

Capítulo 4

Lipases

Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 132
- ▶ Características gerais e modo de ação, 133
- ▶ Fontes e principais características, 137
- ▶ Importância em alimentos | Rancidez hidrolítica, 144
- ▶ Aplicação industrial, 145
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 162
- ▶ Bibliografia, 164

Introdução

Lipases catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol.

Lipases, triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3) são esterases que catalisam a hidrólise de ligações éster preferencialmente sobre substratos insolúveis em água. São enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Essas enzimas têm papel fundamental no metabolismo de lipídeos dos seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reserva energética e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares.

Os aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial de enzimas lipolíticas têm sido intensamente estudados devido principalmente a três motivos:

- Por serem enzimas que apresentam uma forma de ação incomum – são solúveis em água mas catalisam reações envolvendo substratos lipofílicos –, a estrutura molecular das lipases, muitas vezes composta por uma “tampa” que protege o sítio ativo predominantemente hidrofóbico da enzima, apresenta grande interesse ao estudo da conformação tridimensional e de mudanças nessa conformação que interferem na atividade catalítica
- Lipases apresentam grande relevância médica, principalmente em relação à aterosclerose e à hiperlipidemia, uma vez que seus substratos e produtos têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular
- A descoberta, relativamente recente, da capacidade de as lipases catalisarem reações de síntese e sua surpreendente estabilidade em diversos solventes orgânicos abriu inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de várias fontes, aliada às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam, apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais.

Lipases são esterases que apresentam maior atividade sobre substratos insolúveis em água. Catalisam a hidrólise de óleos e gorduras e também a reação inversa de síntese, entre outras.

A função biológica das lipases é hidrolisar ésteres (Figura 4.1), especialmente triacilgliceróis. No entanto,

lipases também são capazes de catalisar reações de síntese dependendo, para isso, de baixa atividade de água no meio reacional (Figura 4.2).

Características gerais e modo de ação

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina-hidrolases (EC 3.1.1.3). Os triacilgliceróis (lipídeos neutros, principais componentes de óleos e gorduras) são seus substratos naturais, com consequente liberação de diacilgliceróis,

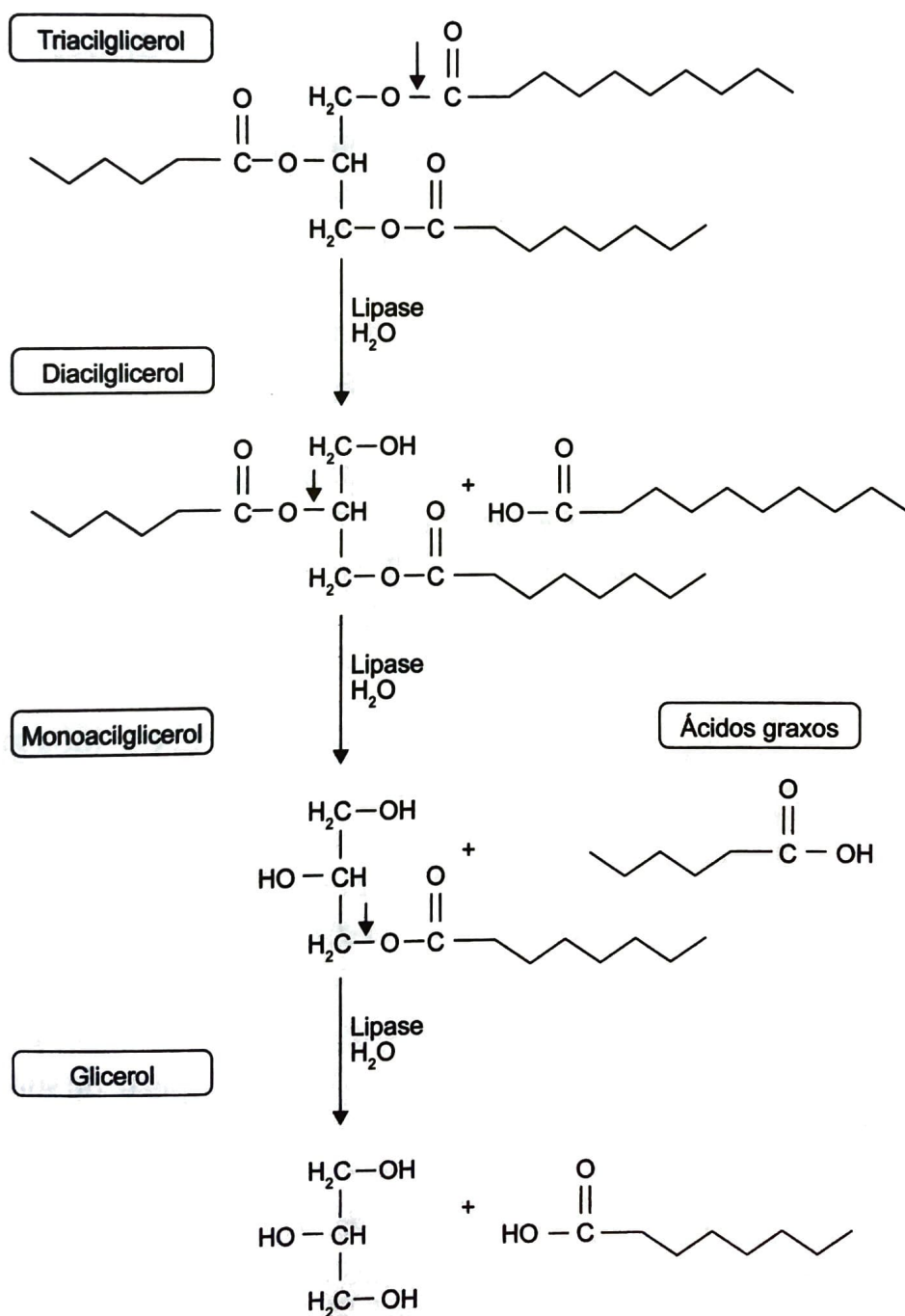


Figura 4.1 Hidrólise de triacilglicerol por lipase.

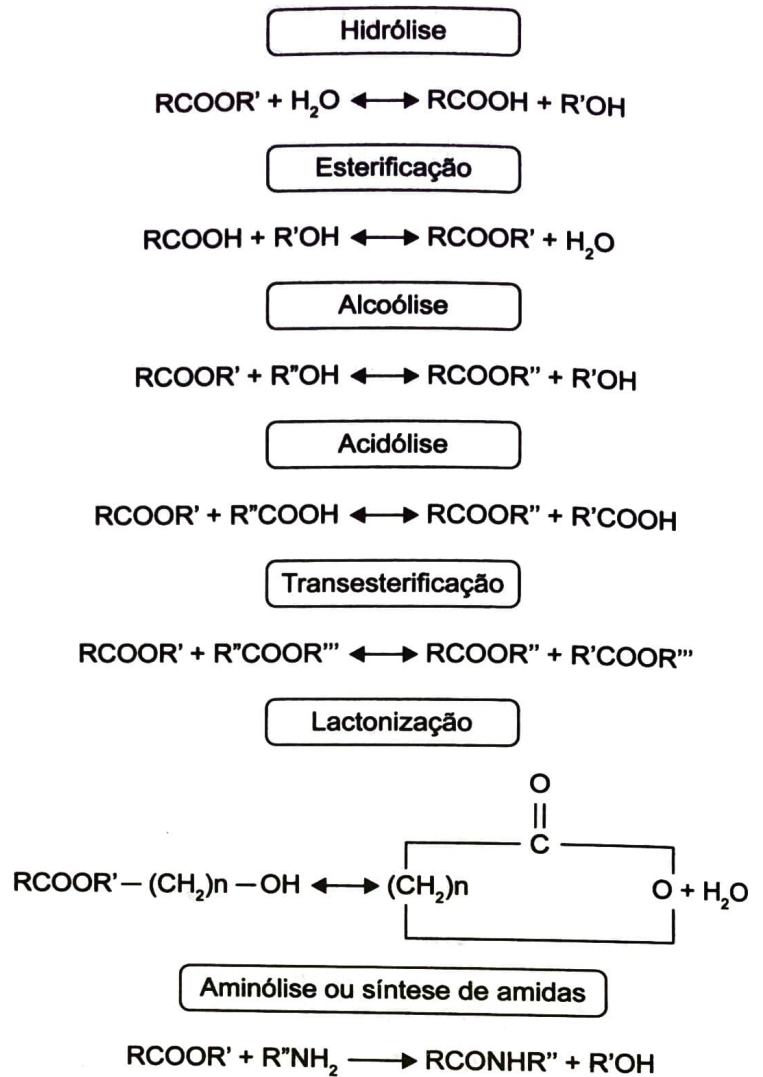


Figura 4.2 Reações catalisadas por lipases.

Lipases são serina-hidrolases cujo sítio ativo se localiza dentro de uma cavidade hidrofóbica onde se aloja o ácido graxo de modo a posicionar a ligação éster alinhada com a região catalítica.

monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos. Independentemente de diferenças na massa molecular, na seletividade de substratos, na resposta a ativadores e inibidores etc., a grande maioria das lipases apresenta estrutura similar, conhecida como “dobra α/β de hidrolase” (α/β *hydrolase-fold*), que é composta por diversas estruturas β -pregueadas paralelas e antiparalelas, separadas por trechos de α -hélices, com peptídeos helicoidais cobrindo parte de sua superfície. Diferentes graus de homologia na estrutura primária são encontrados em lipases; entretanto, uma sequência é excepcionalmente bem conservada: o pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly. O grau de conservação dessa sequência e a perda de atividade de lipases que têm o resíduo de serina modificado ou suprimido são fortes indicadores de que esse trecho esteja localizado

Lipases apresentam três determinantes estruturais-chave: tampa, cavidade de ligação e orifício de oxidação. A tampa é considerada a causa da sua atividade na região de interface hidrofóbico-hidrofílica, mas pode responder a outros estímulos externos, como temperatura.

no sítio catalítico dessas enzimas. Além de glicina e serina, estão presentes, em muitos casos, no sítio catalítico das lipases, resíduos de histidina e de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico. Lipases apresentam ainda três determinantes estruturais-chave: tampa, cavidade de ligação e orifício de oxidação.

A tampa está presente na grande maioria das lipases e já foi considerada a principal diferença entre lipases e esterases. No entanto, sabe-se atualmente que há lipases (especialmente de origem animal) que não apresentam tampa e esterases que apresentam tampa, embora estas sejam, geralmente, pequenas, quando comparadas às tampas das lipases. A tampa é formada por uma ou mais α -hélices, gerando uma estrutura móvel, que isola o sítio catalítico e regiões mais hidrofóbicas da enzima do meio hidrofílico exterior. A tampa das lipases é considerada a causa da sua atividade na região de interface entre ambientes hidrofóbico e hidrofílico. A forma fechada da enzima, que predomina no ambiente hidrofílico, apresenta baixa atividade catalítica. Quando atinge uma região de contato com a interface hidrofóbica, a tampa se abre através de alterações de conformação na estrutura tridimensional da proteína, possibilitando acesso ao sítio catalítico e a atividade hidrolítica pode ser percebida. A tampa pode ainda apresentar outras funções. Na lipase A de *Candida antarctica*, a tampa não responde à tensão superficial na interface óleo/água, mas a mudanças na temperatura, o que garante seu comportamento psicrófilo. À medida que a temperatura aumenta, a tampa tende a passar da configuração aberta para a fechada.

O grau de hidrofobicidade da cavidade de ligação determina a especificidade da lipase, bem como a capacidade de realizar reações de esterificação.

A cavidade de ligação pode apresentar diferentes graus de hidrofobicidade e diferentes conformações tridimensionais. A literatura atualmente divide as lipases em três grupos, de acordo com a forma dessa cavidade: (1) em forma de fenda, localizada na superfície da estrutura proteica e apresentando alta hidrofobicidade (característica das lipases de *Rhizopus* e *Rhizomucor*); (2) em forma de funil (encontrada nas lipases de *C. antarctica*) e (3) em forma de túnel (característica da lipase *cis-9*-específica de *Geotrichum candidum*). O grau de hidrofobicidade dessa cavidade determina a especificidade

Os aminoácidos do orifício do oxianion são responsáveis por fazer ligações de hidrogênio com o oxigênio do composto intermediário da reação, de modo a permitir a liberação dos produtos.

Lipases apresentam até quatro pontes dissulfeto, diretamente relacionadas com sua termoestabilidade.

Lipases são classificadas em não específicas ou 1(3)-específicas, conforme sua regiosseletividade. Apresentam ainda seletividade de substrato, de acordo com o tamanho e o grau de instauração dos ácidos graxos e enantioseletividade, reagindo mais rapidamente com um enantiômero que com os outros.

da lipase, além da capacidade de realizar reações de esterificação. Cavidades mais hidrofóbicas garantem melhor estabilidade de ligação com os substratos em ambientes não aquosos, favorecendo a ocorrência de reações inversas à hidrólise.

O orifício de oxianion é uma região da enzima indispensável à realização da hidrólise. Durante a liberação da ligação éster é formado um intermediário negativamente carregado, cujo oxigênio precisa ser estabilizado para dar continuidade à liberação dos produtos. Os aminoácidos do orifício do oxianion são responsáveis por fazer ligações de hidrogênio com esse oxigênio, de modo a permitir a sequência da reação. Pelo menos um dos resíduos do orifício está sempre localizado próximo ao resíduo de serina do sítio ativo, fazendo parte do pentapeptídeo conservado dessa região da enzima.

Além dessas características estruturais, lipases são enzimas ricas em cisteína, apresentando de uma até quatro pontes dissulfeto em sua estrutura, diretamente relacionadas com sua estabilidade conformacional e com a termoestabilidade característica de algumas lipases.

Classificação

As lipases são, em geral, classificadas de acordo com o tipo de especificidade que apresentam: *regiosseletividade*, *seletividade de substrato* e *enantioseletividade*.

Regiosseletividade. É a propriedade de reconhecer a mesma ligação química em diferentes regiões do substrato e reagir apenas com algumas delas.

- Lipases 1(3)-específicas: hidrolisam apenas ésteres primários, isto é, nas posições 1(3) do triacilglicerol. A maior parte das lipases pertence a essa categoria. Essas lipases são capazes de promover a hidrólise total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, pois 2-monoacilgliceróis tendem a sofrer isomerização e o ácido graxo migra espontaneamente para as posições 1 ou 3, permitindo a hidrólise
- Lipases não específicas: hidrolisam igualmente ligações éster nas posições 1(3) e 2 do triacilglicerol (ésteres

primários e secundários); não são conhecidas lipases 2-específicas, embora a lipase A de *Candida antarctica* hidrolise essa posição ligeiramente mais rápido que as outras.

Seletividade de substrato. Propriedade de reconhecer um tipo de ácido graxo e hidrolisar as ligações nas quais ele está envolvido com exclusividade ou com maior rapidez.

- Em relação ao tamanho da cadeia carbônica: ácidos graxos de cadeia curta (até 10 carbonos), média (de 12 e 14 carbonos), longa (acima de 16 carbonos) ou muito longa (acima de 22 carbonos)
- Em relação ao grau de insaturação do ácido graxo: saturado, mono-, di- ou poli-insaturado. Muitas vezes, a localização da(s) insaturação(ões) também determina a atividade de uma lipase sobre um substrato
- Algumas lipases apresentam seletividade negativa, hidrolisando ligações éster envolvendo todos os ácidos graxos exceto alguns. Em geral, ácidos graxos poli-insaturados como EPA, DHA e o ácido γ -linolênico não são reconhecidos por diversas lipases.

Enantioseletividade. Propriedade de reagir com um determinado isômero do substrato exclusivamente ou mais rapidamente do que com outros isômeros da mesma substância.

A maioria das enzimas apresenta algum grau de enantioseletividade, embora em lipases essa característica seja, geralmente, bastante variada. Quando a reação catalisada por lipases gera maiores concentrações de um enantiômero do que de outro, essa maior concentração é designada como “excesso enantiomérico”.

Na Tabela 4.1 estão relacionadas algumas lipases e suas seletividades.

Fontes e principais características

As lipases são produzidas por virtualmente todos os seres vivos, podendo ser encontradas em células e secreções de animais, vegetais e de diferentes microrganismos (bactérias,

Tabela 4.1 Seletividade de lipases de diferentes fontes.

Fonte da lipase	Seletividade de substrato	Regiosseletividade
Pancreática	C>M,L	1,3
Pré-gástrica	C,M>>L	1,3
<i>Aspergillus niger</i>	C,M,L	1,3>>2
<i>Candida lipolytica</i>	C,M,L	1,3>2
<i>Humicola lanuginosa</i>	C,M,L	1,3>>2
<i>Mucor javanicus</i>	M,L>>L	1,3>2
<i>Rhizomucor miehei</i>	C>M,L	1>3>>2
<i>Penicillium roquefortii</i>	C,M>>L	1,3
<i>Rhizopus delemar</i>	M,L>>C	1,3>>2
<i>Rhizopus javanicus</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Rhizopus niveus</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Rhizopus oryzae</i>	M,L>C	1,3>>>2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Pseudomonas sp.</i>	C,M,L	1,3>2
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C,M>L	1,3

C: ácidos graxos de cadeia curta; M: cadeia média; L: cadeia longa. Reproduzida de Xu, 2000.

Lipases são produzidas por todos os seres vivos, podendo ser encontradas em células e secreções de animais, vegetais e microrganismos.

As lipases mais estudadas são as de mamíferos, mas, do ponto de vista industrial, as lipases microbianas são mais interessantes, pois apresentam maior facilidade de produção em larga escala. Devido à enorme variedade de microrganismos existentes, há também uma grande gama de lipases com características diferenciadas de atuação.

fungos e leveduras). Embora as lipases mais estudadas até hoje sejam as lipases pancreáticas humana e de outros mamíferos, do ponto de vista industrial, as lipases microbianas são bem mais interessantes, pois permitem produção em maior escala e podem ser expressas mais facilmente, via clonagem, em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação. Além disso, devido à enorme variedade de microrganismos existentes, há também uma grande gama de lipases com características diferenciadas de atuação. Há ainda a possibilidade de se induzir a produção de lipases em alguns microrganismos, de acordo com a composição do meio fermentativo. Em geral, a produção de lipases é inibida na presença de açúcares simples (glicose, frutose) ou glicerol e é estimulada por meios contendo ácidos graxos livres, óleos e gorduras ou açúcares mais complexos (polissacarídeos).

Nos animais superiores as lipases estão relacionadas sobretudo à digestão de lipídeos ingeridos na dieta e à

Entre as lipases animais, a pancreática é a mais importante, sendo uma lipase 1(3)-específica com preferência por ácidos graxos de cadeia curta. As lipases vegetais são mais abundantes em sementes oleaginosas e pouco comercializadas.

mobilização dos tecidos adiposos de reserva. A lipase pancreática, produzida pelo pâncreas e introduzida no duodeno durante o processo digestivo, é a mais importante; no entanto, outras lipases – gástrica, lingual (além de outras lipases orais) e lipase ativada pela bile – podem ser responsáveis pela digestão de até 50% dos lipídeos da dieta. Alguns lipídeos, como os glóbulos de gordura presentes no leite não homogeneizado, dependem da ação combinada dessas várias lipases para serem efetivamente digeridos.

Em vegetais, as lipases são mais abundantes em sementes oleaginosas, sendo importantes durante o processo de germinação, mas estão presentes em vários outros tecidos, sendo encontradas, por exemplo, no látex do mamoeiro.

Lipases são ainda produzidas por uma grande quantidade de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), estando envolvidas em seu processo de aquisição de energia. Atualmente, apenas lipases de origem animal ou microbiana têm aplicação industrial, sendo estas últimas predominantes no mercado.

Cutinases são esterases semelhantes a lipases, capazes de hidrolisar ligações éster envolvendo substratos de altíssima massa molecular e também substratos solúveis em água.

Cutinases são esterases semelhantes a lipases em sua estrutura e modo de ação. No entanto, em virtude da ausência da “tampa” em sua estrutura, cutinases são capazes de hidrolisar ligações éster envolvendo substratos de altíssima massa molecular, como o polímero de cutina, que é seu substrato natural, e outros poliésteres sintéticos, incluindo polietileno tereftalato (PET) e policaprolactona. Além disso, cutinases também são capazes de hidrolisar ligações éster em substratos solúveis em água, incluindo ligações envolvendo ácidos graxos de baixa massa, uma vez que na ausência de tampa, não dependem de tensão superficial para serem ativadas. Adicionalmente, já foi comprovado que essas enzimas também são capazes de catalisar as reações inversas à hidrólise, em ambientes com baixa atividade de água, de forma semelhante a lipases e esterases. Ainda não são conhecidas cutinases comerciais, mas elas são produzidas por diversos microrganismos, fungos filamentosos e bactérias, fitopatogênicos e saprófitas e vêm despertando grande interesse de pesquisadores.

Lipases animais

A lipase pancreática suína é a lipase de uso comercial mais estudada. Trata-se de uma enzima 1(3)-específica com preferência por ácidos graxos de cadeia curta. Tem pH ótimo de atuação entre 7,0 e 9,0 (característico do intestino) e é fortemente ativada na presença de NaCl. A maior parte das lipases pancreáticas apresenta ainda atividade de fosfolipase A1 (ver, adiante, Figura 4.8); uma exceção é a lipase pancreática humana.

Lipases microbianas

► Origem fúngica

Candida antarctica foi isolada do lago Vanda, na Antártica, de alta salinidade e eternamente coberto por gelo. Essa levedura é capaz de produzir duas isoformas de lipase, chamadas A e B (ou CaL A e CaL B), de vasta aplicação industrial. A Tabela 4.2 apresenta algumas características das duas isoformas.

CaL A é uma enzima extremamente termoestável, com atividade ótima acima de 70°C e capaz de funcionar a 90°C por várias horas, sem perda significativa de atividade. Essa característica fez com que as primeiras aplicações industriais dessa enzima fossem voltadas para hidrólises em alta temperatura, envolvendo ceras com alto ponto de fusão nas indústrias têxtil e de papel. Essa é a única lipase conhecida com maior afinidade pela posição 2 (dois) do que por ésteres

.....
 Importantes lipases comerciais inespecíficas são produzidos por leveduras do gênero *Candida*. A espécie *C. antarctica* secreta duas isoformas, uma altamente termoestável (CaL A) e outra com atividade em baixa temperatura e excelente atividade de síntese (CaL B).

Tabela 4.2 Comparação entre CaL A e CaL B.

Característica	CaL A	CaL B
Massa molecular (kDa)	45	33
Ponto isoelétrico (pI)	7,5	6,0
pH ótimo	7,0	7,0
Atividade específica (U/mg)	420	435
Termoestabilidade a 70°C	100	15
Estabilidade ao pH	6,0 a 9,0	7,0 a 10,0
Ativação na interface	Sim (baixa)	Não

Adaptada de Kirk; Christensen, 2002.

primários no esqueleto de glicerol. No entanto, por não apresentar essa mesma seletividade para reações de síntese, a CaL A foi classificada como lipase não específica. Além dessa característica pouco usual com relação à regioseletividade, a CaL A apresenta outras características únicas, como marcada seletividade por ácidos graxos trans-insaturados, tanto para hidrólise quanto para síntese. Por fim, a CaL A apresenta ainda a capacidade, pouco distribuída entre as lipases, de reagir com substratos volumosos, como esteróis e alcoóis terciários, apresentando alta estereosseletividade, gerando excesso enantiomérico superior a 70% e, muitas vezes, com alto rendimento.

CaL B é uma enzima pouco termoestável em meio aquoso, apresentando perda significativa de atividade em temperaturas superiores a 40°C. No entanto, apresenta alta atividade e enantioseletividade para reações de síntese e é mais termorresistente em meio orgânico, suportando temperaturas até 70°C, especialmente nas formas comerciais imobilizadas. É uma lipase não específica, com alta atividade para as reações inversas à hidrólise e está disponível em formas de alta pureza para aplicações em química fina (resolução de racematos) comercializadas por diferentes empresas (Novozymes 432®, pela Novozymes, Chyrazy-me L2®, pela Roche, CalB immo Plus®, pela Purolite, por exemplo).

Outras espécies do gênero *Candida* (*C. cylindracea* e *C. rugosa*) também são boas produtoras de lipases inespecíficas. *C. rugosa* produz uma lipase com seletividade pelo ácido ricinoleico, sendo especialmente interessante na transformação de óleo de mamona.

Entre os fungos filamentosos, os gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor* e *Aspergillus* são produtores de lipases 1(3)-específicas, geralmente com preferência por ácidos graxos de até 12 carbonos. Dentre estes, o fungo *Rhizomucor miehei* é o de maior aplicação industrial. Sua lipase foi descrita em 1973, com massa molecular de 31,6 kDa e ponto isoelétrico de 3,8. Em 1977, foi publicado o primeiro trabalho (Moskowitz *et al.*) com sugestão de sua aplicação em alimentos, verificando

Fungos filamentosos são bons produtores de lipases 1(3)-específicas. As espécies mais utilizadas comercialmente são *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus*.

sua capacidade de hidrolisar gorduras animais e óleos vegetais e os efeitos benéficos dessa hidrólise na melhoria do aroma de alguns produtos alimentícios. Atualmente essa lipase é comercializada na forma livre ou imobilizada em resina e apresenta aplicações tanto em hidrólise quanto em síntese. Também disponível comercialmente, na forma livre ou imobilizada, sob o nome comercial de Lipozyme® ou Lipolase® é a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, um fungo filamentosso termofílico.

Uma lipase fúngica de considerável interesse é a produzida por *Geotrichum candidum*. Essa enzima é conhecida como lipase *cis*-9-ácido graxo específica e apresenta grande seletividade por ácidos graxos contendo uma insaturação entre os carbonos 9 e 10, como os ácidos oleico e linoleico, por exemplo.

► Origem bacteriana

Embora seja bem conhecida a produção de lipases por bactérias, até recentemente não havia lipases bacterianas disponíveis comercialmente. No entanto, diversos autores acreditam que as enzimas de origem bacteriana sejam melhor adaptadas para as condições desejadas em transformações industriais.

Diversos gêneros de bactérias já foram estudados por produzirem lipases – extracelulares, ligadas a membranas ou intracelulares. Alguns exemplos estão apresentados na Tabela 4.3. Entre as espécies produtoras de lipases comerciais as mais importantes são apresentadas a seguir:

- *Burkholderia cepacia* (antes *Pseudomonas cepacia*). Sua lipase extracelular está disponível em sua forma livre e imobilizada em diferentes suportes (diatomito e cerâmica), comercializada pela empresa japonesa Amano. Trata-se de uma lipase não específica com pH ótimo de 7,0 e temperatura ótima de 50°C, mantendo a maior parte de sua atividade em temperaturas de até 75°C, e massa molecular de cerca de 33 kDa
- *Pseudomonas fluorescens*. Lipase alcalina, com pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima de 55°C.

.....
Lipases de origem bacteriana são produzidas por espécies dos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*. Este último, produtor de lipases alcalinas com aplicação em detergentes.

Tabela 4.3 Características de algumas lipases bacterianas.

Linagem	Massa molecular (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>Burkholderia ubonensis</i>	33	8,5	65
<i>Enterococcus faecium</i>	19	10,8	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	8,0	45
<i>Bacillus stratosphericus</i>	19	9,0	35
<i>Streptomyces lividans</i>	31	8,0	50
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	23	10	40
<i>Bacillus pumilus</i>	27	8,0	45
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	50	9,0	65
<i>Yersinia enterocolitica</i>	34	9,0	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	9,0 a 10,0	40
<i>Colwellia psychrerythraea</i>	34	7,0	25
<i>Bacillus pumilus</i>	62	6,0	60
<i>Acinetobacter baylyi</i>	30	8,0	60
<i>Spirulina platensis</i>	45	6,5	45
<i>Pseudomonas gessardii</i>	92	5,0	30

Javed *et al.*, 2018.

Lipases vegetais

Não são comercializadas lipases vegetais de aplicação industrial, no entanto, diversos tecidos vegetais são produtores de lipases e há uma vasta literatura científica disponível a respeito do assunto. As fontes mais comumente estudadas são sementes, especialmente as oleaginosas. A maior parte das sementes apresenta atividade de lipase, mesmo em estado dormente, porém, em algumas espécies, como o milho, por exemplo, a atividade na semente dormente é bastante reduzida, próxima de zero, mas aumenta gradativamente ao longo do período de germinação. A maior parte das lipases de sementes apresenta pH ótimo na faixa entre neutro e alcalino. No entanto, são conhecidas exceções, como a lipase de semente de mamona, que tem pH ótimo em 4,5. Lipases vegetais geralmente apresentam temperatura ótima entre 30 e 50°C, mas também são conhecidas exceções, como as isoformas produzidas pela aveia, que apresentam ótima atividade em temperatura entre 65 e 75°C e a lipase de arroz, com temperatura ótima de 80°C. A maior parte das lipases de sementes é inespecífica, porém as lipases de semente de

.....
 Não são comercializadas lipases vegetais de aplicação industrial, mas a maior parte das sementes apresenta atividade de lipase, mesmo quando em dormência.

mamona e de tremoços apresentam maior afinidade pelas posições 1 e 2 do esqueleto de glicerol. A principal exceção é a lipase de coco, que é 1(3)-específica.

Importância em alimentos | Rancidez hidrolítica

Rancidez hidrolítica ocorre quando, por ação de lipases sobre os triacilgliceróis dos alimentos, são gerados ácidos graxos livres. Se estes são de baixa massa molecular, eles são voláteis e causam aroma desagradável no produto. Os produtos mais afetados são os laticínios, mas grãos e seus derivados também podem sofrer deterioração pelo ranço hidrolítico. Em óleos, a alta acidez é considerada um problema grave de qualidade.

As lipases são responsáveis por um tipo de deterioração dos alimentos, conhecido como “rancidez hidrolítica”. Esse processo consiste na hidrólise de triacilgliceróis presentes no alimento com a formação de ácidos graxos livres. Quando voláteis, os ácidos graxos liberados geram odor desagradável, de ranço. A rancidez hidrolítica é mais comum em laticínios, uma vez que o leite possui lipases nativas e sua gordura apresenta quantidade considerável dos ácidos butírico (4:0), caproico (6:0) e caprílico (8:0), que são ácidos graxos de baixa massa molecular, portanto voláteis, e com odor considerado desagradável. No entanto, produtos de origem vegetal, como óleos, grãos, farinhas e farelos também podem se deteriorar em virtude da presença de lipases, naturais da matéria-prima ou provenientes de microrganismos contaminantes. Nesses casos, em geral, por apresentarem em sua composição ácidos graxos de alta massa, não voláteis, o aroma de ranço não é percebido. No entanto, a presença de altos teores de ácidos graxos livres nesses produtos, normalmente designada como alta acidez, é considerada bastante indesejável. Ácidos graxos livres tendem a ser mais suscetíveis à oxidação, acelerando o processo de peroxidação lipídica. Além disso, óleos de alta acidez apresentam menores pontos de fumaça, faísca e combustão, oferecendo risco de ignição quando aquecidos por tempo prolongado. Para evitar a ocorrência desse tipo de deterioração é necessária uma operação de branqueamento para inativação térmica das lipases responsáveis pela rancidez hidrolítica.

Vale lembrar que é possível a ocorrência de rancidez hidrolítica na ausência de lipases. Para tanto, óleos e gorduras precisam ser aquecidos em altas temperaturas, por longo tempo e na presença de água. Esse processo é comum em óleo utilizado para fritura, que atinge temperaturas superiores a 150°C e recebe água do alimento que está sendo frito.

Aplicação industrial

Panificação

A introdução regular de lipases em massa de pão se iniciou por volta dos anos 1990, com as agora chamadas lipases de primeira geração. Essas enzimas eram lipases 1(3)-específicas utilizadas para hidrólise dos triacilgliceróis da massa liberando acilgliceróis parciais (mono- e diacilgliceróis), com propriedades emulsificantes (devido à presença de uma fração polar e uma apolar na molécula).

A presença de emulsificantes promove o aumento da capacidade de retenção de ar da massa, gerando um produto com melhor textura (mais fofo), de miolo mais branco e com maior volume. Além disso, há também aumento da capacidade de retenção de água na massa, o que retarda a sinérese, prolongando a vida de comercialização do pão. Uma vantagem adicional é a possibilidade de maior conservação da massa, uma vez que certos acilgliceróis parciais apresentam atividade antimicrobiana, especialmente os contendo ácidos graxos de cadeia média.

Há indícios de que a formação de ácidos graxos livres na massa favoreça a interação da amilose com esses lipídeos, retardando a retrogradação. Acredita-se, ainda, que esses mesmos ácidos graxos sejam substrato para lipo-oxigenases, naturais da farinha ou adicionadas, em um processo que melhora as características do glúten (ver Capítulo 5, *Oxidoredutases*). Esses últimos benefícios da adição de enzimas não são alcançados quando sua atividade é substituída pela adição de emulsificantes já prontos.

Melhores resultados foram obtidos com as lipases de segunda geração, acrescidas de fosfolipases, capazes de gerar lisofosfolipídeos (ver adiante Surfactantes não iônicos no tópico “Produção de outros ingredientes”) na massa, com poder de emulsificação bastante superior. Mais recentemente, as lipases de terceira geração foram desenvolvidas para evitar a liberação de ácidos graxos de cadeia curta, o que diminui a formação de aroma de ranço ao longo do armazenamento, especialmente em produtos com adição de lipídeos do leite. Além disso, essas enzimas são mais

Lipases de 1ª geração são utilizadas para hidrolisar os triacilgliceróis da massa, gerando acilgliceróis parciais com atividade emulsificante. A 2ª geração dessas enzimas apresenta atividade de fosfolipase, com poder de gerar emulsificantes melhores. A 3ª geração é ainda negativamente seletiva para ácidos graxos de cadeia curta, evitando a geração de aroma de ranço.

bem adaptadas a processos acelerados de fermentação e a equipamentos de mistura de alta velocidade.

A adição de emulsificantes à massa permite ainda a redução significativa da quantidade de lipídeos da formulação, garantindo a fabricação de pães *light*. Estudos demonstraram que as mesmas características de produto final podem ser alcançadas por uma formulação com 4% de lipídeos ou com 1% de lipídeos e 0,3% de emulsificante (no caso do estudo, lecitina de soja), uma redução de 75% desse ingrediente. O mesmo efeito pode ser alcançado pela adição de lipases, com o diferencial de que as enzimas produzem os emulsificantes a partir do lipídeos presentes na massa.

Produção de óleos e gorduras estruturados

Óleos e gorduras estruturados são produtos que contêm triacilgliceróis sintetizados artificialmente com o objetivo de alterar as concentrações relativas de seus ácidos graxos constituintes assim como a posição, no esqueleto de glicerol, que cada grupo acil ocupa. Esse tipo de produto apresenta vantagens dos pontos de vista funcional e/ou nutricional sobre os óleos e gorduras naturais. A obtenção de triacilgliceróis estruturados é feita por meio de interesterificação química ou enzimática entre dois diferentes óleos ou entre óleo e ácidos graxos na forma livre ou etilada (ésteres de etila). A síntese química, embora seja uma tecnologia há muito dominada pela indústria, apresenta várias desvantagens em relação ao processo enzimático: obtenção de produtos inspecíficos, uso de altas temperatura e pressão – o que gera subprodutos de cor escura e odor indesejado de queimado e implica várias etapas de purificação subsequentes. O uso de enzimas 1(3)-específicas garante a obtenção de produtos específicos, de acordo com os substratos utilizados, o que vem a ser de grande importância na aplicação funcional e nutricional dos triacilgliceróis estruturados.

► Uso nutricional

Estudos sobre a absorção de ácidos graxos pelo intestino humano levaram à conclusão de que ácidos graxos de cadeia longa são mais prontamente absorvidos quando na forma

.....
Óleos e gorduras estruturados são sintetizados artificialmente com composição de ácidos graxos e localização no glicerol previamente determinadas. Apresentam vantagens dos pontos de vista nutricional e tecnológico.

de 2-monoacilgliceróis. Uma vez que a lipase pancreática humana é uma lipase 1,3-específica, equivalentes de gordura do leite humano (ricos em ácido palmítico) e óleos com fins terapêuticos devem ser sintetizados de modo a conter esses ácidos graxos na posição 2 do triacilglicerol e grupos acil de cadeia média ou curta ou insaturada (mais facilmente absorvidos na forma livre) nas posições 1 e 3. Estudos mais recentes vêm desvendando que ácidos graxos de cadeia muito longa, como o ácido behênico (22:0), são muito pouco absorvidos no intestino, independentemente da sua posição no esqueleto de glicerol, e que ácidos graxos de cadeia muito curta fornecem menos calorias do que os ácidos graxos mais comumente encontrados em óleos e gorduras naturais (ácido acético = 3,5 kcal/g; ácido propiônico = 5,0 kcal/g e ácido butírico = 6,0 kcal/g, em contraste com os demais ácidos graxos, que fornecem 9,0 kcal/g). Além disso, avaliações sobre o metabolismo de 1,3-diacilgliceróis demonstraram que, embora facilmente hidrolisados e absorvidos no intestino, esses lipídeos são muito mais lentamente metabolizados após absorção pelas células – na ausência de ácidos graxos ligados à posição 2, a ressíntese de triacilgliceróis depende da via metabólica do glicerol-3-fosfato para formação do quilomícron – o que reduz a eficiência no armazenamento dos lipídeos ingeridos na dieta e vem apresentando efeito significativo na redução do acúmulo de gordura em ratos e humanos.

Com base nesses conhecimentos, diversos produtos vêm sendo desenvolvidos, e alguns já estão disponíveis nos mercados de certos países, com a finalidade de garantir lipídeos com características nutricionais desejadas.

Substitutos da gordura do leite humano. As chamadas fórmulas infantis são produtos que visam substituir o leite humano quando a amamentação não é possível, por uma variedade de motivos. Esses produtos, muitas vezes denominados “leites maternizados”, pretendem mimetizar a composição e a estrutura do leite humano para fornecer a melhor alimentação possível para o lactente. No entanto, até muito pouco tempo atrás, os lipídeos constituintes desse tipo de fórmula eram provenientes do leite de ruminantes (bovinos

Ácidos graxos saturados de cadeia longa são mais bem absorvidos na forma de 2-monoacilgliceróis; ácidos graxos de cadeia muito longa não são eficientemente absorvidos pelo intestino; ácidos graxos de cadeia muito curta são menos calóricos, assim como 1,3-diacilgliceróis.

Lipídeos para “leites maternizados” devem apresentar ácido palmítico na posição sn-2 e ácidos graxos insaturados nas posições sn-1 e 3. Esse tipo de lipídeo estruturado pode ser obtido por ação de lipases 1(3)-específicas sobre gorduras ricas em ácido palmítico.

e ovinos) ou de óleos e gorduras vegetais. Além de apresentar composição em ácidos graxos distinta daquela do leite humano – particularmente rico em ácido oleico (18:1 – 30 a 35%) e palmítico (16:0 – 20 a 30%), em adição a pequenas porém importantes quantidades de ácidos araquidônico (20:4 ω 6), EPA (20:5 ω 3) e DHA (22:6 ω 3) (concentração total de cerca de 1%) – a posição desses ácidos graxos no esqueleto de glicerol é totalmente diferente. No leite humano, o ácido oleico tende a aparecer muito mais frequentemente nas posições 1 e 3, enquanto o ácido palmítico se encontra majoritariamente na posição 2. Quando é hidrolisado no intestino (pela lipase pancreática, 1(3)-específica), esse triacilglicerol gera ácidos oleicos livres, rapidamente absorvidos, e 2-monopalmitoil-glicerol, também absorvido eficientemente pelo intestino do lactente. Caso a estrutura nos triacilgliceróis não seja essa, é liberado ácido palmítico, que, na forma livre, forma sais (sabões) com os íons de cálcio presentes no leite, gerando precipitados, que impedem a absorção tanto do ácido graxo quanto do mineral e ainda provocam constipação intestinal no lactente. Assim, os lipídeos estruturados com a finalidade de substituir a gordura do leite humano em fórmulas infantis devem ser compostos majoritariamente de 1,3-dioleil-2-palmitoil-glicerol (OPO), sendo a incorporação de DHA e de EPA nas posições 1(3) também altamente desejável.

Obter esse tipo de produto é possível mediante ação de lipases 1(3)-específicas. Deve-se partir de uma matéria-prima com triacilgliceróis ricos em ácido palmítico – que vão ter alta probabilidade de apresentarem esse ácido graxo na posição 2. A palmitina, gordura vegetal obtida da amêndoa do dendê, é uma matéria-prima de baixo custo e de excelente composição para esse tipo de reação, mas outras gorduras vegetais e animais também podem ser utilizadas, respeitadas as limitações religiosas ou éticas do público-alvo. A essa gordura pode-se misturar ácido oleico livre; oleato de etila ou ainda um óleo rico em ácido oleico, como o azeite de oliva, o óleo de amendoim, o óleo de semente de uva ou o azeite de abacate. Quanto mais puras as matérias-primas (p. ex., tripalmitina + ácido

oleico), maior o rendimento no triacilglicerol desejado, porém, maior o custo do processo. A lipase 1(3)-específica deverá, então, substituir os ácidos graxos das posições 1 e 3 do esqueleto do glicerol por ácido oleico, gerando o triacilglicerol desejado (Figura 4.3). Resíduos de ácidos graxos livres devem ser removidos por destilação e resíduos de triacilgliceróis muito ricos em ácido palmítico devem ser removidos por resfriamento e filtração (*winterização*), o que é possível graças ao seu maior ponto de fusão em relação aos triacilgliceróis enriquecidos em ácidos graxos insaturados. Para maior rendimento, processos em duas etapas já foram propostos: primeiro uma etapa de etanólise promove a formação de 2-palmitoil-glicerol a partir da gordura de origem e esse monoacilglicerol reage, então, com ácido oleico livre ou oleato de etila para geração do triacilglicerol desejado. A primeira marca desse tipo de lipídeo estruturado no mercado foi a Betapol[®], do grupo holandês Bunge/Loders Croklaan, porém atualmente outras marcas com o mesmo tipo de ingrediente já estão disponíveis, como a INFALAC[®], da australiana GrainCorp.

Lipídeos com baixo valor energético. Esse tipo de produto vem sendo desenvolvido recentemente, como uma tentativa de fornecer produtos de menor valor calórico, capazes de auxiliar na redução da obesidade e de várias disfunções associadas a esse tipo de problema (diabetes tipo II, dislipidemias,

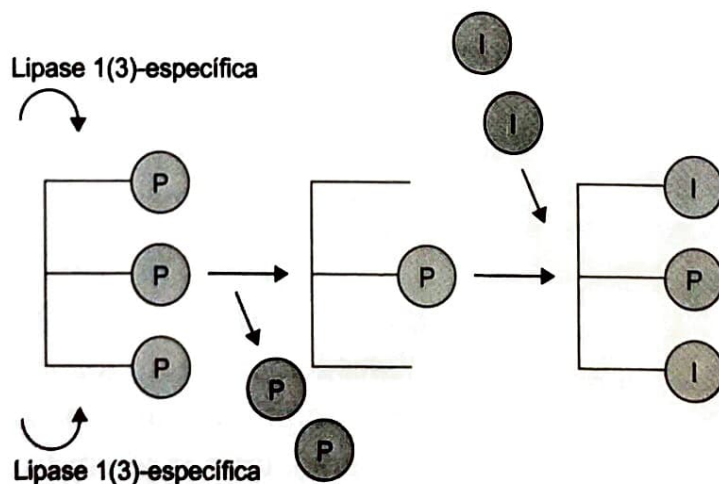


Figura 4.3 Representação da obtenção de triacilgliceróis desejados para substitutos da gordura do leite humano. P = ácido palmítico; I = ácido graxo insaturado (ácidos oleico, araquidônico, DHA ou EPA).

Lipídeos sintéticos contendo ácidos graxos de cadeia média – menos prontamente armazenados – e ácidos graxos essenciais podem ser obtidos por interesterificação enzimática entre o óleo de soja e a gordura de coco.

síndrome metabólica, entre outros). Algumas alternativas se encontram disponíveis no mercado.

► Triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeias média e longa. A maior parte dos óleos e gorduras alimentares é rica em ácidos graxos de cadeia longa (acima de 16 carbonos), cujo metabolismo é lento e que têm a tendência a serem preferencialmente armazenados no tecido adiposo. Ácidos graxos de cadeia média são mais hidrofílicos e podem ser rapidamente metabolizados pelo fígado, uma vez que independem do transporte por via linfática. No entanto, a produção de lipídeos ricos apenas em ácidos graxos de cadeia média gera produtos deficientes em ácidos graxos essenciais, especialmente ácido linoleico (18:2 ω 6) e outros ácidos graxos poli-insaturados. Assim, os lipídeos estruturados enriquecidos em ácidos graxos de cadeia média para redução do teor calórico devem também apresentar uma quantidade de ácidos graxos essenciais de cadeia longa. Alguns produtos comerciais, obtidos por interesterificação, já estão disponíveis no Japão (Healthy Resseta[®], da Nisshin Oillio) e em outros países (Neobee[®] Stephan Co., nos EUA). Esses produtos são obtidos pela interesterificação enzimática, usando lipase não específica, de óleo de soja (como fonte de ácidos graxos essenciais) com gordura de coco ou palmitina de dendê (como fonte de ácidos graxos de cadeia média). Nesse caso, são formados triacilgliceróis de vários tipos (MLM, MML, LML e LLM). No entanto, acredita-se que o triacilglicerol do tipo MLM seja o que promova os melhores resultados, garantindo melhor absorção dos ácidos graxos essenciais. Atualmente não estão disponíveis no mercado produtos enriquecidos no triacilglicerol do tipo MLM, possivelmente porque esse produto dependa de um processo em duas etapas, com enzimas 1(3)-específicas, que torna o produto final menos economicamente interessante.

► Triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeias muito curta ou muito longa. Esses ácidos graxos fornecem valor energético reduzido ou por serem de muito baixa massa molecular (entre 2 e 4 carbonos), ou por serem muito pouco absorvidos pelo intestino (acima de 22 carbonos). Triacilgliceróis contendo misturas desses ácidos graxos formarão lipídeos com

valor calórico extremamente reduzido em relação a óleos e gorduras naturais. Atualmente, dois produtos comerciais (Benefat®, da Cultor, e Caprenin®, da Procter&Gamble) estão disponíveis nos EUA, porém ambos são obtidos por catálise química. Não são conhecidos produtos desse tipo obtidos por via enzimática, embora seja possível encontrar trabalhos científicos relatando processos bem-sucedidos com lipases comerciais (Kim; Akoh, 2015).

► **Diacilgliceróis.** De acordo com Lo *et al.* (2008), a produção de óleos ricos em diacilgliceróis (DAG) e o efeito benéfico de seu consumo na redução da deposição de gordura no tecido adiposo e na redução do peso corpóreo de uma forma geral já são conhecidos por pesquisadores japoneses desde 1999. Esse tipo de produto pode ser obtido por esterificação direta entre ácidos graxos e glicerol, por uma lipase 1(3)-específica, ou por glicerólise. Geralmente, uma ou mais etapas de purificação são necessárias para eliminação de ácidos graxos, glicerol e triacilgliceróis remanescentes, para obtenção de um produto final com alta concentração de DAG. Embora já estejam disponíveis diversos processos patenteados, são conhecidos poucos produtos comerciais, pois os efeitos benéficos e possíveis efeitos negativos da ingestão continuada desse tipo de produto ainda não estão totalmente esclarecidos. A comercialização de óleos contendo altos teores de DAG é mais comum no Japão, onde o produto Enova Oil® (Kao Corporation) está disponível.

► Uso tecnológico

Manteiga de cacau. A manteiga de cacau é constituída principalmente pelos seguintes triacilgliceróis: POP (15 a 20%), POS (35 a 40%) e SOS (25 a 30%) (P = ácido palmítico; O = ácido oleico; S = ácido esteárico), que juntos correspondem a de 75 a 90% da composição da gordura. Essa composição confere à manteiga de cacau uma faixa de fusão muito estreita, isto é: toda a gordura se liquefaz ao mesmo tempo e em uma faixa de temperatura entre 25 e 35°C (próxima à temperatura do corpo humano), propriedade muito rara entre as gorduras naturais e que garante ao produto formulado com essa manteiga a característica de “derreter na

Óleos ricos em diacilgliceróis podem ser obtidos por esterificação direta ou glicerólise, utilizando lipases 1(3)-específicas.

Substituintes da manteiga de cacau podem ser obtidos por reação mediada por lipases entre o azeite de oliva e os ácidos palmítico e esteárico.

boca”. No entanto, o fornecimento de manteiga de cacau no mercado internacional é muito instável e os preços muito variáveis. Foi então desenvolvido um processo enzimático para produção de substituintes da manteiga de cacau. Nesse processo parte-se de um óleo rico em triacilgliceróis que contenham ácido oleico na posição 2 (azeite de oliva, por exemplo) e promove-se a interesterificação desse óleo com os ácidos palmítico e esteárico, através de uma lipase 1(3)-específica. Desde a primeira patente desse processo, depositada pela Unilever em 1981, algumas alterações vêm sendo propostas para melhorar a composição final e o ponto de fusão do produto obtido, assim como para aumentar o rendimento e reduzir custos. As principais alternativas propostas estão na alteração da matéria-prima e do tipo de enzima (fonte biológica; empresa produtora; forma de imobilização e suporte).

Produção de margarina

As gorduras para uso na indústria de alimentos precisam apresentar ponto de fusão específico para suas diferentes aplicações. Esse comportamento pode ser traduzido pela proporção da gordura que estará sólida a uma dada temperatura. Para produtos de panificação, por exemplo, é desejável que a gordura usada tenha entre 38 e 45% de sólidos (*solid fat content* – SFC) a 15°C. Essa faixa geralmente não é alcançada por óleos e gorduras naturais. O óleo de girassol, por exemplo, tem 0% de SFC a 15°C, o óleo de palma tem 23,8%, enquanto o SFC da manteiga de cacau é superior a 50% e o da gordura de cupuaçu é superior a 70%, nessa mesma temperatura. Tradicionalmente, a tecnologia mais utilizada para aumentar o teor de ácidos graxos saturados e atingir o SFC desejado a partir de um óleo natural era a hidrogenação. Nesse processo, parte das insaturações presentes nos ácidos graxos do óleo é hidrogenada, gerando um produto com as características desejadas. No caso de margarinas para consumo doméstico, deseja-se uma gordura sólida em temperatura ambiente, porém com grau de insaturação suficiente para conferir cremosidade e boa espalhabilidade em temperatura de refrigeração. Entretanto, nesse processo,

.....
O uso de interesterificação enzimática entre um óleo e uma gordura possibilita a obtenção de margarinas livres de gorduras *trans*.

são formados ácidos graxos trans-insaturados, que foram associados, na década de 2000, ao aumento do risco de doenças coronarianas, em virtude do efeito da ingestão continuada nos níveis séricos de colesterol: aumentando a LDL (lipoproteína de baixa densidade) e reduzindo a HDL (lipoproteína de alta densidade). Além disso, resíduos dos catalisadores são inevitáveis no produto final, e esses metais também podem provocar danos à saúde do consumidor. Metodologia alternativa é a produção de margarina por interesterificação entre um óleo e uma gordura usando lipases como catalisadores. Assim, com a mistura de ácidos graxos saturados e insaturados nos triacilgliceróis resultantes, pode-se obter um produto com a textura desejada, sem o uso da hidrogenação. Um dos processos mais aplicados é a interesterificação entre a fração líquida e a sólida de gordura de dendê (palma). Um produto comercial disponível nos EUA, o NovaLipid® da ADM, é obtido da interesterificação de óleo de soja natural com óleo de soja totalmente hidrogenado e, portanto, livre de ácidos graxos trans-insaturados.

Produção de outros ingredientes

► Surfactantes não iônicos

Surfactantes são substâncias capazes de promover a mistura de componentes imiscíveis (como óleo e água) através da redução da tensão superficial e formação de micelas. Para que possam atuar como tensoativos, os emulsificantes devem ter uma parte de sua molécula com características polares (fração que fica em contato com a água) e uma parte apolar (que fica em contato com a gordura ou com o ar).

Surfactantes não iônicos como mono- e diacilgliceróis e ésteres de açúcar encontram extensa aplicação na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos, não apenas por sua eficiência como agentes tensoativos mas também por seu caráter atóxico e por sua ação como agentes conservantes. Sua produção por via química não é muito satisfatória, pois a presença de catalisadores alcalinos e a alta temperatura de reação provocam a formação de produtos secundários

.....
Surfactantes não iônicos
são agentes tensoativos com
propriedades conservantes em
alimentos e fármacos.

indesejados. Além do custoso processo de purificação, a produção desses surfactantes por via química apresenta baixo rendimento (entre 30 e 60%).

Mono- e diacilgliceróis (Figura 4.4). A produção por via enzimática de mono- e diacilgliceróis pode ser alcançada de diferentes formas:

- Por hidrólise parcial de triacilgliceróis usando-se lipases 1(3)-específicas – nesse caso, a maior dificuldade consiste em se evitar a hidrólise total, com liberação de ácidos graxos e glicerol
- Por esterificação do glicerol com ácidos graxos livres ou etilados
- Por glicerólise: reação entre triacilglicerol e glicerol.

Nos dois últimos casos são duas as dificuldades a serem contornadas: a eficiente homogeneização dos substratos e a remoção de água do meio reacional. Vários processos já foram propostos nesse sentido, alguns alcançando rendimentos de até 90% em monoacilgliceróis.

Ésteres de açúcar (Figura 4.5). Compostos por um mono ou dissacarídeo esterificado em 1, 2 ou 3 hidroxilas com ácidos graxos. Obtidos por síntese entre açúcares e ácidos graxos.

Lisolecitina (Figura 4.6). Produto obtido pela hidrólise da lecitina (remoção de um dos dois ácidos graxos da molécula) através do uso de fosfolipases (lipases específicas para fosfolipídeos). A lisolecitina possui maior fração polar que a lecitina, o que lhe proporciona maior capacidade emulsificante e maiores possibilidades de aplicação em alimentos e cosméticos. Adicionalmente, a lisolecitina é mais estável em altas temperaturas, em condições ácidas e na presença de sais. Mais recentemente alguns estudos vêm propondo

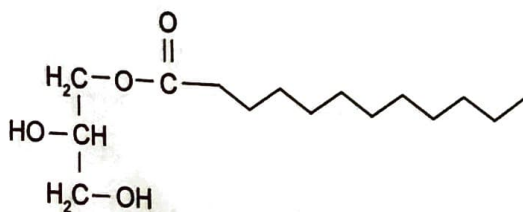


Figura 4.4 Estrutura de monolaurina.

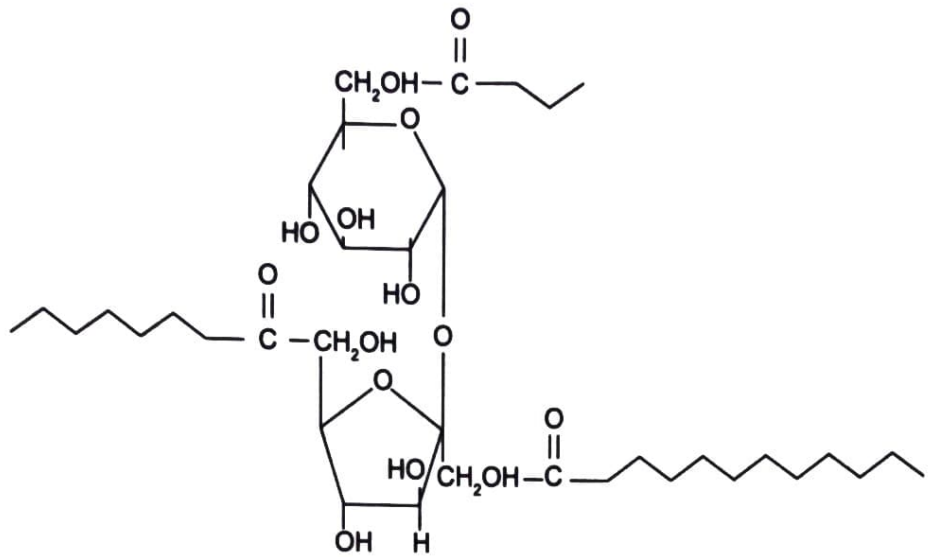


Figura 4.5 Éster de sacarose e ácidos butírico, caprílico e láurico.

o enriquecimento de lecitina ou de lisolecitina com ácidos graxos poli-insaturados. Esses lipídeos teriam maior bioacessibilidade que triacilgliceróis, o que favoreceria a absorção dos ácidos graxos funcionais adicionados.

► Modificação de bioativos

Recentemente muita atenção vem sendo dada à descoberta de compostos antioxidantes naturais. Entre as principais substâncias com essa capacidade estão diversos compostos fenólicos, particularmente os flavonoides. Embora apresentem grande capacidade para prevenir ou retardar a peroxidação de lipídeos, por sua capacidade de receber ou doar elétrons, formando radicais de baixa energia, que não propagam a reação radicalar, os compostos fenólicos apresentam pouca aplicação na conservação de produtos alimentícios, uma vez que sua característica altamente hidrofílica reduz sua dispersão em produtos com alto teor lipídico, justamente os mais sujeitos à peroxidação. Uma alternativa que vem sendo testada recentemente é a modificação de compostos fenólicos, por esterificação com ácidos graxos, por meio da atividade de enzimas lipolíticas, para tornar esses compostos mais lipofílicos e aumentar sua utilização em alimentos gordurosos.

Um outro grupo de alcoóis, que pode ser modificado via esterificação por lipases, é o dos esteróis. O consumo

Flavonoides antioxidantes podem ser modificados por lipases para se tornarem mais lipofílicos e se dispersarem em matrizes lipídicas.

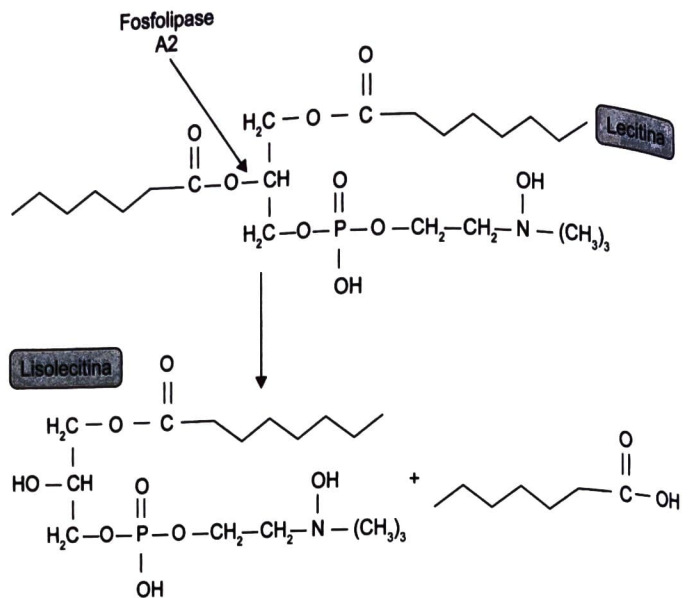


Figura 4.6 Lecitina e lisolectina.

.....
A esterificação enzimática de fitoesteróis com ácidos graxos aumenta a absorção intestinal desses compostos bioativos.

de fitoesteróis, como sitosterol, estigmasterol e campesterol (Figura 4.7) da soja, vem sendo associado à redução dos níveis séricos de colesterol em ratos e humanos. No entanto, a absorção desses esteróis vegetais no intestino é muito baixa, bem menor do que a do colesterol. Para aumentar a absorção, os esteróis devem estar na sua forma esterificada com ácidos graxos, o que pode ser alcançado por reação com lipases ou com a colesterol-esterase.

Degomagem enzimática

.....
A degomagem é uma etapa do refino de óleos na qual são removidos os fosfolipídeos presentes no óleo bruto.

A degomagem é uma etapa do refino de óleos na qual são removidos os fosfolipídeos presentes no óleo bruto. Fosfolipídeos podem ser divididos em gomas hidratáveis e não hidratáveis. No primeiro grupo encontram-se a fosfatidil-colina ou lecitina e o fosfatidil-inositol. São considerados não hidratáveis a fosfatidil-etanolamina e o ácido fosfatídico. Dependendo da composição da fração de fosfolipídeos do óleo a ser refinado, a degomagem pode consistir em apenas uma etapa de lavagem com água, que pode acompanhar a neutralização (etapa de remoção dos ácidos graxos livres). É o que acontece, por exemplo, com o óleo de soja, particularmente rico em lecitina. Outros óleos não são tão fáceis de

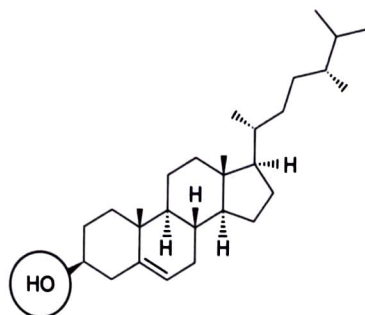


Figura 4.7 Estrutura do campesterol. No destaque, a hidroxila que sofre esterificação com ácidos graxos.

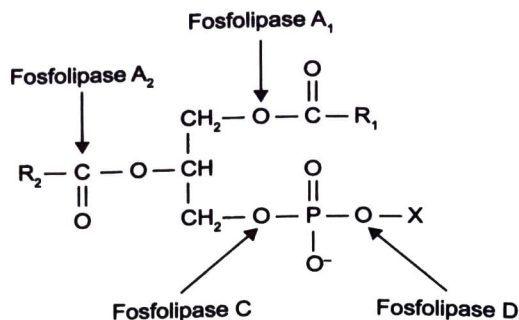
degomar. O óleo de colza ou de canola é mais rico em ácido fosfatídico, de baixa hidratação e difícil remoção durante a degomagem. Nesse caso, é recomendada a degomagem enzimática. O processo utiliza fosfolipases A1 ou A2, capazes de remover ácidos graxos do esqueleto de glicerol e aumentar a hidrofiliçidade do fosfolípido a ser removido (Figura 4.8). Fosfolipases A1 (como a Lecitase® – Novozymes) são mais facilmente encontradas comercialmente. A eficiência desse processo depende de um tratamento ácido prévio (por adição de pequenas quantidades de ácido cítrico) para quelar metais que promovem a agregação dos fosfolípidos, reduzindo a área superficial e, conseqüentemente, a taxa de hidrólise.

Produção de aromas

► Síntese de ésteres

Uma fração significativa dos aromas de alimentos é constituída por ésteres voláteis (de baixa massa molecular) que podem ser sintetizados a partir de um álcool (alifático ou terpênico) e um ácido, com uso de lipases. São duas as principais vantagens do uso dessa metodologia:

- Produtos obtidos por síntese enzimática são considerados “naturais”, o que evita que formulações contendo esses aromas sejam rotuladas como “aromatizadas artificialmente”, característica que vem sendo cada vez mais notada pelos consumidores
- Em muitos casos, apenas um isômero apresenta o aroma desejado. Através de síntese enzimática é possível



X = H⁺, colina, etanolamina, serina, inositol etc.

Figura 4.8 Região de atividade das diferentes fosfolipases sobre os fosfolípídeos. Quando X = H, obtém-se o ácido fosfatídico. A ausência de grupamento polar ligado ao fosfato reduz a hidratação desse tipo de fosfolípídeo.

produzir apenas esse isômero, aumentando o poder aromatizante do produto e reduzindo sua dosagem e seu custo. Outra possibilidade é o uso de lipases para remover, de misturas racêmicas, os isômeros indesejados, deixando apenas aqueles com aroma característico (usado na purificação de mentol).

Os seguintes ésteres já foram sintetizados pela ação de lipases comerciais: valerato de etila, acetato de hexila e caproato de etila que apresentam aroma frutado e são utilizados em aromas tipo “tutti-frutti”, acetato de butila com aroma de abacaxi, butirato de etila com aroma de morango e acetato de isoamila, com aroma de banana (Figura 4.9). Além desses, ésteres de geraniol, farnesol e citronelol com ácidos butírico, propiônico e valérico já foram produzidos e apresentam aromas frutados, de rosas e lavanda.

► Gordura de leite lipolisada

Esse produto é utilizado como flavorizante em aromas de manteiga para margarinas e pipocas; aroma de queijo e em produtos de panificação. É produzido a partir de

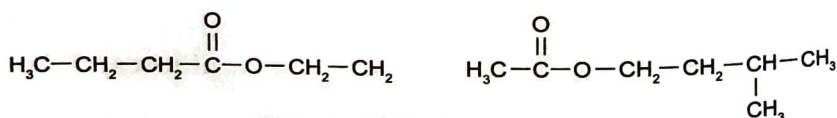


Figura 4.9 Estruturas do butirato de etila e do acetato de isoamila.

A gordura de leite lipolisada é utilizada como flavorizante em aromas de manteiga para margarinas e pipocas, em aromas de queijo e em produtos de panificação.

leite concentrado ou de manteiga clarificada (*butter oil*) na presença de emulsificantes, que aumentam a área superficial otimizando a taxa de hidrólise. Lipases pancreáticas e fúngicas (*Aspergillus niger* e *Penicillium roquefortii*) podem ser aplicadas para essa finalidade, e a reação é terminada quando se atinge o aroma desejado ou uma dada acidez, previamente estabelecida. O produto costuma ser pasteurizado e seco em *spray dryer* para comercialização. Lipases pré-gástricas e bacterianas já foram aplicadas para obtenção desse produto, porém tendem a liberar altos teores de ácidos graxos de cadeia curta (ácido butírico), gerando aroma indesejado no produto.

► Maturação acelerada de queijos

Maturação de queijos: lipases liberam ácidos graxos responsáveis pela formação do aroma e do sabor característicos de certos queijos finos.

É considerada uma das mais antigas aplicações de lipases exógenas em alimentos e se baseia no uso de lipases animais (lipase pré-gástrica de cabrito: queijo parmesão) ou lipases microbianas (em geral fúngicas: *Penicillium roquefortii*, *P. camembertii*), de inóculo microbiano (a presença do microrganismo, além de produzir as enzimas necessárias, ainda garante a aparência típica do produto) e, em alguns casos, em conjunto com proteases. As lipases liberam ácidos graxos que dão o sabor e o aroma específico dos diferentes queijos. O uso de enzimas isoladas, em conjunto com o inóculo microbiano ou não, reduz o tempo de maturação de diversos queijos, de vários meses para apenas algumas semanas. Isso reduz muito o custo de produção, sem prejuízo das características e da qualidade final do produto.

O produto, denominado de “queijo modificado por enzimas” (do inglês *enzyme modified cheese* – EMC), é obtido pelas seguintes etapas: suspensão da matéria-prima em água (cerca de 65% de sólidos) → adição de emulsificantes e mistura (45% de sólidos) → pasteurização (72°C/30 min – resfriar até a temperatura de reação) → adição de lipases e proteases (40 a 55°C/8 a 36 h) → pasteurização (72°C/30 min) → secagem em *spray dryer* ou apenas envase.

Em geral, a matéria-prima é formada por coágulo de caseína, aparas de queijo ou queijos não maturados. Os emulsificantes mais usados são mono- e diacilgliceróis,

geralmente são adicionados também estabilizantes como fosfatos ou ácido cítrico e antioxidantes, em geral, tocoferóis. Apesar da grande aplicação industrial desse tipo de produto, existem muito poucas misturas de enzimas comerciais específicas para esse tipo de aplicação. O produto mais antigo, da Danisco, tem o nome comercial de Accelase® e é composto principalmente de enzimas de bactérias lácticas: um homogenato de células contendo enzimas intracelulares com atividade de protease, esterase e lipase. Outros dois produtos estão disponíveis no mercado: Rulactine® e Flavorage®, o primeiro contendo proteases de *Micrococcus* sp., e o segundo, lipases de *Aspergillus* sp. Os produtores podem, ainda, fazer suas próprias misturas de enzimas disponíveis no mercado. A pasteurização final tem por objetivo inativar as enzimas e garantir a vida de comercialização do produto, que pode ser comercializado seco ou úmido, dependendo da aplicação desejada. Produtos obtidos com essa tecnologia, com aroma característico de queijo *cheddar*, *parmesão* e *gouda*, podem ser encontrados no mercado.

Outras aplicações

Em virtude de sua enantiosseletividade, lipases são aplicadas na obtenção de compostos opticamente puros para uso como fármacos e em química fina.

► Produção de compostos opticamente ativos e resolução de racematos

Nos seres vivos, a atividade biológica de um medicamento ou princípio ativo é geralmente dependente da estereoquímica do composto em questão. Assim, enquanto um enantiômero apresenta um efeito benéfico, o outro pode ser tóxico ou inócuo. Alguns exemplos dos diferentes efeitos das formas enantioméricas de fármacos em humanos podem ser observados na Tabela 4.4.

Em 1992, a Food and Drug Administration (FDA) adotou um programa no qual princípios ativos em misturas racêmicas enfrentariam processos muito mais longos e complexos de aprovação para venda nos EUA do que os opticamente puros. A partir desse ano, a grande maioria das indústrias farmacêuticas tem procurado metodologias eficientes para produção de compostos opticamente puros e para resolução de racematos. Em razão de sua enantiosseletividade, lipases

Tabela 4.4 Efeito das formas enantioméricas das substâncias.

Fármaco	R-enantiômero	S-enantiômero
Carnitina	Tratamento de doenças cardíacas musculares	Tóxico
Ibuprofeno	Inativo	Anti-inflamatório
Penicilamina	Tóxico	Antiartrítico
Talidomida	Sedativo	Provoca morte e deformação fetal

têm sido empregadas em vários processos desse tipo por meio de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio orgânico.

Diversos trabalhos científicos e patentes se utilizam da estereosseletividade de lipases e esterases para selecionar enantiômeros via hidrólise ou via síntese, de acordo com os esquemas ilustrados na Figura 4.10. Um exemplo é a resolução de misturas racêmicas de R,S-arilatos de metila (como o metil-éster de naproxeno), para síntese de anti-inflamatórios não esteroides, por lipase de *Rhizomucor miehei*.

Outra aplicação de lipases em química fina está na produção de compostos quirais puros para utilização como intermediários em sínteses químicas e como padrões para análises cromatográficas.

► Formulação de detergentes

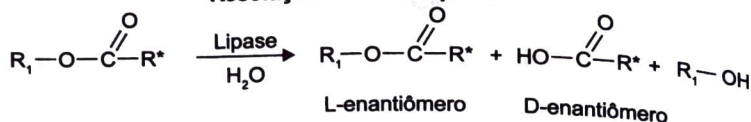
A indústria de detergentes é o destino da maior parte das lipases produzidas comercialmente. Isso se dá pois a utilização de formulações contendo lipases, amilases e proteases reduz expressivamente o tempo e a temperatura de lavagem, resultando em um processo mais eficiente com menor gasto de energia. Entretanto, para esse determinado fim as lipases devem apresentar características específicas tais como: atividade a temperaturas em torno de 60°C e valores de pH alcalinos, resistência a surfactantes e à proteólise.

► Tratamento de efluentes

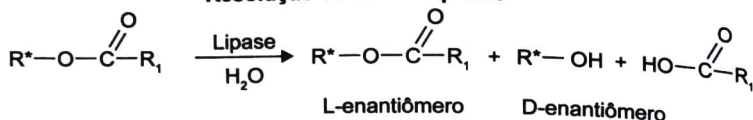
Lipases são utilizadas em lodo ativado e em outros processos aeróbicos de tratamento de efluentes de diversas indústrias (alimentos, couro, abatedouros etc.) na remoção da camada lipídica que flota, dificultando a aeração dos tanques.

Resolução de misturas racêmicas por hidrólise enantioespecífica

Resolução de ácidos quirais

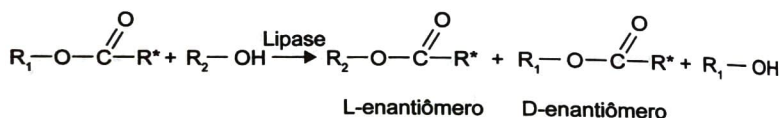
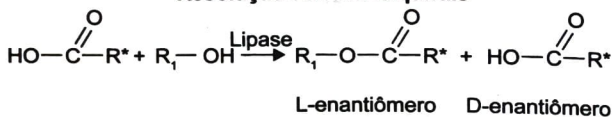


Resolução de alcoóis quirais



Resolução de misturas racêmicas por esterificação enantioespecífica

Resolução de ácidos quirais



Resolução de alcoóis quirais

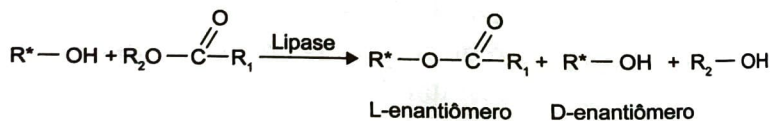
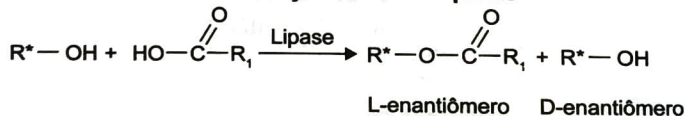


Figura 4.10 Resolução de misturas racêmicas utilizando lipases – por hidrólise e por síntese.

Outras aplicações industriais de lipases estão relacionadas na Tabela 4.5.

Métodos de detecção da atividade

A atividade de lipases pode ser determinada sobre óleos e gorduras naturais, na presença ou na ausência de estabilizantes (como a goma arábica), emulsificantes ou sob

Tabela 4.5 Aplicações de lipases – miscelânea.

Indústria	Aplicação
Couros	Remoção de gordura residual das peles
Rações	Melhoria da palatabilidade
Medicina	Auxiliar de digestão; análises clínicas
Cosméticos	Auxiliar na penetração de produtos para permanentes
Papel e celulose	Lise de material gorduroso da pasta de celulose Remoção de tinta em papel reciclado
Tecidos	Refino de seda

O método clássico de determinação da atividade de lipases se baseia na titulação dos ácidos graxos liberados, na presença de um indicador.

agitação vigorosa (1.000 rpm). Em muitos casos é aconselhável acrescentar ao meio reacional algumas pérolas de vidro que auxiliam a homogeneização e a reação deve sempre ser conduzida sob agitação. A atividade da enzima irá variar com o tipo de substrato usado e com as condições de reação (temperatura, pH, tempo e agitação, além do uso de auxiliares de homogeneização).

Em alguns casos é útil utilizar a medida de atividade de esterase para estimar a atividade lipolítica. Nesses casos são usados substratos sintéticos solúveis (triacetina, por exemplo). Nas metodologias mencionadas anteriormente, a atividade é detectada e quantificada pela titulação dos ácidos graxos liberados, por ação da lipases, com NaOH ou KOH alcóolico, na presença de fenolftaleína ou de outro indicador ácido/base. Há ainda a possibilidade de se utilizarem substratos sintéticos cromogênicos (p. ex., ésteres de *p*-nitrofenol e ácidos graxos) cuja hidrólise pode ser quantificada por espectrofotometria de luz visível.

Avaliar a atividade de cutinases não é muito simples. Cutinases reais devem apresentar atividade sobre cutina, um substrato natural pouco disponível comercialmente. Algumas alternativas já foram sugeridas na literatura, especialmente para confirmar a ocorrência de cutinases reais e não lipases ou esterases. A atividade de cutinase pode ser avaliada sobre cutina natural, que precisa ser extraída de vegetais. Nesse caso, os ácidos graxos liberados devem ser quantificados por cromatografia gasosa. Um método mais simples, porém mais caro, é o uso de cutina modificada,

identificada com marcador radioativo ou ligada ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). Nesse último caso, a hidrólise pode ser acompanhada por espectrometria a 590 nm, pela liberação do corante. Sobre PET a atividade pode ser medida pela fluorescência do ácido tereftálico – o monômero liberado, e sobre policaprolactona, observa-se a perda de absorbância a 660 nm, pela destruição do polímero. A atividade de cutinase pode ainda ser estimada sobre substratos sintéticos como ésteres de *p*-nitrofenol e ácidos graxos de baixa massa molecular como: acetato, butirato e valerato. Se a enzima em teste for capaz de hidrolisar esses substratos, além dos substratos com ácidos graxos de alta massa, possivelmente será uma cutinase.

Bibliografia

Leitura recomendada: Kim; Akoh, 2015; Javed *et al.*, 2018.

- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties. A review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 27(1): 15-29. 2010.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 133-153. 2000.
- CHEN, S.; SU, L.; CHEN, J.; WU, J. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*. 31: 1754-1767. 2013.
- COWAN, D. Lipases for the production of food components. In: WHITEHURST, R. J.; VAN OORT, M. *Enzymes in Food Technology*. Blackwell Publishing Ltd. 2010.
- FERREIRA-DIAS, S.; TECELÃO, C. Human milk fat substitutes: Advances and constraints of enzyme-catalyzed production. *Lipid Technology*. 26(8): 183-185. 2014.
- IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10: 129-140. 2000.
- JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, A. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 132: 23-34. 2018.
- KIM, B. H.; AKOH, C. C. Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids. *Journal of Food Science*. 80(8): 1713-1724, 2015.
- KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research & Development*. 6: 446-451. 2002.