



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP  
Telefone: (16) 274 2477 - Fax: (16) 272 5958 - e-mail: [postmaster@cnpdia.embrapa.br](mailto:postmaster@cnpdia.embrapa.br)

ISSN 1413-6244

# COMUNICADO TÉCNICO

Nº 24, jul/98, p. 1-4

## ANÁLISE DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DAS PROTEÍNAS DO GLÚTEN DE TRIGO EM ESTADO SÓLIDO POR FTIR.

Rubens Bernardes Filho<sup>1</sup>  
Rosana Otsuka<sup>2</sup>  
Luiz Alberto Colnago<sup>1</sup>

O trigo é o único cereal cuja farinha forma uma massa coesa que permite a confecção de pães, bolos, macarrão, entre outros produtos. Apesar de a farinha de trigo ter mais de 70% de amido, são as proteínas de reserva do trigo, as prolaminas e gluteninas, que dão à sua farinha, quando umedecida, a propriedade elástica necessária para essas aplicações. Essas proteínas podem ser concentradas, a partir da massa de farinha de trigo, por meio de lavagem exaustiva com água. Nesse processo, além do amido são removidas outras substâncias solúveis em água, resultando em uma massa viscoelástica que corresponde a aproximadamente 10 a 12% da massa seca inicial, denominada glúten (Shewry et al., 1994). São as propriedades viscoelásticas do glúten que permitem que a massa cresça, retendo o gás carbônico formado tanto no processo de fermentação biológica (fabricação de pães) quanto no de fermentação química (fabricação de bolos, biscoitos e etc.). Ao assar a massa, retira-se água, o que torna o glúten rígido, mantendo assim a porosidade gerada no processo de fermentação. A propriedade viscoelástica do glúten também é indispensável no macarrão para que durante o processo de cozimento este não desprenda o amido na água.

Por esses motivos, há um grande interesse científico e tecnológico em determinar a origem molecular da viscoelasticidade do glúten. Os estudos da origem molecular da viscoelasticidade têm sido dificultados pela sua complexidade intrínseca, pois o glúten é formado por dezenas de proteínas de alto peso molecular e insolúveis em água, o que tem dificultado as suas análises com as técnicas de determinação de estruturas tridimensionais, em alta resolução, como a difração de raios X e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

Como as estruturas das proteínas do glúten variam de acordo com o solvente utilizado, foram estudadas as estruturas secundárias das proteínas (ESPs) do glúten de trigo, em estado sólido, utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Esta espectroscopia permite fazer a quantificação das estruturas secundárias de proteínas em estado sólido, na forma de pastilha e filme (Forato et al., 1998b).

<sup>1</sup> Pesquisadores da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Cx. Postal 741, 13560-970 São Carlos SP

<sup>2</sup> Bolsista da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, 13560-970 São Carlos SP

CT/24, CNPDIA, jul/98, p.2

A quantificação das concentrações de ESPs utilizando espectros de FTIR tem sido feita por métodos de aumento de resolução e reconhecimento de padrões (Jackson & Mantsch, 1996). Neste trabalho o método de aumento de resolução não foi usado para a análise do espectro do glúten, em KBr, porque os resultados da quantificação são dependentes dos assinalamentos da posição dos picos associados às estruturas secundárias na banda de amida I. Além disso, as análises com os métodos de aumento de resolução são dependentes de parâmetros de entrada fornecidos pelo operador, tornando estas análises pouco confiáveis (Forato et al., 1998a). Assim, os espectros do glúten foram analisados com o método de reconhecimento de padrões, baseado em decomposição de valor singular. Forato (1996) e Forato et al. (1998b) demonstraram que esse método pode ser usado na análise de espectros de proteínas em KBr, fornecendo previsões similares aos obtidos com as proteínas em solução.

Os espectros foram obtidos com um espectrômetro de infravermelho Perkin-Elmer, modelo Paragon 1000. O equipamento foi mantido em sala com temperatura e umidade controladas. A faixa espectral utilizada foi a compreendida entre os números de onda  $4000$  e  $400\text{cm}^{-1}$ , sendo utilizada resolução de  $4\text{cm}^{-1}$ . Para a aquisição de cada espectro foram realizadas 64 varreduras.

A quantificação das concentrações de ESPs a partir dos espectros de infravermelho foi feita utilizando um método de reconhecimento de padrões baseado no algoritmo de decomposição de valores singulares (Forato et al., 1998b).

Os espectros foram tratados matematicamente da seguinte forma: tiveram linha de base corrigida entre  $2100$  e  $900\text{cm}^{-1}$ , foram normalizados entre  $1800$  e  $1200\text{cm}^{-1}$ , de forma que a soma das absorvâncias de todos os pontos desse intervalo fosse 100 (Forato et al., 1998b).

As amostras das proteínas padrões e das várias preparações do glúten usadas para análise por FTIR, em pastilha de KBr, foram feitas utilizando-se 1 mg de proteína e 100mg de KBr seco. A proteína e o KBr foram triturados em almofariz de ágata. Após isso, o produto obtido foi colocado em pastilhador Perkin-Elmer e comprimido, em prensa hidráulica, com pressão de 10 toneladas, por 2 minutos.

Na figura 1 está um espectro de FTIR do glúten em KBr, na região de  $2100$  a  $900\text{cm}^{-1}$ . Neste espectro estão assinaladas as bandas de amida I e II; também se pode ver o ombro da banda de amida I em  $1740\text{cm}^{-1}$ , devido aos triglicerídeos.

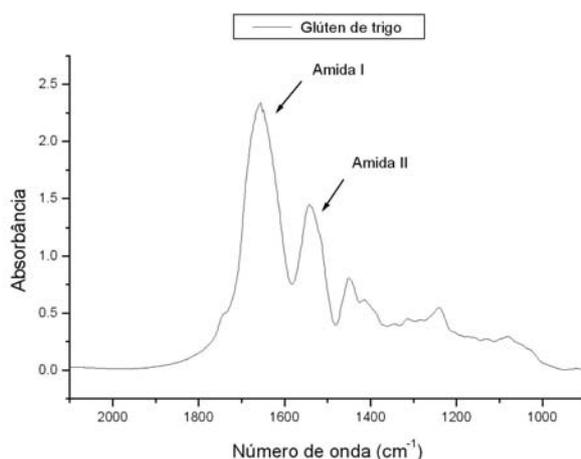


Figura 1 Espectro de FTIR do glúten trigo após a correção da linha de base mostrando a região de número de onda de  $2100$  a  $900\text{cm}^{-1}$ .

CT/24, CNPDIA, jul/98, p.3

A figura 2 mostra uma comparação do espectro da banda de amida I do glúten, em pastilha de KBr, com 3 proteínas com diferentes proporções de estruturas secundárias: a concanavalina A, rica em folhas, o citocromo C, rico em hélice- e a papaína, que possui proporções semelhantes das duas estruturas. Como se pode observar nesses espectros, o glúten tem espectro mais parecido com o do citocromo C e papaína, com um sinal simétrico e centrado em  $1655\text{cm}^{-1}$ . O sinal do glúten é bem diferente do da concanavalina, indicando que as estruturas secundárias das proteínas do glúten são principalmente do tipo hélice-. A quantificação com o método de aumento de resolução apresentou teor de 48% de hélice-, 26% para folha-, 25% para volta- e 14% para outras estruturas. Esse resultado é diferente do observado para o glúten em solução acética, rico em volta-, e na forma de massa, rico em folha-, usando método de aumento de resolução (Pézolet et al., 1992; Belton et al., 1995).

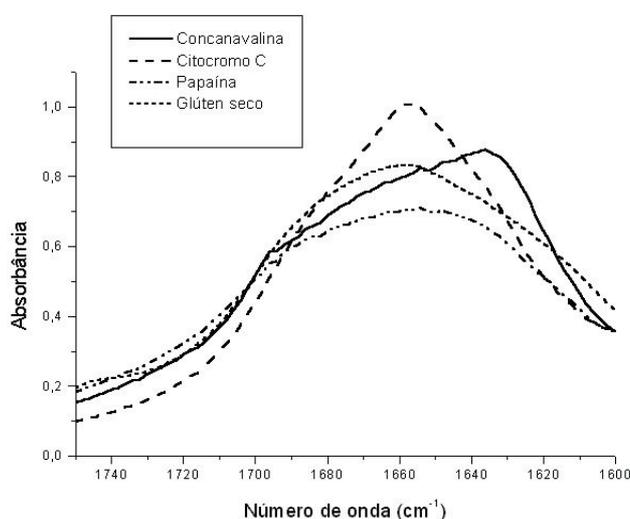


Figura 2 Espectros das proteínas: Concanavalina A, Insulina, Papaína e do glúten seco preparados em pastilha de KBr.

Na tabela 1 estão os dados de quantificação das ESPs do glúten exposto a diferentes temperaturas. Esse experimento foi realizado para avaliar o efeito das temperatura nas ESPs do glúten. Os resultados são similares de 60 a 120 graus centígrados, indicando que as proteínas do glúten têm ESPs bastante estáveis. Essa estabilidade com a temperatura é um fator muito importante para que o glúten mantenha suas propriedades mesmo durante o processo de assar dos pães.

Tabela 1 - Resultado da quantificação das estruturas secundárias do glúten que foi seco em estufa sob diferentes temperaturas. A faixa do espectro utilizadas foi de  $1750$  a  $1600\text{cm}^{-1}$  e a amostra preparada em pastilha de KBr. Dados em valores percentuais.

Temperatura	Hélice-	Folhas-	Voltas-	Outras
60 °C	46.2	21.0	22.5	13.4
80 °C	46.2	21.2	22.1	13.7
100 °C	45.5	21.5	22.4	13.5
120 °C	46.4	21.2	22.2	13.7

CT/24, CNPDIA, jul/98, p.4

#### Referências Bibliográficas

- FORATO, L.A. **Determinação de estruturas secundárias de proteínas em estado sólido, por FTIR.** São Carlos: USP/IQSC, 1996. 130p. Dissertação Mestrado.
- FORATO, L.A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L.A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.5, p.146-50, 1998a.
- FORATO, L.A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L.A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, Washington, v.258, p.136-141, 1998b.
- JACKSON, M.; MANTSCH, H.H. Biomedical infrared spectroscopy. In: MANTSCH, H.H.; CHAMPMAN, D. **Infrared spectroscopy of biomolecules.** New York: Willey-Liss, 1996. Cap.11, p.311-340.
- PÉZOLET, M.; BONEFANT, S.; DOUSSEAU, F.; POPINEAU, Y. Conformation of wheat gluten proteins: comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. **Febs**, v.299, n.3, p.247-250, 1992.
- SHEWRY, P.R.; MILES, M.J.; TATHAM, A.S. The prolamin storage proteins of wheat and related cereals. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Elmsford, v.61, p.37-59, 1994.