

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIZANDRA KAMRADT SAVI

**CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA  
DIFERENCIAL (DSC) DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA DO TRIGO  
(*Triticum aestivum*, CULTIVAR BRS-PARRUDO) OBTIDAS POR DIFERENTES  
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.**

CURITIBA

2014

LIZANDRA KAMRADT SAVI

**CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA  
DIFERENCIAL (DSC) DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA DO TRIGO  
(*Triticum aestivum*, CULTIVAR BRS-PARRUDO) OBTIDAS POR DIFERENTES  
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Engenharia  
de Alimentos, no curso de Pós Graduação em  
Engenharia de Alimentos, setor de Tecnologia,  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra.

Co-orientador: Dr. Marco Aurélio S. de Oliveira

CURITIBA

2014

---

S267c Savi, Lizandra Kamradt  
Caracterização térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) das frações ricas em glutenina do trigo (*Triticum aestivum*, Cultivar BRS-Pamudo) obtidas por diferentes métodos de extração/ Lizandra Kamradt Savi. – Curitiba, 2014.  
68f. : Il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

Orientador: Marcos R. Mafra – Co-orientador: Marco Aurélio S. de Oliveira.  
Bibliografia: p. 63-68.

1. Glúten - Físico-química. 2. Proteínas - Desnaturação. 3. Tíolos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Marcos R.. III. Oliveira, Marco Aurélio S. de . IV. Título.

CDD: 641.3311

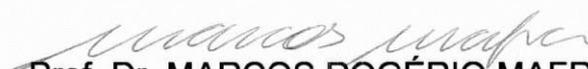
---

**LIZANDRA KAMRADT SAVI**

**CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA POR CALORIMETRIA  
EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) DAS FRAÇÕES RICAS  
EM GLUTENINA DO TRIGO (*Triticum aestivum*, cultivar BRS-  
Parrudo) OBTIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS DE  
EXTRAÇÃO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:

  
Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA  
Setor de Tecnologia, UFPR

  
Prof. Dr. MARLUS PINHEIRO ROLEMBERG  
Instituto de Ciência e Tecnologia/UFALFENAS

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA LUCIA MASSON  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 13 de junho de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e desafios que me foram dados durante a vida. Nada na vida é por acaso, obrigada!

Aos meus pais, Álvaro Savi Filho e Elmi Kamradt Savi, por me terem dado a vida, além de todo o amor e carinho incondicional. Por me motivarem sempre me apoiando em tudo, e por serem exemplos de caráter, transmitindo assim os valores que carregarei para o resto da minha vida. Aos meus irmãos, Lúcius e Leandro Kamardt Savi, pelo apoio e companheirismo e as minhas cunhadas-irmãs Simony e Fabiane.

Aos meus orientadores Dr. Marcos Rogério Mafra e Dr. Marco Aurélio S. de Oliveira por acreditarem em mim, pela orientação e dedicação durante todo o trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

Às amigas, Carol, Cíntia, Aline F., Priscila M., Dani Carpiné, Giovanna, Paloma e Érika, pelo companheirismo e amizade durante os momentos de alegria e de tristeza. Não sei como seria sem o apoio e conselhos de vocês!

Às Técnicas da Central Analítica da Usina Piloto, Andrea e Patrícia, por tamanha paciência, atenção, auxílio e dedicação durante todo o período do trabalho.

Aos amigos do LATOS, Elaine, João, Heron, Thiago e Sheila, por todos os conselhos e pelo companheirismo.

Aos amigos e colegas, Aline R., Ana Paula, Daniele S., Fernanda, Fernanda P., Catia, Ana Mery, Gerson, Rafael, pelos momentos de descontração nas horas vagas e pelas trocas de conhecimento e auxílio.

Ao Laboratório de Bioquímica do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, pelo espaço e equipamentos cedidos para as análises.

Ao secretário do PPGEAL, Paulo Krainski, pela paciência e auxílio durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela disponibilização dos recursos físicos e financeiros, e em especial à todos os professores do programa.

A CAPES por conceder a bolsa de mestrado.

A Embrapa Trigo e Romanus Ingredientes pelo fornecimento das amostras de farinha de trigo utilizadas nas análises

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Os Laboratórios são templos em que a inteligência é concitada ao serviço de Deus, e, ainda mesmo quando a cerebração se perverte, transitoriamente subornada pela hegemonia política, geradora de guerras, o progresso da Ciência, como conquista divina, permanece na exaltação do bem, rumo a glorioso porvir.”*

**Emmanuel**

## RESUMO

A denominação glúten é dada para o conjunto de proteínas encontradas em diversos cereais, sendo estas responsáveis por conferir à massa a coesão e a retenção de gases durante a fermentação. As principais proteínas que compõem o glúten são a gliadina e a glutenina. Estas são proteínas insolúveis em água, sendo a gliadina solúvel em solução alcoólica e glutenina solúvel em soluções ácidas e alcalinas. Por serem as principais proteínas da farinha de trigo, o estudo do comportamento térmico destas frações proteicas é essencial para o projeto de unidades de processamento desta matéria-prima. Entretanto, o processo de separação e purificação destas proteínas tendem a alterar as propriedades físico-químicas destas frações. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar as frações ricas em glutenina obtidas da farinha de trigo (cultivar BRS-Parrudo – Embrapa), separadas por quatro métodos de extração, sendo estes assim denominados: extração padrão, extração com adição de DTT (ditiotreitól), extração por decantação e a extração direta. A quantidade de proteína obtida em cada extração foi quantificada pelo método de Bradford, sendo que as massas molares foram avaliadas por eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE. A temperatura de desnaturação das frações proteicas foi determinada pela calorimetria exploratória diferencial (DSC) e o grau de desnaturação destas frações foi avaliado por dicróismo circular (CD). Na análise de Bradford, as concentrações de proteínas na extração padrão, extração com adição de DTT e na extração por decantação foram de 0,20 mg/mL, 0,30 mg/mL e 0,16 mg/mL, respectivamente, enquanto que na extração direta foi obtida maior concentração de proteína, 8,87 mg/mL. Na extração direta ocorre uma única etapa de extração, na qual são obtidas diversas frações proteicas, além da fração de interesse. Isto pode explicar o fato da maior concentração de proteína obtida nessa extração. As bandas identificadas na eletroforese para a avaliação das massas molares foram:  $86,7 \pm 2,9$  Kda, para as frações de alta massa molar, e  $48,3 \pm 0,5$  KDa e  $39,1 \pm 0,45$  Kda, para as de baixa massa molar. A análise das frações proteicas por dicróismo circular, revelou que as mesmas não sofreram desnaturação durante os processos de extração. A análise de DSC para a avaliação das quatro diferentes extrações revelou uma pequena variação da temperatura de desnaturação entre as amostras extraídas. Na extração padrão e extração direta foram obtidas as temperaturas de desnaturação de  $64,3 \pm 0,62^\circ\text{C}$  e  $67,2 \pm 0,52^\circ\text{C}$ , respectivamente e os eventos térmicos foram endotérmicos, com variação de entalpia de aproximadamente  $-3,95$  J/g na extração padrão e  $-10,80$  J/g na extração direta. Para a extração com adição de DTT, a temperatura de desnaturação foi de  $65,1 \pm 1,74^\circ\text{C}$  e a variação de entalpia de  $-12,68$  J/g. Essas amostras passaram pelo processo de diálise no intuito de eliminar interferentes. Foi observado uma pequena variação nas temperaturas de desnaturação, porém os picos obtidos apresentaram uma melhor definição, confirmando a eliminação dos contaminantes. Este trabalho demonstrou que o método de extração empregado pode alterar as propriedades das proteínas do glúten, especificamente a glutenina, sendo a análise de DSC um método robusto, rápido e confiável para avaliação destes extratos. As frações de glutenina extraída da farinha de trigo do cultivar BRS-Parrudo da Embrapa apresentou temperatura de desnaturação intermediária, quando comparada com os valores já encontrados na literatura para outros cultivares.

PALAVRAS-CHAVE: *Glúten, desnaturação, ditiotreitól (DTT), propriedades físico-químicas*

## ABSTRACT

Gluten is the name given to the group of proteins found in some cereals, which are responsible for conferring cohesion to the mass and retention of gas during fermentation. The major proteins which comprise the gluten are gliadin and glutenin. These proteins are insoluble in water. Gliadin is soluble in alcoholic solution and glutenin is soluble in acidic and alkaline solutions. Because they are the major proteins of wheat flour, the study of the thermal behavior of these protein fractions is essential for the design of processing units of this raw material. However, the process of separation and purification of these proteins tend to alter the physicochemical properties of these fractions. Thus, this study aims to evaluate the fractions of glutenin obtained from wheat flour (BRS-stout - Embrapa) and separated by four methods, which are named as: standard extraction, extraction with addition of DTT (dithiothreitol), extraction by decantation and the direct extraction. The amount of protein obtained at each extraction was quantified by the Bradford method, and the molecular weights were analyzed by gel electrophoresis on denaturing SDS-PAGE. The denaturation temperature of the protein fractions was determined by differential scanning calorimetry (DSC) and the degree of denaturation of these fractions was assessed by circular dichroism (CD). The results showed that the protein concentration in standard extraction, extraction by addition of DTT and decantation were 0.20 mg / ml, 0.30 mg / ml and 0.16 mg / ml, respectively. It was observed that direct extraction obtained a higher protein concentration, 8.87 mg / ml. In the direct extraction which consists in a single extraction step, various protein fractions are obtained with the fraction of interest protein. This may explain the fact that the highest concentration of protein was obtained in this extraction. The bands identified in electrophoresis for assessment of molecular weight were  $86.7 \pm 2.9$  kDa for the high molecular weight fractions, and  $48.3 \pm 0.5$  kDa and  $39.1 \pm 0.45$  kDa for the low molecular weight. The analysis of the protein fractions by circular dichroism revealed that they did not undergo denaturation during the extraction process. The DSC analysis for the evaluation of four different extractions revealed a small variation of the denaturing temperature between the samples. In the standard extraction and direct extraction were obtained the denaturation temperatures of  $64,3 \pm 0,62^{\circ}\text{C}$  e  $67,2 \pm 0,52^{\circ}\text{C}$ , respectively, thermal events were endothermic and the enthalpy obtained was approximately  $-3.95$  J / g in the standard extraction and  $-10.80$  J / g for the direct extraction. For the extraction with the addition of DTT, the denaturation temperature was  $65,1 \pm 1,74^{\circ}\text{C}$  and the enthalpy change of  $-12.68$  J / g. These samples passed through the dialysis process in order to eliminate interfering. A small change in denaturation temperature was observed, but peaks obtained showed a better definition, confirming the removal of contaminants. This study demonstrated that the type of extraction method can change the properties of gluten proteins, specifically the glutenin, and the DSC analysis is a robust, fast and reliable method for assessing these statements. The fractions of glutenin extracted from wheat flour of BRS-stout Embrapa showed intermediate denaturation temperature when compared with the values already found in the literature for other cultivars.

KEY-WORDS: *Gluten, denaturation, dithiothreitol (DTT), physicochemical properties*

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA PRINCIPAL DOS AMINOÁCIDOS.....	20
FIGURA 2 – AMINOÁCIDO CISTEÍNA .....	22
FIGURA 3 - LIGAÇÕES DISSULFETO.....	22
FIGURA 4 – ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS.....	23
FIGURA 5 – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR PARA ESTRUTURA DE $\alpha$ - HÉLICE, $\beta$ -FOLHA E CONFORMAÇÃO RANDÔMICA. ....	26
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CORANTE COMASSIE AZUL BRILHANTE .....	27
FIGURA 7 – ESTRUTURAS DO GLÚTEN, GLIADINA E GLUTENINA. ....	29
FIGURA 8 – CURVA TÍPICA DE DSC, I – MUDANÇA DA LINHA DE BASE SEM PICO; II E III – PICOS ENDOTÉRMICOS; IV – PICO EXOTÉRMICO.....	33
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO PADRÃO DAS PROTEÍNAS DO TRIGO.....	37
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT NOS SOLVENTES DE CADA ETAPA DAS EXTRAÇÕES DAS PROTEÍNAS DO TRIGO.....	39
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO POR DECANTAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO TRIGO.....	40
FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DIRETA DAS PROTEÍNAS DO TRIGO.....	41
FIGURA 13 – EQUIPAMENTO DE DSC DA PERKIN ELMER 8500. ....	45

FIGURA 14 - SDS-PAGE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12% CORADO COM COMASSIE BLUE DAS FRAÇÕES DA EXTRAÇÃO A FARINHA DE TRIGO. A COLUNA MM APRESENTA O MARCADOR DE MASSA MOLAR LOW MOLECULAR WEIGHT (GE LIFESCIENCIES) COM AS RESPECTIVAS MASSAS EM KDA. CINCO MICROGRAMAS DE PROTEÍNA TOTAL DE CADA FRAÇÃO FORAM APLICADOS NO GEL. AS AMOSTRAS DA COLUNA 1 – E1 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINAS DA EXTRAÇÃO PADRÃO, NA COLUNA 2 – E2 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINAS DA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, NA COLUNA 3 – E3 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINA DA EXTRAÇÃO POR DECANTAÇÃO, NA COLUNA 4 – E4 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINAS DA EXTRAÇÃO DIRETA. O QUADRADO TRACEJADO DESTACA AS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA DE ALTA MASSA MOLAR E O QUADRADO CONTÍNUO DESTACA AS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINAS DE BAIXA MASSA MOLAR. ....50

FIGURA 15 – ESPECTRO DA ANÁLISE DE DICROÍSMO CIRCULAR DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA EXTRAÍDAS PELA EXTRAÇÃO PADRÃO, COM CONCENTRAÇÃO 0,002 mg/mL, ESTÁ APRESENTADA EM VERMELHO, E PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, COM CONCENTRAÇÃO DE 0,003 mg/mL, ESTÁ EM AZUL. TODAS AS AMOSTRAS ESTAVAM EM TEMPERATURA DE 20°C. A ELIPSIDADE MOLAR/ MG DE PROTEÍNA SÃO DADOS EM  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{(mg de proteína)}^{-1}$  E O COMPRIMENTO DE ONDA EM nm. ....53

FIGURA 16 – CURVA DE DSC DA FRAÇÃO RICA EM GLUTENINA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO PADRÃO, COM TEMPERATURA ENTRE 20°C E 80°C, PANEIA PADRÃO PERKIN ELMER, COM TAXA DE AQUECIMENTO DE 2°C/min E VAZÃO DO GÁS DE PURGA (N<sub>2</sub>) DE 50mL/min. AS TEMPERATURAS DE DESNATURAÇÃO DA AMOSTRA DE CADA UMA DAS REPETIÇÕES. ANÁLISE 1: 64,78°C; ANÁLISE 2: 65,15°C E ANÁLISE 3: 63,72°C.....54

FIGURA 17 – CURVA DE DSC REALIZADO COM A AMOSTRA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT. SÃO MOSTRADAS AS TEMPERATURAS DE DESNATURAÇÃO DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA DE CADA UMA

DAS REPETIÇÕES. ANÁLISE 1: 67,94°C; ANÁLISE 2: 64,78°C; ANÁLISE 3: 64,41°C; ANÁLISE 4: 63,25°C.....	55
FIGURA 18 – CURVA DE DSC DAS ANÁLISES REALIZADAS COM A AMOSTRA DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO POR DECANTAÇÃO.....	56
FIGURA 19 – CURVA DE DSC DAS ANÁLISES REALIZADAS COM A AMOSTRA DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO DIRETA. ONDE AS TEMPERATURAS APRESENTADAS NA FIGURA SÃO OS EVENTOS TÉRMICOS DA AMOSTRA. ANÁLISE 1: 67,74°C; ANÁLISE 2: 66,74°C.....	57
FIGURA 20 – CURVA DE DSC DAS ANÁLISES REALIZADAS COM A AMOSTRA DA FRAÇÃO RICA EM GLUTENINA, APÓS O PROCESSO DE DIÁLISE, OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, ONDE AS TEMPERATURAS APRESENTADAS NA FIGURA SÃO OS EVENTOS TÉRMICOS DA AMOSTRA. ANÁLISE 1: 67,53°C; ANÁLISE 2: 67,99°C, ANÁLISE 3: 65,89°C, ANÁLISE 4: 63,88°C.....	59
FIGURA 21 – CURVAS DE DSC REALIZADO COM AS AMOSTRAS OBTIDAS PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, ANTES E APÓS O PROCESSO DE DIÁLISE. A EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT ANTES DO PROCESSO DE DIALISE TEVE COMO TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO 67,94°C E $\Delta H$ DE 12,68±0,44 J/G E A EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT APÓS O PROCESSO DE DIALISE TEVE COMO TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO 67,99°C E $\Delta H$ DE 17,82±1,04 J/G.....	60

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO E POLARIADADE DOS AMINOÁCIDOS. ....	21
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS DO GLÚTEN: GLUTENINA E GLIADINA.....	30
TABELA 3 – SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO PADRÃO PARA CADA UMA DAS PROTEÍNAS EXPECÍFICAS DA FARINHA DE TRIGO.....	36
TABELA 4 – SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT PARA CADA UMA DAS PROTEÍNAS EXPECÍFICAS DA FARINHA DE TRIGO. .....	38
TABELA 5 – PREPARO DA PLACA ELISA PARA A ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	42
TABELA 6 – PARÂMETROS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	46
TABELA 7 – DADOS OBTIDOS PELO DSC PARA AS AMOSTRAS DA EXTRAÇÃO DIRETA, TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO, $\Delta H$ , MÉDIAS E DESVIO PADRÃO.....	57

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1. Trigo: produção, constituintes e aplicações.....	17
3.1.1. Cultivar BRS-Parrudo .....	18
3.2. Proteínas e Aminoácidos.....	19
3.2.1. Estrutura das proteínas .....	22
3.2.2. Desnaturação das proteínas .....	23
3.2.3. Dicroísmo Circular .....	25
3.2.4. Quantificação das proteínas .....	26
3.3. Glúten do trigo.....	28
3.4. Gliadina e Glutenina .....	31
3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	32
3.5.1. Estudo das proteínas do glúten de trigo, glutenina, por Calorimetria Exploratória Diferencial. ....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Material.....	35

4.2.	Métodos de extração de proteínas .....	35
4.2.1.	Extração Padrão.....	36
4.2.2.	Extração com adição de DTT .....	37
4.2.3.	Extração por Decantação .....	39
4.2.4.	Extração Direta.....	40
4.3.	Quantificação das proteínas.....	41
4.4.	Avaliação das massas molares das proteínas .....	43
4.5.	Análise de Dicroísmo Circular .....	43
4.6.	Análise Térmica das proteínas por DSC .....	44
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1.	Avaliação dos precipitados obtidos nas etapas das extrações.....	47
5.2.	Análises de Bradford, Eletroforese e Dicroísmo Circular das frações ricas em glutenina. ....	49
5.2.1	Análises de Bradford e Eletroforese das frações ricas em gluteninas 49	
5.2.2	Dicroísmo Circular (CD) das frações ricas em glutenina. ....	52
5.3.	Análise Calorimétrica por DSC das frações rica em glutenina .....	53
5.3.1	Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) das frações ricas em glutenina .....	54
5.3.2	Avaliação do processo de dialise nas frações ricas em glutenina pela análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	58
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Embrapa (2013), a produção nacional de trigo em 2013 foi de 5,3 milhões de toneladas, 22,4% maior que a produção em 2012. O processamento do grão tem como objetivo principal produzir a farinha de trigo, sendo gerados como subprodutos o farelo e o germe de trigo. A farinha de trigo é composta principalmente por carboidratos, lipídeos e proteínas. Dentre estes compostos, as proteínas exercem grande influência sobre a qualidade e características esperadas aos produtos obtidos a partir da farinha de trigo.

Para compreender o comportamento das proteínas do trigo, se faz necessário um aprofundamento nos aspectos fundamentais de proteínas e aminoácidos. As proteínas possuem propriedades específicas que podem ser explicadas pela seqüência de aminoácidos de sua cadeia. As proteínas do trigo de maior importância para a indústria de alimentos são principalmente as que compõem o glúten e são divididas em: não formadoras do glúten (albumina e globulina), e as formadoras do glúten (gliadina e glutenina).

O glúten é composto por proteínas capazes de formar uma massa viscoelástica, característica esta que nenhum outro cereal possui. Para uma adequada formação da massa viscoelástica deve haver um equilíbrio entre as proteínas do glúten, a gliadina e a glutenina, devido as suas características específicas.

Visando garantir a qualidade, dos produtos a base de farinha de trigo a indústria de alimentos, são adicionados diferentes compostos à farinha, estes geralmente interagem com as proteínas do glúten potencializando suas características, isso também ocorre devido às interações intramoleculares e intermoleculares entre a gliadina e glutenina.

A gliadina é solúvel em álcool e confere extensibilidade a massa enquanto a glutenina é solúvel em soluções alcalinas e confere elasticidade a massa. A glutenina é dividida em gluteninas de alta massa molar e gluteninas de baixa massa molar e em muitos trabalhos elas são estudadas separadamente.

Outra propriedade que devemos observar durante o processo de produção, dos alimentos a base de farinha de trigo, são as temperaturas utilizadas no processo de produção e condições de tratamento, pois atuam diretamente na desnaturação dessas proteínas, influenciando na qualidade dos produtos.

Este trabalho tem como objetivo avaliar as propriedades térmicas da proteína do glúten, glutenina, obtida por diferentes métodos de extração. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford, a visualização foi realizada por eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE. Nas análises de eletroforese foram observadas as gluteninas de alta massa molar e as gluteninas de baixa massa molar. A estabilidade das proteínas aos métodos de extração foi verificada por Dicroísmo Circular.

A técnica de DSC possibilitou a avaliação das temperaturas de desnaturação das proteínas do glúten de trigo isoladamente ou com os interferentes presentes na farinha.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar os diferentes métodos de extração das Frações Ricas em Glutenina e posteriormente pela Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi determinado o perfil térmico e temperatura de desnaturação das frações ricas em glutenina.

### **2.2. Objetivos específicos**

Para que o objetivo geral seja alcançado as seguintes metas foram propostas:

- ✓ Extrair as frações ricas em glutenina da farinha de trigo do cultivar BRS-Parrudo da Embrapa;
- ✓ Quantificar (Método de Bradford) e visualizar se houve a extração das frações ricas em glutenina por Eletroforese SDS-PAGE;
- ✓ Avaliar por Dicroísmo Circular se ocorreram alterações na estrutura molecular das frações ricas em glutenina;
- ✓ Analisar o perfil térmico das frações de glutenina, por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

*Neste item foi abordada a produção de trigo, suas aplicações e seus constituintes de interesse para a indústria de massas e panificação, em especial o glúten. Esse grupo proteico encontrado na farinha de trigo possui duas proteínas principais que são de extrema importância para as suas propriedades funcionais do glúten, a gliadina e a glutenina. Por serem os constituintes centrais deste trabalho, esta revisão de literatura abordará as principais características físico-químicas destas proteínas. Entretanto, para que tais propriedades pudessem ser descritas, uma revisão sobre os aspectos fundamentais das proteínas e as principais características do trigo, também foram apresentadas.*

#### **3.1. Trigo: produção, constituintes e aplicações**

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma planta de ciclo anual, sendo que seu cultivo inicia durante o inverno e é finalizado durante a primavera. A partir da farinha de trigo podemos encontrar os seguintes produtos: pães, massas alimentícias, bolos, biscoitos entre outras variedades. A produção anual no Brasil oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas, e as regiões de cultivo são: regiões Sul (RS, SC e PR), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF), sendo que cerca de 90% da produção de trigo se concentra na região Sul do Brasil. O consumo do grão no Brasil está em torno de 10 milhões de toneladas por ano, o que gera um déficit de 5 a 6 milhões de toneladas na balança comercial (EMBRAPA, 2013).

Os grãos de cereais, como todos os materiais biológicos, possuem sua composição química bastante variada. O conteúdo de proteínas no trigo pode variar entre 6% a 27% porém, em lotes comerciais, o conteúdo de proteína sempre está entre 8% e 16% (HOSENEY, 1991; WONG, 1995), podendo possuir aproximadamente 70% de amido e 2% de lipídeos (WONG, 1995). Na indústria de

massas, panificação e outras, nas quais o trigo é matéria-prima, a diferença na qualidade final dos produtos pode estar relacionada a diferenças na composição das proteínas do trigo (RODRIGUES, 2009; HOSENEY, 1991).

As proteínas dos cereais, principalmente do trigo, têm sido classificadas por alguns autores, de acordo com sua solubilidade e divididas em quatro categorias (RODRIGUES, 2009; HOSENEY, 1991; WONG, 1995):

I. **Albuminas:** proteínas solúveis em água, e sua solubilidade não se alteram na presença de sais. Na presença de calor estas proteínas sofrem coagulação.

II. **Globulinas:** proteínas insolúveis em água, porém solúveis em soluções salinas de baixa concentração, sendo insolúveis em soluções salinas de alta concentração.

III. **Prolaminas:** proteínas solúveis em soluções alcoólicas.

IV. **Gluteninas:** proteínas solúveis em ácidos ou bases diluídas.

As prolaminas são encontradas apenas nos cereais e algumas gramíneas, sendo que no trigo essa fração de proteínas é chamada de gliadina.

As gliadinas e gluteninas são as proteínas de grande interesse industrial e correspondem a cerca de 80% das proteínas do trigo (WONG, 1995).

A fim de compreender o comportamento das proteínas do trigo durante o processamento industrial, será realizada uma abordagem dos aspectos fundamentais envolvendo as proteínas e os aminoácidos que as compõem.

### 3.1.1. Cultivar BRS-Parrudo

Desde a primeira metade do século 20, a Embrapa Trigo, vem realizando diversos trabalhos para a melhoria dos cultivares de trigo com a coevolução de sistemas de produção e de melhoramento genético, onde as plantas tem resistência e/ou tolerância para um novo sistema de preparo do solo. Outros itens avaliados para o melhoramento genético da planta são: maior produtividade de grãos,

avaliação de perdas causadas por pragas, doenças e estresses, adaptação as condições de clima, entre outras.

Com resultados de 30 anos de pesquisa foi desenvolvido a cultivar BRS-Parrudo com genética que agrupa características agronômicas importantes, além de apresentar grãos duros, vermelhos e vítreos, conferindo assim uma farinha de elevada força de glúten.

Em relação à qualidade tecnológica, preliminarmente classificada como Trigo Melhorador, podendo assim empregar essa cultivar na produção de massas alimentícias secas, biscoitos tipo “*cracker*”, panificação industrial e para a panificação em geral mesclado com trigo de glúten mais fraco.

O cultivar BRS-Parrudo foi indicado para semeadura nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, conforme registro no MAPA.

### **3.2. Proteínas e Aminoácidos**

As proteínas são polímeros complexos e desempenham um papel importante em todos os sistemas biológicos. As proteínas são compostas por 20 aminoácidos diferentes, sendo estes ligados uns aos outros por meio de ligações peptídicas (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WALSTRA, 2003).

Os aminoácidos diferem entre si pela natureza química, forma e tamanho do grupo R da cadeia lateral (FIGURA 1), e possuem em sua estrutura um grupamento ácido (carboxila) e outro amino, que participam das ligações peptídicas. As propriedades físico-químicas das proteínas, como carga líquida, solubilidade, reatividade química e potencial de ligação com hidrogênio, dependem da natureza química do grupo R, também denominado de grupamento lateral ou grupamento secundário (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WALSTRA, 2003).



TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO E POLARIIDADE DOS AMINOÁCIDOS.

<b>Apolar</b>	
Alanina	
Valina	
Leucina	Aminoácidos Alifáticos
Isoleucina	
Prolina	
Fenilalanina	Aminoácidos Aromáticos
Triptofano	
Metionina	Aminoácido Sulfurado
<b>Polar não carregado</b>	
Glicina	Aminoácido Alifático
Tirosina	Aminoácido Aromático
Aspargina	Aminoácido com grupo amida
Glutamina	
Serina	Aminoácidos Hidroxilados
Treonina	
Cisteína	Aminoácido Sulfurado
<b>Grupamento positivo básico</b>	
Lisina	
Arginina	Aminoácidos Básicos
Histidina	
<b>Grupamento negativo ácido</b>	
Ácido aspártico	Aminoácidos Ácidos
Ácido glutâmico	

FONTE: (FENNEMA, 2010).

A maioria das proteínas possui, em sua estrutura o aminoácido cisteína, o qual é fortemente hidrofóbico e muito reativo devido à presença do grupamento sulfídrico (SH-) (FIGURA 2). A cisteína é uma das principais responsáveis pelas ligações intramoleculares e intermoleculares nos sistemas proteicos por meio das chamadas ligações dissulfeto (FIGURA 3), conferindo à proteína a sua estrutura secundária (HOSENEY, 1991; NELSON, 2011).

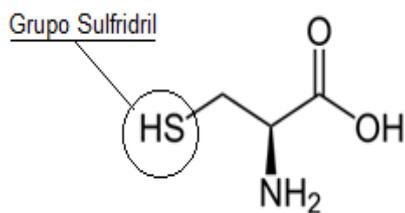


FIGURA 2 – AMINOÁCIDO CISTEÍNA  
 FONTE: HOSENEY, 1991

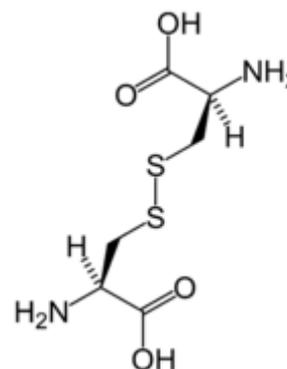


FIGURA 3 - LIGAÇÕES DISSULFETO  
 FONTE: HOSENEY, 1991.

A massa molar e a estrutura das proteínas podem variar consideravelmente. Na seção seguinte tais características das proteínas serão abordadas em detalhes.

### 3.2.1. Estrutura das proteínas

Nas proteínas a sequência de aminoácidos e o comprimento da cadeia varia consideravelmente, influenciando na sua estrutura, propriedades físico-químicas, propriedades biológicas e função. A estrutura primária (FIGURA 4) é o primeiro nível de organização estrutural das proteínas e refere-se a uma sequência linear, onde os aminoácidos estão ligados covalentemente por ligações amida ou ligações peptídicas (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WALSTRA, 2003).

A estrutura secundária (FIGURA 4) é o arranjo espacial das proteínas promovido pelos seus constituintes aminoácidos (resíduos de aminoácidos), podendo ser helicoidais ou  $\beta$ -folha (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WALSTRA, 2003).

Na estrutura terciária (FIGURA 4) o arranjo espacial linear da proteína com fragmentos de uma estrutura secundária se dobra ainda mais, formando assim uma estrutura tridimensional compacta. Esse fenômeno depende de várias interações entre os aminoácidos da cadeia, como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Essa estrutura modifica as propriedades físico-

químicas das proteínas, como sua solubilidade (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WALSTRA, 2003).

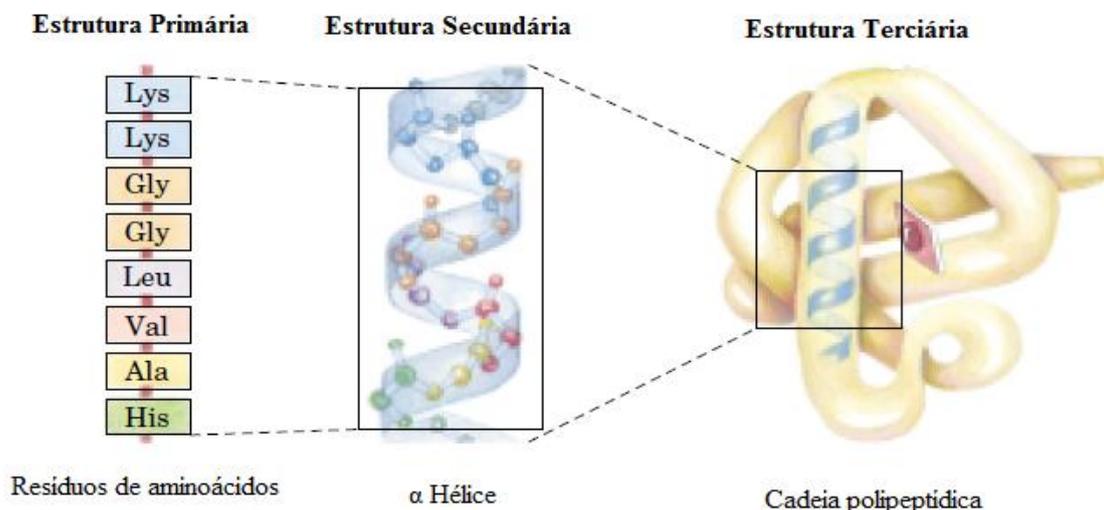


FIGURA 4 – ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS.  
 FONTE: adaptado de NELSON (2011).

A formação da estrutura tridimensional de uma proteína é bastante complexa e ocorre pelo processo de dobramento de uma cadeia polipeptídica aleatória. Essa transformação é espontânea e lenta, onde a estrutura passa de um estado desordenado para um estado ordenado, sendo que as interações intramoleculares não covalentes facilitam tal transformação (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WALSTRA, 2003). Quando tem-se a ação de um agente externo, o qual desenrola a estrutura das proteínas ocorre o processo de desnaturação e este fenômeno que ocorre com as proteínas será abordado a seguir.

### 3.2.2. Desnaturação das proteínas

A desnaturação proteica   um fen meno que ocorre quando, pela a o de um agente desnaturante, a proteína transforma sua estrutura inicial (ativa) em uma estrutura final desordenada (inativa). A perda da conforma o nativa leva   perda da sua atividade biológica, diminui sua solubilidade em água pela exposi o de mais

grupos hidrofóbicos, aumenta sua reatividade com componentes externos ou com grupos da própria molécula, promove uma maior suscetibilidade as enzimas proteolíticas, entre outras alterações (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WALSTRA, 2003).

A desnaturação geralmente ocorre quando observamos mudanças no ambiente natural das proteínas, tais como; pH, força iônica, temperatura, composição do solvente. Ao eliminarmos esse agente desnaturante ou a força que está favorecendo a desnaturação, a proteína assume a sua conformação termodinamicamente mais favorável, podendo inclusive retornar a sua forma original, o que caracteriza uma desnaturação reversível.

Em alimentos podemos observar que após a desnaturação das proteínas, estas perdem a sua solubilidade e suas propriedades funcionais, porém nem sempre esse processo é indesejável, como por exemplo, no melhoramento das propriedades emulsificantes e de formação de espuma na interface óleo-água utilizando proteínas parcialmente desnaturadas, outro exemplo é a desnaturação térmica das proteínas de leguminosas melhorando assim sua digestibilidade, sendo que a grande maioria das proteínas são melhores digeridas quando estão parcialmente desnaturadas, porém a desnaturação proteica deve ser bem avaliada de acordo com a finalidade do produto a ser processado (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991).

O aquecimento é um dos principais procedimentos tecnológicos que afetam a estrutura das proteínas e as suas propriedades funcionais na maioria das formulações de alimentos (RELKIN & LAUNAY, 1990), visto que o calor tem efeitos complexos nas fracas ligações da proteína, principalmente nas ligações de hidrogênio. Quando ocorre um aumento gradual da temperatura, a conformação proteica em geral permanece intacta, até que em uma determinada temperatura ocorre a perda abrupta da estrutura e função da proteína. Este comportamento sugere que o desdobramento proteico é um processo cooperativo, ou seja, a perda da estrutura em uma parte da proteína desestabiliza as outras partes (NELSON & COX, 2002).

### 3.2.3. Dicroísmo Circular

Para a avaliação da conformação e estabilidade térmica de proteínas (desnaturação) podemos utilizar a espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD, *de circular dichroism*). Trata-se de uma técnica relativamente simples, que utiliza pequena quantidade de amostra e de fácil obtenção na coleta de dados. O CD refere-se à absorção diferencial da luz circularmente polarizada. Os espectros para proteínas são obtidos nos comprimentos de onda na região ultravioleta do espectro eletromagnético. Esses espectros fornecem informações sobre a estrutura secundária da proteína, estimando a fração da molécula que se apresenta como  $\alpha$ -hélice, conformação  $\beta$ , ou conformação randômica (CÔRREA & RAMOS; 2009).

O gráfico apresentado na Figura 5 representa o espectro para as estruturas de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha, e conformação randômica. Para as estruturas de  $\alpha$ -hélice observamos duas bandas negativas de similar magnitude em 222 nm e 208 nm e a banda positiva em aproximadamente 190nm. Para a conformação  $\beta$  é observada uma banda negativa entre 210 nm e 220 nm e uma banda positiva entre 200-195 nm. Para conformação randômica observa-se uma banda em 200 nm (CÔRREA & RAMOS; 2009).

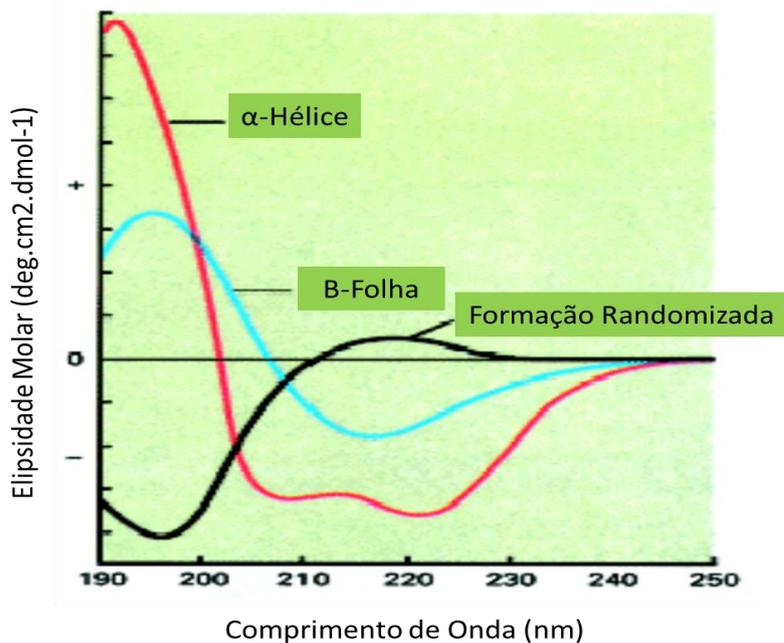


FIGURA 5 – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR PARA ESTRUTURA DE  $\alpha$ -HÉLICE,  $\beta$ -FOLHA E CONFORMAÇÃO RANDÔMICA.  
 FONTE: adaptado de NELSON (2011).

Nesse trabalho avaliaremos se houve ou não desnaturação das proteínas utilizando a técnica de Dicroísmo Circular.

### 3.2.4. Quantificação das proteínas

A quantificação de proteína pode ser determinada pelo método oficial utilizado em análises de alimentos, método de Kjeldahl (VERBRUGGEN, 1998). O método consiste em aquecer a amostra em ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado para que ocorra a eliminação do carbono e do hidrogênio da amostra devido a sua oxidação. Para a aceleração dessa reação utilizamos catalisadores como mercúrio, cobre, selênio e sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) aumentando o ponto de ebulição na digestão. O nitrogênio da amostra é reduzido e transformado em sulfato de amônia ( $(NH_4)_2SO_4$ ).

Logo após a primeira etapa (digestão), adiciona-se hidróxido de sódio (NaOH) concentrado e aquece-se novamente a solução para promover a liberação da amônia. Posteriormente é adicionado, ao conteúdo evaporado, um volume

conhecido de uma solução de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), formando borato de amônia ( $(NH_4)_3BO_3$ ). Em seguida é realizada uma titulação utilizando ácido clorídrico padrão (HCl) afim de quantificar o borato de amônia (CECCHI, 2003; ÖTLES, 2005).

Outro método para a quantificação de proteínas, porém pouco utilizado em análises de alimentos é um método colorimétrico, ou também conhecido como Método de Bradford. É um método no qual o conteúdo proteico é mensurado a partir da quantificação das ligações peptídicas das proteínas. Por meio da ligação da proteína com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (FIGURA 6). A interação entre a proteína de alta massa molar e o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente a luz na faixa de 595 nm, a qual é monitorado no espectrofotômetro. Embora este corante possa existir na forma catiônica, neutra ou aniônica, é somente na sua forma aniônica que este se complexa com as macromoléculas das proteínas (BRADFORD, 1976; COMPTON & JONES, 1985).

Esse método é de fácil reprodução e de rápido resultado, sendo que o processo de ligação da proteína com o corante é concluído em cerca de 2 minutos, com uma boa estabilidade de cor durante 1 hora (BRADFORD, 1976).

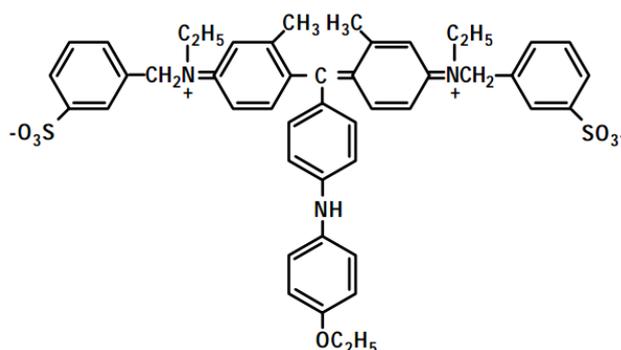


FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CORANTE COMASSIE AZUL BRILHANTE  
FONTE: Compton & Jones (1985).

Como vimos até o momento todas as proteínas possuem características particulares, as quais conferem a individualidade a cada uma delas. As proteínas do trigo (glúten), por exemplo, possuem propriedades específicas de grande importância para a indústria de alimentos. A seção seguinte aborda as principais

características e funcionalidades das proteínas que compõem o glúten da farinha de trigo.

### **3.3. Glúten do trigo**

O glúten é composto pelas principais proteínas do trigo, e estas são únicas por possuírem capacidade de formar uma massa viscoelástica responsável por aprisionar o gás (CO<sub>2</sub>) durante a fermentação. Para que haja a formação do glúten faz-se necessário adicionar à farinha, água e energia mecânica suficiente para a interação das proteínas do trigo. Possuem também propriedades funcionais específicas, que podem alterar as características do alimento durante seu preparo, processamento e armazenamento e não possuem atividade enzimática (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WONG, 1995).

A “rede de glúten” é formada devido a presença das proteínas gliadina e glutenina, que perfazem 80% do total das proteínas da farinha.

Ao promovermos a mistura da massa, as proteínas desdobram-se, expondo suas cadeias e facilitando as interações (WONG, 1995; FENNEMA, 2010). A albumina e a globulina não possuem tal capacidade e por isso não são consideradas formadoras da rede de glúten. A FIGURA 7 apresenta um esquema ilustrativo da estrutura do glúten (rede de glúten) a partir da gliadina e da glutenina.

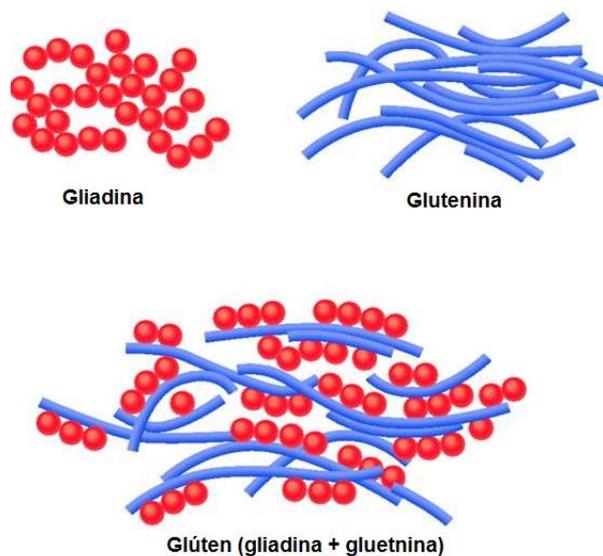


FIGURA 7 – ESTRUTURAS DO GLÚTEN, GLIADINA E GLUTENINA.  
FONTE: adaptado de FASANO (2011).

As interações que ocorrem entre proteínas do glúten, podem ser atribuídas a sua composição de aminoácidos, apresentada na Tabela 2 onde observamos que mais de 40% de seus resíduos é de Ácido Glutâmico (Glu), em sua maioria sob a forma de sua amida, a Glutamina (Gln) e de Prolina (Pro). A baixa solubilidade do glúten em água é atribuída a pequena quantidade de Lisina (Lys) no seu resíduo de aminoácidos. Os aminoácidos que compreendem as proteínas do glúten apresentam cerca de 30% de resíduos hidrofóbicos (FENNEMA, 2010; HOSENEY, 1991; WONG, 1989).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS DO GLÚTEN: GLUTENINA E GLIADINA.

Aminoácido	HOSENEY, 1991 e WONG, 1995.	
	Glutenina (mol/10 <sup>5</sup> g de proteínas)	Gliadina (mol/10 <sup>5</sup> g de proteínas)
Cisteína (Cys)	10	10
Metionina (Met)	12	12
Ác. Aspártico (Asp)	23	20
Treonina (Thr)	26	18
Serina (Ser)	50	38
Ác. Glutâmico (Glu)	278	317
Glx*	-	-
Prolina (Pro)	114	148
Glicina (Gly)	78	25
Alanina (Ala)	34	25
Valina (Val)	41	43
Isoleucina (Ile)	28	37
Leucina (Leu)	57	62
Tirosina (Tyr)	25	16
Fenilalanina (Phe)	27	38
Lisina (Lys)	13	5
Histidina (His)	13	15
Arginina (Arg)	20	15
Triptofano (Trp)	8	5

Onde: <sup>a</sup>Glx corresponde à mistura de Glu (ác. glutâmico) e Gln (glutamina). A maior parte da Glx das proteínas do trigo é encontrada sob a forma de Gln (glutamina).

As proteínas do glúten possuem um baixo nível de cargas, o que nos leva observar que as forças de repulsões internas são pequenas, porém as cadeias de proteínas podem interagir entre si mais facilmente, sendo este aspecto favorável na formação da massa (HOSENEY, 1991).

Os resíduos dos aminoácidos contribuem muito para sua capacidade em formar agregados proteicos por meio de interações hidrofóbicas, como por exemplo ligações com lipídeos e outras substâncias não polares (FENNEMA, 2010).

### 3.4. Gliadina e Glutenina

De todos os cereais apenas o trigo possui habilidade de formar “massa forte” e coesa, na qual suas moléculas estão unidas apresentando maior dificuldade para o seu rompimento. Esta característica é a responsável pela capacidade da massa de trigo de reter gás (CO<sub>2</sub>) durante a fermentação (HOSENEY, 1991). A propriedade de coesão do glúten confere às suas proteínas, a gliadina e glutenina, se unirem fortemente não havendo o rompimento da rede de glúten formada. Para uma adequada formação da rede de glúten deve-se haver um equilíbrio entre a viscosidade e elasticidade da massa, pois essas características dependem da proporção entre as proteínas gliadina e glutenina (KHATKAR *et al.*, 2012; BARAK *et al.*, 2012).

A elasticidade é a propriedade que a massa possui quando, aplicando sobre ela uma força, a qual a distende, e ao retirarmos essa força, a massa retorna a sua forma original. Quando aplicamos a mesma força na massa para distendê-la e ao retirarmos essa força, esta não retorna a sua forma original, essa propriedade é chamada de extensibilidade (MANDARINO, 1994).

As gliadinas, são proteínas solúveis em álcoois, conferem extensibilidade à massa e quando hidratadas tendem a se comportar como um líquido viscoso (KHATKAR *et al.*, 2012). A massa molar média das gliadinas é de 40.000Da, podendo variar entre 32.000 a 42.000Da e em alguns casos chegando a 47.000 Da (HOSENEY, 1991; WONG, 1995). Segundo WONG (1995) os resíduos de aminoácidos da gliadina são compostos principalmente por ácido glutâmico na forma de glutamina (38% a 56%) e prolina (15% a 30%). Ainda segundo WONG (1995), os resíduos de aminoácidos básicos lisina, arginina e histidina são encontrados em pequena quantidade na gliadina. As gliadinas apresentam estrutura secundária e a maioria das ligações encontradas são pontes dissulfeto intramoleculares (HOSENEY, 1991; WONG, 1995).

As gluteninas confere ao glúten alta elasticidade, porém baixa extensibilidade. Esta classe é composta por um grupo heterogêneo de proteínas (gluteninas de alta massa molar e gluteninas de baixa massa molar) que apresentam pontes dissulfeto intramoleculares e intermoleculares, com massas molares que variam entre 12.000 a

130.000 Da, chegando a milhões. De acordo com a sua massa molar podemos dividi-las em gluteninas de alta massa molar (HMW) com valores acima de 95.000Da e gluteninas de baixa massa molar (LMW) com valores abaixo de 95.000 Da. As gluteninas estão unidas entre si por pontes dissulfeto intermoleculares (HOSENEY, 1991; WONG, 1995; FENNEMA, 2010).

### **3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As análises térmicas reúnem o conjunto de técnicas capazes de avaliar o comportamento térmico dos sistemas em condições programadas de temperatura (MOTHÉ, 2002). Nesta seção abordaremos a técnica, de calorimetria exploratória diferencial (DSC), técnica muito útil no estudo do comportamento térmico de sistemas proteicos.

Alguns exemplos de eventos térmicos que são desencadeados pela variação da temperatura são a decomposição, a cristalização, a transição vítrea, mudanças de pesos, entre outros (MATOS, 2012).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é definida como uma análise na qual é medida a variação de entalpia de uma amostra e sua referência ao sofrer aquecimento ou resfriamento. A variação da entalpia é detectada pela variação da temperatura associada com as alterações físicas ou químicas que possam ocorrer na amostra, mudança de fase ou também reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, entre outras capazes de causar variações de temperatura entre a amostra e a referência (HATAKEYAMA & QUINN, 1994; TAN e CHE MAN, 2002).

O DSC permite determinações quantitativas, pois a área dos picos está relacionada com a energia envolvida no processo. Na FIGURA 8 é possível observar uma curva típica das análises de DSC (BERNAL *et al.*, 2002).

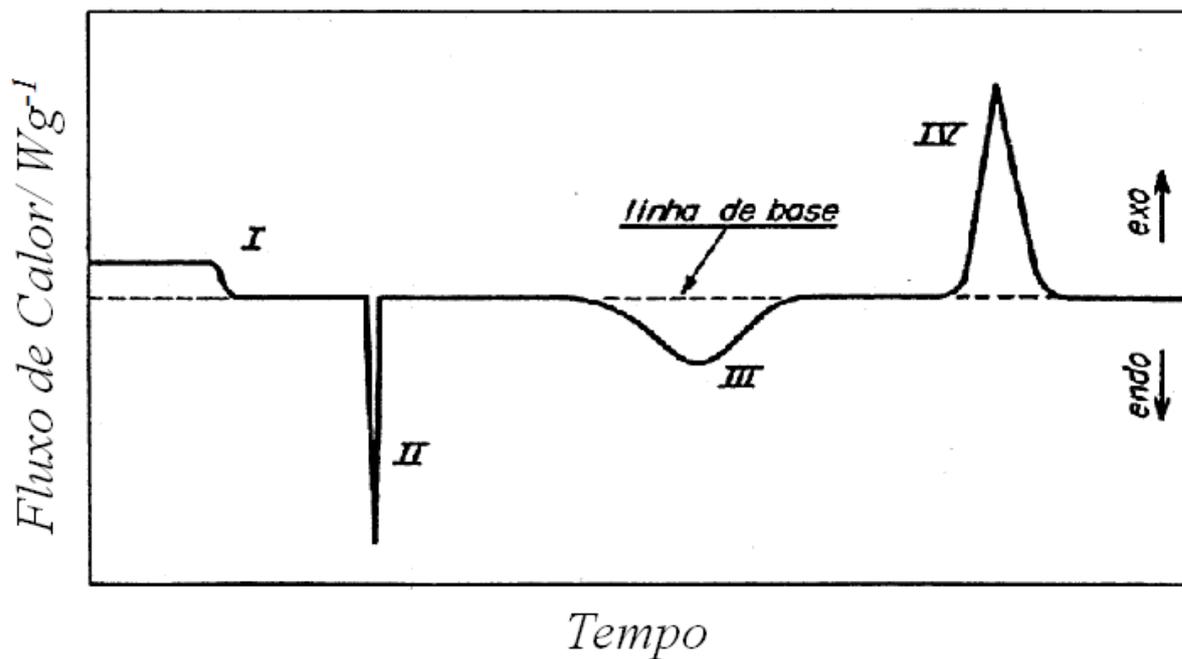


FIGURA 8 – CURVA TÍPICA DE DSC, I – MUDANÇA DA LINHA DE BASE SEM PICO; II E III – PICOS ENDOTÉRMICOS; IV – PICO EXOTÉRMICO.  
**FONTE: adaptado de Bernal (2002).**

Na análise dos dados apresentados graficamente no DSC, quando é observado algum evento térmico, este apresenta um desvio na linha de base. Os dados obtidos na análise do DSC podem ser: capacidade calorífica de materiais, variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e temperatura dos eventos térmicos (BROWN, 2004). As análises de DSC são utilizadas para o estudo da transição vítrea, envelhecimento de materiais termoplásticos, grau e qualidade da cristalização, fenômenos calorimétricos em alimentos assim como desnaturação proteica (MATOS, 2012; BILIADERIS, 1983).

### 3.5.1. Estudo das proteínas do glúten de trigo, glutenina, por Calorimetria Exploratória Diferencial.

As proteínas formadoras do glúten são muito estudadas com o intuito de auxiliar na melhor da qualidade dos produtos a base de farinha de trigo. Sabe-se que durante o processo de assamento do pão, para manter a estrutura da massa, é importante estudarmos a desnaturação das proteínas do trigo (WANG, *et al.*, 2014).

Durante o assamento da massa, as altas temperaturas desnaturam as proteínas do trigo, evitando a interação entre elas e também com outros compostos, melhorando a formação da rede de glúten (WONG; 1989).

Alguns estudos foram realizados para a avaliação das temperaturas de desnaturação das proteínas da farinha de trigo e seus compostos. Para a glutenina as temperaturas obtidas nos estudos foram dois picos de 64,3°C e 84,2°C. León, *et al.* (2003) estudaram os perfis térmicos das proteínas da farinha de trigo e dos demais componentes da farinha, observando que os eventos térmicos das proteínas do trigo são todas endotérmicos. Avaliaram também a influência do conteúdo de água nas amostras, observando que houve uma diminuição nas temperaturas onde ocorrem os eventos térmicos.

Estudos realizados por Rodrigues *et al.* (2005) em diferentes cultivares de trigo, verificaram a variação das temperaturas de desnaturação, das proteínas que formam o glúten, por análises de DSC, neste mesmo estudo as temperaturas de desnaturação para a glutenina foram de 53,1°C e 38,8°C para os diferentes cultivares.

Nos estudos de Wang *et al.* (2014) foi correlacionada as temperaturas de desnaturação das proteínas do trigo com o período de armazenamento dessas proteínas congeladas, sendo que não foram observadas grandes variações nas temperaturas dos eventos térmicos. Para as frações de gluteninas foram obtidos valores de temperaturas de 53,12°C e após o armazenamento a temperatura de desnaturação variou para 54,7°C.

Sendo assim serão avaliados os eventos térmicos de desnaturação das Frações Ricas em Glutenina extraídas pelos diferentes métodos utilizados nesse trabalho.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

*Neste trabalho foram utilizados quatro diferentes métodos de extração das frações ricas em glutenina da farinha de trigo. Neste capítulo são apresentadas as metodologias de extração, quantificação e identificação destas frações proteicas.*

### 4.1. Material

Para esse trabalho foi utilizada farinha de trigo cedida pela EMBRAPA, Cultivar BRS-PARRUDO. Amostras de aproximadamente 400g da farinha foram armazenadas à vácuo em temperatura ambiente local de aproximadamente 24°C. Os reagentes utilizados foram: água tipo 1 (Elga, Modelo Purelab Ultra, Inglaterra), água tipo 2 (Vexer, Modelo Smart N°161/12 VOS, Curitiba, Brasil), solução de Tris (GE Healthcare) HCl (5T Baker) pH 8, solução de KCl (Vetec), solução de EDTA (Sigma Aldrich), álcool 1-propanol (Sigma Aldrich e Synti), solução de SDS (dodecilsulfato de sódio) (GE Healthcare), solução de DTT (ditiotreitól) (Sigma Aldrich), Albumina de Soro Bovino (Invitrogen), Comassie Brillhante Blue G-250 (Sigma Aldrich), Etanol (5T Baker), Glicina (GE Healthcare),  $\beta$ -Mercapto (Sigma Aldrich).

### 4.2. Métodos de extração de proteínas

*Nesse trabalho foram utilizados 4 métodos de extração sendo assim identificados: Extração Padrão, Extração com adição de DTT, Extração por Decantação e Extração Direta.*

### 4.2.1. Extração Padrão

O primeiro procedimento de extração utilizado nesse trabalho foi desenvolvido a partir da metodologia descrita por León *et al.*, (2003). Este procedimento consistiu na extração das proteínas da farinha de trigo por meio da solubilização 20 g da farinha em 100 mL do solvente específico para cada proteína a ser extraída (TABELA 3). A solução de farinha com solvente foi agitada por 30 minutos em agitador magnético com rotação de aproximadamente 50 rpm e posteriormente centrifugada a 3493.g (5000 rpm) durante 10 min. Os sobrenadantes da centrifugação foram armazenados e os precipitados solubilizados novamente com o solvente específico da próxima etapa de extração. Após todas as etapas de extração o precipitado final (precipitado 4) foi descartado. A Figura 9 apresenta as etapas da Extração Padrão:

TABELA 3 – SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO PADRÃO PARA CADA UMA DAS PROTEÍNAS EXPECÍFICAS DA FARINHA DE TRIGO.

ETAPA DE EXTRAÇÃO	SOLVENTE (100mL)	PROTEÍNA EXTRAÍDA
1 <sup>a</sup>	Água osmolizada	Albumina
2 <sup>a</sup>	Solução de 50mM Tris HCl, pH 8 + 100mM KCl + 5mM EDTA	Globulina
3 <sup>a</sup>	Solução aquosa de 1-propanol 50% (v/v)	Gliadina
4 <sup>a</sup>	Solução aquosa de 1-propanol 50% (v/v) contendo 1% de SDS (v/v)	Glutenina

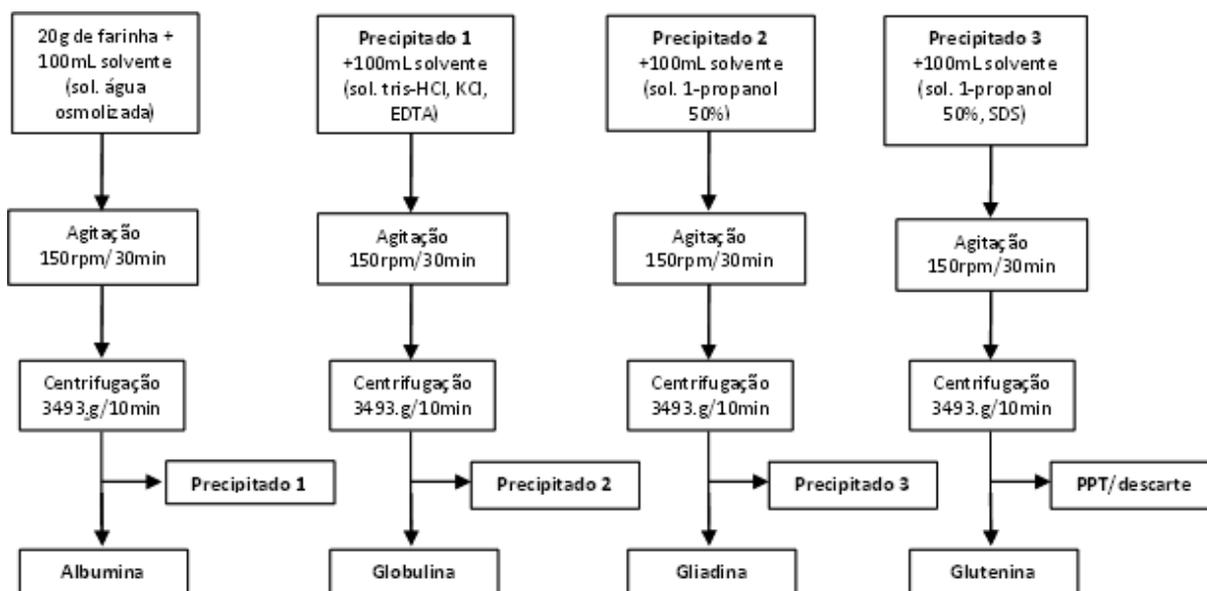


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO PADRÃO DAS PROTEÍNAS DO TRIGO

Após o procedimento de extração a fração rica em Glutenina foi congelada por 24h à aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo na sequência liofilizada e armazenada em dessecador.

#### 4.2.2. Extração com adição de DTT

A Extração com adição de DTT (ditiotreitól) seguiu a mesma metodologia descrita no item 4.2.1, porém em cada uma das soluções dos solventes foi adicionado 1 mM de DTT conforme a TABELA 4.

TABELA 4 – SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT PARA CADA UMA DAS PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DA FARINHA DE TRIGO.

ETAPA DE EXTRAÇÃO	SOLVENTE (100mL)	PROTEÍNA EXTRAÍDA
1 <sup>a</sup>	Água osmolizada + 1mM de DTT	Albumina
2 <sup>a</sup>	Solução de 50mM Tris HCl, pH 8 + 100mM KCl + 5mM EDTA + 1mM de DTT	Globulina
3 <sup>a</sup>	Solução aquosa de 1-propanol 50% (v/v) + 1mM de DTT	Gliadina
4 <sup>a</sup>	Solução aquosa de 1-propanol 50% (v/v) contendo 1% de SDS (v/v) + 1mM de DTT	Glutenina

O DTT é um agente redutor o qual impede as ligações dissulfeto que ocorrem entre proteínas, sendo neste trabalho utilizado a fim de evitar a formação da “rede de glúten” melhorando a extração das frações de proteínas em foco.

No trabalho de DUPONT *et al.* (2005) o DTT foi adicionado ao solvente que seria utilizado nas extrações das frações de glutenina da farinha. Já na metodologia de VERBRUGGEN *et al.* (1998) o DTT foi utilizado em todas as etapas de extração, da mesma forma que realizamos a extração com adição de DTT. Foi observado que a solubilização dos precipitados nos solventes de etapas posteriores foi facilitada devido à presença do agente redutor DTT.

Após cada extração, o precipitado foi ressuspenso com o solvente utilizado na etapa seguinte da extração, e o sobrenadante resultante foi armazenado (León *et al.*, 2003).

A Figura 10 apresenta as etapas da Extração com adição de DTT:

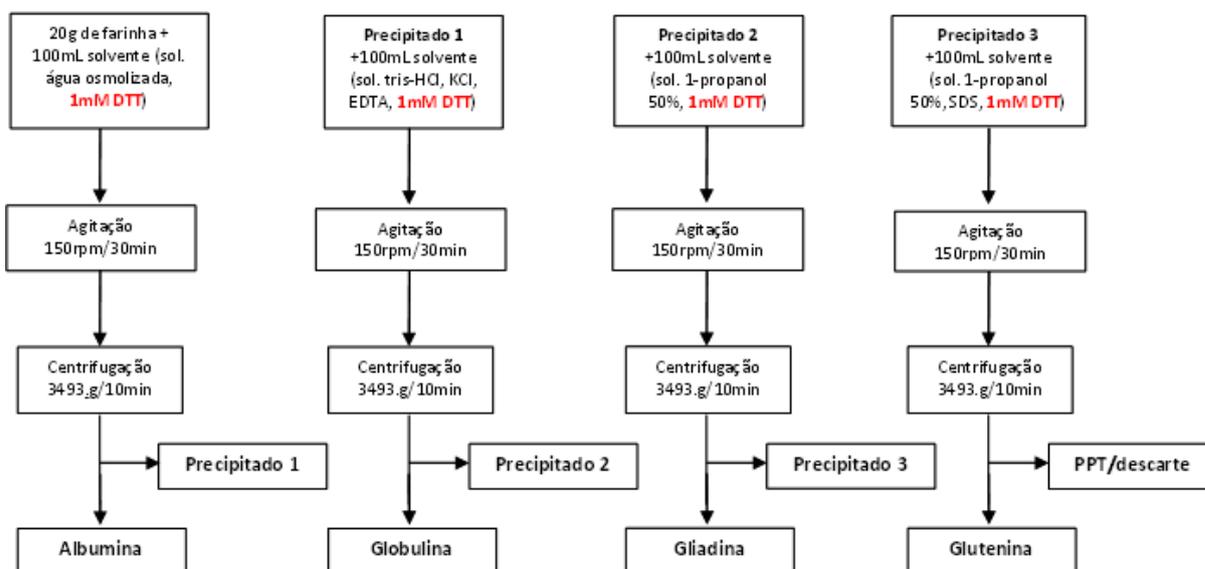


FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT NOS SOLVENTES DE CADA ETAPA DAS EXTRAÇÕES DAS PROTEÍNAS DO TRIGO.

#### 4.2.3. Extração por Decantação

A extração por decantação foi realizada utilizando os mesmos solventes propostos por León, et al. (2003) sendo que as duas primeiras etapas, extração das frações de albumina e das frações de globulina, foram realizadas por decantação. As etapas subsequentes para a extração das frações de gliadina e das frações ricas em gluteninas seguiram a metodologia já descrita.

Na extração da Albumina foram utilizados 40g de farinha de trigo e 600 mL de água destilada. A suspensão foi agitada lentamente com o auxílio de um bastão de vidro e posteriormente aguardou-se a decantação da fase sólida. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado no mesmo solvente (água destilada). Este procedimento foi realizado até o sobrenadante apresentar-se mais límpido. O objetivo foi evitar a formação da rede de glúten, evitando a complexação da glutenina e da gliadina, por meio de uma agitação mais branda. O aumento no volume de solvente foi necessário para compensar o efeito da baixa agitação na transferência de massa dos compostos hidrofílicos. Na segunda etapa para a extração da Globulina foi utilizado 600 mL da solução de 50mM de Tris HCl pH 8, 100mM de KCl e 5mM de EDTA, sendo então agitada lentamente com um bastão de

vidro e aguardado a decantação durante 1h. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado na terceira etapa do processo, para a extração da Gliadina, onde o mesmo foi solubilizado em 200 mL da solução de 1-propanol 50%. A solução foi agitada lentamente com bastão de vidro e centrifugada a 3493.g (5000rpm) por 10 min. O sobrenadante foi armazenado liofilizado e o precipitado utilizado na última etapa do processo.

Na extração da Glutenina foi solubilizado em 200 mL da solução de 1-propanol 50% e SDS 1%, a solução foi agitada em agitador mecânico 40 rpm por 5 min e centrifugado a 3493.g (5000 rpm) por 10 min. O sobrenadante foi armazenado liofilizado e o precipitado foi descartado. O fluxograma da Extração por Decantação é apresentado na Figura 11:

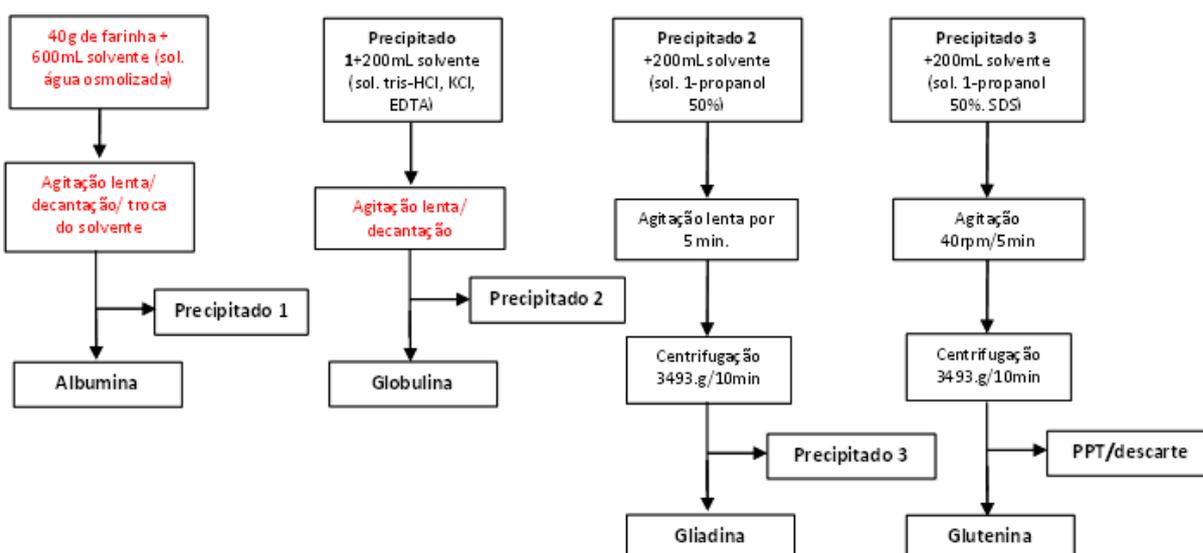


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO POR DECANTAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO TRIGO.

#### 4.2.4. Extração Direta

Na Extração Direta o objetivo foi extrair primeiro a glutenina a fim de avaliar se tal alteração na ordem de extração evitaria a formação da rede de glúten, permitindo assim a maior eficiência na separação da gliadina e da glutenina.

Portanto, neste método a primeira e única etapa do processo consistiu na solubilização de 20g de farinha de trigo em 100mL da solução de 1-propanol 50% e SDS 1%. A solução foi agitada a 50 rpm em agitador magnético por 30min, sendo em seguida centrifugada a 3493.g (5000 rpm) por 15min. O sobrenadante foi armazenado e o precipitado foi descartado. O fluxograma dessa extração é apresentado na Figura 12.

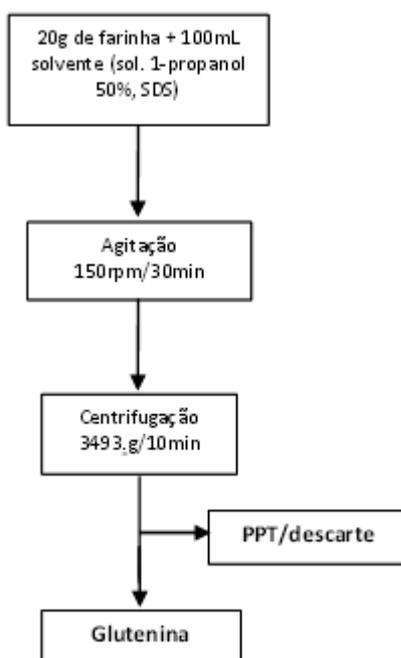


FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DIRETA DAS PROTEÍNAS DO TRIGO.

### 4.3. Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas nas amostras foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford, no qual ocorre a ligação do corante Comassie Brilliant Blue G-250 com as proteínas (BRADFORD, 1976), como descrito na seção 3.2.4.

Primeiramente a curva padrão foi plotada utilizando albumina de soro bovino (BSA), para que posteriormente as concentrações das proteínas fossem calculadas. Na Tabela 5 é apresentado o preparo da curva para a análise de Bradford.

TABELA 5 – PREPARO DA PLACA ELISA PARA A ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.

<b>µg de proteína</b>	<b>Água osmolizada (µL)</b>	<b>Solução de BSA (µL)</b>	<b>Reagente de Bradford (µL)</b>
branco	30	0	170
0,6	27	3	170
1	25	5	170
2	20	10	170
3	15	15	170
4	10	20	170
6	0	30	170

O sistema de reação continha 170µL da solução do Reagente de Bradford e 2µL da amostra, completando-se com água osmolizada o volume para 200µL. A mistura foi homogeneizada e a medida da absorbância realizada em espectrofotômetro ELX-800 da Biotek Instruments.

Após a realização da análise foi obtido o resultado da concentração das proteínas. Quando a concentração da amostra ficava abaixo da concentração mínima de proteína da curva, havia a necessidade de variar a alíquota da amostra, para que a sua concentração ficasse dentro dos limites de sensibilidade da curva (0,6µg a 6µg de proteína).

O reagente de Bradford, foi preparado utilizando 50mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, dissolvido em 50mL de etanol 85% e adicionado 100mL de ácido fosfórico 95% e 500mL de água tipo 1. A solução foi então homogeneizada em agitador magnético por 20min, sendo na sequência filtrada e completado o volume para 1L de solução final.

#### **4.4. Avaliação das massas molares das proteínas**

A fim de avaliar a distribuição de massa molar das frações ricas em gluteninas extraídas da farinha de trigo (glúten), foi empregada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) conforme protocolo descrito por LAEMMLI (1970). Hosney (1991), Verbruggen (1998), Dupont (2005), Lew (1992) e Xu (2007) também utilizaram a técnica de eletroforese para avaliar os processos de extração das proteínas do trigo.

O gel separador utilizado nas análises realizadas para as proteínas foi de 12% (m/v) de acrilamida e o gel de empilhamento foi de 4% (m/v) de acrilamida. As análises de eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo as orientações do fabricante (Bio-Rad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6.8, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol) e aquecidas à 80°C por 5 min, antes da aplicação. Este procedimento é realizado para que houvesse a desnaturação da amostra. O SDS confere carga negativa às moléculas proteicas, permitindo que as mesmas migrem no gel quando submetidas a uma diferença de potencial. A voltagem da corrida foi de 200 V com variação da amperagem. Na cuba foi utilizado o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as amostras das proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e em seguida descoradas em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

#### **4.5. Análise de Dicroísmo Circular**

Este trabalho teve como objetivo foi avaliar a temperatura de desnaturação das frações ricas em glutenina. Para tanto a técnica de Dicroísmo Circular (Circular Dichroism - CD) foi utilizada para avaliar o grau de desnaturação das frações extraídas da farinha de trigo durante o processo de extração.

O espectrômetro de dicroísmo circular (CD) modelo J-815 da Jasco International CO (Tóquio, Japão) empregado era equipado com uma unidade de controle de temperatura. A eletroforese SDS-PAGE das frações ricas em glutenina apresentaram boa separação das bandas somente para as amostras provenientes dos métodos de extração padrão e extração com adição de DTT. Por esta razão a análise de CD foi realizada somente para essas frações proteicas.

Para a obtenção dos espectros foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,01 cm e 1 cm de largura. Como gás de purga foi utilizado o nitrogênio, com fluxo de 10 mL min<sup>-1</sup>. As concentrações das amostras das frações ricas em glutenina utilizada nos experimentos foi de 0,73 mg/mL para as frações ricas em glutenina extraída pela extração padrão e de 2,35 mg/mL para as frações ricas em glutenina extraída pela extração com adição de DTT. Ambas as amostras foram dialisadas para a eliminação de possíveis impurezas carregadas durante os processos de extrações. As concentrações obtidas a partir das amostras dialisadas, da extração padrão e extração com adição de DTT, foram respectivamente 0,13 mg/mL e 1,45 mg/mL.

#### **4.6. Análise Térmica das proteínas por DSC**

Com a análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi avaliado as temperaturas de desnaturação das frações ricas em glutenina, extraídas pelos diferentes métodos apresentados.

Nessa análise foi empregada uma variação do método descrito por León *et al.* (2003). Foram realizados alguns testes preliminares para definirmos os parâmetros adequados para as frações ricas em glutenina extraídas da farinha. As análises foram realizadas no equipamento modelo DSC 8500 da Perkin Elmer (Shelton, Estados Unidos) apresentado na Figura 13.



FIGURA 13 – EQUIPAMENTO DE DSC DA PERKIN ELMER 8500.

O DSC foi calibrado com o elemento índio a fim de aferir as medidas de temperatura e fluxo de calor registradas pelo equipamento. Utilizou-se uma taxa de aquecimento de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  na faixa de temperatura entre  $20^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$ . Foram realizados testes preliminares, onde observamos que acima da temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$  a amostra iniciava a sua degradação, interferindo assim nos resultados finais observados nos gráficos. Foi empregada painelas de alumínio Padrão Perkin Elmer com menor espessura e não lacrada, para aumentar a sensibilidade de resposta à troca térmica. O fluxo do gás de purga foi mantido em  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  a fim de evitar a condensação de gases, que poderiam influenciar nos resultados obtido. Para a referência foi utilizada a painela de alumínio padrão, hermeticamente lacrada e vazia.

Na tabela 6 são apresentados os parâmetros utilizados na análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

TABELA 6 – PARÂMETROS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.

Equipamento	DSC 8500 Perkin Elmer
Temperatura Inicial	20°C
Temperatura final	80°C
Taxa de aquecimento	2°C/min
Acondicionamento da amostra	Panela de alumínio, padrão Perkin Elmer, aberta.
Panela da Referência	Vazia
Calibração	Índio
Fluxo de N <sub>2</sub> (gás de purga)	50mL/min

Nas metodologias de análise as amostras foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,0001. O software para o tratamento dos resultados foi o Pyris Manager, versão 2009 da Perkin Elmer.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*A glutenina, uma das proteínas formadoras da rede de glúten na farinha de trigo, possui frações de alta massa molar e frações de baixa massa molar, que neste trabalho foram extraídas, sendo denominadas de Frações Ricas em Glutenina. Foram utilizados quatro extrações, com base na metodologia de Leon et al. (2003).*

*Primeiramente serão apresentados e discutidos os resultados obtidos pelas quatro diferentes extrações das frações ricas em glutenina e em seguida serão avaliados os precipitados de cada etapa das extrações.*

*Serão apresentados e discutidos a quantificação das frações (Bradford), avaliação das massas molares (Eletroforese), análise de dicroísmo circular (CD) e as análises de DSC.*

### **5.1. Avaliação dos precipitados obtidos nas etapas das extrações**

Os métodos de extração consistem em solubilizar a farinha de trigo passando por quatro etapas, utilizando diferentes solventes para cada fração de proteína a ser extraída. Ao final de cada etapa, o sobrenadante foi armazenado e o precipitado foi solubilizado novamente de forma a permitir a extração das proteínas remanescentes no precipitado. Na etapa final de extração o precipitado foi descartado.

Uma das características que foram observadas nos precipitados foi a formação da rede de glúten, que se dá pelas ligações dissulfeto intra e intermoleculares entre as proteínas da farinha de trigo, gliadina e glutenina, na presença de água e agitação mecânica (MANDARINO, 1994; HOSENEY, 1991; KHATKAR, 2012). A formação da rede de glúten nos precipitados foi detectada a partir da observação que o precipitado formava uma massa coesa e viscoelástica de difícil solubilização em qualquer tipo de solvente.

Na extração padrão foi observada a formação da rede de glúten nos precipitados desde as primeiras etapas das extrações, sendo que para a extração das frações de gliadina e das frações de glutenina foi observada maior dificuldade na solubilização do precipitado. Houve a formação da rede de glúten, que se caracteriza em uma massa viscoelástica, a qual é formada pelas interações entre as proteínas do trigo a gliadina e glutenina, como já citado anteriormente. Na etapa de extração das frações de glutenina o precipitado final apresentou-se mais consistente e com aspecto sensorial semelhante a da farinha de trigo *in natura*.

Na avaliação dos precipitados da extração por decantação e da extração direta também foram observadas as mesmas características descritas anteriormente

na extração padrão. Durante as etapas de extração da albumina e globulina na extração por decantação, a formação da rede de glúten não foi observada devido a metodologia de extração por decantação utilizada. Já na etapa de extração das frações de gliadina após a centrifugação, a formação da rede de glúten foi observada no precipitado e a solubilização deste no solvente foi realizada com maior dificuldade. O último precipitado, após a extração das frações ricas em glutenina, se apresentou com consistência de massa viscoelástica e com aspecto sensorial semelhante a da farinha de trigo *in natura*.

A extração direta é caracterizada por uma única etapa para a obtenção das frações ricas em gluteninas. Ao final desta etapa a amostra é centrifugada sendo o precipitado descartado.

Devido a formação da rede de glúten (massa viscoelástica) em todos os precipitados, pudemos supor que as frações de glutenina estavam presentes nestes, assim como no precipitado final, o qual foi descartado.

Sabendo que para a formação da rede de glúten há a necessidade de água e agitação mecânica, podemos então dizer que durante as etapas das extrações padrão, por decantação e extração direta, as frações ricas em glutenina não foram extraídas em sua totalidade, permanecendo nos precipitados formados.

Na extração com adição de DTT, onde foi adicionado 1mM de DTT (ditiotreitól) nos solventes de cada etapa de extração, não foram observadas as mesmas características descritas nas extrações padrão e extração por decantação, para os precipitados. Esses se apresentaram com formação de massa não consistente e coesa, porém com maior viscosidade. Isso ocorre porque o DTT é um agente redutor que evita a formação de pontes dissulfeto intermoleculares e intramoleculares entre a gliadina e glutenina, sendo as pontes dissulfeto uma das principais responsáveis pela formação da rede de glúten. Devido a presença do DTT, que foi adicionado aos solventes em cada uma das etapas da extração, e a partir das análises realizadas neste trabalho observamos uma maior extração das frações ricas em glutenina na extração com adição de DTT.

## **5.2. Análises de Bradford, Eletroforese e Dicroísmo Circular das frações ricas em glutenina.**

### **5.2.1 Análises de Bradford e Eletroforese das frações ricas em gluteninas**

A quantificação de proteína das frações ricas em gluteninas das quatro extrações foi realizada utilizando o método colorimétrico de Bradford (1976). Por sua vez a avaliação das massas molares das frações ricas em gluteninas foi realizada por eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE.

As frações ricas em gluteninas que foram provenientes das quatro extrações já descritas no item 4.2. A extração padrão da fração de glutenina liofilizada foi resolubilizada em solução aquosa e a concentração determinada na análise colorimétrica pelo método de Bradford foi de 0,20 mg/mL de proteínas.

Para a extração com adição de DTT, a fração rica em glutenina foi rotaevaporada e pela análise de Bradford a concentração determinada foi de 0,30 mg/mL de proteínas. Na extração por decantação a fração de glutenina liofilizada foi resolubilizada em solução aquosa e obtemos 0,16 mg/mL em concentração da fração proteica, e por fim na extração direta da fração rica em glutenina, foi rotaevaporada e o resultado da concentração para essa fração proteica foi de 8,78 mg/mL.

A seguir, na Figura 14 é apresentado o gel de eletroforese o qual podemos identificar as frações ricas em glutenina definidas por sua massa molar, as frações de alta massa molar e as frações de baixa massa molar, características desta proteína.

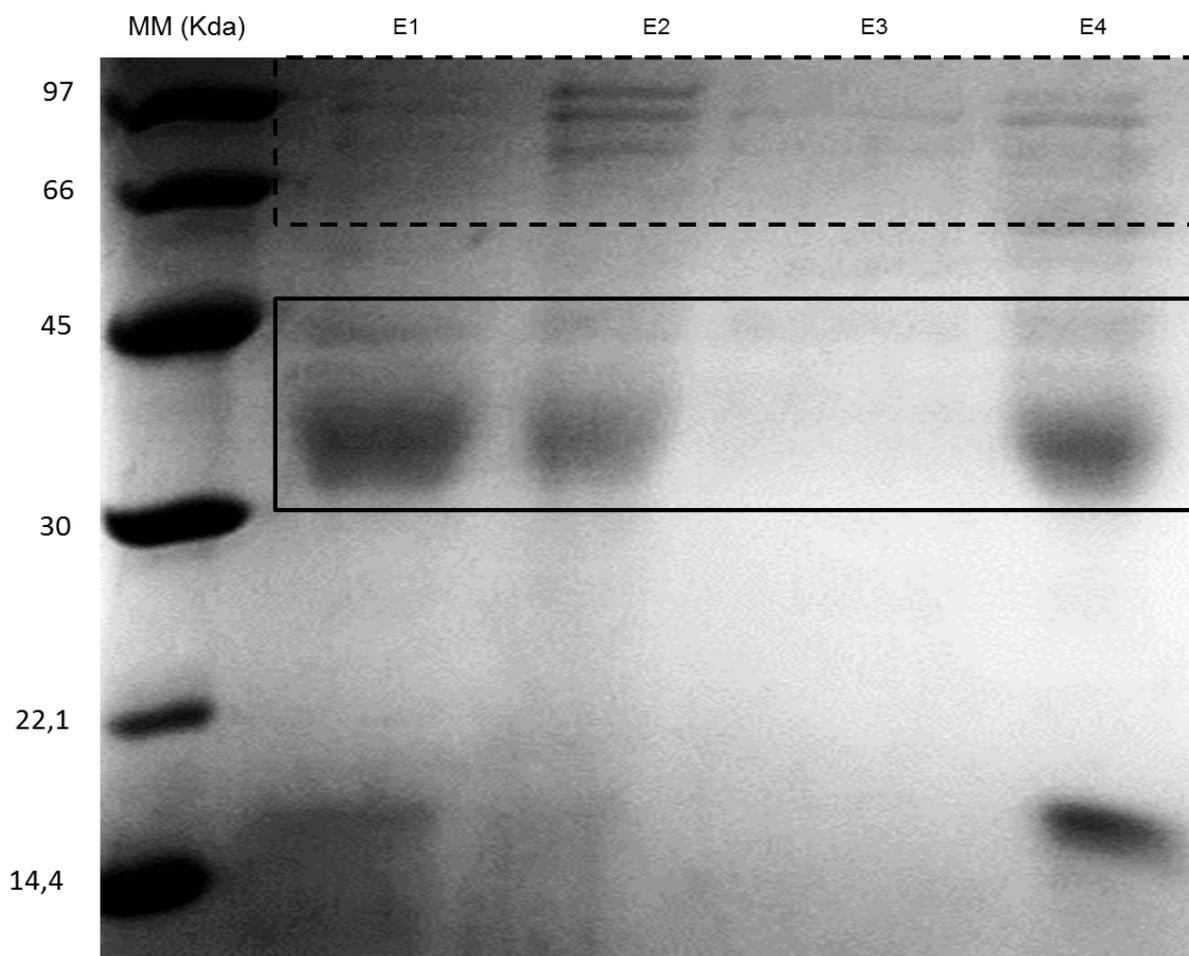


FIGURA 14 - SDS-PAGE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12% CORADO COM COMASSIE BLUE DAS FRAÇÕES DA EXTRAÇÃO A FARINHA DE TRIGO. A COLUNA MM APRESENTA O MARCADOR DE MASSA MOLAR LOW MOLECULAR WEIGHT (GE LIFESCIENTIES) COM AS RESPECTIVAS MASSAS EM KDA. CINCO MICROGRAMAS DE PROTEÍNA TOTAL DE CADA FRAÇÃO FORAM APLICADOS NO GEL. AS AMOSTRAS DA COLUNA 1 – E1 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINAS DA EXTRAÇÃO PADRÃO, NA COLUNA 2 – E2 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINAS DA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, NA COLUNA 3 – E3 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINA DA EXTRAÇÃO POR DECANTAÇÃO, NA COLUNA 4 – E4 – FRAÇÃO RICA EM GLUTENINAS DA EXTRAÇÃO DIRETA. O QUADRADO TRACEJADO DESTACA AS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA DE ALTA MASSA MOLAR E O QUADRADO CONTÍNUO DESTACA AS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINAS DE BAIXA MASSA MOLAR.

A quantificação de proteínas da fração rica em glutenina pela extração direta mostrou que a metodologia utilizada nessa extração foi a que resultou na maior concentração proteica (8,78mg/mL) comparando com a extração com adição de DTT. De fato, o protocolo para a extração direta foi o que utilizou menor volume de solvente, devido ao número menor de etapas de extração, diminuindo a dispersão das frações proteicas ao longo do processo de extração.

Verbruggen e colaboradores (1998) e Larré e colaboradores (1997) mostraram que as gluteninas são divididas em dois grupos distintos de proteínas

que podem ser visualizados em gel de eletroforese. O primeiro grupo apresenta-se massa molar entre 90 e 140 KDa (gluteninas de alta massa molar) e o segundo grupo entre 30 e 50 KDa (gluteninas de baixa massa molar). A massa molar aparente das bandas encontradas no gel mostrado na Figura 14 foi estimada utilizando a migração do marcador de massa molar como padrão e foram de  $86,7 \pm 2,9$  KDa para as frações de glutenina de alta massa molar e para as frações de gluteninas de baixa massa molar os valores ficaram entre  $48,25 \pm 0,49$  KDa e  $39,1 \pm 0,45$  KDa. Dessa forma, baseando-se nas informações descritas por Verbruggen e colaboradores (1998) e Larré e colaboradores (1997), foi possível delimitar as regiões do gel que contêm as bandas correspondentes aos dois grupos de gluteninas. Na Figura 14 as frações de gluteninas de baixa massa molar estão marcadas pelo retângulo contínuo e as frações de alta massa molar estão marcadas pelo retângulo tracejado.

É possível observarmos no gel de eletroforese dessa fração (Figura 14) que as extrações realizadas neste trabalho, além da fração rica em glutenina extraiu também as proteínas com massa molar menor que 30KDa, as quais podem corresponder a fração de gliadinas, globulinas ou albuminas.

A Extração por Decantação foi a que apresentou a menor quantificação de proteínas pelo Método de Bradford, com 0,16mg/mL, comparando com a Extração Padrão realizada. Como consequência da baixa concentração, o volume máximo possível de proteína que pôde ser aplicada no gel não foi suficiente, ocasionando o aparecimento de bandas mais fracas, quando essa coluna é comparada com as outras colunas do gel. No entanto, aparentemente as bandas presentes na fração rica em glutenina dessa extração são as mesmas presentes na Extração Padrão e Extração com adição de DTT.

Além das bandas que parecem corresponder às gluteninas de alta e baixa massa molar, foram visualizadas bandas correspondentes a proteínas menores, com massas molares entre 21 e 14 KDa. Essas bandas provavelmente correspondem a proteínas contaminantes não formadoras do glúten, que não fazem parte da família das gluteninas.

### 5.2.2 Dicroísmo Circular (CD) das frações ricas em glutenina.

O dicroísmo circular (Circular Dichroism, CD), técnica espectroscópica, foi utilizado com o objetivo de fornecer informações referentes à conformação das proteínas presentes na fração rica em glutenina na extração padrão e na extração com adição de DTT.

A análise de CD foi realizada para a extração padrão, por ser a extração utilizada como base de todas as outras extrações realizadas. A análise realizada para a extração com adição de DTT foi utilizada, pois nessa extração o agente redutor DTT, como já foi dito, atua nas ligações dissulfeto podendo assim vir a desnaturar as proteínas de interesse.

Os espectros obtidos após a varredura (190 – 250 nm) das amostras das frações ricas em glutenina são apresentados na Figura 15. A análise das curvas permite concluir que durante os processos de extração das frações ricas em glutenina, os solventes e tratamentos utilizados não foram drásticos o suficiente a ponto de causar a desnaturação das proteínas.

De acordo com Côrrea & Ramos (2009), o espectro obtido neste experimento (Figura 16) apresenta características de proteínas em conformação  $\beta$ -folha e  $\alpha$ -hélice. A conformação  $\alpha$ -hélice é identificada a partir das bandas negativas obtidas na faixa entre 210 e 220 nm e uma banda positiva na faixa em 195 nm. A estrutura  $\beta$ -folha é confirmada pela presença de uma banda negativa em 208 nm e outra banda positiva na faixa de 190 nm.

Pela avaliação do espectro podemos admitir que a amostra possui frações de proteínas tanto na conformação de  $\beta$ -folha quanto de  $\alpha$ -hélice, não havendo apresentação de conformação desnaturada. Dessa forma pode-se concluir que o processo de extração foi eficiente para as proteínas em estudo, não causando a desnaturação da fração rica em glutenina.

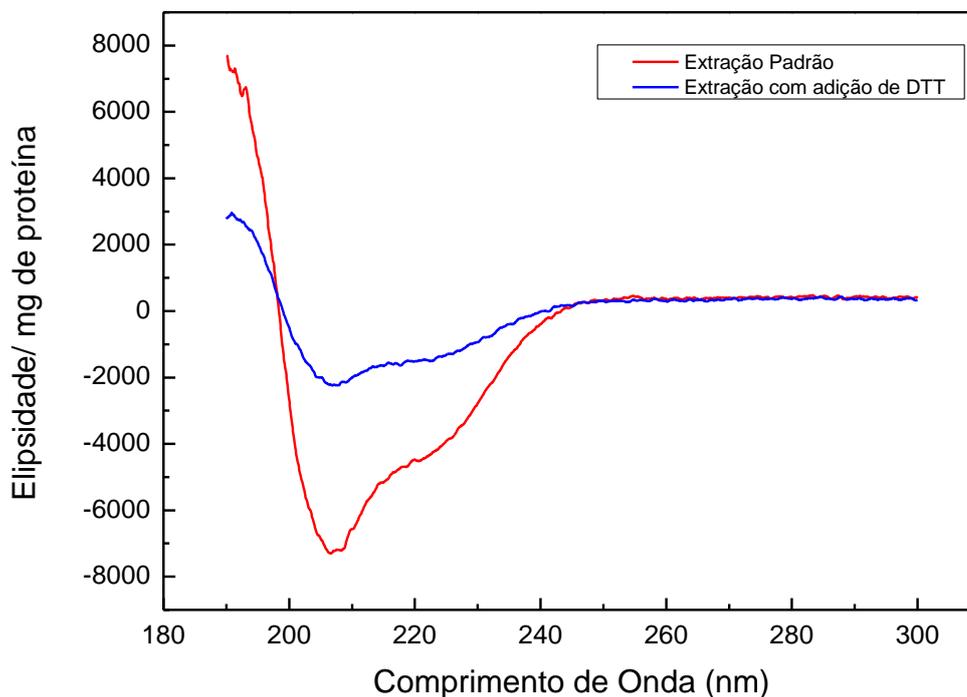


FIGURA 15 – ESPECTRO DA ANÁLISE DE DICROÍSMO CIRCULAR DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA EXTRAÍDAS PELA EXTRAÇÃO PADRÃO, COM CONCENTRAÇÃO 0,002 mg/mL, ESTÁ APRESENTADA EM VERMELHO, E PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, COM CONCENTRAÇÃO DE 0,003 mg/mL, ESTÁ EM AZUL. TODAS AS AMOSTRAS ESTAVAM EM TEMPERATURA DE 20°C. A ELIPSIDADE MOLAR/ MG DE PROTEÍNA SÃO DADOS EM  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{(mg de proteína)}^{-1}$  E O COMPRIMENTO DE ONDA EM nm.

### 5.3. Análise Calorimétrica por DSC das frações rica em glutenina

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi empregada na caracterização das frações ricas em glutenina obtidas em cada uma das extrações, avaliando a temperatura de desnaturação da glutenina.

Na sequência serão apresentadas as análise de DSC para as amostras extraídas pelas quatro diferentes extrações utilizando panela Padrão Perkin Elmer não lacrada, temperatura da análise foi até 80°C, e os demais parâmetros foram descritos no item 4.6.

### 5.3.1 Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) das frações ricas em glutenina

Na Figura 16 são apresentadas as curvas de DSC das frações ricas em glutenina extraídas pela extração padrão. É possível observar que a temperatura de desnaturação da triplicata variou entre 63,72°C e 65,15°C, caracterizada em todas as análises por eventos endotérmicos.

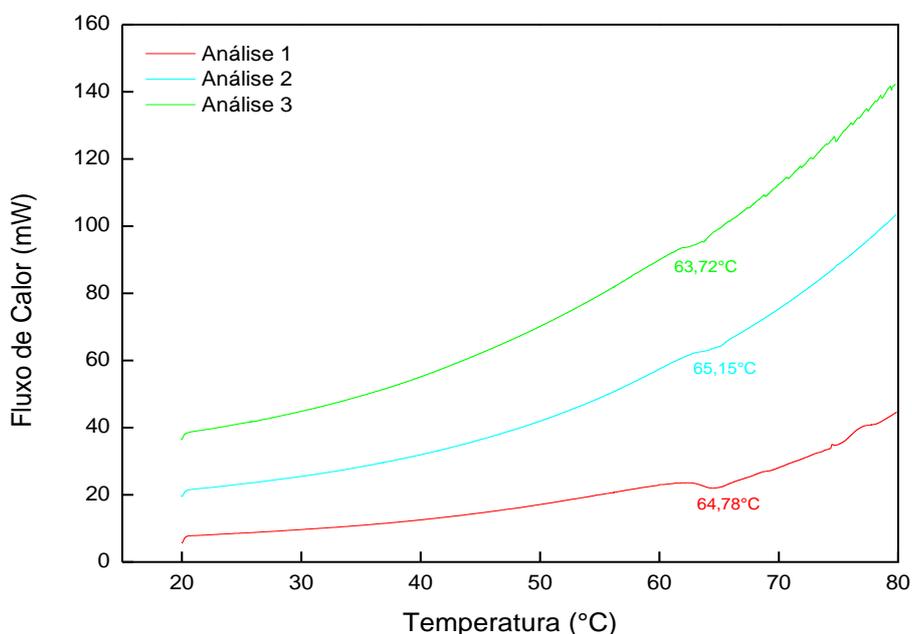


FIGURA 16 – CURVA DE DSC DA FRAÇÃO RICA EM GLUTENINA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO PADRÃO, COM TEMPERATURA ENTRE 20°C E 80°C, PANELA PADRÃO PERKIN ELMER, COM TAXA DE AQUECIMENTO DE 2°C/min E VAZÃO DO GÁS DE PURGA (N<sub>2</sub>) DE 50mL/min. AS TEMPERATURAS DE DESNATURAÇÃO DA AMOSTRA DE CADA UMA DAS REPETIÇÕES. ANÁLISE 1: 64,78°C; ANÁLISE 2: 65,15°C E ANÁLISE 3: 63,72°C.

Estes resultados foram condizentes com os estudos realizados por León *et al.* (2003), Rodrigues *et al.* (2005) e Wang *et al.* (2014), onde os picos de desnaturação encontrados para gluteninas foram eventos endotérmicos. León *et al.* (2003), que estudaram as proteínas extraídas da farinha de trigo por DSC, mostrou dois eventos para a glutenina o primeiro em 64,3°C e o segundo em 84,2°C.

Rodrigues *et al.* (2005) em estudos realizados com dois diferentes cultivares de trigo, “Amazonas” e “Sorraia”, pela análise de DSC obteve eventos térmico de desnaturação para a glutenina de  $53,1\pm 1,1^{\circ}\text{C}$  e  $38,8\pm 1,3^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Essas variações de temperatura dos eventos térmicos foram atribuídas aos diferentes cultivares avaliados. Avaliando o efeito do congelamento e armazenamento nas propriedades do glúten, Wang *et al.* (2014) obteve temperatura de desnaturação da glutenina entre  $53,12\pm 0,32^{\circ}\text{C}$  e  $54,70\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Para essas variações de temperaturas podemos dizer que se dá devido aos diferentes cultivares e outros fatores como armazenamento.

A Figura 17 mostra a análise de DSC do produto obtido pela extração com adição de DTT.

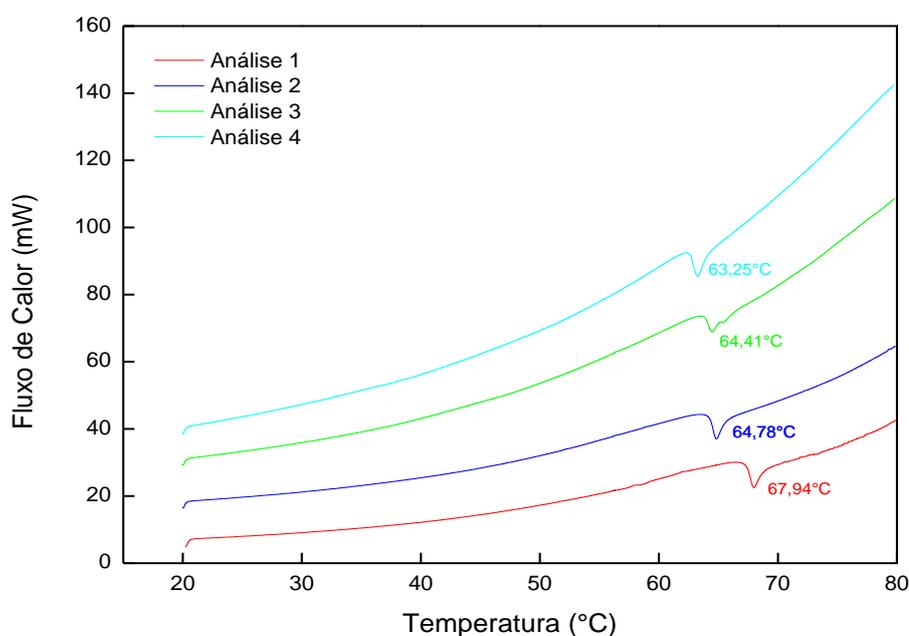


FIGURA 17 – CURVA DE DSC REALIZADO COM A AMOSTRA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT. SÃO MOSTRADAS AS TEMPERATURAS DE DESNATURAÇÃO DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA DE CADA UMA DAS REPETIÇÕES. ANÁLISE 1:  $67,94^{\circ}\text{C}$ ; ANÁLISE 2:  $64,78^{\circ}\text{C}$ ; ANÁLISE 3:  $64,41^{\circ}\text{C}$ ; ANÁLISE 4:  $63,25^{\circ}\text{C}$ .

Podemos observar na Figura 17 que a formação e a amplitude dos picos foram semelhantes. Foi observada uma pequena variação da temperatura dos eventos térmicos, tendo como média  $65,15^{\circ}\text{C} \pm 1,74$ . A média da variação de entalpia observada nestes experimentos foi de  $12,68 \pm 0,44$  J/g.

Na Figura 18 são apresentadas as curvas de DSC realizadas com as frações ricas em glutenina obtidas pela extração por decantação.

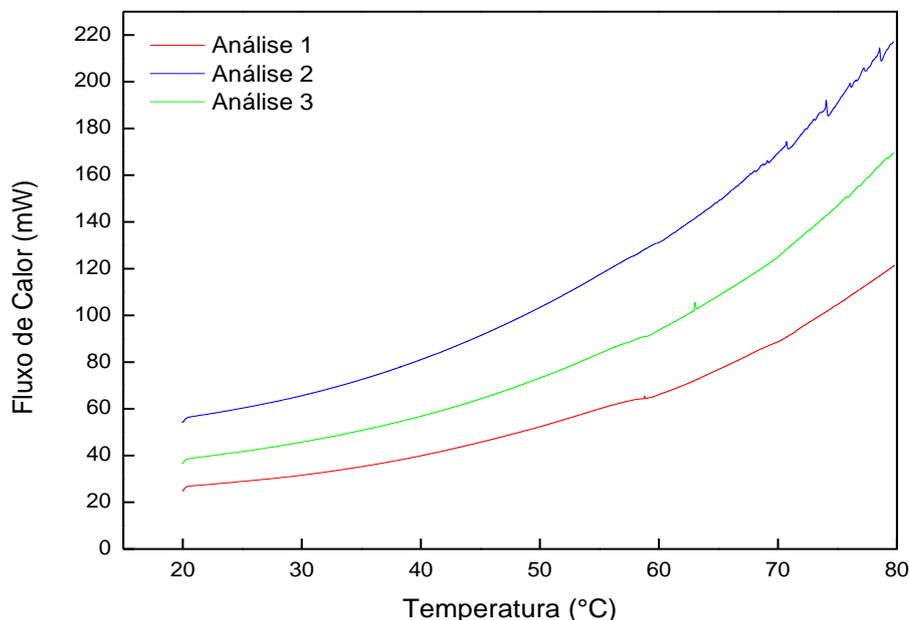


FIGURA 18 – CURVA DE DSC DAS ANÁLISES REALIZADAS COM A AMOSTRA DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO POR DECANTAÇÃO.

Não foi possível observar nenhum evento térmico nessas. Isso pode ter ocorrido devido à baixa concentração da fração rica em glutenina extraída pelo método de extração por decantação, que foi de 0,16mg/mL, para a qual também não foi observada nenhuma banda no gel de eletroforese SDS-PAGE que evidenciasse a presença da glutenina.

Na Figura 19 são apresentadas as curvas de DSC da amostra obtida pela extração direta. Embora neste caso tenha-se realizado somente duas análises, é possível observar comportamento semelhante aos encontrados nas outras frações. Na análise 1 obtivemos um pico exotérmico em aproximadamente 58,7°C, possivelmente por alguma contaminação durante o processo de extração, e um segundo pico endotérmico em 67,74°C. Na análise 2 foi observado apenas um pico endotérmico em 66,74°C. E a média da variação de entalpia observada nestes experimentos foi cerca de  $\Delta H = 10,8 \pm 3,11$  J/g. Os valores de temperatura e variação de entalpia são apresentados na TABELA 7.

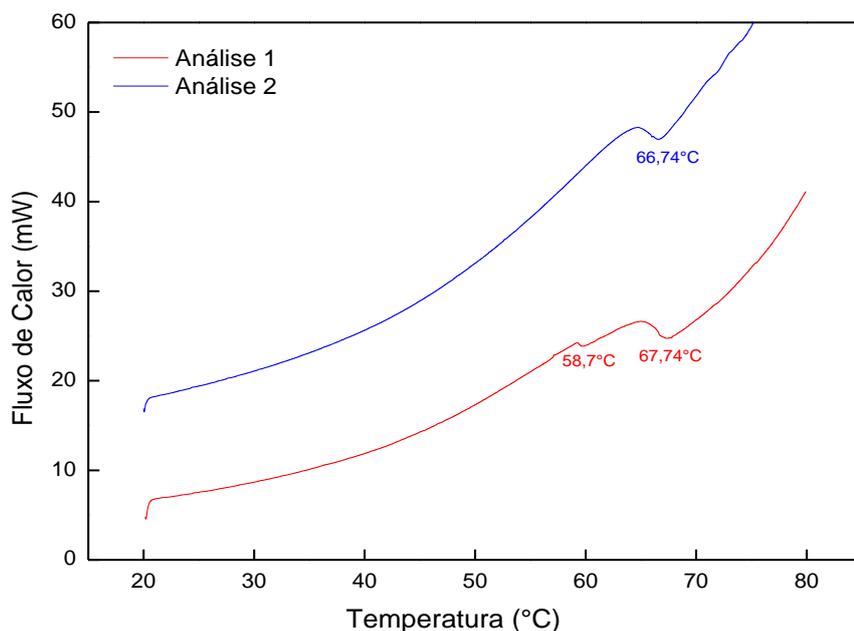


FIGURA 19 – CURVA DE DSC DAS ANÁLISES REALIZADAS COM A AMOSTRA DAS FRAÇÕES RICAS EM GLUTENINA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO DIRETA. ONDE AS TEMPERATURAS APRESENTADAS NA FIGURA SÃO OS EVENTOS TÉRMICOS DA AMOSTRA. ANÁLISE 1: 67,74°C; ANÁLISE 2: 66,74°C.

Nota-se na análise das curvas de DSC que comportamento térmico das frações obtidas não foi afetado de forma significativa pelo método de extração.

TABELA 7 – DADOS OBTIDOS PELO DSC PARA AS AMOSTRAS DA EXTRAÇÃO DIRETA, TEMPERATURA DE DENATURAÇÃO,  $\Delta H$ , MÉDIAS E DESVIO PADRÃO.

<b>EXTRAÇÃO DIRETA</b>		
	Temperatura de Denaturação (°C)	$\Delta H$ (J/g)
	67,74	-13,91
	66,70	-7,68
<b>Média</b>	<b>67,22</b>	<b>-10,80</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,52</b>	<b>3,11</b>

### **5.3.2 Avaliação do processo de dialise nas frações ricas em glutenina pela análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Os resultados das análises de DSC de todas as extrações realizadas foram comparados, onde pode-se verificar que a extração com adição de DTT apresentou características mais semelhantes para todas as amostras analisadas (análise 1, análise 2, análise 3 e análise 4), tanto para a variação de temperatura, quanto para a característica de formação e amplitude dos picos. Isso foi atribuído a melhor extração das frações ricas em glutenina da farinha de trigo ao ser adicionado o agente redutor (DTT) nos solventes de cada uma das etapas de extração. Com isso as interações entre as frações de gliadina e as frações de glutenina foram evitadas, melhorando os resultados das análises.

O  $\Delta H$  calculado foi de  $12,68 \pm 0,44$  J/g, comparando com as demais extrações, obtiveram os menores valores de desvio padrão entre as amostras.

Sendo assim as frações ricas em gluteninas que foram obtidas a partir da extração com adição de DTT passaram por um processo de diálise, para verificar o comportamento térmico, como apresentado na Figura 20.

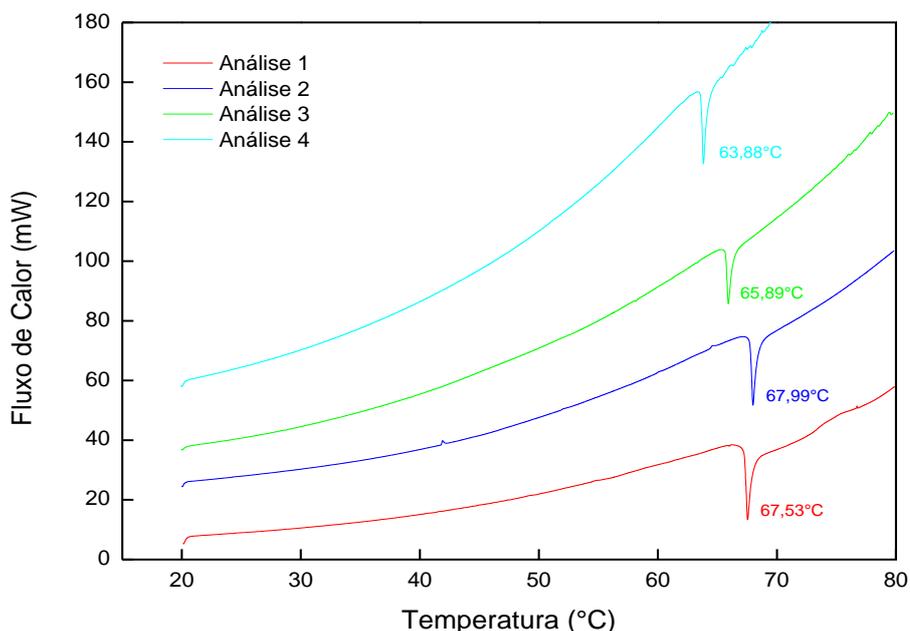


FIGURA 20 – CURVA DE DSC DAS ANÁLISES REALIZADAS COM A AMOSTRA DA FRAÇÃO RICA EM GLUTENINA, APÓS O PROCESSO DE DIÁLISE, OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, ONDE AS TEMPERATURAS APRESENTADAS NA FIGURA SÃO OS EVENTOS TÉRMICOS DA AMOSTRA. ANÁLISE 1: 67,53°C; ANÁLISE 2: 67,99°C, ANÁLISE 3: 65,89°C, ANÁLISE 4: 63,88°C.

Comparando a amostra da fração rica em glutenina extraída pelo método de Extração com adição de DTT, antes e após ser realizado o processo de diálise, verifica-se que os picos apresentaram-se mais alongados e com menor amplitude (Figura 20). Os valores médios de  $\Delta H$  foram de  $12,68 \pm 0,44$  J/g para a amostra antes da dialise e  $\Delta H$  de  $17,82 \pm 1,04$  J/g. Observa-se ainda um menor desvio nas amostras submetidas à diálise.

Segundo Mothé e Azevedo (2002) isso ocorre devido ao fato de que quanto mais pura e homogênea as amostras se apresentarem, mais definidos serão os picos e menor será sua amplitude.

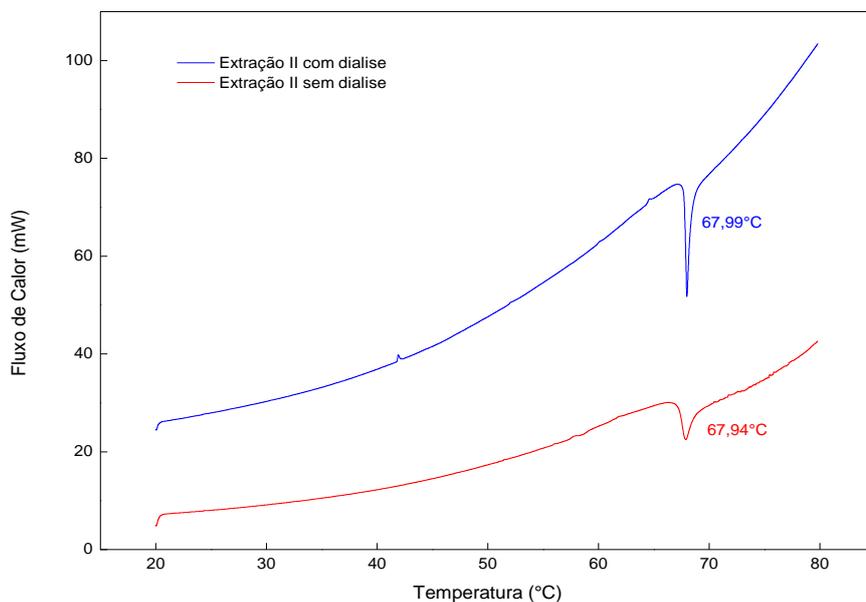


FIGURA 21 – CURVAS DE DSC REALIZADO COM AS AMOSTRAS OBTIDAS PELA EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT, ANTES E APÓS O PROCESSO DE DIÁLISE. A EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT ANTES DO PROCESSO DE DIALISE TEVE COMO TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO 67,94°C E  $\Delta H$  DE 12,68 $\pm$ 0,44 J/G E A EXTRAÇÃO COM ADIÇÃO DE DTT APÓS O PROCESSO DE DIALISE TEVE COMO TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO 67,99°C E  $\Delta H$  DE 17,82 $\pm$ 1,04 J/G.

## 6. CONCLUSÃO

A farinha de trigo é uma matéria-prima de grande consumo no Brasil e de grande relevância para a indústria de panificação, entre outras. As características sensoriais dos produtos esta intimamente relacionada com as propriedades da farinha de trigo utilizada. Especificamente, as proteínas que compõem o glúten, gliadina e glutenina, são responsáveis pelas aspectos texturais das massas obtidas, como elasticidade e coesão. Conhecer as propriedades físico-químicas destas proteínas é portanto relevante para o desenvolvimento de produtos e processos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades da glutenina extraída da farinha de trigo do cultivar BRS-Parrudo da Embrapa. Foram empregados quatro métodos de extração da glutenina assim denominados: extração padrão, extração com adição de DTT (ditiotreitól), extração por decantação e a extração direta. As frações ricas em glutenina obtidas foram avaliada quanto ao teor de proteínas (método de Bradford), massa molar (eletroforese SDS-PAGE), grau de desnaturação (dicroísmo circular) e temperatura de desnaturação (DSC).

Por meio da análise de Bradford verificou-se que a amostra extraída pela extração por decantação a concentração de proteínas foi de 0,16 mg/mL. Na análise de eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE, foi observada para essa mesma amostra bandas imperceptíveis no gel devido à baixa concentração das proteínas, dificultando a confirmação das frações ricas em glutenina. Ainda na análise de eletroforese SDS-PAGE, na amostra extraída pela extração direta foram observadas, além das bandas características das frações ricas em glutenina, bandas com massa molar próximas de 30 KDa, indicando a presença de outras proteínas. Segundo esta mesma análise, as extrações com melhores resultados foram a extração padrão e a extração com adição de DTT, apresentando as bandas características das frações ricas em glutenina, ou seja, bandas de alta massa molar de  $86,7 \pm 2,9$ KDa e as bandas de baixa massa molar de  $48,3 \pm 0,5$ KDa e  $39,1 \pm 0,45$ KDa.

Sendo assim, as frações ricas em glutenina extraídas pela extração padrão e pela extração com adição de DTT, foram avaliadas por dicroísmo circular a fim de avaliar o grau de desnaturação das proteínas extraídas. Pela a análise de CD

verificou-se que os processos extração não foram drásticos o suficiente para promover a desnaturação das frações ricas em glutenina.

Com a análise de dicroísmo circular confirmando que as frações proteicas encontravam-se de forma não desnaturada, foram realizadas análises de DSC para avaliar o perfil térmico das frações ricas em glutenina.

Avaliando as extrações que foram realizadas por DSC as temperaturas de desnaturação para a extração padrão e extração direta foram de  $64,29 \pm 0,62^{\circ}\text{C}$  e  $67,22 \pm 0,52^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, e a variação de entalpia de  $-3,95 \pm 1,02 \text{ J/g}$  e  $-10,80 \pm 3,11 \text{ J/g}$ , respectivamente. Observou-se que a extração com adição de DTT apresentou melhores resultados quanto a definição dos picos. Suas temperaturas de desnaturação foram em média de  $65,15 \pm 1,74^{\circ}\text{C}$ , e os valores de variação de entalpia foram em média de  $12,68 \pm 0,44 \text{ J/g}$ . Com o intuito de avaliar a variação de temperatura de desnaturação das frações ricas em gluteninas após o processo de dialise, processo este responsável por eliminar os diversos interferentes que poderiam estar presentes na amostra, foram realizadas análises de DSC das amostras dialisadas provenientes da extração com adição de DTT. As curvas de DSC realizadas não apresentaram grandes variações, permanecendo com temperatura do evento térmico em torno de  $66,32 \pm 1,63^{\circ}\text{C}$  e valores de  $\Delta H$  de  $17,82 \pm 1,04 \text{ mJ}$ . Entretanto, foi possível observar uma melhor definição dos picos, o que confirmou a eliminação de possíveis contaminantes. Independente do método de extração utilizado observamos que as temperaturas de desnaturação obtidas tiveram pouca variação entre si e o perfil térmico das amostras analisadas não alterou significativamente.

Portanto após as análises realizadas neste trabalho, foi possível concluir que as frações ricas em glutenina, extraídas pela extração com adição de DTT, apresentaram melhores resultados. Quanto a avaliação por calorimetria exploratória diferencial (DSC) a temperatura de desnaturação dessa fração proteica, para o cultivar BRS-Parrudo da Embrapa, foi de aproximadamente  $65^{\circ}\text{C}$ . Isto demonstra que a farinha obtida a partir desta espécie apresenta uma maior resistência térmica, quando comparado com estudos encontrados na literatura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIO, C. B. **Estudo termodinâmico de associação de surfactantes zwitteriônicos e sua interação com polímeros através de titulação calorimétrica.** Campinas, 127 p. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2011.

ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The influence of processing parameters on food protein functionality: I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. **Canada Institute of Food Science Technology Journal**, v. 14, n. 4, p. 289-294, 1981.

BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **Food Science and Technology**, 2012; p. 1 -7.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de Análises Calorimétricas Diferenciais – DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BILIADERIS, C. G. Differential Scanning Calorimetry in Food Research - A Review. **Food Chemistry**, v.10, p. 239-265, 1983.

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, p. 248 – 254, 1976

BROWN, M. E. **Handbook of thermal analysis and calorimetry**; Editora Elsevier Science, Amsterdam, 1998.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** Editora da Unicamp, 2ª Edição, Rev. Campinas, SP, 2003.

CORREA, M. J.; FERRER, E.; AÑÓN, M. C.; FERRERO, C. Interaction of modified celulosas and pectins with gluten proteins. **Food Hydrocolloids**, p. 1 – 9, 2013.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3; p. 164 – 173, 2009.

DUPONT, F. M.; CHAN, R.; LOPEZ, R.; VENSEL, W. H. Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenins, and other proteins from small samples of wheat flour. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1575-1584, 2005.

EMBRAPA TRIGO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.html>. Acesso em: 27/02/2013.

BIOTEK. Disponível em: [http://www.biotek.pt/pt/products/microplate\\_detection/elx800\\_absorbance\\_microplate\\_reader.html](http://www.biotek.pt/pt/products/microplate_detection/elx800_absorbance_microplate_reader.html). Acesso em: 19/03/2014.

CALUCCI, L.; *et al.*; Structure and Dynamics of High Molecular Weight Glutenin Subunits of Durum Wheat (*Triticum durum*) in Water and Alcohol Solutions Studied by Electron Paramagnetic Resonance and Circular Dichroism Spectroscopies. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 2001; v. 49; p. 359-365.

FASANO, A.; Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. **Physiological Reviews**, v. 91, p. 151-175, 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 25/06/2013.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução Adriano Brandelli, 4ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

FREYER, M. W. & LEWIS, E. A. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interaction. **Methods in cell biology**, v. 84, p. 79-113, 2008.

FISICHELLA, S.; SAVARINO, A.; Conformational studies of glutenin polymers from different wheat cultivars by Circular Dichroism Spectroscopy. **Protein & Peptide Letters**, 2007; v.14; p. 784-787.

FISICHELLA, S.; *et al.*; Conformational studies of wheat flour high relative molecular mass glutenin subunits by Circular Dichroism Spectroscopy. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, 2002; v. 65; p. 142–147.

GÓMEZ, A. V.; FERRER, E.; AÑÓN, M. C.; PUPPO, M. C.; Analysis of soluble proteins/aggregates derived from gluten-emulsifiers systems. *Food Research International*, v. 46, p. 62–68, 2012.

HATAKEYAMA T.; QUINN F.X. **Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer Science**. New York: John Wiley & Chichester; p.11-12, 1994.

HAY, J. N. **Thermal analysis – Techniques & Applications**. Bodmin: Royal Society of Chemistry, p. 158-161, 1992.

HEERKLOTZ, H. & SEELIG, J. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, p.69-85, 2000.

HOSENEY, R.C. **Principios de ciencia y tecnología de los cereales**. Zaragoza, Editora Acribia, 1991.

KHATKAR, B. S.; BARAK, S.; MUDGIL, D.; Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012; v. 53, p. 38 – 41.

LARRÉ, C.; *et al.*; Preparative separation of high and low molecular weight subunits of glutenin from Wheat. **Journal of Cereal Science**, 1997; p. 143–150.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277; p. 680 – 685, 1970.

LEÓN, A.; ROSSEL, C. M.; BARBER, C. B.; A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. **Original Paper**, 2003; v. 217, p. 13 – 16.

LEW, E. J. L.; KUZMICKYI, D. D.; KASARDA, D. D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. **Cereal Chemistry**, v. 69; p. 508 – 515, 1992.

McCANN, T. H.; SMALL, D. M.; BATEY, I. L.; WRIGLEY, C. W.; DAY, L. Protein–lipid interactions in gluten elucidated using acetic-acid fractionation. **Food Chemistry**, v. 115; p. 105 – 112, 2009.

MANDARINO, J. M. G. Componentes do trigo: Características físico-químicas, funcionais e tecnológicas. Londrina, 40 p. EMBRAPA-CNPSO, 1994.

MATOS, F.C. **Estudos da decomposição térmica de ácidos graxos através da Calorimetria Exploratória Diferencial**. Campinas, 107 p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.

MICARD, V.; GUILBERT, S.; Thermal behavior of native and hydrophobized wheat gluten, gliadina and glutenina-rich fractions by MDSC. **International Journal of Biological Macromolecules Structure Function Interactions**, v. 27, p. 229 – 236, 2000.

MOTHÉ, C. G. AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. Editorial editora; São Paulo, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman and Company, New York and Basingstone, 3<sup>o</sup> edition, p. 115, 2002.

ÖTLES, S.; **Methods of analysis of food components and additives**. Editora CRC/Taylor & Francis, 2005.

PIERCE, M.M.; RAMAN, C.S; NALL, B.T.; Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. **Methods**, v. 19, p. 213-221, 1999.

RELKIN, P.; LAUNAY, B. Concentration effects on the kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. **Food Hydrocolloids**, v.4, n.1, p.19-32, 1990.

RODRIGUES, O.; TEIXEIRA, M. C. C.; DIDONET, A. D.; **Bases Ecofisiológicas para Manutenção da Qualidade do Trigo**. Embrapa; Passo Fundo, 2009.

ROSELIN, L. S.; LIN, M.; LIN, P.; CHANG, Y.; CHEN, W.; Recent trends and some applications of isothermal titration calorimetry in biotechnology. **Biotechnol**, v. 5, p. 85-98, 2010.

SARAIVA, A. L. G.; SILVA, C. E. M.; CLEMENTE, E. Efeito do ácido ascórbico em massa de pão na presença de ácido tânico. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, p. 207 – 211, 2010.

WALSTRA, P. **Physical Chemistry of Foods**. United States of America, Editora Marcel Dekker, 2003.

WANG, P.; et al.; Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. **Food Hydrocolloids**, 2014; p. 238 – 246.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. Zaragoza, Editora Acribia, 1995.

TAN, C. P., CHE MAN, Y. B. Recent developments in differential scanning calorimetry for assessing oxidative deterioration of vegetable oils. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p. 312 – 318, 2002.

VERBRUGGEN, I. M.; VERAVERBEKE, W. S.; VANDAMME, A.; DELCOUR, J. A.; Simultaneous Isolation of Wheat High Molecular Weight and Low Molecular Weight Glutenin Subunits; **Journal of Cereal Science**; v. 28, p. 25 – 32, 1998.

XU, J.; BIETZ, J. A.; CARRIERE, C. J. Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. **Food Chemistry**, v. 101; p. 1025 – 1030, 2007.