MARCHANT, R.; BABONNEAU, F.; PRADIER, C.M.; BACCILE, N.; HUMBLLOT, V. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 157, p. 325–334, 2017.

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**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 176–182, 2017.

## APÊNDICE D – Patente 4

**“Aplicação de soforolipídio para redução de contaminação de aeróbios mesófilos em cortes de frango”**

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>, Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas<sup>1</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Mayka Reghiany Pedrão<sup>2</sup>, Alexandre Rodrigo Coelho<sup>2</sup>, Amanda Hipólito<sup>1</sup>, Nicole Pan<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas Universidade Estadual de Londrina, Paraná-Brasil, <sup>2</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná-Brasil, <sup>3</sup>Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas Universidade Estadual de Londrina, Paraná-Brasil

**1. INTRODUÇÃO**

As bactérias aeróbias mesófilas, encontrados em cortes de frango, são indicativos de contaminação, e interferem diretamente na vida de prateleira destes produtos. Assim sendo, uma melhor qualidade microbiológica garante a inocuidade do produto, bem como uma elevação de seu *shelf-life*. Diversos estudos têm sido direcionados na busca de novos agentes sanitizantes e antimicrobianos, no entanto, no Brasil ainda não é permitida a utilização de qualquer adjunto ou composto descontaminante no processamento de abate das aves, sendo utilizado somente cloração da água de no máximo 1 ppm de cloro livre e a água de renovação dos resfriadores até 5 ppm (BRASIL, 1998).

Vários tipos de intervenções vêm sendo estudados, especialmente no exterior, sendo alguns já aplicados na rotina dos abatedouros. Assim a aplicação de soforolipídios, biossurfactante com atividades antimicrobianas, devido a mecanismos de desestabilização e alteração da permeação da membrana celular (FRACCHIA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015) é uma iniciativa inovadora que pode auxiliar na redução da contaminação, que causa grandes perdas econômicas no setor avícola,

## 2. METODOLOGIA

As etapas da invenção foram a produção e extração do soforolipídio de uma espécie de *Candida*; aplicação de diferentes concentrações de soforolipídio em teste de imersão com pedaços de peito de frango e análise microbiológica da influência na população de aeróbios mesófilos por sistema Petrifilm.

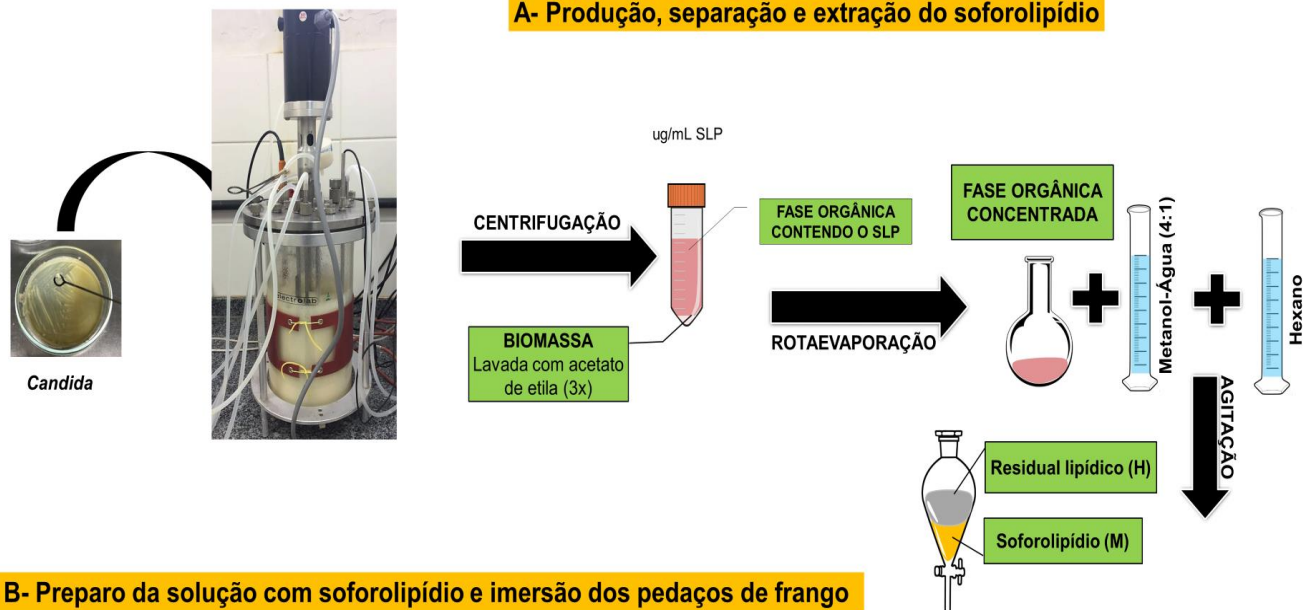
**ETAPA A** – A produção do soforolipídio foi realizada por uma levedura do gênero *Candida* em meio de fermentação inicial contendo em (g.L<sup>-1</sup>): glicose, 77,5; ácido oleico, 75; extrato de levedura 2,5. Seguido de adições de 20 g.L<sup>-1</sup> de ácido oleico a cada 48 h e porção única de 90 g.L<sup>-1</sup> de glicose quando a biomassa atingiu seu máximo (estimado por leitura 600 nm). A *Candida* foi cultivada em biorreator de bancada (5 L) com volume operacional de 3,5 L, pH controlado em 3,5, 450 rpm, 30 °C por 288 h. O cultivo foi centrifugado e do sobrenadante obtido a fração do soforolipídio. O processo de extração do biossurfactante consistiu na lavagem da biomassa com acetato de etila (3x), rotaevaporação e extração com solução metanol:água (4:1) e hexano. Após a obtenção da fração do soforolipídio, o mesmo foi liofilizado.

**ETAPA B** – Consistiu na aplicação dos soforolipídios produzidos para testar a sua possível ação antibacteriana na população de mesófilos aeróbios totais da carne de frango. Previamente foi realizado teste de solubilidade do soforolipídio, sendo o composto solúvel em solução contendo ≥45% de etanol em água (v/v). Os tratamentos testados foram: A - Controle com água clorada de torneira, B - Etanol 45%, C, D e E – 500, 2.250 e 4.000 µg.mL<sup>-1</sup> de soforolipídio, respectivamente. Foram preparadas soluções estoque para cada tratamento em 45% etanol (v/v) e colocadas em banho de ultrassom por 20 minutos. O teste consistiu na imersão de 100 g da carne de peito de frango, cortadas em quadrados de 2cm x 2cm, em frascos de Erlenmeyers de 1000 mL contendo 500 mL das soluções com os diferentes tratamentos. Foi analisado também o efeito de diferentes tempos de tratamentos (30, 60 e 90 minutos), sendo todas as análises realizadas em triplicata. Ao final de cada tempo de tratamento, as amostras de frango foram coletadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração até a análise microbiológica.

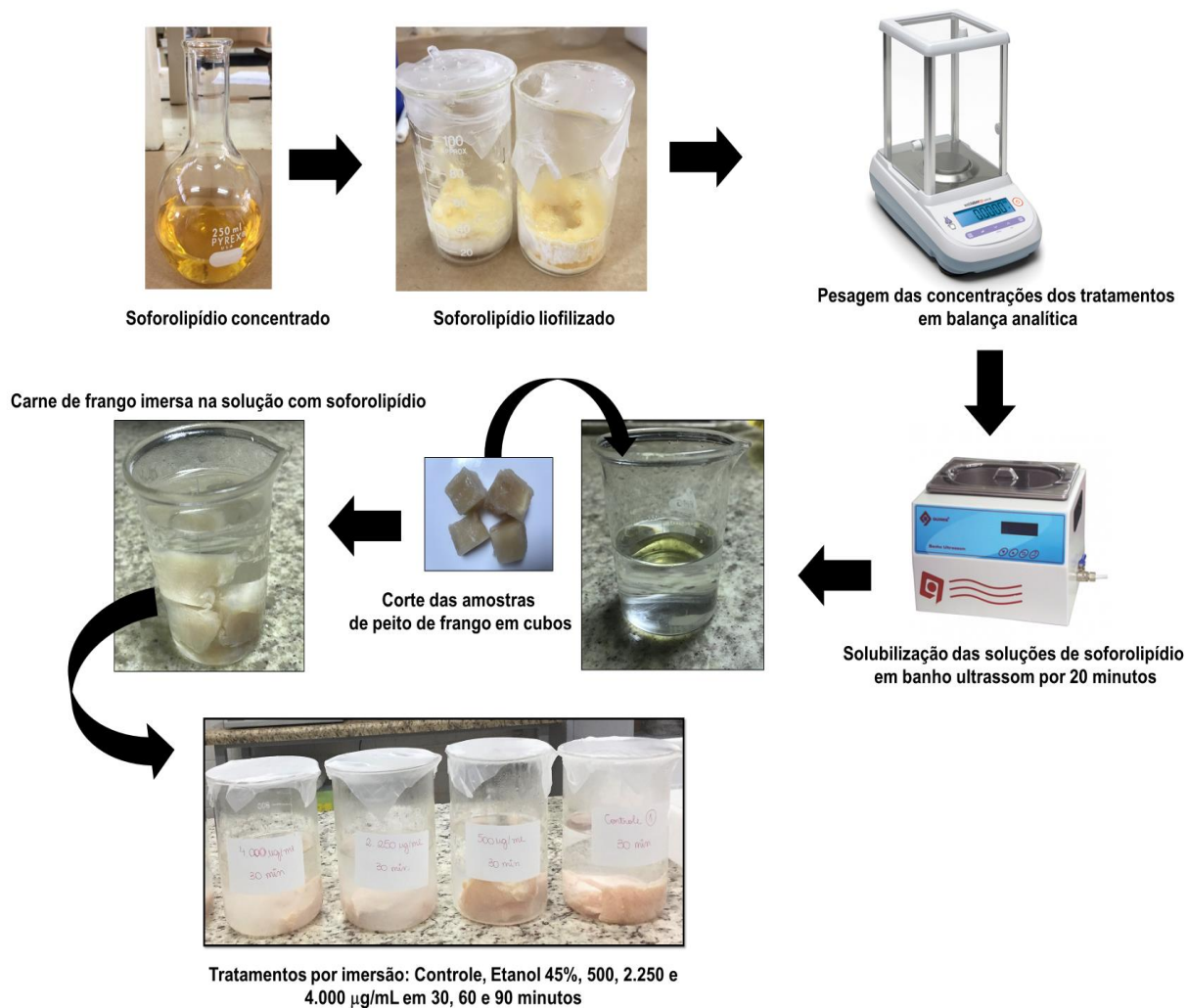
**ETAPA C** - Análises microbiológicas para determinação de aeróbios mesófilos foram realizadas. De cada tratamento foram removidos assepticamente e pesados 25 g da carne de peito de frango e acondicionados em sacos de polietileno estéreis contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 1% e estéril. Estas amostras foram homogeneizadas em aparelho stomacher por três minutos, sendo este conteúdo equivalente à diluição  $10^{-1}$ . As diluições subsequentes foram realizadas em solução salina 0,85%, estéril. Para a cálculo de aeróbios mesófilos do peito de frango, 1 mL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foram semeadas em placas Petrifilm™C (3M®), com incubação a 35 °C por 48 horas. Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmo decimal (Log10) e expressas em Log UFC/ 25g.

No presente experimento, totalizaram-se 45 amostras, sendo os tratamentos: controle (apenas água), etanol 45%, soforolipídio 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , soforolipídio 2.250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e soforolipídio 4.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cada tratamento foi avaliado em três diferentes tempos: 30, 60 e 90 minutos. Para o experimento foi utilizado o delineamento estatístico fatorial e a variável resposta observada foi a contagem de aeróbios mesófilos em  $\log_{10}$  (UFC/25g).

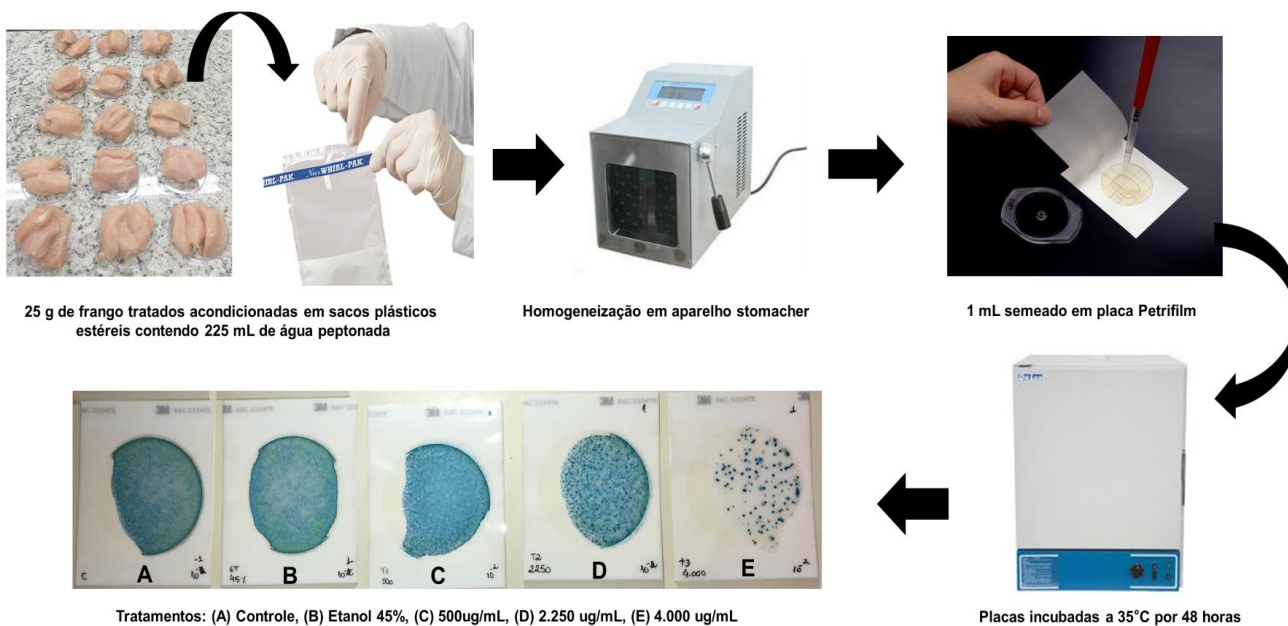
### A- Produção, separação e extração do sofrorlipídio



### B- Preparo da solução com sofrorlipídio e imersão dos pedaços de frango



### C- Análise da atividade de soforolipídios em aeróbios mesófilos por sistema Petrifilm



### 3. RESULTADOS

Os resultados estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Aeróbios mesófilos  $\log_{10}$  (UFC/25g) em amostras de peito de frango tratadas com diferentes concentrações de soforolipídios com 30 minutos de exposição

Tratamentos	$\log_{10}$ (UFC/25g)
Controle	3,74 ( $\pm 0,11$ ) <sup>a</sup>
Etanol 45%	3,59 ( $\pm 0,12$ ) <sup>b</sup>
Soforolipídios 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3,37 ( $\pm 0,08$ ) <sup>c</sup>
Soforolipídios 2.250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,20 ( $\pm 0,11$ ) <sup>d</sup>
Soforolipídios 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,03 ( $\pm 0,06$ ) <sup>e</sup>

Letras iguais não diferiram entre si no Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett a 5% de significância, os resíduos podem ser considerados normais ( $p$ -valor = 0,5655) e há homogeneidade de variância ( $p$ -valor=0,7052), respectivamente. A análise de variância mostrou que o efeito dos tratamentos foi significativo. O tempo e a interação entre tempo e tratamento não apresentaram efeito significativo ( $p > 0,05$ ), mostrando que os tempos 30, 60 e 90 minutos não apresentaram diferenças entre si. Sugerindo a utilização, portanto, do menor tempo, 30 minutos, para o tratamento.

Em relação as concentrações de soforolipídios testadas, todos diferiram entre si ao nível de significância de 5% (Tabela 1). O aumento da concentração de soforolipídios, com exposição de 30 minutos, reduziu o crescimento dos mesófilos comparado ao controle em 10%, 41% e 72% com 500, 2250 e 4000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente, demonstrando ser um eficiente sanitizante não tóxico. Nos demais tempos de exposição, em todos os tratamentos ocorreu a completa eliminação das células viáveis, porém com interferência na coloração da carne.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que o exposição por 30 minutos foi suficiente e o tratamento com a concentração de 4.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  soforolipídio foi o mais eficaz apresentando uma redução de 72% de unidades formadoras de colônia de mesófilos aeróbios, ou seja, uma significativa redução quando comparada ao tratamento com água (controle), permitida legalmente para uso na indústria.

#### REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 1998. Seção 1, p. 226.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 4, de 4 de Outubro de 2011. Departamento de Inspeção de Produtos de

Origem Animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 out. 2011.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (EU) nº 101/2013 da Comissão de 4 de fevereiro de 2013 relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, 5 fev, 2013. L 34.

DEPNER, R. F. R. **Comparação dos resultados da contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refil e lavagem de carcaças em abatedouros de frangos do Rio Grande do Sul**. 2015. 53f. Dissertação (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

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

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performances objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n.4, p. 2105, 2011.

FRACCHIA, L.; BANAT, J.J.; CAVALLO, M.; CERESA, C.; BANAT, I.M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **Bioengineering**. 2 (3), 144-162, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

FREITAS, C. A. U. Q.; SILVEIRA, V.A.I.; CELLIGOI, M.A.P.C; HIPÓLITO, A. Perspectivas de aplicação de sofrorolípido microbiano na indústria de alimentos. In: Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos 3. Curitiba. **Editora Athena**, 2019. doi: 10.22533/at.ed.98019091012. Disponível em: <<https://www.atenaeditora.com.br/post-artigo/23745>>.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p.118-157.

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

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, v. 78, p. 43-52, 2008.

JAMES, W. O.; PRUCHA, J. C.; BREWER, R. L. Cost-Effective techniques to control human enteropathogens on fresh poultry. **Poultry Science**, v.72, p.1174-1176, 1993.

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella spp.* e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p. 465-476, jul./set. 2007.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MORSHEDY, A. E. M. A.; SALLAM, K. I. Improving the microbial quality and shelf life of chicken carcasses by trisodium phosphate and lactic dipping. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.7, p.645-650, 2009.

MORYA, V. K.; PARK, J.H.; KIM, T.J.; JEON, S.; KIM, E.K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 282–288, 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Prudent Practices in the Laboratory: handling and disposal of chemicals**. Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications. National Academy Press. Washington, D.C. 1995.

OLIVEIRA, M.R.; MAGRI, A.; BALDO, C.; CAMILIOS-NETO, D.; MINUCELLI, T.; CELLIGOI, M.A.P.C. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **Intl. J. of Adv. Biotec. and Res.** 6, 161-174, 2015.

PAULINO, B.N.; PESSOA, M.G.; MANO, M.C.; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 24, p. 10265–10293, 2016.

PONTES, C.; ALVES, M.; SANTOS, C.; RIBEIRO, M.H.; GONÇALVES, L.; BETTENCOURT, A.F.; RIBEIRO, I.A. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 513, n. 1–2, p. 697–708, 2016.

Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016>>.

RUSSEL, S. **Chlorine: Still the Most Popular Sanitizer in the Poultry Industry**. 2007.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.9-14, 1998.

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. **Ann Clin Lab Sci**. 39 (1), 60-63, 2009.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; UKNALIS, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 136, p. 21–29, 2017.

TOLDRÁ, F. **Safety of meat and processed meat**. University of Georgia, U.S.A. Ed. Springer. 699 p. 2009.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. **Food Safety and Inspection Service** – FSIS. FSIS Directive 7120.1 Revision 33. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC. 2016.

VALOTTEAU, C.; BANAT, I.M.; MITCHELL, C.A.; LYDON, H.; MARCHANT, R.; BABONNEAU, F.; PRADIER, C.M.; BACCILE, N.; HUMBLLOT, V. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 157, p. 325–334, 2017.

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**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 176–182, 2017.