

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO BIOMÉDICO



Sónia Kristy Pinto Melo Rodrigues

**Caracterização das proteínas do glúten de trigo brasileiro de diferentes
qualidades tecnológicas por Espectrometria de Massas**

Rio de Janeiro
2016

Sónia Kristy Pinto Melo Rodrigues

Caracterização das proteínas do glúten de trigo brasileiro de diferentes qualidades tecnológicas por Espectrometria de Massas

Monografia apresentada no Instituto Biomédico da
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
como requisito para obtenção do grau de Bacharel
em Biomedicina

Orientadora Científica e acadêmica: Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

Rio de Janeiro

2016

Sónia Kristy Pinto Melo Rodrigues

Caracterização das proteínas do glúten de trigo brasileiro de diferentes qualidades tecnológicas por Espectrometria de Massas

Monografia apresentada no Instituto Biomédico da
Universidade Federal Do Estado do Rio de Janeiro
como requisito para obtenção do grau de Bacharel
em Biomedicina

22 de Dezembro de 2016

Banca examinadora

Dr. Rafael Braga Gonçalves-UNIRIO

Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira-UNIRIO

Dedico este trabalho aos meus pais,
Sidónio Rodrigues e Maria dos Prazeres Santos.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a todos os professores, pelo conhecimento racional, dedicação e pela paciência durante a minha formação profissional.

À minha orientadora Profa. Dra. Mariana Larraz Ferreira pela credibilidade e confiança depositada em mim, pelos conhecimentos, que me possibilitaram adquirir bagagem que com certeza serão úteis futuramente.

Ao Dr. Carlos Andrés Rodríguez Vega e Dr. Gustavo Souza pela ajuda e pelo conhecimento passado, pelas dicas e por toda a ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (LBP) e aos membros do Laboratório de Bioativos.

À equipe glúten, Verônica, Thaís, Carol e Diego, principalmente Millena por toda a ajuda, pela paciência para me ajudar e pelas explicações, pelas horas de almoço, conversas e gargalhadas.

Aos meus pais pelo amor, apoio incondicional e pelas palavras de incentivos mesmo estando longe.

A toda a minha família, principalmente minha Madrinha Gloria, Tio Humberto e Tia Maria José pelo amor e apoio incondicional.

A todos os meus amigos em Cabo Verde, na UNIRIO e no Brasil, obrigada pela compreensão e pelo apoio.

À minha amiga de infância Aleida, pelo apoio, paciência e pelo amor, mesmo estando longe de casa nunca me deixou desistir.

À toda a minha Família 604, Du, Faby, Heiny, Héliida, Jéssica e Risete, obrigada por ser minha família aqui no Brasil e obrigada pelo apoio, carinho e amor.

À minha amiga Andréa, por sempre me lembrar de que no final tudo dá certo, pelas noites de estudo e por tornar essa caminhada mais fácil.

À UNIRIO pela bolsa de Iniciação Científica, à FAPERJ e ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

Aos membros da banca pelo tempo dedicado na avaliação desse trabalho.

A todos vocês o meu sincero obrigada, esse trabalho não seria realizado sem a ajuda de todos vocês.

E finalmente a Deus, porque sem ele nada é possível.

Resumo

O grão de trigo é considerado a matéria-prima mais adequada para a fabricação de pães e massas devido a sua textura e qualidade das proteínas de reserva. O trigo é o 2º cereal mais cultivado no mundo, no entanto, a produção brasileira é inferior à demanda e apresenta baixa qualidade tecnológica. A qualidade norteia a utilização industrial do trigo e está intimamente relacionada com a qualidade do glúten, que depende das proteínas de reserva e do perfil polimérico das gluteninas. Abordagens proteômicas revelam-se como importantes ferramentas para a caracterização das proteínas do trigo. No sentido de obter melhor entendimento sobre os fatores determinantes da qualidade do trigo brasileiro, este trabalho teve como objetivo caracterizar as proteínas do glúten de farinhas de trigo brasileiro de diferentes qualidades, por meio de cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas de alta definição (UPLC-HDMS). Neste trabalho, foram utilizadas 9 farinhas de trigo brasileiro classificadas como Forte, Média e Fraca, sendo 3 variedades de cada. Determinou-se o teor de umidade e de proteínas totais. Após extração e quantificação das proteínas, foi realizado um *pool* de acordo com cada classificação. Foi feita a digestão, redução e alquilação das proteínas. As aquisições foram realizadas em sistema NanoUPLC-HDMS Synapt G2-S (Waters) e os dados foram analisados no software PLGS (Waters). Foram identificados 5.493 peptídeos em todas replicatas e 610 peptídeos por replicata. Foram identificadas 150 proteínas, que apresentaram em média 6 peptídeos identificados por proteína. As proteínas identificadas apresentaram taxas dinâmicas similares com mais de 4 ordens de magnitude para todas as amostras, indicando uma distribuição similar de expressão proteica. Das 150 proteínas, 82 foram comuns às 3 amostras. A maioria das proteínas identificadas ainda não foi caracterizada quanto à função, ressaltando-se a necessidade de mais estudos quanto à caracterização dessas proteínas. Com relação às proteínas exclusivas de cada amostra, as gliadinas e gluteninas de baixo peso molecular foram as principais. Tais proteínas são também fatores determinantes na qualidade tecnológica do trigo. A aplicação de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas mostrou-se eficiente na identificação das proteínas do trigo e fornecem novas perspectivas de avaliação da qualidade tecnológica de farinha de trigo brasileiro. No entanto, os resultados necessitam ainda de uma etapa de quantificação detalhada.

Palavras-chave: LC-MS, gliadina, glutenina, prolaminas, *Triticum aestivum*.

Abstract

Wheat grain is considered the most suitable raw material for the manufacture of bread and pasta due to its texture and quality of the storage proteins. Wheat is the second most cultivated cereal in the world, however, Brazilian production is lower than demand and presents low technological quality. Technological quality drives the industrial use of wheat and is closely related to the gluten quality, which depends on the storage proteins and the glutenin polymer profile. Proteomic approaches prove to be an important tool for the characterization of wheat proteins. In order to obtain a better understanding of the factors determining the quality of Brazilian wheat, this work aimed to characterize the gluten proteins of Brazilian wheat flours of different technological qualities, using Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with High Definition Mass Spectrometry (UPLC-HDMS). In this work, 9 Brazilian wheat flours were classified as Strong, Medium and Low quality, being 3 varieties of each. The moisture and total protein content was determined. After extracting and quantifying the proteins, a pool was performed according to each classification. Protein digestion, reduction and alkylation were done. The acquisitions were performed in NanoUPLC-HDMS Synapt G2-S system (Waters) and the data were analyzed in PLGS software (Waters). Globally 5,493 peptides were identified in all replicates and 610 peptides per replicate. A total of 150 proteins were identified, showing on average 6 peptides identified per protein. The identified proteins showed similar dynamic range of more than 4 orders of magnitude for all samples, indicating a similar distribution of protein expression. From the 150 proteins, 82 were common to all 3 samples. Most of the identified proteins have not yet been characterized in function, emphasizing the need for more studies on the characterization of these proteins. Regarding the unique proteins to each sample, gliadins and low molecular weight glutenins were the most important. These proteins are also determining factors of the wheat technological quality. The application of chromatographic techniques coupled with mass spectrometry proved to be efficient in the identification of wheat proteins and provide new perspectives for evaluating the technological quality of Brazilian wheat flour. However, these results still require a detailed quantification step.

Keywords: LC-MS, gliadin, glutenin, prolamins, *Triticum aestivum*.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Estudo histológico do grão de trigo.....	4
Figura 2 - Classificação das proteínas do trigo.....	7
Figura 3 - Eletroforese bidimensional (IEF- SDS-PAGE) de gluteninas e gliadina de trigo comum chinês.....	9
Figura 4 - Cromatogramas das aquisições por MS ^E das amostras Fraca em BPI (base peak intention).....	26
Figura 5 - Cromatogramas das aquisições por MS ^E das amostras Média em BPI (base peak intention).....	26
Figura 6 - Cromatogramas das aquisições por MS ^E das amostras Forte em BPI (base peak intention).....	27
Figura 7 - Comparação dos cromatogramas das aquisições por MS ^E das amostras Fraca, Média e Forte em BPI (base peak intention).....	28
Figura 8 - Distribuição de erro dos peptídeos em ppm (%).....	29
Figura 9 - Tipos de Peptídeos identificados.....	30
Figura 10 - Distribuição do número de Clivagem perdida (%).....	31
Figura 11A - Total de peptídeos por amostra, considerando todas as replicatas.....	31
Figura 11B - Número de peptídeos identificados por replicata.....	31
Figura 12 - Média de peptídeos por amostra.....	32
Figura 13 - Distribuição do número de peptídeos identificados por proteína (%).....	32
Figura 14 - Dinâmica das proteínas Fracas, Médias e Fortes.....	34
Figura 15 - Diagrama de Venn com todas as proteínas identificadas nas amostras Fraca, Média e Forte.....	34
Figura 16A - Identificação das proteínas comuns das amostras Fraca, Média e Forte.....	35
Figura 16B - Identificação das proteínas presentes na amostra Fraca.....	35
Figura 16C - Identificação das proteínas presentes na amostras Média.....	35
Figura 16D - identificação da proteínas presentes na amostra Forte.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1-Characterização da qualidade tecnológica de diferentes cultivares brasileiras segundo parâmetros reológicos e físico-químicos.....	19
Tabela 2-Characterização físico-química de farinhas de trigo de diferentes cultivares brasileiros: umidade e teor de proteína total por Kjeldhal.....	24
Tabela 3-Quantificação da concentração das proteínas por Bradford.....	24
Anexo 1-Lista de proteínas identificadas nas diferentes amostras.....	45

Lista de Abreviaturas

AACC- American Association of Cereal Chemists

ABITRIGO- Associação Brasileira das Indústrias de Trigo

ARV- Analisador Rápido de Viscosidade

BSA- Albumina de Soro Bovino

DDA- Data Depending analysis

ESI-MS-MS- Espectrometria de Massa por Ionização por Electrospray

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations

HMW-GS- High-Molecular Weight – Glutenin Subunits

HPLC- Cromatografia Líquida de alta eficiência

IEF-SDS-PAGE- Focalização Isoelétrica - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

kDa- kilo Dalton

LC-MS- Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas

LMW-GS- Low-Molecular Weight – Glutenin Subunits

m/z- razão massa carga

MALDI-TOF-TOF- Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz, seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ppm- parte por milhão

UPLC-HDMS- Cromatografia Líquida de Ultraperformance acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Definição

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. O grão de Trigo	3
2.2. Composição química do grão de trigo.....	5
2.2.1. Amido.....	6
2.3. As proteínas do trigo	6
2.3.1. Gliadinas.....	8
2.3.2. Gluteninas.....	9
2.3.3. Polimerização das proteínas de reserva.....	10
2.4. Qualidade tecnológica do trigo.....	11
2.4.1. Reologia do trigo.....	12
2.4.2. Necessidade de avanços na determinação da qualidade tecnológica .	13
2.5. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)	16
3. Objetivo	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. Material e Métodos.....	17
4.1. Amostras vegetais.....	17
4.2. Caracterização química das amostras	20
4.3. Extração das proteínas	20
4.4. Etapa de dessalinização e concentração das proteínas (clean-up)	21
4.5. Quantificação das proteínas	21
4.6. Digestão Tríplica.....	21
4.7. Aquisição em NanoUPLC-MS ^E	22
4.8. Processamento dos dados.....	23
5. Resultados e discussão	23
5.1. Análise da composição química.....	23
5.2. Aquisição de dados em NanoUPLC-MS ^E e Scouting run	25
5.3. Peptídeos.....	28
5.4. Identificação das Proteínas.....	33
6. Conclusão	37
7. Referências Bibliográficas.....	38
8. Anexo	47

1. Introdução

Segundo FAOSTAT (2016), a produção anual total de trigo é de mais de 730 milhões de toneladas, sendo considerado o segundo cereal mais cultivado atualmente no mundo. A produção de trigo no Brasil projetada para 2018/2019 é de 7,89 milhões de toneladas e o consumo é estimado em 12,25 milhões de toneladas (MAPA, 2016). O Brasil tem uma produção do trigo desproporcional ao seu consumo, e isso faz com que seja necessária a importação de outros países como China, Estados Unidos, Índia, Rússia, Canadá, Argentina, e de alguns países da União Europeia. O que não acontece com outros cereais, por exemplo, o milho, que apresenta produção elevada, possibilitando exportação (MAPA, 2016).

O Brasil nos últimos anos tem se tornado o maior importador mundial de trigo, superando países que tradicionalmente ocupavam lugar de destaque entre os maiores compradores do mercado internacional, como por exemplo, Egito, Japão e Irã (FERREIRA, 2003).

No Brasil, produzir trigo de forma competitiva e sustentável é um dos principais desafios da agricultura. A produção recebe reforço sistemático dos órgãos de governo, uma vez que as condições do clima e do solo são desfavoráveis para esse cultivo (MAPA, 2016). Além disso, é difícil encontrar técnicas de manejo adequadas para uma boa produção e obtenção de grãos de trigo que apresentem bom rendimento e qualidade (PIRES *et al.*, 2011). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de trigo (ABITRIGO), apenas 30% do produto nacional convêm à panificação, devido à baixa qualidade e concentração de glúten, a maior parte do grão produzido é destinada à produção de farinhas para bolo e biscoitos.

Dentre todos os grãos de cereais, o trigo é o que se destaca na fabricação de produtos de panificação e massas alimentícias, devido à capacidade da sua farinha produzir uma massa que exhibe propriedades reológicas, como extensibilidade e elasticidade, adequadas à produção de pães, características proporcionadas pela presença das proteínas formadoras do glúten (CARREIRA, 2011). O glúten é uma rede polimérica viscoelástica formada pelas proteínas de reserva, gliadinas e gluteninas, após a farinha ser hidratada e submetida a uma força mecânica. As proteínas do glúten são difíceis de serem identificadas e caracterizadas porque apresentam um grande polimorfismo (FERREIRA *et al.*, 2014).

Os grãos maduros de trigo são constituídos majoritariamente pelas proteínas de reserva (80-85%), as gliadinas que formam apenas pontes dissulfeto intramoleculares e são monoméricas, e as gluteninas que são capazes de formar pontes dissulfeto também intermoleculares, formando polímeros. As gluteninas são formadas por subunidades de baixo peso molecular e de alto peso molecular (do inglês LMW e HMW, respectivamente), podendo formar de 100 kDa até mais de 1.000 kDa (WRIGLEY, 1996).

Devido à capacidade de formar polímeros, parte das gluteninas tornam-se insolúveis até mesmo em tampões contendo agentes desnaturantes como o dodecilsulfato de sódio (SDS). É sabido que esta fração polimérica insolúvel, de alto peso molecular, afeta a viscoelasticidade do glúten e por isso são os principais contribuintes do potencial tecnológico do trigo (NAEM & MACRICHIE, 2005; DELCOUR *et al.*, 2012).

As proteínas do glúten são responsáveis pelos aspectos tecnológicos e pela qualidade da farinha de trigo e devido às características reológicas, as proteínas do glúten são adicionadas em diversos tipos de alimentos, o que faz do trigo, um alimento de grande importância nutricional e econômica.

Cabe ressaltar, que além do aspecto tecnológico, as proteínas do glúten podem desencadear alergias alimentares e intolerâncias, incluindo reações inflamatórias em pacientes portadores de doença celíaca, sendo o tratamento a exclusão do consumo de glúten durante toda a vida.

A doença celíaca (DC) ou enteropatia sensível ao glúten, é uma doença digestiva caracterizada por intolerância ao glúten, ela pode aparecer durante a infância ou na vida adulta. Sendo assim, os pacientes celíacos não podem consumir o glúten porque até mesmo a ingestão de uma quantidade mínima de glúten pode causar danos intestinais e conduzir a uma variedade de sintomas, incluindo dor abdominal, perda de peso, diarreia, irritabilidade e complicações em longo prazo, como osteoporose, infertilidade e malignidade (BONGIOVANNI, *et al* 2010).

O diagnóstico da DC tem sido um desafio porque as suas formas clínicas vêm se modificando e, cada vez mais, são latentes ou assintomáticas. Portanto, percebê-las exige o envolvimento não somente do gastroenterologista, mas também de vários outros profissionais da saúde (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Neste contexto, abordagens proteômicas com base em técnicas sensíveis e confiáveis, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, capazes de separar até mesmo peptídeos de mesma massa/carga (m/z), revelam-se como importantes ferramentas para a quantificação e identificação das proteínas do glúten.

2. Revisão bibliográfica

2.1. O grão de Trigo

O Trigo (*Triticum* spp.) é uma gramínea que, no Brasil, apresenta ciclo anual, sendo cultivado durante o inverno. Dependendo da espécie e da qualidade, podemos utilizar o trigo em forma de pães, massas alimentícias, bolos, biscoitos, além de outras aplicações e ainda na fabricação de ração animal, quando o mesmo não atinge a qualidade exigida pela indústria (EMBRAPA, 2016).

Historicamente o trigo surgiu há mais de 10 mil anos na região da Mesopotâmia. Estudos arqueológicos apontam que o trigo foi o segundo grão cultivado, após a cevada, o seu cultivo foi fundamental para o desenvolvimento da civilização ocidental. O cultivo do trigo desde a antiguidade foi importante porque permitiu o progresso da espécie humana através do desenvolvimento de civilizações e fixação destas, devido à possibilidade de armazenamento dos grãos. A evolução do trigo iniciou-se entre espécies ancestrais e com a modificação genética, foi tornando-se mais produtivo (SCASE, 1975; HOWTHORN, 1983).

O trigo é um dos cereais mais importantes desde a pré-história, devido a sua boa adaptação a todos os tipos de solo e a diferentes climas (QUAGLIA, 1991).

As duas espécies de trigo mais produzidas no mundo são o *Triticum aestivum*, pertencente à espécie hexaplóide (AABBDD, $2n=42$), mais utilizada na panificação, produção de bolos, biscoitos, massas e produtos de confeitaria, e o *Triticum durum*, espécie tetraploide (AABB, $2n=28$), especialmente destinada ao preparo de massas alimentícias (SERNA-SALDIVAR, 2010). O *Triticum aestivum* ou trigo comum, também conhecido como trigo mole, representa mais de 90% da produção mundial e é muito importante do ponto de vista comercial, uma vez que em países que não produzem o trigo duro (*T. durum*), esta espécie também é usada no lugar da sêmola para a fabricação de massas alimentícias (QUAGLIA, 1991; GOODING, 2009).

O grão de trigo é um fruto seco chamado cariopse que é constituído de uma semente revestida por tegumentos (Figura 1). O grão apresenta uma forma ovóide e tem um sulco que atravessa todo o seu comprimento. No lado dorsal, o germe estende-se do pólo basal até um terço do comprimento do grão, e o oposto, no pólo apical, encontra-se uma escova quase invisível a olho nu (SCHEUER *et al.*, 2011).

O grão de trigo tem o tamanho de 5-7 mm de comprimento, 2,5 a 4 mm de largura e 2,5 a 3,5 mm de espessura e seu peso pode variar entre 20 e 50 mg (CARDOSO & BRAZ, 2005). No entanto, essas características podem variar de acordo com as condições de cultura, clima, presença ou não de parasitas e também da posição do grão na espiga (CALDERINI *et al.*, 2000, EVERS & MILLAR, 2002).

Histologicamente, o grão é constituído pelo germe (3%), envelopes externos (13-16% do grão) e endosperma amiláceo (80-85% do grão) (Figura 1) (KENT & EVERS, 1994; ONIPE *et al.*, 2015).

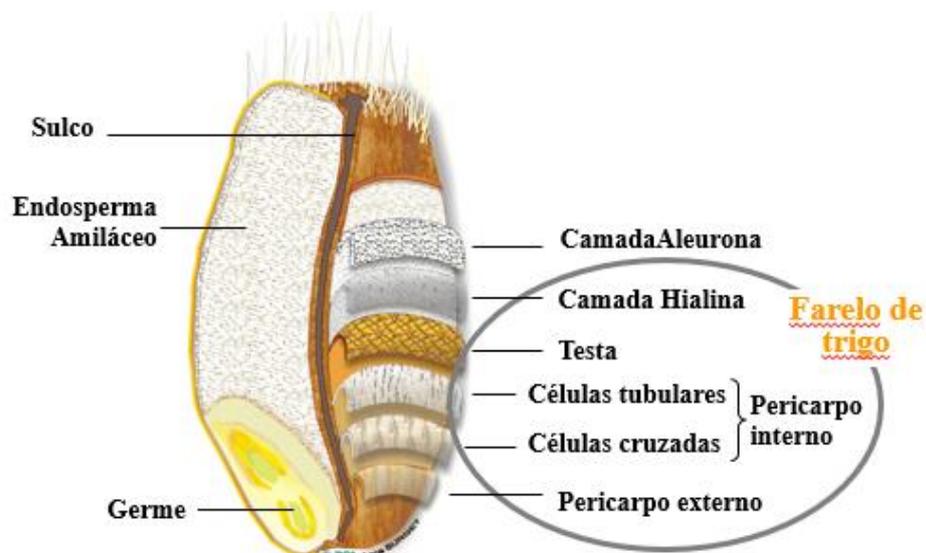


Figura 1. Estudo histológico do grão de trigo. Adaptado de Surget & Barron (2005).

O germe ou embrião é a parte do grão que é responsável pela germinação do grão, ela constitui cerca de 2 a 3% do peso do grão e é rico em enzimas, lipídios e dos componentes fundamentais à germinação do grão (BELITZ & GROSCH, 1997; ATWELL, 2001; SCHEUER *et al.*, 2011). É composto pelo eixo embrionário e pelo revestimento externo, o escutelo.

O envelope externo é a parte mais externa do grão e ela recobre toda a semente. Ele representa aproximadamente 13 a 16% do grão e é composto por seis camadas, cada uma com uma espessura e origem diferente (BRANDÃO *et al.*, 2007). Da superfície externa para o centro, o envelope externo do grão é constituído pelo pericarpo externo e pericarpo interno que contém as células cruzadas, e as células tubulares, testa (onde se encontra os pigmentos que dão cor ao grão), hialina e camada de aleurona (Figura 1) (HONSEY, 1991; QUAGLIA, 1991).

O endosperma representa o tecido mais abundante do grão, representando cerca de 80%. O endosperma é composto essencialmente de grânulos de amido e proteínas. Devido a esta composição, a estrutura do endosperma é responsável por atribuir ao trigo às propriedades de dureza e vitrosidade (HADDAD *et al.*, 2001, SCHEUER *et al.*, 2011).

Dureza e vitrosidade são importantes fatores de rendimento e qualidade e podem definir o uso tecnológico do grão (JAYAS *et al.*, 2010). A vitrosidade é uma propriedade ótica, verificada pelo alto grau de compactação das células do endosperma, e é influenciada pelas condições de crescimento do grão, levando em conta a temperatura, estado hídrico e nitrogênio disponível durante o crescimento da planta (VERONA *et al.*, 2009; SCHEUER *et al.*, 2011). Já a dureza é o grau de resistência do grão à deformação, é uma característica definida por fatores genéticos e deve ser levada em consideração durante a moagem do grão porque pode determinar a qualidade do mesmo (SYMES, 1961; EI-KHAYAT *et al.*, 2006, GREFFEUILLE *et al.*, 2007).

2.2. Composição química do grão de trigo

A composição química do grão de trigo afeta suas características funcionais e tecnológicas que, juntamente com as propriedades estruturais e a população microbiológica, definem a qualidade da farinha de trigo (MOUSIA *et al.*, 2004). Assim, as diferentes características dos componentes dos grãos de trigo provenientes de diferentes cultivares, bem como as suas quantidades, podem influenciar a qualidade da farinha de trigo (MORITA *et al.*, 2002).

O grão de trigo é composto majoritariamente por amido (70-75%), proteínas (8-16%, de acordo com a variedade e condições de cultivo), água (12-14%),

polissacarídeos não amiláceos (2 a 3%), lipídeos (2%) e cinzas (1%) (MORITA *et al.*, 2002).

2.2.1. Amido

O amido é o principal constituinte (85%) do endosperma amiláceo que juntamente com a camada aleurona formam o endosperma, uma vez que esta camada não é totalmente eliminada durante a moagem (HEMERY *et al.*, 2007). Os grânulos de amido são compostos por dois polímeros de glicose em diferentes graus de polimerização e ramificação, amilose (26-28%) e amilopectina (72-74%). A amilopectina é um polímero ramificado e complexo, tem peso molecular que varia de 10.000 a 100.000 kDa e está presente na maioria dos amidos (60-90%). É constituída por monômeros de D-glicopiranosose unidos por ligação glicosídica α (1-4) e também pode fazer ligações glicosídicas α (1-6) nas laterais com outras cadeias (COLONNA & BULÉON, 1992; COPELAND *et al.*, 2009). Já a amilose é um monômero com cadeias longas e lineares de D-glicopiranosose ligadas por ligações glicosídicas α (1-4), com peso molecular que varia entre 100 e 1.000 kDa (HONSEY, 1994). Os polímeros de amilose são os responsáveis pela absorção de água e formação de gel, formando redes tridimensionais (CHEFTEL & CHEFTEL, 1992; ATWELL, 2001). Essa característica é de grande interesse para a indústria de processamento de alimentos porque modifica a textura e por consequência a qualidade dos produtos elaborados (HUNG *et al.*, 2006).

Quando o amido é encontrado na presença de água e temperatura, ele apresenta algumas propriedades como solubilidade, viscosidade, gelatinização e adesão (KULP, 1972). Durante o cozimento, o amido nativo transforma-se em uma pasta e quando ele é resfriado, ocorre a desagregação das moléculas formando um gel, que se transforma gradualmente em um agregado semicristalino, diferente do grânulo inicial (COPELAND *et al.*, 2009). As mudanças que ocorrem nos grânulos de amido durante a gelatinização e a retrogradação, são os principais determinantes do comportamento reológico desses amidos; elas têm sido medidas principalmente pelas mudanças de viscosidade durante aquecimento e resfriamento de dispersões de amido (MESTRES, 1996).

2.3. As proteínas do trigo

Osborne (1907) foi o primeiro a classificar as proteínas do trigo, de acordo com a sua solubilidade (Figura 2). Ele classificou as proteínas em solúveis em água (albuminas), solúveis em soluções salinas (globulinas), solúveis em soluções alcoólicas (gliadinas) e as solúveis em soluções alcalinas ou ácidas (gluteninas solúveis). Em consequência das numerosas associações covalentes entre os polipeptídeos de gluteninas, parte destas proteínas permanece insolúvel mesmo em tampões fortemente desnaturantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) (WRIGLEY, 1996).

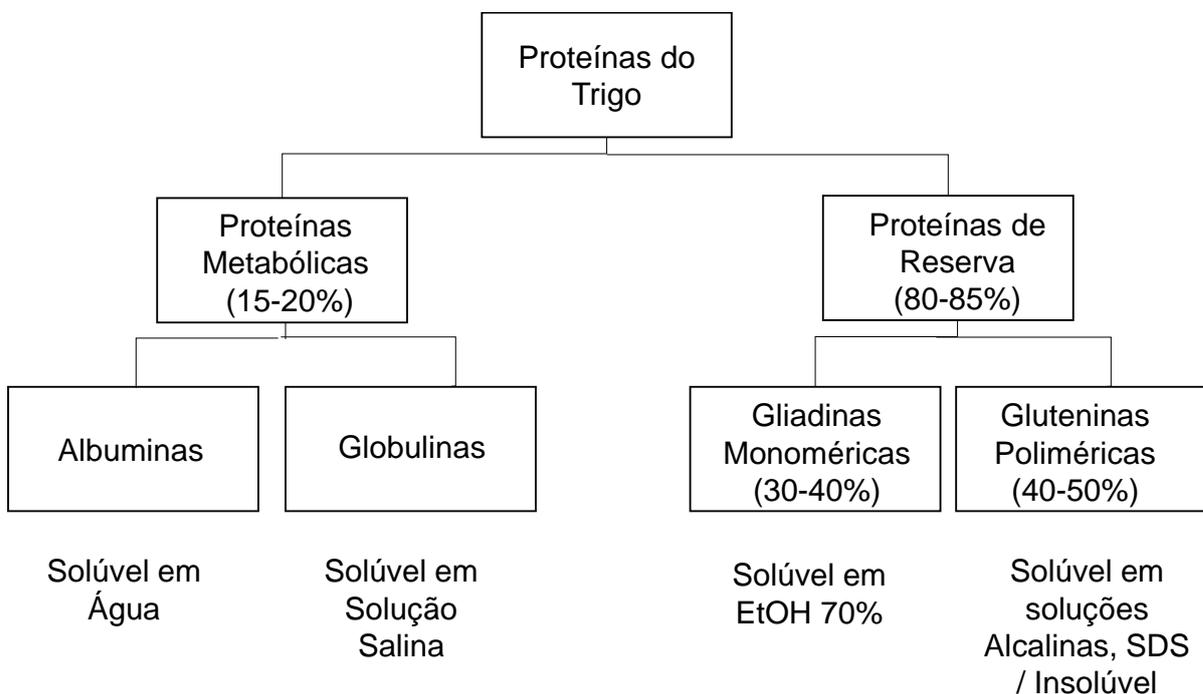


Figura 2. Classificação das proteínas do trigo (adaptado Osborne, 1907).

Algumas décadas depois, foi proposta outra classificação baseada nas características moleculares das proteínas de reserva do trigo, sua capacidade de polimerização e a sua composição de aminoácidos (SHEWRY *et al.*, 1986). Assim, as proteínas de reserva foram classificadas em dois grupos majoritários, as gliadinas como monoméricas e as gluteninas como poliméricas. As subunidades de gliadinas e gluteninas foram então classificadas em três subtipos de acordo com o seus teores de enxofre. Dentre as proteínas monoméricas (gliadinas), as pobres em enxofre: ω -gliadinas e as ricas em enxofre: α - β e γ -gliadinas. Dentre as subunidades de gluteninas, as ricas em enxofre, divididas em glutenina de baixo peso molecular (do

inglês, LMW-GS) e de alto peso molecular (do inglês, HMW-GS), subdivididas em tipo y e x (HALFORD *et al.*, 1992; SHEWRY & TATHAM, 1990).

As proteínas do trigo são ainda classificadas por suas características biológicas e sua localização no grão (WRIGLEY & BEITZ, 1988). Compreendem então proteínas metabólicas (albuminas e globulinas) e de reserva (gliadinas e gluteninas), sendo, essas últimas também conhecidas como prolaminas devido a sua rica composição em aminoácidos prolina (P) e glutamina (Q). As prolaminas são as proteínas que formam o glúten e são responsáveis pela viscoelasticidade da farinha, permitindo a produção de pão, massas e macarrão (QIAO, 2008). O glúten é formado com a adição de água na farinha de trigo submetida a força mecânica (sova), forma-se então uma massa coesa e elástica que se expande quando assada (GRISWOLD, 1972). A propriedade viscoelástica resultante do glúten hidratado é conferida pelas gliadinas e gluteninas, que juntas propiciam resistência à ruptura da massa, as gliadinas conferem boa extensibilidade e as gluteninas, elasticidade (CHIANG *et al.*, 2006; VAN DER BRUG *et al.*, 2005).

Assim, a composição qualitativa e quantitativa das frações de gliadinas e glutenina influenciam as propriedades reológicas da massa de trigo, mais especificamente na formação e obtenção da matriz viscoelástica do glúten (PRUSKA-KEDZIOR *et al.*, 2008).

2.3.1. Gliadinas

As gliadinas são definidas como proteínas do glúten que são insolúveis em água e soluções salinas, mas por outro lado são solúveis em soluções alcoólicas sem redução das ligações de dissulfeto. Por possuírem apenas pontes dissulfeto intramoleculares, apresentam-se como monômeros e interagem intermolecularmente com outras proteínas principalmente por meio de ligações não covalentes (KONTOGIORGOS, 2011).

As gliadinas apresentam massa molecular de 30 kDa a 78 kDa, representam aproximadamente 45% das proteínas disponíveis do trigo. De acordo com a mobilidade eletroforética (Figura 3) apresentam-se em duas subfrações: α - β - γ - e ω - (ANG *et al.*, 2010; D'OVIDIO & MASCI, 2004). As α -, β - e γ -gliadinas tem pI entre 6,5 e 8,0 e peso molecular de 30-45 kDa, enquanto que as ω -gliadinas têm pI entre 5 e 7 e peso molecular próximo de 75 kDa (SHEWRY & HALFORD, 2002). Cabe

ressaltar, que as α -, β - gliadinas são muito similares, portanto as subunidades de gliadina podem ser classificadas em três tipos: α -/ β -, γ - e ω - (MELNOKOVA *et al.*, 2011)

2.3.2. Gluteninas

As gluteninas representam cerca de 40 a 50% das proteínas de reserva do trigo. Elas formam um polímero que é estabilizado por pontes de dissulfeto inter e intramoleculares podendo atingir pesos moleculares acima de 1.000 kDa (WRIGLEY, 1996). As gluteninas são insolúveis em água e etanol, mas podem ser solubilizadas em presença de ureia (POMERAZ, 1965) ou em dodecil sulfato de sódio (SDS) (GRAVELAND *et al.*, 1979).

Elas são divididas de acordo com o peso molecular em LMW-GS e HMW-GS (SHEWRY *et al.*, 1986). De acordo com a mobilidade eletroforética (Figura 3), as LMW-GS se subdividem em dois grupos B e C, com peso molecular igual a 40 kDa e 50 kDa, respectivamente (SING & SHEPERD, 1988). Enquanto que as HMW-GS se subdividem em tipo A, com pesos moleculares de 95 a 136 kDa (SHEWRYEL *al.*, 1986).

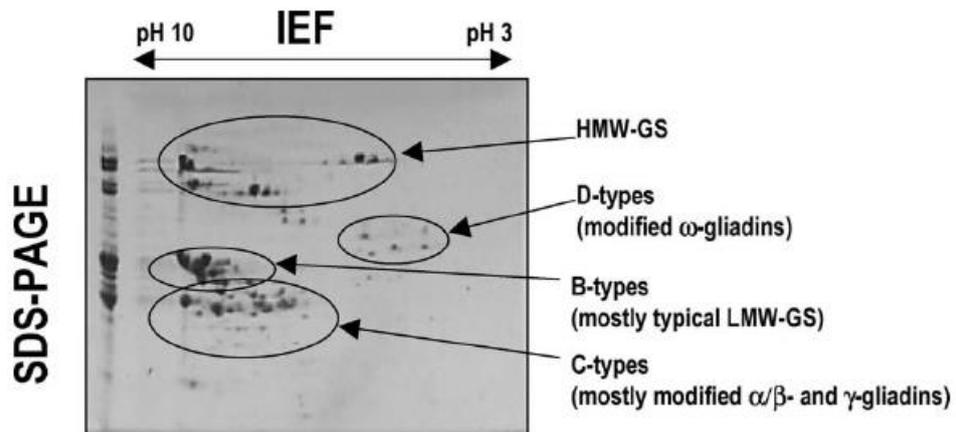


Figura 3. Eletroforese bidimensional de gluteninas e gliadinas de trigo comum chinês. Fonte: D'OVIDIO & MASCI, 2004.

2.3.3. Polimerização das proteínas de reserva

A formação das pontes dissulfeto intermoleculares é uma modificação pós-traducional, essencial para a polimerização das gluteninas. Segundo Morel & Bonicel (1996), os polímeros de gluteninas são estabilizados por ligações de hidrogênio e por pontes de dissulfeto intermoleculares, o tamanho e a estrutura final dos polímeros de gluteninas são influenciados pelos resíduos de cisteína e sua posição na estrutura das subunidades de glutenina.

A síntese de glutenina e de seus polímeros iniciam-se precocemente no grão, por volta de 7 dias após a floração (GUPTA *et al.*, 1996). Muitos autores vêm trabalhando na tentativa de caracterizar a polimerização do trigo durante o seu desenvolvimento. Benetrix *et al.* (1994) fizeram análises de eletroforese unidimensional de trigo duro e observaram que as frações α -, β -, γ -gliadinas bem como as subunidades de gluteninas (HMW e LMW) e as albuminas foram sintetizadas ao mesmo tempo. Outros trabalhos feitos com trigo comum também demonstraram que a síntese das LMW-GS ocorrem ao mesmo tempo que as HMW-GS, cerca de 5 a 13 dias depois da floração, levando em conta o seu genótipo e as condições de crescimento (DUPONT & ALTENBACH, 2003; ABONYI *et al.*, 2007).

Panozzo *et al.* (2001) estudaram a evolução de diferentes frações poliméricas durante o crescimento de grãos de trigo de quatro variedades diferentes. Eles observaram que a proporção de polímeros de tamanho médio (> 150 kDa) mantém-se relativamente constante, enquanto que os pequenos polímeros diminuíram significativamente. Por outro lado a proporção de polímeros maiores do que 400 kDa aumentaram de forma constante. Benetrix *et al.* (1994) observaram um padrão semelhante de crescimento dos polímeros de glutenina para o trigo duro. Os autores sugeriram que o aumento no tamanho molecular dos polímeros durante o enchimento do grão indica um processo de polimerização contínuo.

Cabe ressaltar que a distribuição da massa molecular dos polímeros de glutenina e principalmente as frações poliméricas insolúveis em SDS afetam positivamente a viscoelasticidade do glúten e, portanto, são os principais contribuintes do potencial tecnológico do trigo (POPINEAU *et al.*, 1994; NAEEM *et al.*, 2005; DELCOUR *et al.*, 2012). Assim, o teor e a composição das proteínas do glúten (gliadinas/gluteninas), que permitirão a formação dos polímeros por meio de pontes dissulfeto, são fatores determinantes para a qualidade da farinha de trigo. No

entanto, devido ao seu polimorfismo, as proteínas do glúten são difíceis de serem identificadas e caracterizadas.

Mais recentemente, no intuito de avaliar a estrutura polimérica do glúten, alguns trabalhos foram desenvolvidos por espectrometria de massas (LUTZ *et al.*, 2012; ROMBOUITS *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2014). No entanto, os autores relatam que as técnicas utilizadas (ex: MALDI-TOF-TOF, ESI-MS-MS) exigem conhecimento prévio da localização de resíduos cisteínas e apontam a necessidade de um procedimento preciso de quantificação. Isso porque, os métodos utilizados são considerados como dados dependentes (do inglês, DDA-*data-dependent analysis*) e fornecem apenas uma amostragem parcial e, portanto, não abrangem todos os peptídeos necessários para quantificação (SILVA *et al.*, 2006; MURAD *et al.*, 2012).

2.4. Qualidade tecnológica do trigo

Os fatores de qualidade da farinha de trigo podem ser divididos em dois grupos: os inerentes ao trigo, resultantes da composição genética e das condições de crescimento da planta e os que dependem do processo de armazenamento e moagem do trigo em farinha (QUEIJI *et al.*, 2006). A qualidade pode ser determinada através de uma série de características que apresentam significados diversos de acordo com a designação de uso ou tipo de produto. É possível dividir estas características em físicas, químicas, enzimáticas e reológicas (RASPER, 1991; RAO, 1993; SMANHOTTO *et al.*, 2006).

O trigo é o cereal que apresenta melhor característica para panificação, e por isso a qualidade industrial tem sido um dos mais importantes alvos do melhoramento genético de trigo. O teor e a qualidade das proteínas formadoras de glúten (gliadina e glutenina) da farinha de trigo são os principais fatores responsáveis pelo seu potencial de panificação. Por outro lado, o amido e os lipídeos são também necessários para garantir o potencial de panificação com características adequadas como volume e textura, dependendo do teor e qualidade destes na farinha (TOUUFELI *et al.*, 1999; BORLA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004; QUEIJI *et al.*, 2006).

A qualidade e as propriedades reológicas do glúten são diretamente influenciadas pela qualidade e quantidade das gliadinas e gluteninas. Para que uma

farinha seja considerada de boa qualidade, deve haver um balanço entre estas duas frações de proteínas (TOUFEILI *et al.*, 1999; WIESER, 2007). Assim, para uma qualidade ser representativa, deve haver combinação ideal entre quantidade e qualidade de proteínas presentes no trigo (SILVA *et al.*, 2004).

A coesão e a elasticidade são consideradas propriedades tecnológicas do glúten, que garantem as características únicas de produtos panificados produzidos a partir de farinha de trigo. O uso mais comum do glúten é na produção de alimentos de panificação, principalmente na fortificação de farinhas com baixo teor proteico para aumentar a força da massa e melhorar a textura do produto, utilizado como melhorador de ligações proteicas e agente de ligação de água em outros alimentos, como cereais matinais, carnes, queijos, salgadinhos e produtos análogos de carne texturizados (DAY *et al.*, 2009; ZIANDONADI *et al.*, 2012). Além disso, o melhoramento do trigo ao longo do tempo resultou em alterações no perfil proteico do cereal, principalmente um aumento do conteúdo de glúten, que contribui para um maior consumo de glúten total pela população (KASARDA, 2013).

Cabe ainda ressaltar que as condições climáticas durante o desenvolvimento e maturação dos grãos de trigo são características que influenciam a qualidade do trigo (DUPONT & ALTENBACH, 2003).

2.4.1. Reologia do trigo

A reologia estuda o escoamento e a deformação da matéria e tem como objetivo obter a descrição quantitativa das propriedades mecânicas, a informação relacionada com a estrutura molecular e a composição do material, caracterizar e simular o desempenho dos materiais durante o processamento e controlar a qualidade do produto (DOBRASZCZYK & MORGENSTERN, 2003).

A reologia na indústria de panificação é importante para ajudar a identificar as características de processamento da massa e a qualidade do produto final, além de ajudar na definição dos ingredientes dos produtos elaborados (LEE & MULVANEY, 2003; GUTKOSKI *et al.*, 2004).

As propriedades reológicas das massas são influenciadas basicamente pela dureza do grão, granulometria da farinha e hidratação da massa (BRANLARD *et al.*, 2001). As propriedades reológicas da massa do pão são importantes porque determinam o comportamento da massa durante o processo de manuseio mecânico

e porque afetam os processos que determinam o crescimento das cavidades celulares e a estabilidade da massa, durante o processo de elaboração (STOJCESKA *et al.*, 2007). E isso acontece por causa do amido, das proteínas e da água, em que a parte proteica da farinha tem a habilidade para formar a rede viscoelástica contínua do glúten, desde que haja água suficiente para a hidratação e energia mecânica para efetuar a mistura (GRAS *et al.*, 2000).

A análise do glúten é muito importante, é usado para medir o teor de glúten úmido, e a partir do glúten seco calcular o índice de glúten de determinada amostra (MONTENEGRO & ORMENESE, 2008). Esse método consiste em fazer uma massa com a farinha de trigo e água, em seguida lavar essa massa para remover o amido e os outros componentes hidrossolúveis do glúten. Obtém-se o glúten úmido que depois é seco e pesado para a determinação do glúten seco (POPPER *et al.*, 2006). É muito importante determinar a quantidade e qualidade do glúten da farinha, para poder conhecer a sua potencialidade, uma vez que o glúten retém o gás na massa conferindo leveza dos produtos fermentados e conferindo textura, forma e expansão aos produtos finais (BECHTEL *et al.*, 1977; AMEMIYA & MENJIVAR, 1992).

Para determinar a absorção da água pela farinha é feita uma análise farinográfica, que é usada para monitorar o desenvolvimento da rede proteica de glúten durante o processo de mistura da massa auxiliando a prever a aplicação tecnológica da farinha de trigo (MONTENEGRO & ORMENESE, 2008).

Na extensografia é medida e registrada a resistência da massa à extensão, enquanto ela é esticada em velocidade constante, após períodos de descanso (SCHEUER *et al.*, 2011).

Já para analisar a viscosidade da farinha é feita uma análise rápida de viscosidade onde o equipamento ARV (Analisador Rápido de Viscosidade) mede o comportamento da gelatinização e as propriedades de pasta do amido, através de um viscosímetro, que controla a resistência da amostra durante o aquecimento e o resfriamento, ou seja, caracteriza o processo a partir das propriedades funcionais do mesmo (COPELAND *et al.*, 2009).

2.4.2. Necessidade de avanços na determinação da qualidade tecnológica

A maioria dos países importadores e exportadores de trigo têm regulamentações impostas pelas agências de controle para a inspeção da qualidade

dos grãos. No Canadá, o sistema oficial de classificação de grãos é regulado pela Comissão Canadense de Grãos e por um longo tempo apenas as características visuais dos grãos eram usadas para classificação do trigo e registro de novas variedades para a produção comercial (COMISSÃO CANADENSE DE GRÃOS, 2016). No entanto, essa classificação foi removida em 2008, devido às suas limitações, como subjetividade e necessidade de pessoal bem treinado. Com a remoção do sistema visual de classificação, a indústria de trigo sofre com a necessidade urgente de um sistema de técnicas precisas de classificação (JAYAS *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos, a inspeção de grãos também é baseada em características visuais, morfológicas e de textura para classificar o trigo em oito classes comerciais padronizadas (LOOLHART *et al.*, 1995). A Austrália, que está entre os maiores exportadores de trigo, também segue um protocolo rigoroso na classificação do trigo. O trigo australiano é classificado baseado na dureza, cor e teor proteico, este último define o preço (CRACKNELL & WILLIAMS, 2004).

Na França, o Departamento de Agricultura usa diferentes critérios de qualidade para a classificação de trigo, com base em testes reológicos como Alveógrafo, pH e testes de panificação para classificar o trigo de acordo com o uso tecnológico final em quatro classes, ou seja, alto grau de panificação, panificação regular, biscoito e trigo para outros fins (CRACKNELL & WILLIAMS, 2004). Outros países europeus também usam classificação semelhante.

No Brasil, esta classificação é norteadada pelos métodos da AACC (*American Association of Cereal Chemists*) e pela Instrução Normativa MAPA 38/2010, que utilizam a determinação da força do glúten (J) pelo método de alveografia, utilizando como parâmetros tenacidade (P), extensibilidade (L), enquanto que a estabilidade é medida em farinógrafo, conforme dados na Tabela 1.

As amostras de farinhas nacionais são majoritariamente classificadas como trigo pão e brando (médio e fraco) e apresentam propriedades tecnológicas próprias apenas para aplicabilidade na fabricação de bolachas, biscoitos, produtos de confeitaria, pizzas, massas caseiras e/ou uso doméstico (COSTA *et al.*, 2008).

Embora o Brasil, classifica o trigo em classes comerciais considerando as características de qualidade desejadas para o produto final, os métodos, a confiabilidade e a precisão de classificação variam amplamente e estudos apontam

resultados contrastantes e que muitas vezes não apresentam correlação com a qualidade do produto final (COSTA *et al.*, 2013; DENCIC *et al.*, 2010).

Os testes reológicos realizados para medição da qualidade do trigo, nada mais são do que medidas indiretas do glúten. Os valores de estabilidade das massas, por exemplo, dependem, em grande parte, do número de ligações cruzadas entre as moléculas de proteínas presentes no glúten, bem como da força destas ligações (INDRANI, RAO, 2007; COSTA *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013). Em suma, as ligações de hidrogênio e dissulfeto desempenham grande importância na formação da estrutura do glúten, pois formam uma rede tridimensional relacionada à extensibilidade, impermeabilidade ao gás, elasticidade e ao alto poder de absorção de água da massa (INDRANI; RAO, 2007).

No intuito de compreender a relação entre as proteínas de reserva e a qualidade da farinha, estudos têm sido realizados para determinar os componentes dessas proteínas. He *et al.* (2005) estudaram os efeitos das subunidades de glutenina na qualidade de glúten para fazer pão e encontraram que determinadas combinações, como HMW-GS Glu-A1 1, Glu-B1 7 + 8, Glu-D1 5 + 10 podem contribuir para uma melhoria da qualidade de genótipos de trigo. Barak *et al.* (2013) mostraram ainda que variedades de trigo com composição semelhantes de HMW-GS, mas apresentando proporção diferente de gliadina/glutenina, apresentaram propriedades reológicas diferentes.

Um estudo comparando a qualidade tecnológica de grãos e de farinha de trigo importados e nacionais mostraram dados alarmantes, ressaltando-se a qualidade tecnológica inferior do trigo nacional quando comparado com amostras importadas, fato este que tem impacto negativo sobre a destinação de seu uso industrial, bem como sobre seu valor econômico (COSTA *et al.*, 2008). Os autores ressaltam ainda a necessidade de uma ação junto aos produtores de trigo nacionais que vise uma melhora na qualidade tecnológica dos grãos de trigo, fato este que viria a trazer implicações na valorização comercial e na finalidade industrial de seu produto.

Dentro desse contexto, a pesquisa sobre a determinação e compreensão da elaboração da qualidade tecnológica do trigo pode se tornar mais acessível com o progresso e a modernidade das ferramentas proteômicas.

2.5. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

Entre os diferentes tipos de cromatografia, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido mais amplamente utilizada como ferramenta de análise essencial para pesquisa, fabricação, testes clínicos e diagnósticos. Isto é devido à sua aplicabilidade universal e notável precisão de ensaio (HAYES *et al.*, 2014). O princípio básico da cromatografia é a separação de misturas, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase estacionária, encontrada dentro da coluna cromatográfica e uma fase móvel, solvente orgânicos ou inorgânicos (HAYES *et al.*, 2014).

A cromatografia de fase reversa é uma técnica cromatográfica que separa componentes de uma mistura pela diferença de hidrofobicidade. Nessa técnica a fase estacionária é mais hidrofóbica que a fase móvel, e isso resultam em uma retenção forte com analitos hidrofóbicos. A separação pode ser realizada tanto por eluição isocrática quanto por gradiente, separando com alta resolução, componentes com pequena diferença de hidrofobicidade (HAYES *et al.*, 2014). A cromatografia de fase reversa têm sua resolução e eficiência altamente influenciadas pelo empacotamento da coluna cromatográfica. A seletividade é influenciada pelo gradiente e pela escolha da fase móvel e da fase estacionária (HAYES *et al.*, 2014).

A espectrometria de massas é um método que consiste na geração de íons moleculares, que são separados entre si por meio de sua relação massa/carga (m/z) em um analisador de massas, e o sinal elétrico gerado a partir da razão m/z é convertido, gerando um espectro de massas correspondente a esse sinal. Quando as análises feitas por MS ocorrem através de acoplamento com uma técnica de separação por LC, temos como resultado o aumento da velocidade das análises, diminuindo o tempo de execução das mesmas e possibilitando que um grande número de amostras seja analisado em um curto período de tempo (POLESEL, 2012).

Em proteômica de *shotgun*, as proteínas são digeridas em peptídeos, e analisadas LC-MS, em geral, utilizando aquisição dependente de dados (em inglês, DDA) onde há a seleção dos íons precursores mais intensos com base na abundância relativa e estes são fragmentados em série. Esse tipo de método possui limitações como seleção de íons estocásticos e irreproduzíveis, sub-amostragem e longo ciclo instrumental (DISTLER *et al.*, 2014)

Visando diminuir os problemas supracitados, espectrômetros de massas mais recentes possuem maior resolução e velocidade de sequenciamento, além de ter precisão de massa melhorada. Adicionalmente, estratégias imparciais de aquisição denominadas independente de dados (em inglês, DIA) também foram criadas para superar as limitações do DDA, fazendo fragmentação simultânea de múltiplos íons precursores sem considerar intensidade ou outra característica, permitindo obtenção de resultados mais abrangentes (DISTLER *et al.*, 2014).

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

Caracterizar as proteínas do glúten de trigo brasileiro de diferentes qualidades tecnológicas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

3.2. Objetivos específicos

- Determinação da umidade, quantificação das proteínas pelo método de Bradford e determinação das proteínas totais;
- Extração das proteínas de reserva para análise proteômica;
- Avaliação proteômica dos extratos proteicos de farinhas de trigo de diferentes qualidades tecnológicas usando cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) acoplada à espectrometria de massas de alta definição (HDMS) com sistema de mobilidade iônica;

4. Material e Métodos

4.1. Amostras vegetais

As farinhas de nove cultivares de trigo da espécie *Triticum aestivum* foram recebidas em Abril de 2015 provenientes da safra de 2014/2015, com colheita e manejo normal de sementes, cedidas pela empresa OR Melhoramento de Sementes Ltda. de Passo Fundo-RS, em colaboração com a Universidade de Passo Fundo (UPF). Essas amostras foram previamente caracterizadas de acordo com suas qualidades tecnológicas e classificadas em fortes, médias e fracas, tendo como critério de avaliação estabilidade e força do glúten. Essa é uma classificação

segundo os métodos da AACC e da IN do MAPA 38/2010, que utilizam a determinação da força do glúten (J) pelo método de Alveografia, utilizando como parâmetros tenacidade (P), extensibilidade (L), enquanto que a estabilidade é medida em farinógrafo, conforme dados apresentados abaixo (tabela 1). As amostras foram armazenadas em recipientes fechados, em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises.

Tabela 1. Caracterização da qualidade tecnológica de diferentes cultivares brasileiras segundo parâmetros reológicos e físico-químicos.

Cultivares	Qualidade	Classificação	Força do glúten (J)	Estabilidade (min)	Número de queda (s)	Tenacidade (mm)	Extensibilidade (mm)	Absorção de água (%)
CAMPEIRO	Doméstico	Fraca	119,25	7,25	291	32	152	49
GUABIJU	-	Forte	241	-	-	132	95	-
MARFIM	Pão/ Melhorador	Média	291,8	17,24	350	80,4	116,6	55
AMETISTA	Pão/ Melhorador	Forte	352,7	17	325,5	117	87	67,5
JADEÍTE 11	Pão/ Melhorador	Forte	313,1	17,1	381,6	87	117	66
ORS 1401	Pão/ Melhorador	Média	329	17	352	110	97	62
ORS 1402	Pão	Média	272,5	8,6	327	84,8	116	62
ORS 25	Básico	Fraca	157,2	10,6	313	44	123	51,4
ORS 27	-	Fraca	-	-	-	-	-	-

Fonte: OR Melhoramento. - não disponível.

4.2. Caracterização química das amostras

Foram feitas as análises dos teores de umidade e proteínas totais em triplicata, segundo métodos padrões da AACC 44-19 e 46-12 (fator de correção 5,7), respectivamente (AACC, 2000). Para determinar a umidade, foram pesados 1 g de cada amostra em triplicata (balança Shimadzu AUX220) e foram colocadas na estufa a 105°C até obtenção do peso constante. A análise de proteínas totais por Kjeldahl foi feita a partir de 0,25 g de farinha adicionando-se uma mistura catalítica em papel vegetal. As amostras foram colocadas em tubos para digestão, onde foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e aquecidos progressivamente até 400°C, até obtenção de uma solução límpida. Após a digestão foram realizadas as etapas de destilação da amônia e titulação com hidróxido de sódio padronizado.

Os resultados foram submetidos à análise estatística (ANOVA, teste de Tukey) usando o software estatístico XLSTAT (Addinsoft, 2016).

4.3. Extração das proteínas

A extração das amostras foi feita segundo Martínez-Esteso et al. (2016) com modificações. Foram pesados 100 mg de cada amostra em triplicata (balança Shimadzu AUX220) em tubos eppendorfs identificados (1,5 mL, Axygen), e acrescentou-se 1 mL de tampão 80 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 40 mM de iodoacetamida (IAM). As amostras foram homogeneizadas com auxílio do vortex e depois agitadas em shaker (60 minutos; 200 rpm; 25 °C; Incubadora TE-420 Tecnal). Foram centrifugadas (10.600 xg; 10 min; 20 °C; Centrífuga refrigerada Megafuge 16R Centrifuge, Thermo), os sobrenadantes contendo as proteínas solúveis (albuminas e globulinas) foram descartados e os *pellets* seguiram na extração. Os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de tampão de fosfato salino (PBS) pH 7,4 contendo 0,5% de SDS e 2% de β -mercaptoetanol. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do vortex e depois foram agitadas em shaker em *overnight* (840 minutos; 200 rpm; 25 °C). No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (10.600 xg; 15 min; 4°C).

4.4. Etapa de dessalinização e concentração das proteínas (*clean-up*)

Para a etapa de *clean-up* foram utilizados filtros Amicon 3 kDa (Ultra Centrifugal Filters, Millipore). Primeiramente os filtros foram lavados (ativados) com 500 μ L de água ultrapura (Milli-Q, Millipore) e centrifugados (14.000 xg ; 30 min; 4 $^{\circ}C$). As amostras foram centrifugadas (10.000 xg ; 10 min; 4 $^{\circ}C$) para retirar qualquer precipitado existente e os filtros Amicon foram centrifugados invertidos para retirada da água (1.000 xg ; 2 min; 4 $^{\circ}C$). Adicionou-se 500 μ L da amostra nos filtros e centrifugou a 14.000 xg por 30 min a 4 $^{\circ}C$. Foram feitas 3 lavagens com 500 μ L de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 , 50 mM; pH 8,5), seguida de centrifugação (14.000 xg ; 60 min; 8 $^{\circ}C$). Em seguida, os filtros foram invertidos em novos tubos e centrifugados (1.000 xg ; 2 min; 4 $^{\circ}C$) para recuperar o retido.

4.5. Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas extraídas foi realizada segundo Bradford (1976). Inicialmente foi feita a curva padrão com albumina de soro bovino (BSA) partindo da concentração de 2 mg/ml com diluições seriadas até a concentração de 0,125 mg/ml. A curva padrão teve coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99 e as leituras foram realizadas em triplicata com dois ensaios em branco. Os extratos proteicos foram diluídos 10 vezes em NH_4HCO_3 e 20 μ L de amostra ou de BSA foram pipetados em eppendorf acrescentando-se 1 mL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). As amostras reagiram por 5 minutos em abrigo da luz e em seguida foi feita a leitura em triplicata a 595 nm em espectrofotômetro (UV-2700, Shimadzu). Os resultados foram submetidos à análise estatística (ANOVA, teste de Tukey) usando o software estatístico XLSTAT (Addinsoft, 2016).

4.6. Digestão Trípica

Após a quantificação de proteínas, foram realizadas as diluições das amostras em NH_4HCO_3 (50 mM; pH 8,5) com objetivo de obter concentração aproximada de 1 μ g/ μ L para cada amostra. O *pool* foi construído a partir de 20 μ L de cada amostra que foram agrupados de acordo com a classificação em fracas, médias e fortes, resultando em três *pools* com volume final de 60 μ L. A etapa de digestão começou com a adição de 50 μ L de cada *pool* de extrato proteico (1 μ g/ μ L), 10 μ L de

NH_4HCO_3 (50 mM pH 8,5) e 25 μL de solução 0,2% v/v RapiGest SF (Waters). As amostras foram homogeneizadas em vortex por 30 segundos e colocadas em bloco aquecedor por 15 minutos a 80°C. As amostras foram então centrifugadas (14.000 xg; 10 min; 4 °C) e adicionadas de 2,5 μL de 100 mM DTT (preparado no mesmo dia em 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5) e, novamente foram homogeneizadas, colocadas em banho-maria (30 min; 60 °C) e centrifugadas (14.000 xg; 10 min; 4 °C). Em seguida foi adicionado 2,5 μL de IAM 300 mM (preparado no mesmo dia em 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5), as amostras foram agitadas em vortex, deixadas ao abrigo da luz a 20 °C por 30 min, adicionadas 10 μL de Tripsina Lys-C (Trypsin/Lys-C Mix, *Mass Spectrometry Grade*, Promega) preparada em 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5 e homogeneizadas. A etapa de digestão foi feita em overnight no bloco aquecedor (14 horas, 37 °C, sem agitação). Após a etapa de overnight, foi adicionado 10 μL de 5% ácido trifluoroacético (TFA), foi feita a homogeneização, e foi colocado no bloco por 90 min a 37 °C, em seguida foi centrifugado (14.000 xg; 30 min; 4 °C). Depois disso, 100 μL de cada pool foram adicionado em vials *total recovery* (Waters) e foi adicionado padrão interno fosforilase B (Waters) na concentração final de 25 fmol/ μL . Os vials foram identificados e armazenados em ultrafreezer até a aquisição dos dados.

4.7. Aquisição em NanoUPLC-MS^E

As aquisições das corridas cromatográficas dos peptídeos tripsinizados foram realizadas usando um sistema NanoUPLC (Acquity, Waters) acoplado ao espectrômetro de massas de alta definição (Synapt G2-S HDMS, Waters) com analisador híbrido do tipo quadropolo e tempo de voo (time-of-flight-TOF). Todas as análises foram realizadas em modo resolução com nanoelectrospray em modo positivo (nanoESI+). O analisador de TOF foi calibrado com solução equimolar de Leu-Enk (Leucina Encefalina) e GFP (Glu1-fibrinopeptídeo B) de 200 fmol/L.

As separações cromatográficas foram realizadas com uma pré coluna Xbridge™ BEH130 C18 (5 μm , 300 μm x 50 mm, Waters) e coluna Acquity HSS T3 (1,8 μm , 100 μm x 100mm, Waters) mantida a 55 °C. Utilizou-se a fase móvel A constituída por água ultra-pura e fase móvel B de acetonitrila, ambas adicionadas de 0,1% de ácido fórmico (AF).

No primeiro momento, realizaram-se corridas de prospecção (*scouting run*), com o intuito de quantificar o teor de proteínas injetadas em cada amostra, por meio do cálculo da área total dos cromatogramas e então normalizar as quantidades a serem injetadas. Em seguida, os extratos foram corridos aplicando o método multiplexado de MS^E, onde se tem aplicação simultânea de baixa e alta energia para fragmentação (15 a 55 V). Foram injetados 2 µL para cada amostra (Forte, Média e Fraca), utilizando fluxo de 0,6 mL/min das fases móveis e seguindo a seguinte programação: 0 min – 93 % fase A e 7% fase B; 1,31 min – 93 % fase A e 7% fase B; 91,31 min – 60 % fase A e 40% fase B; 92,61 min – 15 % fase A e 85% fase B; 95,23 min – 15 % fase A e 85% fase B; 96,54 min – 93 % fase A e 7% fase B, com o tempo de varredura de 90 min. Foram adquiridos íons com *m/z* entre 50 e 2.000, com tempo de escaneamento de 0,5 segundos, voltagens do cone de 30 V, do capilar de 2,7 kV e da *source offset* de 30 V.

4.8. Processamento dos dados

Para identificação dos peptídeos e proteínas foi utilizado o software *ProteinLynx Global SERVER* (v 3.0, Waters), alimentado com o banco de dados de proteínas de *Triticum aestivum* do UNIPROTKB release 2016, (www.uniprot.org).

5. Resultados e discussão

5.1. Análise da composição química

As amostras analisadas apresentam teor médio de umidade de $11,14 \pm 1,14\%$ e altos teores de proteínas que variaram de 11,4 a 16,9%, apresentando um teor médio de $14,0 \pm 1,8 \%$ (Tabela 2). Apesar das diferentes variedades apresentarem valores significativos, não foi possível estabelecer uma relação entre a classificação das farinhas e os teores de proteínas, tendo as farinhas um teor médio de 14,2%, 13,2% e 14,6%, respectivamente para as amostras de classificação fracas, médias e fortes. Apesar da qualidade das farinhas serem associadas aos teores de proteínas totais, este resultado corrobora trabalhos anteriores que apontam que a qualidade da farinha e, respectivamente da massa, está associada à qualidade das proteínas de reserva que compõem o glúten (COSTA *et al.*, 2013; DENČIĆ *et al.*, 2011).

Os teores de umidade de todas as amostras analisadas apresentaram-se menores ao valor máximo de umidade em farinhas (15%) permitido pela legislação vigente (BRASIL, 2005). A variedade que apresentou maior valor de umidade (14,12%) foi a ORS 27 e foi ela que apresentou diferença significativa. O teor de umidade de farinhas deve ser firmemente controlado, pois este parâmetro figura como um dos principais fatores de aceleração de reações químicas nestes alimentos, provocando alterações nas suas características nutricionais, organolépticas e tecnológicas. Teores de umidade abaixo do limite máximo permitido normalmente asseguram a conservação da qualidade das farinhas durante a estocagem comercial (FARONI et al., 2007).

Tabela 2. Caracterização físico-química de farinhas de trigo de diferentes cultivares brasileiras: umidade e teor de proteína total por Kjeldhal.

Tabela 2.	Classificação	Proteína total (% bs)	Umidade (%)
CAMPEIRO	Fraca	16,86±0,72 ^A	10,68±0,28 ^B
ORS 25	Fraca	12,16±1,01 ^{CD}	10,57±0,26 ^B
ORS 27	Fraca	13,52±0,38 ^{BCD}	14,12±0,31 ^A
MARFIM	Média	14,71±0,72 ^{ABC}	10,66±0,91 ^B
ORS 1401	Média	13,30±1,29 ^{CD}	11,01±0,29 ^B
ORS 1402	Média	11,44±1,24 ^D	11,02±0,23 ^B
GUABIJU	Forte	16,18±0,88 ^{AB}	10,77±0,07 ^B
AMETISTA	Forte	12,94±1,45 ^{CD}	10,98±0,28 ^B
JADEÍTE 11	Forte	14,62±0,38 ^{ABC}	10,44±0,32 ^B

Letras diferentes representam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) entre os diferentes cultivares.

Após passar pela etapa de *clean-up* foram determinadas as concentrações de proteínas de cada extrato (Tabela 3). Os extratos proteicos apresentaram diferença significativa com relação ao teor proteico determinado por Bradford. As amostras apresentaram concentrações entre 10,78 a 16,65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas, com média calculada de 12,54 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e coeficiente de variação de 16%. A partir deste dado, é possível calcular a eficiência de extração, levando em conta que as farinhas apresentaram teor de proteínas totais em base seca de 14%. Assim, em 100 mg de farinha colocadas em 1 mL de tampão, teremos 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, o que representa 14 μg de proteínas totais por μL . Partindo do resultado de concentração de proteínas de

reserva de 12,54 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tem-se 89% de proteínas de reserva, resultado coerente com os dados da literatura que mostram que as proteínas de reserva representam em média 85% das proteínas totais. Este resultado denota que a etapa de lavagem das proteínas solúveis também foi eficiente e não promoveu perdas de prolaminas.

Tabela 3. Quantificação da concentração das proteínas por Bradford.

Cultivares	Classificação	Proteína por Bradford ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
CAMPEIRO	Fraca	11,49 \pm 0,19 ^{CDE}
ORS 25	Fraca	13,65 \pm 0,07 ^B
ORS 27	Fraca	10,78 \pm 0,79 ^{DE}
MARFIM	Média	11,99 \pm 0,15 ^{CD}
ORS 1401	Média	12,10 \pm 0,31 ^C
ORS 1402	Média	12,85 \pm 0,10 ^{BC}
GUABIJU	Forte	16,65 \pm 0,49 ^A
AMETISTA	Forte	14,06 \pm 0,76 ^B
JADEÍTE 11	Forte	10,39 \pm 0,48 ^E

Letras diferentes representam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) entre os diferentes cultivares

5.2. Aquisição de dados em NanoUPLC-MS^E e *Scouting run*

Antes de começar a aquisição das amostras pelo método MS^E foi feito um *scouting run*, que é uma corrida de prospecção, de cada uma das três amostras. Essa corrida tem o objetivo de normalizar a área total dos picos obtidos de proteínas totais injetadas na coluna, e também a quantidade de proteínas que deve ser injetada no equipamento. Assim, após normalização foram injetados 3,9 μL , 3,0 μL e 2,7 μL das amostras fraca, média e forte, respectivamente.

Após esta etapa foi feita outra corrida usando o método de aquisição MS^E (modo de aquisição contínuo com aplicação simultânea de baixa e alta energia na célula de colisão), as amostras correram em triplicata, cada corrida durou 90 minutos (Figura 4-6). Os cromatogramas obtidos mostram intensidade de sinal satisfatória para as amostras analisadas ($> 10^6$), onde é possível observar que, para as amostras Fracas, os picos encontram-se mais bem resolvidos apresentando sinais mais intensos entre 10 a 15 minutos e entre 20 a 25 minutos (Figura 4).

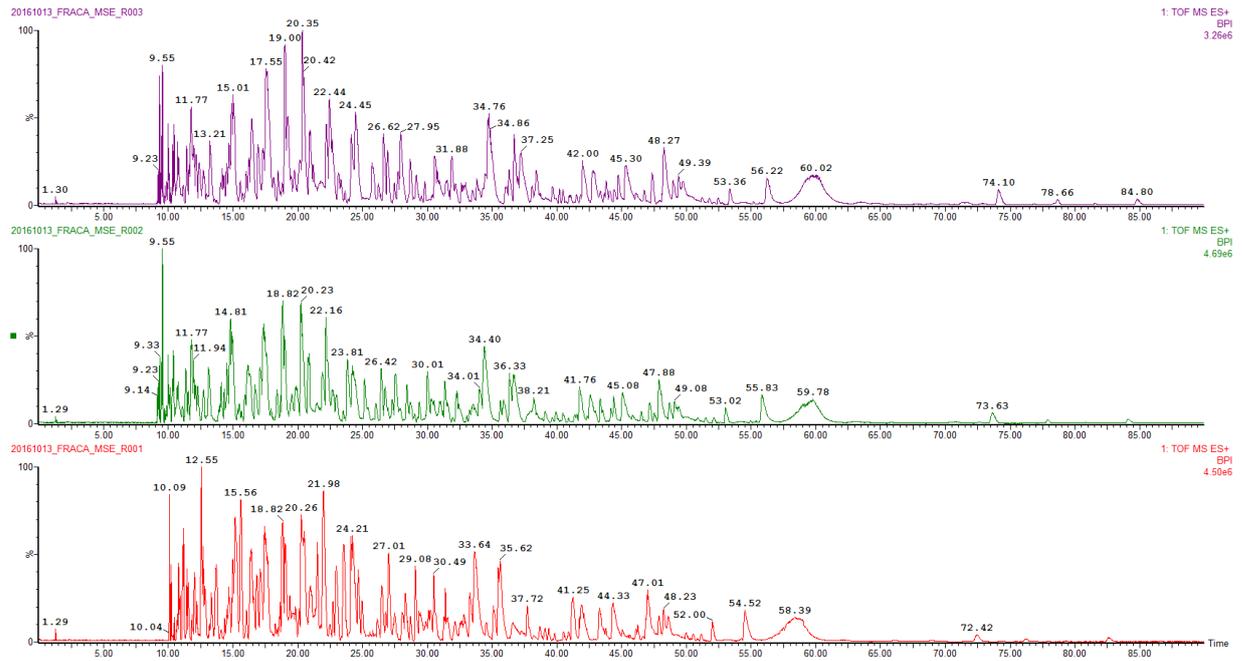


Figura 4. Cromatogramas das aquisições por MS^E das amostras Fracas em BPI (*base peak intention*).

As amostras Médias (Figura 5) também apresentaram boa resolução e intensidades nos picos, apresentando maior intensidade entre 15 a 20 minutos e entre 35 a 40 minutos. Enquanto que as amostras Fortes apresentaram picos mais intensos na região de 15 a 22 minutos (Figura 6).

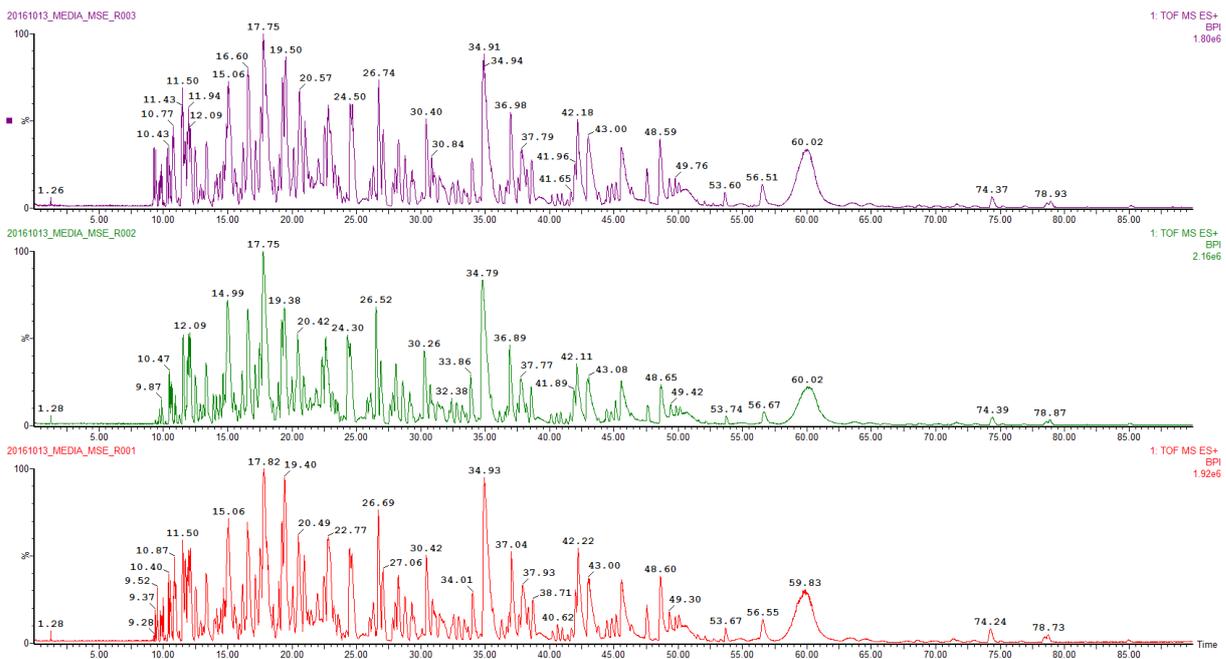


Figura 5. Cromatogramas das aquisições por MS^E das amostras Médias em BPI (*base peak intention*).

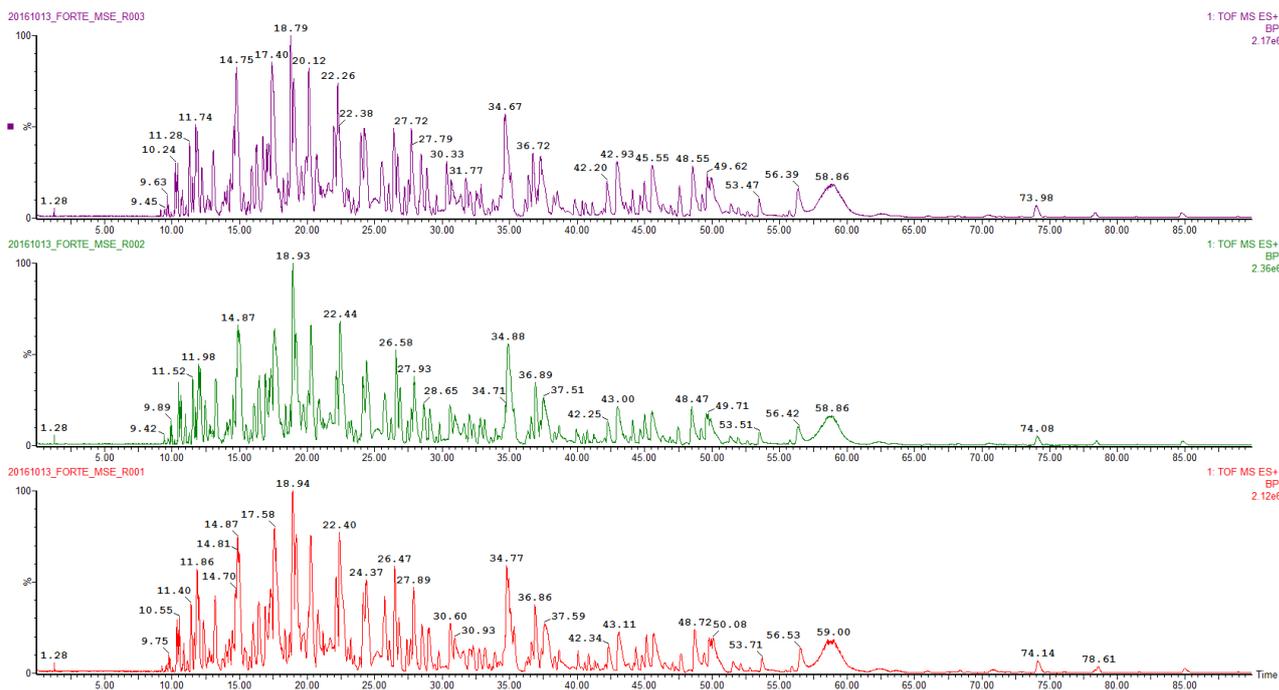


Figura 6. Cromatogramas das aquisições por MS^E das amostras Fortes em BPI (*base peak intention*).

Analisando os cromatogramas das três amostras (Figura 7), observou-se que as amostras apresentaram perfis cromatográficos similares, com boa resolução e picos de alta intensidade. Ressalta-se também que não houve formação de picos durante aproximadamente 10 minutos iniciais. Diferentemente das demais, na amostra Fraca, picos de maiores intensidades foram eluídos nos tempos iniciais da corrida. Também se deve destacar que entre 22 a 30 minutos de corrida, essa amostra foi a que apresentou menos intensidades nos picos. As amostras Média e Forte destacaram-se por apresentarem altos picos entre 15 a 23 minutos e um pico bastante intenso em 34 minutos, principalmente na amostra Média.

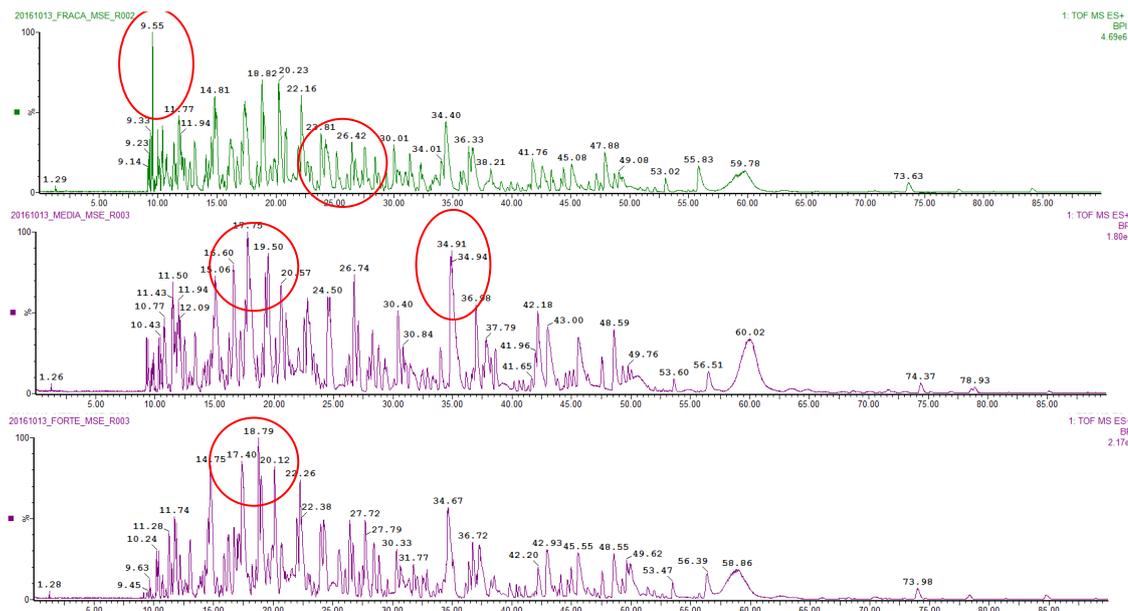


Figura 7. Comparação entre os cromatogramas das aquisições por MS^E das amostras Fraca, Média e Forte em BPI (*base peak intention*).

5.3. Peptídeos

Foram identificados 6.494 peptídeos no total, relativos a todas as proteínas (336) de todas as replicatas. Ao aplicar um filtro nas proteínas, escolhendo apenas aquelas presentes em 2 de 3 replicatas, foi necessário também filtrar a tabela de peptídeos identificados deixando apenas os peptídeos pertencentes às 150 proteínas restantes. Resultando então em 5.493 peptídeos comuns nas 150 proteínas analisadas, que serão então apresentadas neste estudo.

Como forma de avaliação da qualidade dos dados obtidos analiticamente, algumas figuras de mérito que atestam a qualidade dos dados obtidos são apresentadas. A distribuição de erro de massas exatas (Figura 8) mostra que houve uma distribuição normal dos erros que variaram de -30 a 30 ppm (parte por milhões). No entanto, observa-se que 75% dos erros de massa foram registrados entre -2 e +4 ppm, o que mostra que os dados analisados são robustos e confiáveis.

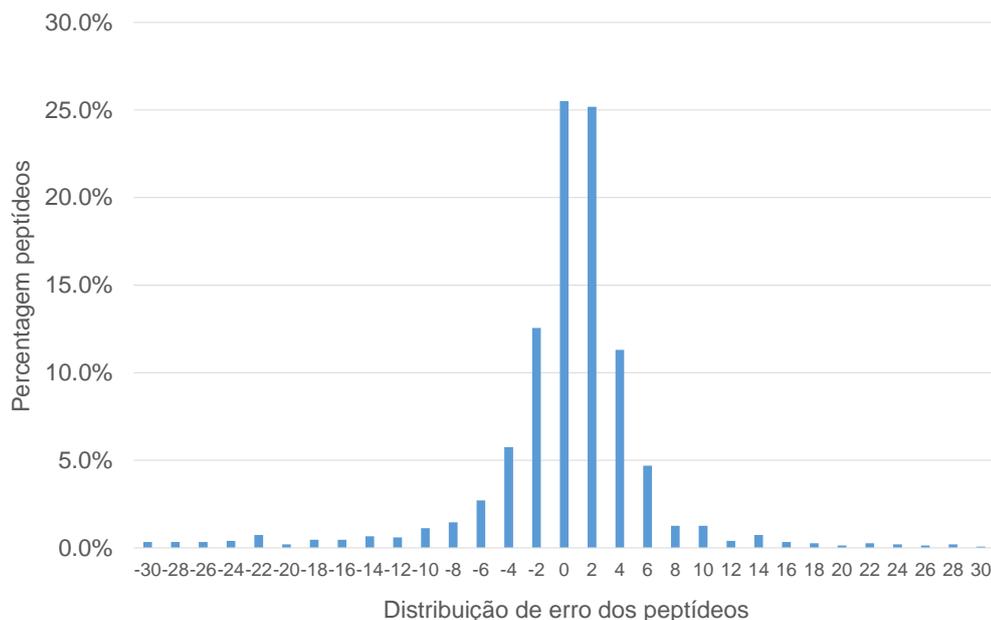


Figura 8. Distribuição de erro dos peptídeos em ppm (%).

Dos 5.493 peptídeos identificados, 55% desses peptídeos foram fragmentados na primeira passagem (Pep Frag 1) pelo detector, ou seja, esses peptídeos foram os primeiros a serem identificados, enquanto que 10% foram identificados na segunda passagem (Pep Frag 2) (Figura 9).

Outro dado que deve ser ressaltado é a porcentagem de peptídeos fragmentados na fonte que foi de 19%. Um estudo utilizando método de aquisição e equipamento semelhante mostrou uma porcentagem de 12% de peptídeos fragmentados na fonte, e concluiu que tal valor era esperado e não afetou os resultados (MURAD & RECH, 2012). A fragmentação na fonte está diretamente relacionada com a energia de dessolvatação na interface do eletrospray da fonte de ionização. A energia de dessolvatação deve ser controlada pela tensão de cone, onde maiores energias podem melhorar o rendimento da ionização (necessária para a análise por MS) mas também promover a fragmentação na fonte, que pode comprometer o rendimento final de ionização (KIM *et al.*, 2013). Um número muito pequeno de peptídeos tiveram perda neutra de amônia (NH_3) ou de água (H_2O) de 0,6% e 0,7%, respectivamente (Figura 9).

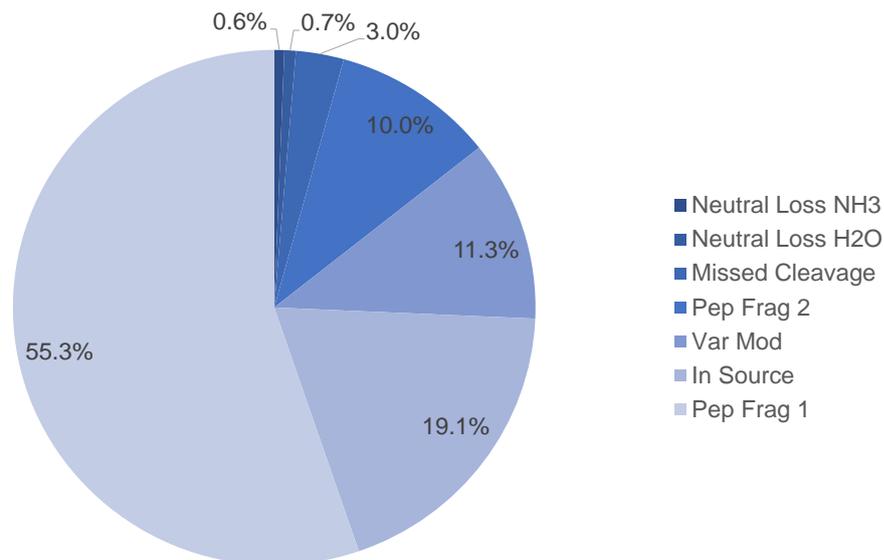


Figura 9. Tipos de peptídeos identificados.

Outro dado relevante com relação à identificação de peptídeos é que apenas 3% dos peptídeos identificados apresentaram clivagem perdida, o que indica eficiência da digestão trípica, uma vez que clivagens perdidas acontecem quando a tripsina não cliva sítios onde tem uma lisina ou arginina na presença de prolina. A baixa percentagem de resíduos básicos nas proteínas do glúten, associados aos altos teores de prolina, tornam difícil a obtenção de peptídeos trípticos e de tamanho adequado para identificação por espectrometria de massa (FERREIRA *et al.*, 2014; VENSEL *et al.*, 2011).

A distribuição de peptídeos e os respectivos números de clivagens perdidas estão apresentados na Figura 10. Nota-se que cerca de 70% dos peptídeos foram identificados sem nenhuma clivagem perdida, o restante apresentou apenas de uma a três. A porcentagem de clivagens perdidas nas proteínas do trigo é um fator importante pois essas proteínas são muito ricas em prolinas (13%) (BELITZ & GROSH, 2009), o que pode tornar a digestão ineficiente, resultando em peptídeos grandes, e por consequência mais difíceis de serem identificados por espectrometria de massas.

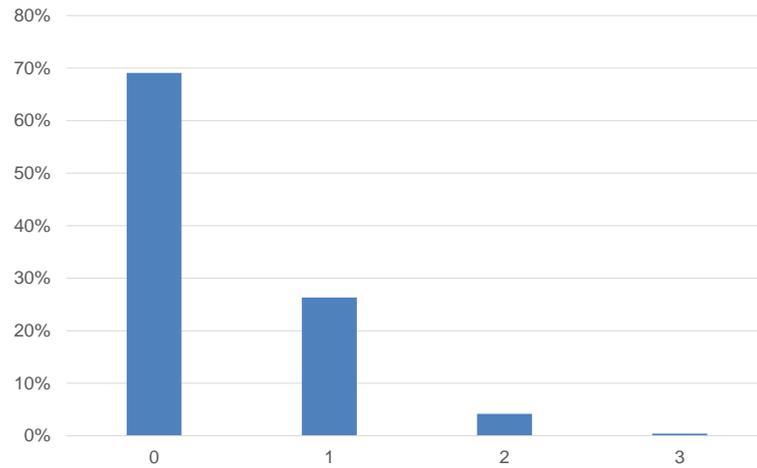


Figura 10. Distribuição do número de clivagens perdidas (%).

As amostras Fracas apresentaram 1.627 peptídeos, as Médias 1.305 e as Fortes 1.441 (Figura 11A). Cada replicata apresentou entre 500 a 700 peptídeos, mostrando boa reprodutibilidade (Figura 11B). As replicatas da amostra Fraca apresentaram maior número de peptídeos identificados com média de 705, seguidos da Forte com 596 e da Média com 531.

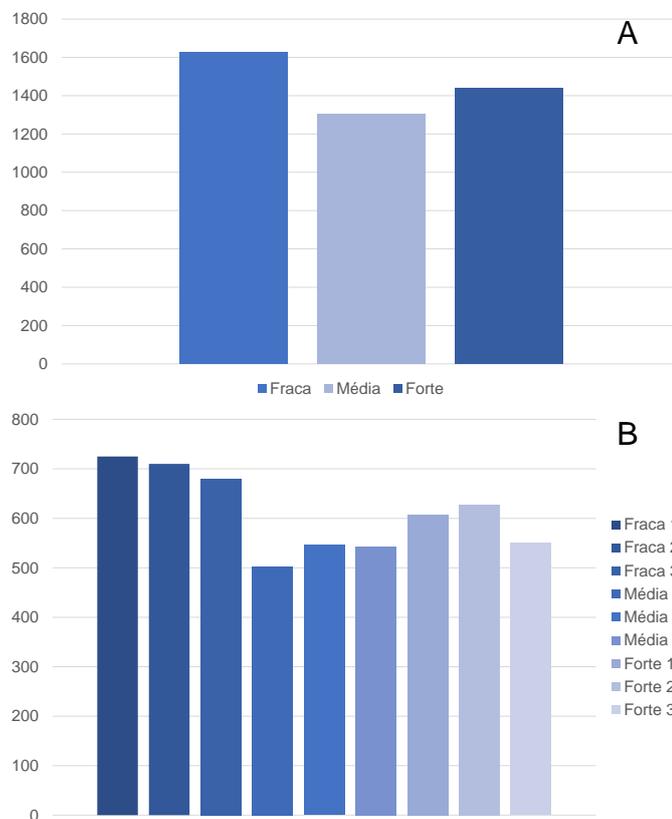


Figura 11. A) Total de peptídeos por amostra, considerando todas as replicatas. B) Número de peptídeos identificados por replicata.

Calculou-se também a média de peptídeos identificados por proteínas nas três amostras e também nas três replicatas, sem levar em conta as replicatas que não apresentavam nenhum peptídeo identificado (Figura 12). Os valores das médias das amostras são bem próximos, com aproximadamente 6 peptídeos por proteína. Estes resultados ultrapassam o critério mínimo de qualidade utilizado em outros trabalhos com abordagem proteômica onde se tem em média 3 a 4 peptídeos identificados por proteína (FERREIRA et al., 2014).

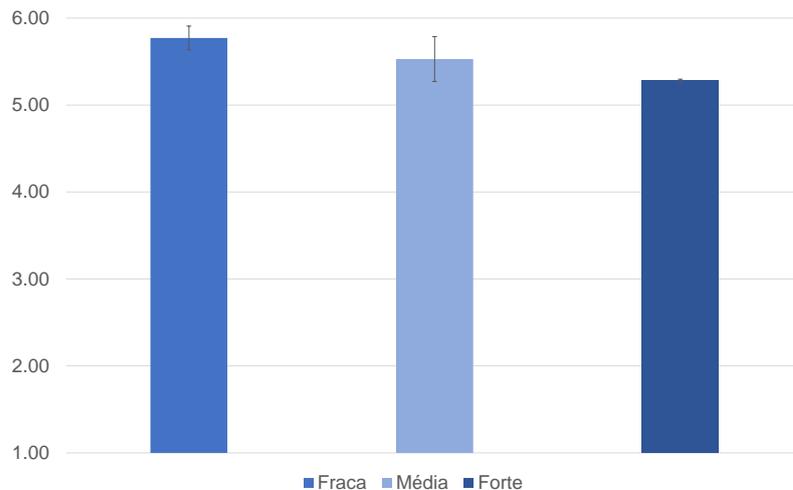


Figura 12. Média de peptídeos identificados por proteína por amostra.

Ao analisar o número de peptídeos por proteínas (figura 13) foi observado que foram encontrados até 24 peptídeos por proteínas. Aproximadamente 86% das proteínas identificadas apresentaram de 1 a 9 peptídeos, e menos de 2% das proteínas apresentaram entre 13 a 24 peptídeos.

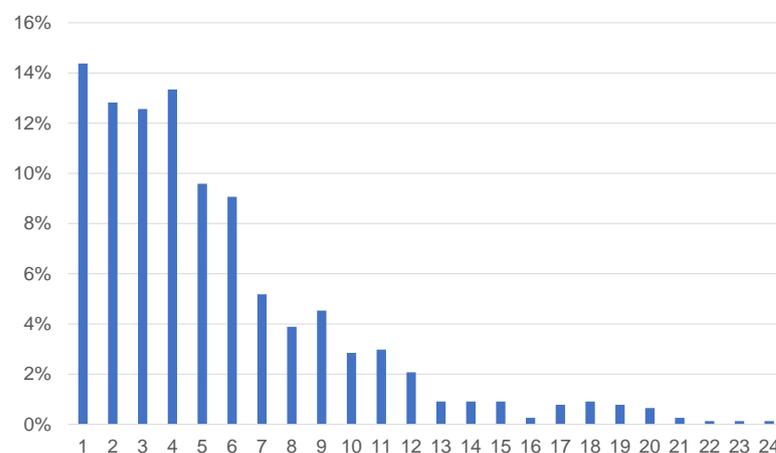


Figura 13. Distribuição do número de peptídeos identificados por proteína (%).

5.4. Identificação das Proteínas

A taxa dinâmica das proteínas foi calculada a partir dos valores de intensidade dos peptídeos combinados das suas respectivas proteínas (Figura 14). A taxa dinâmica representa uma representação gráfica da distribuição das abundâncias das proteínas em determinado organismo e podem ser relacionadas com a expressão das proteínas. Neste trabalho, utilizou-se somente a intensidade dos íons detectados e não foi realizado um estudo quantitativo em termos molares. Foi realizada uma média de cada valor de intensidade de íons das 3 replicatas. A partir dessa média foi calculada o logaritmo na base 10 e foi atribuído um número decrescente de 1 a 150, sendo 1 a proteína que teve o maior valor de Log 10 e 150 a que apresentou o menor valor.

Em sistemas biológicos complexos, um intervalo de 2-log para a taxa dinâmica das proteínas expressas na base de log10 é desejado (Gustavo Souza, comunicação pessoal). O trabalho de Murad & Rech (2012), usando nano UPLC-MS^E para análise das proteínas totais de grãos de soja detectou uma taxa dinâmica de proteínas de 3 log, com total de 95 proteínas identificadas, indicando assim uma boa detecção dessas proteínas.

Na figura 14 é possível observar que as proteínas apresentaram uma taxa dinâmica que varia de 7 a 4,5 log aproximadamente. Apesar de altos, esses valores eram esperados, uma vez que foi realizada uma prévia extração das proteínas solúveis, que representam de 15 a 20% das proteínas totais. Assim, neste trabalho apenas as proteínas que representam 80% das proteínas do trigo, principalmente gliadinas e gluteninas, foram consideradas. As amostras Médias e Fortes apresentaram valores bem próximos, variando um pouco no final já que as Médias apresentaram menos proteínas que as Fortes. Já para as amostras Fracas os valores foram um pouco maiores e apresentaram mais proteínas que as demais.

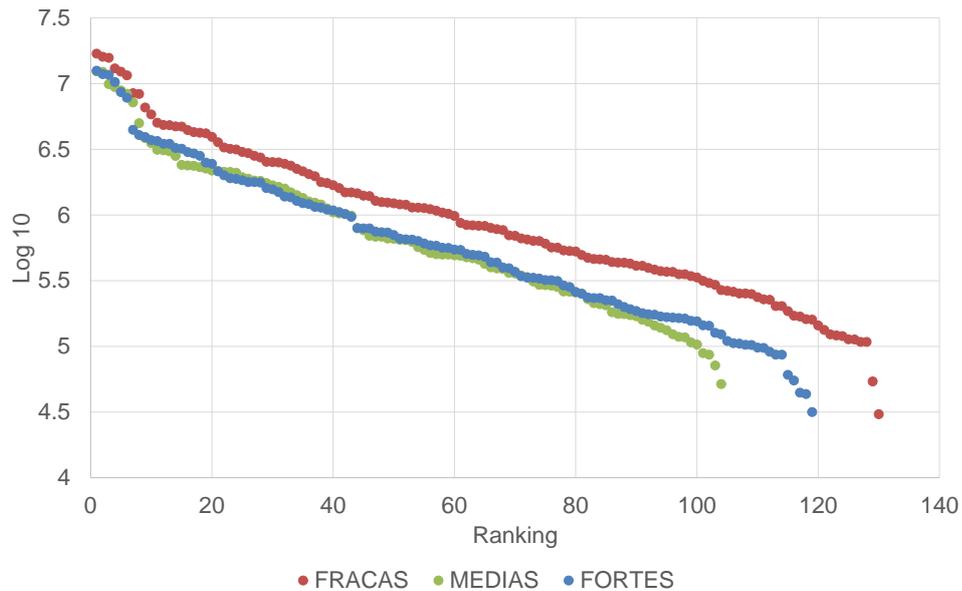


Figura 14. Dinâmica das proteínas Fracas, Médias e Fortes.

Globalmente, foram identificadas um total de 992 proteínas, sendo que cada replicata apresentou entre 90 a 150 proteínas. Depois de analisar os dados no software PLGS, os dados foram exportados para o Excel onde planilhas foram geradas para aplicação de filtros de identificação. Dentre as 150 proteínas identificadas em 2 de 3 replicatas, 82 são comuns às três amostras, 21 são encontradas apenas nas fracas, 4 apenas nas Médias e 9 apenas nas Fortes. (Figura 15). Uma tabela com a descrição e número de acesso do UNIPROT de todas as proteínas identificadas em cada amostra está disponível em anexo (anexo 1).

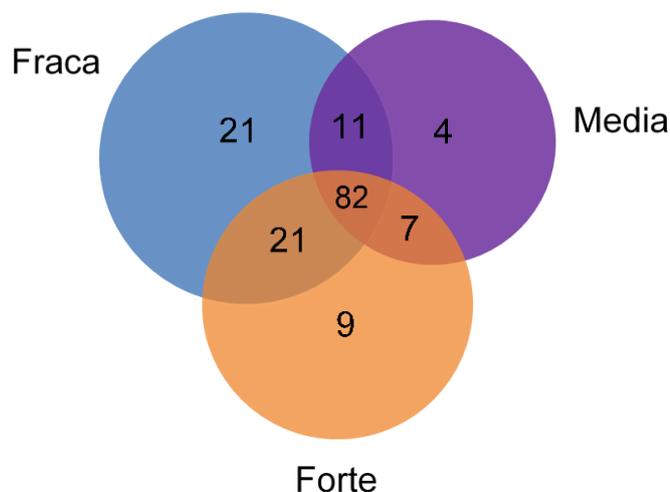


Figura 15. Diagrama de Venn com todas as proteínas identificadas nas amostras Fraca, Média e Forte.

A maioria das proteínas foram identificadas nas três amostras, e elas apresentaram um perfil bem variado. A maioria das proteínas identificadas (23%) ainda não foram caracterizadas, mostrando que ainda há muito o que se estudar para entender por completo as proteínas do trigo (Figura 16A). As gliadinas presentes nessas amostras também apresentaram um valor significativo (16%). Cabe ressaltar que juntamente com as gluteninas, estas proteínas são também são determinantes na qualidade tecnológica do trigo, por apresentarem efeito positivo no volume do pão durante o cozimento (BARAK *et al.*, 2013).

Barak et al. (2013) também mostraram que as subunidades de gluteninas (HMW-GS e LMW-GS) também são responsáveis não só pelo volume do pão mas também pela firmeza das migalhas de pão e pela força da massa. No presente estudo, as HMW-GS e LMW-GS representaram 19% das proteínas comuns nas diferentes amostras. Foram ainda encontradas proteínas que são classificadas como inibidores enzimáticos, enzimas, alérgenos e outras proteínas que não se enquadram em nenhuma das classificações acima.

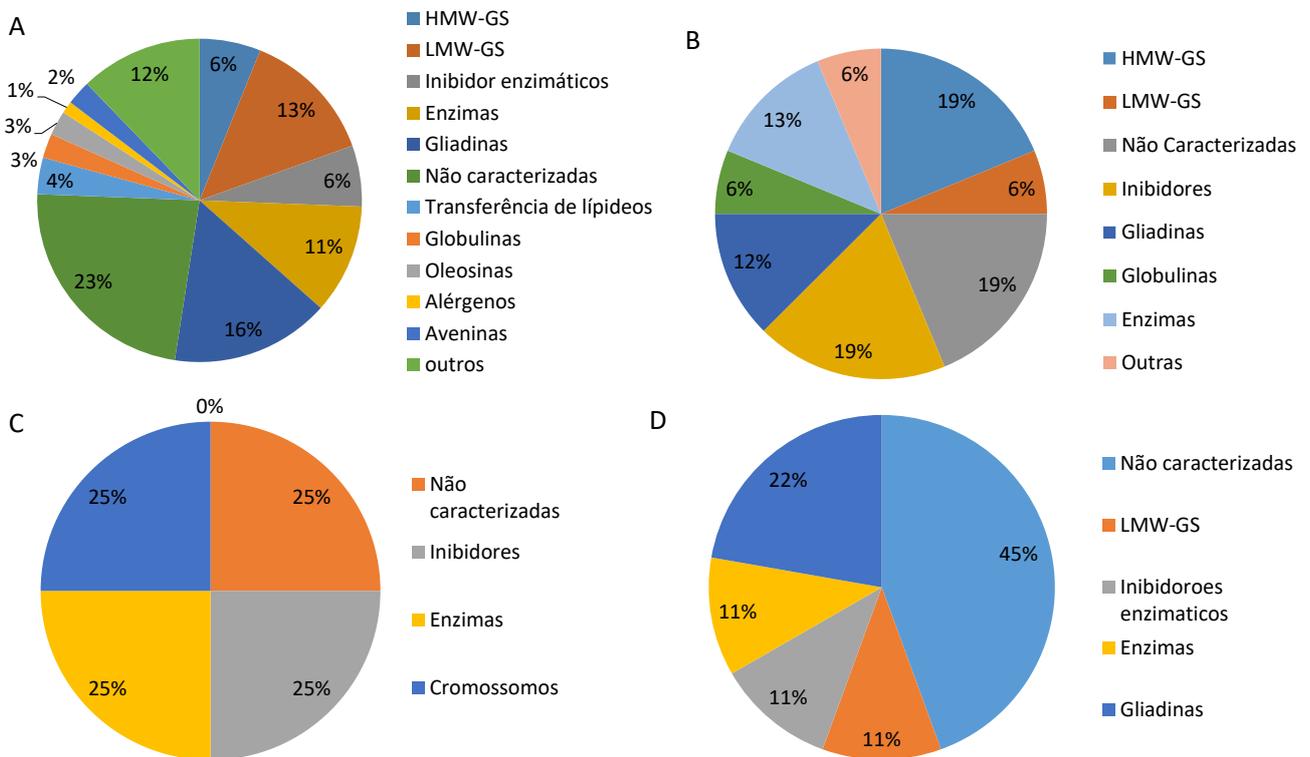


Figura 16. A) Caracterização das proteínas identificadas nas amostras Fraca, Média e Forte; B) Caracterização das proteínas presentes nas amostras Fracas; C) Caracterização das proteínas presentes nas amostras Médias; D) Caracterização das proteínas presentes nas amostras Fortes.

Quando as proteínas exclusivas de cada amostra são representadas, a amostra Fraca (figura 16B), apresenta o maior número e diversidade de proteínas em relação as outras. As 21 proteínas presentes exclusivamente nas amostra Fracas são em sua maioria HMW-GS ou LMW-GS (25%). No entanto, as proteínas não caracterizadas representam uma fração bem significativa. Ainda puderam ser identificadas gliadinas, globulinas e enzimas representando um total de 31% das proteínas caracterizadas.

Devido ao baixo número de proteínas exclusivamente identificadas nas amostras Médias, nenhuma proteína relacionada à qualidade do trigo foi identificada, sendo encontrada a mesma porcentagem de proteínas não caracterizadas, inibidores enzimáticos, enzimas e proteínas relacionadas ao cromossomo. As amostras Fortes apresentaram 9 proteínas exclusivas, a maioria não caracterizadas ou de função desconhecida. No entanto, 11% e 22% das proteínas identificadas exclusivamente nas amostras fortes, correspondem a LMW-GS e gliadinas, respectivamente. Tal resultado corrobora estudos recentes de marcadores genéticos sobre a elaboração da qualidade do trigo, que mostram que as proteínas que foram mais estudadas, as HMW-GS, não são as únicas determinantes da qualidade do trigo e estudos mais aprofundados acerca da caracterização das gliadinas e LMW-GS ainda é necessário (ZHEN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

Estes dados necessitam ainda de análise minuciosa da quantificação de cada proteína identificada, uma vez que a expressão dessas proteínas pode ser um fator importante na elaboração da qualidade do trigo. O estudo intervarietal, ou seja, de cada cultivar separadamente, é também importante para os melhoradores e produtores de plantas diferenciarem os genótipos.

6. Conclusão

Neste trabalho foram aplicadas técnicas de LC-MS no intuito de obter melhor entendimento sobre os fatores determinantes da qualidade de farinhas de trigo brasileiro de diferentes variedades. As farinhas apresentaram teores de umidade e de proteínas totais semelhantes e as proteínas de reserva foram extraídas de maneira satisfatória.

Foi possível identificar um elevado número de peptídeos presentes em pelo menos duas das três replicatas técnicas. Esses peptídeos apresentaram baixíssimo valor de erro de massa exata, na ordem de 2-5 ppm, o que denota confiabilidade dos resultados. Apenas 3% dos peptídeos identificados apresentaram clivagem perdida, indicando eficiência no processo de digestão proteica. Observou-se ainda um número elevado de peptídeos identificados por proteína.

Foram identificadas 150 proteínas, sendo 82 comuns às três amostras. A amostra classificada como Fraca, foi a que apresentou maior número e diversidade de proteínas identificadas. Proteínas que ainda não foram caracterizadas quanto à função, representaram uma porcentagem significativa das proteínas identificadas. Com relação às proteínas exclusivas de cada amostra, foram identificadas proteínas de interesse relacionadas à qualidade, como gliadinas e gluteninas de baixo peso molecular.

Apesar da aplicação da LC-MS ter se mostrado eficiente na identificação de proteínas associadas à frações proteicas do trigo, o processamento dos dados gerados por meio de ferramentas quimiométricas faz-se necessário na tentativa de distinguir as diferentes qualidades de farinha estudadas, utilizando-se como parametro as proteínas identificadas.

Contudo, os resultados deste trabalho fornecem novas perspectivas de avaliação da qualidade tecnológica de farinha de trigo brasileiro. Futuramente esses resultados devem ser associados a um estudo de polimerização e da distribuição dos polímeros das proteínas de reserva, para melhor compreensão dos fatores determinantes da qualidade do trigo.

7. Referências Bibliográficas

AACC. Approved methods. In 10th ed.). Minneapolis, MN: **American Association of Cereal Chemists**, 2000.

ABITRIGO- Associação Brasileira das Indústrias de trigo. Acessado em: <http://www.abitrigo.com.br/> , Dezembro 2016.

ABONYI, T. et al. Synthesis of gluten-forming polypeptide 1. Biosynthesis of gliadins and glutenins subunits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55 p.3655-3660, 2007.

AMEMIYA, J. I.; MENJIVAR, J. A. Comparison of small and large deformation measurements to characterize the rheology of wheat flour doughs. **Journal of Food Engineering**. v.16, n.1-2, p.91-108, 1992.

ANG, S., *et al.*, Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic. **European Biophysics Journal**. v.39. 2010.

ATWELL, W. A. Wheat Flour. Eagen Press Handbook Series. **American Association of Cereal Chemists**. St. Paul, 2001.

BARAK, S. et al. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **Food Science and Technology**. v.51, p. 2011-217, 2013.

BECHTEL, D. B. et al. Breadmaking studies by light and transmission electron microscopy. **Cereal Chemistry**. v.55, n.3, p.392-401, 1977.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, p.537-575, 1997.

BELITZ, H.D. & GROSCH, M. Food Chemistry. 4th ed. Berlin: Springer, 2009.

BÉNÈTRIX, F. et al. Changes in protein complexes of durum wheat in developing seed. **Cop Science**, v.34 p. 462-468, 1994.

BONGIOVANNI, T. R. S. et al. Celiac Disease Impact of Gluten-free Camp on Quality of Life of Children and Adolescents with. **Pediatrics**, v.125(3), p.525-529, 2010

BORLA, O. P, et al. Quality parameters and baking performance of commercial gluten flours. **Lebensm-Wiss.u.-Technol.**, v.37, p.723–729, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72(1), p.248-254, 1976.

BRANLARD, G. et al. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. **Euphytica**. v.119, p.59-67, 2001

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 8, 03 jun. 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, n. 105, p. 91. 2005.

CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with Pattern Lab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**. v.11, p.102–117, 2016.

CHEFTEL, J.; CHEFTEL, H. Introducción a La bioquímica y tecnología de los alimentos. **Zaragoza: Acribia**,v.1, 333p.1992.

CHIANG, S. et al. Effect of wheat flour protein compositions on the quality of deep-fried gluten balls. **Cereal Chemistry**. v.97, p.666-673, 2006.

COLONNA, P. & BULÉON, A. New insights on starch structure and properties. In: **Cereal Chemistry and Technology: a Long Past and a Bright Future**. In Proceedings 9th International Cereal and Bread Congress, p. 25-42, 1992

COPELAND, L. Structural characterization of wheat starch granules differing in amylase content and functional characteristics. **Carbohydrate Polymers**. v.75, p.705-711, 2009.

COSTA, M. D. G. et al. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28(1), p.220-225, 2008.

COSTA, M. S. et al. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p.163-170, 2013

DAY, L.; et al. Enhancement of gluten quality combined with reduced lipid content through a new salt-washing process. **Journal of Food Engineering**. v.95, p.365-372, 2009.

DELCOUR, J. A., et al.. Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. **Annual Review of Food Science and Technology**, Vol 3, 3, 469-492, 2012.

DENČIĆ, S. et al. Effects of genotype and environment on breadmaking quality in wheat. **International Journal of Plant Production**, v.5, p.71-82, 2011.

DOBRA SZCZYK, B. J. & MORGENSTERN, M. P. Review – Rheology and the bread making process. **Journal of Cereal Science**, v.38, p.229-245, 2003.

DUPONT, F. M. et al. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. **Proteome Science**, 9(10), 10-1186, 2011.

DUPONT, F.M. & ALTENBACH, S.B. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and proteins synthesis. **Journal of Cereal Science**, v.38 p.133-146, 2003.

EL-KHAYAT, G. H. et al. Durum wheat quality: some physical and chemical characteristics of Syrian durum wheat genotypes. **International Journal of Food Science and Technology**. v.41, supplement 2, p.22-29, 2006.

FAOSTAT. Food and Agricultural organization of the United Nations. In **F. C. S. a. D. Brief** (Ed.), 2016

FARONI, L. R. D. et al. Qualidade da farinha obtida de grãos de trigo fumigados com dióxido de carbono e fosfina. **Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.**, v. 6, n. 2, p. 115-119, 2007.

FERREIRA, M. S. L. et al. A MALDI-TOF based study of the in-vivo assembly of glutenin polymers of durum wheat. **Food Research International**, v.63, p.89-99, 2014

GOODING, M. J. The wheat crop. In K. Khan & P. R. Shewry (Eds.), **Wheat chemistry and technology** 4 ed., p. 19-38, 2009.

GRAS, P. et al. Modelling the developmental rheology of wheat flour dough using extension test. **Journal of Cereal Science**. v.31, n.1, p.1-13, 2000.

GRAVLAND, A. et al. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 30, 71-84, 1979.

GREFFEUILLE, V. et al. Analysis of the millin greduction of bread wheat farina: physical and biochemical characterization. **Journal of Cereal Science**. v.45, n.1, p.97-105, 2007.

GRISWOLD, R. M. **Estudo experimental dos alimentos**. São Paulo: **Edgar Blücher**, p.292-293, 1972.

GUPTA, R. B. et al. Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheats. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.1377-1385, 1996.

GUTKOSK, L. C. et al. Avaliação de farinhas de trigos cultivados no Rio Grande do Sul na produção de biscoitos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p.91-97, 2004

HADDAD, Y. et al. Rheological Behaviour of Wheat Endosperm—Proposal for Classification Based on the Rheological Characteristics of Endosperm Test Samples. **Journal of Cereal Science**. v.34, n.1, p.105-113, 2001.

HALFORD, N. G. et al. Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.373-378, 1992.

HAYES, R. et al. Cores hell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1357, p.3652, 2014

HONESEY, R. C. Principios de ciencia y tecnologia de loscereales. **Zaragoza: Acribia**, p.321, 1991.

HOSENEY, R. C. Principles of cereal science and technology. 2. ed. St. Paul: **AACC**, p.378, 1994.

HOWTHORN, J. Fundamentos de la Ciencia de los Alimentos. **Acribia. Zaragoza**, 1983.

HUNG, P. V. et al. Waxy and high-amylose wheat starches and flours—characteristics, functionality and application. **Food Science and Technology**. v.17, n.8, p.448-456, 2006.

KASARDA, D.D. Can an increase in celiac disease be attributed to an increase in the gluten content of wheat as a consequence of wheat breeding? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.61, p.1155-1159, 2013.

KIM, J.S., et al. In-Source Fragmentation and the Sources of Partially Tryptic Peptides in Shotgun Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v.12(2), p.910–916, 2013.

KONTOGIORGIOS, V. Microstructure of hydrated gluten network. **Food Research International**. v.44, p.2582-2586, 2011.

KULP, K. Physicochemical properties of starches of wheat and flours. **Cereal Chemistry**, v.49, p.697-706, 1972.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016.

MARTINEZ-ESTESO, M. J. et al. Defining the wheat gluten peptide fingerprint via a discovery and targeted proteomics approach. **Journal of Proteomics**, 2016

MELNIKOVA, N.V. et al. Catalogue of alleles of gliadin-coding loci in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). **Biochimie**, 2011.

MONTENEGRO, F. M. & ORMENESE, R. C. S. C. Avaliação da Qualidade Tecnológica da Farinha de Trigo. Campinas: **Cereal Chocotec**, p.62, 2008.

MOREL, M. H. & BONICEL, J. Determination of the number of cysteine residues in high molecular weight subunits of wheat gluten. **Eletroforesis**, v.17 p.392-399, 1996.

MORITA, N. et al. Dough and baking properties of highamylose and waxy wheat flours. **Cereal Chemistry**. v.79, p.491-495, 2002

MOUSIA, Z. et al. Effect of wheat pearling on flour quality. **Food Research International**. v.37, p.449-459, 2004.

MURAD, A. M. & RECH, E. Nano UPLC-MSE proteomic data assessment of Soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnology** 2012

NAEEM, H. A.; MACRITCHIE, F. Polymerization of glutenin during grain development in near-isogenic wheat lines differing at Glu-D1 and Glu-B1 in greenhouse and field. **Journal of Cereal Science**, v.41(1), p.7-12, 2005.

NASCIMENTO, K. O. et al. Celiac Disease: Symptoms, Diagnosis and Nutritional Treatment. **SAÚDE REV.**, v. 12, n. 30, p. 53-63, 2012.

ONIPE, O.O. et al. Composition and functionality of wheat bran and application in some cereal products. **International Journal of Food Science & Technology**, 2015.

OSBORNE, T. B. The proteins of wheat kernel. Washington: **Carnegie Institute Publication**, p.84, 1907.

PANOZZO, J. F., EAGLES, H. A., WOOTON, M. Changes in protein composition during grain development in wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.52 p.485-493, 2001.

PIRES, J. L. F., VARGAS, L., & CUNHA, G. R. Trigo no Brasil - Bases para produção competitiva e sustentável. In, (pp. 488). Passo Fundo- RS -Brasil: **Embrapa Trigo**, 2011.

POMERANZ, Y. Dispersibility of wheat proteins in aqueous urea solutions – New parameter to evaluate bread-making potentialities of wheat flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.16, p.586-593, 1995.

POPPER, L et al. Future of Flour – A Compendium of Flour Improvement. **Kansas City: Agrimedia**, p.325, 2006.

PRUSKA-KEDZIOR, A. et al. Comparison of viscoelastic properties of gluten from spelt and common wheat. **European Food Research Technology**. v.277, p.199-207, 2008.

QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnología de la panificación**. Zaragoza: Editorial Acribia, p.485, 1991.

QUEIJI, M. F. D.; SCHEMIM, M. H. C.; TRINDADE; J. L. F. Propriedades reológicas da massa de farinha de trigo adicionada de alfa-amilase. **Ciência Agr. Eng.**, v.12 p.21-29, 2006.

RAO G. V.; RAO P.H. Methods for determining rheological characteristics of doughs: a critical evaluation. **Journal of Food Science Technology**, v.30, p.77-87, 1993

RASPER, V.F. Quality evaluation of cereal and cereal products. In: LORENZ, K., KULP, K. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, p.595-638, 1991.

SCHEUER, P. M. et al. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13, n.2, p.211-222, 2011. ISSN 1517-8595

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos proteicos. **São Paulo: Varela**, p.517, 1996.

SHEWRY, P. R., et al. The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: Genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. in: **Oxford Surveys of Plant and Molecular Cell Biology**, Vol. 6. B. J. Mifflin, ed. Oxford University Press: London. 1986

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **Biochemical Journal**, v.267, p.1-12, 1990.

SHEWRY, P.R., HALFORD, N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p.947-958, 2002.

SHOUMIM, Z. Deletion of the low-molecular-weight glutenin subunit allele Glu-A3a of wheat (*Triticum aestivum*L.) significantly reduces dough strength and breadmaking quality. **BMC Plant Biology**, v. 14, p.1, 2014.

SILVA, S. A., et al. Composição de subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW) em trigos portadores do caráter “stay-green”. **Ciência Rural**, v.34, n.3, 2004.

SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W. Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. **Theor. Appl. Genet.** 66:628-641. 1988.

SMANHOTTO, A. et al..Características físicas e fisiológicas na qualidade industrial de cultivares e linhagens de trigo e triticales. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.10, p. 867-872, 2006.

STOJCESKA, V. et al. A comparison rheological measurements of wheat dough to predict baking behaviour. **Journal of the Food Engineering**. v.83, p.475-482, 2007.

SURGET, A.; BARRON, C. Histologie du grain de blé. **Industrie des céréales**, v.45, p.3-7, 2005.

TOUFEILI, I. et al. The role of gluten proteins in the baking of arabic bread. **Journal of Cereal Science**. v.30, p.255-265, 1999.

VAN DER BORGHT, A. et al. A. Fractionation of wheat and wheat flour in tostarch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v.41, p.221-237, 2005.

VENSEL, W. H. et al. Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. **Proteome Science**, v.12, 2014

WANG, A, et al. Identification of Low Molecular Weight Glutenin Alleles by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.). **PLoS ONE**, v.10(9), 2015.

WANG, B. et al. Prediction of peptide drift time in ion mobility mass spectrometry from sequence-based features. **BMC Bioinformatics**, v.14(59), p.1-9, 2013.

WANG, Y. et al. Low molecular weight glutenin subunit gene *Glu-B3h* confers superior dough strength and breadmaking quality in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Scientific Reports**, v. 6, p. 27182 , 2016.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v.24, p.115-119, 2007.

WRIGLEY, C. W. Giant proteins with flour power. **Nature**, v.381(6585), p738-739, 1996.

WRIGLEY, C.W. Giant proteins with power. **Nature** v.381, p.738-739, 1996.

WRIGLEY, C.W., BIETZ, J.A. Proteins and amino acids. **Wheat Chemistry and Technology**, Vol.1. St. Paul, MN: AACC. p.159-275, 1988.

ZANDONADI, R.P.; et al. Green banana pasta: an alternative for gluten-free diets. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**. v.112, n.7, p.1068-1072, 2012

8. Anexo

Anexo 1. Lista de proteínas identificadas nas diferentes amostras

Número de acesso (UNIPROT)	Descrição (UNIPROT)	Amostra
Q5UHH8	dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média
C7C4X0	Alpha amylase inhibitor CM1 (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=wtai-CM1 PE=2 SV=1	Média
Q9S6Y2	Alpha purothionin (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=Pur-B1 PE=4 SV=1	Forte
I0IT53	Alpha/beta-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Fraca
I0IT55	Alpha/beta-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
I0IT62	Alpha/beta-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Fraca
P01544	Alpha-1-purothionin (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=THI1.1 PE=1 SV=2	Forte, Média, Fraca
P32032	Alpha-2-purothionin OS=Triticum aestivum GN=THI1.2 PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
P16851	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2 OS=Triticum aestivum PE=1 SV=2	Média, Fraca
P17314	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3 OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	Forte, Fraca
Q306F8	Alpha-gliadin Gli2-CN16-14 OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
K7X0I8	Alpha-gliadin OS=Triticum aestivum GN=gli-2 PE=4 SV=1	Média, Fraca
K7X1I9	Alpha-gliadin OS=Triticum aestivum GN=gli-2 PE=4 SV=1	Forte, Fraca
K7X1L1	Alpha-gliadin OS=Triticum aestivum GN=gli-2 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
X2KWL1	Alpha-gliadin protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
P12862	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial OS=Triticum aestivum GN=ATPA PE=3 SV=1	Fraca
P0CZ08	Avenin-like a3 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
G9I0T6	Avenin-like protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
V5M127	Avenin-like protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Fraca
Q7X9M2	Beta amylase (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Média, Fraca
W5EKI0	Beta-amylase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca

P81713	Bowman-Birk type trypsin inhibitor OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5D637	Chromosome 3B_ genomic scaffold_ cultivar Chinese Spring OS=Triticum aestivum GN=TRAES_3BF058900010CFD_c1 PE=4 SV=1	Media
P83207	Chymotrypsin inhibitor WCI OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q41540	CM 17 protein OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
I6PWK7	Dimeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Fraca
Q4U198	Dimeric alpha-amylase inhibitor OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q4U1A1	Dimeric alpha-amylase inhibitor OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Fraca
P30569	EC protein I/II OS=Triticum aestivum PE=1 SV=2	Forte, Média, Fraca
Q03033	Elongation factor 1-alpha OS=Triticum aestivum GN=TEF1 PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5B4B5	Elongation factor 1-alpha OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Fraca
Q53WS3	Em protein OS=Triticum aestivum GN=Em-B1 PE=4 SV=1	Forte, Fraca
P16347	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	Forte, Fraca
Q3S4I0	Eukaryotic translation initiation factor 5A OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte
W5CCA9	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q6EEX1	Gamma gliadin OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Media
Q94G90	Gamma-gliadin (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte
M9TG60	Gamma-gliadin 1 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
M9TGF7	Gamma-gliadin 2 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
P06659	Gamma-gliadin B OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
B6UKN0	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum GN=II910 PE=4 SV=1	Média, Fraca
B6UKP6	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum GN=II936 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
K7X1R6	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Fraca
L7R599	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Media
R9XU99	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
R9XV71	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
R9XWA1	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Media
R9XWC4	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca

U5U7C3	Gamma-gliadin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Fraca
D2KFH0	Gliadin/avenin-like seed protein OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q0Q5D9	Globulin 1 OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q0Q5E3	Globulin 1 OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
B7U6L5	Globulin 3B OS=Triticum aestivum GN=glo-3B PE=4 SV=1	Fraca
I6QQ39	Globulin-3A OS=Triticum aestivum GN=Glo-3A PE=2 SV=1	Forte, Fraca
P12299	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit_ chloroplastic/amyloplastic OS=Triticum aestivum GN=AGP-L PE=2 SV=2	Forte, Média, Fraca
P30523	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit_ chloroplastic/amyloplastic OS=Triticum aestivum GN=AGP-S PE=2 SV=1	Forte
P16315	Glutenin_ low molecular weight subunit PTDUCD1 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte
A0A096UTL2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q0KIW2	Glycine-rich RNA-binding protein OS=Triticum aestivum GN=TaGRP2 PE=2 SV=1	Forte, Média
Q84QI5	GSP-1 Grain Softness Protein OS=Triticum aestivum GN=Gsp-1 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q9FVJ5	GSP-A1 OS=Triticum aestivum GN=Gsp-1 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
A0A060MZP1	High molecular weight glutenin subunit (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=glu PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
H9B854	High-molecular-weight glutenin subunit Bx13 OS=Triticum aestivum GN=HMW- GS Bx13 PE=4 SV=1	Fraca
W5A2P9	Histone H2B OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Média, Fraca
A5HMG2	HMW glutenin subunit 1By16 OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Fraca
Q03871	HMW glutenin subunit 1By9 OS=Triticum aestivum GN=Glu-1By9 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q41553	HMW glutenin subunit Ax2 OS=Triticum aestivum GN=HMWG PE=4 SV=1	Fraca
Q45R38	HMW glutenin x-type subunit Bx7 OS=Triticum aestivum GN=Glu-B1a1 PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
V9P7D7	LMW-i glutenin subunit 37 OS=Triticum aestivum GN=LMW-i PE=4 SV=1	Forte, Fraca

B2BZC7	LMW-m glutenin subunit 0154A5-M OS=Triticum aestivum GN=Glu-D3 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
B2BZD2	LMW-m glutenin subunit 0877L13-M OS=Triticum aestivum GN=Glu-D3 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q5MFN9	Low molecular weight glutenin OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
I1XB60	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
B2Y2S3	Low molecular weight glutenin subunit OS=Triticum aestivum GN=GluB3-2 PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
M4VSR0	Low temperature-responsive RNA-binding protein OS=Triticum aestivum GN=LTR PE=2 SV=1	Forte, Fraca
P93790	Low-molecular-weight glutenin storage protein OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
R4JB65	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=LMW-GS PE=4 SV=1	Fraca
R4JBI2	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=LMW-GS PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
R4JFB5	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=LMW-GS PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
R4JFQ3	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=LMW-GS PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
R9YUB3	Low-molecular-weight glutenin subunit Glu-D3 OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
F8SGN5	Low-molecular-weight glutenin subunit OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Média, Fraca
Q1ZZT4	Low-molecular-weight glutenin subunit OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média
B5B0D5	Major allergen CM16 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
W4ZT39	Malate dehydrogenase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
A4ZIW9	Monomeric alpha-amylase inhibitor (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
P82900	Non-specific lipid-transfer protein 2G OS=Triticum aestivum PE=1 SV=2	Forte, Média, Fraca

Q8GZB0	Non-specific lipid-transfer protein OS=Triticum aestivum GN=LTP1500 PE=3 SV=1	Média, Fraca
I3NM41	Oleosin OS=Triticum aestivum GN=35D7.3 PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5E9F6	Oleosin OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5ELC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
P12783	Phosphoglycerate kinase_ cytosolic OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Fraca
B9A8E2	Protein disulfide-isomerase OS=Triticum aestivum GN=pdi PE=2 SV=1	Forte, Fraca
B9A8E4	Protein disulfide-isomerase OS=Triticum aestivum GN=pdi3 PE=2 SV=1	Media
A0A024FSC1	Protein disulfide-isomerase OS=Triticum aestivum GN=TaPDIL1-1gamma PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
V5RM09	Puroindoline OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Fraca
Q10464	Puroindoline-B OS=Triticum aestivum GN=PINB PE=1 SV=1	Forte, Média, Fraca
D2TGC2	Putative alpha-amylase inhibitor CM2 (Fragment) OS=Triticum aestivum GN=wtai-CM2 PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q571Q5	Putative LMW-glutenin subunit OS=Triticum aestivum GN=glu PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q7X9M4	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q07810	rRNA N-glycosidase OS=Triticum aestivum GN=trig7 PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
C0LF31	Serpin 2 OS=Triticum aestivum GN=SER2 PE=2 SV=1	Forte, Fraca
Q6J160	S-type low molecular weight glutenin L4-55 (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q8S4P7	Thaumatococcus-like protein OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Média, Fraca
W5CMD2	Triosephosphate isomerase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5DIU6	Triosephosphate isomerase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Fraca
Q43691	Trypsin/alpha-amylase inhibitor CMX2 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Fraca
Q2PCC7	Type 2 non specific lipid transfer protein OS=Triticum aestivum GN=ltp7.1c PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
Q2PCC5	Type 2 non specific lipid transfer protein OS=Triticum aestivum GN=ltp7.1e PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca

A0A0C4BIW4	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Fraca
W4ZQ59	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Fraca
W5DC13	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte
W5E4I6	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5FZ62	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5GVP7	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Fraca
W5H9W9	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Fraca
W5HAK3	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5HFK6	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Fraca
W5HPC1	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte
W5I5X1	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	Forte, Média, Fraca
W4ZN68	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Media
W4ZP51	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W4ZWJ3	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Fraca
W4ZXB7	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Média, Fraca
W4ZXS7	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W4ZZK4	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5AKY9	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5ALW8	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Media
W5BBZ7	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Fraca
W5BKE1	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5C5N9	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte
W5DK32	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5E2U0	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Fraca
W5EAP7	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5ECA4	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5EH57	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5EH76	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Fraca

W5EJS7	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5EST8	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5F7M4	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Média, Fraca
W5FIP7	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Média, Fraca
W5FN32	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5GAL2	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5HXX0	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5I0M2	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
W5I8L6	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Fraca
W5IBK5	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte
Q0Q5D2	X-type HMW glutenin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Forte, Média, Fraca
D3JUT3	Xylanase inhibitor protein I OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	Forte, Média, Fraca