



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 102014028897-0 B1



(22) Data do Depósito: 19/11/2014

(45) Data de Concessão: 15/06/2021

(54) Título: COMPLEXO LIPÍDIO-PROTEÍNA-CARBOIDRATO, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E SEU USO, COMPOSIÇÃO DE MAIONESE COMPREENDENDO O COMPLEXO LIPÍDIO-PROTEÍNA-CARBOIDRATO, E MEIO DE CULTURA

(51) Int.Cl.: A23L 29/10; C12P 1/04; C12N 1/28.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): JENYFFER MEDEIROS CAMPOS; LEONIE ASFORA SARUBBO; TÂNIA LÚCIA MONTENEGRO STAMFORD.

(57) Resumo: COMPLEXO LIPÍDIO-PROTEÍNA-CARBOIDRATO, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E SEU, COMPOSIÇÃO DE MAIONESE COMPREENDENDO O COMPLEXO LIPÍDIO-PROTEÍNA-CARBOIDRATO, E MEIO DE CULTURA A presente invenção descreve um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis*, o seu processo de produção e seu uso, a aplicação desse complexo em maionese e o meio de cultura utilizado em sua produção. Especificamente, a presente invenção compreende um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis* que apresenta aplicabilidade na produção de maionese. Além disso, compreende um processo de produção desse complexo que viabiliza a produção em larga escala. A presente invenção se situa nos campos da microbiologia, química e bioquímica.

COMPLEXO LIPÍDIO-PROTEÍNA-CARBOIDRATO, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E SEU USO, COMPOSIÇÃO DE MAIONESE COMPREENDENDO O COMPLEXO LIPÍDIO-PROTEÍNA-CARBOIDRATO, E MEIO DE CULTURA

→ Campo da invenção

1. A presente invenção descreve um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis*, o seu processo de produção e seu uso, a aplicação desse complexo em maionese e o meio de cultura utilizado em sua produção. A presente invenção se situa nos campos da microbiologia, química e bioquímica.

→ Antecedentes da invenção

2. Os microrganismos são amplamente utilizados em diversos segmentos industriais e a utilização de novos compostos produzidos por esses está sendo investigada, como, por exemplo, no potencial uso dessas substâncias na indústria de forma a substituir moléculas sintéticas ou obtenção de compostos que proporcionem novas características aos produtos finais.

3. Os surfactantes são poderosos agentes anfipáticos com aplicação em vários segmentos industriais, destacando as indústrias petrolíferas, farmacêuticas e alimentícias.

4. O monoestearato de glicerila e a carboximetilcelulose são emulsificantes sintéticos largamente empregados nas indústrias de alimentos. Embora sejam extremamente eficientes, esses aditivos têm sofrido restrições, especialmente por parte dos consumidores, em função das exigências de redução do uso de aditivos “artificiais” ou quimicamente sintetizados em alimentos. Conseqüentemente, a consciência cada vez maior dos consumidores tem levado ao aumento

da demanda por aditivos e ingredientes mais naturais (SHEPHERD et al., 1995).

5. Alguns emulsificantes alimentícios naturais derivados de vegetais, como a lecitina e a goma arábica, já gozam de grande participação e aceitação no mercado. Contudo, a lecitina apresenta limitações de funcionalidade quando aplicada em produtos submetidos a condições de processamento mais modernas, como cocção em microondas e irradiação. A produção de emulsificantes a partir de cultivos microbianos, os chamados biossurfactantes, surge como alternativa aos aditivos existentes, especialmente em virtude da possibilidade em obter produtos mais resistentes às exigências das modernas tecnologias de processamento de alimentos (SARUBBO, 1997).

6. A maioria dos surfactantes comerciais são sintéticos e derivados do petróleo. Com a constante e crescente preocupação ambiental, os biossurfactantes apresentam-se como alternativas aos produtos existentes. Os biossurfactantes apresentam vantagens em relação aos surfactantes sintéticos devido à biodegradabilidade, baixa toxicidade e diversidade de aplicações em vários segmentos industriais. No entanto, o uso de biossurfactantes é limitado devido aos altos custos de produção.

7. Sabe-se que a demanda pelo uso de produtos naturais é crescente e isto o torna como alternativa viável para a indústria alimentícia. No entanto, não se utiliza ainda os biossurfactantes como aditivos em larga escala.

8. A utilização de biossurfactantes em alimentos mostra-se promissora quando são consideradas algumas aplicações já descritas na literatura em produtos lácteos, de panificação, sistemas aerados e molhos para saladas (CAMPOS et al., 2013).

9. Entretanto, vários trabalhos descritos na literatura sobre a produção de biossurfactantes produzidos por microrganismos, incluindo

bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos, se referem à aplicação na área ambiental principalmente na biorremediação, ou seja, a utilização de compostos surfactantes é bastante atrativa na remoção de contaminantes hidrofóbicos gerados pela indústria de petróleo.

10. Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema.

11. O documento *Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods* de Shepherd *et al.* (1995) revela a produção por microorganismos de substâncias extracelulares de alto peso molecular com propriedades emulsificantes para utilização em alimentos. Foram avaliados 24 produtos extracelulares e oito desses apresentaram melhor atividade do que emulsificantes de alimentos já conhecidos, como a goma arábica e a carboximetilcelulose.. O meio para o cultivo dos microorganismos contém como algumas das fontes de carbono sugeridas os óleos de milho e colza. Foi realizada uma preparação de molho para salada contendo 40% de óleo de girassol, 40,3% de água, 10% de vinagre, 4% de ovo em pó integral, 2% de açúcar, 2% de sal, 1% de mostarda, 0,2% de Mayodan (mistura de goma guar e goma xantana), 0,5% de amido instantâneo Ultratex e 0,2/0,8% de produtos extracelulares de *C. utilis* liofilizado. Há a indicação de que a propriedade emulsificante da *C. utilis* seja devido substâncias aminoaçúcares secretadas e esses compostos poliméricos demonstraram a possibilidade da substituição dos emulsificantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos, além de poder oferecer novas texturas. Outro aspecto importante é que esse microorganismo apresenta um histórico de não apresentar toxicidade a humanos. Entretanto, os testes de toxicidade do biosurfactante não foram realizados, além de que a vida de prateleira desse produto foi avaliada por apenas uma semana, o que não garante a viabilidade

comercial do produto. Além disso, foram utilizados diversos componentes como fonte de carbono no meio de cultura, como glicose, sacarose, lactose, piruvato, óleo de milho e óleo de colza.

12. O documento *Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by Candida lipolytica*, de Sarubbo *et al.* (2007) revela a produção de surfactante por *Candida lipolytica* em meio contendo óleo de canola e glicose como fontes de carbono. A composição do meio utilizado compreende 0,1% de NH_4NO_3 , 0,02% de KH_2PO_4 , 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% de extrato de levedura, 10% de glicose e 10% de óleo de canola. A incubação ocorreu sob agitação de 150 rpm, por 144 horas a 27°C. A produção do biossurfactante a partir do óleo de canola e glicose atingiu seu máximo em 48 horas de fermentação e o material foi identificado como um complexo proteína-lipídeo-polissacarídeo. A capacidade de emulsificação do meio sem células demonstrou influencia pela adição de sal, pH e temperatura. Posteriormente, foram realizados testes para identificar o melhor reagente para isolar o biossurfactante e o acetato de etila demonstrou melhor eficácia do que misturas de clorofórmio e metanol. A propriedade emulsificante do biossurfactante isolado foi medida e verificou-se que possui propriedade comparáveis com os emulsificantes comerciais e outros biossurfactantes. Dessa forma, o documento apresenta uma alternativa para produção de biossurfactantes a partir do óleo de canola e glicose, porém o processo descrito é longo, o que é desfavorável para a aplicação industrial, além da quantidade do óleo de canola utilizado ser alta o que também dificulta a produção em larga escala, já que o óleo de canola possui um alto custo.

13. Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui

proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

14. Dessa forma, os biossurfactantes presentes no estado da técnica não possuem um nível adequado de segurança (toxicidade) e não atribuem uma vida de prateleira longa ao produto final. Além disso, a utilização do biossurfactante em escala industrial ainda é um inconveniente devido aos altos custos de produção, ocasionados por fatores como, por exemplo, alto tempo de fermentação e matérias-primas de alto custo. Portanto, há problemas que impossibilitam a produção em larga escala de biossurfactantes e a ainda são necessários aprimoramentos aos biossurfactantes, seus respectivos usos e na qualidade do produto final.

→ **Sumário da invenção**

15. Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir da produção de um complexo lipídio-proteína-carboidrato sintetizado por *Candida utilis*, que pode ser utilizado como surfactante. Em sua produção, é utilizado um tempo reduzido de fermentação e óleo de fritura reutilizado como fonte de carbono no meio de cultura em baixas quantidades. O óleo de fritura de canola pode ser utilizado nessa invenção sem a necessidade de padronização, ou seja, o óleo que foi utilizado na fritura de diferentes alimentos, independente da composição final. Além disso, testes demonstraram que o complexo lipídio-proteína-carboidrato obtido por esse processo possui propriedades surfactantes que geram emulsões alimentares estáveis, proporcionando uma vida de prateleira adequada para a comercialização do produto. Adicionalmente, testes demonstraram que o complexo em questão não apresenta toxicidade aguda.

16. A presente invenção revela um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis*.

17. Em uma concretização, o processo de produção de complexo lipídio-proteína-carboidrato compreende as etapas de:

- a) preparo de um pré-inóculo de *Candida utilis*;
- b) preparo de um meio de cultura contendo óleo;
- c) mistura do meio de cultura com a suspensão de pré-inóculo contendo *Candida utilis*; e
- d) incubação.

18. A presente invenção também revela o uso do complexo lipídio-proteína-carboidrato como surfactante.

19. Além disso, a presente invenção revela uma composição de maionese, compreendendo o complexo lipídio-proteína-carboidrato.

20. A presente invenção também se refere ao meio de cultura produzido com óleo de canola.

21. Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é a produção de um complexo lipídio-proteína-carboidrato com propriedade surfactante de aplicação comercial. O meio de cultura e os parâmetros de fermentação desenvolvidos visam a aplicação industrial, de forma a reduzir os custos de produção, utilizando meio de cultura viável e reduzindo o tempo de fermentação, viabilizando a produção em larga escala. Foi avaliado o melhor processo de produção do complexo lipídio-proteína-carboidrato de forma a possuir especificações que reduzem o tempo e, portanto, o custo de produção. Além disso, a utilização comercial desse complexo como surfactante é comprovada, por meio da apresentação de um produto comercial testado quanto à qualidade do produto final e a baixa toxicidade.

22. Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no

segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

→ **Breve descrição das figuras**

23. Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as seguintes figuras.

24. A Figura 1 mostra testes de atividade de emulsificação instável (A) e estável (B). A emulsão utilizando o complexo lipídio-proteína-carboidrato está de acordo com a figura 1B.

25. A Figura 2 mostra as características físicas do complexo lipídio-proteína-carboidrato isolado.

26. A Figura 3 mostra o comportamento das maioneses frente à estabilidade da emulsão formada durante quatro semanas sob refrigeração. Apenas a formulação 5 demonstrou estabilidade ao final das 4 semanas. Segue as composições de cada formulação: 1) carboximetilcelulose e goma guar; 2) carboximetilcelulose; 3) carboximetilcelulose e complexo lipídio-proteína-carboidrato de *Candida utilis*, 4) goma guar; 5) goma guar e complexo lipídio-proteína-carboidrato de *Candida utilis*; 6) complexo lipídio-proteína-carboidrato de *Candida utilis*.

27. A Figura 4 mostra a análise dos componentes do complexo lipídio-proteína-carboidrato detectados por cromatografia em camada delgada.

28. A Figura 5 mostra o espectro de Infravermelho de complexo lipídio-proteína-carboidrato purificado de *Candida utilis*.

29. A Figura 6 mostra o espectro NMR ¹³C do complexo lipídio-proteína-carboidrato isolado produzido por *Candida utilis*.

30. A Figura 7 mostra o espectro NMR ¹H do complexo lipídio-proteína-carboidrato isolado produzido por *Candida utilis*.

→ **Descrição detalhada da invenção**

31. A presente invenção refere-se a um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis*, o processo de produção desse complexo, o seu uso, composição de maionese compreendendo-o e o meio de cultura utilizado em sua produção. Adicionalmente, refere-se à reutilização de óleo residual de fritura de canola, particularmente como meio de cultura para crescimento de *Candida utilis*.

32. O óleo de fritura de canola apresenta a vantagem de não precisar de padronização, em outras palavras, pode ser utilizado o óleo que foi empregado na fritura de diferentes alimentos, mesmo que apresente composição final variada em relação a moléculas de ácidos graxos e outros produtos de decomposição do óleo.

33. Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis*.

34. Em uma concretização, o complexo é produzido em meio de cultura contendo óleo de canola.

35. Em uma concretização, o complexo lipídio-proteína-carboidrato possui o espectro de infravermelho da figura 5, o espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C da figura 6 e o espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da Figura 7.

36. A presente invenção também se refere ao processo de produção de complexo lipídio-proteína-carboidrato compreendendo as etapas de:

- a) preparo de um pré-inóculo de *Candida utilis*;
- b) preparo de um meio de cultura contendo óleo;
- c) mistura do meio de cultura com a suspensão de pré-inóculo contendo *Candida utilis*; e
- d) incubação.

37. Em uma concretização, o óleo é de canola.

38. Em uma concretização, o óleo de canola está em concentração de 6% em peso/volume total do meio de cultura.

39. Em uma concretização, a incubação do meio contendo *Candida utilis* é sob agitação a 150 rpm em *Shaker* orbital, a 28° C e durante 88 horas.

40. Em uma concretização, o processo de produção pode compreender uma etapa adicional de isolamento do complexo lipídio-proteína-carboidrato.

41. A presente invenção também se refere ao uso do complexo lipídio-proteína-carboidrato como surfactante.

42. Em uma concretização, o complexo lipídio-proteína-carboidrato é usado no preparo de emulsão alimentar.

43. A presente invenção também se refere a uma composição de maionese compreendendo o complexo lipídio-proteína-carboidrato e goma guar.

44. Em uma concretização, o complexo lipídio-proteína-carboidrato em uma concentração de 0,7% em peso/volume total de maionese.

45. A presente invenção também se refere a um meio de cultura produzido com óleo de canola.

46. Em uma concretização, o óleo de canola é óleo de fritura e está presente em uma quantidade de 6% em peso/volume do meio, que compreende adicionalmente elementos minerais em água.

47. Em uma concretização, o meio de cultura é utilizado para o crescimento de *Candida utilis*.

- Complexo lipídio-proteína-carboidrato

48. No contexto da presente invenção, o termo deve ser entendido como composto que compreende lipídios, proteínas e

carboidratos em sua composição, sendo esses os componentes encontrados em maior quantidade na composição.

- Biossurfactante

49. No contexto da presente invenção, o termo deve ser entendido como surfactantes produzidos com auxílio de microrganismos.

- Canola

50. No contexto da presente invenção, o termo deve ser entendido como variedade de planta obtida pelo processo de *cultivar* de plantas da família *Brassica*, mais especificamente *Brassica napus* ou *Brassica rapa*.

- Óleo de fritura

51. No contexto da presente invenção, o termo deve ser entendido como óleo residual de fritura. Em outras palavras, óleo que já foi utilizado anteriormente, como, por exemplo, para fritura de artigos alimentícios ou outras aplicações.

→ **Exemplos - concretizações**

52. Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

53. Um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis* é utilizado como surfactante para aplicação em alimentos. O novo processo de produção utiliza água destilada suplementada com óleo vegetal de canola residual de fritura, coletado em estabelecimentos comerciais da região metropolitana do Recife.

- Produção do complexo lipídio-proteína-carboidrato

54. O complexo lipídio-proteína-carboidrato foi obtido através das etapas principais de preparo do inóculo, formulação do meio de produção e produção do biossurfactante.

55. O inóculo é feito com a espécie de levedura selecionada (*Candida utilis*), mantida em meio Yeast Mold Agar (YMA) composto por: extrato de malte, 3g/L, extrato de levedura, 3g/L, peptona, 5g/L, glicose, 10g/L, Agar e 20 g/L. Quando excluído o ágar constitui o meio do pré-inóculo YMB (Yeast Mold Broth), ambos com pH final 5,7. Para obtenção do pré-inóculo a *Candida utilis* é transferida para frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido Yeast Mold Broth (YMB) e incubada em *Shaker* orbital a 28°C, durante 24 horas.

56. O meio de produção é preparado com água destilada suplementada com óleo vegetal após fritura, como fonte de carbono, e nitrato de amônio, utilizado como fonte de nitrogênio, suplementado com glicose em meio mineral, contendo fosfato de potássio, sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de ferro, cloreto de sódio e extrato de levedura. Em seguida, o meio de produção é esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 minutos.

57. A produção é realizada em recipientes contendo uma suspensão da levedura de 10⁸ células/mL do pré-inóculo e 1.000 mL do meio de produção, incubados a 150 rpm em *Shaker* orbital a 28°C, durante 88 horas. O fermentado é centrifugado e filtrado para obtenção do líquido metabólico livre de células. O complexo lipídio-proteína-carboidrato é isolado adicionando-se 3 volumes de etanol a 95% contendo 1% (vol/vol) de ácido acético mantido a 4°C por 16h. O precipitado é coletado por centrifugação a 10.000g e completamente seco. A secagem pode ser realizada à temperatura ambiente, a 40°C, ou alternando essas temperaturas, como foi realizado nesse exemplo: 40°C no período diurno e temperatura ambiente durante a noite.

58. A quantidade aproximada de material utilizado para produzir 1L de meio encontra-se na tabela 1 abaixo. O rendimento médio do produto final é de 7,5g/L de complexo lipídio-proteína-carboidrato isolado.

Material	Quantidade
Óleo de fritura de canola	60mL
Glicose	60g
Nitrato de amônio	2g
Fosfato de potássio	0,1g
Sulfato de magnésio heptahidratado	5g
Cloreto de ferro	0,1g
Cloreto de sódio	0,1g
Extrato de levedura	3g
Etanol	2885mL
Ácido acético	100mL

Tabela 1 - Valores aproximados de material utilizados para produzir 1L de meio

59. O tempo aproximado de produção encontra-se listado na tabela 2 abaixo.

Tempo	Atividade
4 horas	Preparo, esterilização, resfriamento do pré-inóculo e inoculação
24 horas	Crescimento do microrganismo no pré-inóculo
2 horas	Pesagem dos insumos, preparo do meio e aferição do pH
2 horas	Aquecimento da autoclave, esterilização e resfriamento do meio
88 horas	Fermentação em shaker
12 horas	Centrifugação do meio para obtenção do líquido metabólico
2 horas	Preparo de solução e adição ao líquido metabólico

12 horas	Geladeira para precipitação do complexo lipídio-proteína-carboidrato
2 horas	Remoção do precipitado
48 horas	Evaporação em chapa aquecedora até secagem completa

Tabela 2 - Tempo aproximado para a realização de cada etapa

60. O biossurfactante foi produzido em meio de baixo custo, contendo óleo de fritura de canola, que é um resíduo altamente poluente e pode ser utilizado como meio de cultura para crescimento de *Candida utilis* e como substrato para produção do complexo lipídio-proteína-carboidrato auxiliando assim o setor ambiental.

- Determinação dos parâmetros de produção

61. Foram realizadas diversas concretizações envolvendo diferentes combinações de concentração dos componentes do meio de produção e parâmetros de cultivo a fim de determinar as condições ótimas de produção do complexo lipídio-proteína-carboidrato. A combinação de fatores que demonstrou esse resultado, porém sem limitar o processo a esses parâmetros, e foi utilizada na concretização descrita anteriormente corresponde ao experimento 26 da tabela 3, o qual indica um meio contendo 6% de óleo residual de canola, 6% de glicose, 0,2% de nitrato de amônio e 0,3% de extrato de levedura e incubação por 88 horas com agitação em *Shaker* orbital a 150rpm, contendo inóculo a 1%. A tabela 3 indica os outros parâmetros testados.

Número do experimento	Óleo de Fritura de Canola (%)	Glicose (%)	Nitrato de Amônia (%)	Extrato de Levedura (%)	Agitação (rpm)	Inóculo (%)	Tempo (h)
1	3	6	0,20	0,30	150	1	88

2	4	6	0,20	0,30	150	1	88
3	5	6	0,20	0,30	150	1	88
4	6	6	0,20	0,30	150	1	88
5	6	2	0,20	0,30	150	1	88
6	6	4	0,20	0,30	150	1	88
7	6	6	0,20	0,30	150	1	88
8	6	8	0,20	0,30	150	1	88
9	6	6	0,10	0,30	150	1	88
10	6	6	0,20	0,30	150	1	88
11	6	6	0,30	0,30	150	1	88
12	6	6	0,40	0,30	150	1	88
13	6	6	0,20	0,10	150	1	88
14	6	6	0,20	0,30	150	1	88
15	6	6	0,20	0,50	150	1	88
16	6	6	0,20	0,70	150	1	88
17	6	6	0,20	0,30	120	1	88
18	6	6	0,20	0,30	150	1	88
19	6	6	0,20	0,30	200	1	88
20	6	6	0,20	0,30	250	1	88
21	6	6	0,20	0,30	150	0,3	88
22	6	6	0,20	0,30	150	1	88
23	6	6	0,20	0,30	150	2	88
24	6	6	0,20	0,30	150	3	88
25	6	6	0,20	0,30	150	1	74
26	6	6	0,20	0,30	150	1	88
27	6	6	0,20	0,30	150	1	108
28	6	6	0,20	0,30	150	1	128

Tabela 3 - Experimentos com diferentes parâmetros de produção (os valores representados em porcentagem correspondem à porcentagem em peso do componente em relação ao volume total)

- Aplicação do complexo lipídio-proteína-carboidrato

62. O complexo lipídio-proteína-carboidrato produziu boas emulsões sendo testado em concentrações diferentes em formulações de molho tipo maionese obtendo melhor estabilidade da emulsão a 0,7% e não apresentou contaminação quanto aos parâmetros microbiológicos definidos pela legislação.

63. Com o objetivo de produzir um biossurfactante com propriedade emulsificante, um teste importante aplicado é a atividade de emulsificação, descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Neste, 1,0 mL de hidrocarbonetos (óleo de milho, óleo de girassol) são adicionados separadamente a 1,0 mL do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação, em tubos de ensaio e agitados em vortex durante um minuto. A estabilidade da emulsão é determinada após 24 horas, e o índice de emulsificação (E24) é calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor multiplicado por 100.

64. A partir deste ensaio preliminar, pode-se sugerir que a utilização deste biossurfactante apresenta a mesma resposta em uma emulsão, apresentando-se semelhante ao descrito na figura 1B. Com isto, pode-se aplicar o biossurfactante isolado, que apresenta em sua composição, aproximadamente 66% de gordura (figura 2), o que o torna miscível também no meio utilizado.

65. Após isolamento do complexo lipídio-proteína-carboidrato, o mesmo foi testado em formulações com concentrações de 0,2-0,8% (peso/volume) para obtenção da melhor concentração. Após encontrar a concentração de 0,7% que apresentou melhor estabilidade da emulsão,

o mesmo foi novamente testado sozinho, combinado com goma guar (0,2%) ou carboximetilcelulose (0,2%) a fim de obter o produto mais estável após 30 dias sob refrigeração. A única formulação que permaneceu estável após quatro semanas foi a maionese combinada com o complexo lipídio-proteína-carboidrato isolado, que atua como agente emulsificante, e a goma guar, que atua como agente estabilizante.

66. O complexo lipídio-proteína-carboidrato foi avaliado em formulações de maionese usado isolado ou combinado com agentes estabilizantes (goma guar e carboximetilcelulose) conforme tabela 4 abaixo.

Formulação	Ingredientes testados
1	Carboximetilcelulose + goma guar
2	Carboximetilcelulose
3	Carboximetilcelulose + biossurfactante isolado de <i>Candida utilis</i>
4	Goma guar
5	Goma guar + biossurfactante isolado de <i>Candida utilis</i>
6	Biossurfactante isolado de <i>Candida utilis</i>

Tabela 4 - Composições testadas na produção de maionese

67. A formulação de maionese testada nessa concretização compreende aproximadamente 40% de óleo de girassol, 40,3% de água, 10% de vinagre, 4% de ovo em pó, 2% de açúcar, 2% de sal, 1% de farinha de mostarda e 0,5% de amido instantâneo. Os ingredientes foram adicionados individualmente em um recipiente e, posteriormente, misturados com o auxílio de um agitador elétrico (mixer) durante um minuto, à temperatura ambiente. Os molhos obtidos foram armazenados

a 4°C durante um mês para inspeção visual de sua aparência (Torabizadeh et al., 1996) e avaliados semanalmente quanto à estabilidade da emulsão.

68. Os resultados mostraram que o complexo lipídio-proteína-carboidrato conseguiu estabilizar o molho após 4 semanas de armazenamento sob refrigeração a 4°C, quando combinado com a goma guar, conforme ilustrado na figura 3.

69. A formulação 5 foi a única que não desestabilizou formando uma fase aquosa depositada no fundo do recipiente, o que sugere a emulsificação do complexo lipídio-proteína-carboidrato associado com o poder estabilizante da goma guar, a qual possui esta propriedade comprovada e aprovada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para uso em alimentos. A concentração do biossurfactante usada nesta formulação foi de 0,7%.

70. Foi testado o poder emulsificante e estabilizante em condições extremas de pH, temperatura, salinidade e tempo de aquecimento (parâmetros importantes para utilização na indústria alimentícia), oferecendo resistência em sua degradação.

- Caracterização do biossurfactante

71. Testes de caracterização foram realizados como composição centesimal, Cromatografia em Camada Delgada, Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear.

72. A composição química do biossurfactante isolado foi determinado e os resultados encontrados de carboidratos, lipídios e proteínas são descritos na tabela 5 abaixo. O biossurfactante produzido por *C. utilis* foi classificado como um complexo lipídio-proteína-carboidrato.

Análises químicas	Resultados (%)
Lipídios	65,88
Proteínas	7,10
Carboidratos	6,39
Cinzas	2,13
Umidade	18,50

Tabela 5 - Caracterização Bioquímica do biossurfactante produzido por *Candida utilis* em meio mineral suplementado com 6% (p/v) de glicose e 6% (p/v) de óleo de fritura de canola por 88 h a 150 rpm e 28 °C

73. Para comprovação da composição química do biossurfactante isolado, determinou-se a análise em Cromatografia em Camada Delgada. Pode-se observar uma mancha bem definida de cor castanho em L1 com $R_f = 0,50$ e L2 com $R_f = 0,73$ na exposição aos vapores de iodo como também para C3 e C4 com $R_f = 0,76$ e $R_f = 0,71$, respectivamente, enquanto não foram observadas manchas após a pulverização com ninidrina descritos na Figura 4.

74. De acordo com o espectro de IR (Figura 5), a banda larga observada no biossurfactante isolado de *Candida utilis* foi 3461 cm^{-1} correspondente ao O-H estiramento. A absorção entre 2856 cm^{-1} e 2925 cm^{-1} são definidas como estiramento simétrico de grupos de cadeia alifática (-CH), -CH₂ e -CH₃. Percebe-se estiramento C=O em 1745 cm^{-1} , o que pode caracterizá-lo como éster de cadeia alifática, pois não tem estrutura de aromático C=C na faixa entre 1600 e 1580 cm^{-1} .

75. Pode-se confirmar por meio do espectro de RMN que trata-se de um éster. No espectro de ¹³C (Figura 6) tem um sinal em 173 ppm. Há dupla ligação confirmado com sinais no espectro de ¹H (Figura 7) na região entre 5.0 e 5.6 ppm, e pelos sinais em 130 ppm no espectro de ¹³C. Encontra-se também uma cadeia alquílica longa com sinais na

região de 0.8 a 2.4 no espectro de ^1H , confirmado pelos sinais entre 17 e 35 ppm no espectro de ^{13}C e pelo espectro de DEPT 135 onde estes sinais ficaram com fase negativa (fase que os CH_2 aparecem). Não se detectou a presença de anel glicosídico na amostra.

- Toxicidade

76. Além disso, foi empregado na pesquisa o teste biológico. Foram utilizados no experimento 24 ratos da linhagem Wistar (12 machos e 12 fêmeas) com 60 dias de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, distribuídos em dois grupos, com 12 animais cada, e receberam as dietas de caseína e com complexo lipídio-proteína-carboidrato. O composto isolado foi administrado em rações formuladas e oferecidas aos animais. As dietas foram administradas por um período de 21 dias. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE e aprovado em 05/11/2012 sob processo nº 23076.039279/2012-85. Ao final do teste biológico, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa para o ganho de peso, a ingestão dietética e peso de rins e fígado entre os grupos com dieta padrão e com os animais que ingeriram dieta com complexo lipídio-proteína-carboidrato, comprovando a ausência de toxicidade aguda do complexo. O teste biológico conferiu inocuidade do produto a ser utilizado em alimentos.

77. Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Processo de produção de complexo lipídio-proteína-carboidrato **caracterizado por** compreender as etapas de:
 - a) preparo de um pré-inóculo de *Candida utilis*;
 - b) preparo de um meio de cultura contendo óleo de canola;
 - c) mistura do meio de cultura com a suspensão de pré-inóculo contendo *Candida utilis*; e
 - d) incubação.
- 2) Processo de produção de complexo lipídio-proteína-carboidrato de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado pelo** óleo ser de canola.
- 3) Processo de produção de complexo lipídio-proteína-carboidrato de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo** óleo de canola estar em concentração de 6% em peso/volume total do meio de cultura.
- 4) Processo de produção de complexo lipídio-proteína-carboidrato de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, **caracterizado pela** incubação do meio contendo *Candida utilis* ser sob agitação a 150 rpm em *Shaker* orbital, a 28°C e durante 88 horas.
- 5) Processo de produção de complexo lipídio-proteína-carboidrato de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** compreender uma etapa adicional de isolamento do complexo lipídio-proteína-carboidrato.
- 6) Uso do complexo lipídio-proteína-carboidrato conforme definido em qualquer uma das Reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** ser como surfactante.
- 7) Uso do complexo lipídio-proteína-carboidrato de acordo com a Reivindicação 6, **caracterizado por** ser como surfactante no preparo de emulsão alimentar.

8) Composição de maionese, **caracterizada por** compreender o complexo lipídio-proteína-carboidrato conforme definido em qualquer uma das Reivindicações 1 a 3 e goma guar.

9) Composição de maionese, de acordo com a Reivindicação 8, **caracterizada pelo** complexo lipídio-proteína-carboidrato estar presente em uma concentração de 0,7% em peso/volume total de maionese.

10) Meio de cultura, **caracterizado por** ser produzido com óleo de canola.

11) Meio de cultura, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizado pelo** óleo de canola ser óleo de fritura e estar presente em uma quantidade de 6% em peso/volume do meio, que compreende adicionalmente elementos minerais em água.

12) Meio de cultura, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 10 ou 11, **caracterizado por** ser para o crescimento de *Candida utilis*.

FIGURAS

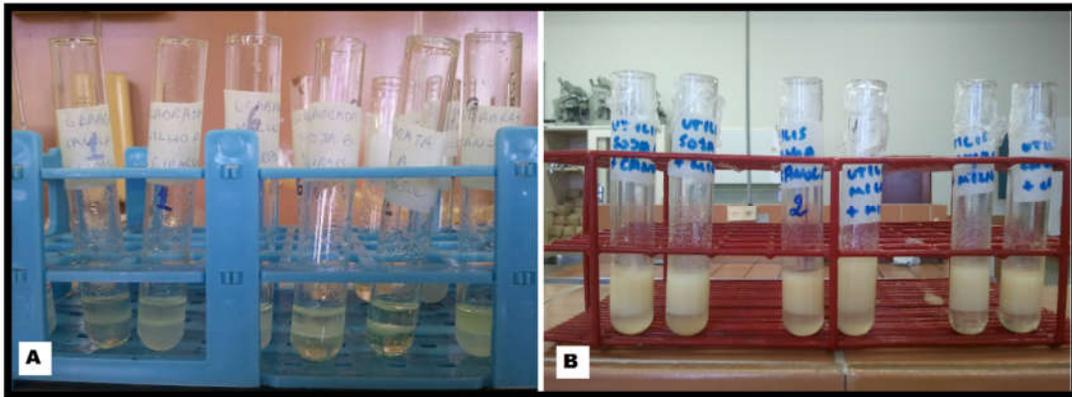


Figura 1



Figura 2



Figura 3

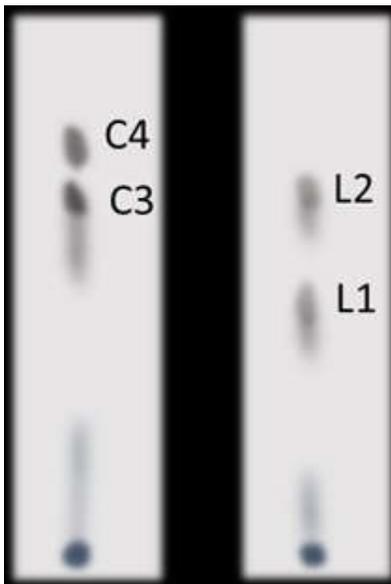


Figura 4

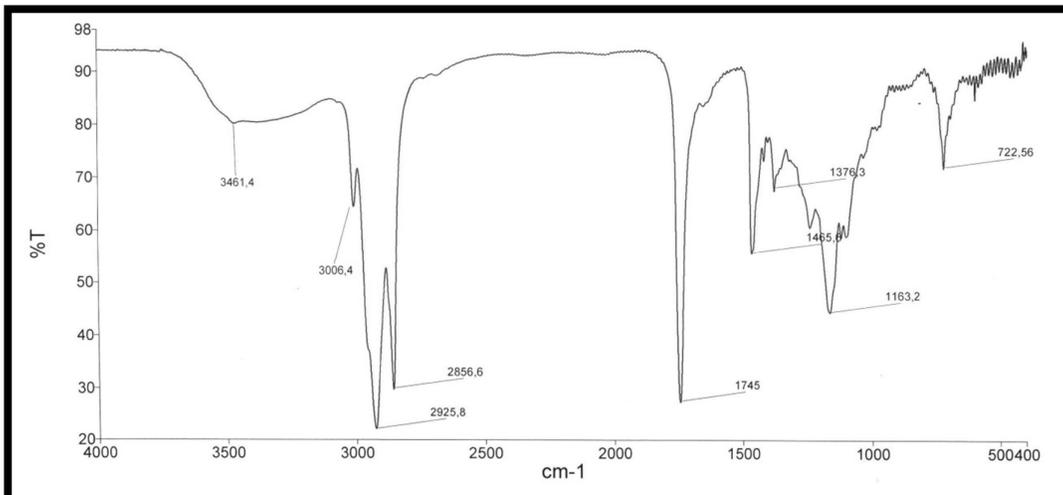


Figura 5

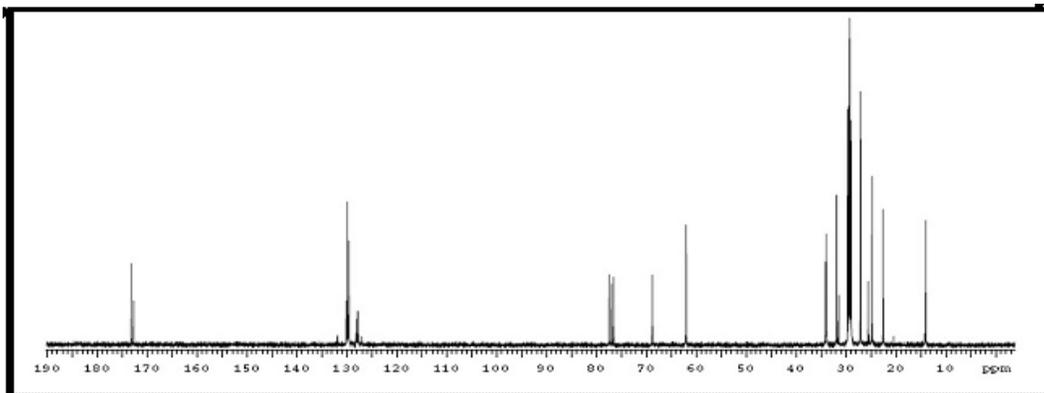


Figura 6

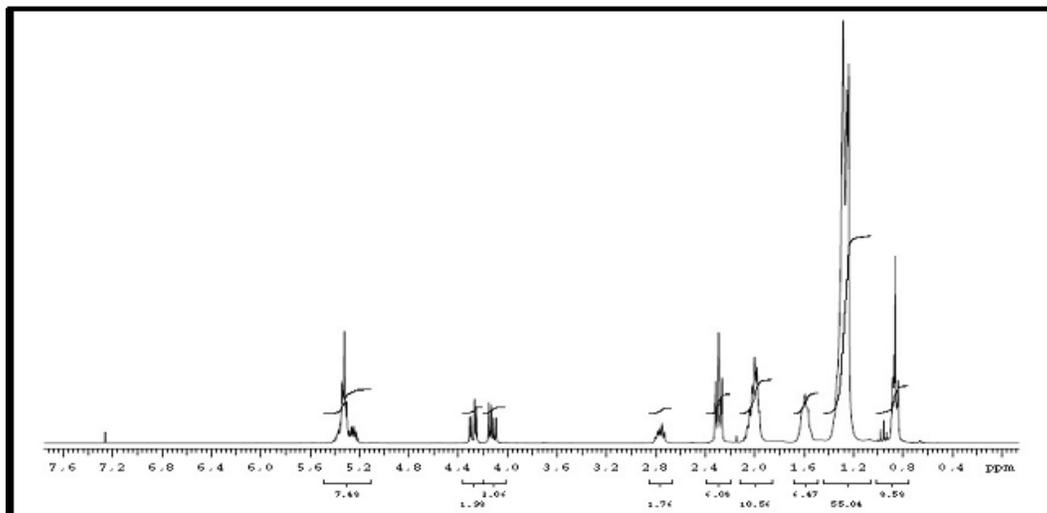


Figura 7