



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**Influência da lipofilização sobre as propriedades
funcionais das proteínas de palmiste (*Elaeis guineensis*)
e de algodão (*Gossypium herbaceum*)**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Maria Lamus Uvarova, aprovada
pela Comissão Julgadora em 09 de
março de 2004.

Campinas, 09 de março de 2004.

Maria Lamus Uvarova


Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano
Presidente da Banca

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano
Orientador

**Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos para obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

Campinas, 2004

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
L218i
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 57703
PROC 16 - 117 - 04
C _____ D X _____
PREÇO 11,00
DATA 16/04/2004
Nº CPD _____

CM00196630-6

BIB ID 314887

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L218i Lamus Uvarova, Maria
Influência da lipofilização sobre as propriedades
funcionais das proteínas de palmiste (*Elaeis guineensis*) e
de algodão (*Gossypium herbaceum*) / Maria Lamus
Uvarova. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Daniel Barrera-Arellano
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas. 2. Farinhas. 3. Algodão. I. Barrera-Arellano,
Daniel. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano
(Orientador)



Profa. Dra. Caroline Joy Steel
(Membro)

Prof. Dr. Valdomiro Sgarbieri
(Membro)



Prof. Dr. Renato Grimaldi
(Suplente)

Campinas, 2004

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano*, pela oportunidade de trabalhar juntos, por compartilhar seus conhecimentos, pela orientação, pela liberdade e confiança no desenvolvimento do projeto.

À minha família, aos meus pais *Elena Uvarova* e *Abelando Lamus*, pelo amor, pela confiança, apoio e compreensão!

A todo o pessoal do Laboratório de Óleos e Gorduras do DTA – FEA; à *Dra. Lireny* e ao *Dr. Renato Grimaldi*, por sua ajuda incondicional. A todos os técnicos do laboratório, especialmente à *Rosana* e à *Camila* e a minhas colegas, pela alegria, honestidade, excelente ambiente de colaboração e respeito.

A meus maravilhosos amigos *Caroline* e *José*, *Thais*, *Sérgio*, *Lina*, *Pablo* e *Lyssa*, um bálsamo para minha vida!

Ao CNPq, pela bolsa concedida para o apoio à formação de pesquisadores em países da América Latina.

A meu adorado *Farid*, que é o motor da minha vida e minha alegria de viver!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	<i>viii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>x</i>
NOMENCLATURA	<i>xii</i>
RESUMO GERAL	<i>xiv</i>
GENERAL ABSTRACT	<i>xvi</i>
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos	4
CAPÍTULO 1. PROTEÍNAS DE ALGODÃO E PALMISTE: MODIFICAÇÕES QUÍMICAS POR VÁRIOS MÉTODOS (Revisão bibliográfica).	5
3. PROTEÍNAS DE ORIGEM VEGETAL	6
3.1. A palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>) e seus frutos	6
3.1.1. Torta de palmiste.	7
3.1.2. Tecnologia de extração das proteínas do palmiste	7
3.2. Algodão (<i>Gossypium</i>)	9
3.2.1. Generalidades da planta de algodão	9
3.2.2. Sementes de algodão e sua composição	9
3.2.3. Subprodutos do algodão	10
3.2.4. Tecnologia de extração de proteínas de algodão	12
4. PROTEÍNAS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS	13
5. MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	17
5.1. Lipofilização	17
5.1.1. Modificações químicas por meio da lipofilização	18
5.1.2. Reações químicas de lipofilização	19
5.1.2.1. Acilação com anidridos	20
5.1.2.1.1. Succinilação	20
5.1.2.1.2. Acetilação	21
5.1.2.1.3. Citracolinação	22
5.1.2.2. Acilação com anidridos de ácidos graxos	22

5.1.2.3. Acilação por meio de ésteres de ácidos graxos	23
5.2. Efeito da lipofilização sobre as propriedades funcionais das proteínas	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 2. LIPOFILIZACIÓN DA LA HARINA DE PALMISTE (<i>Elaeis guineensis</i>): INFLUENCIA SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES	36
RESÚMEN	37
SUMMARY	38
1. INTRODUCCIÓN	39
2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
Materia prima	40
Preparación de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST)	40
Métodos analíticos	41
Reacción de lipofilización	41
Determinación de los ácidos grasos unidos covalentemente	41
Solubilidad (NSI)	42
Capacidad de retención de agua (CRA) y capacidad de retención de aceite (CRAC)	42
Propiedades superficiales	42
Análisis estadístico	43
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
AGRADECIMIENTOS	47
4. BIBLIOGRAFÍA	48
CAPÍTULO 3. THE INFLUENCE OF LIPOPHILIZATION ON FUNCTIONAL PROPERTIES OF COTTONSEED FLOUR (<i>Gossypium herbaceum</i>) AND ITS PROTEIN CONCENTRATE	59
Abstract	60
INTRODUCTION	60
MATERIAL AND METHODS	61

Raw material	61
Preparation of cottonseed protein concentrate (CC)	61
Analytical methods	61
Lipophilization reaction	62
Analysis of covalently bound fatty acids (CFA)	62
Solubility (NSI)	62
Water retention capacity (WRC) and oil retention capacity (ORC)	62
Surface properties	63
Statistical analysis	63
RESULTS AND DISCUSSION	63
Lipophilization of cottonseed flour and its protein concentrate	63
Protein solubility	64
Surface properties	65
Water retention capacity (WRC) and oil retention capacity (ORC)	66
Acknowledgements	67
REFERENCES	68
3. CONCLUSÕES GERAIS	76
4. ANEXO 1. PREPARAÇÃO DO CONCENTRADO DE PALMISTE	78
5. ANEXO 2. ELIMINAÇÃO DE AÇÚCARES E FIBRAS SOLÚVEIS NO FARELO DE ALGODÃO	79
6. ANEXO 3. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE LIPOFILIZAÇÃO	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1		pág
Tabela 1	Composição química do palmiste	5
Tabela 2	Composição centesimal do farelo de algodão	9
Tabela 3	Classificação das propriedades funcionais das proteínas	13
Tabela 4	Solubilidade de diversas proteínas de origem vegetal, sem lipofilização e lipofilizadas com cloreto de ácido palmítico, em pH 7	26
Tabela 5	Propriedades emulsificantes e espumantes da glicinina de soja lipofilizada com éster de N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico	27
 CAPÍTULO 2		
Tabla I	Composición centesimal de la harina de palmiste sin testa (HPST) y con testa (HPCT)	50
Tabla II	Efecto de la relación proteína:cloruro de ácido palmítico en la composición química, rendimiento y relación de lipofilización de las harinas HPST;1:0,5 y HPST;1:1.	51
Tabla III	Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la actividad emulsionante (AE), estabilidad de la emulsión (EE), capacidad emulsionante (CE), expansión de la espuma (ExEsp) y estabilidad la espuma (EsEsp) de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 4,3 y 7,0	52
Tabla IV	Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la	

capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de retención de aceite (CRAC) de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1	53
---	----

CAPÍTULO 3

Table 1	Centesimal composition of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC)	69
Table 2	Effect of Protein:Palmitoyl Chloride Ratio (PPCR) on chemical composition and lipophilization rates on cottonseed flour (CF) and cottonseed concentrate (CC)	70

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	pág
Figura 1 Representação de uma molécula de proteína lipofilizada com um ácido graxo	19
Figura 2 Lipofilização de uma molécula protéica por anidrido succínico	20
Figura 3 Lipofilização de uma molécula protéica por anidrido acético	20
Figura 4 Lipofilização de uma molécula protéica por anidrido citracônico	21
Figura 5 Mecanismo de incorporação de grupo ϵ -amino livre por catalise básica com éster de N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico	22
Figura 6 Mecanismo de incorporação do cloreto de ácido palmítico ao grupo ϵ -amino livre, por catalise básica	23
Figura 7 Processo de lipofilização com adição direta do cloreto de ácido graxo	23
Figura 8 Influencia da razão de lipofilização na solubilidade da β -lactoglobulina lipofilizada com N-hidroxisuccinimida de ácido esteárico	26
Figura 9 Índice de estabilidade da espuma em relação à taxa de incorporação de ácidos graxos da β -lactoglobulina lipofilizada com N-hidroxisuccinimida de ácido esteárico	28
 CAPÍTULO 2	
Figura 1 Curvas de solubilidad de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST)	54
Figura 2 Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la solubilidad proteica de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin	

	testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 7,0	55
Figura 3	Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la actividad emulsionante (AE) y estabilidad de la emulsión (EE) de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 7,0	56
Figura 4	Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la expansión (ExEsp) y estabilidad (EsEsp) de la espuma de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 7,0	57
 CAPÍTULO 3		
Figure 1	Effect of Protein:Palmitoyl Chloride Ratio (PPCR) on solubility profiles of cottonseed flour (CF), and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0	71
Figure 2	Effect of Protein:Palmitoyl Chloride ratio (PPCR) on emulsion activity (EA) and emulsion stability (ES) of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0	72
Figure 3	Effect of Protein:Palmitoyl Chloride ratio (PPCR) on foam expansion (FE) and foam stability (FS) of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0	73
Figure 4	Effect of Protein:Palmitoyl Chloride ratio (PPCR) on water retention capacity (WRC) and oil retention capacity (ORC) of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0	74

NOMENCLATURA

pl – Punto isoeléctrico

HPST – Harina de palmiste sin testa

HPCT -Harina de palmiste con testa

HPST;1:0,5– Harina de palmiste sin testa lipofilizada en la relación proteína:cloruro de 1:0,5 p/v.

HPST;1:1– Harina de palmiste sin testa lipofilizada en la relación proteína:cloruro de 1:1 p/v.

FA – Farinha de algodão

FA;1:0,25 – Farinha de algodão lipofilizada na relação proteína:cloreto de 1:0,25 p/v.

FA;1:0,5 – Farinha de algodão lipofilizada na relação proteína:cloreto de 1:0,5 p/v.

FA;1:1 – Farinha de algodão lipofilizada na relação proteína:cloreto de 1:1 p/v.

CA – Concentrado protéico de algodão

CA;1:0,25 – Concentrado protéico de algodão lipofilizado na relação proteína:cloreto de 1:0,25 p/v.

CA;1:0,5 - Concentrado protéico de algodão lipofilizado na relação proteína:cloreto de 1:0,5 p/v.

CA;1:1 - Concentrado protéico de algodão lipofilizado na relação proteína:cloreto de 1:1 p/v.

AE – Atividade emulsificante (%)

EE – Estabilidade emulsificante (%)

CE – Capacidade emulsificante (mL de óleo /g de amostra)

ExEsp – Expansão da espuma (%)

EsEsp – Estabilidade da espuma (%)

CRA – Capacidade de retenção de água (g de água retidos / g de amostra)

CRO – Capacidade de retenção de óleo (g de óleo retidos / g de amostra)

CRAC - Capacidad de retención de aceite (g de aceite retenidos / g de muestra)

AGL – Ácidos grasos libres (mg / g de muestra)

AGT – Ácidos grasos totales (mg / g de muestra)

AGC – Ácidos grasos covalentes (mg / g de muestra)

PPCR – Protein:Palmitoyl Chloride Ratio

CF – Cottonseed flour

CC – Cottonseed protein concentrate

CF;1:0.25 – Cottonseed flour lipophilized at PPCR= 1:0.25 w/v.

CF;1:0.5 – Cottonseed flour lipophilized at PPCR= 1:0.5 w/v.
CF;1:1 – Cottonseed flour lipophilized at PPCR= 1:1 w/v.
CC;1:0.25 – Cottonseed protein concentrate lipophilized at PPCR= 1:0.25 w/v.
CC;1:0.5 – Cottonseed protein concentrate lipophilized at PPCR= 1:0.5 w/v.
CC;1:1 – Cottonseed protein concentrate lipophilized at PPCR= 1:1 w/v.
EA – Emulsion activity (%)
ES – Emulsion stability (%)
EC – Emulsion capacity (%)
FE – Foam expansion (%)
FS – Foam stability (%)
WRC – Water retention capacity (g water retained / g sample)
ORC – Oil retention capacity (g oil retained / g sample)
FFA – Free fatty acids (mg / g sample)
TFA – Total fatty acids (mg / g sample)
CFA – Covalent fatty acids (mg / g sample)

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi lipofilizar proteínas de duas matérias primas vegetais e avaliar os efeitos da lipofilização sobre as propriedades funcionais. As fontes de proteína vegetal estudadas foram as farinha de palmiste e de algodão.

A farinha de palmiste original, contendo 21% de proteína (N x 6,25), foi lipofilizada com cloreto de ácido palmítico nas proporções proteína:cloreto de 1;0,5 e 1:1 p/v. As propriedades funcionais da farinha (solubilidade, capacidade de retenção de água (CRA) capacidade de retenção de óleo (CRO), capacidade emulsificante (CE), atividade emulsificante (AE) e estabilidade da emulsão (EE), expansão da espuma (ExEsp) e estabilidade da espuma (EsEsp) antes e após a lipofilização foram estudadas no pl (pH 4,3) e em pH 7,0. Comparadas com a farinha original, a solubilidade, a CE e a CRA das proteínas lipofilizadas diminuíram. No entanto, a CRO aumentou entre 1,5 e 2,8 vezes nas farinhas lipofilizadas, devido ao incremento da hidrofobicidade das moléculas protéicas. As propriedades superficiais, como a AE e EE, apresentaram aumentos significativos, da ordem de 1000% e 300%, respectivamente, quando a lipofilização foi realizada na proporção proteína:cloreto de 1:0,5. Nesta mesma proporção, a ExEsp apresentou mais de 300% de aumento e a espuma permaneceu estável após 30 e 120 min.

A farinha de algodão original apresentou um teor de proteína de 48% (N x 5,3). Esta farinha foi concentrada por precipitação ácida e o processo permitiu obter um rendimento de 38% em peso e um teor de proteína de 77%. Tanto a farinha quanto o seu concentrado foram lipofilizados com cloreto de ácido palmítico nas proporções proteína:cloreto de 1;0,25, 1:0,5 e 1:1 p/v. As propriedades funcionais da farinha e do concentrado (solubilidade, capacidade de retenção de água (CRA) capacidade de retenção de óleo (CRO), atividade emulsificante (AE) e estabilidade da emulsão (EE), expansão da espuma (EEsp) e estabilidade da espuma (EsEsp) antes e após a lipofilização foram mediadas em pH 7,0. A solubilidade do concentrado foi maior que a da farinha. A lipofilização, de um modo geral, causou uma queda no índice de solubilidade, devido ao aumento da hidrofobicidade. Todos os produtos lipofilizados (da farinha e do concentrado) apresentaram um aumento tanto nas propriedades superficiais (Ae, EE, ExEsp, EsEsp) quanto na CRO e CRA. Todos os produtos de algodão tiveram níveis de gossipol livre abaixo do limite máximo permitido pela legislação, tornando-os inócuos para o consumo humano.

Em geral, pode-se afirmar que nas farinhas de palmiste e de algodão e no concentrado protéico de algodão, a lipofilização causou um aumento nas propriedades superficiais, entretanto, a solubilidade foi sensivelmente reduzida.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effects of lipophilization on functional properties obtained from palm kernel and cottonseed flours.

Palm kernel flour, containing 21% protein (N x 6.25), was lipophilized with palmitoyl chloride in the following Protein:Palmitoyl chloride ratios (PPCR): 1:0.5 and 1:1, w/v. Functional properties of palm kernel flour (solubility, water retention capacity (WRC), oil retention capacity (ORC), emulsion capacity (EC), emulsion activity (EA), emulsion stability (ES), foam expansion (FE) and foam stability (FS)) before and after lipophilization were studied at pl (4.3) and at pH 7.0. In comparison to the original flour, solubility, EC, and WRC of lipophilized flours decreased. However, ORC increased between 1.5 and 2.8 times for lipophilized flours due to the increase of protein hydrophobicity. Surface properties, such as EA and ES, presented significant increases, up to 1000% and 300%, respectively, when lipophilization was carried out at a PPCR= 1:0.5. At the same ratio, FE showed an increase of more than 300% and the foam remained stable after 30 and 120 min.

Original cottonseed flour presented 48% protein (N x 5.3). This flour was concentrated by acid precipitation, with a yield on 38% on a weight basis, with 77% protein. The flour and its protein concentrate were lipophilized with palmitoyl chloride at PPCR=1:0.25, 1:0.5 and 1:1 w/v. Their functional properties (solubility, water retention capacity (WRC), oil retention capacity (ORC), emulsion activity (EA), emulsion stability (ES), foam expansion (FE) and foam stability (FS)) were studied at pH 7.0. The solubility of the concentrate was higher than the flour. Lipophilization caused a further decrease of the solubility index due to the increment of hydrophobicity. All the lipophilized products (flour and concentrate) presented an increase of surface properties, as well as of ORC and WRC. The increase of ORC and WRC could be due to the rearrangement of protein molecules, after fatty acids incorporation. Gossypol content of all cottonseed products was lower than the maximum limits permitted by human consumption.

Lipophilization caused an increment of functional properties of palm kernel and cottonseed flours and of cottonseed protein concentrate; however, solubility index decreased sensibly.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, tem-se buscado incorporar novas fontes de alimentos com alto teor de proteínas na dieta humana. Muitas destas fontes, principalmente aquelas de origem vegetal, de baixo preço e de grande produção, como as oleaginosas, têm sido destinadas quase que totalmente à alimentação animal. Uma alternativa à valorização destes recursos é a aplicação de tecnologias modernas que agreguem valor, transformando-os em produtos com características e propriedades favoráveis para o uso na indústria alimentícia e/ou nas indústrias farmacêutica e cosmética.

Para a modificação de proteínas, diversas tecnologias têm sido desenvolvidas e aplicadas, dentre as quais destaca-se a modificação química. A lipofilização é um tipo de modificação química que possibilita a alteração das propriedades funcionais relacionadas com as características hidrofílicas/hidrofóbicas das proteínas, mediante a incorporação de grupamentos lipofílicos nas moléculas. Como resultado, poderiam obter-se proteínas modificadas com melhores propriedades funcionais e afinidade com compostos ou sistemas hidrofóbicos. Poucos grupos de pesquisa no mundo trabalham atualmente com lipofilização de proteínas, porém, espera-se um aumento no interesse por esta tecnologia em função das vantagens que ela oferece. Nosso objetivo foi estudar o uso desta tecnologia, aplicando-a às matérias primas altamente disponíveis no país.

O Brasil destaca-se como um grande produtor agrícola, ocupando um importante lugar na produção de algodão, e apresenta um crescimento significativo nos volumes de óleo de palma e de palmiste. No ano de 2002, a produção mundial de óleos e gorduras ultrapassou 120 milhões de toneladas. O óleo de soja representou quase 30 milhões de toneladas, representando 25% da produção mundial total. Em segundo lugar, se encontra o óleo de palma, com aproximadamente 24,5 milhões de toneladas, gerando como produto paralelo o óleo de palmiste com aproximadamente 3 milhões de toneladas (MPOPC, 2002). De acordo com a FAO (2002), a produção brasileira de sementes de algodão foi cerca de 2 milhões de toneladas/ano. A variedade de L.r. *latifolium* Hutch, pertencente à espécie de algodoeiro *Gossypium hirsutum*, é a mais plantada no mundo, abrangendo um total de 33,3 milhões de hectares e produzindo sementes com linter, responsáveis por 90% da produção mundial de algodão em caroço. Atualmente, a industrialização destas matérias primas está relacionada, principalmente, à produção de

óleos, tortas, farelos e farinhas, sendo que estes dois últimos são, algumas vezes, destinados à exportação, apesar de seu valor agregado reduzido.

Este trabalho foi escrito na forma de capítulos, os quais serão descritos resumidamente a seguir:

CAPÍTULO 1: O trabalho tem por objetivo a aplicação da tecnologia da lipofilização para a modificação das propriedades funcionais de proteínas vegetais, obtidas a partir das farinhas de palmiste e de algodão e do concentrado protéico de algodão. Neste capítulo, realizou-se uma justificativa da escolha destas matérias primas, uma revisão geral das proteínas de palmiste e de algodão e de algumas técnicas de extração destas proteínas, uma visão geral das propriedades funcionais e sua importância nas proteínas e por último, uma revisão dos métodos de lipofilização de proteínas, destacando-se a lipofilização química.

CAPÍTULO 2: Apresenta-se, em forma de artigo, o processo de lipofilização da farinha de palmiste e seu efeito sobre algumas propriedades funcionais, entre elas a solubilidade, capacidade emulsificante, atividade e estabilidade da emulsão, expansão e estabilidade da espuma e capacidade de retenção de água e de óleo. Além disso, se estudou a influência da testa sobre algumas propriedades funcionais e realizou-se um tratamento com ácido clorídrico para a sua remoção. Nas farinhas de palmiste lipofilizadas, as propriedades funcionais foram estudadas em função do pH (pI e pH 7) e do grau de lipofilização, com diferentes proporções de proteína e cloreto de ácido palmítico (proteína:cloreto 1:0,5 e 1:1 p/v).

CAPÍTULO 3: Neste capítulo, aplicou-se a tecnologia de lipofilização na farinha de algodão e ao concentrado protéico de algodão. As propriedades foram estudadas em pH 7,0 e observou-se a influência do grau de lipofilização (proteína:cloreto de 1:0,25, 1:0,5 e 1:1, p/v) sobre diferentes propriedades funcionais, tais como: solubilidade, atividade e estabilidade da emulsão, expansão e estabilidade da espuma, capacidade de retenção de água e de óleo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MALAYSIAN PALM OIL PROMOTION COUNCIL (MPOPC). **Palm Oil Link**. Quaterly Review. V. 12, p.2-15, 2002.

FAO/ FAOSTAT-Agriculture. Disponível em :

<http://apps1.fao.org/servlet/XteServlet.jrun?Areas=21&Items=328&Elements=51&Years=2002&Format=Table&Xaxis=Years&Yaxis=Countries&Aggregate=&Calculate=&Domain=SUA&ItemTypes=Production.Crops.Primary&Language=espanol&UserName,> ©
FAO 1999-2002

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar e aplicar a tecnologia da lipofilização em DIVERSAS fontes de proteína vegetal disponíveis no Brasil, a saber: farinha de palmiste, farinha de algodão e seu concentrado e avaliar os efeitos da lipofilização sobre diferentes propriedades funcionais

2.2. Específicos

- Avaliar os efeitos da presença da testa sobre as propriedades funcionais da farinha de palmiste.
- Avaliar os processos de concentração de proteínas a partir da farinha de palmiste e de algodão de acordo com técnicas propostas por diferentes autores.
- Determinar, mediante o uso de diferentes solventes, a redução de açúcares e fibras solúveis com o objetivo de aumentar o teor de proteína na farinha de algodão.
- Aplicar a reação de lipofilização, seguindo a reação de Shotten-Baumann, nas proteínas das farinhas de palmiste e de algodão, assim como o concentrado protéico de algodão com cloreto de ácido palmítico em diferentes proporções proteína:cloreto.
- Avaliar o efeito da relação Proteína:Cloreto de ácido palmítico sobre as propriedades funcionais das proteínas lipofilizadas de palmiste, algodão e seu concentrado.
- Determinar o teor de gossipol em todos os produtos de algodão e o efeito do processo da lipofilização sobre este composto.

CAPÍTULO 1

PROTEÍNAS DE PALMISTE E ALGODÃO: MODIFICAÇÕES QUÍMICAS POR VÁRIOS MÉTODOS (Revisão bibliográfica)

3. PROTEÍNAS DE ORIGEM VEGETAL

3.1. A palma africana (*Elaeis guineensis*) e seus frutos

O dendezeiro, ou palma africana (*Elaeis guineensis*), é uma das mais importantes fontes de óleo comestível no mundo, obtendo-se dois tipos de óleos de seu fruto. O dendê, ou óleo de palma, é extraído da polpa, e o óleo de palmiste, do caroço. O rendimento corresponde, aproximadamente, a 20% de óleo de palma e 4% de óleo de palmiste em relação ao peso dos cachos (Salunkhe *et al.*, 1992).

A palma africana se desenvolve favoravelmente em solos argilosos mas que possuem uma drenagem adequada, provavelmente como nos bancos dos rios africanos. Entretanto, seu cultivo pode ser feito em solos vulcânicos com alta incidência de água. A distribuição ideal da palma é de 10° ao redor da linha do Equador. Existem plantações fora desta zona, mas a produtividade é relativamente baixa. A palma africana segue a vegetação de floresta tropical onde se encontram árvores de borracha e outros tipos de palmeiras (Wood, 1987).

Os frutos da palma africana são compostos de uma pele externa macia (epicarpo), uma polpa fibrosa que contém o óleo (mesocarpo), e uma célula interna (endocarpo) que contém a amêndoa (endosperma). O endosperma, que constitui de um terço à metade do volume da fruta, é uma massa celular branca coberta por uma forte membrana preta, chamada de testa. Um endosperma típico consiste de 50% de lipídios, 9% de proteína bruta, 5,5% de fibra celulósica e tecido, amidos digeríveis e açúcares, (Crombie, 1956). A Tabela 1 mostra a composição química média do palmiste.

Tabela 1. Composição química do palmiste

Componente	Teor (% base úmida)
Umidade	6-8
Óleo	47 – 52
Proteína	7,5 – 9
Fibra bruta	5
Cinza	2
Hidratos de carbono	26,1

Fonte: Cornelius, 1965

As amêndoas da palma apresentam muitas células de forma oval de aproximadamente 150 X 80µm, cheias de óleo que funde à temperatura ambiente (Aghazhu *et al.*, 1979). Existem grânulos de proteína (de aproximadamente 5 µm) e de

amido dispersos neste óleo. Apenas poucos grânulos de proteína por célula são encontrados nas primeiras capas das células vizinhas à testa.

3.1.1. Torta de palmiste

A torta de palmiste contém um teor variável de proteína, que também depende do método utilizado na extração de óleo. A proteína da torta de palmiste tem um balanço de aminoácidos considerado deficiente, sendo o aminoácido limitante a lisina. Por outro lado, seu conteúdo de metionina é maior que nas proteínas de soja (Salunkhe *et al.*, 1992).

A torta de palmiste não é adequada para consumo humano, sendo utilizada unicamente para a alimentação animal. A digestibilidade dos nutrientes da torta é relativamente baixa. Moss & Givens (1994) reportaram uma digestibilidade de 0,75 para a proteína bruta de palmiste. Esse baixo valor é devido ao fato da testa conter altas concentrações de taninos e constituintes fenólicos. Os compostos fenólicos sofrem oxidação com a consequente aparição de quinonas, que interagem com os grupos tióis e grupos amina das proteínas, formando complexos insolúveis. A testa do palmiste está fortemente unida à amêndoa e os processos de descascamento usual não são capazes de removê-las (Sreedhara & Kurup, 1998).

A farinha de palmiste é obtida após desengorduramento completo da torta de palmiste por solvente, dessolventização e, por fim, peneirada numa peneira com diâmetro de abertura de 0,485 mm.

3.1.2. Tecnologia da extração das proteínas do palmiste

Tradicionalmente, a obtenção da torta de palmiste é realizada esterilizando a fruta a 120°C, seguida por uma digestão a 95°C. A fruta é separada em massa da polpa, fibra, amêndoa e água. As amêndoas de palmiste são quebradas e passadas por rolos, onde são posteriormente cozidas até atingir aproximadamente 11% de umidade e, finalmente prensadas. A torta resultante possui um teor médio de proteína de 12% (N x 6,25) (Gollingwood, 1958).

Poucos são os trabalhos que estudam a extração de proteínas de palmiste. Balogun (1982) extraiu proteínas de palmiste em soluções alcalinas na presença de NaOH. A extração foi feita a 28°C com agitação magnética em uma solução 0,05 N de NaOH, a pH 12. As proteínas foram filtradas e precipitadas com uma solução de 5% de

ácido tricloroacético, seguida por diálise por três dias. Outros reagentes foram estudados tais como H_2O , NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mas nenhum deles apresentou rendimento comparável ao obtido pela extração com NaOH .

Em geral, a solubilidade protéica das oleaginosas é mais baixa do que a das sementes leguminosas (Kazazis & Kalasaki, 1979; Bogolun & Odutuga, 1981); isto é atribuído ao fato da maioria das proteínas estarem ligadas à celulose ou a compostos fenólicos da mesma torta.

Aghazu *et al.* (1979) extraíram proteínas de torta de palmiste aptas para o consumo humano. Para separar os polissacarídeos indigeríveis, como fibras, etc, a torta foi moída junto com diferentes solventes. Os solventes usados foram acetona, isopropanol, dietil éter e hexano na proporção 2:1 em relação à torta de palmiste. Esses autores obtiveram 40 a 50% de proteínas em relação à proteína inicial, porém com teores de proteína muito baixos (aprox. 30%, usando fator 6,25) e um alto desperdício de solventes.

Outras metodologias são usadas para obter farinhas de palmiste das amêndoas de palmiste inteiras. Estes tratamentos foram feitos por Sreedhara *et al.* (1992), tratando as amêndoas com diferentes solventes para retirar a testa, que representa quase 5% do peso da amêndoa e contém altos teores de substâncias fenólicas. Os estudos demonstraram que a imersão em HCl 4 N, a 95°C , por 6 a 7 min, elimina quase 100% da testa, obtendo-se amêndoas de cor branco perolada. A retirada da testa produz um aumento no teor de proteína de 8,5%, assim como uma diminuição da fibra bruta.

As gorduras provenientes da palma são usadas como matéria prima para a produção de produtos de higiene pessoal, como sabonetes finos, processamento de borracha, espumas, velas, cosméticos, detergentes. Na indústria de alimentos, ela é usada na fabricação de sorvetes, margarinas para fritura, biscoitos, entre outros. Usualmente, a gordura de palmiste é amplamente usada em *shortenings*, na fabricação de margarinas, gorduras especiais para cobertura, sorvetes, biscoitos *cream-cracker* e biscoitos em geral (Labruna, 2000).

3.2. Algodão (*Gossypium*)

3.2.1. Generalidades da planta de algodão

Existem mais de 40 espécies do gênero *Gossypium*., entre as quais destacam-se *G. hirsutum* (espécie americana), *G. herbaceum* (espécie asiática) e *G. barbadense* (espécie egípcia). A cultura do algodão matura após cinco ou seis meses após o plantio. A altura da planta pode variar entre 0,76 a 1,21 m, mas existem algumas variedades que alcançam até 2,72 m. Esta planta adapta-se a solos arenosos, regiões úmidas perto de fontes de água, em ambientes especialmente característicos do sul da América do Norte e dos vales dos rios do Egito e da Índia (Altschul *et al.*, 1958).

3.2.2. Semente de algodão e composição

A semente de algodão compõe-se principalmente de endosperma, tecido com pouca quantidade de embrião, que contém o óleo como a melhor fonte de energia. O cotilédone dos embriões contém três classes de células: epiderme, palisado e grãos de aleurona que contém proteínas. Além destes tipos de células, as sementes contêm estruturas intercelulares chamadas de glândulas de pigmentos, cheias de gossipol. Estas são esféricas e medem entre 100-400 µm de diâmetro (Gardner *et al.*, 1976). A estrutura intercelular das sementes é altamente organizada. Lipídios, proteínas e fósforo estão empacotados individualmente e dispersos no citoplasma. Esta compartimentação da célula é extremamente importante para o processamento das sementes e posterior obtenção de diversos produtos industrializados (Martinez *et al.*, 1970).

O maior interesse no algodão está, principalmente, nas suas fibras, no entanto, as sementes são uma fonte importante de óleo e farelo. A Tabela 2 apresenta a composição centesimal do farelo de algodão, observando-se que apresenta um elevado conteúdo de óleo (15-22%) e teor protéico (17,1-21,3%), sendo que o primeiro é utilizado principalmente na alimentação humana, e o segundo na alimentação animal.

Tabela 2. Composição centesimal do farelo de algodão.

Componente	%
Umidade	5-12,8
Óleo	15,2-22
Proteína	17,1-21,3
Fibra bruta	30-34,6

Fonte: Salunkhe *et al.*, 1992

As principais proteínas do algodão são globulinas (α e β), fosfoproteínas, glutenina e glicoproteínas. De acordo com Noyes (1969) o farelo de algodão é nutricionalmente inferior à proteína de soja em razão da qualidade dos seus aminoácidos. Isto é devido aos baixos teores de metionina e lisina, e de outros aminoácidos limitantes, como a isoleucina e treonina.

Adicionalmente, a semente de algodão contém alguns compostos antinutricionais, entre os quais destaca-se o gossipol; um polifenol tóxico presente em concentrações que podem atingir até 1,4-2,1%; e em outras espécies podendo chegar a valores entre 1,9 e 3,4%. O gossipol afeta a cor e as propriedades do óleo e do farelo devido à sua interação com as proteínas durante o processamento térmico (Altschul *et al.*, 1958). O gossipol livre, não ligado durante o processo térmico, é extremamente tóxico e limita, portanto o uso dos farelos em alimentos, tanto para a dieta humana quanto para a alimentação animal. Os valores máximos de gossipol livre permitidos não devem ser maiores que 0,045% (Liadakis *et al.*, 1993).

3.2.3. Subprodutos do algodão

O algodoeiro não é somente uma planta fibrosa e oleaginosa, mas também, produtora de proteína de qualidade, que, na ausência de gossipol, pode funcionar como suplemento protéico na alimentação animal e humana. Logo após a separação da fibra, seu principal produto, é o óleo comestível. No processamento de extração do óleo obtém-se os subprodutos primários, que são: o linter, a casca e a amêndoa; os secundários, farinha integral, óleo bruto, torta e farelo; os terciários, óleo refinado, borra e farinha desengordurada (De Araujo, 2003).

A semente coberta com linter e rica em óleo contém, em média 60% de caroço e 40% de fibra. A semente liberada com a quebra das cascas possui de 30 a 40% de proteínas e de 35 a 40% de lipídios e constitui uma das principais matérias-primas para a indústria de óleo comestível.

A torta de algodão, obtida após a extração do óleo, pode ser usada como fertilizante, na indústria de corantes, na alimentação animal e na fabricação de farinhas alimentícias, após sua desintoxicação; entretanto, sua principal aplicação reside na elaboração de rações animais, devido ao seu alto valor protéico (De Araújo *et al.*, 2003). A torta é obtida por cozimento das sementes em flocos, a uma temperatura entre 93-137°C. Esse calor empregado no cozimento pode afetar a solubilidade das tortas e farelos quando são diluídos em ácido ou álcalis, assim como pode comprometer sua qualidade se estes fatores não são bem controlados (Altshul *et al.*, 1958). Em função do tipo de extração, pode-se produzir dois tipos de torta: a torta gorda (5% de óleo residual), mais energética, proveniente apenas da prensagem mecânica, porém com menor teor de proteína; e a torta magra (menos de 2% de óleo residual), oriunda da extração por solventes, e que apresenta concentração relativamente maior de proteína.

Tradicionalmente, na alimentação animal são utilizados os subprodutos, como o caroço, o farelo e as cascas da semente do algodão, fornecendo proteína e energia aos ruminantes. Estes subprodutos são usados principalmente na alimentação de poligástricos, pois o gossipol é tóxico aos monogástricos e inofensivo aos ruminantes se fornecido em quantidades controladas. Galinhas alimentadas com dieta contendo caroço de algodão produzem ovos com gema que se torna esverdeada após um período de estocagem e para suínos, não se pode adicionar gossipol em concentrações acima de 5% na sua ração.

O farelo do algodão é o subproduto resultante da extração do óleo contido no grão que, ao ser esmagado, é usado moído e peletizado para ração animal. A farinha de algodão, proveniente da extração direta com o hexano, deixa a farinha de cor clara e textura fina e com bastante proteína, variando de 60 a 68% (N x 6,25) podendo fornecer uma suplementação protéica a diversos produtos de panificação, como pães, biscoitos doces e salgados (De Araújo *et al.*, 2003).

3.2.4. Tecnologia de extração de proteínas de algodão

Existem diversas formas de extração de proteínas das sementes de algodão. Em 1969, Berardi *et al.*, apresentaram um método seletivo para separar proteínas de alto e baixo peso molecular, chamado de “extração em dois passos”. No primeiro passo, extraem-se as proteínas de baixo peso molecular, solúveis em água. No segundo passo, extraem-se proteínas de alto peso molecular, solúveis em soluções alcalinas com NaOH 0,075 N. O isolado do primeiro passo contém, em média, 13% de nitrogênio total da farinha original; e o isolado do segundo passo, entre 16% a 52% (Berardi *et al.*, 1969).

No ano seguinte, Martinez *et al.* (1970) obtiveram concentrados protéicos de algodão, extraídos com etanol a 90% ou com água em pH neutro. Solução aquosa 0,008 M de CaCl_2 também foi usada e apresentou a maior remoção dos açúcares totais. Os concentrados extraídos com etanol apresentaram, em média, 11,5% de nitrogênio e, com água, 11,7%.

Outro procedimento de extração, em nível industrial, é o chamado “*Liquid Cyclone Procedure*” (Gastrock *et al.*, 1969). Este procedimento não utiliza meios aquosos e as sementes, em forma de flocos, são separadas das glândulas de pigmentos por meio de uma centrífuga. O produto final possui teores de gossipol livre menores que 0,04% e um teor de nitrogênio de 11,05% (Martinez *et al.*, 1970).

Shemer *et al.* (1973) isolou proteínas de algodão com sódio hexametáfosfato (SHMP) seguido por precipitação ácida a 60°C e pH 7, com 2% de SHMP. O isolado mostrou 94,8% de proteína (N x 6,25). O valor protéico do isolado não diferiu significativamente da farinha de algodão livre de gossipol.

Métodos enzimáticos também foram testados para extrair proteínas de algodão. Childs (1975) comparou a extração química de proteínas de algodão com a enzimática-química, usando enzimas proteolíticas tais como papaína, tripsina e ficina. O procedimento enzimático mostrou-se mais eficiente que o químico, porém os custos envolvidos nesse processo o tornaram um fator limitante.

El Tinay *et al.* (1980) estudaram o uso de eletrólitos (CaCl_2 , MgSO_4 e Na_2SO_4) para melhorar a extractibilidade das proteínas e comparou com a extração usando NaOH. O estudo concluiu que a extração feita com NaOH a pH 10 apresentou maior recuperação das proteínas (96%) e menor teor de gossipol livre.

Berardi & Chery (1979) extraíram proteínas de farelo de algodão com NaOH 0,034 N, a pH 10,5, usando uma proporção farelo:solvente de 1:1, p/p. Após a centrifugação, o extrato foi acidificado com HCl 1N no ponto isoelétrico (pI). Liadakis *et al.* (1993), usando uma técnica similar, extraíram isolados com NaOH 0,1 N, a pH 12, com proporção farelo:solvente de 1:20, p/v, a 40°C, por 30 min. Os precipitados isoelétricos foram lavados com 2-propanol a 50% e o teor de proteína obtido foi de 85,3% (N x 6,25). Um segundo experimento, usando Na₂SO₃, produziu um isolado de 86% de proteína, porém a recuperação das proteínas totais foi 33% menor àquelas extraídas com hidróxido de sódio.

El Tinay *et al.* (1988) estudou posteriormente o efeito da extractibilidade das proteínas da farinha de algodão quando elas eram recuperadas por coagulação isoelétrica, diálise, coagulação isoelétrica após diálise, e coagulação isoelétrica seguida de diálise. Encontraram que a diálise causa uma considerável melhora na recuperação protéica quando comparada com a precipitação convencional. A coagulação por meio da diálise mostrou uma recuperação de proteínas de 81,2% e um rendimento protéico de 23,9%, diminuindo a concentração de gossipol livre para 0,010% (10 ppm), permitindo o seu uso em produtos de grau alimentício.

4. PROTEÍNAS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS

A qualidade de um alimento é definida pela sua composição, propriedades nutricionais e funcionais. As propriedades nutricionais estão relacionadas com a quantidade de nutrientes essenciais, a biodisponibilidade de tais nutrientes e a ausência de substâncias tóxicas e/ou antinutricionais. As propriedades funcionais das proteínas são definidas como todas aquelas propriedades não-nutricionais transferidas pelas proteínas aos alimentos (Roussel-Philippe *et al.*, 2000) e referem-se às características físico-químicas e às interações entre a própria proteína e os outros componentes do alimento (Kinsella *et al.*, 1985). Estas influem notoriamente no processamento, estocagem e aceitação do produto final. O conhecimento das propriedades funcionais das proteínas de matérias primas vegetais é importante para definir como estas proteínas podem ser adicionadas aos alimentos e como elas podem substituir outras proteínas utilizadas tradicionalmente e de custo mais elevado.

A funcionalidade de uma proteína reflete as complexas interações entre a composição em aminoácidos, a configuração estrutural e a distribuição das proteínas (Killara & Sharkasi, 1986). Existem inúmeras revisões que analisam os diversos aspectos da funcionalidade das proteínas (Kinsella, 1976; Morrissey *et al.*, 1987; Cheftel *et al.*, 1989; Whitaker, 1983). Nota-se um esforço constante dos pesquisadores para entender como a composição e a estrutura podem influir nas propriedades funcionais, sendo que o primeiro passo é entender as propriedades por si mesmas e como elas definem as características dos alimentos. As propriedades funcionais podem ser divididas em diferentes grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação das propriedades funcionais das proteínas.

Propriedades Sensoriais, Organolépticas		Odor, cor, sabor, textura, flavor, sensação, forma, aspeto, etc
Propriedades Hidrofílicas, Superficiais, Interfásicas	Interações proteína-água	Solubilidade, dispersibilidade, água, sinerese, viscosidade, formação de massa, etc.
	Interações proteína-óleo	Dispersibilidade, capacidade de absorção de óleo
	Interações proteína-água-óleo, proteína-água-ar	Emulsificação, formação de espuma, aeração, absorção de sabores (flavor), arenosidade, cremosidade, etc
Estruturais, Intermoleculares	Interações proteína-proteína	Elasticidade, coesão, adesão, mastigabilidade, etc.
Cinestéticas		Turbidez, maciez, arenosidade
Reológicas, Viscoelásticas Texturas		Agregação, geleificação, formação de filmes, de massa, de fibras, extrudabilidade, estabilidade, textura, etc
Outras		Compatibilidade com aditivos, enzimas, modificação de propriedades inertes

A capacidade de absorção de óleo/água, as propriedades das emulsões e o índice da solubilidade do nitrogênio (Nitrogen Solubility Index, NSI) são as propriedades funcionais mais importantes para a utilização das proteínas como aditivo alimentar (Kinsella *et al.*, 1985).

A solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas, também classificada como uma propriedade funcional, pela importância que exerce sobre a funcionalidade das proteínas nos alimentos. A solubilidade de uma proteína depende de vários fatores (Giese, 1994; Sgarbieri, 1996):

- ❑ Peso molecular e conformação das moléculas,
- ❑ Densidade e distribuição das cargas elétricas influenciadas pelo pH,
- ❑ Natureza e concentração de íons ou força iônica,
- ❑ Temperatura.

A solubilidade de uma proteína depende em grande parte do número e do arranjo de cargas na molécula, que, por sua vez, depende da composição em aminoácidos, particularmente do número de resíduos ácidos (aspartil, glutamil) e básicos (histidil, arginil e lisil). Partes não protéicas como lipídios, carboidratos, fosfatos, etc, também afetam a solubilidade das proteínas. Em geral, a solubilidade de uma proteína é influenciada pela maior ou menor afinidade das moléculas de proteínas pelo solvente que, na sua maioria é água. Mudanças, particularmente na diminuição da solubilidade das proteínas, afetam de maneira desfavorável sua funcionalidade (Kinsella *et al.*, 1985).

A capacidade de retenção de água é uma propriedade funcional muito importante, pois os atributos de textura, suculência e maciez dos produtos dependem desta propriedade e da solubilidade. Nos produtos protéicos, pode-se encontrar uma fração de água chamada de hidratação e outra chamada de água livre. A água de hidratação se refere à ligada por pontes de hidrogênio com grupos hidrofílicos, tais como grupos polares das cadeias laterais das proteínas (carboxílicos, amínicos, hidroxílicos e sulfidrílicos), e a grupos não dissociáveis da própria ligação peptídica (carbonila e imida). A água livre está, na verdade, imobilizada na rede tridimensional dos filamentos de proteínas, envolvendo as ligações cruzadas e forças eletrostáticas entre as cadeias polipeptídicas. Em pH isoelétrico, verifica-se um mínimo de capacidade de retenção de água (CRA), que é máxima em pH ácido e alcalino. Em valores de pH afastados do ponto isoelétrico, a predominância de cargas de mesmo sinal provoca repulsão e afastamento das cadeias

das proteínas, deixando maior espaço para ser preenchido por moléculas de água. O aumento da densidade de cargas líquidas permite a formação de maior capacidade de hidratação, contribuindo para maior retenção de água. A capacidade de absorver água deve-se, em parte, ao desdobramento e expansão das moléculas de proteínas; enquanto a dissociação de proteínas em subunidades pode, teoricamente, aumentar a quantidade de posições potenciais de ligação com moléculas de água (Beuchat, 1977). Quando uma proteína apresenta alta capacidade de retenção de água, ela pode ser utilizada na indústria de alimentos como ingrediente para prevenir perda de água em produtos como pães e bolos, e para aumentar a proporção de água em lingüiças, peixes em conserva e produtos congelados (Vioque *et al.*, 2000).

De acordo com Kinsella (1976), o mecanismo da capacidade de retenção de óleo, se refere à absorção física do óleo. Outros autores relacionam a capacidade de absorção de óleo com os grupos não polares das cadeias das moléculas de proteína. Em particular, as diferentes concentrações de proteínas, a quantidade de aminoácidos não polares, a seqüência destes na cadeia protéica e as diferenças nas características conformacionais das proteínas poderiam explicar as diferentes capacidades de retenção de óleo apresentadas pelas mesmas.

A capacidade das proteínas de formar emulsões estáveis durante o armazenamento é importante para manter a qualidade sensorial de produtos à base de leites, maioneses, molhos para salada, embutidos, sobremesas congeladas, pastelaria, etc. Para estabilizar as emulsões, as proteínas devem ser capazes de serem absorvidas pela interface óleo – água e de reorganizar sua conformação, mantendo os resíduos hidrofóbicos na fase oleosa e os resíduos hidrofílicos na fase aquosa. Além disso, as proteínas formam um filme em torno do óleo, suspendendo-o na fase aquosa através da formação de gotículas (Kinsella *et al.*, 1985).

A proteína também é um componente importante na formação de espuma, além de outros ingredientes (lipídios, sais, açúcares) e o pH. Geralmente, a proteína é considerada como uma coletora na interfase gás/líquido. Como bom “agente espumante”, a proteína deve: a) ser capaz de adsorver-se na interfase gás-água durante a formação de espuma, b) realizar rápidos arranjos e rearranjos na interfase e c) formar um filme viscoelástico coesivo (Giese, 1994).

5. MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A produção de proteínas modificadas tem o objetivo principal de fornecer novos ingredientes à indústria de alimentos que permitam melhorar as características organolépticas e/ou as condições de sua utilização (Roussel-Phillipe, 1998). Porém, estes produtos modificados também são de interesse para as indústrias farmacêutica e cosmética. As modificações intencionais e planejadas em proteínas podem ser efetuadas por reações puramente químicas, por reações catalisadas enzimaticamente e por transformações físicas (Sgarbieri, 1996). Embora exista um grande número de reagentes que podem modificar os grupos ativos das cadeias laterais das proteínas, as reações podem ser agrupadas em:

1. acilação,
2. alquilação,
3. reduções e oxidações,
4. substituições.

Os principais objetivos da modificação química são bloquear ou inibir reações de deterioração; melhorar as propriedades sensoriais, melhorar as propriedades funcionais e melhorar as propriedades nutricionais (Sgarbieri, 1996).

A lipofilização é um tipo de modificação química de proteínas e refere-se ao incremento geral da hidrofobicidade das proteínas por meio da incorporação de grupos hidrofóbicos ligados covalentemente, tornando-as mais afins por sistemas apolares (Haque & Kito, 1983a).

5.1. Lipofilização

A lipofilização de proteínas pode ser realizada por meios químicos (acilação) ou enzimáticos.

A lipofilização enzimática apresenta certas particularidades em relação à natureza protéica. As enzimas são específicas para as condições da reação e precisam de condições brandas de temperatura e pressão, resultando muito interessante para a indústria devido não somente à economia de energia, mas porque seu uso permite usá-las como substratos com diversos compostos relativamente instáveis, que seriam

degradados sob condições severas (Roussel-Philippe, 1998). Têm sido reportados diversos métodos enzimáticos para modificar a natureza lipofílica das proteínas, tais como a transglutaminação por transglutaminase e fosforilação por quinases. Estas aumentam a solubilidade das proteínas sem necessidade de hidrólise. A proteólise, por meio de proteases, aumenta a solubilidade, as propriedades emulsificantes e a formação de espuma. Do mesmo modo, melhoram a retenção de água e de óleo (Levashov *et al.*, 1985; Torchilin *et al.*, 1980).

A lipofilização (acilação) química de proteínas pode ser feita com anidridos de tipo succínico, acético e citracônico, com anidridos de ácidos graxos, com ésteres de ácidos graxos e com cloretos de ácidos graxos.

5.1.1. Modificações químicas por meio da lipofilização

A existência de aminoácidos hidrofóbicos na cadeia polipeptídica sugere a possibilidade de interação entre as proteínas e os lipídios biológicos, que têm um importante papel na formação de membranas biologicamente funcionais. Nos sistemas alimentícios, as interações entre proteínas e lipídios têm sido amplamente reconhecidas como determinantes na funcionalidade das mesmas (Haque & Kito, 1983a).

A lipofilização é uma das maneiras de modificar o comportamento funcional de uma proteína. Este tipo de modificação valoriza algumas matérias primas de origem vegetal que contêm uma elevada porcentagem de proteínas e que apresentam baixo custo no mercado.

A lipofilização aplicada no âmbito tecnológico transforma as proteínas em produtos com características e propriedades especiais para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. As proteínas lipofilizadas, usadas a nível alimentício são transformadas sob condições não drásticas, não afetando significativamente o seu valor nutricional (Feeney, 1977b) e podem promover a diminuição de certos fatores como a alergenicidade (Akita & Nakai, 1990a).

O uso de diferentes métodos para aumentar a hidrofobicidade continua sendo tema de diversos trabalhos de investigação, por exemplo, o anidrido succínico tem sido usado para melhorar a funcionalidade das proteínas de trigo (Grant, 1973), concentrados protéicos celulares (McElwain *et al.*, 1975) e proteínas de pescado (Groninger & Miller,

1975). Outros métodos usados para unir grupos hidrofóbicos foram amplamente estudados no Japão na década de oitenta, como os realizados com ácidos graxos de ésteres de N-hidroxisuccinimida (Haque & Kito, 1983a; Haque *et al.*, 1982; Akita & Nakai, 1990a; Haque & Kito, 1983b) e cloretos de ácidos graxos (Smith & Yada, 1991, Roussel-Philippe, 2000). O uso de anidridos acético e succínico (Messinger *et al.*, 1987), e também a reação de plasteína, que incorporam aminoácidos hidrofóbicos ou álcoois (Arai *et al.*, 1975), são outras das metodologias aplicadas. Atualmente, o uso de cloretos de ácidos graxos é amplamente utilizado por seu baixo custo, disponibilidade comercial e alta reatividade. Os cloretos de ácidos graxos têm sido utilizados com êxito nas modificações de proteínas vegetais como soja, trigo (Roussel-Philippe *et al.*, 2000) e outras fontes protéicas de baixo valor funcional como as sementes de girassol e de milho (Roussel-Philippe & Barrera-Arellano, 2002).

5.1.2. Reações químicas de lipofilização

A reação química de lipofilização é basicamente uma acilação, na qual os grupos amino livres, em meio alcalino, reagem com grupos hidrofóbicos. Como se mencionou anteriormente, muitos são os ligantes lipofílicos utilizados, entre os quais destacam-se os ésteres de N-hidroxisuccinimida e os cloretos de ácidos graxos.

O grupo ϵ -amino da lisina, Figura 1, é o grupo de maior reatividade e susceptibilidade, mas é influenciado por fatores que limitam sua disponibilidade, que está condicionada pela composição e conformação da própria molécula protéica.

Outro grupo viável de participar na reação é o resíduo da tirosina, na qual as ligações éster e ésteres fenólicos são espontaneamente introduzidos em meio alcalino. Grupos como a treonina e a serina com seus resíduos hidroxila (OH), e os grupos sulfidrilas (SH) da cisteína, por outro lado, também podem participar na união com os ácidos graxos (Kito, 1987). O ácido glutâmico é um promotor poderoso dos ataques nucleofílicos de grupos amino livres (dupla ativação), e sua reatividade está determinada pela proximidade espacial do grupo carboxílico ao ϵ -amino da lisina (Akita & Nakai, 1990a).

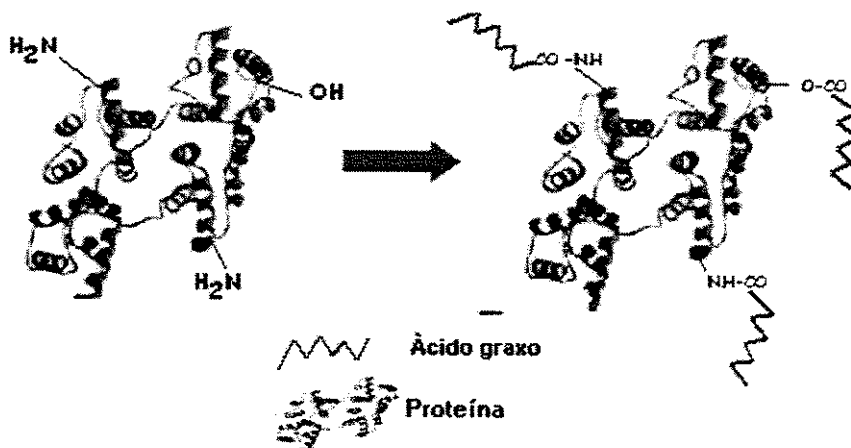


Figura 1: Representação de uma molécula de proteína lipofilizada com um ácido graxo.

5.1.2.1. Acilação com anidridos

Estas reações se desenvolvem por acilação direta. Os anidridos de tipo succínico, acético e citracônico reagem com as proteínas dispersas em um meio tamponado. Outros anidridos como o maléico e o dimetilmaléico também são usados com frequência.

5.1.2.1.1. Succinilação

A succinilação converte os grupos amino terminais das cadeias laterais da lisina em derivados carboxílicos (Figura 2). Desta forma, o NH_3^+ em meio ácido é convertido em COO^- em meio básico, provocando repulsões eletrostáticas entre os grupos carboxílicos nativos e aqueles que foram adicionados, com a respectiva diminuição do pI (Franzen & Kinsella, 1976). É importante mencionar que as repulsões são proporcionais ao grau de succinilação. O pH da reação pode ser controlado com acetato ou hidróxido de sódio e deve permanecer superior a 7.

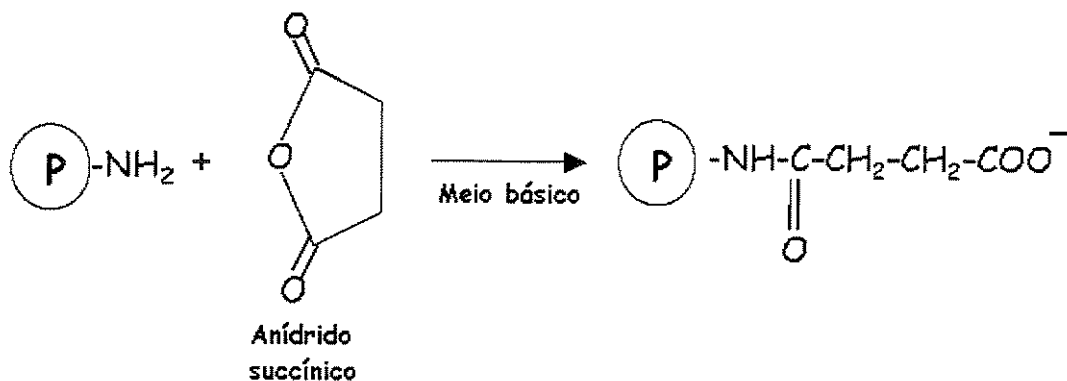


Figura 2. Lipofilização de uma molécula protéica por anidrido succínico (Franzen & Kinsella, 1976).

O aumento das cargas negativas transforma as propriedades físico-químicas das proteínas, modificando o perfil de solubilidade e aumentando as propriedades emulsificantes e espumantes (Franzen & Kinsella, 1976).

5.1.2.1.2. Acetilação

A acetilação das proteínas permite fixar sobre os grupos amina, grupos acetil neutros, provocando menores repulsões eletrostáticas com os grupos carboxílicos unidos à proteína (Figura 3).

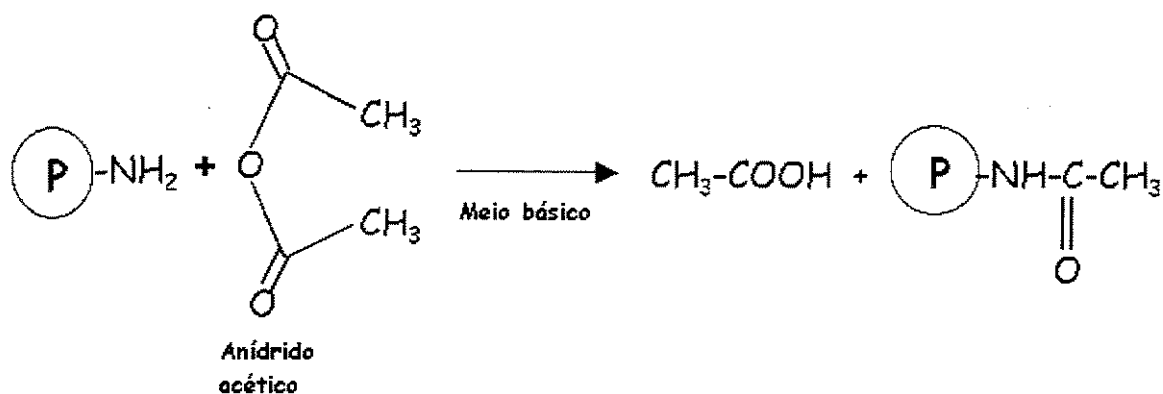


Figura 3. Lipofilização de uma molécula protéica por anidrido acético (Franzen & Kinsella, 1976).

As propriedades funcionais das proteínas acetiladas são comparáveis às das proteínas succiniladas. A solubilidade da proteína acetilada, em função do pH, possui um

valor intermediário entre a da proteína nativa e a da proteína succinilada (Roussel-Philippe, 1998; Franzen & Kinsella, 1976; Lakkis & Villota, 1982).

5.1.2.1.3. Citraconilação

O processo da acilação por anidrido citracônico é semelhante ao de succinilação. Existe a formação de uniões amida que permitem, com relativa facilidade, a “desacilação” em condições ácidas ($\text{pH} < 5$) (Figura 4). Esta reação é utilizada para bloquear a lisina quando o alimento é processado termicamente ou está em meio alcalino, o que conserva o valor nutricional dos produtos alimentícios que contém (Roussel-Philippe, 1998).

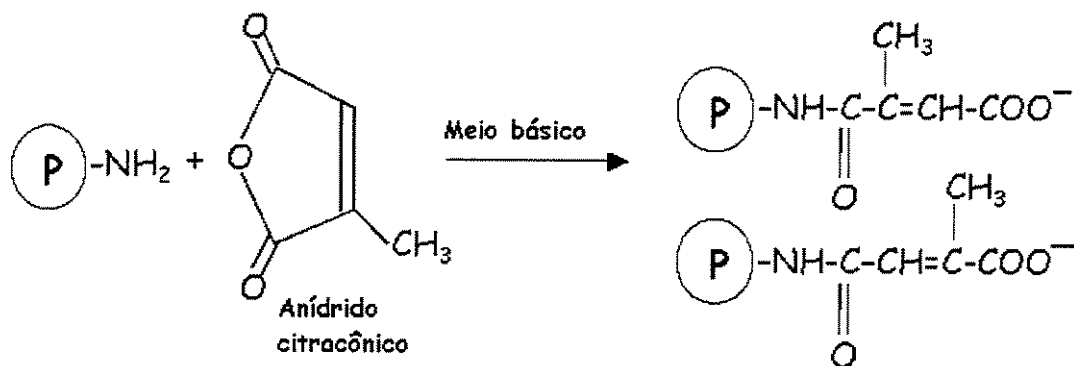


Figura 4. Lipofilização de uma molécula protéica por anidrido citracônico (Roussel-Philippe, 1998).

5.1.2.1.4. Acilação com anidridos de ácidos graxos

A reação é geralmente conduzida em misturas hidroalcoólicas ou em meios orgânicos (mistura de metanol/clorofórmio ou hexano) para permitir a solubilização dos anidridos. A lipofilização com anidridos de ácidos graxos afeta notavelmente as propriedades surfactantes, como se observa na acilação da farinha de soja (Haque *et al.*, 1982) e da gelatina (Kawazoe *et al.*, 1996).

A incorporação de ácidos graxos, via anidridos, permite modificar as proteínas rapidamente, sem a formação de produtos secundários.

5.1.2.2. Acilação por meio de ésteres de ácidos graxos

Outra metodologia amplamente usada para modificar a natureza lipofílica das proteínas é a utilização de ésteres de ácidos graxos de N-hidroxysuccinimida. As

primeiras lipofilizações que empregaram os ésteres de ácidos graxos em proteínas alimentícias foram feitas por Haque *et al.* (1982), com glicinina de soja. Na Figura 5, o grupo ϵ -amino desloca seu par de elétrons solitários, enquanto que a succinimida os atrai (Haque & Kito, 1983a).

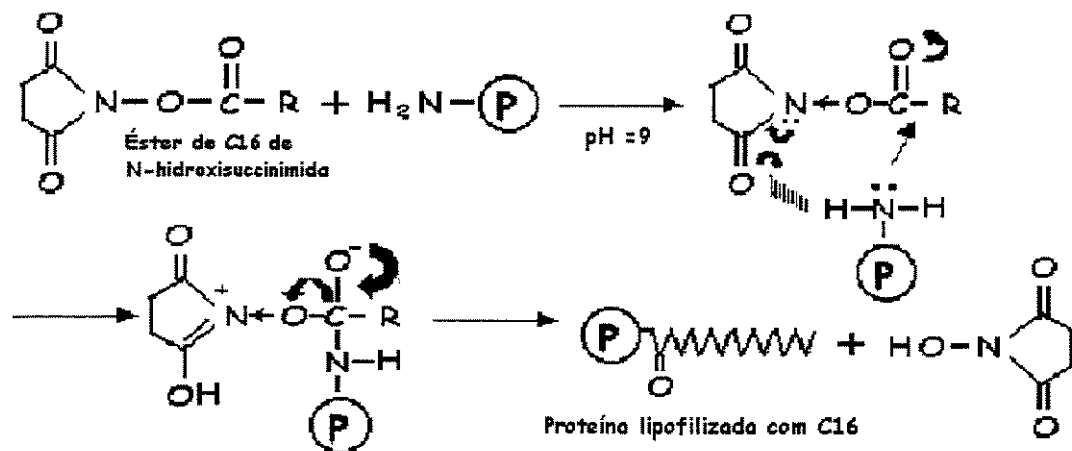


Figura 5: Mecanismo de incorporação de grupo ϵ -amino livre da lisina por catálise básica com éster de N-hidroxissuccinimida de ácido palmítico (Haque & Kito, 1983a).

5.1.2.3. Acilação por meio de cloretos de ácidos graxos

Outro tipo de acilação disponível para lipofilizar proteínas com relativa facilidade operacional é o uso de cloretos de ácidos graxos. O mecanismo de incorporação (Figura 6) segue a reação de Shotten-Baumann, que pode se efetuar de duas formas diferentes:

- Utilizando um sistema de micelas reversas em solventes orgânicos (Kabanov *et al.*, 1989).
- Por adição direta dos cloretos de ácidos graxos em um meio aquoso. Este mecanismo é usado para modificar enzimas (Koelsch *et al.*, 1981; Smith & Yada, 1991), proteínas de soja (Hayakawa & Nakai, 1985), germe de trigo (Roussel-Philippe, 1998; Graille *et al.*, 1998), torta de babaçu e germe de milho (Rouseel-Philippe & Barrera-Arellano, 2002)

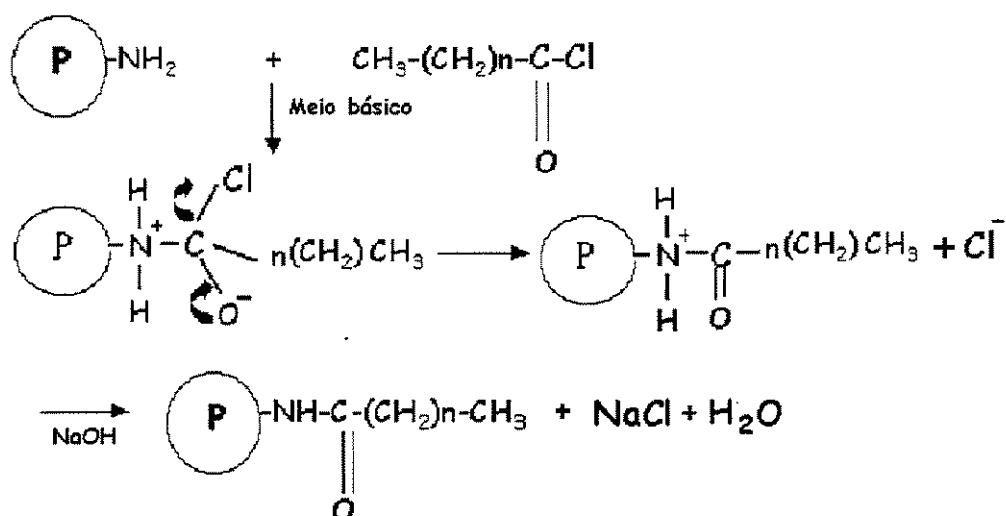


Figura 6: Mecanismo de incorporação do cloreto de ácido palmítico ao grupo ϵ -amino livre da lisina, por catálise básica (Roussel-Philippe, 1998).

Na Figura 6, a proteína, em meio básico, deixa o par de elétrons não compartilhado do nitrogênio mais acessível, permitindo sua reação com o grupo carbonilo, deslocando o íon cloreto. No processo, o nitrogênio perde um próton, com a conseqüente inclusão do ácido graxo e a formação de cloreto de sódio e água.

O processo de lipofilização com cloretos de ácidos graxos está descrito na Figura 7.

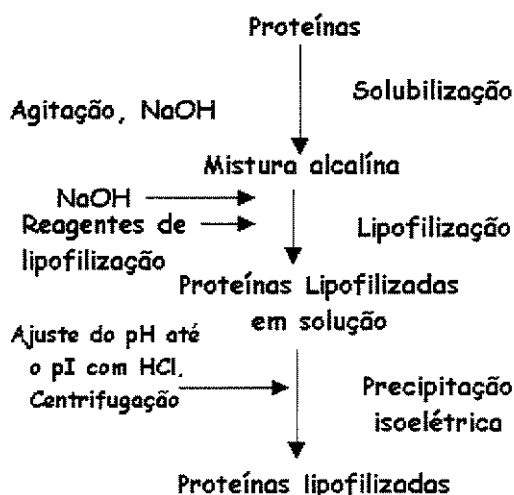


Figura 7. Processo de lipofilização com adição direta do cloreto de ácido graxo (Roussel-Philippe & Barrera-Arellano, 2002).

O pH alcalino permite que a base (OH^-) atue primeiro desprotonando, de forma parcial, os grupos amino da lisina e, eventualmente, ionizando o grupo carboxílico do ácido glutâmico. A reação pode ser interrompida neutralizando o pH da solução (Haque & Kito, 1983a).

A lipofilização com cloreto de ácido graxo não afeta significativamente o balanço de cargas e, por conseguinte, não afeta a solubilidade no pH isoelétrico. É importante mencionar que, quando uma proteína é succinilada, os resíduos reativos carregados positivamente (grupos amino terminais) são transformados em derivados carboxílicos carregados negativamente (em meio alcalino), deslocando seu pH isoelétrico a valores de pH mais ácidos. No caso da lipofilização com ácidos graxos, os grupos amino são convertidos em resíduos apolares.

Após a lipofilização, deve-se monitorar o grau de modificação, o que pode ser realizado por cromatografia gás-líquido. Para quantificar os ácidos graxos incorporados covalentemente à proteína, deve-se quantificar previamente os ácidos graxos totais e aqueles que não se ligaram ou ficaram em estado livre. Os ácidos graxos totais se determinam, geralmente, por meio de uma hidrólise ácida com HCl 6N e extração com solvente (hexano, éter etílico, clorofórmio, etc). Posteriormente, adiciona-se uma solução conhecida de padrão interno (ácido margárico, palmítico, esteárico, etc) para quantificá-los por cromatografia. Os ácidos graxos livres são extraídos de forma similar aos ácidos graxos totais, sem aplicar a hidrólise. A quantidade de ácidos graxos unidos covalentemente é calculada pela diferença entre os ácidos graxos totais e os livres (Haque & Kito, 1983b).

Os valores dos moles de ácidos graxos ligados por mol de proteína são sempre uma média, devido ao fato de que em uma proteína modificada, os ácidos graxos não estão unidos no mesmo grau, como consequência da heterogeneidade populacional (Akita & Nakai, 1990a).

O aumento da hidrofobicidade das proteínas modificadas está intimamente ligado às mudanças conformacionais. Hayakawa & Nakai (1985) classificaram a hidrofobicidade das proteínas a nível alifático (aminoácidos alifáticos) e a nível aromático (aminoácidos aromáticos). Métodos fluorescentes como o CPA (ácido cis-parinárico) e ANS (1-anilino-8-naftalenosulfonato) são usados para medir a hidrofobicidade das proteínas modificadas. O método CPA mede a hidrofobicidade causada pelos resíduos alifáticos, como as

cadeias hidrocarbonadas (ácidos graxos), e o método ANS mede a hidrofobicidade aromática (Akita & Nakai, 1990a). Ao lipofilizar a β -lactoglobulina, os autores concluíram que existe um aumento na hidrofobicidade superficial causada pelos ácidos graxos (usando como reagente de lipofilização o éster de N-hidroxisuccinimida de ácido esteárico) e por tanto do CPA. Porém, quando mais de nove moles de ácido esteárico são incorporados, a CPA decresce. Estas provas podem exibir a distribuição de grupos alifáticos e aromáticos e monitorar as possíveis mudanças conformacionais na molécula protéica ao ser lipofilizada.

5.2. Efeito da lipofilização sobre as propriedades funcionais das proteínas

A estrutura e a conformação de uma proteína dependem do ambiente iônico onde ela se encontra (Mangino, 1984). Os aminoácidos aromáticos são mais hidrofóbicos e volumosos e se encontram normalmente no interior da molécula protéica. Os aminoácidos menos hidrofóbicos se acomodam mais facilmente no interior devido ao seu menor tamanho e maior flexibilidade. Em valores de pH alcalinos ou em presença de solventes orgânicos, a proteína sofre um rearranjo no qual os aminoácidos aromáticos são expostos, enquanto que os aminoácidos alifáticos permanecem no interior da molécula. De acordo com Puigserver *et al.* (1979), quando grupos hidrofóbicos são unidos ao resíduo ϵ -amino da lisina, estes tendem a se mover para o interior hidrofóbico da proteína, causando uma forte restrição molecular. À medida que se incorporam mais ácidos graxos, maior é a abertura da proteína, as interações hidrofóbicas e os efeitos estéricos se incrementam, resultando na formação de numerosos estados de agregação e polimerização, que promovem a precipitação das proteínas. Este comportamento afeta substancialmente suas características funcionais (Akita & Nakai, 1990a), entre as quais:

Solubilidade. Um dos fenômenos visíveis do incremento da hidrofobicidade é a diminuição da solubilidade. Por exemplo, a lipofilização da β -lactoglobulina com diferentes proporções molares de ácido esteárico/proteína, ocasiona uma acentuada diminuição da solubilidade, em função de complexos rearranjos conformacionais (Akita & Nakai, 1990a).

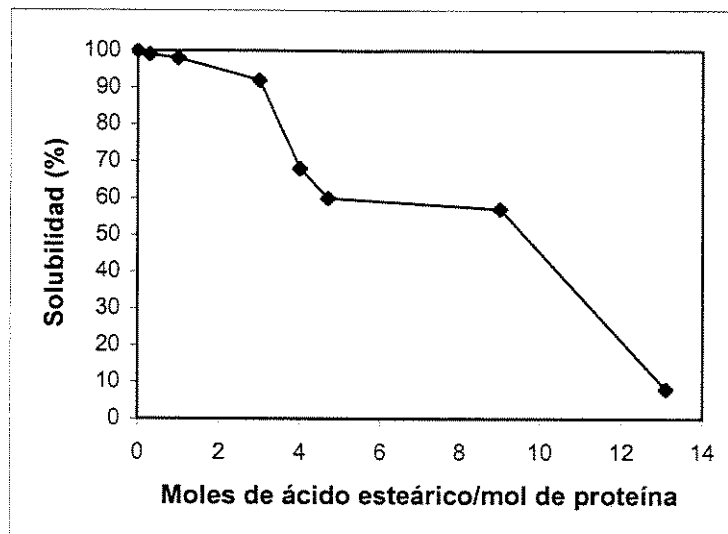


Figura 8. Influência da razão de lipofilização na solubilidade da β -lactoglobulina lipofilizada com N-hidroxisuccinimida de ácido esteárico (Akita & Nakai, 1990a).

A redução da solubilidade não está linearmente relacionada com o aumento dos ácidos graxos; pelo contrário, esta diminuição ocorre por etapas (Figura 8). As ligações com os ácidos graxos fazem desdobrar as proteínas e, assim, novas conformações são descobertas. Quando tais posições são lipofilizadas durante a reação, as proteínas se agregam ainda mais e precipitam, diminuindo sua solubilidade.

Na Tabela 4, mostra-se o efeito da lipofilização sobre a solubilidade de diversas proteínas vegetais.

Tabela 4. Efeito da lipofilização com cloreto de ácido palmítico (C16) sobre a solubilidade de diversas proteínas de origem vegetal, em pH 7.

Proteínas	Prot. não lipofilizadas	Prot. lipofilizadas com C16
Concentrado de gérmen de milho ^a	45,44	24,13
Torta de girassol ^a	36,4	11,4
Concentrado de girassol ^a	13,16	1,44

^a Solução a 4% de proteína a 28 °C por 30 min. Relação proteína:C16 1:1, p/p. (Roussel-Philippe & Barrera-Arellano, 2002).

Propriedades superficiais. A lipofilização tem um efeito marcante sobre as propriedades superficiais. Ao incorporar adequadamente ligantes hidrofóbicos, melhora-se a anfifilicidade da proteína, facilitando seu alinhamento na interface óleo-água. As

proteínas modificadas se beneficiam incrementando sua atividade e estabilidade da emulsão (Tabela 5), assim como, suas propriedades espumantes (Akita & Nakai, 1990a).

A diminuição da tensão superficial é um importante fator na formação e na estabilização de uma emulsão (Puigserver *et al.*, 1979). As primeiras moléculas de um surfactante introduzidas em um sistema bicamada a tuam formando uma monocamada. As moléculas surfactantes restantes se associam umas às outras para formar micelas, que estabilizam o sistema por meio de rearranjos hidrofílicos-hidrofóbicos (Stutz *et al.*, 1973) (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da lipofilização, com éster de N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico, sobre as propriedades emulsificantes e espumantes da glicinina de soja (Kito, 1987)

Proteína	Atividade emulsificante (%)	Expansão de espuma (%)	Estabilidade espuma (%) ^c
Glicinina de soja	100 ^a	101	60
Glicinina de soja-C16	266 ^a	128	90

^a Solução 0,4% proteína em tampão 0,1 M de fosfato de sódio, pH 7 a 25°C. Relação proteína:C16 3:1,p/p.

É importante mencionar que o incremento da atividade emulsificante é proporcional à diminuição do grau de incorporação de ácidos graxos. O corolário indica que em graus de incorporação baixos, a atividade emulsificante aumenta quando a relação óleo:água é menor que 2. Acima desta razão, somente as proteínas altamente lipofilizadas apresentam atividades emulsificantes altas (Haque *et al.*, 1982; Kito, 1987).

A tensão superficial também decresce com o aumento do tamanho do ligante. Quando os ligantes são menores, a ocorrência de formação de agregados é menor. Estes agregados, são produto da associação de monômeros, que favorecem a formação de uma camada continua que reduz a tensão superficial. Desse modo, pode-se dizer que a tensão superficial é inversamente proporcional ao grau de incorporação de ácidos graxos e ao tamanho destes (Haque & Kito, 1984a).

As propriedades espumantes das proteínas também se beneficiam pela lipofilização, especialmente a baixos níveis de incorporação de ácidos graxos. Porém, a estabilidade de uma espuma é dependente de modificações a níveis médios e altos (Haque *et al.*, 1982; Kito, 1987). A diminuição da tensão superficial e interfacial faz com que a proteína

seja capaz de formar filmes estruturados, contínuos e coesivos ao redor das bolhas de ar (Bikerman, 1973). De acordo com esse pesquisador, algumas partículas podem estabilizar a espuma em função da formação de barreiras físicas à coalescência. Desse modo, a união de ácidos graxos, a níveis médios, causa uma maior precipitação de proteínas capazes de formar e manter a espuma ao longo do tempo (Figura 9) (Akita & Nakai, 1990a).

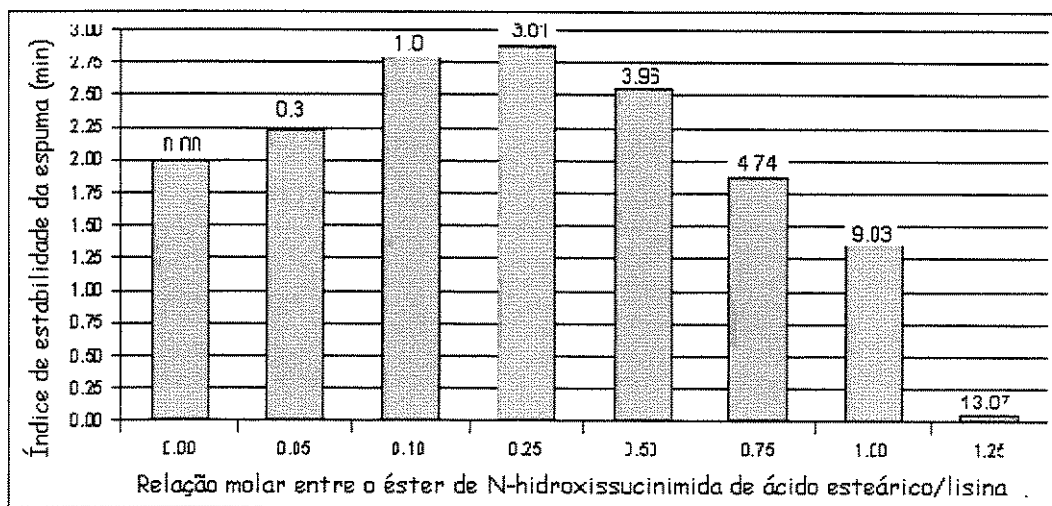


Figura 9. Índice de estabilidade da espuma em relação à taxa de incorporação de ácidos graxos. Lipofilização de β -lactoglobulina com N-hidroxissuccinimida de ácido esteárico. Os valores sobre as barras referem-se à quantidade de ácidos graxos unidos à proteína (Akita & Nakai, 1990a).

A expansão e estabilidade da espuma também são influenciadas pelo tamanho do ligante. À medida que aumenta-se o tamanho dos ácidos graxos, aumentam-se as propriedades espumantes. Por outro lado, a densidade da espuma se comporta inversamente proporcional ao tamanho dos ácidos graxos (Haque & Kito, 1984a; Akita & Nakai, 1990a).

Finalmente, pode-se dizer que a lipofilização é um método de modificação química das proteínas, que pode alterar favoravelmente sua funcionalidade. É fácil de ser implementado e não modifica sensivelmente o valor nutricional das proteínas, permitindo a utilização de proteínas em aplicações, onde em sua forma nativa não teriam uma funcionalidade adequada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAZHU, B.U.C.; MEISSNER, H.P.; NGOOI, C.I.; TANNENBAUM, S.R. Protein-rich flours from palm kernels. **Journal of Food Technology**, v. 14, p. 1-8, 1979

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Lipophilization of β -lactoglobulin: effect on hydrophobicity, conformation and surface functional properties. **Journal of Food Science**, v. 55, p.711-717, 1990a.

ALTSCHUL, A.M.; LYMAN, C.M.; THURBER F.H, Cottonseed meal. In: Processed plant protein foodstuffs. C apitulo 17. 4 69-534. Editado p or: Altschul, A.M. **Academic Press Inc.**, New York. (1958).

ARAI, S.;YAMASHITA, M.; ASO, K.; FUJIMAKI, M. A parameter related to the plastein formation. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 342-351, 1975

BALOGUN, O.O. E xtraction of n itrogen from p alm kernel meal and e valuation of d igestibility of protein isolate from the meal by the in vitro method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 30, p. 1163-1166, 1982.

BALOGUN, O.O.; ODUTUGA A. A. The extraction of nitrogen from the west-African locust-bean seed (*Parkia-Filicoidea Welw*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, p. 868-872, 1981.

BERARDI, L.C.; CHERRY, J. Preparation and composition of co precipitated protein isolates from cottonseed, soybean and peanut flours. **Cereal Chemistry**, v. 56, p. 95-99. 1979

BERARDI, L.C.; MARTINEZ, W.H.; FERNANDEZ, C.J. - Cottonseed protein isolates: two step extraction procedure. **Food Technology**, v. 23, p. 75-82, 1969.

BEUCHAT LR, Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal Agriculture Food Chemistry** v. 25, p. 258-261, 1977.

BIKERMAN, J.J. Foams. **Ed .Springer-Verlas**. N. Y. New York, p. 279, 1973.

CHEFTEL, J.C.; CUQ J.L.; LORIENT, D. Propriete physico-chimiques des amines et des proteines. 2: Proprietes generales des proteines. In: **Proteines alimentaires**. p. 12-26, Ed. TEC & DOC LAVOISER, Paris. 1989.

CHILDS, E.A. Enzymatic-chemical method for extraction of cottonseed protein. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 78-80, 1975.

- CLARK, E.P. Concerning studies on gossypol. II. Concerning the nature of Carruth's gossypol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 76, p. 229-235. 1928.
- CORNELIUS, J.A. Some technical aspects influencing the quality of palm kernels. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 17, p. 57-61, 1965.
- CROMBIE, W. M, Fat metabolism in the west African oil palm (*Elaeis guineensis*). 1. Fatty acid formation in the maturing kernel. **Journal of Experimental Botany**, v. 7, p. 181-193, 1956.
- DE ARAUJO, A.E. Cultura de algodão herbáceo na agricultura familiar. Disponível em: **www.embrapa.org** Data de ingresso: 25 de setembro de 2003. Versão eletrônica Jul, 2003.
- EL TINAY A.H.; CHANDRASEKHAR, H.; RAMANATHAM, G. Protein and gossypol extractability from cottonseed flour. **Journal of the Science and Food Agriculture** v. 31, p. 38-42, 1980.
- EL TINAY A.H.; NOUR, A. M.; ABDEL-KARIM, S.H.; MAHGOUB, S.O. Aqueous protein and gossypol extraction from glanded cottonseed flour: factors affecting protein extraction. **Food Chemistry**, v. 29, p. 53-63, 1988
- FEENEY, R.E. In: "Evaluation of proteins in humans"; Bodwell, C.E., Ed.; Avi Publishing Co.: Westport, C.T. p. 233, 1977b.
- FRANZEN, K.L.; KINSELLA, J.E. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 24, p. 788-795, 1976.
- GARDNER, H.K.; HRON, R.J.; VIX, H.I. Removal of pigment glands (gossypol) from cottonseed. **Cereal Chemistry**, v. 53, p. 549-571, 1976.
- GASTROCK, E. A.; D'AQUIN, E.L.; EAVES, P.H.; CROSS, D.E. Edible flour from cottonseed by liquid classification using hexane. **Cereal Science Today**, v. 14, p. 8-11, 1969
- GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, application. **Food Technology**. v. 40, p. 50-62, 1994
- GRAILLE, J.; ROUSSEL-PHILIPPE, C.; PINA, M. Protein lipophilization by chemical means and biocatalysis. **Biopolimes Science: Food and Non-food Applications**. Montpellier, France, (Inra 1999 – les colloques no. 91), 1998.
- GRANT, D.R. The modification of wheat flour proteins with succinic anhydride. **Cereal Chemistry**, v. 50, p. 417-428, 1973.

- GRONINGER, H.S.; MILLER, R.J. Preparation and aeration properties of an enzyme-modified succinylated fish protein, **Journal of Food Science**, v. 40, p. 327-330, 1975.
- HAQUE, Z.; KITO, M. Lipophilization of α_{s1} -casein. 2. Conformational and functional effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 1231-1237, 1983b.
- HAQUE, Z.; KITO, M. Lipophilization of α_{s1} -casein. 1. Covalent attachment of palmitoyl residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31: p. 1225-1230, 1983a.
- HAQUE, Z.; KITO, M. Lipophilization of α_{s1} -casein. 3. Purification and physicochemical properties of novel amphipathic fatty acyl peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p.1392-1397, 1984a.
- HAQUE, Z.; MATOBA, T.; KITO, M. Incorporation of fatty acid into food protein: palmitoyl soybean glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 481-486, 1982.
- HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationship of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 486, 1985.
- KAVANOV, A.V.; LEVASHOV A.V.; ALAKHOV V. Yu. Lipid modification of proteins and their membrane transport. **Protein Engineering**, v. 3, p. 39-42, 1989.
- KAWAZOE, I.; SATO, N.; SHINA, Y.; SUZUKI, Y.; AINDA, K. Characterization of a lipophilized gelatin prepared by a new method. **Biotechnology Techniques**, v. 10, p. 437-442, 1996.
- KAZAZIS, I., KALAISSAKIS, P. Extraction of nitrogenous from leguminosae- solubility of nitrogen from Vicia-Sativa. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p. 759-765, 1979.
- KILLARA, A.; SHARKASI, T.Y. – Effect of temperature on food proteins and its implication on functional properties. CRC Critical reviews. In: Food Science and Nutrition. Cap. 23 (4), p. 323-395, 1986.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins in food: a survey. CRC Crit. In. **Food Science and Nutrition**, v.7, p. 219-280, 1976.
- KINSELLA, J.E.; DOMODARAN, S.; GERMAN, B. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. In: ALTSHUL, A.A.; WILCKE, H.L. **New protein Food**. Cap. 5, v.5, p. 107-179, 1985.
- KITO M. Chemical and physical lipophilization of proteins. **Journal of American Chemist Society**, v. 64, p. 1676-1681, 1987.

KOELSCH, R.; LASCH, J.; KLIBANOV, A.L.; TORCHILIN, V.P. Incorporation of chemically modified proteins into liposomes. **Acta of Biology and Medicine Germany**, v. 40, p. 331-335, 1981.

LABRUNA, J.C. Biscoitos, macarrões, sabões, cosméticos...Tudo de óleo de palma. **Óleos & Grãos**. v. 57, p. 16-18, 2000.

LAKKIS, J.; VILLOTA, R. Effect of acetylated on sub structural properties of proteins: a study using fluorescence and circular dichroism. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 553-560, 1982.

LEVASHOV, A.V.; KABANOV, A.V.; NAMETKIN, S.N.; MARTINEK, K.; BEREZIN, I.V. Translocation of hydrophobized proteins (enzymes) into liposomes. **Dokl Akad. Nauk, SSSR**, 248:755-758. (Russia); **DAN (Engl. Ed)** 284, p.306-309, 1985.

LIADAKIS, G. N.; FLORIDIS A.; TZIA C., OREOPOULOU V. Protein Isolates with reduced gossypol content from screw-pressed cottonseed meal. **American Chemical Society**, v. 41, p. 918-922, 1993.

MANGINO, M.E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 2711-2718, 1984.

MARTINEZ, W.H.; BERARDI, L.C.; GOLDBLATT, L.A. – Cotton seed protein products- composition and functionality. **Journal of Agriculture and Food chemistry**, v. 18, p. 961-966, 1970.

McELWAIN, M.; RICHARDSON, T.; AMUNDSON, C.J. Some functional properties fo succinylated single cell protein concentrate. **Journal of Milk and Food Techology**, v. 38, p. 521-526, 1975.

MESSINGER, J.K.; RUPROW, J.H.; ZEECE, M.G.; ANDERSON, R.L. Effect of partial proteolysis and succinylation on functionality of corn germ protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1620-1624, 1987.

MORRISEY, P., MULVIHILL, D.M., O'NEAL, E.M. Functional properties of muscle properties. In: Hudson, B.J.F. Developments in food protein – 5. London: **Elsevier Applied Science**, p. 195-256, 1987.

MOSS, A.R., GIVENS, D.I. The chemical composition, digestibility, metabolizable energy content and nitrogen degradability of some protein-concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 47, p. 335-351, 1994.

- NOYES, R. **Protein food supplements**. Fd. Proc. Rew. No 3, Noyes Development Corporation, Park Ridge, N.J, USA, 232 p, 1969.
- PUIGSERVER, A.J.; SEN, L.C.; GONZALES-FLORES, E.; FEENEY, R.E.; WHITAKER, J.R. Covalent attachment of amino acids to casein. 1. Chemical modification and rates of *in vitro* enzymatic hydrolysis of derivates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 27, p. 1098-1104, 1979.
- ROUSSEL-PHILIPPE, C. – Etude de différents procédés de lipophilisation des protéines. Application aux protéines de soja et au gluten de blé, France, p. 217. These Docteur. Institut National Polytechnique de Toulouse. 1998
- ROUSSEL-PHILIPPE, C.; BARRERA-ARELLANO, D. Valorização de Matérias-primas oleaginosas : Lipofilização de farelos e tortas protéicas. Lab. Óleos e Gorduras, FEA/UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil. Relatório FAPESP, Processo No. 2000/10418-2, p. 81, 2002
- ROUSSEL-PHILIPPE, C.; PINA, M.; GRAILLE. Chemical lipophilization of soy protein isolates and wheat gluten. **European Journal of Lipids and Science Technology**, v. 2, p. 97-101, 2000.
- SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K.; ADSULE, R.N.; KADAM, S.S.- World Oilseeds. **Chemistry, Technology, and Utilization**. 2da. Edic., Editora AVI Book, Van Nostrand Reinhold, 1992.
- SGARBIERI, W.C. Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades, degradações, modificações., 2da. Edic., São Paulo, **Livraria Varela**, p. 517, 1996
- SHEMER M.; MIZRAHI S.; BERK, Z.; MOKADY, S. Effect of processing conditions on isolation of cottonseed protein by sodium hexametaphosphate extraction method, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 21, p. 460-462, 1973.
- SMITH, J.L.; YADA, R.Y. Lipophilization of *Mucor miehei* aspartyl proteinase: effect on structure-function and stability. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 331-346, 1991.
- SREEDHARA, N.; ARUMUGHAN, C., NARAYUNAN, C.S. Dehulling of palm kernel of oil palm (*Elaeis guineensis*) to obtain superior-grade palm kernel flour and oil. **Journal of American Chemist Society**, v. 69, p. 1015-1018, 1992.
- SREEDHARA, N.; KURUP, P. – Effect of hydrochloric acid treatment of palm kernel for dehulling on the nutritional quality of kernels protein. **Journal of Science and Food Agriculture**. v. 77, p. 435-440, 1998.

STUTZ, R.L.; DEL VECCHIO, A.J.; TEENEY, R.J.; PATTERSON CO, C.J. The role of emulsifier and dough conditioners in food. **Food Production Dev**, v. 7, p.52, 1973.

TORCHILIN, V.P.; OMEL'YANENKO, V.G.; KLIBANOV, A.L.; MIKHAILOV, A.L.; GOL'DANSKII, V.I.; SMIRNOV, V.N. Incorporation of hydrophilic protein modified with hydrophobic agent into liposome membrane. **Biochemistry and Biophysics Acta**, 602, p.511-521, 1980.

VIOQUE, J., SANCHEZ-VIOQUE, R., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., MILLAN, F. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, p. 447-450, 2000.

WHITAKER, J.R., FEENEY, R.E. Chemical and physical modification of proteins by the hydroxide ion. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. V. 19, p. 173-212, 1983.

WOOD, B.J. Growth and production of oil palm fruits. In: **Palm Oil**. Ed. John Wiley & Sons, New York, USA., p. 11-28, Editada por Gunstone, F.D. 1987

CAPITULO 2
EFFECTO DE LA LIPOFILIZACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES
DE LA HARINA DE PALMISTE (*Elaeis guineensis*)

Artigo para submeter à revista científica:

Grasas y Aceites

Efecto de la lipofilización sobre las propiedades funcionales de la harina de palmiste (*Elaeis guineensis*).

Maria Lamus Uvarova, Daniel Barrera-Arellano

Laboratório de Óleos e Gorduras-Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)-

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6091

CEP 13081-970, Campinas, SP, Brasil

Laboratorio de Óleos e Gorduras (Tel/Fax: (55) 19 3289-1186)

E-mail: muvarova@hotmail.com, daniel@fea.unicamp.br

RESUMEN

Efecto de la lipofilización sobre las propiedades funcionales de la harina de palmiste (*Elaeis guineensis*).

Se estudiaron las propiedades funcionales de las proteínas presentes en la harina de palmiste, obtenida a partir de almendras con y sin testa. La remoción de la testa con HCl 4 N permitió disminuir la concentración de polifenoles, lo que significó obtener una harina de mejor color (crema claro) y textura. Se estudió la lipofilización de las proteínas de la harina de palmiste para evaluar los cambios en las propiedades funcionales y compararlos con las propiedades de las tortas no modificadas. Las propiedades medidas fueron: solubilidad, capacidad de retención de agua (CRA) y capacidad de retención de aceite (CRAC), capacidad emulsionante (CE), actividad emulsionante (AE), estabilidad de la emulsión (EE), expansión de la espuma (EEsp) y estabilidad de la espuma (EsEsp). La lipofilización de la torta sin testa se probó en dos proporciones de proteína:cloruro de ácido palmítico, 1:0,5 y 1:1, p/v. La solubilidad y la CE disminuyeron, sin embargo las otras propiedades o se mantuvieron constantes (CRA) o aumentaron notablemente. La lipofilización con menor concentración de ácidos grasos (relación proteína:cloruro de 1:0,5) mostró mayores valores en las propiedades funcionales medidas.

PALABRAS CLAVES: Harina de palmiste, modificación química, proteínas, lipofilización, solubilidad, propiedades funcionales.

SUMMARY

Effect of lipophilization on functional properties of palm kernel flour (*Elaeis guineensis*).

Functional properties of proteins presented in palm kernel flour were studied, started with almonds with and without testa. Removal of testa with HCl permitted a decrease of the polyphenol concentration, besides conferring the flour a light cream color. Lipophilization of the proteins of palm kernel was studied in order to evaluate the changes on functional properties and compare them to the properties of non-modified flour. Properties measured were solubility, water retention capacity (WRC) and fat retention capacity (FRC), emulsion capacity (EC), emulsion activity (EA), emulsion stability (ES), foam expansion (FE) and foam stability (FS). Lipophilization of the cake without testa was tested in two protein:palmitoyl chloride ratios: 1:0.5 and 1:1, w/v. Solubility and EC decreased, however, the other properties either kept constant (WAC) or increased markedly. Lipophilization with a lower concentration of fatty acids (1:0.5 protein:palmitoyl chloride ratio) showed higher values for functional properties.

KEY WORDS: *Palm kernel flour, chemical modification, proteins, lipophilization, solubility, functional properties.*

1. INTRODUCCIÓN

La torta de palmiste es un subproducto de la industria de aceite de palma. Posterior a la extracción de aceite, la torta generalmente se utiliza para alimentación animal y siempre en menores proporciones que otras tortas de oleaginosas (Cornelius, 1966, 1983; Tang y Teoh, 1985).

La harina de palmiste proviene de la extracción por solvente de la torta de palmiste. Ambas son mal toleradas por los animales porque son extraídas junto con la testa, que posee compuestos fenólicos que son fácilmente oxidados en quinonas, las cuales interactúan con los grupos tióles y/o grupos amina formando complejos insolubles (Sreedhara y Kurup, 1998).

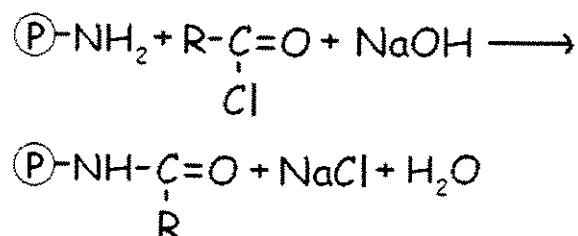
Actualmente, las aplicaciones de las proteínas de palmiste han sido poco estudiadas, aunque la producción global de aceite de palma haya aumentado considerablemente año tras año, y puede representar, consecuentemente, una materia prima disponible a bajo costo. Aún más interesante podría ser el uso de las almendras enteras de palmiste en la producción de harinas con características sensoriales y tecnológicas, mejoradas.

La remoción de la testa ha sido estudiada por Sreedhara *et al.*, (1992) que evaluó su valor nutricional para posible uso en alimentación. Balogun (1982) concentró proteínas de la torta de palmiste, lo cual aumentó la digestibilidad en comparación a la torta original, con un alto potencial de mejoramiento para la alimentación animal.

La valorización de la harina de palmiste solo será posible si sus propiedades funcionales y tecnológicas fueran mejoradas, ya que sus proteínas poseen poco interés en el ámbito industrial. Una tecnología disponible, y sin embargo poco estudiada, es la lipofilización de proteínas. Esta modificación química de proteínas altera básicamente las características hidrofílicas / hidrofóbicas mediante la incorporación de grupos lipofílicos en las moléculas, mejorando la afinidad de las proteínas con compuestos o sistemas hidrofóbicos.

La acilación de las proteínas con grupos hidrofóbicos puede ser realizada con ésteres de N-hidroxisuccinamida (Haque *et al.*, 1982), anhídridos succínico o acético (Messinger *et al.*, 1987) o cloruros de ácidos grasos (Roussel-Philippe *et al.*, 2000). La acilación ha sido aplicada a diversas proteínas vegetales, como los del trigo (Barber y Warthesen, 1982; Roussel-Philippe *et al.*, 2000), de soya (Franzen y Kinsella, 1976; Haque y Kito, 1982; Aoki *et al.*, 1981), de algodón (Choi *et al.*, 1983), de girasol (Schwenke *et al.*, 1986), entre otras.

En la reacción de lipofilización, el cloruro de ácido graso reacciona con los grupos amina libre, en medio alcalino, resultando en la inclusión de ácidos grasos en la molécula proteica (Roussel-Phillipe *et al.*, 2000).



El objetivo de este trabajo fue evaluar, como primera etapa, la influencia de la testa en las propiedades funcionales de la torta de palmiste. Posteriormente, se estudiaron los efectos de la lipofilización en las propiedades funcionales, como la solubilidad, capacidad de retención de agua y aceite y las propiedades superficiales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas.

Almendras enteras de palmiste (*Elaeis guineensis*), cedidas por Agropalma, S.A, (Brasil), cosecha 2002.

Cloruro de ácido palmítico de AZKO Chemicals (Francia).

Preparación de la harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST).

Para la preparación de la harina de palmiste con testa se partió de las almendras, que fueron molidas en molino de cuchillas e desgrasadas en extractor soxhlet con hexano por 8 h. La harina fue secada a 60°C y posteriormente molida en molino (Foos Tecator, Knifetec 1095 Sample Mill) por 15 seg, y tamizada por malla de 0,485mm.

Para preparar la harina de palmiste sin testa se partió de las almendras de palmiste. Las almendras se limpiaron y se separaron manualmente de aquellas que se encontraban quebradas y con fibras externas dañadas, seguidas de secado a 40°C en horno con aire circulante, por 1 h. La remoción de la testa se realizó según el método de Sreedhara *et al.* (1992). Una muestra de 20 g de almendras se trató con HCl 4N a una temperatura de 95°C por 8 min (relación de almendras:ácido de 1:1.5 p/v) bajo constante agitación. Las almendras tratadas se lavaron con exceso de agua para retirar el ácido residual. En esta etapa, la testa estaba blanda y se retiró manualmente. Las almendras se almacenaron en congelador y posteriormente fueron molidas. La extracción de la fracción lipídica se hizo en extractor soxhlet con hexano por 8 h, obteniéndose la harina de palmiste sin testa (HPST). La harina fue molida nuevamente y tamizada por malla de 0,485mm.

Debido a sus características y propiedades más adecuadas, la harina de palmiste sin testa fue lipofilizada.

Métodos analíticos

Humedad, ceniza y nitrógeno fueron determinados por triplicata según los métodos de AOCS (1997). La proteína bruta fue calculada multiplicando por el factor 6,25. (Sreedhara y Karup, 1998)

La composición de aminoácidos fue determinada según el método de Spackman *et al.*, (1958). Los compuestos fenólicos fueron determinados en HPST y HPCT, según el método de Sodini y Canella (1977). Muestras por duplicado (0,5 g cada) fueron extraídas por reflujo con 100 mL de etanol / agua (80/20, v/v) a pH 4,3, por 4 h. Las muestras fueron enfriadas, centrifugadas (Heraeus Sepatech, Suprafuge 22, rotor HF 22.50) a 12500 g, por 10 min. La lectura de la absorbancia fue hecha en el sobrenadante, a 700 nm. Los resultados fueron expresados en términos de ácido tánico (ppm). Proteínas, polifenoles y contenido de ceniza se expresaron sobre la materia seca.

Reacción de lipofilización

La HPST se lipofilizó siguiendo el proceso de Roussel-Philippe *et al.*, (2000) como sigue: la harina se dispersó en agua, relación harina:agua de 1:5, p/v, y el pH ajustado a 9 con NaOH 4 N a temperatura ambiente (30°C) bajo a agitación magnética constante. La reacción se llevó a cabo por adición de cloruro de ácido palmítico, gota a gota, manteniendo el pH en 9,0. Las relaciones de proteína de HPST y cloruro de ácido palmítico estudiadas fueron 1:1 y 1:0,5, p/p. Después de 30 min, el pH de la dispersión se ajustó a 7,0. Una alícuota fue retirada para la determinación de ácidos grasos libres y totales. El resto de la dispersión se llevó a pl (pH 4,3) con HCl 6N y se centrifugó (Heraeus Sepatech, Suprafuge 22, rotor HF 12.500) a 18000 g, por 20 min. Los residuos fueron lavados dos veces con agua acidificada a pH 4,3 y centrifugados bajo las condiciones anteriores. Las respectivas tortas lipofilizadas fueron secadas en horno con aire circulante a 40°C por 24 h, molidas, tamizadas (0,485 mm) y almacenadas en congelador a 4°C hasta su utilización.

Determinación de los ácidos grasos unidos covalentemente (AGC).

Los ácidos grasos presentes en las proteínas de las harinas lipofilizadas se determinaron según el método de AOAC 922.06 (1990). Para la determinación de los ácidos grasos totales (AGT), 2 g de harina lipofilizada fue hidrolizada con HCl 6N, filtrada en papel S&S 589 y lavada. El papel filtro, con la muestra, se secó en estufa a 105°C por 1 h y posteriormente extraído con éter etílico.

La determinación de los ácidos grasos libres (AGL) se hizo por extracción con éter etílico a partir de 1,5 g de harina lipofilizada. Los ácidos grasos unidos covalentemente (AGC) a la proteína son la diferencia entre los AGT y los AGL. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Medición de las propiedades funcionales

Solubilidad (Nitrogen Solubility Index, NSI)

El NSI de la HPCT y la HPST se determinó a diferentes valores de pH y en los productos lipofilizados, a pH 7,0, según el método de Rahma y Narasinga (1979), como sigue: muestras de 3 g fueron dispersadas en 30 mL de agua a temperatura ambiente (30°C). El pH de las dispersiones fue ajustado con NaOH 0,5N o HCl 0,5N. Estas permanecieron en constante agitación magnética, siendo posteriormente centrifugadas (rotor HF 22.50) a 12,500 g, por 20 min. Alícuotas de 5 mL se retiraron posteriormente, para determinar su contenido de nitrógeno (micro-Kjeldahl). El NSI se expresó como nitrógeno soluble en la alícuota con relación al nitrógeno total. Las mediciones fueron realizadas por duplicado.

Capacidad de retención de agua (CRA) y capacidad de retención de aceite (CRAC)

Muestras de 2 g fueron completadas con 15 mL de agua (CRA) o 10 mL de aceite de soya (CRAC) en un tubo para centrífuga de 50 mL, previamente pesado. El tubo fue agitado en Vortex por 2 min y centrifugado (rotor HF 22.50) a 750 g, por 20 min, según el método de Rahma y Narasinga (1983). El tubo fue pesado después del descarte del sobrenadante, y la CRA y la CRAC fueron expresados como g de agua o aceite retenidos/g de muestra seca. El procedimiento fue repetido 5 veces. Todas las mediciones de la CRA fueron hechas a pH 7.

Propiedades superficiales

La actividad emulsionante (AE) y la estabilidad de la emulsión (EE) se determinaron según el método de Yasumatsu *et al.*, (1972) modificado como sigue: La AE se estimó suspendiendo 1 g de muestra en 15 mL de agua en tubo para centrífuga graduado, seguido de agitación utilizando un homogenizador Ultraturrax (IKA-WERK) a 20000 rpm, por 30 seg. Inmediatamente después, la dispersión fue emulsionada con 15

mL de aceite de soya con el Ultraturrax, por 90 seg. Los tubos fueron centrifugados (rotor HF 22.50) a 750 g, por 5 min. La AE se calculó como la altura de la capa emulsionada/altura total x 100. La EE se determinó calentando la emulsión a 80 °C por 30 min, enfriando con agua y centrifugando a 2500 rpm, por 5 min. El resultado fue expresado de la misma manera que la AE. Los resultados obtenidos son el promedio de cuatro repeticiones.

La capacidad emulsionante (CE) se realizó según el método de Swift *et al.*, (1961) modificado. Las muestras (1% de proteína) se ajustaron a diferentes pH con NaOH 1N o HCl 1N, por 30 min (recipientes de Ø= 7cm). Los recipientes fueron enfriados en baño de hielo y la dispersión fue agitada con Ultraturrax a 20000 rpm, por 30 seg. En ese instante, se adicionó aceite de soya desde una bureta graduada a una velocidad de 1,4 mL/seg, mientras dos electrodos fueron conectados a un amperímetro para la medición de la resistencia (KΩ). El punto de inversión se detectó por el amperímetro cuando la lectura de la resistencia es infinita (inversión de una emulsión de aceite en agua a una emulsión de agua en aceite). La CE se expresó en mL de aceite emulsionado/g de muestra, siendo realizadas 10 repeticiones.

La expansión (EEsp) y la estabilidad (EsEsp) de la espuma se determinó según el método de Puski (1975) modificado: una dispersión de 1% de proteína fue agitada con Ultraturrax a 20000 rpm, por 90 seg. El volumen se registró y la expansión de espuma se expresó como volumen de la espuma/volumen antes de la agitación x 100. La estabilidad de la espuma (EsEsp) se registró después de 30 y 120 min de reposo de la muestra.

Análisis estadístico

Los experimentos para las mediciones de las propiedades funcionales fueron conducidos de forma casualizada. Se utilizó el programa *STATISTICA 5.0* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A) aplicando análisis de varianza y teste de *Tukey*, con nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se presenta la composición centesimal de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST).

La remoción de la testa no modifica significativamente la composición centesimal de la harina de palmiste (únicamente la concentración de polifenoles y taninos), resultando una

harina de color crema clara y textura mejorada. La coloración de la HPCT se presentó marrón oscura, debido a la testa. La remoción de la testa en las harinas disminuyó aproximadamente 65% de los constituyentes fenólicos con relación a la HPCT, sin embargo, el contenido de proteína se mantuvo igual si comparamos los resultados obtenidos por Sreedhara y Karup (1998), en el cual el aumento de proteína representó más de 8% a la proteína inicial. Los taninos son conocidos por unirse con las proteínas como mecanismo de defensa contra los insectos (Barry y Duncan, 1985; Yu *et al.*, 1995). La harina de palmiste sin testa fue la escogida para ser lipofilizada debido a sus mejores características, como mejor color y menor concentración de polifenoles.

El proceso de lipofilización de la HPST, en las relaciones proteína:cloruro de 1:1 y 1:0,5, permitió recuperar, respectivamente, 87,7 y 85,4 % (en el pl) de las proteínas originales, debido principalmente a los efectos de dilución. Se observó que la cantidad de ácidos grasos unidos a las proteínas de las harinas lipofilizadas (Tabla II) fue mayor que la cantidad de moles de lisina presentes en la proteína de la harina de palmiste (254,69 μ moles lisina/g de proteína). En la HPST;1:1, la cantidad de ácidos grasos unidos covalentemente (AGC) a la proteína fue 3 veces más que la cantidad de lisina presente y en la HPST;1:0,5 fue 1,7 veces. Estos resultados sugieren que el cloruro de ácido palmítico, además de reaccionar con la lisina, también puede reaccionar con otros sitios nucleofílicos, como residuos libres hidroxilo de la treonina, serina y tirosina, y residuos sulfidrilo de la cisteína.

Roussel-Philippe (2001) reportó una diferencia significativa entre la cantidad de ácidos grasos ligados covalentemente (AGC) y la cantidad de lisina presente en las harinas de maíz y de girasol (lipofilizados en proporción proteína:cloruro de ácido palmítico de 1:1, p/p), que fue de 4,5 y de 6 veces, respectivamente.

La solubilidad es una propiedad físico-química fundamental que depende del peso molecular, naturaleza y concentración de iones, pH y temperatura y que se manifiesta en un equilibrio entre las interacciones solvente-proteína y proteína-proteína (Sgarbieri, 1996; Kinsella *et al.*, 1985). Las condiciones que afectan el equilibrio a favor de las interacciones proteína-proteína disminuyen la solubilidad, y las condiciones que favorecen las interacciones proteína-solvente la incrementan. Las fuerzas que participan en estas interacciones son electrostáticas, hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno (Kinsella *et al.*, 1985). La solubilidad también es afectada por las condiciones aplicadas en el procesamiento, como calentamiento, uso de solventes, pH, tamaño de partícula, etc.

En la Figura 1, se presenta la curva de solubilidad de las HPST y HPCT. Como se puede observar, el proceso de remoción de la testa ocasiona una reducción de la solubilidad (menos de 10% a valores de pH alcalinos) y un pH isoelectrico mal definido, debido probablemente al uso de soluciones ácidas, altas temperaturas, tamaño de partícula, etc. Balogun (1982), trabajando con aislados proteicos de palmiste, observó la reducción en la solubilidad al retirar la testa, así como un aumento de la digestibilidad.

El efecto de la lipofilización sobre la solubilidad se muestra en la Figura 2. A pH 7,0, tanto la HPST;1:1 como la HPST;1:0,5, mostraron disminución en su solubilidad. Es difícil afirmar que exista una desnaturalización, propiamente dicha, asociada a la lipofilización de las proteínas de la harina de palmiste o de las proteínas en general, pero es evidente que esta transformación afecta directamente su comportamiento funcional. En la lipofilización de lactoglobulina con ácido esteárico, Akita y Nakai (1990a) observaron una correlación entre la disminución de la solubilidad y la cantidad de ácidos grasos unidos.

Las proteínas, en presencia de solventes orgánicos y a pH alcalinos, sufren una reorganización, en la cual los grupos hidrofóbicos (ácidos grasos) son expuestos, mientras los residuos hidrofílicos pasan a ocupar el interior de la molécula proteica. Las interacciones entre los residuos hidrofóbicos aumentan, provocando un estado de alta agregación y, consecuentemente, la precipitación de las proteínas (Akita y Nakai, 1990a).

Las propiedades superficiales están relacionadas a la capacidad de las proteínas de disminuir la tensión superficial entre los componentes hidrofílicos del medio y dependen principalmente de la composición y conformación de las proteínas presentes (Kinsella, 1976). Las propiedades emulsionantes son mínimas en el pH isoelectrico de las proteínas y tienden a aumentar con el aumento del pH. Los respectivos datos son presentados en la Tabla III.

La capacidad emulsionante a pH 7,0 mostró una disminución de 44% en la HPST frente a la HPCT, probablemente debido al tratamiento ácido y altas temperaturas aplicadas para retirar la testa. En el punto isoelectrico, la CE fue menor que a pH 7,0. La desnaturalización y/o factores que afectan la solubilidad o la conformación nativa, como temperatura, pH y efectos iónicos, intervienen directamente en la flexibilidad de las proteínas (Graham y Phillips, 1975; MacRitchie, 1978; Tornberg, 1978 a,b).

En la harinas lipofilizadas, la capacidad emulsionante a pH 7,0 disminuyó frente a las harinas no modificadas (Tabla III), posiblemente debido a la disminución de la solubilidad que presentaron los productos lipofilizados y a efectos estéricos, que impiden

la apertura de los segmentos polares en el medio acuoso. La reducción de la CE en las harinas 1:0,5 y 1:1, fue del orden de 68 % y 66% frente a la HPCT sin lipofilizar.

La AE y EE son mas dependientes del carácter hidrofóbico a nivel superficial que posee una proteína. La lipofilización aumentó la AE y la EE en la HPST;1:0,5 más de 1000% y 300%, respectivamente, en comparación a la muestra de HPST sin lipofilizar. La HPST;1:0,5 tuvo mayor AE y EE frente a la HPST;1:1, en orden de 7,5% y 43%, respectivamente (Figura 3). La relación agua y aceite estudiada en la AE y EE fue de 1. Este comportamiento fue relatado por Kito (1987) en la lipofilización de α_{s1} -caseína. La AE fue mayor cuando la proporción de incorporación de los AG fue menor a una relación agua:aceite entre 0,5 y 2,0. Kato y Nakai (1980) demostraron una alta correlación entre la hidrofobicidad molecular y las propiedades superficiales de las proteínas. Al incorporar ácidos grasos, la tensión superficial disminuye y la capa superficial de las proteínas sobre las gotas de aceite aumenta. En el pl, las harinas originales y las lipofilizadas no mostraron ninguna actividad emulsionante.

Para que una proteína tenga buenas propiedades espumantes, debe por lo menos cumplir con dos funciones: reducir la tensión superficial (e interfacial) entre el líquido y a burbuja de aire y con un grado de desnaturación superficial, acentuar las interacciones proteína-proteína que permitan la formación de una película cohesiva (Kinsella, 1976). La expansión de la espuma (a pH 7,0) en la HPST;1:0,5, representó un aumento superior de 300% con relación a la harina no modificada. La lipofilización probablemente causó la disminución de la espesura de la capa interfacial, favoreciendo la formación de la espuma y su estabilidad a través del tiempo (Figura 4). La estabilidad de la espuma (EsEsp) de las harinas de palmiste lipofilizadas mostraron variaciones no significativas a través del tiempo (30 y 120 min). En el pH isoelectrico, la ExEsp de la HPST;1:0,5 fue mayor que a pH 7,0, debido al aumento de las interacciones proteína-proteína y de la cohesión intermolecular, que reducen al máximo la tensión superficial. En la Figura 4, se muestra que a medida que aumentó el grado de incorporación de AG, disminuyeron la ExEsp y la EsEsp, y que en general las propiedades superficiales fueron beneficiadas por la lipofilización, como consecuencia del aumento de las interacciones hidrofóbicas, con excepción de la CE.

La CRA no mostró gran variación entre las harinas con y sin testa y sus lipofilizados (Tabla IV). La CRA fue mayor en la HPST en comparación con las demás muestras, probablemente debido al proceso de remoción de la testa. Huffman *et al.*, (1975) reportaron que diferentes variedades de harinas de girasol presentaron un

aumento de la CRA cuando la solubilidad disminuyó, producto de algún tipo de desnaturación.

La CRAC de las harinas originales fue similar y muy baja, sin embargo, la lipofilización aumentó la CRAC, debido al carácter lipofílico de las moléculas. El aumento de la CRAC fue proporcional al aumento de ácidos grasos incorporados que fue de 1,5 y 2,8 veces en la HPST;1:0,5 y HPST;1:1, respectivamente, en comparación a la harina sin testa no lipofilizada. Roussel-Philippe (2001) reportó un aumento de 2,5 veces en la CRAC en la harina de girasol lipofilizada y 1,5 veces en la harina de maíz lipofilizada en una relación proteína:cloruro de ácido palmítico de 1:1, p/p.

La remoción de la testa permitió obtener una torta de bajo contenido de polifenoles, de propiedades más adecuadas para la obtención de productos de mayor valor agregado.

La lipofilización ocasionó un aumento general de las propiedades funcionales, destacándose la AE, EE, ExEsp y EsEsp, sin embargo la solubilidad, la CRA y la CE disminuyeron significativamente. Los mayores valores fueron obtenidos cuando se utilizó una relación proteína:cloruro menor (HPST;1:0,5).

La influencia de otros componentes en la materia prima vegetal, como los carbohidratos, fibras, etc, no fueron estudiados en este trabajo, sin embargo, es imposible ignorar sus contribuciones en las propiedades funcionales a las proteínas de la harina de palmiste.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, y al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, por el auxilio financiero y por la beca concedida.

4. BIBLIOGRAFÍA

Akita, E.M., Nakai, S. (1990a). Lipophilization of β -lactoglobulin: Effect on hydrophobicity, conformation and surface functional properties. *J. Food Sci*, **55**, 711-717.

AOAC (1990). Official Methods of Analysis, 15th Ed.. K. Helrich Editor. Association of Official Analytical Chemist Inc., Washington, DC.

AOCS (1997) Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. 5th Ed. Ed. Firestone D., AOCS Press, Champ, IL.

Aoki, H., Taneyama, O., Orimo, N., Kitagawa, I. (1981). Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. *J. Food Sci*, **46**, 1192-1195.

Balogun, O.O. (1982). Extraction of nitrogen from palm kernel meal and evaluation of digestibility of protein isolate from the meal by the in vitro method. *J. Agric. Food Chem*, **30**, 1163-1166.

Barber, J.K., Warthesen, J.J. (1982). Some functional properties of acetylated wheat gluten. *J. Agric. Food Chem*, **30**, 930-934.

Barry, T.N., Duncan, S.J. (1985). The role of condensed tannins in the nutritional values of *Lotus pedunculatos* for sheep. *Br. J. Nutr*, **54**, 211-217.

Choi, Y.R., Lusas, E.W., Rhee, K.C. (1983). Molecular structure and functionalities of protein isolates prepared from defatted cottonseed flour succinylated at various levels. *J Food Sci*, **48**, 1275-1280.

Cornelius, J.A. (1966). Some technical aspects influencing the quality of palm kernels. *J. Sci. Food Agric*, **17**, 57-61.

Cornelius, J.A. (1983). Processing of oil palm fruit and its products. Tropical Products Institute, Grays Inn Road, London, UK, 22-34.

Franzen, K.L., Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J. Agric. Food Chem*, **24**, 788-795.

Graham, D. E., Phillips, M.S. (1975). The conformation of proteins at interfaces and their role in stabilizing emulsion. En: Proc. Symp. Theory and Practice of emulsion technology, Brunel University. Smith, A.L., Ed., Academic Press, London.

Haque, Z., Matoba, T., Kito, M. (1982). Incorporation of fatty acid into food protein: palmitoyl soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem*, **30**, 481-486.

Haque, Z., Kito, M. (1982). Lipophilization of soybean glycinin: covalent attachment to long chain fatty acids. *Agric. Biol. Chem*, **46**, 597-599.

- Huffman, V.L., Lee, C.K., Burns, E.E. (1975). Selected functional properties of sunflower meal. *J. Food Sci*, **40**, 70-74.
- Kato, A., Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **624**, 13.
- Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of proteins in food: a Survey. *CRC Critical-Reviews in Food. Sci. Nutr*, **7**, 219-280.
- Kinsella, J.E., Domodaran, S., German, B. (1985). Physicochemical and functional properties of oilseed protein with emphasis on soy proteins. En: *New Protein Foods*, vol. **5**, 107-179. Academic Press Inc., Orlando.
- Kito, M. (1987). Chemical and physical lipophilization of proteins. *JAOCS*, **64**, 1676-1681.
- MacRitchie, F. (1978). Differences in baking quality between wheat flours. *J. Food Sci.* **13**, 187-194
- Messinger, J.K., Rupnow, J.H., Zeece, M.G., Anderson, R.L. (1987). Effect of partial proteolysis and succinylation on functionality of corn germ protein isolates. *J. Food Sci*, **52**, 1620-1624.
- Puigserver, A.J., Sen, L.C., Gonzales-Flores, E., Feeney, R.E., Whitaker, J.R. (1979). Covalent attachment of amino acids to casein.1. Chemical modification and rates of in vitro enzymatic hydrolysis of derivatives. *J. Agric. Food Chem*, **27**, 1098-1104.
- Puski, G. (1975). Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. *Cereal Chem*, **52**, 655-664.
- Rahma, E.H., Narasinga, M.S. (1979). Characterization of sunflower proteins. *J. Food Sci*, **44**, 579-582.
- Rahma, E.H., Narasinga, M.S. (1983). Effect of acetylation and succinylation of cottonseed flour units functional properties. *J. Agric. Food Chem*, **31**, 352-355.
- Roussel-Philippe, C. (2001). Lipofilização das proteínas de milho, girassol e babaçu. Proyecto de pos-doctorado. Proyecto FAPESP, No. 2000/10418-2. UNICAMP. Lab. Óleos e Gorduras.
- Roussel-Philippe, C., Pina, M., Graille, J. (2000). Chemical lipophilization of soy protein isolates and wheat gluten. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **2**, 97-101.
- Schwenke, K.D., Linow, K.J., Zirwer, D. (1986). Modification of the oligomeric structure of 11S globulin from sunflowers (*Helianthus annuus L.*) and rape (*Brassica napus L.*) seeds by succinylation. *Nahrung*, **30**, 263-270.

Sgarbieri, V.C. (1996). Proteínas em alimentos protéicos, p. 265-266. Livraria Varela., São Paulo.

Sodini, G., Canella, M. (1977). Acidic Butanol removal of color-forming phenols from sunflower meal. J. Agric. Food Chem, **25**, 822-825.

Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Analytical Chemistry. Washington, **30**, p 1190-1206,.

Sreedhara, N., Arumughan, C., Narayanan, C.S. (1992). Dehulling of palm kernel of oil palm (*Elaeis guineensis*) to obtain superior-grade palm kernel flour and oil. JAOCS, **69**, 1015-1018.

Sreedhara, N., Karup, P.A. (1998). Effect of hydrochloric acid treatment of palm kernel for dehulling on the nutritional quality of kernel protein. J. Sci. Food Agric, **77**, 435-400.

Swift, C.E., Lockett, C., Fryar, A.J. (1961). Comminuted meat emulsions- the capacity of meats for emulsifying fat. Food Technol, **15**, 468-473.

Tang, T.S., Teoh, P.K. (1985). Palm kernel oil extraction the Malaysian experience. J. Am. Oil Chem. Soc, **62**, 254-258.

Tornberg, E. (1978a). Functional characterization of protein stabilized emulsions-creaming stability J. Food Sci. **43**, 1559-1568.

Tornberg, E. (1978b). Functional characterization of protein stabilized emulsions-emulsifying behavior of proteins in a valve homogenizer. J. Sci. Food Agric. **29**, 867-879.

Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., Ishii, K. (1972). Whipping and emulsifying properties of soybean products. Agr. Biol. Chem, **36**, 719-727.

Yu, F., Barry, T.N., McNabb, W.C., Mouhan, P.J., Wilson, G.F. (1995). Effect of bound condensed tannin from cottonseed upon in situ protein solubility and dry matter digestion in the rumen. J. Sci. Food Agric, **69**, 311-320.

Tabla I

Composición centesimal de la harina de palmiste sin testa (HPST) y con testa (HPCT)

Componentes	HPCT	HPST
Sólidos totales (%)	89,3±0,8	88,8±0,5
Lípidos residuales (%)*	<0.1	<0.1
Proteínas (%)*	21,0±0,8	21,7±0,6
Ceniza (%)*	3,5±0,5	3,3±0,7
Carbohidratos (%) (por diferencia)	64,6	63,6
Polifenoles (ppm)	52,8	18,5

*Datos expresados en base a materia seca

Tabla II

Efecto de la relación proteína:cloruro de ácido palmítico en la composición química, rendimiento y relación de lipofilización de las harinas HPST;1:0,5 y HPST;1:1.

Componentes	HPST;1:0,5.	HPST;1:1
Sólidos totales* (%)	98,3±1,2	94,8±1,4
Proteínas* (%)	18,5±0,8	19,1±0,3
Cenizas* (%)	0,9±0,2	0,9±0,2
Rendimiento* (%)	88,3	74,9
AGL (mg/g de harina)	76,6	132,3
AGT (mg/g de harina)	98,8	172,9
AGC (mg/g de harina)	22,1	40,6
Relación de lipofilización		
μmoles AGC/ g de proteína	433,7	773,9

* Datos expresados en base a materia seca.

AGL: Ácidos grasos libres

AGT: Ácidos grasos totales

AGC: Ácidos grasos covalentes

Tabla III.

Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la actividad emulsionante (AE), estabilidad de la emulsión (EE), capacidad emulsionante (CE), expansión de la espuma (ExEsp) y estabilidad de la espuma (EsEsp) de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 4,3 y 7,0.

Columnas acompañadas por superíndices diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Muestras	pH	AE (%)	EE (%)	CE (ml aceite/g muestra)	ExEsp (%)	EsEsp (%)	
						30 min	120 min
HPST	4,3	0,0	0,0	55,20±3,2	15,8±0,6	15,8±0,6	13,7±0,9
	7,0	3,5±0,1 ^a	10,7±0,6 ^a	86,64±4,1 ^a	39,8±2,9 ^a	13,3±0,4 ^a	9,7±0,8 ^a
HPCT	4,3	0,0	0,0	75,3±4,2	13,0±1,3	12,7±0,9	10,6±0,9
	7,0	4,1±0,1 ^a	5,0±0,1 ^b	125,0±3,3 ^b	20,3±0,1 ^b	16,1±1,2 ^b	14,4±1,1 ^b
HPST;1:0.5.	4,3	0,0	0,0	-	169,2±0,9	146,1±0,8	146,±0,8
	7,0	38,6±0,9 ^b	44,7±0,4 ^c	27,1±1,4 ^c	162,1±0,6 ^c	144,8±0,4 ^c	144,8±0,4 ^c
HPST;1:1	4,3	0,0	0,0	-	89,9±1,2	89,9±1,2	89,9±1,2
	7,0	35,5±0,2 ^c	25,6±1,7 ^d	29,1±2,9 ^c	103,8±0,6 ^d	99,0±1,5 ^d	99,0±1,5 ^d

Tabla IV

Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de retención de aceite (CRAC) de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1.

Columnas acompañadas por superíndices diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Muestras	CRA g/g muestra a pH 7,0	CRAC g/g muestra
HPST	1,47±0,8 ^a	0,15±0,3 ^a
HPCT	1,27±0,5 ^b	0,15±0,4 ^a
HPST;1:0,5	1,21±0,2 ^c	0,24±0,2 ^b
HPST;1:1	1,29±0,2 ^d	0,44±0,4 ^c

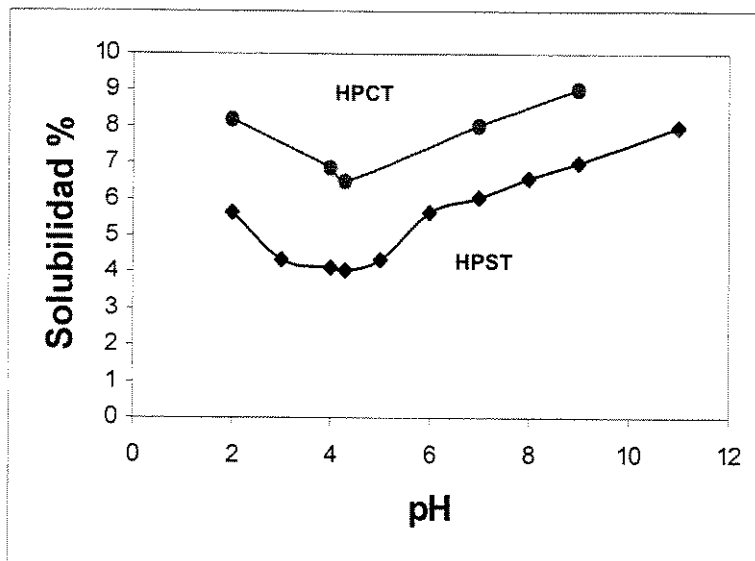


Figura 1

Curvas de solubilidad de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST).

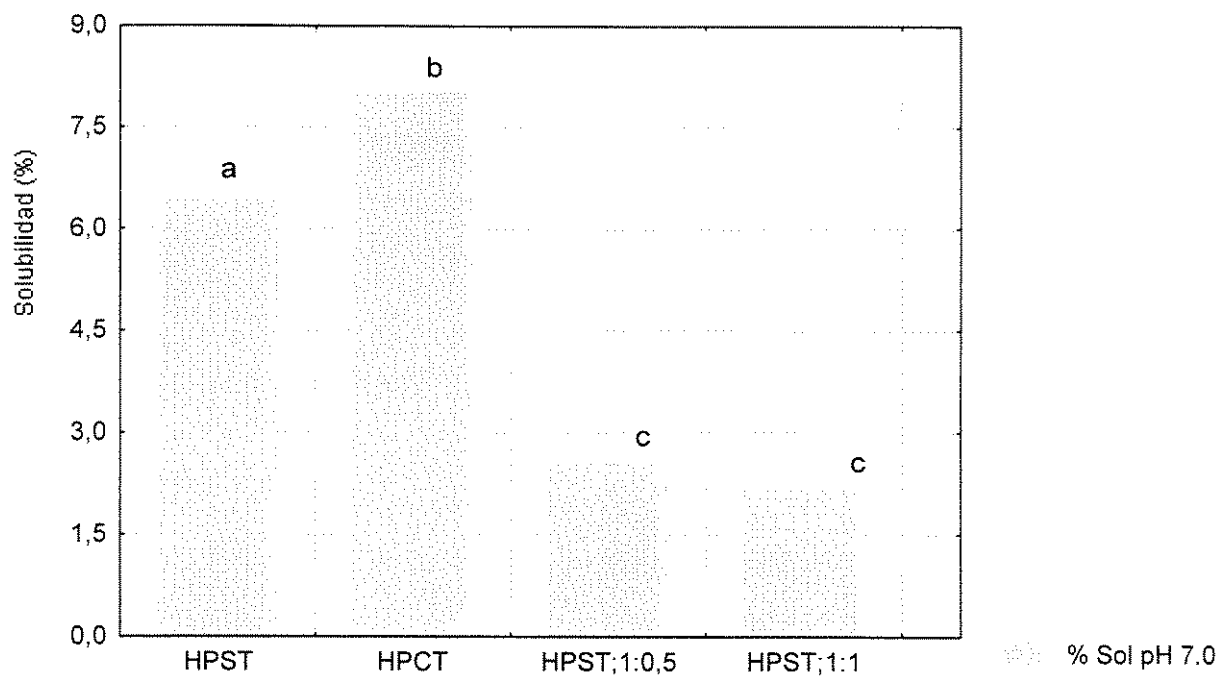


Figura 2

Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la solubilidad proteica de las harina de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 7,0.

Columnas acompañadas por letras diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

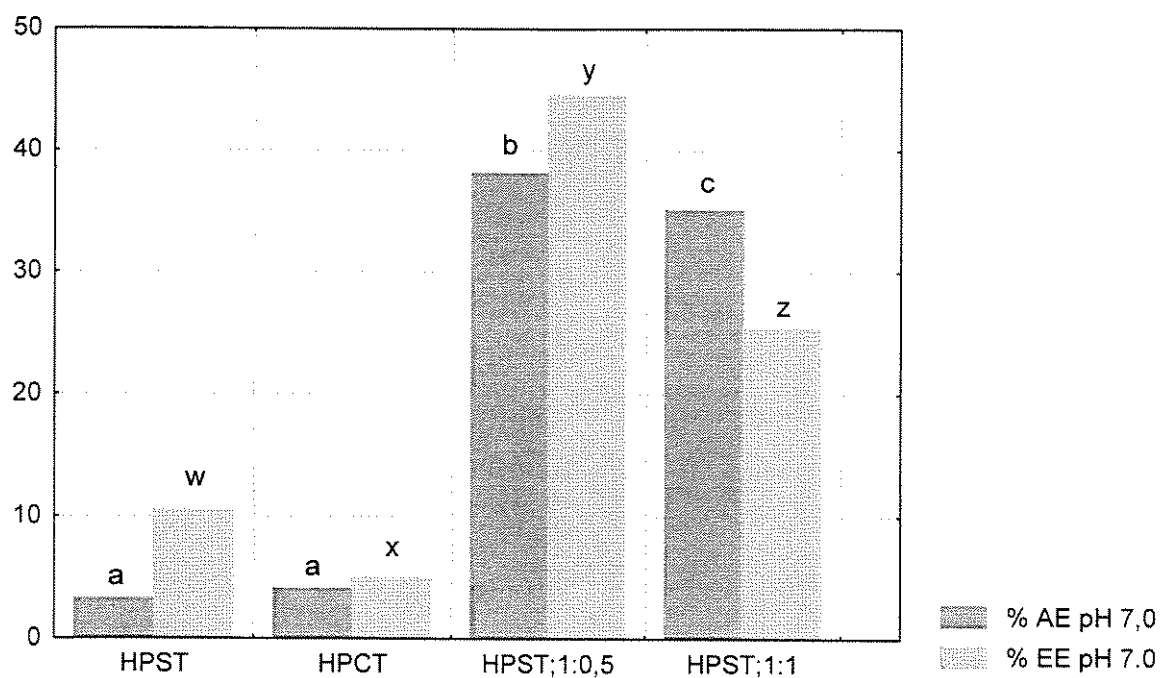


Figura 3

Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la actividad emulsionante (AE) y estabilidad de la emulsión (EE) de las harina de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 7,0.

Columnas acompañadas por letras diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

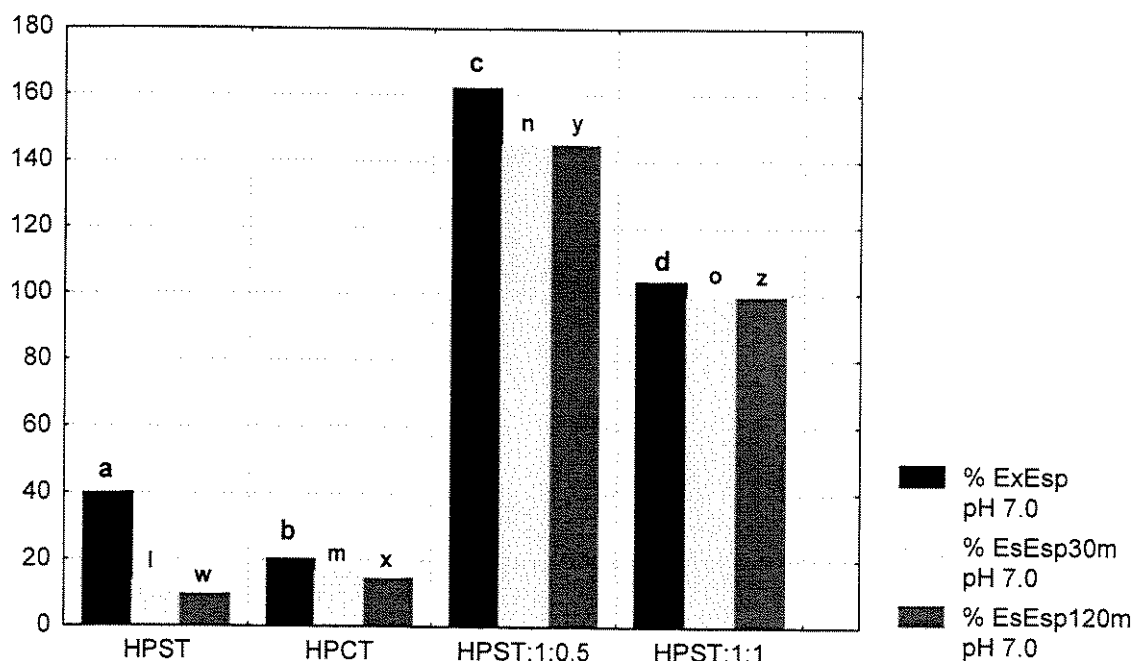


Figura 4

Efecto de la remoción de la testa y de la lipofilización sobre la expansión (ExEsp) y estabilidad de la espuma (EsEsp) de las harinas de palmiste con testa (HPCT) y sin testa (HPST) y de las harinas lipofilizadas HPST;1:0,5 y HPST;1:1 a pH 7,0.

Columnas acompañadas por letras diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

CAPÍTULO 3

THE INFLUENCE OF LIPOPHILIZATION ON FUNCTIONAL PROPERTIES OF COTTONSEED FLOUR (*Gossypium herbaceum*) AND ITS PROTEIN CONCENTRATE

Artigo para submeter à revista científica:

Journal of the Science of Food and Agriculture

The influence of lipophilization on functional properties of cottonseed flour (*Gossypium herbaceum*) and its protein concentrate

Maria L. Uvarova*, Daniel Barrera-Arellano*

Laboratório de Óleos e Gorduras, UNICAMP/DTA/FEA – Caixa Postal 6091, CEP 13081-970, SP, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed (Tel/Fax: (55) 19 32891186),

e-mail: daniel@fea.unicamp.br

Abstract: The objective of this work was to evaluate the effects of lipophilization on the functional properties of cottonseed flour and its concentrate, as well as to compare them before and after modification. Cottonseed flour and its concentrate presented 48% and 77% protein (N x 5.3), respectively, and the concentration process yielded 38% in weight. Cottonseed flour and its concentrate were lipophilized with palmitoyl chloride in three protein:palmitoyl chloride ratios: 1:0.25, 1:0.5 and 1:1, w/v. The properties measured were: solubility, water retention capacity (WRC), oil retention capacity (ORC), emulsion activity (EA), emulsion stability (ES), foam expansion (FE) and foam stability (FS) at pH 7.0. With the exception of solubility, all the functional properties increased, especially foam properties and WRC. Lipophilization caused a decrease on protein content of both cottonseed flour and concentrate, but improved sensorial properties such colour and texture. Lipophilization with greater amounts of fatty acids (protein:palmitoyl chloride ratio of 1:1) showed higher values in almost all the measured properties. Content of free gossypol in cottonseed flour, concentrate and its lipophilized products was below the permitted limits.

Keywords: lipophilization, functional properties, cottonseed flour, cottonseed concentrate, surfactant properties.

INTRODUCTION

Today, cottonseed world production represents more than 2.1 million ton/year in Brazil and more than 53.7 million ton/year¹. Cottonseed meal, a by-product of cottonseed oil extraction, is widely used for animal feed and represents an interesting and economic source of proteins for human consumption, considering the needs of great section of the population.

Cottonseed meals and flours contain high quality proteins that can be used as protein supplement for human consumption, in the absence of gossypol. Elimination of gossypol in cottonseed meal is necessary; since this toxic compound, when combined with available lysine, induces its nutritional reduction. Moreover, gossypol can cause serious clinical signs in humans and in monogastric animals, such as lung edemas and hepatic hemorrhages, which makes it an undesirable compound in human food².

Cottonseed flour obtained by direct oil extraction with hexane, presented clear colour, fine texture and high protein content. Between 60 to 68% (N X 6.25) of this protein could be used as a protein supplement in several bakery products, such as bread, sweet and salt biscuits².

Functional properties of cottonseed meal, its concentrate and its isolate were thoroughly studied by other authors. The first researches in this field were published in the early seventies and involved the determination of the composition and functionality of

cottonseeds^{3,4}. Other researchers worked on the effect of gossypol and its different elimination techniques^{5,6,7}.

Several authors studied the functional properties of the modified cottonseed proteins. Child and Park⁸ and Choi *et al*⁹ succinylated cottonseed proteins. Later, Rahma and Narasinga¹⁰ succinylated and acetylated proteins of cottonseed flour obtaining different results that depended on the nature of the charges incorporated by the anhydrides used. This way, the influence of lipophilization on the functional properties of cottonseed proteins resulted interesting, since it modifies the hydrophilic/hydrophobic characteristics, by the incorporation of lipophilic groups in the molecules. This modification improves the affinity of the proteins with hydrophobic compounds or systems.

Acylation of proteins with hydrophobic groups can be accomplished with N-Hydroxysuccinimide esters¹¹, fatty acid anhydrides¹², succinic or acetic anhydrides¹³ or fatty acid chlorides¹⁴. Acylation has been applied to many vegetable proteins, including those of wheat^{14,15}, soy^{11,14,16,17}, sunflower¹⁸, cottonseed⁹ and peanuts¹⁹. Lipophilization is an acylation process, where the fatty acid chloride reacts with free amine groups, in alkaline medium, resulting in the inclusion of fatty acids in the protein molecule¹⁴, following the Shotten-Baumann reaction.

The objective of this work was to evaluate the effects of lipophilization of cottonseed flour and its protein concentrates on functional properties such as: solubility, water and oil retention capacities and surface properties.

MATERIAL AND METHODS

Raw material

Cottonseed (*Gossypium herbaceum*) flour provided by Maeda S.A. (Brazil) was used as the protein source.

Palmitoyl chloride was provided by AKZO Chemicals (France)

Cottonseed flour (CF) obtained from double oil extraction, expeller and posterior extraction with hexane, was ground in a Foos Tecator mill (Knifetec 1095 Sample Mill) and sieved through a 0.485 mm sieve. Cottonseed flour was defatted again in a Soxhlet extractor with fresh hexane and evaporated at 50°C in an oven with circulating air for 3 h, ground and stored at 4°C until use.

Preparation of cottonseed protein concentrate (CC)

The preparation of the concentrate from cottonseed flour was done according to the method of Liadakis *et al*²⁰. Extraction of CC was carried out with 1N NaOH at pH 12.0 and a sample:solvent ratio of 1:20 (w/v), at room temperature (20°C), for 1 h, under constant agitation. The suspension was centrifuged at 18000 g (Heraeus Sepatech, Suprafuge 22, rotor 12.500) and filtered through Whatman #3 paper. Extraction was repeated twice (sample:solvent ratio 1:10, w/v) and the proteins were recovered from supernatants by precipitation at pI (pH 4.0). After centrifugation, the concentrate was dried in an oven with circulating air at 35°C, ground, and stored in a freezer at 4°C until use.

Analytical methods

Moisture, ash and nitrogen were determined by triplicate according to AOCS²⁵ approved methods. Crude protein was calculated by multiplying the Kjeldhal nitrogen by the conversion factor of 5.3²⁶.

Amino acid composition was determined according to the method of Spackman *et al*²⁷. Free gossypol was determined according to AOCS²⁵ (Official Method Ba 7-58). The results were expressed in ppm. Protein, lipid and ash contents were expressed as percentages on a dry matter basis.

Lipophilization reaction

Cottonseed flour and its concentrate were lipophilized according to Roussel-Philippe *et al*¹⁴. CF and CC were dispersed in water at a ratio of 1:5, w/v, and the pH was adjusted to 9.0 with 4N NaOH at room temperature (20°C), under constant magnetic stirring. The reaction was carried out by direct addition of palmitoyl chloride, drop by drop, while stirring and maintaining the pH at 9.0. The Protein:Palmitoyl Chloride Ratios (PPCR) were 1:0.25, 1:0.5 and 1:1, w/v. After 30 minutes, the dispersion was maintained under agitation during 15 min and the pH was adjusted to 7.0. An aliquot was collected for free and total fatty acid determination. The remainder of the dispersion was brought to pI (pH 4.0) with 1N HCl for protein precipitation and centrifuged at 18000 g (Heraeus Sepatech, Suprafuge 22, rotor HF 12.500) for 20 min. The residue was then washed twice with water at pH 4.0 and centrifuged under the same conditions.

Lipophilized cottonseed flour and concentrate were dried in an oven with circulating air at 40°C for 24 h, ground, sieved (0.485 mm sieve), and stored in a freezer at 4°C until analyses.

Analysis of bound fatty acids (BFA)

The fatty acid content in lipophilized proteins was determined according to AOAC²¹ Method 922.06. For the determination of total fatty acids (TFA), 2.0 g of lipophilized product was hydrolyzed with 6N HCl, filtered in S&S 589 paper and washed with hot water. The filter paper with the sample was dried in an oven at 105°C for 1 h and extracted with ethyl ether. TFA was expressed as mg of total fatty acids/g of dry sample.

Determination of free fatty acids (FFA) was carried out by extraction of 1.5 g lipophilized product with ethyl ether. FFA was expressed as mg of free fatty acids / g of dry sample.

Bound fatty acids (BFA) were calculated as the difference between TFA and FFA. The measures were made in triplicate.

Solubility

Nitrogen solubility index (NSI): NSI of cottonseed flour, concentrate and lipophilized products was determined at pH 7.0, according to the method of Rahma and Narasinga²², as follows: samples were dispersed in 30 mL of water (6% protein solution) at room temperature (20°C). The pH of the dispersions was adjusted with 0.5 N NaOH or 0.5 N HCl, under constant magnetic agitation. Dispersions were centrifuged at 12500 g (rotor 22.50) for 20 min. Aliquots of 5 mL of the supernatants were collected and analysed by micro-Kjeldahl. NSI was expressed as the percentage of soluble nitrogen with regard to total nitrogen. This determination was made in duplicate.

Water retention capacity (WRC) and oil retention capacity (ORC)

Samples of 2.0 g were combined with 15 mL water (WRC) or 10 mL soybean oil (ORC) in 50 mL centrifuge tubes, previously weighed. Slurries were agitated in a Vortex agitator for 2 min and centrifuged at 12500 g for 20 min, according to the method of Rahma and Narasinga¹⁰. The tubes were re-weighed after discarding the supernatant, and both the WRC and ORC were expressed as g of water or oil retained by g of dry sample. The procedure was repeated 5 times. All the measures of WRC were made at pH 7.0 by adjusting the pH with 0.5N HCl or 0.5N NaOH..

Surface properties

Emulsion activity (EA) and emulsion stability (ES) were determined according to the method of described by Yasumatsu *et al*²³, modified as follows: EA was estimated by preparing a 4% protein dispersion in 15 mL water in a graduated centrifuge tube, agitating at 20000 rpm (Ultraturrax IKA-WERK) for 30 s. The dispersion was then emulsified during 90 s with 15

mL soybean oil with the Ultraturrax mixer. The tubes were then centrifuged at 750 g (rotor 22.50) for 5 min. EA was calculated as the ratio of the height of the emulsified layer by the total height in the centrifuge tube x 100. ES was determined by heating the emulsion at 80°C for 30 min, cooling it to 20°C with water and centrifuging it at 750 g for 5 min. The result was expressed the same way as for EA. The results given were the average of 5 replications.

Foam expansion (FE) and foam stability (FS) were determined according to the method described by Puski²⁴, modified as follows: 1% protein dispersions were shaken with the Ultraturrax mixer at 20000 rpm for 90 s. The volume was registered and the foam expansion was expressed as the relation between the volume of foam and the volume of the dispersion before agitation x 100. The stability of the foam was registered and expressed in the same way after 30 min and 120 min.

Statistical analysis

Analysis of variance and the *Tukey* test, at an assurance level of 95% ($p < 0.05$) were used to compare the effects of lipophilization on functional properties of modified and non-modified cottonseed proteins, using the *STATISTICA 5.0* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A) program.

RESULTS AND DISCUSSION

Centesimal composition of CF and CC are shown in Table 1. After the second extraction with hexane, cottonseed flour showed a residual oil content lower than 0.5% and a light yellow-greenish colour. Crude protein content was 48% on a dry basis. The yield of the concentrate obtained by an adaptation of the method described by Liadakis *et al*²⁰, was 38% in weight. It presented 77% protein (conversion factor of 5.3). In comparison to the results obtained by Liadakis *et al*²⁰, concentrates with 14.3% of nitrogen were obtained in this study against 13.4% obtained by these authors. For that reason, and for nomenclature purposes, percentages of protein lower than 90% were called *concentrates* in this research.

The free gossypol content of the cottonseed flour was very low (17 ppm) after the second extraction with hexane (Table 1). It is well known that heat and solvents cause the rupture of pigment glands and removal of gossypol²⁸. The content of free gossypol in the original cottonseed (just ground), was 480 ppm. This suggests that conventional oil extraction processes, where the combination of rolling, heat and moisture are mandatory stages, cause a decrease of free gossypol up to human-safe levels. In these processes, part of the free gossypol is converted to bound gossypol²⁸. The second extraction with hexane, carried out in the laboratory, produced cottonseed meal with almost null gossypol content. Osman *et al*²⁹ obtained cottonseed meal and isolate with low gossypol levels using a combination of sieving and different settling processes with hexane. The gossypol content of the concentrate was almost null due to its degradation at the basic pH used in its preparation (pH 12.0). El Tinay *et al*⁵ produced isolates with low gossypol contents, obtaining minimum levels when the isolates were extracted in highly alkaline media.

Lipophilization of cottonseed flour and protein concentrate

The term "*lipophilization*" is used to describe the increase in hydrophobicity of the proteins obtained through chemical modification of the protein structure, and also to describe the attachment of fatty acids to cottonseed proteins¹⁴.

In the lipophilization process, cottonseed flour lipophilized at PPCR of 1:0.25, 1:0.5 and 1:1, allowed a recovery of 96%, 81% and 71%, respectively, of the original protein content at pI. For the concentrate, the recovery was 83%, 72% and 56%, respectively. This is probably due to a dilution effect and recovery proportional to the amount of palmitoyl chloride incorporated to the protein structure.

The yield of lipophilization for cottonseed meal was 81.8%, 81.7% and 83.6%, in weight, for the ratios described above and, for the lipophilized concentrate, 90%, 88% and 86%, respectively. This means that for lipophilized cottonseed flours and concentrates, an average of 18% and 13% of the mass was transformed mainly into free fatty acids, sodium chloride and complexes formed between free gossypol and palmitoyl chloride.

It was observed that the amount of fatty acid attached to lipophilized cottonseed flour and concentrate (Table 2) was higher than the lysine mol quantity present in cottonseed protein (472.07 μmol Lys/g protein). For cottonseed flours CF;1:0.25, CF;1:0.5 and CF;1:1 acylation rate was 0.19, 0.66 and 1.19 times higher than the lysine content and for the protein concentrates CC;1:0.25, CC;1:0.5 and CC;1:1 was 2.24, 3.04 and 5.4 times higher. These results suggest that the palmitoyl chloride, besides reacting with the lysine group also reacts with other nucleophilic sites, like the free hydroxyl residues (OH) of the threonine, serine and tyrosine amino acids to form ester and phenolics bonds, and also the sulphhydryl residues of the cysteine to form thioester bonds. Roussel-Philippe³⁰ observed significant differences between the quantity of fatty acids attached by covalent bonding (BFA) and the quantity of lysine present in defatted corn germ proteins lipophilized at a protein:palmitoyl chloride ratio of 1:1, w/w, and in sunflower proteins lipophilized at the same proportion (4.5 and 6 times, respectively).

The colour of the lipophilized products was light and their texture was soft and dense.

In lipophilized products, the gossypol content was almost null, possibly due to competition between palmitoyl chloride and gossypol for occupying the lysine and hydroxyl groups ionized of the high pH. The bounds between gossypol and proteins are reversible¹⁰ and easily degraded to other complex compounds. According to Rahma and Narasinga¹⁰, the effects of succinylation and acylation of cottonseed meal showed a non significant decrease of total gossypol content, in the range of 12% to 15%. However, the content of free gossypol was reduced from 50% to 88% by the acylation process and 33% to 55% by succinylation.

Protein solubility

Solubility is the main functional property for the utilization of proteins as food ingredients and it depends on the molecular weight and nature of proteins, as well as the concentration of ions, pH, and temperature, as they influence the balance of solvent-protein and protein-protein interactions^{31,32}. The conditions that favour protein-protein interactions contribute negatively to solubility, on the other hand, as protein-solvent interactions are favoured, solubility increases³². Solubility is also influenced by the conditions applied, such as heat, presence of solvents, pH, particle size, etc.

CF solubility at pH 7.0 was 9% (Fig 1). This low value is possibly a result of the oil extraction process applied to the seeds, since the heat applied during cooking drastically modifies protein conformation. At pH 11.0 (data not shown), only 44% of the nitrogen was soluble. It is known that the forces that favour protein-protein interactions in aqueous solutions are due to hydrophobic interactions between the non polar residues of the protein³². The fact that CF presented more than 38% hydrophobic amino acids eased the formation of hydrophobic patches that resulted in molecular aggregation states and the decrease of its solubility. In this context, the introduction of more hydrophobic molecules in cottonseed proteins through lipophilization, favours hydrophobic interactions and decreases electrostatic repulsion, reducing their solubility. All lipophilized products showed a decrease in solubility (Fig 1), caused by the presence of organic solvents and alkaline pH. In this diverse condition, proteins suffer a re-arrangement and hydrophobic groups (fatty acids) are exposed, so the hydrophilic residues migrate to the interior of the molecule. The interactions between hydrophobic residues increase, promoting states of high aggregation and, consequently,

protein precipitation^{33,34,35}. Solubility is not reduced linearly, but came out by steps⁵. Akita and Nakai³⁸ reported the same behaviour when lipophilizing lactoglobuline with the N-Hydroxysuccinimide ester of stearic acid. Rahma and Narasinga¹⁰ showed an increase of the solubility of succinylated cottonseed meal, but when acetylated, the solubility of cottonseed meal decreased. During succinylation, hydrophilic groups are introduced in the molecule, which reduces its pI to more acidic pH values. However, during acylation, hydrophobic groups are introduced, and depending on the number of acylated groups added, solubility decreases in an aqueous medium. During lipophilization processes, fatty acids do not influence the charge balance of the proteins and consequently their pI. The amine group residues are transformed into non polar residues when weak forces such as Van der Waals forces promote aggregations and protein polymerization³³.

Surface properties

Surface properties are related to the capacity of proteins of reducing superficial tension between hydrophilic components of the medium. It depends mainly of the composition, distribution and conformation of the proteins³⁶.

Emulsion activity (EA) of lipophilized CF was superior in comparison to the non-modified CF (Fig 2). Lipophilized cottonseed flour at PPCR of 1:1, showed a higher increase, up to 17% with respect to the emulsion activity of non-modified CF. Lipophilized proteins have a greater amount of non polar segments which minimize the repulsions in the molecules. Hydrophobic character is responsible of aggregation and increase of the emulsion activity. Steric and superficial hydrophobicity effects caused by the fatty acids, influence the formation of rigid films around oil droplets. While the succinylated proteins increase the emulsification properties by electrostatic and hydration effects, due to the increase of the net charge³², the lipophilized proteins increase them by the decrease of the repulsion forces and by the formation of intermolecular hydrophobic interactions among the protein films. In the lipophilized protein concentrates, the increase of EA was not significant due to the low levels of incorporation of palmitoyl chloride; however, higher molar ratios of C16/Lys showed the highest values of EA, 7.6% more with respect to the emulsion activity of non-modified CC, and 32% more with respect to the emulsion activity of CF.

At pH 7.0, CF showed high emulsion stability (65%) compared to its lipophilized products (<55%), when submitted to 80°C (Fig 3). Lipophilized protein concentrate also showed lower ES values compared to the emulsion stability of CC, with the exception of the product lipophilized at PPCR of 1:1, which had an ES close to 80%. It could be observed, for the lipophilized protein concentrate at a PPCR of 1:1, that a higher quantity of fatty acids was attached to the protein reactive groups. Availability of lysine groups, due to previous purification, and the decrease of gossypol content, promoted fatty acid binding, and consequently, emulsification properties. A C16/Lys molar ratio of 5.4 (corresponding to lipophilized protein concentrate at PPCR of 1:1) can be considered as an intermediate value, and below this value, the increase in EA and ES is not significant.

Haque and Kito³³, when lipophilizing α -casein, observed that a lower degree of protein incorporation resulted in a higher EA and lower ES value, when the oil/water proportion was below 2. At molar ratios of palmitoyl chloride: α -casein in the range of 0.3 to 6.0, the protein was denominated as *low incorporate*, although at the ratio of 6.0, the protein exhibited the highest level of EA and ES.

A protein with good foaming properties must, at least, present two functions: reduce the superficial (and interfacial) tension between the liquid phase and the air bubble, and promoted, with a degree of superficial denaturation, accentuate protein-protein interactions

that permit the formation of a cohesive film³⁶. For foam formation, the proteins should be soluble in the aqueous phase and capable to unfold rapidly and form a strong layer of protein around the air bubble³².

Foam expansion (FE) at pH 7.0 of CF and CC lipophilized products increased notably when compared to the respective non-lipophilized products (Figure 3). For CF;1:1, corresponding to C16/Lys ratio of 1.19, the increase in FE was up to 375% with respect to the foam stability of CF. Foam remained the same after 120 min when compared to time zero. Lipophilized CC;1:0.5, corresponding to a C16/Lys ratio of 3.04, showed the highest FE, however a decrease of 17.8% in stability was observed after 120 min of rest. Haque and Kito³⁷ found an increase in foam stability at greater incorporation degrees. Akita and Nakai³⁸ also observed a significant increase in foam stability when using low and medium incorporation degrees; however, it was lower than for the non-lipophilized β -lactoglobulin. Lipophilization caused a reduction of the thickness of the interfacial layers, as a consequence of a strong association of the molecules to form continuous intermolecular polymers and of Van der Waals forces, which also favor the formation of more strong and stable foams.

Water retention capacity (WRC) and oil retention capacity (ORC)

Water retention capacity is an important hydration property, which corresponds to the quantity of water retained by the protein, accompanied by volume expansion. Hydrated protein complexes confer to the products the texture required in the manufacture of reconstituted meat, for example. Fat retention capacity of components affects textural and sensory properties of foods, mainly through the enhancement of flavour retention and improvement of mouthfeel³⁹.

The water and fat retention capacities of cottonseed flour were high (Fig 4). Lipophilization increased ORC, due to the high hydrophobicity of lipophilized cottonseed proteins, which contain numerous fatty acids attached to their side chains by hydrophobic interactions. Lipophilization also caused an increase of WRC, possible due to proteins unfolding and steric effects of fatty acid residues. This behaviour was not expected, once cottonseed flour had a low solubility. Although WRC and ORC of the CC and the lipophilized CC were lower than that of lipophilized CF, they showed an important increase (Fig 4). The increase observed for WRC and ORC was proportional to the increase of the fatty acids incorporated; however, at low incorporation levels and low molar ratios of C16/Lys (0.19 to 1.19), the protein is able to unfold and effectively expose its hydrophilic residues to retain or absorb water. Roussel-Philippe³⁰ reported an increase of 4.1 times in WRC and 2.3 times in ORC of lipophilized sunflower proteins, as well as 1.2 times in WRC and 1.09 times in ORC of lipophilized corn germ flours, when lipophilizing at PPCR of 1:1. Acetylation of cottonseed proteins carried out by Rahma and Narasinga¹⁰, showed a higher WRC compared to non-modified cottonseed meal and this increase was proportional to the increase of the modification degree; nevertheless, the authors did not explain the phenomena involved.

The lipophilization process reduces free gossypol content to safe levels and improved visual and texture characteristics. The study of the functional properties of native cottonseed proteins and of non-modified proteins showed an increase of most of them, except for solubility. Lipophilization can modify the hydrophilic/hydrophobic balance of the proteins. These results suggest that lipophilization influences protein surface properties decreasing its superficial tension due to the increment of net hydrophobicity. However, other factors such as composition, distribution and conformation of the proteins are essential to increase surface properties of lipophilized proteins. At low levels of fatty acid incorporation, steric effects of fatty acid residues and the change in protein conformation possibly favours proteins unfolding, making them capable of efficiently retaining water and oil.

The influence of other components of cottonseed, such as carbohydrates, fibbers, etc, was not studied in this work; however, it is impossible to ignore their contribution on functional properties.

Acknowledgements: Funds for this research were provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

1. FAO/FAOSTAT-Agriculture. Available in :
<http://apps1.fao.org/servlet/XteServlet.jrun?Areas=21&Items=328&Elements=51&Years=2002&Format=Table&Xaxis=Years&Yaxis=Countries&Aggregate=&Calculate=&Domain=SUA&ItemTypes=Production.Crops.Primary&Language=espanol&UserName>, © FAO 1999-2002.
2. EMBRAPA, Cultura do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar. In: www.embrapa.org Sistemas de Produção, 1. ISSN 1678-8710 Electronic version Jul./2003.
3. Martinez WH, Berardi LC and Goldblatt LA, Cottonseed protein products-composition and functionality. *J Agric Food Chem* **18**:961-968. (1970).
4. Berardi LC, Martinez WH and Fernandez CJ, Cottonseed protein isolates: two step extraction procedure. *Food Tech* **23**:75-82 (1969)
5. El Tinay A, Chandrasekhar H. and Ramanatham G, Protein and gossypol extractability from cottonseed flour. *J Sci Food Agric* **31**:38-42 (1980).
6. Cherry JP and Gray MS, Methylene chloride extraction of gossypol from cottonseed products. *J Food Sci* **46**:1726-1733 (1981).
7. Rahma EH and Narasinga R., Gossypol removal and functional properties of protein produced by extraction of glanded cottonseed with different solvents. *J Food Sci* **49**: 1057-1060 (1984).
8. Childs EA and Park KK, Functional properties of acylated glandless cottonseed flour. *J Food Sci* **41**: 713-728 (1976).
9. Choi YR., Lusas EW and Rhee KC, Molecular structure and functionalities of protein isolates prepared from defatted cottonseed flour succinylated at various levels. *J Food Sci* **48**:1275-1280 (1981).
10. Rahma EH and Narasinga MS, Effect of acetylation and succinylation of cottonseed flour units functional properties. *J Agric Food Chem* **31**:352-355 (1983).
11. Haque Z and Kito M, Lipophilization of soybean glycinin: covalent attachment to long chain fatty acids. *Agric Biol Chem* **46**:597-599 (1982).
12. Haque Z and Kito M, One-step lipophilization of proteins using fatty acyl anhydride. *Agric Biol Chem* **48**:1099-1101 (1984a).
13. Messinger JK, Rupnow JH, Zeece MG and Anderson RL, Effect of partial proteolysis and succinylation of functionality of corn germ protein isolate. *J Food Sci* **52**:1620-1624 (1987).
14. Roussel-Philippe C, Pina M and Graille J, Chemical lipophilization of soy protein isolates and wheat gluten. *Eur J Lipid Sci Technol* **2**: 97-101 (2000).
15. Barber JK and Warthesen JJ, Some functional properties of acylated wheat gluten. *J Agric Food Chem* **30**: 930-934 (1982).
16. Franzen KL and Kinsella JE, Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J Agric Food Chem* **24**:788-795 (1976).
17. Aoki H, Taneyama O, Orimo N and Kitagawa I, Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. *J Food Sci* **46**:1192-1195 (1981).
18. Schwenke KD, Linow KJ and Zirwer D, Modification of the oligomeric structure of 11S globulin from sunflower (*Helianthus annuus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) seeds by succinylation. *Nahrung* **30**:263-270 (1986).
19. Beuchat LR, Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *J Agric Food Chem* **25**:258-261 (1977).

20. Liadakis GN, Floridis A, Tzia C and Oreopoulou V, Protein isolates with gossypol content from screw-pressed cottonseed meal. *J Agric Food Chem* **41**:918-922 (1993).
21. AOAC, Official Methods of Analysis, 15th Ed. K Helrich Editor. Association of Official Analytical Chemist Inc, Washington, DC (1990).
22. Rahma EH and Narasinga MS. Characterization of sunflower proteins. *J Food Sci* **44**:579-582 (1979).
23. Yasumatsu K, Sawada K, Moritaka S, Misaki M, Toda J, Wada T and Ishii K, Whippening and emulsifying properties of soybean products. *Agr Biol Chem* **36**:719-727 (1972).
24. Puski G, Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. *Cereal Chem* **52**:655-664 (1975).
25. AOCS, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. 5th Ed. Ed. Firestone D., AOCS Press, Champ, IL (1997).
26. Jones, DB, USDA. Circular No. 183. United States Department of Agriculture, 1941.
27. Spackman DH, Stein WH and Moore S, Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry* **30**:1190-1206 (1958).
28. Altschul AM, Lyman CM and Thurber FH, Cottonseed meal. In: Processed plant protein foodstuffs. 469-534. Academic Press Inc., New York. (1958).
29. Osman HOA, Khalil M, El-Mahdy AR and El-Iraki S, Preparation, evaluation and functional properties of gossypol-poor cottonseed protein isolates. *Food Chem* **24**:109-126 (1987).
30. Roussel-Philippe C, Lipofilização das proteínas de milho, girassol e babaçu. Proyect FAPESP, No. 2003/10418-2. UNICAMP. Lab. Óleos e Gorduras (2001).
31. Sgarbieri VC, Proteínas em alimentos protéicos. 265-266. Livraria Varela, São Paulo (1996).
32. Kinsella JE, Domodaran S and German B, Physicochemical and functional properties of oilseed protein with emphasis on soy proteins. In: New Protein Foods **5**:107-179 Academic Press Inc., Orlando.(1985).
33. Haque Z and Kito M, Lipophilization of α_{s1} -Casein. 2. Conformational and functional. *J Agric Food Chem* **31**:1231-1237 (1983b).
34. Haque Z and Kito M, Lipophilization of α_{s1} -casein. 3. Purification and physicochemical properties of novel amphipatic fatty acyl peptides. *J Agric Food Chem* **32**:1392-1397 (1984b).
35. Puigserver AJ, Sen LC, Gonzales-Flores E, Feeney RE and Whitaker JR, Covalent attachment of amino acids to casein.1. Chemical modification and rates of in vitro enzymatic hydrolysis of derivates. *J Agric Food Chem* **27**:1088-1092 (1979).
36. Kinsella .E, Functional properties of proteins in food: a Survey. *CRC Critical-Reviews Food Sci Nutr* **7**:219-280 (1976).
37. Haque Z and Kito M, Lipophilization of α_{s1} -casein. 1. Covalent attachment of palmitoyl residue. *J Agric Food Chem* **31**:1225-1230 (1983a).
38. Akita EM and Nakai S, Lipophilization of β -lactoblobulin: Effect on hydrophobicity, conformation and surface functional properties. *J Food Sci* **55**:711-717 (1990a).
39. Hung SC and Zayas JF, Protein solubility, water retention, and fat binding of corn germ protein flour compared with milk proteins. *J Food Sci* **57**:372-376,384 (1992).

Table 1.

Centesimal composition of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC).

	CF	CC
Dry matter (%)	95.6±1.5	98.4±2.2
Residual lipids (%)*	<0.5	<0.5
Proteins (Nx5,3)*	48.1±0.8	77.0±1.5
Ash (%)*	6.4±1.0	3.5±0.9
Free gossypol (ppm)	17.3±0.6	2.3±0.5

*Data expressed on a dry basis

Table 2.

Effect of Protein:Palmitoyl Chloride Ratio (PPCR) on chemical composition and lipophilization rates on cottonseed flour (CF) and cottonseed concentrate (CC)

	CF;1:0.25	CF;1:0.5	CF;1:1	CC;1:0.25	CC;1:0.5	CC;1:1
Dry matter (%)	96.12±2.6	96.80±3.2	97.30±1.0	99.1±1.9	98.7±2.2	98.6±2.2
Proteins (Nx5,3)*	45.80±1.0	39.10±0.6	33.80±1.8	63.90±0.9	55.10±1.4	43.2±1.5
Ash (%)*	1.95±0.5	1.91±0.6	1.87±0.5	2.63±0.7	2.01±0.5	1.66±0.8
Free gossypol (ppm)	2.2±0.5	1.3±0.5	1.1±0.6	1.9±0.6	1.1±0.4	1.0±0.2
mg of FFA/g	106.03±0.3	177.93±0.3	302.27±0.2	86.49±0.4	223.1±0.3	338.80±0.5
mg of TFA/g	116.93±0.5	204.42±0.2	339.75±0.3	334.45±0.2	472.34±0.4	608.90±0.5
mg of BFA/g	10.92	27.04	37.47	247.91	249.2	270.10
Lipophilization rate (μ mol CFA/g of proteins)	0.19	0.66	1.19	2.24	3.04	5.40

*Data expressed on dry basis

FFA: Free fatty acids

TFA: Total fatty acids

BFA: Bound fatty acids

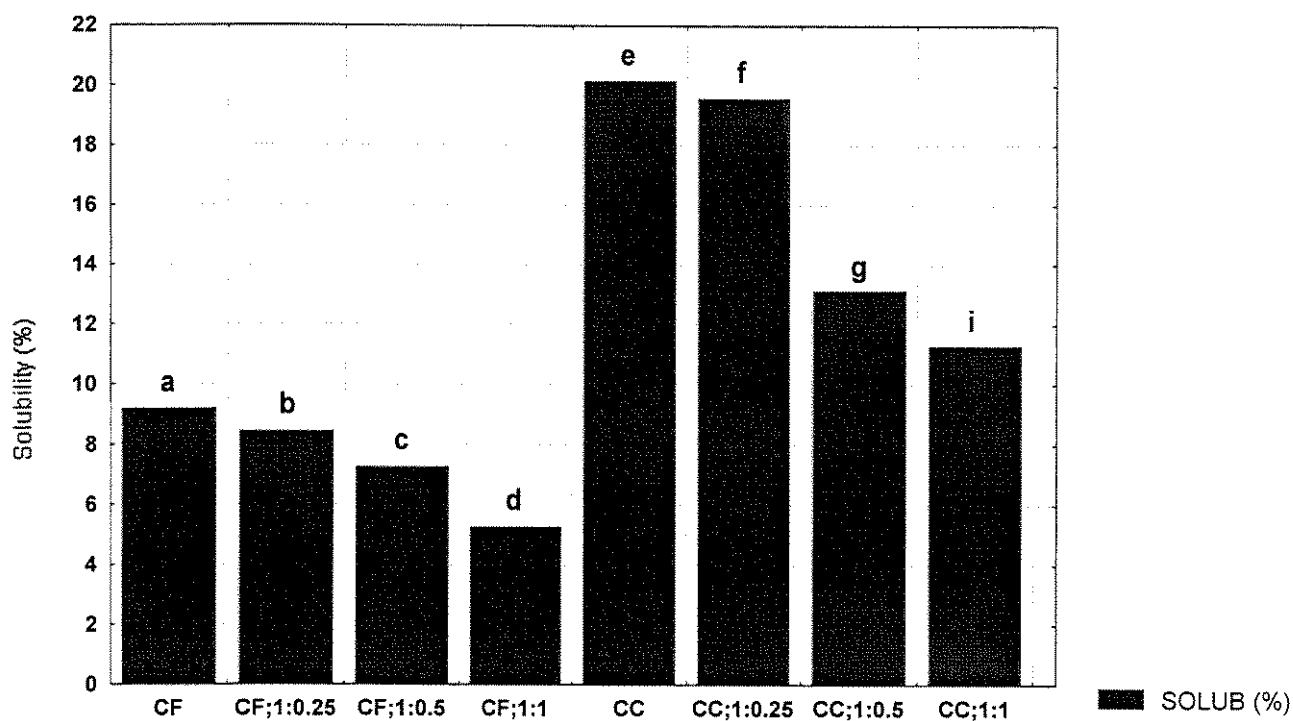


Figure 1.

Effect of Protein:Palmitoyl Chloride Ratio (PPCR) on solubility profiles of cottonseed flour (CF), and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0

Columns accompanied by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

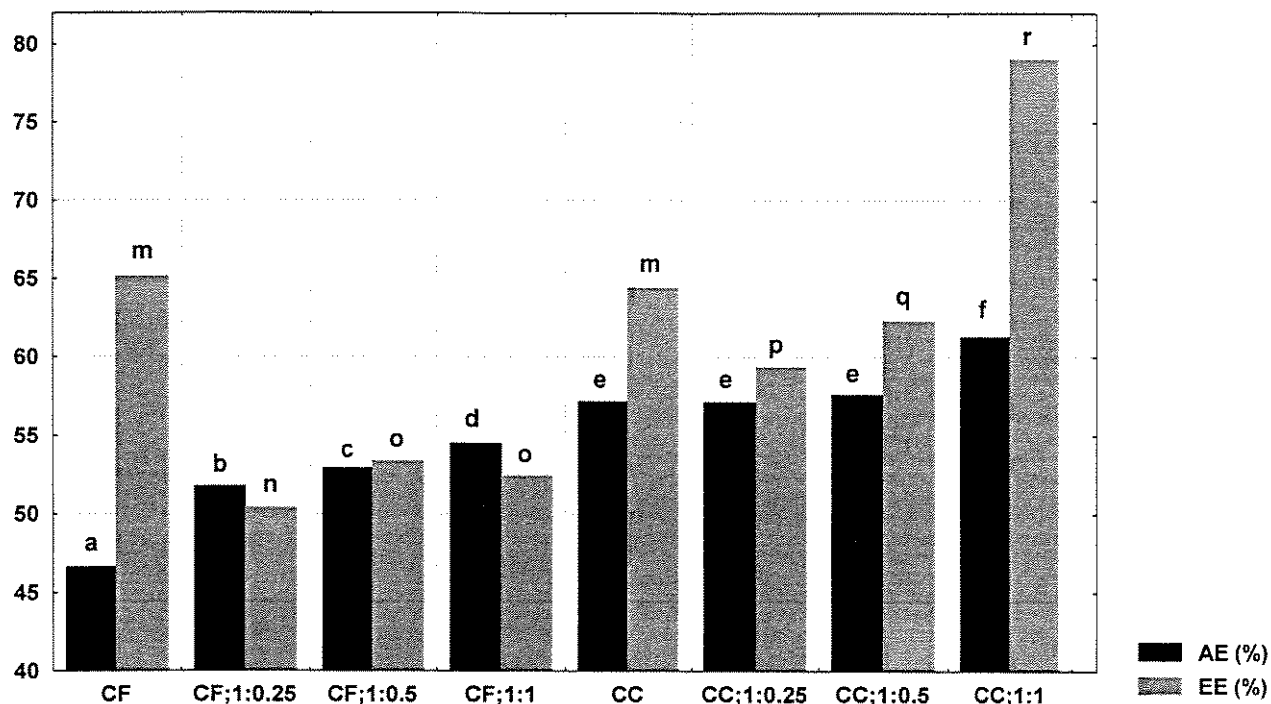


Figure 2

Effect of Protein:Palmitoyl Chloride ratio (PPCR) on emulsion activity (EA) and emulsion stability (ES) of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0
Columns accompanied by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

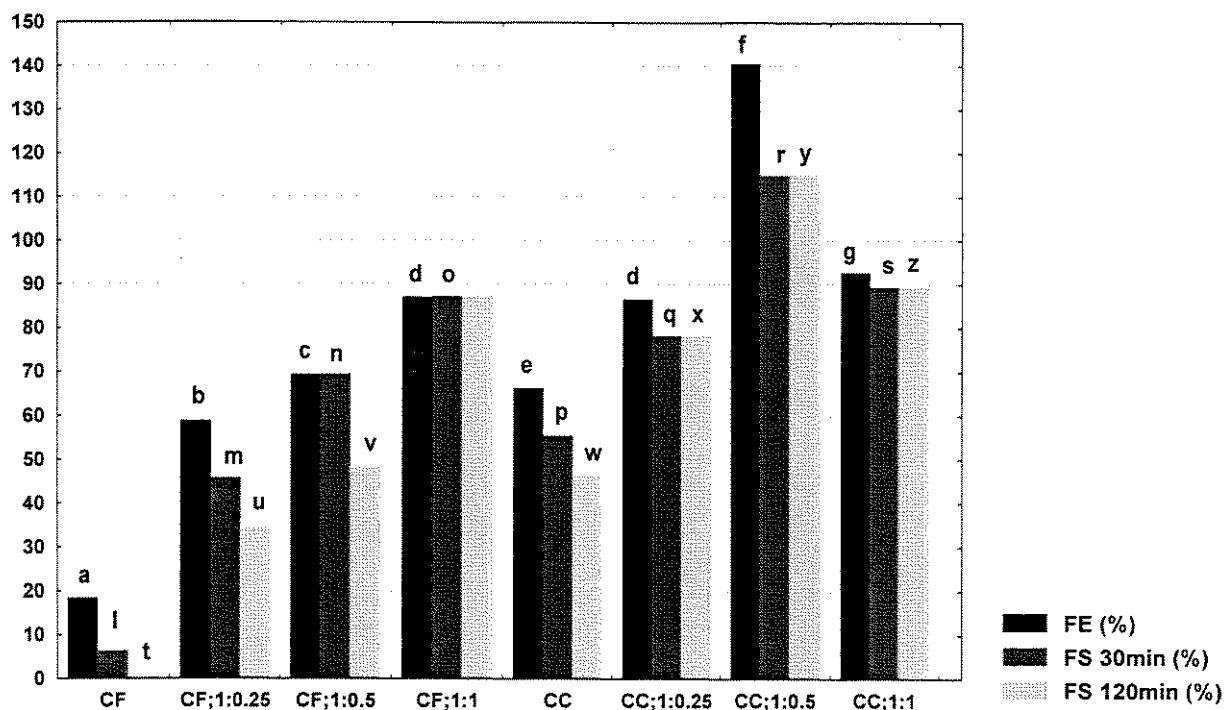


Figure 3

Effect of Protein:Palmitoyl Chloride ratio (PPCR) on foam expansion (FE) and foam stability (FS) of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0
Columns accompanied by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

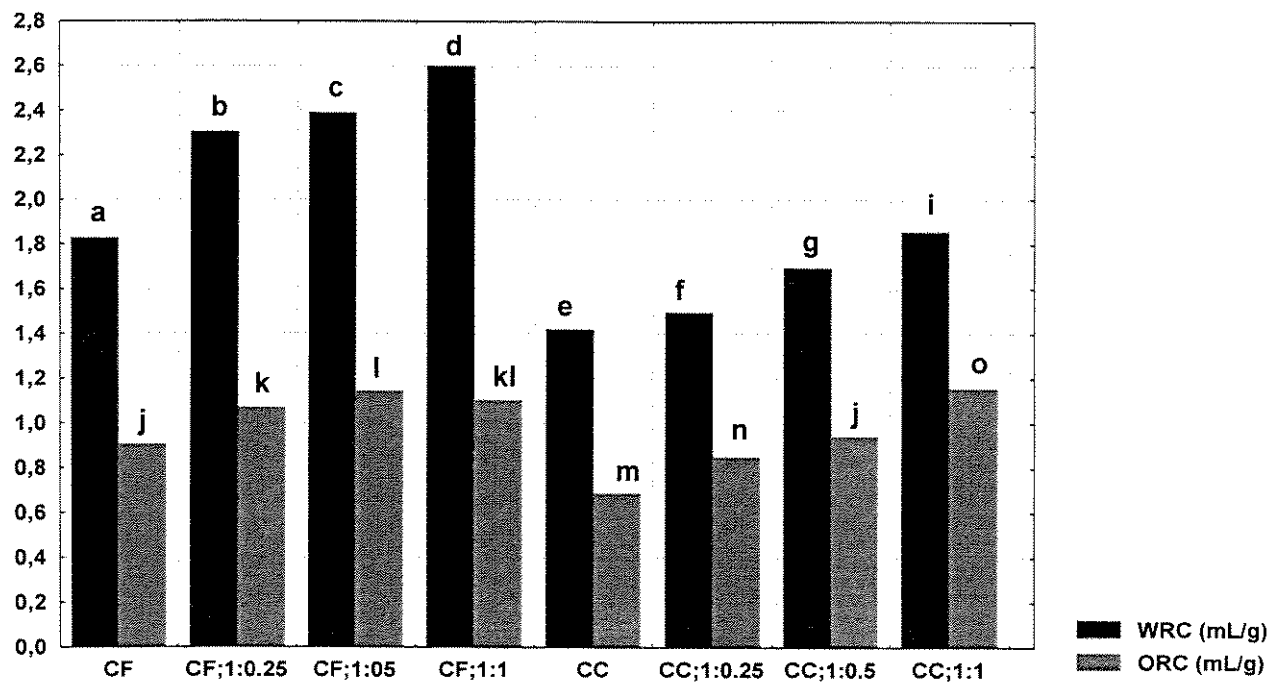


Figure 4

Effect of Protein:Palmitoyl Chloride ratio (PPCR) on water retention capacity (WRC) and oil retention capacity (ORC) of cottonseed flour (CF) and cottonseed protein concentrate (CC) at pH 7.0

Columns accompanied by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

CONCLUSÕES GERAIS

1. A remoção da testa das amêndoas de palmiste teve um efeito importante nas propriedades funcionais, ocasionando uma redução da solubilidade e um aumento na estabilidade da emulsão e expansão de espuma. A farinha de palmiste sem testa apresentou melhores propriedades sensoriais tais como cor e textura.
2. O processo de concentração de proteínas a partir da farinha de palmiste mostrou-se tecnicamente viável, obtendo-se um concentrado com teor de proteína de 48% (N X 6,25), porém com rendimentos muito baixos, menores que 2%, o que seguramente torna sua aplicação inviável economicamente.
3. O processo de concentração de proteínas a partir da farinha de algodão permitiu obter concentrados com 77% de proteína bruta (N X 5,3) e um rendimento de 38%, índices adequados para este tipo de produtos.
4. As propriedades funcionais da farinha de palmiste, medidas no pH isoeletrico de suas proteínas (pH 4,3), foram menores que no pH 7,0, exceto as propriedades espumantes das farinhas lipofilizadas. Isto é devido principalmente à diminuição da solubilidade no pl, provocada pela desnaturação, porém, a formação de espuma é beneficiada pela desnaturação a nível superficial, responsável pelas mudanças conformacionais que geram filmes coesivos ao redor das bolhas de ar.
5. A lipofilização via reação com cloreto de ácido palmítico mostrou-se uma técnica rápida e eficiente para modificar quimicamente as propriedades funcionais das proteínas vegetais de palmiste e de algodão, valorizando estas duas matérias primas.
6. O processo de lipofilização de proteínas da farinha de palmiste e da farinha de algodão e seu concentrado modificou significativamente as propriedades funcionais, observando-se um aumento nos valores das propriedades superficiais (atividade e estabilidade da emulsão) e espumantes, porém, a solubilidade diminuiu significativamente em todos os casos.

7. Observou-se que a mudança nas propriedades funcionais depende do tipo de matéria prima utilizada e da relação proteína:cloreto de ácido palmítico. Em geral, para a farinha de palmiste lipofilizada, as propriedades aumentaram a níveis baixos de proteína:cloreto de ácido palmítico, enquanto que na farinha de algodão e seu concentrado protéico lipofilizados, os valores das propriedades funcionais aumentaram com o aumento dos níveis de ácido palmítico incorporado.
8. Muito embora os teores de gossipol apresentados pela farinha de algodão forem baixos, o processo de lipofilização, os reduziu ainda mais, devido à alta quantidade de álcali utilizada para manter o pH 9,0.

1 ANEXO 1. OBTENÇÃO DO CONCENTRADO DE PALMISTE

A obtenção do concentrado do palmiste a partir da farinha sem testa foi feita segundo o método Bologun *et al.* (1982) e Nielsen *et al.*, (1973). A farinha foi suspensa em uma solução de NaOH 1N, relação farinha:solvente de 1:10, p/v. Agitou-se por 90 min, a 600 rpm, à temperatura ambiente (25°C) e o pH se manteve em 12. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 12500 g (rotor 22.500) por 20 min e o sobrenadante foi acidificado até o pl (pH 4,3). O concentrado foi seco em estufa com circulação de ar por 24 h, a 35°C, moído e armazenado em freezer. O rendimento na concentração foi de 1,98% em peso e o teor de proteína foi de 44% (N X 6,25). Por estes motivos, a concentração de proteínas da torta de palmiste foi inviável em termos econômicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALOGUN, O.O. Extraction of nitrogen from palm kernel meal and evaluation of digestibility of protein isolate from the meal by the in vitro method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 30, p. 1163-1166, 1982.

NIELSEN, N.C.; INGLETT, G.E.; WALL, J.J., DONALDSEN, G.L. Corn germ protein isolate-preliminary studies on preparation and propestiea. **Cereal Chemistry**, v. 50, p. 435-443, 1973.

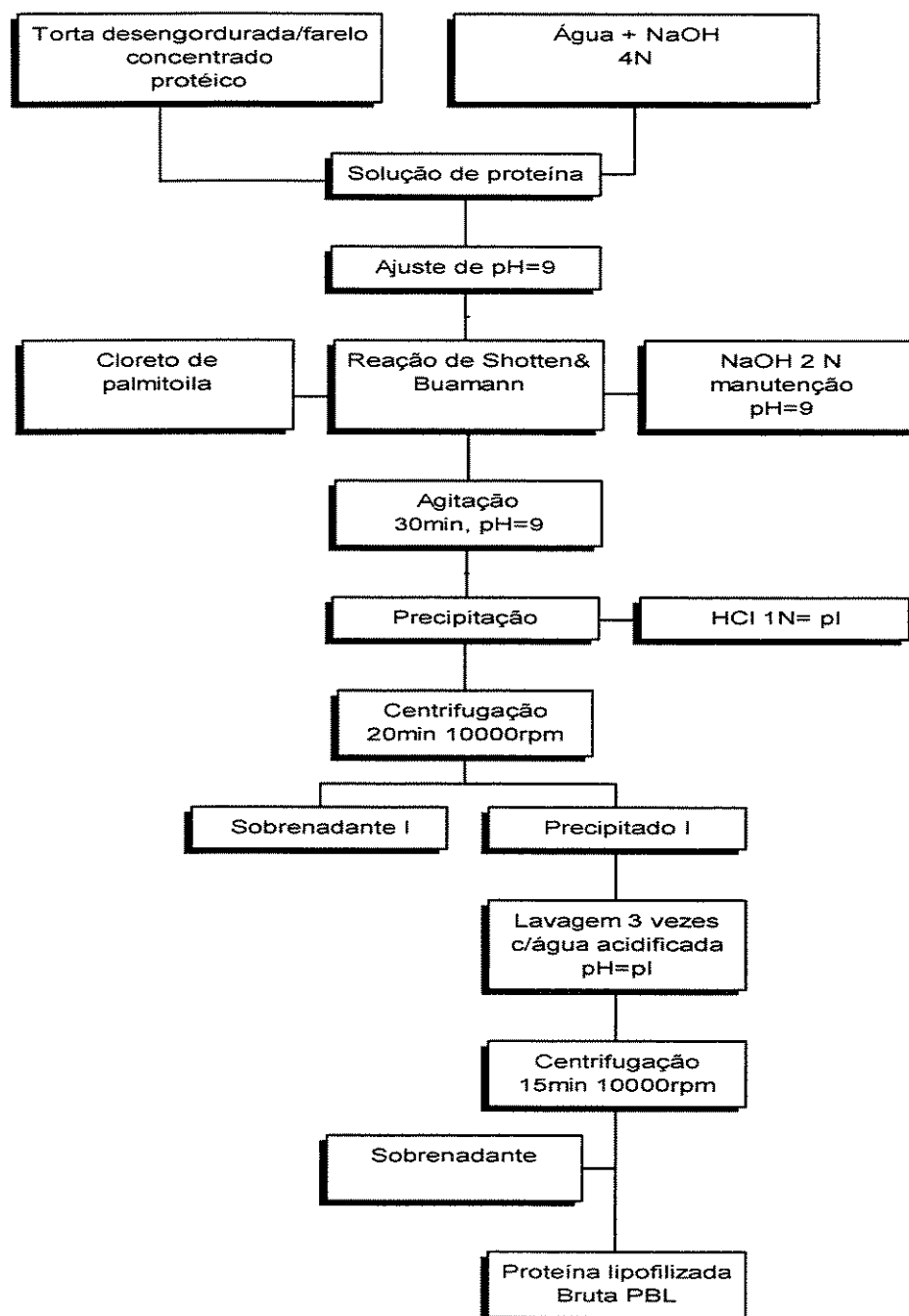
2 ANEXO 2. ELIMINAÇÃO DE AÇÚCARES E FIBRAS SOLÚVEIS DO FARELO DE ALGODÃO

A remoção dos açúcares e fibras solúveis do farelo de algodão foi estudada com quatro solventes. As soluções utilizadas foram etanol 90%, segundo o método de Martinez *et al.* (1970), 1-butanol:HCl 0,005N (92:8 v/v) e 2-propanol:HCl 0,005N (92:8 v/v), segundo Liadakis *et al.*, (1993). A relação farelo:solvente utilizada, foi de 1:100, p/v. Um grama de amostra foi suspenso nos solventes mencionados em um erlenmeyer de 250 mL com tampa e deixado em agitação magnética por 2 h. Após este tempo, as suspensões foram centrifugadas a 12500 g (rotor HF 22.500) e os sobrenadantes foram descartados. Os resíduos foram secos em uma estufa com circulação de ar por 2 h, a 40°C. A determinação de nitrogênio foi feita após a secagem. Contra o esperado, observou-se que para todos os solventes utilizados, existiu uma redução pequena no teor de proteína dos produtos. Isto é provavelmente devido à remoção de proteínas solúveis nestes solventes, que foi maior que a quantidade de fibras e açúcares solúveis da farinha de algodão. Portanto, a produção do concentrado de algodão por precipitação ácida foi feita diretamente do farelo de algodão, com 48% de proteína (N X 5,3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARTINEZ, W.H.; BERARDI, L.C.; GOLDBLATT, L.A. Cottonseed protein products-composition and functionality. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 18, p. 961-968, 1969.
- LIADAKIS, G.N.; FLORIDIS, A.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V. Protein isolates with gossypol content from screw-pressed cottonseed meal. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 918-922, 1993.

6. ANEXO 3. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE LIPOFILIZAÇÃO, SEGUNDO ROUSSEL-PHILIPPE (1998)



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ROUSSEL-PHILIPPE, C. Etude de differents procedes de lipophilisation des proteines. Application ant protéines de soja et an gluten de blé, França, **Tese de doutorado**. Institut National Polychnique de Tolouse, 1998.