

Monitoramento da oxidação dos tióis proteicos em grãos de trigo imaturos e de diferentes aptidões tecnológicas

Carolina Thomaz dos Santos D'Almeida; Millena Cristina Barros Santos; Sônia Kristy Pinto Melo Rodrigues; Luciana Ribeiro da Silva Lima; Mariana Simões Larraz Ferreira¹

Resumo

O trigo é considerado a matéria-prima mais adequada para a fabricação de pães e massas devido à sua viscoelasticidade, determinada pela qualidade do glúten. Apesar do conhecido impacto dos polímeros de glúten na qualidade do trigo, a dinâmica da formação das pontes dissulfeto, por meio da oxidação dos tióis das cisteínas (PSH), não está completamente elucidada. Este trabalho objetivou o estudo da evolução do estado redox dos PSH de 8 genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) brasileiro ao longo da maturação do grão (estádios leitoso, pastoso, maturação fisiológica, maduro e farinha). Os grãos foram caracterizados quanto ao peso médio, umidade, proteínas totais e PSH pelo método de DTNB. Os grãos maduros apresentaram em média 12% de umidade, 15% de proteína e peso seco de $34,0 \pm 2,1$ mg/grão. Os teores de PSH variaram de 2,2-8,6 $\mu\text{mol/g}$ (leitoso), 1,7-7,2 $\mu\text{mol/g}$ (pastoso) a 1,0-3,4 $\mu\text{mol/g}$ (maturação fisiológica). Em grãos maduros e farinhas, o teor de PSH foi similar para todas as amostras ($2,3 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/g}$; < 2 $\mu\text{mol/g}$, respectivamente). Três genótipos apresentaram oxidação excessiva nos estádios imaturos. As demais amostras apresentaram um declínio progressivo no teor de PSH, corroborando a literatura e confirmando o envolvimento destes nas pontes dissulfetos intermoleculares de acordo com o desenvolvimento do grão.

Palavras chave: tióis, trigo, pontes dissulfeto, grupamento sulfidrílica.

Abstract

Wheat is considered the most suitable raw material for the manufacture of bread and pasta because of its viscoelasticity, determined by the quality of gluten. Despite the known impact of gluten polymers on wheat quality, the dynamics of disulfide bond formation, through the oxidation of cysteine thiols (PSH), has not been fully elucidated. This work aimed to study the evolution of the PSH redox state of eight Brazilian wheat genotypes (*Triticum aestivum*) throughout the maturation stage of the grain (milky, softy, physiological maturity, mature stages and flour). The grains were characterized as dry weight, water content, total protein and PSH by the DTNB method. Mature grains showed on average 12% water content, 15% protein and dry weight of 34.0 ± 2.1 mg/grain. PSH levels ranged from 2.2-8.6 $\mu\text{mol/g}$ (milky), 1.7-7.2 $\mu\text{mol/g}$ (pasty) to 1.0-3.4 $\mu\text{mol/g}$ (physiological maturity). In mature grains and flours, the PSH content was similar for all samples (2.3 ± 0.6 $\mu\text{mol/g}$, < 2 $\mu\text{mol/g}$, respectively). Three genotypes showed excessive oxidation in the immature stages. The other samples showed a progressive decline in PSH content, corroborating the literature and confirming the involvement of these in the intermolecular disulfide bonds according to the development of the grain.

Keywords: thiols, wheat, disulfide bonds, sulfhydryl group.

Instituição: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

¹Autor para correspondência:

Mariana Simões Larraz Ferreira - E-mail: mariana.ferreira@unirio.br

Laboratório de Bioativos, Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN)

Escola de Nutrição da UNIRIO - Departamento de Ciência dos Alimentos

Endereço: Avenida Pasteur, 296 – Urca - CEP 22290-240

Telefone: +55 21 2542 7269.

1. INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum spp.*) é um cereal da família *Poaceae* (também conhecida como *Gramineae*), pertencente à subfamília *Pooideae* e ao gênero *Triticum*. As diferentes espécies de trigo são classificadas de acordo com o número de cromossomos. Historicamente, o cultivo de trigo surgiu há mais de 10 mil anos na região sudeste da Turquia, sendo uma das primeiras culturas alimentares domésticas e, por oito mil anos, tem sido o alimento básico das principais civilizações da Europa, Ásia Ocidental e África do Norte. Essas primeiras formas cultivadas eram diploides (genoma AA, $2n=14$) (*Triticum monococcum*) e tetraploides (genoma AABB, $2n=28$) (*Triticum dicoccum*). O trigo hexaploide (AABBDD, $2n=42$) (*Triticum aestivum*) surgiu mil anos depois no Oriente Próximo, provavelmente devido aos múltiplos cruzamentos entre as espécies e com o novo genoma hexaploide sendo selecionado pelos agricultores por suas propriedades superiores (1).

Segundo a Instrução Normativa nº 38/2010 (2), o trigo é comercialmente classificado, e estas, junto com a espécie do trigo, direcionam o seu uso na forma de pães, massas alimentícias, bolos, biscoitos, além de outras aplicações, como na fabricação de ração animal, quando o mesmo não atinge a qualidade exigida pela indústria alimentícia (3). Essa diversa aplicabilidade o torna uma matriz de grande importância econômica e nutricional, fazendo do trigo (*Triticum aestivum*) o cereal mais produzido e o segundo mais consumido no mundo (4).

Segundo a FAO, a produção anual total de trigo foi de mais de 750 milhões de toneladas em 2017 (5). No Brasil, a produção de trigo concentra-se na região Sul, sendo o Paraná e Rio Grande do Sul os principais produtores. A produção de trigo no país na safra 2017/18 foi de 4,9 milhões de toneladas, e para o ano de 2018/2019 foi projetada a produção de aproximadamente 5,6 milhões de toneladas, com o consumo é estimado em cerca 11,3 milhões de toneladas, sendo necessária a importação de outros países como Argentina, Paraguai, China, Estados Unidos, Índia, Rússia e Canadá (6).

A farinha de trigo é a matriz alimentícia mais adequada para a fabricação de produtos panificáveis, como pães, bolos e biscoitos, devido à qualidade das proteínas de reserva, gliadinas e gluteninas, conhecidas como glúten. De acordo com a indústria de panificação, a determinação da qualidade do trigo é conferida principalmente a partir de análises físico-químicas (peso do hectolitro, peso de mil grãos, extração experimental de farinha, número de queda etc.) e reológicas (alveografia, farinografia etc.) (7), que não consideram parâmetros primordiais como a qualidade e composição das proteínas que compõem o glúten.

Em grãos maduros do trigo, as proteínas do glúten representam 80-85% das proteínas totais e são compostas de subunidades monoméricas, as gliadinas, capazes de formar apenas pontes dissulfeto intramoleculares, e polipeptídeos de gluteninas, subunidades de alta e baixa massa molecular, estabilizados por pontes dissulfeto intermoleculares. A massa molecular dos polímeros de glutenina pode se estender de 100.000 Da até mais de 1.000.000 Da (8). Em consequência das numerosas associações covalentes (*i.e.* pontes dissulfeto) entre os polipeptídeos, parte dos polímeros de glutenina permanece insolúvel mesmo em tampões fortemente desnaturantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS).

Sabe-se que a distribuição da massa molecular dos polímeros de glutenina e principalmente as frações poliméricas insolúveis em SDS afetam positivamente a viscoelasticidade do glúten e, portanto, são os principais contribuintes do potencial tecnológico do trigo (9-11). Apesar do notório impacto destes polímeros na qualidade do trigo, a relação entre a funcionalidade e a estrutura polimérica do glúten no trigo ainda não é bem conhecida. Inúmeras investigações sobre reações redox que ocorrem durante a moagem do trigo, preparo e cozimento da massa mostram a influência da estrutura oxidada do glúten na qualidade da panificação (12). Durante este processo, uma parte das ligações dissulfeto é clivada pelas forças mecânicas (sova mecânica), o que permite a formação de uma rede de glúten viscoelástica contínua (13).

O aminoácido cisteína possui na sua cadeia lateral uma estrutura oxidável conhecida como grupamento sulfidrila (SH) ou tiol, e este é primordial no processo de polimerização, ou seja, na formação das proteínas do glúten durante o processo de maturação do grão do trigo, bem como na formação de massa,

influenciando na sua estabilidade e estrutura dos produtos finais. A partir de ligações dissulfetos (S-S) (entre as estruturas oxidáveis de dois resíduos de cisteína), formam-se as estruturas terciárias, com S-S intramoleculares, ou até mesmo estruturas quaternárias que são estabilizadas por S-S intermoleculares, dando origem aos polímeros de gluteninas (14). A formação das S-S intermoleculares é uma modificação pós-traducional, essencial para a polimerização das gluteninas.

Estudos prévios realizados com a espécie *Triticum durum* mostram que, precocemente, desde a fase linear de enchimento do grão, são formados oligômeros de gluteninas que apresentam ainda um número expressivo de SH, ou seja, de resíduos Cys reduzidos, não engajados em pontes S-S (14, 15). Após a maturidade fisiológica, quando o grão entra na fase de dessecação, as associações polipeptídicas são favorecidas pelo ambiente oxidativo. Paralelamente, os grupamentos tióis desaparecem, evidenciando um envolvimento em S-S (14, 15).

Ainda neste contexto, ao longo do desenvolvimento do grão tem sido relatada a associação de glutatona às proteínas, chamada de “glutationilação” (14). Essa polimerização é um processo muito complexo que envolve também as chaperonas e isomerases, que são relacionadas ao enovelamento adequado das proteínas de reserva sintetizadas no retículo endoplasmático. O grande destaque é para a proteína dissulfeto isomerase (PDI), uma glicoproteína pertencente à família da tiorredoxina, que possui massa molecular de 60 kDa e atua assegurando que o enovelamento ocorra corretamente, dando origem a polímeros de glutenina regulares, culminando na maior qualidade do glúten (16). Victorio *et al.* (17) identificaram as chaperonas, com destaque para a PDI, em farinhas de trigo brasileiro de diferentes aptidões tecnológicas e estas se mostraram diferencialmente expressas nas amostras que apresentavam maior força de glúten (forte e média) em relação à fraca.

As mudanças que ocorrem durante a maturação do grão afetam os componentes macromoleculares, principalmente as proteínas, e são muito relevantes do ponto de vista nutricional e tecnológico. Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações do estado redox de grupamentos tióis que acompanham o desenvolvimento do grão, a fim de melhor compreender a evolução da polimerização de gluteninas em diferentes genótipos de grãos de trigo (*Triticum aestivum*) brasileiro.

2. MÉTODO

2.1. AMOSTRAS DE TRIGO

Oito genótipos (Campeiro, ORS25, ORS1401, ORS1402, Marfim, Jadeite, Ametista e Topázio) de trigo (*Triticum aestivum*), cedidos pela empresa OR Melhoramento de Sementes Ltda (Passo Fundo-RS, Brasil), foram analisados em quatro estágios diferentes de desenvolvimento, estágios pastoso, leitoso, de maturação fisiológica e maduro e, ainda sob a forma de farinha obtidas pela moagem dos grãos de trigo maduros. A variedade Topázio não foi analisada em grãos maduros nem em farinha, pois não foi fornecida amostra.

Os grãos foram cultivados na mesma localização (Latitude 28° 09’ 33”, Longitude 52° 18’ 23”, Região Sul) durante a safra de 2015/2016, com colheita normal (sem apresentar problemas climáticos que possam afetar a produtividade final) e manejo de sementes. As amostras foram escolhidas por apresentarem diferentes aptidões (qualidades) tecnológicas (fortes, médias ou fracas), segundo análises realizadas previamente (Tabela 1), de acordo com a Associação Americana Internacional de Químicos de Cereais (AACCI) (18) e Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 38/2010 (19). Dentre estas análises, é realizada a determinação da força do glúten pelo método de Alveografia, utilizando como parâmetros a tenacidade e extensibilidade, enquanto que a determinação da estabilidade é medida em farinógrafo e utiliza os parâmetros de tempo de desenvolvimento da massa e absorção de água.

Tabela 1. Classificação de diferentes genótipos de trigo brasileiro segundo parâmetros reológicos e físico-químicos.

| Genótipos | Classificação | Aptidão |
|-----------------|-----------------|---------|
| CAMPEIRO | Doméstico | Fraca |
| TOPÁZIO | Pão | Fraca |
| ORS 25 | Básico | Fraca |
| MARFIM | Pão/ Melhorador | Média |
| ORS 1401 | Pão | Média |
| ORS 1402 | Pão | Média |
| AMETISTA | Melhorador | Forte |
| JADEÍTE | Melhorador | Forte |

A primeira coleta (realizada em 15 de setembro de 2015) definiu os grãos em estado leitoso com teor de umidade estimado em 60%, a segunda coleta (25 e 30 de setembro de 2015) definiu os grãos em estado pastoso com teor de umidade de 45% e a terceira coleta (3 e 5 de novembro de 2015) definiu os grãos em estado de maturação fisiológica (MF) com teor de umidade de 33%. Também foram analisados grãos maduros colhidos por colheita mecânica com 12% de umidade.

As espigas foram transportadas congeladas em recipiente contendo gelo seco e foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C (Indrel, Brasil), sendo posteriormente liofilizadas (temperatura do condensador de -55 °C e pressão final de 73 Hg) (LS-3000, Terroni, Brasil). Os grãos liofilizados foram debulhados manualmente e mantidos em ultrafreezer até o momento das análises.

2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os grãos congelados foram triturados, com o auxílio de um pistilo, em graal com nitrogênio líquido para prevenção da oxidação dos grupos sulfidrilas. Os teores de umidade e proteínas totais foram determinados em triplicata após liofilização, segundo métodos padrões da AACCI (20) 44-19 e 46-12 (fator de correção 5,75), respectivamente.

2.3. TEOR DE TIÓIS PROTEICOS (PSH)

A determinação de PSH foi feito segundo Morel e Bonicel (21). A partir de 20 mg de grãos moídos, em triplicata, foi adicionado 590 µL de propanol, 590 µL de tampão Tris/HCl (250 mM, pH 8,5) e 120 µL de reagente de Ellmans (DTNB, ácido 5,5'ditiobis 2-nitro-benzoico) em etanol (1:1:0,2; v:v:v). Ao abrigo da luz, as amostras foram vortexadas, homogeneizadas por 10 minutos a 200 rpm a 25 °C em shaker e depois centrifugadas (Megafuge, Thermofisher, Alemanha) por 10 minutos, 14.000 x g, a 25 °C. Foi retirado o sobrenadante e feita a leitura da absorbância por espectrofotometria (UV-2700, Shimadzu) a 412 nm.

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise estatística (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$) usando o software estatístico XLSTAT (Addinsoft, v. 2018.2.50452).

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS GRÃOS E FARINHAS DE TRIGO DE DIFERENTES APTIDÕES TECNOLÓGICAS

Foi avaliado o peso seco médio e o teor de proteínas ao longo do desenvolvimento do grão (Figura 1) e, como esperado, observou-se um crescente aumento em ambos, devido ao acúmulo gradativo de matéria seca. Nota-se um aumento de 3 a 4 vezes no peso médio seco do grão entre o estado leitoso e de maturação fisiológica (Figura 1A). O peso seco médio dos grãos na maturidade fisiológica foi de $33,2 \pm 5,02$ e na colheita foi de $34,0 \pm 2,05$ mg. Análises estatísticas foram realizadas para tentar diferenciar o peso ao longo do

desenvolvimento do grão e também em estágios iguais de diferentes variedades. No estágio leitoso, a variedade com menor peso foi ORS 1401 e esta apresentou diferença significativa com as três variedades de maior peso (Campeiro, ORS 25 e ORS 1402). No estágio pastoso, a variedade Ametista apresentou diferença com cinco variedades (Marfim, Campeiro, ORS25, ORS 1401 e ORS 1402), sendo significativamente maior. Na maturação fisiológica, a variedade Marfim foi significativamente menor que as demais, enquanto Campeiro, Ametista, Jadeíte e ORS 25 apresentaram os maiores valores, sendo iguais entre elas e diferente das demais. Por fim, o grão maduro ORS 25 apresentou o maior peso, mas foi apenas significativamente maior quando comparado aos dois menores pesos (Marfim e ORS 1401). De maneira geral, o peso do grão aumenta ao longo do estágio de maturação. Análises estatísticas mostraram que o estágio de maturação fisiológica e maduro são iguais, mas diferente dos demais. O estágio leitoso e pastoso também são estatisticamente diferentes. O teor de proteína por grão teve um aumento progressivo durante a maturação do grão até o estágio de maturação fisiológica (Figura 1B). As análises estatísticas desses teores estão apresentados na Tabela 2.

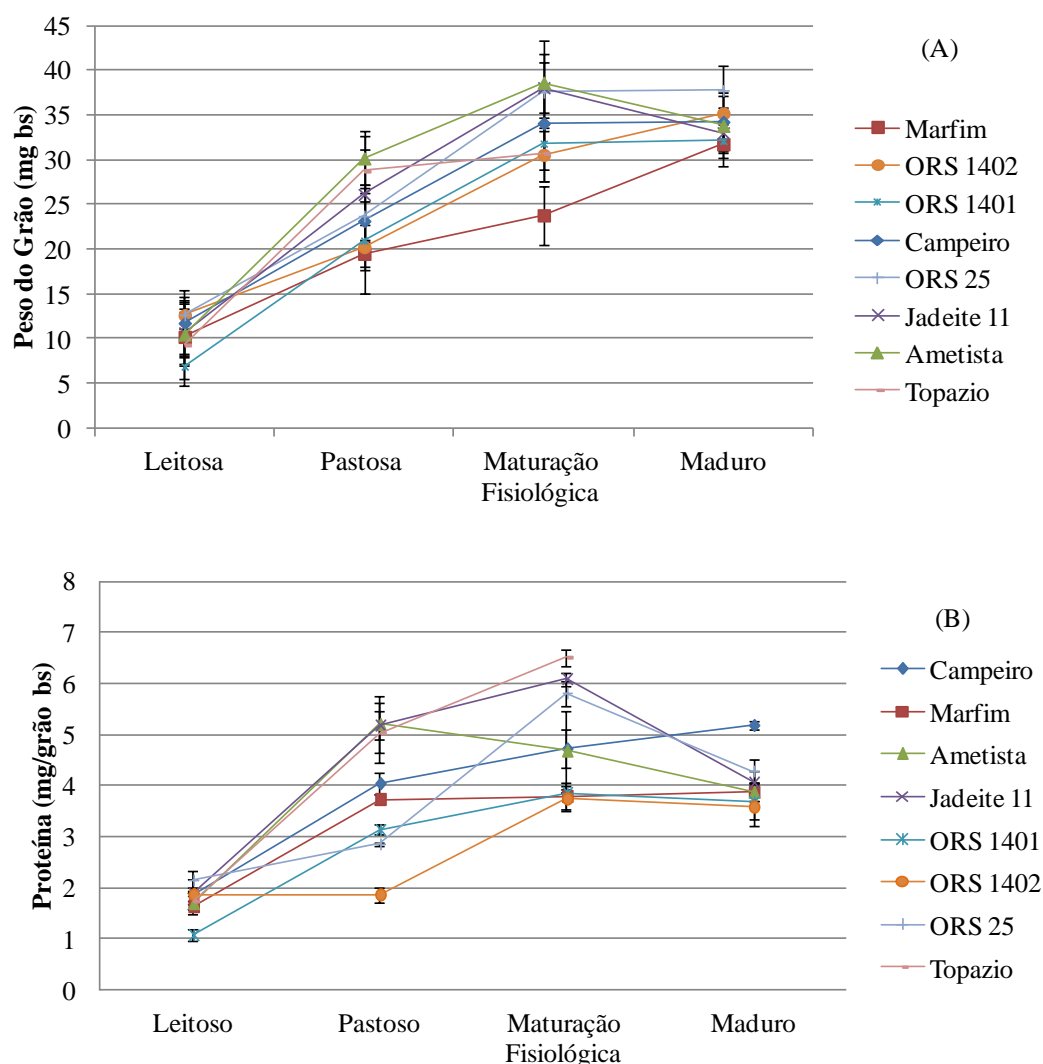


Figura 1. Evolução do peso seco médio (A) e do teor de proteínas dos grãos (mg/grão) (B) de trigo de diferentes genótipos em quatro estágios de maturação.

A umidade do grão define o momento da colheita sendo o teor de umidade ideal ao final do desenvolvimento do grão igual a 12%. A umidade média dos grãos estudados foi de 12,1%, correspondendo ao ideal, entretanto, foram observados teores elevados no estágio pastoso, variando de 12 a 22%. Os teores de umidade da farinha de todas as amostras analisadas foram inferiores ao valor máximo (15%) permitido

pela legislação vigente (19). A concentração média de proteínas nas amostras foi de $14,9 \pm 2,9\%$ (Tabela 2). Ao longo do desenvolvimento do grão, o aumento do acúmulo da proteína no endosperma do grão ocorre ao mesmo tempo em que aumenta o seu peso seco, por isso a concentração de proteínas manteve-se constante, apesar da variação de 20% entre as amostras e dos valores superiores encontrados nos grãos pastosos.

Tabela2. Composição química de grãos e farinha de trigo em diferentes estádios de maturação de diferentes genótipos brasileiros (MF: maturação fisiológica).

| Cultivares | Aptidão | Estágio de maturação | Proteína total (% bs) | Umidade (%) |
|------------|---------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| Campeiro | Fraca | Leitoso | $16,1^{ab} \pm 1,17$ | $13,3^a \pm 0,19$ |
| | | Pastoso | $17,4^a \pm 0,94$ | $16,7^b \pm 0,68$ |
| | | MF | $13,8^b \pm 1,08$ | $10,0^c \pm 0,15$ |
| | | Maduro | $15,1^b \pm 0,21$ | $7,4^d \pm 0,23$ |
| | | Farinha | $16,9^a \pm 0,72$ | $10,7^c \pm 0,28$ |
| ORS 25 | Fraca | Leitoso | $16,8^a \pm 1,57$ | $12,5^a \pm 0,79$ |
| | | Pastoso | $12,0^b \pm 0,01$ | $12,5^a \pm 0,02$ |
| | | MF | $15,0^a \pm 0,67$ | $7,8^b \pm 0,87$ |
| | | Maduro | $11,3^a \pm 0,61$ | $8,2^b \pm 0,45$ |
| | | Farinha | $12,2^b \pm 1,01$ | $10,6^c \pm 0,26$ |
| Topázio | Fraca | Leitoso | $18,6^a \pm 1,76$ | 8,0* |
| | | Pastoso | $17,5^a \pm 2,02$ | $12,4^a \pm 0,48$ |
| | | MF | $21,2^a \pm 1,76$ | $9,2^b \pm 0,41$ |
| ORS 1401 | Média | Leitoso | $15,5^a \pm 1,67$ | $9,6^a \pm 0,44$ |
| | | Pastoso | $14,9^a \pm 0,47$ | $21,0^b \pm 0,43$ |
| | | MF | $12,1^b \pm 0,02$ | $8,9^c \pm 0,3$ |
| | | Maduro | $11,5^b \pm 1,08$ | $8,7^c \pm 0,31$ |
| | | Farinha | $13,3^b \pm 1,29$ | $11,0^d \pm 0,29$ |
| Marfim | Média | Leitoso | $16,0^a \pm 0,50$ | $13,9^a \pm 0,32$ |
| | | Pastoso | $19,1^a \pm 0,48$ | $15,1^a \pm 0,24$ |
| | | MF | $15,9^a \pm 1,14$ | $8,5^b \pm 0,07$ |
| | | Maduro | $11,9^a \pm 0,26$ | $7,4^c \pm 0,14$ |
| | | Farinha | $14,7^a \pm 0,72$ | $10,7^d \pm 0,91$ |
| ORS 1402 | Média | Leitoso | $14,8^a \pm 0,27$ | $7,9^a \pm 0,07$ |
| | | Pastoso | $9,2^b \pm 0,71$ | $17,5^b \pm 0,08$ |
| | | MF | $12,2^c \pm 0,78$ | $7,7^a \pm 0,13$ |
| | | Maduro | $10,2^{bc} \pm 1,02$ | $7,8^a \pm 0,28$ |
| | | Farinha | $11,4^{bc} \pm 1,24$ | $11,0^c \pm 0,23$ |
| Jadeíte | Forte | Leitoso | $17,5^{ab} \pm 2,74$ | $7,3^a \pm 0,31$ |
| | | Pastoso | $19,9^{ab} \pm 1,04$ | $20,3^b \pm 0,10$ |
| | | MF | $16,0^b \pm 0,35$ | $6,6^a \pm 0,36$ |
| | | Maduro | $12,3^c \pm 0,74$ | $8,9^c \pm 0,41$ |
| | | Farinha | $14,6^{bc} \pm 0,38$ | $10,4^d \pm 0,32$ |
| Ametista | Forte | Leitoso | $16,1^{ab} \pm 2,04$ | $11,4^a \pm 2,1$ |
| | | Pastoso | $17,2^a \pm 1,83$ | $22,9^b \pm 0,63$ |
| | | MF | $13,5^{bc} \pm 2,00$ | $8,9^{ac} \pm 0,18$ |
| | | Maduro | $11,5^{dc} \pm 0,53$ | $7,7^{cd} \pm 0,05$ |
| | | Farinha | $12,9^{bd} \pm 1,45$ | $11,0^a \pm 0,28$ |

Letras diferentes representam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) entre amostras de mesma variedade ao longo do tempo ($n=3$). *Análise realizada apenas com uma replicata devido à baixa quantidade de grãos fornecidos.

3.2. TEORES DE TIÓIS PROTEICOS (PSH)

Nota-se na Figura 2 que os teores PSH variaram entre 2,2 a 8,6 $\mu\text{mol/g}$ grão para as amostras mais imaturas (leitosos), 1,7 a 7,2 $\mu\text{mol/g}$ grão para o estado pastoso e 1,0 a 3,4 $\mu\text{mol/g}$ grão para o estado de maturação fisiológica, sendo todos os resultados expressos em base seca. De maneira global, as médias de PSH encontradas foram $5,2^a \pm 2,4$ $\mu\text{mol/g}$ (leitoso), $3,7^{ab} \pm 1,9$ $\mu\text{mol/g}$ (pastoso), $1,9^{bc} \pm 0,8$ $\mu\text{mol/g}$ (MF), $2,5^{bc} \pm 0,5$ $\mu\text{mol/g}$ (maduro) e $1,1^c \pm 0,2$ $\mu\text{mol/g}$ (farinha). A maior taxa de oxidação de tióis ocorreu entre os estados mais imaturos (leitoso e pastoso), principalmente para Topázio, Campeiro, Jadeite e ORS1402. As amostras Marfim, Ametista e ORS1401 destacam-se pelo baixo conteúdo de grupamentos tióis nos estágios mais imaturos, o que indica um perfil oxidado.

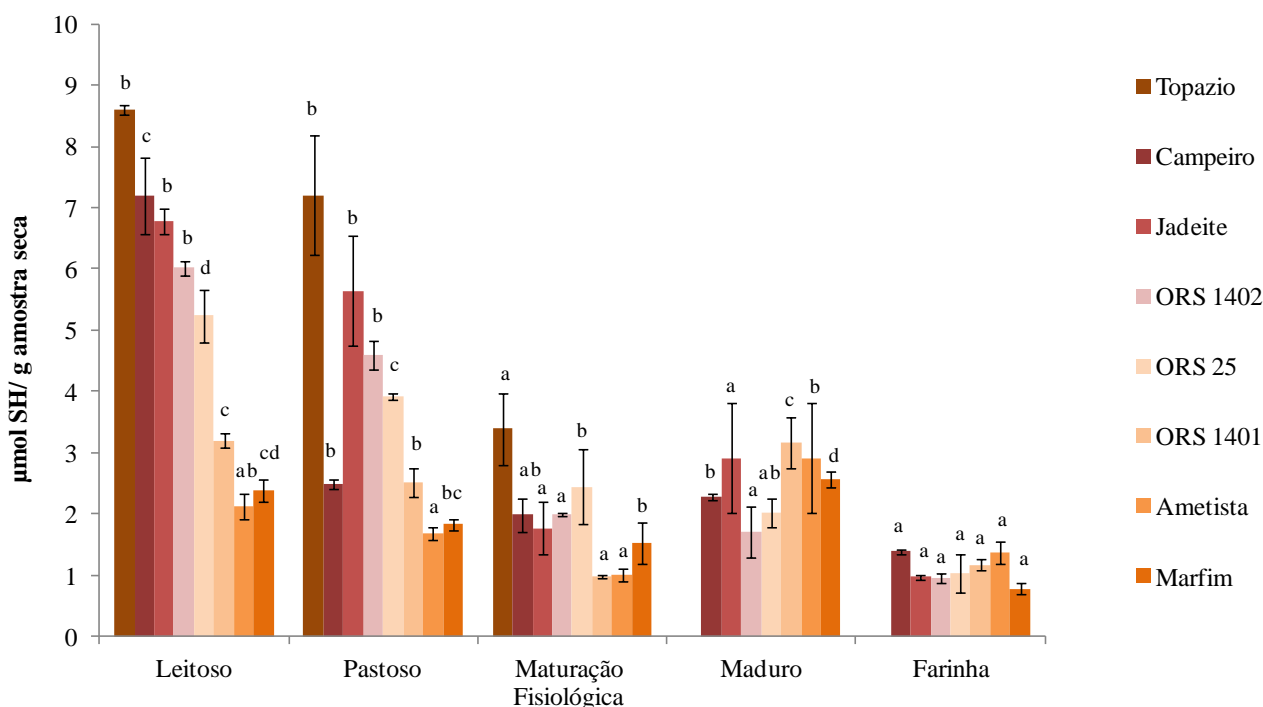


Figura 2. Evolução dos grupamentos tióis ao longo do desenvolvimento dos grãos e na farinha de trigo. Letras diferentes representam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) entre amostras de mesma variedade ao longo do tempo.

Esse resultado permite observar que os teores de tióis decaíram ao longo do tempo e, mesmo com o teor ligeiramente superior nos grãos maduros, não foi significativo. Os resultados obtidos para a farinha foram coerentes com essa oxidação dos grupamentos tióis, sendo que nenhuma amostra apresentou aumento dos valores de PSH e estes apresentaram diferença significativa com os demais estágios. Embora a média nos grãos maduros tenha sido ligeiramente superior, não houve diferença significativa (Figura 3). Globalmente, as diferentes variedades apresentaram perfis de oxidação e teores de tióis tanto durante a maturação, como na forma de farinha, similares entre si, não sendo possível associar com a aptidão (Figura 3).

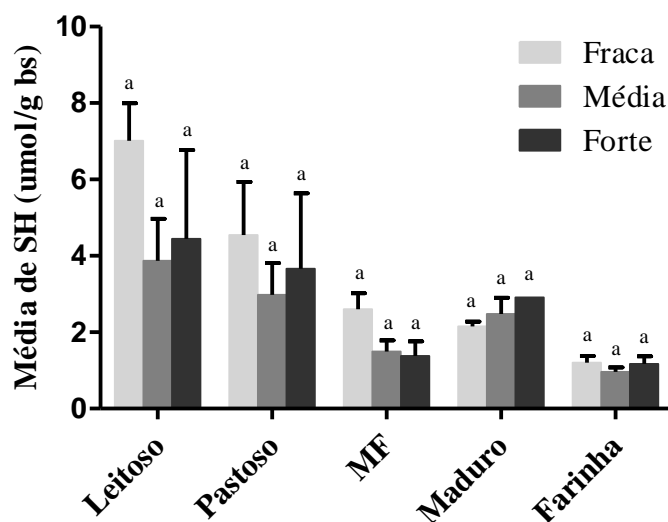


Figura 3. Valores médios de tiol de cada aptidão tecnológica ao longo do desenvolvimento do grão e na farinha de trigo. Letras diferentes representam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) entre as aptidões tecnológicas ao longo do estágio de maturação.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do endosperma no grão de trigo começa com a fertilização de uma célula diplóide, seguida pela divisão repetida dos núcleos triplóides, formação gradual das paredes celulares e partição da célula vacuolada original em um padrão celular característico. Em seguida, ocorre a fase de expansão celular, na qual o conteúdo de água aumenta e as reservas de amido e proteína se acumulam (22). Esse perfil de expansão celular pode ser observado no estágio pastoso, no qual ocorre o aumento de 71% e 39,5% respectivos ao peso e umidade do grão quando comparado ao inicial. Após esse período, o estágio de maturação fisiológica é alcançado, sendo este caracterizado pelo fim do acúmulo da matéria seca e começo do dessecamento do grão, uma vez que a entrada de água no grão cessa. Com isso, o peso do grão não sofre maiores alterações após esse estágio, e, com isso, já é possível prever o peso final do grão na maturação fisiológica (23).

A expansão celular e o acúmulo de água param antes de cessar o acúmulo de matéria seca; o amido e proteína substituem a água da célula; e o núcleo começa a dessecar, com isso, reduzindo a umidade do grão (22). No entanto, neste trabalho o teor de umidade apresentado foi posterior à liofilização e teve como objetivo determinar o peso seco do grão. Já nas farinhas, o teor de umidade deve ser firmemente controlado, pois este parâmetro figura como um dos principais fatores de aceleração de reações químicas nestes alimentos, provocando alterações nas suas características nutricionais, sensoriais e tecnológicas. Teores de umidade abaixo do limite máximo permitido normalmente asseguram a conservação da qualidade das farinhas durante a estocagem comercial (24).

O vitrosidade e a dureza do endosperma estão fortemente relacionadas ao conteúdo proteico dos grãos. As proteínas começam a ser sintetizadas durante a fase de divisão celular, que antecede o estado leitoso, e continuam ao longo do crescimento do grão até a fase de maturação fisiológica. Assim, ao longo do desenvolvimento do grão, o aumento do acúmulo da proteína no endosperma ocorre ao mesmo tempo em que aumenta o seu peso seco (14), o que leva a pouca variação na concentração das proteínas (% bs) (Tabela 2). Não foi possível estabelecer uma relação entre a classificação comercial das farinhas e os teores de proteínas, tendo as farinhas um teor médio de 14,5%, 13,1% e 13,3%, respectivamente para as amostras fracas, médias e fortes. Apesar da aptidão das farinhas serem associadas aos teores de proteínas totais, este

resultado corrobora trabalhos anteriores que apontam que a aptidão da farinha e, respectivamente da massa, está associada à qualidade e não à quantidade das proteínas do glúten (25, 26).

Quando observado o teor de proteínas por grão, algumas amostras (Ametista, Jadeíte, ORS25) apresentaram maior concentração de proteínas na maturação fisiológica, com declínio nos grãos maduros (Figura 1B), provavelmente devido a um maior acúmulo de amido. Estudos confirmaram que a síntese das proteínas do glúten (gliadinas e gluteninas) ocorre no estágio leitoso, ou seja, entre a segunda e a terceira semana após a antese (momento de maturação da planta) (27). Grimwade *et al.* (28) relataram que RNAm para os vários grupos de proteínas do glúten foram detectados a partir de 11 dias após a antese, e o impacto no teor de proteínas totais foram detectadas a partir de cerca de 14 dias após a antese. Katagiri *et al.* (29) detectaram a expressão dos genes da subunidade do glúten 7 dias após a antese, apresentando, após 14 a 21 dias, alteração significativa no teor total de proteína. Isso explica o aumento no teor de proteínas totais nos estágios mais imaturos, já que a síntese proteica já aumentaria as proteínas totais nesse estágio. A síntese de alguns aminoácidos é diminuída na fase de dessecação do grão, que sucede a maturação fisiológica, uma vez que estes são utilizados para a formação de proteínas Zhen, Dong (30).

Paralelamente aos processos de crescimento do grão, mudanças no estado redox são também observadas, tais como na atividade de enzimas detoxificantes e compostos antioxidantes, como ácido ascórbico e grupamentos sulfidrilas que a partir do estágio de maturação fisiológica são oxidados formando agregados proteicos, dando origem aos polímeros de gluteninas (14). Estas modificações, além de determinarem também a capacidade antioxidante dos grãos, envolvem a formação de polímeros de proteínas que estão diretamente ligados à qualidade do glúten.

A redução no teor de SH ao longo do desenvolvimento do grão apresentada pelas amostras pode, então, ser explicada pela oxidação de SH em SS, o que levará a formação de grandes agregados proteicos. O número de grupos SH e SS são importantes na manutenção da estrutura secundária da proteína, e também são importantes influenciadores da elasticidade, extensibilidade, estabilidade da massa e qualidade do produto (31). Duas variedades italianas de trigo duro (*Triticum durum*) mostraram diferenças na hidrofobicidade da superfície das proteínas e no teor de tióis acessíveis. Nas variedades italianas, a acessibilidade do tiol diminuiu acentuadamente após a fase leitosa, sugerindo que as proteínas adquirem uma estrutura compacta através da formação de ligações S-S intramoleculares ou através da associação com espécies poliméricas ligadas a S-S (27).

Os teores de PSH encontrados corroboram dados da literatura, nos quais o decréscimo ao longo do desenvolvimento do grão foi de 89%, 36% e 34% quando comparados ao estágio inicial (leitoso) até o grão maduro (31). Em farinhas de trigo obtidas por moagem do grão inteiro, os teores variaram de 0,065 a 0,4 $\mu\text{mol SH/g}$ (32), valores inferiores aos apresentados no presente artigo (0,78 a 1,38 $\mu\text{mol SH/g}$ farinha obtida por extração). Esse menor teor pode ser devido à análise de PSH ter sido realizada após a extração do glúten na farinha. Comparando três diferentes aptidões tecnológicas (fraca, média e forte), estas apresentaram valores similares ao longo do desenvolvimento do grão, e isto pode ser explicado pela ligação do SH à glutatona (33) ou por ligações irreversíveis a outros compostos. Este mesmo resultado pode explicar o perfil oxidado de algumas amostras como Marfim, Ametista e ORS1401 (Figura 2). De fato, Ferreira *et al.* (34) a "glutatonilação" de gluteninas é uma etapa intermediária e representa um mecanismo de proteção contra a oxidação irreversível de tióis proteicos, e não uma limitação à polimerização de gluteninas, como descrito anteriormente (35).

Por fim, além da relação com a qualidade do produto final, o grupamento SH possui capacidade redutora, o que faz com que o tiol possua ação antioxidante, oferecendo proteção contra a ação de radicais livres. Por apresentar maior teor de SH, os grãos mais imaturos podem ser associados a maior ação antioxidante. Isso corrobora com a literatura, onde foram avaliados os compostos bioativos, como antioxidantes, ao longo do desenvolvimento do grão de trigo com as mesmas variedades citadas e foi observado que ao longo do desenvolvimento do grão houve redução, uma vez que estes se complexam com proteínas, parede celular e outros compostos (36).

5. CONCLUSÃO

Foi possível acompanhar o estado de oxidação dos grupamentos tióis de proteínas, observando-se um maior teor de tióis nas amostras mais imaturas, que ainda não apresentam ligações dissulfeto formadas, permanecendo com seus tióis reduzidos. Com o desenvolvimento do grão, os teores de tióis diminuíram devido, possivelmente, às pontes dissulfeto (intermoleculares e intramoleculares) formadas ao longo da maturação dos grãos. Embora alguns genótipos tenham apresentado um perfil oxidado com pouca modificação entre as amostras no estágio leitoso e maduro, não foi possível associar os resultados com as diferentes aptidões tecnológicas dos genótipos de trigo analisados. Esses resultados devem ser futuramente relacionados com a distribuição do perfil polimérico de cada amostra, bem como com dados sobre a expressão de chaperonas, enzimas responsáveis pelos processos de formação de pontes dissulfeto.

6. REFERÊNCIAS

1. Shewry PR. Wheat. *J Exp Bot.* 2009;60(6):1537-53.
2. Brasil. Instrução Normativa nº 38, de 30 de Novembro de 2010. 2010.
3. Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2016.
4. ABITRIGO. Associação Brasileira das Indústrias de Trigo. 2018.
5. Faostat. Food and Agricultural organization of the United Nations. 2017.
6. Mapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2017.
7. TORRES GAMS, A.; GAMBIM, E.; TOMAZIN, T. . Proteínas de reserva do trigo: gluteninas. 2009 Contract No.: 117.
8. Wrigley CW. Giant proteins with flour power. *Nature.* 1996;381(6585):738-9.
9. Naeem HA, MacRitchie F. Polymerization of glutenin during grain development in near-isogenic wheat lines differing at Glu-D1 and Glu-B1 in greenhouse and field. *Journal of Cereal Science.* 2005;41(1):7-12.
10. Delcour JA, Joye IJ, Pareyt B, Wilderjans E, Brijs K, Lagrain B. Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3:469-92.
11. Popineau Y, Cornec M, Lefebvre J, Marchylo B. Influence of high M_r glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of gluteins and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat Sicco. *Journal of Cereal Science.* 1994;19(3):231-41.
12. Joye IJ, Lagrain B, Delcour JA. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking – A review. *Journal of Cereal Science.* 2009;50(1):11-21.
13. Singh H, MacRitchie F. Application of Polymer Science to Properties of Gluten. *Journal of Cereal Science.* 2001;33(3):231-43.
14. Ferreira MSL, Samson M-F, Bonicel J, Morel M-H. Relationship between endosperm cells redox homeostasis and glutenin polymers assembly in developing durum wheat grain. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2012;61:36-45.
15. Ferreira MSL, Bonicel J, Rosa NN, Samson MF, Morel MH, editors. How are gluten polymers assembled during grain filling in durum wheat? *Gluten proteins 2009, Xth International Gluten Workshop; 2009; Clermont-Ferrand, France.*
16. Osipova SV, Permyakova MD, Permyakov AV. Role of Non-prolamins Proteins and Low Molecular Weight Redox Agents in Protein Folding and Polymerization in Wheat Grains and Influence on Baking Quality Parameters. 2012.
17. Victorio VCM, Souza GHMF, Santos MCB, Vega AR, Cameron LC, Ferreira MSL. Differential expression of albumins and globulins of wheat flours of different technological qualities revealed by nanoUPLC-UDMSE. *Food Chemistry.* 2018;239:1027-36.
18. Aacc. Approved Methods of Analysis. 11^a ed ed. MN, U.S.A: S. P. AACC International; 2010.
19. BRASIL. Instrução normativa nº 8, 03 jun. 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo.: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**; 2005. p. 91.
20. Aacci. Approved methods. In 10th ed.). Minneapolis, MN: American Association of Cereal Chemists International. 2000.

21. Morel MH, Bonicel J. New investigations of disulphide bounds of wheat proteins by dithioerythritol (DTE) reduction. In C. W. Wrigley (Ed.) ed. Royal Australian Chemical Institute: Melbourne, Australia: Proceedings of the Sixth International Gluten Workshop; 1996. p. 257-61.
22. Dupont FM, Altenbach SB. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*. 2003;38(2):133-46.
23. Ferreira MSL, Martre P, Mangavel C, Girousse C, Rosa NN, Samson M-F, et al. Physicochemical control of durum wheat grain filling and glutenin polymer assembly under different temperature regimes. *Journal of Cereal Science*. 2012;56(1):58-66.
24. Faroni LRD, Berbbert PA, Martinazzo AP, Coelho EM. Qualidade da farinha obtida de grãos de trigo fumigados com dióxido de carbono e fosfina. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2002;6(1807-1929):354-7.
25. Costa MS, Scholz MBdS, Franco CML. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. *Food Science and Technology*. 2013;33(0101-2061):163-70.
26. Denčić S, Mladenov N, Kobiljski B. Effects of genotype and environment on breadmaking quality in wheat. *International Journal of Plant Production*. 2011;5:71-82.
27. Iametti S, Bonomi F, Pagani MA, Zardi M, Cecchini C, D'Egidio MG. Properties of the protein and carbohydrate fractions in immature wheat kernels. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(26):10239-44.
28. Grimwade B, Tatham AS, Freedman RB, Shewry PR, Napier JA. Comparison of the expression patterns of genes coding for wheat gluten proteins and proteins involved in the secretory pathway in developing caryopses of wheat. *Plant molecular biology*. 1996;30(5):1067-73.
29. Katagiri M, Masuda T, Tani F, Kitabatake N. Expression and Development of Wheat Proteins during Maturation of Wheat Kernel and the Rheological Properties of Dough Prepared from the Flour of Mature and Immature Wheat from the Flour of Mature and Immature Wheat. *Food Science and Technology Research*. 2011;17(2):111-20.
30. Zhen S, Dong K, Deng X, Zhou J, Xu X, Han C, et al. Dynamic metabolome profiling reveals significant metabolic changes during grain development of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016;96(11):3731-40.
31. Wang N, Ma S, Li L, Zheng X. Aggregation characteristics of protein during wheat flour maturation. *Journal of the science of food and agriculture*. 2018.
32. Bressiani J, Gutkoski LC. Qualidade da farinha de trigo de grão inteiro em resposta a influência de diferentes tamanhos de partículas: Universidade de Passo Fundo; 2016.
33. Tea I, Genter T, Violleau F, Kleiber D. Changes in the glutathione thiol-disulfide status in wheat grain by foliar sulphur fertilization: consequences for the rheological properties of dough. *Journal of Cereal Science*. 2005;41(3):305-15.
34. Ferreira MSL, Mangavel C, Rogniaux H, Bonicel J, Samson M-F, Morel M-H. A MALDI-TOF based study of the in-vivo assembly of glutenin polymers of durum wheat. *Food Research International*. 2014;64:89-99.
35. Rhazi L, Cazalis R, Lemelin E, Aussenac T. Changes in the glutathione thiol-disulfide status during wheat grain development. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003;41(10):895-902.
36. Santos MCB, Lima LRdS, Nascimento FR, Nascimento TPd, Cameron LC, Ferreira MSL. Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. *Food Research International*. 2018.

Como citar este artigo:

D'Almeida CTS, Santos MCB, Rodrigues SKPM, Ferreira MSL. Monitoramento da oxidação dos tióis proteicos em grãos de trigo imaturos e de diferentes aptidões tecnológicas. *SEMEAR* 2019 ago/dez;1(1):pag 31-42.