

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

Sophorolipids by the *Starmerella bombicola* as sanitizer in carcass washing by aspersion and immersion in slaughtering and poultry processing.

Soforolípidos la *Starmerella bombicola* como desinfectante en lavado de canales por aspersión e inmersión en sacrificio y tratamiento de aves.

Recebido: 19/04/2021 | Revisado: 26/04/2021 | Aceito: 23/06/2021 | Publicado: 08/07/2021

Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0161-3162>

Universidade Estadual de Londrina, Brasil

E-mail: christiane.queiroz1@gmail.com

Victória Akemi Itakura Silveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-3391>

Universidade Estadual de Londrina, Brasil

E-mail: victoriakemi@hotmail.com

Dionísio Borsato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2281-0242>

Universidade Estadual de Londrina, Brasil

E-mail: dborsato@uel.br

Guilherme Biz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0447-3521>

Universidade Estadual de Londrina, Brasil

E-mail: gbiz@uel.br

Mayka Reghiany Pedrão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2258-1849>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: maykapedrao@utfpr.edu.br

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2217-8937>

Universidade Estadual de Londrina, Brasil

E-mail: macelligoi@uel.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo aplicar soforolipídios 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 soforolipídios 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 soforolipídios 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 soforolipídios e com 30 minutos na concentração de 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os soforolipídios 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-chave: Biossurfactante; Qualidade microbiológica; Indústria avícola; Antimicrobianos.

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.

Keywords: Biosurfactant; Microbiological quality; Poultry industry; Antimicrobials.

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, Isolan, 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; Isolan 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-β-D-glicopiranosil-β-glicopiranosose) ligados a uma fração hidrofóbica composta de uma longa cadeia de ácido graxo através de uma ligação β-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 soforolipídios 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 Obtenção das amostras de carcaças de frango

As carcaças de frango foram coletadas da indústria avícola de Rolândia (PR), 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.

2.2 Tratamento das amostras com soforolipídios

Os soforolipídios, produzidos por *S. bombicola*, foram caracterizados (CLAE) com predominância de formas lactônicas, foram liofilizados e utilizados para os diferentes tratamentos. Foi realizado teste de solubilidade dos soforolipídios, sendo que foi solúvel em concentrações de etanol $\geq 45\%$ em água (v/v). Posteriormente, os soforolipídios 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 soforolipídios em etanol a 45% (C, D e E), respectivamente. As soluções foram submetidas a banho de ultrassônico por 20 minutos (Silveira et al, 2019).

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 soforolipídios, 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 (Purnell, 2014). Ao final dos tratamentos, as amostras de carcaças, foram coletadas, individualizadas, em sacos plásticos estéreis e mantidas sob congelamento a temperatura máxima de -12°C até o transporte para laboratório de análise microbiológicas. O transporte até o laboratório foi realizado em caixa térmica.

2.2.2 Lavagem por imersão de carcaças

A imersão das carcaças, em solução contendo soforolipídios 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 (Purnell, 2014). Ao final dos tratamentos, as amostras de água e de carcaças, foram coletadas, individualizadas, em sacos plásticos estéreis e mantidas sob congelamento a temperatura máxima de -12°C até o transporte para laboratório de análise microbiológicas. O transporte até o laboratório foi realizado em caixa térmica.

2.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014). As amostras de cada carcaça foram compostas por peles do pescoço, peito e cloaca em um total de 25 g de cada carcaça, ou 25mL de água de lavagem. Posteriormente a pesagem foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada à 35 a 37 °C por 24h e semeado 1 mL em placas petrifilm 3M™ para o isolamento e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) dos microrganismos a serem pesquisados (*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 (USA, 2014).

2.4. Análises estatísticas

Os dados coletados foram inseridos em planilha com o programa Microsoft Excel (2010) e em seguida usado a rotina do software Matlab, topologia da rede 12x12 hexagonal para desenvolvimento das redes neurais artificiais (RNA) do tipo SOM e obtenção dos mapas de comparação. A análise estatística descritiva foi realizada através do software STATISTICA For Windows Versão 10.0 (Statsoft, 2010), na qual os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância em triplicata e as médias comparadas pelos teste de Krsukal-wallis e Tukey ao nível de 5% de significância.

3. Resultados e Discussão

3.1 Soforolipídios como sanitizante aplicados por aspersão em carcaças de frango

A aplicação dos sofrorolipídios, 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 sofrorolipídios. Após a aspersão 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 µg.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 ^a	2,99±0,03 ^b	2,97±0,07 ^b	1,97±0,09 ^c	1,71±0,14 ^d
<i>E. coli</i> (log UFC/g)	3,09±0,02 ^a	2,96±0,02 ^b	2,62±0,07 ^c	1,96±0,08 ^d	1,62±0,15 ^e
Coliformes termotolerantes (log UFC/g)	3,20±0,01 ^a	3,06±0,02 ^b	2,85±0,08 ^c	2,05±0,07 ^d	1,77±0,09 ^e
Aeróbios mesófilos (log UFC/g)	5,19±0,03 ^a	5,09±0,04 ^b	5,06±0,03 ^{bc}	5,08±0,03 ^c	4,14±0,06 ^d

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

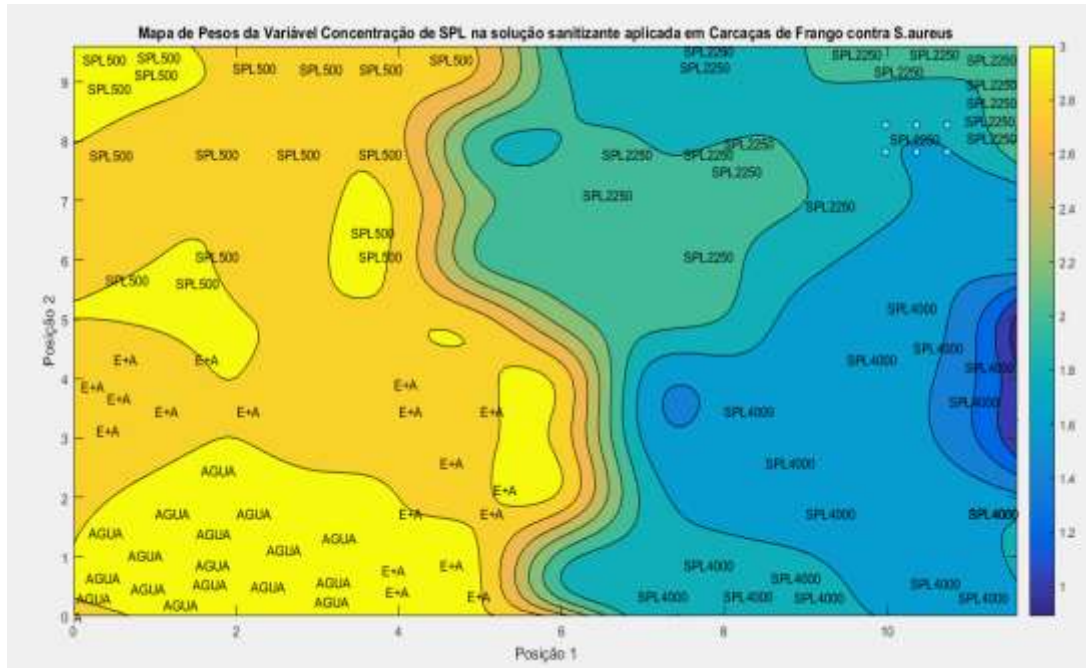
Os resultados para *S. aureus* evidenciam que as soluções controles e a solução contendo 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de sofrorolipídios apresentaram efeitos antimicrobianos semelhantes, ou seja, não diferiram entre si, todavia ao aumentar as concentrações de sofrorolipídios nas soluções sanitizantes para 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.

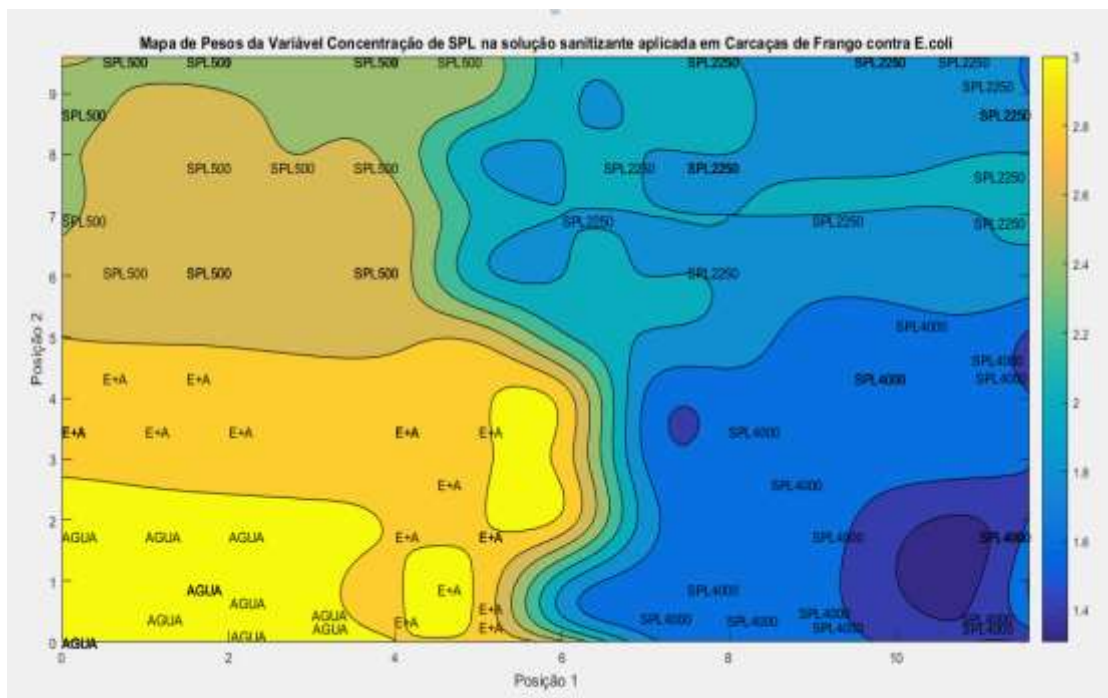
Os mapas obtidos por redes neurais, apresentados na Figura 1A, 1B, 1C e 1D, validam os resultados apresentados na Tabela 1, e evidenciam a suscetibilidade das quatro cepas estudadas diante do sanitizante, sofrorolipídios.

A ação sanitizante dos sofrorolipídios 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, consequentemente, grupos com maior diferenciação.

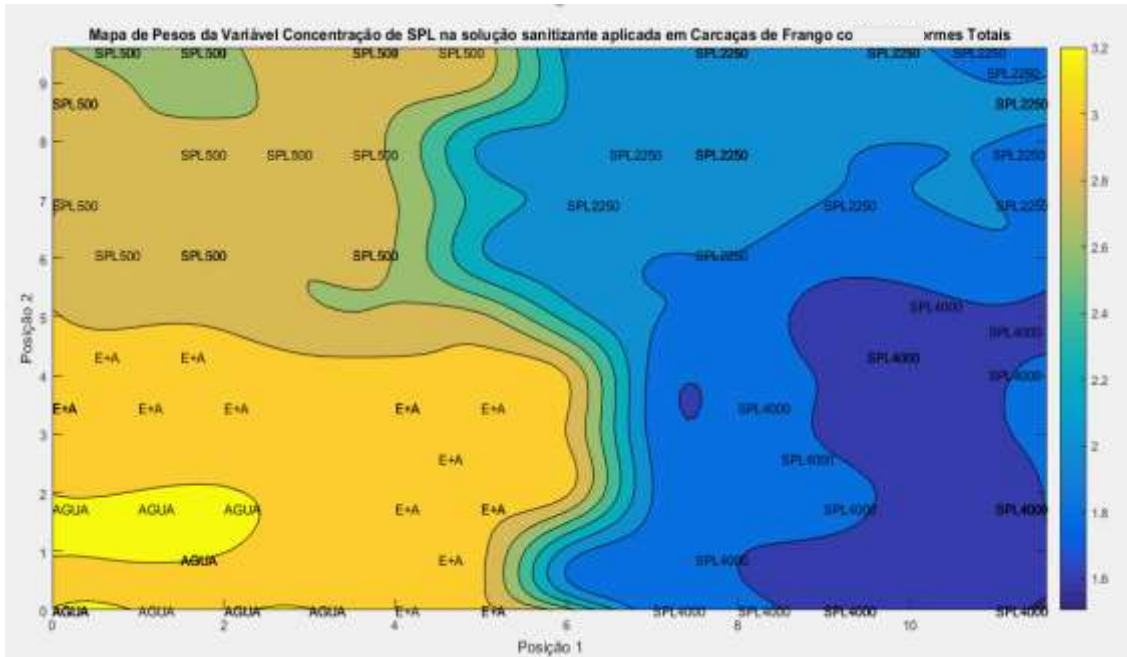
Figura 1 - Efeito dos sofrorolípídios a 500, 2.250 e 4.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aplicados por aspersão em carcaças de frango contra *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B), coliformes termotolerantes (C) e aeróbios mesófilos (D)



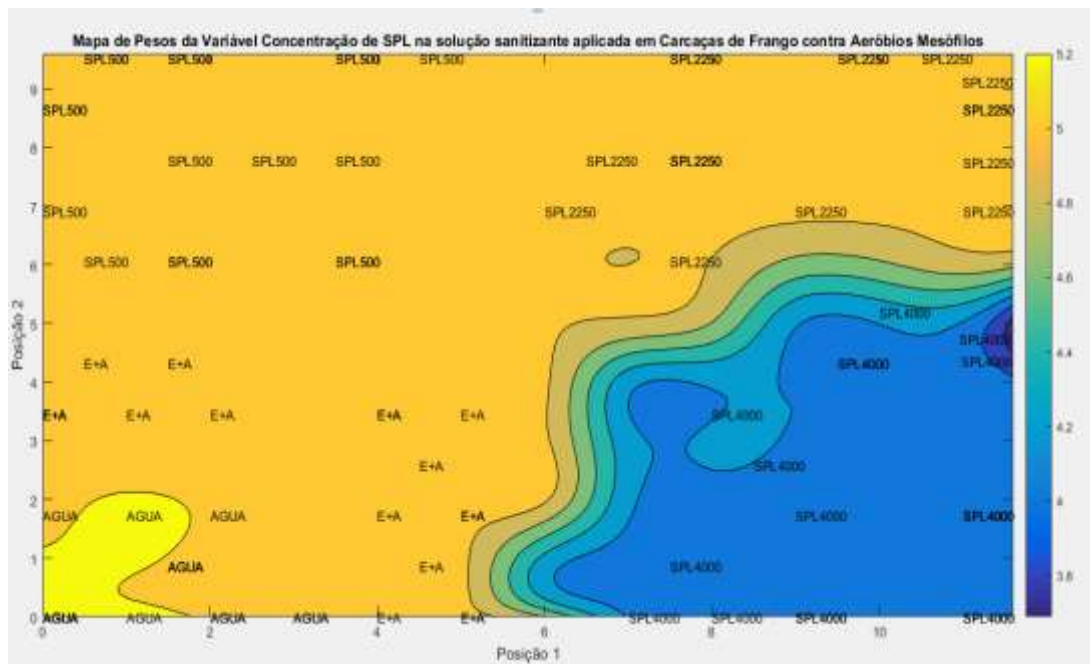
(A) *Staphylococcus aureus*



(B) *Escherichia coli*



(C) Coliformes termotolerantes



(D) Aeróbios mesófilos

Source: Autores.

O mapa referente ao *S. aureus* permite verificar que os tratamentos com água, água + etanol (E+A) e solução 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SPL 500), apresentam similaridade e são diferentes dos tratamentos contendo soforolipídios em concentrações de 2.250 e 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 carcaças 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	Água	Água + Etanol	Soforolipídios ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
				500	2.250	4.000
<i>S.aureus</i> (log UFC/g)	30'	3,09±0,022 ^{aA}	3,03±0,043 ^{bB}	2,92±0,026 ^{cA}	2,15 ±0,046 ^{dA}	0±0,00 ^{eA}
	60'	3,34±0,037 ^{aB}	3,26±0,021 ^{bA}	2,87±0,014 ^{cA}	0±0,00 ^{dB}	0±0,00 ^{dA}
	90'	3,44±0,022 ^{aC}	3,24±0,016 ^{bA}	2,53±0,049 ^{cB}	0±0,00 ^{dB}	0±0,00 ^{dA}
<i>E.coli</i> (log UFC/g)	30'	3,05±0,014 ^{aC}	2,89 ±0,028 ^{bC}	2,85±0,031 ^{bA}	0±0,00 ^{cA}	0±0,00 ^{cA}
	60'	3,26±0,011 ^{aB}	3,25±0,009 ^{aA}	2,80±0,036 ^{bB}	0±0,00 ^{cA}	0±0,00 ^{cA}
	90'	3,40±0,010 ^{aA}	3,14±0,029 ^{bB}	2,63±0,051 ^{cC}	0±0,00 ^{dA}	0±0,00 ^{dA}
Coliformes termotolerantes (log UFC/g)	30'	3,21±0,023 ^{aB}	3,04±0,036 ^{bC}	2,96±0,024 ^{bA}	2,36 ±0,070 ^{cA}	0±0,00 ^{dA}
	60'	3,49±0,013 ^{aA}	3,38±0,022 ^{bA}	2,91±0,020 ^{cA}	2,09±0,089 ^{dB}	0±0,00 ^{eA}
	90'	3,47±0,018 ^{aA}	3,29±0,041 ^{bB}	2,75±0,022 ^{cB}	0±0,00 ^{dC}	0±0,00 ^{dA}
Aeróbios mesófilos (log UFC/g)	30'	3,14±0,016 ^{aB}	3,07±0,032 ^{aB}	3,11±0,066 ^{aA}	2,01±0,151 ^{bA}	0±0,00 ^{cA}
	60'	3,59±0,017 ^{aA}	3,59±0,040 ^{aA}	2,99±0,022 ^{bA}	1,60±0,173 ^{cB}	0±0,00 ^{dA}
	90'	3,73±0,074 ^{aA}	3,53±0,018 ^{bA}	2,57±0,080 ^{cB}	0±0,00 ^{dC}	0±0,00 ^{dA}

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). Fonte: Autores.

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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentam a maior eficiência antibacteriana, eliminando toda a contaminação presente na água de lavagem, seguida da solução de soforolipídios 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

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.

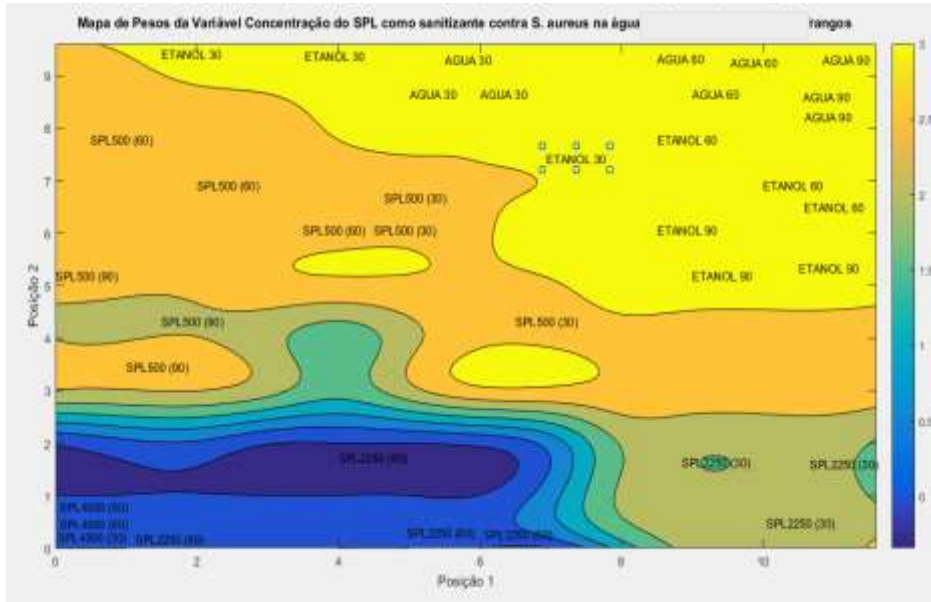
Embora o etanol seja um desinfetante de uso comum, sua interação com soforolipídios ainda não é bem claro. Algumas hipóteses são pela capacidade do etanol de auxiliar na solubilização do soforolipídios na água, e aumentar a interação com as membranas celulares. Outros possíveis mecanismos podem estar 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no tempos mínimo de 30 minutos e após este tempo concentração de 4.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ocorreu ausência total de contaminação. Com as concentrações de 500, 2.250 e 4.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentaram uma total eficiência, eliminando toda a contaminação presente na água de lavagem.

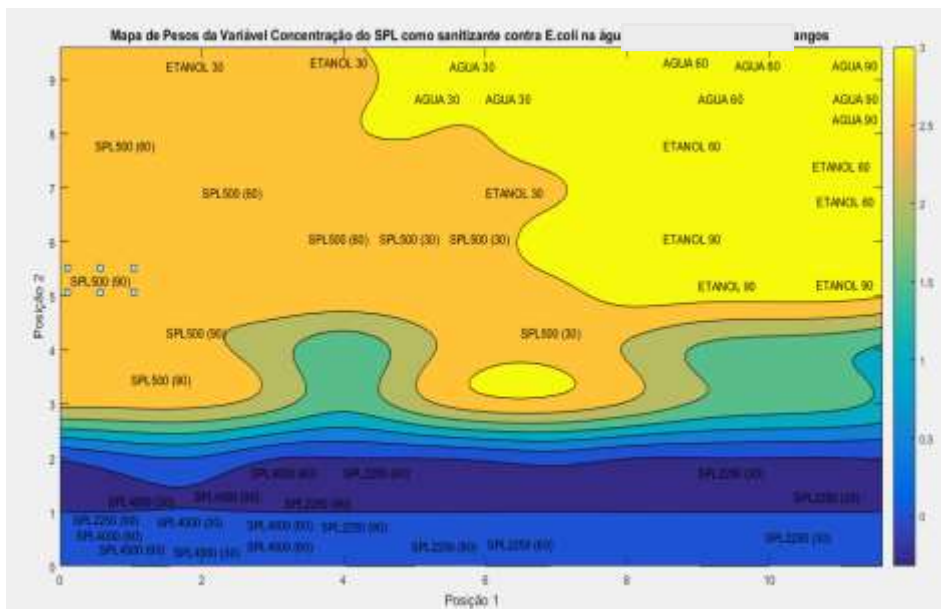
Os mapas obtidos por redes neurais, apresentados na Figura 2A, 2B, 2C e 2D, confirmam os resultados. Diante da exposição às soluções contendo soforolipídios é evidente a suscetibilidade das quatro cepas estudadas a este metabólito, que foi indicada pelas regiões de diferentes cores, e que pode se visualizar as concentrações e tempos de exposição com ação

semelhantes pelas cortes iguais. Os tratamentos com 2.250 e 4.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentaram uma tendência a diferenciação para todos os microrganismos estudados, demonstrando a eficiência dessas concentrações como um agente sanitizante.

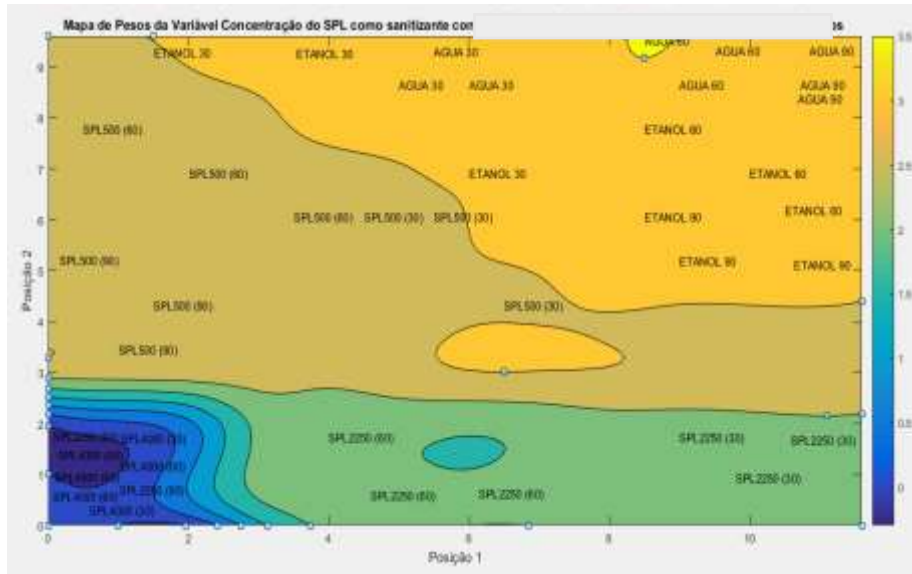
Figura 2 - Efeito dos sofrorolípídios a 500, 2.250 e 4.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aplicados por imersão em carcaças de frango nos tempos de 30, 60 e 90 minutos contra *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B), coliformes termotolerantes (C) e aeróbios mesófilos (D).



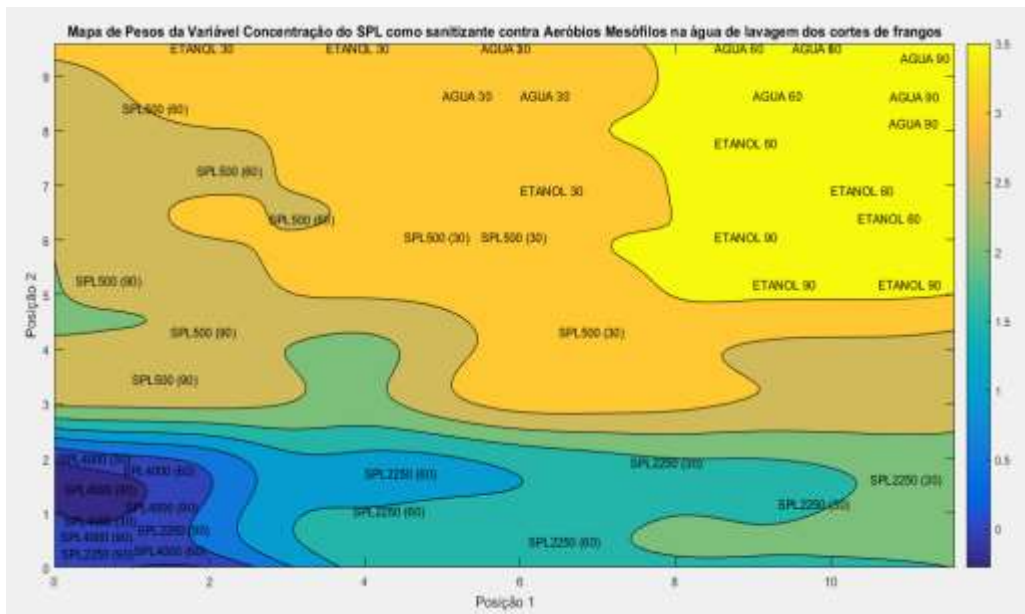
(A) *Staphylococcus aureus*



(B) *E. coli*



(C) Coliformes termotolerantes



(D) Aeróbios mesófilos

Source: Autores.

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 sofrorolipídios, 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. Conclusão

Conclui-se que os sofrorolipídios de *S. bombicola* 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 sofrorolipídios de *S. bombicola* foi eficaz na redução logarítmica das unidades formadoras de colônia (UFC) em 1,32 para *S. aureus*, 1,47 para *E. coli*, 1,43 para coliformes termotolerantes e 1,05 para aeróbios mesófilos. A imersão de carcaças por 30 minutos de exposição em solução de sofrorolipídios *S. bombicola* a 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e por 90 minutos a 2.250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ levou a erradicação completa de *S. aureus*, *E. coli*, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos das mesmas, comprovando ser o tratamento de imersão o mais eficiente na redução dos microrganismos contaminantes de carcaças de frango.

Os achados levam a mentalizar resultados promissores na pesquisa em aplicação deste novo sanitizante, sofrorolipídios, em equipamentos das indústrias de abate e processamento de aves, visto ser uma área desafiadora e de fundamental importância na qualidade final dos produtos, minimizando as perdas econômicas e reduzindo custos.

Referências

- ABPA. (2019). *Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal*. <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 Higiênica 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., Isolan, 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 its 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, e20180568.
- 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., 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 *Starmerella 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 *Starmerella 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*.
- 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.
- Purnell, G., James, C., James, J. S., Howell, M., & Corry, J. E. L. (2014) Comparison of Acidified Sodium Chlorite, Chlorine Dioxide, Peroxyacetic Acid and Tri-Sodium Phosphate Spray Washes for Decontamination of Chicken Carcasses. *Food Bioprocess Technology*, 7 (2093–2101).
- 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 polylactic 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, 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.

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.

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

USDA. (2016). United States Department of Agriculture. *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. 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.