

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**Verônica Cristina Mayrinck Victorio**

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS METABÓLICAS DE FARINHAS DE  
TRIGO BRASILEIRO DE DIFERENTES QUALIDADES TECNOLÓGICAS POR  
UPLC-UDMS<sup>E</sup>

Rio de Janeiro

2017

Verônica Cristina Mayrinck Victorio

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS METABÓLICAS DE FARINHAS DE TRIGO  
BRASILEIRO DE DIFERENTES QUALIDADES TECNOLÓGICAS POR UPLC-  
UDMS<sup>E</sup>**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

Rio de Janeiro

2017

V646 Victorio, Verônica Cristina Mayrinck.  
Caracterização das proteínas metabólicas de farinhas de trigo brasileiro de diferentes qualidades tecnológicas por UPLC-UDMS<sup>E</sup> / Verônica Cristina Mayrinck Victorio, 2017.  
81 f. ; 30 cm

Orientadora: Mariana Simões Larraz Ferreira.  
Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

1. Albuminas. 2. Globulinas. 3. Ontologia Genética. 4. Proteômica.  
I. Ferreira, Mariana Simões Larraz. II. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição. III. Título.

CDD – 572.66

Verônica Cristina Mayrinck Victorio

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS METABÓLICAS DE FARINHAS DE TRIGO  
BRASILEIRO DE DIFERENTES QUALIDADES TECNOLÓGICAS POR UPLC-  
UDMS<sup>E</sup>

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Aprovada em: 22 / 2 / 2017

BANCA EXAMINADORA



Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dra. Andrea Furtado Macedo  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dr. Silas Pessini Rodrigues  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dedico este trabalho a Deus, Pai amantíssimo, que me dirigiu e sustentou até aqui. Meu refúgio, minha alegria e minha fortaleza ontem, hoje e para sempre.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPERJ e ao CNPq por financiarem a pesquisa.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Gutkoski e à empresa OR Melhoria de Sementes Ltda. pelo fornecimento das amostras.

À Dra. Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves, coordenadora do PPGAN, pelas conversas, risadas e eficiência na resolução de problemas.

À Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira, minha querida orientadora, por ter aceitado e cumprido, com maestria e passos de *ballet*, a missão de me orientar nesta trajetória.

À Dra. Andrea Furtado Macedo e ao Dr. Silas Pessini Rodrigues, membros da banca examinadora, pelas contribuições que permitiram melhorar este trabalho.

Ao Dr. Gustavo Henrique Martins Ferreira Souza pelo direcionamento e por todo auxílio na execução deste trabalho.

Ao Dr. Andrés Rodríguez Vega pela solicitude e pelo auxílio prestado. *Muchas Gracias!*

À equipe do laboratório de Bioquímica de Proteínas e de Bioativos I.

Ao meu querido *Team Gluten*: Carolina Thomaz, Diego Kalili, Millena Santos, Sônia Rodrigues e Thais Alves, por terem compartilhado comigo erros, acertos, lágrimas e sorrisos, muitos sorrisos. Crescemos muito nesta jornada!

Às queridas Ellen Lopes, Joana Oliveira e Roberta Linhares por estarem sempre prontas a ajudar.

Às meninas da turma de Mestranda 2015/1, principalmente, Caroline Geoffroy, Cinthia de Carvalho, Mônica Cristine e Ticiane Farias, por conversas e incentivos trocados. Foi difícil mas, como no final tudo dá certo, chegou a hora da vitória!

À equipe de nutrição do IEISS pelo incentivo e ajuda de sempre.

Ao Valdemir Matos, amigo querido, pelo auxílio em exatamente tudo o que eu preciso e por nunca dizer “não”.

A todos os meus amigos por me amarem e por terem entendido minha ausência neste período.

À minha amada família por todo amor e boas vibrações enviadas.

Aos meus pais, Adilson Francisco Victorio e Selma Mayrinck Victorio, por sempre dizerem “Vai lá filha, Deus está contigo!” e “Lindinha, Eu te amo”.

Aos meus irmãos Adilson e Anselmo e minhas cunhadas Fabíola e Viviane, à minha irmã Vera e ao meu cunhado Marcus por me levarem sempre no coração.

A todos os meus sobrinhos. Especialmente: Ágatha, Joana, João, Julia e Miguel por sempre virem correndo me abraçar e dizendo “Tia Cissaaaaa!!!”.

À Bárbara Souza Vitorino de Barros, amiga querida, por ser minha fã e por torcer muito pelo meu sucesso.

À Marisete Pio da Fonseca, minha sogrinha, por tudo que faz por nós, incluindo o feijão!

Ao Warllan Pio da Fonseca, meu marido lindo, por cuidar de mim, por enxugar minhas lágrimas, por dizer palavras de incentivo e por ter doado grande parte do nosso tempo para que eu pudesse obter o título de Mestre!

E a todos que, de algum modo, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Deus abençoe cada um de vocês.

Em verdade, em verdade vos digo: se um grão de trigo, caindo na terra, não morrer, fica ele só. Mas se morrer, produz muito fruto.

Jesus (João 12:24)



## RESUMO

O trigo é o segundo cereal mais cultivado no mundo e sua farinha é considerada a matéria-prima mais adequada para a fabricação de pães e massas, devido às propriedades viscoelásticas das proteínas do glúten. As proteínas metabólicas, albuminas e globulinas, representam 20% das proteínas do trigo e compreendem enzimas e inibidores enzimáticos que atuam durante o desenvolvimento do grão. Os poucos estudos proteômicos que caracterizaram essas proteínas focaram no crescimento de grãos submetidos a estresse térmico, realizando eletroforese bidimensional (2-DE) e MALDI-TOF. A utilização de espectrometria de massas (MS) e de estratégias de aquisição independente de dados (DIA) oferece uma nova abordagem para identificar proteínas diferenciais associadas com a qualidade. Neste trabalho, proteínas solúveis foram extraídas de nove cultivares de farinhas de trigo brasileiro (*Triticum aestivum*) de diferentes qualidades tecnológicas, fraca (FR), média (MD) e forte (FO). Os extratos proteicos foram digeridos e os peptídeos foram analisados por cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) e espectrometria de massas de ultradefinição (UDMS<sup>E</sup>). Coletivamente, 5.894 proteínas foram identificadas e quantificadas, com 83% dos peptídeos com erro inferior a 5 ppm e com média de 8 peptídeos/proteína. Apenas 0,5% dos peptídeos sofreram fragmentação na fonte e 13% apresentaram clivagens perdidas. A faixa dinâmica apresentou mais de cinco ordens de grandeza e mostrou a mesma tendência para todas as condições. As amostras apresentaram um total de 414 proteínas diferencialmente expressas, com cerca de 85% proteínas ainda não anotadas na literatura de acordo com sua função biológica. Proteínas relacionadas com a qualidade, como puroindolinas, gliadinas e chaperonas, notadamente envolvidas no processo de enovelamento de proteínas do glúten, apresentaram-se diferencialmente expressas em FO e MD e subexpressas em FR. Foram encontrados domínios relacionados à ação de chaperonas também superexpressos em FO e MD e subexpressos em FR. A aplicação da técnica nanoUPLC-UDMS<sup>E</sup> foi eficaz para identificar proteínas solúveis em trigo e permitiu uma clara distinção das farinhas por qualidade tecnológica por meio de ferramentas quimiométricas, proporcionando uma melhor compreensão da qualidade da farinha de trigo brasileira. Os resultados deste trabalho fornecem novas perspectivas de avaliação da qualidade tecnológica de farinha de trigo brasileiro.

*Palavras-chave:* Albuminas. Globulinas. Ontologia Genética. Predição de Domínios. Proteômica. *Triticum aestivum*.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF METABOLIC PROTEINS OF BRAZILIAN WHEAT FLOURS OF DIFFERENT TECHNOLOGICAL QUALITIES BY UPLC-UDMS<sup>E</sup>

Wheat is the second most cultivated cereal in the world and its flour is considered the most suitable raw material for bread and pasta making due to the viscoelastic properties of gluten proteins. Metabolic proteins, albumins and globulins, represent 20% of wheat proteins and comprise enzymes and enzyme inhibitors that act during grain development. The few proteomic studies that characterized these proteins focused on the growth of grain subjected to heat stress, performing two-dimensional electrophoresis (2-DE) and MALDI-TOF. The use of mass spectrometry (MS) and data independent acquisition strategies (DIA) offers a new approach to identify differential proteins associated with quality. In this work, soluble proteins were extracted from nine cultivars of Brazilian wheat flour (*Triticum aestivum*) of different technological qualities, weak (WK), medium (MD) and strong (ST). Protein extracts were digested and peptides were analyzed by ultra performance liquid chromatography (UPLC) and ultra definition mass spectrometry (UDMS<sup>E</sup>). Collectively, 5,894 proteins were identified and quantified, with 83% of the peptides with error less than 5 ppm and with an average of 8 peptides/protein. Only 0.5% of the peptides undergone in-source fragmentation and 13% showed missed cleavages. The dynamic range presented more than five orders of magnitude and showed the same trend for all conditions. The samples had a total of 414 differentially expressed proteins, with about 85% proteins not yet annotated in the literature according to their biological function. Quality-related proteins, such as puroindolines, gliadins and chaperones, notably involved in the gluten-protein folding process, were differentially expressed in ST and MD and down-regulated in WK. We found domains related to the action of chaperones also up-regulated in ST and MD and down-regulated in WK. The application of the nanoUPLC-UDMS<sup>E</sup> technique was effective to identify soluble proteins in wheat and allowed a clear distinction of the flours by technological quality by means of chemometric tools, providing a better understanding of the Brazilian wheat flour quality. The results of this work provide new perspectives for evaluating the technological quality of Brazilian wheat flour.

*Keywords:* Albumins. Domain Prediction. Gene Ontology. Globulins. Proteomic. *Triticum aestivum*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> O grão de trigo e suas diferentes camadas. Adaptado de Surget e Barron (2005).....	18
<b>Figura 2.</b> Composição das proteínas do trigo: aproximação entre as classificações de Osborne e Shewry.....	19
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas de scouting run (ScRun), obtidos pelo método MS <sup>E</sup> , para cada amostra (fraca -FR, média - MD e forte - FO) apresentados em TIC ( <i>total ion count</i> ). .....	36
<b>Figura 4.</b> Cromatogramas obtidos pelo método HDMS <sup>E</sup> para cada amostra (fraca - FR, média - MD e forte - FO) apresentados em BPI ( <i>base peak intention</i> ).....	37
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas das triplicatas (R001, R002 e R003) da amostra fraca (FR), obtidos pelo método UDMS <sup>E</sup> em BPI ( <i>base peak intention</i> ).....	37
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas das triplicatas (R001, R002 e R003) da amostra média (MD), obtidos pelo método UDMS <sup>E</sup> em BPI ( <i>base peak intention</i> ).....	38
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas das triplicatas (R001, R002 e R003) da amostra forte (FO), obtidos pelo método UDMS <sup>E</sup> em BPI ( <i>base peak intention</i> ).....	38
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas comparativos entre amostras fraca (FR), média (MD) e forte (FO), obtidos pelo método UDMS <sup>E</sup> em BPI ( <i>base peak intention</i> ). .....	39
<b>Figura 9.</b> Histograma de erro de massa de A) fragmentos e B) peptídeos (ppm). ..	40
<b>Figura 10.</b> A) Distribuição do erro de massa (ppm) em relação à massa/carga ( $m/z$ ) e B) Densidade de massa dos peptídeos, considerando massa monoisotópica ( $[M + H]^+$ ).....	41
<b>Figura 11.</b> Tipos de peptídeos identificados. ....	43
<b>Figura 12.</b> Número de peptídeos e proteínas identificadas em cada amostra, fraca (FR), média (MD) e forte (FO). .....	44
<b>Figura 13.</b> Faixas dinâmicas das amostras fraca (FR), média (MD) e forte (FO). ....	45
<b>Figura 14.</b> Percentual de proteínas associadas e não associadas à ontologia genética.....	46

<b>Figura 15.</b> Distribuição das proteínas por função molecular.....	47
<b>Figura 16.</b> Distribuição das proteínas por processos biológicos.....	47
<b>Figura 17.</b> Distribuição das proteínas por componente celular.....	48
<b>Figura 18.</b> Expressão diferencial de proteínas comparando, em pares, as amostras forte (FO), média (MD) e fraca (FR). .....	49
<b>Figura 19.</b> Percentual de distribuição das funções associadas aos domínios das proteínas não anotadas e diferencialmente expressas. ....	53
<b>Figura 20.</b> Análise de componentes principais (PCA) das amostras fraca (FR), média (MD) e forte (FO).....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das farinhas de diferentes cultivares em relação à força do glúten e à estabilidade. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Programação dos métodos cromatográficos para MS <sup>E</sup> , HDMS <sup>E</sup> e UDMS <sup>E</sup> . ....	30
<b>Tabela 3.</b> Teor de umidade e de proteínas das farinhas de diferentes cultivares agrupadas por qualidade.....	34
<b>Tabela 4.</b> Concentração de proteínas nos extratos e diluição para construção do <i>pool</i> . ....	35
<b>Tabela 5.</b> Proteínas anotadas e diferencialmente expressas no estudo. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACC	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
ABITRIGO	Associação Brasileira das Indústrias de Trigo
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASM	Bomba auxiliar
BPI	<i>Base peak intention</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CV	Coefficiente de variância
DDA	Aquisição dependente de dados
DIA	Aquisição independente de dados
DTT	Ditiotreitol
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDR	Taxa de falsos positivos ( <i>false discovery rate</i> )
FO	Forte
FR	Fraca
GFP	[Glu] <sup>1</sup> -fibrinopeptídeo B
HDMS <sup>E</sup>	Espectrometria de massas de alta definição ( <i>High Definition MS<sup>E</sup></i> )
HMW-GS	Subunidades de glutenina de alto peso molecular ( <i>High-molecular-weight glutenin subunits</i> )
IAM	Iodoacetamida
IMS	Espectrometria por mobilidade iônica
Leu-Enc	Leucina-Encefalina
LMW-GS	Subunidades de glutenina de baixo peso molecular ( <i>Low molecular weight - glutenin subunits</i> )
Log <sub>2</sub>	Log <sub>2</sub> de <i>max fold change</i>
-Log	Log <sub>10</sub> negativo de ANOVA
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz- tempo de voo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MD	Média
MS	Espectrometria de massas ( <i>Mass Spectrometry</i> )

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de amônio
PCA	Análise de componentes principais
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PepFrag1	Fragmentados identificados na primeira passagem
PepFrag2	Fragmentados identificados na segunda passagem
ppm	partes por milhão
PU	Número de peptídeos únicos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TIC	Contagem total de íons ( <i>total ion count</i> ).
TOF	Tempo de voo ( <i>time-of-flight</i> )
UDMS <sup>E</sup>	Espectrometria de massas de ultradefinição ( <i>Ultra Definition MS<sup>E</sup></i> )
UPLC	Cromatografia líquida de ultraperformance ( <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	O GRÃO DE TRIGO.....	18
2.2	PROTEÍNAS DO TRIGO.....	19
2.2.1	Proteínas de reserva .....	19
2.2.2	Proteínas metabólicas .....	20
2.3	IMPACTO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA E METABÓLICAS NA QUALIDADE TECNOLÓGICA DO TRIGO .....	21
2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS) .....	22
2.4.1	Métodos MS <sup>E</sup> .....	23
2.4.2	Estudo de proteínas metabólicas do trigo por MS .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
3.1	OBJETIVO GERAL .....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	26
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FARINHAS .....	27
4.3	EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	27
4.4	ETAPA DE DESSALINIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS (CLEAN-UP).....	28
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS EXTRATOS .....	28
4.6	POOL DE AMOSTRAS POR QUALIDADE TECNOLÓGICA.....	29
4.7	DIGESTÃO TRÍPTICA .....	29
4.8	ANÁLISE EM nanoUPLC-MS <sup>E</sup> .....	30
4.9	PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	31
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33



5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FARINHAS .....	33
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS EXTRATOS .....	34
5.3	INJEÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS EM nanoUPLC-MS <sup>E</sup> .....	35
5.3.1	Método MS <sup>E</sup> .....	35
5.3.2	Método HDMS <sup>E</sup> .....	36
5.3.3	Método UDMS <sup>E</sup> .....	36
5.4	DADOS QUALITATIVOS DO EXPERIMENTO .....	39
5.4.1	Fragmentos e peptídeos.....	39
5.4.2	Proteínas .....	43
5.5	ONTOLOGIA GENÉTICA DAS PROTEÍNAS.....	45
5.6	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS .....	48
5.7	PREDIÇÃO DE DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS NÃO ANOTADAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS.....	52
5.8	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) .....	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO A - TABELA COM PARÂMETROS REOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS UTILIZADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DA QUALIDADE TECNOLÓGICA DAS DIFERENTES CULTIVARES DE FARINHA DE TRIGO BRASILEIRO.....</b>	<b>67</b>
	<b>APÊNDICE A – LISTA DE PROTEÍNAS ANOTADAS E NÃO ANOTADAS E DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO ESTUDO.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo é amplamente utilizado na dieta humana por suas características viscoelásticas únicas que permitem a produção de massas e pães (Vensel *et al.*, 2014). Atualmente é o segundo cereal mais cultivado no mundo com uma produção total anual de mais de 730 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016). O Brasil, no entanto, apresenta produção inferior à demanda, sendo obrigado a importar o restante para manter o abastecimento do país e garantir segurança alimentar à população. A produção brasileira de trigo em 2016 foi de 6,7 milhões, enquanto o consumo foi estimado em 10,7 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Produzir trigo de forma competitiva e sustentável tem sido um dos principais desafios da agricultura brasileira, não somente no que tange técnicas de cultivo adequadas, mas também na obtenção de bons rendimentos e qualidade tecnológica (Pires *et al.*, 2011). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de trigo (ABITRIGO), apenas 30% do produto nacional convêm à panificação. Devido à baixa qualidade e concentração de glúten, a maior parte do grão produzido é destinada à produção de farinhas para bolo e biscoitos.

A qualidade tecnológica define a orientação industrial de uso do trigo e está relacionada com a textura e quantidade e qualidade das proteínas de reserva que formam o glúten. A qualidade é determinada pela composição e pela distribuição de massa molecular dos polímeros (Popineau *et al.*, 1994; Pirozi *et al.*, 2008; Dhaka e Khatkar, 2015). No entanto, no Brasil, apenas análises físico-químicas e reológicas, são amplamente empregadas na avaliação da qualidade tecnológica do grão ou da farinha (Aacc, 2000).

Do ponto de vista funcional, em grãos maduros, as proteínas metabólicas (albuminas e globulinas) ou não-prolaminas, compreendem de 15 a 20 % do total de proteína do grão. São compostas por proteínas monoméricas fisiologicamente ativas ou estruturais, principalmente representadas por enzimas metabólicas, reguladoras e protetoras (Goesaert *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2008; Saulnier, 2012). Enquanto que as proteínas de reserva ou prolaminas representam 80-85%, sendo compostas por subunidades monoméricas, gliadinas, capazes de formar pontes dissulfeto intramoleculares, e polipeptídeos de gluteninas, formados por subunidades de alta e

baixa massa molecular, estabilizados por pontes dissulfeto intermoleculares. A massa molecular dos polímeros pode se estender de 100 kDa até mais de 1.000 kDa, tornando-se insolúveis mesmo em tampões desnaturantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) (Wrigley, 1996).

A relação das proteínas de reserva e a qualidade da farinha tem sido bastante estudada. Sabe-se que a distribuição da massa molecular dos polímeros de glutenina e principalmente as frações insolúveis em SDS afetam positivamente a viscoelasticidade do glúten, sendo, portanto os principais contribuintes do potencial tecnológico do trigo (Popineau *et al.*, 1994; Naeem e Macritchie, 2005; Delcour *et al.*, 2012).

Já o impacto das proteínas metabólicas na qualidade do trigo ainda foi pouco estudado (Hill *et al.*, 2008; Osipova *et al.*, 2012; Tomić *et al.*, 2015) e há pouco tempo acreditava-se que elas exerciam pouca ou nenhuma influência na panificação (Goesaert *et al.*, 2005). Contudo, recentemente alguns trabalhos apontaram para a contribuição de certas albuminas, como a fração de 15-30 kDa nas propriedades reológicas da massa, como absorção de água e resistência à extensão (Tomić *et al.*, 2015). Além disso, enzimas como a proteína dissulfeto isomerase (PDI), constituintes dessa fração, podem estar associadas a uma melhor qualidade da farinha, por participar do enovelamento das proteínas de reserva (Kimura *et al.*, 2015).

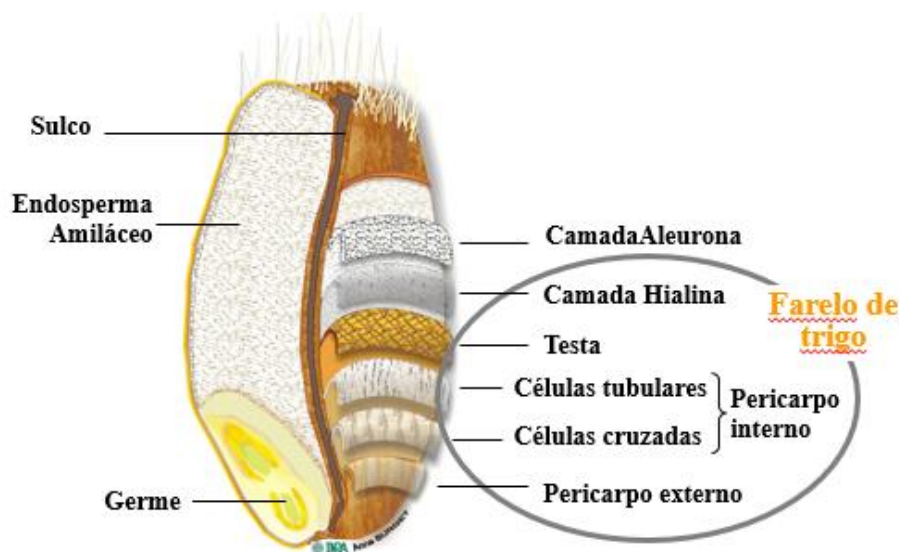
Sabe-se que o conhecimento e o entendimento de proteínas é dificultado por fatores como a possibilidade de amplas combinações aminoacídicas e a complexidade das interações proteicas e enzimáticas (Souza *et al.*, 2017). A espectrometria de massas (MS) é capaz de fornecer alto rendimento de identificação e expressão de proteínas e interações proteína-proteína (Cunsolo *et al.*, 2014). Nesse sentido, abordagens proteômicas com base em técnicas sensíveis e confiáveis, revelam-se como importantes ferramentas de análise das proteínas do trigo (Dupont *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2014; Mejías *et al.*, 2014).

Considerando os fatores expostos acima, que somam-se ao mínimo entendimento atual sobre o trigo do Brasil, este trabalho propõe a caracterização das proteínas metabólicas de farinhas de trigo brasileiro de diferentes cultivares por meio da utilização de abordagens proteômicas como cromatografia líquida de ultraperformance e espectrometria de massas de ultradefinição (UPLC-UDMS<sup>E</sup>).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O GRÃO DE TRIGO

O trigo é um cereal pertencente à família das Gramíneas com inflorescência do tipo espiga, onde as flores crescem ao longo de um eixo. Botanicamente, trigo é uma monocotiledônea por apresentar um só cotilédono na ocasião da germinação (Serna-Saldivar, 2010a). O grão de trigo é chamado de cariopse e é essencialmente composto pelo germe, pelos envelopes externos (farelo) e endosperma (Surget e Barron, 2005) (Figura 1). Cada tecido possui uma estrutura e composição diferente: o germe é rico em lipídeos, vitaminas do complexo B e minerais; os envelopes externos (pericarpo e testa) são ricos em fibras alimentares, e possuem a maior parte das vitaminas, minerais e compostos fenólicos (Hemery *et al.*, 2007). O endosperma constitui-se da camada aleurona e do endosperma amiláceo, este último apresenta células repletas de grânulos de amido incorporados em uma matriz proteica, formada essencialmente por proteínas de reserva (Saulnier, 2012).

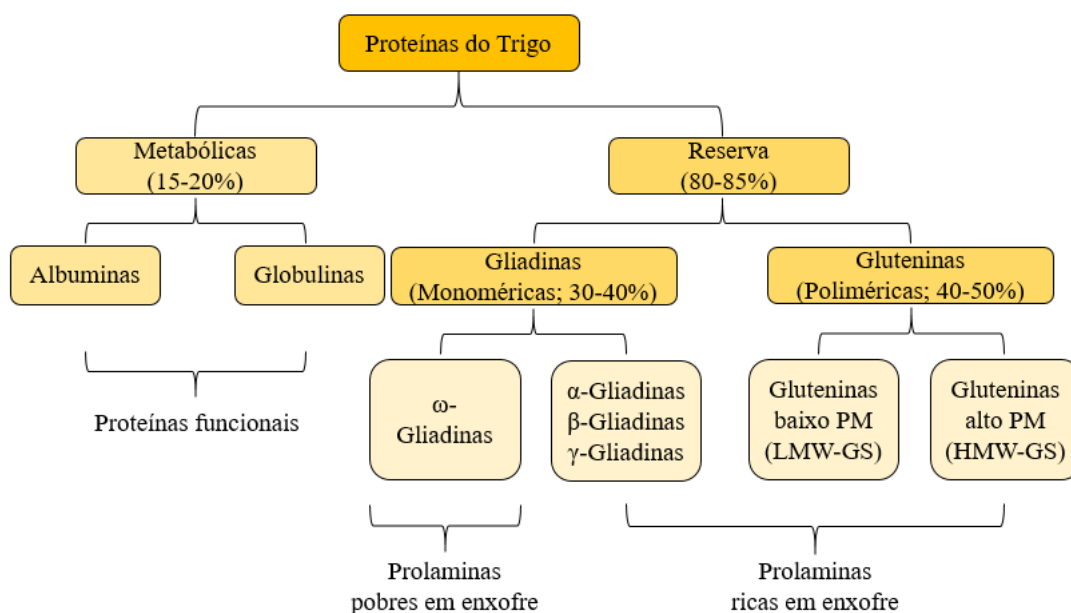


**Figura 1.** O grão de trigo e suas diferentes camadas. Adaptado de Surget e Barron (2005).

Os tipos de trigo de maior interesse comercial são o trigo comum (*Triticum aestivum*), pertencente à espécie hexaploide (AABBDD), mais utilizada na panificação, produção de bolos, biscoitos, massas e produtos de confeitaria, e o trigo duro (*Triticum durum*), espécie tetraploide (AABB), especialmente destinada ao preparo de massas alimentícias (Serna-Saldivar, 2010b).

## 2.2 PROTEÍNAS DO TRIGO

As proteínas do trigo foram divididas por Osborne (1907) em quatro classes de acordo com sua solubilidade, sendo as albuminas solúveis em água, as globulinas em soluções salinas, as gliadinas em soluções alcoólicas e as gluteninas em ácidos ou bases diluídas. Outra classificação foi proposta por Shewry (1986), baseada no grau de polimerização e no teor de aminoácidos sulfurados das proteínas de reserva (ou prolaminas como são genericamente conhecidas no trigo): as gliadinas formam a família das prolaminas monoméricas; e as gluteninas são prolaminas poliméricas constituídas de subunidades de baixo e alto peso molecular, reunidas em agregados estabilizados por pontes dissulfeto (Figura 2). No trigo, o teor de proteína pode variar de 9 a 16% (Saulnier, 2012).



**Figura 2.** Composição das proteínas do trigo: aproximação entre as classificações de Osborne e Shewry.

### 2.2.1 Proteínas de reserva

As proteínas do glúten, gliadina e glutenina, são as principais proteínas de reserva do trigo e são caracterizadas por serem insolúveis em água e por possuírem alto teor de prolina e glutamina (Van Den Broeck *et al.*, 2015). Elas correspondem a 80-85% do conteúdo proteico total do grão e são encontradas principalmente no endosperma amiláceo (Goesaert *et al.*, 2005). Estão divididas em dois grupos de acordo com sua habilidade em formar polímeros através de pontes dissulfeto intermoleculares entre subunidades proteicas (Dahesh *et al.*, 2014). Essas proteínas

estão envolvidas com a qualidade do trigo, que está relacionada com estas ligações (Lutz *et al.*, 2012). As gliadinas, solúveis em álcool, conferem viscosidade e extensibilidade à massa e as gluteninas, insolúveis em álcool, relacionam-se com força e elasticidade (Wieser, 2007; Vensel *et al.*, 2014)

As gliadinas podem ser divididas em  $\alpha/\beta$  -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -gliadinas, com base na mobilidade em gel de eletroforese. Por possuírem pontes dissulfeto intramoleculares, apresentam-se como monômeros, sendo  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas encontradas em maiores proporções do que  $\omega$ 1,2-,  $\omega$ 5-gliadinas. Este fato está relacionado com o genótipo da cultivar e com as condições de crescimento do trigo (Wieser, 2007).

As gluteninas são divididas em subunidades de alto peso molecular (*High-molecular-weight glutenin subunits* - HMW-GS) e de baixo peso molecular (*Low-molecular-weight glutenin subunits* - LMW-GS). Apresentam-se como polímeros porque possuem cisteínas livres que possuem grupamentos tióis (SH), podendo fazer, adicionalmente, pontes dissulfeto intermoleculares (Muccilli *et al.*, 2010; Rombouts *et al.*, 2013; Vensel *et al.*, 2014). Devido à natureza polimérica, o peso molecular das gluteninas pode variar de 500.000 a mais de 10 milhões Da (Wrigley, 1996; Wieser, 2007; Lutz *et al.*, 2012).

### 2.2.2 Proteínas metabólicas

As albuminas e globulinas são proteínas metabólicas conhecidas como não-prolaminas e, em cereais, encontram-se principalmente no farelo do grão e também nas células da camada aleurona que constituem o endosperma (Goesaert *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2015). Estas proteínas compreendem de 15 a 20% do total de proteína do grão e são, principalmente enzimas com peso molecular em torno de 25 kDa, podendo variar de 60 a 70 kDa (Goesaert *et al.*, 2005). Nutricionalmente, são ricas em aminoácidos essenciais como triptofano, metionina e lisina (Khan *et al.*, 2015).

As albuminas são  $\alpha$ -amilases, inibidoras de proteases e outras enzimas com diferentes funções fisiológicas (Tomić *et al.*, 2015). Em estudo recente foram avaliadas a fração albumina de 14 cultivares de trigo, o peso molecular variou 8 a 72 kDa e suas funções biológicas principais foram relacionadas com a quebra do amido

e em outras reações enzimáticas (Khan *et al.*, 2015). Já foi demonstrado que a fração de albumina 15-30 kDa pode ter influência nas propriedades reológicas da massa, especialmente aquelas relacionadas à absorção de água e resistência à extensão (Tomić *et al.*, 2015).

### 2.3 IMPACTO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA E METABÓLICAS NA QUALIDADE TECNOLÓGICA DO TRIGO

A maior parte dos cereais é consumida em alimentos processados e, por isso, o impacto de suas proteínas nas propriedades funcionais do processamento de alimentos deve ser considerado (Shewry e Halford, 2002). No sentido da relação entre as proteínas de reserva e a qualidade da farinha, muitos estudos tem sido realizados (Osipova *et al.*, 2012). A quantidade e a distribuição da massa molecular dos polímeros de glutenina foram há tempos correlacionados com a qualidade em testes tecnológicos e de panificação (Payne *et al.*, 1987). No entanto, a maioria dos estudos focaram apenas nas gluteninas de alto peso molecular (Barak *et al.*, 2013), cabendo ressaltar que uma mistura apropriada das frações de gliadina e glutenina é essencial para as propriedades viscoelásticas da massa e qualidade do produto final (Wieser, 2007). Barak *et al.* (2013) mostraram que cultivares de trigo com composição semelhantes em HMW-GS, mas que possuíam razão gliadina/glutenina diferentes, apresentaram propriedade reológicas diferentes. A quantidade e tipo de subunidade que compõem os polímeros de glutenina de alto peso molecular estão associados com massas fortes, bastante viscoelásticas, resultando em diferenças na qualidade de panificação (Shewry e Halford, 2002; Liu *et al.*, 2012).

Contudo, no que tange a participação das proteínas metabólicas na qualidade do trigo, apenas estudos mais recentes mostram que chaperonas e isomerases estão relacionadas ao enovelamento adequado das proteínas de reserva sintetizadas no retículo endoplasmático (Osipova *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2015). A glicoproteína PDI, pertencente à família da tiorredoxina, possui massa molecular de 60 kDa (Osipova *et al.*, 2012) e atua assegurando que o enovelamento tridimensional e as pontes dissulfeto ocorram corretamente através de modificações pós traducionais (Dong *et al.*, 2012; Osipova *et al.*, 2012), que podem dar origem a polímeros de glutenina regulares, culminando em maior qualidade do glúten (Liu *et*

*al.*, 2012). Futuramente, essas proteínas podem vir a ser utilizadas para manipulação genética do trigo (Kimura *et al.*, 2015).

A família das puroindolinas é composta por lipoproteínas de superfície que apresentam duas isoformas, puroindolina A e puroindolina B, cuja capacidade de ligação lipídica tem sido relacionada com impacto positivo na panificação. Além disso, essas enzimas apresentam estrutura e função similares a proteínas de transferência de lipídios e inibidores de  $\alpha$ -amilase, tornando-se importantes proteínas reportadas na fração de albuminas e globulinas (Osipova *et al.*, 2012). Alguns estudos apontam essas proteínas como a base molecular para dureza do grão. Maior dureza pode estar relacionada com a falta do gene que as codifica ou com mutações genéticas (Lillemo e Morris, 2000; Morris, 2002; Heinze *et al.*, 2016) que podem afetar a capacidade de interação dessas proteínas com lipídeos polares, e a capacidade de estabilização de membranas, levando a uma maior ligação de grânulos de amido com a matriz proteica (Lillemo e Morris, 2000).

Outra classe de proteínas importantes são as amilases, que estão endogenamente presentes na farinha. Farinhas não maltadas, ou seja, que não foram feitas do grão germinado, tem atividade elevada de  $\beta$ -amilase e baixa de atividade de  $\alpha$ -amilase, diminuindo o volume e a qualidade do pão. Para otimizar a atividade de amilase, a farinha geralmente é suplementada com a enzima (Goesaert *et al.*, 2005).

Nesse sentido há cada vez maior necessidade de entendimento da fração de proteínas metabólicas que, apesar de constituírem a fração minoritária das proteínas do trigo, também influenciam na qualidade tecnológica. Cabe ressaltar que todo o estudo a ser realizado, está ainda mais acessível com o progresso e a modernidade das ferramentas proteômicas (Liu *et al.*, 2012).

## 2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

A espectrometria de massas é uma ferramenta essencial para análises proteômicas em larga escala (Distler *et al.*, 2014). Trata-se de uma técnica analítica capaz de fornecer informações moleculares específicas, tais como identificação da sequência de peptídeos, que vem sendo utilizada para identificar peptídeos do grão de trigo (Fiedler *et al.*, 2014).



Em proteômica *shotgun*, as proteínas são digeridas em peptídeos, e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em sequência (LC-MS/MS), em geral, utilizando aquisição dependente de dados (em inglês, DDA) onde há a seleção dos íons precursores mais intensos com base na abundância relativa e estes são fragmentados em série. Esse tipo de método possui limitações como seleção de íons estocásticos e irreprodutíveis, subamostragem, longo ciclo instrumental, perda de informação (precursores não fragmentados), além de tolerar erros na interpretação dos dados de espectros MS/MS compostos que são gerados por peptídeos com sobreposição de relação massa/carga ( $m/z$ ) e tempos de retenção similares (Distler *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2017).

Visando diminuir os problemas supracitados, espectrômetros de massas mais recentes possuem maior resolução e velocidade de sequenciamento, além de ter precisão de massa melhorada, sendo capazes de determinar características estruturais adicionais, como a estrutura primária de proteínas (Cunsolo *et al.*, 2014). Adicionalmente, estratégias imparciais de aquisição denominadas independente de dados (em inglês, DIA) também foram criadas para superar as limitações do DDA (Distler *et al.*, 2014).

#### 2.4.1 Métodos MS<sup>E</sup>

Os métodos MS<sup>E</sup> são métodos DIA onde todos os íons gerados na fonte são transmitidos até a célula de colisão, que alterna entre baixa e alta energia, enviando alternadamente precursores e fragmentos ao analisador. Os resultados desses métodos são mais abrangentes e reprodutíveis porque ocorre a fragmentação simultânea de múltiplos íons precursores, independentemente da intensidade ou de outra característica. Dessa forma, são obtidos dados de massa exata de precursores e fragmentos ao mesmo tempo, tornando-os ideais para análise de amostras complexas por permitirem ampla cobertura de faixa dinâmica (Geromanos *et al.*, 2009; Distler *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2017).

O método de alta definição denominado *High Definition MS<sup>E</sup>* (HDMS<sup>E</sup>) é o método MS<sup>E</sup> acrescido do sistema de espectrometria por mobilidade iônica (em inglês, IMS) que permite que os íons dos peptídeos sejam separados pela sua conformação ao passarem por uma fase gasosa, sendo o tempo de aceleração

proporcional e dependente da mobilidade através do gás. Essa dimensão adicional de separação reduz interferências e melhora a capacidade máxima do sistema, aumentando a seletividade do alinhamento dos precursores com seus produtos, pois a fragmentação ocorre depois do sistema IMS (Distler *et al.*, 2014; Distler *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017)

O método de ultra definição, conhecido como *Ultra Definition MS<sup>E</sup>* (UDMS<sup>E</sup>), é um método otimizado no qual é feita uma rampa de energia de colisão de acordo com os dados obtidos na IMS (energia de colisão específica para o tempo de aceleração). Dessa forma, a eficiência de fragmentação é melhorada, aumentando a intensidade de desempenho MS/MS para sequenciamento de peptídeos. A especificidade da energia de colisão é possível porque os dados de mobilidade iônica correlacionam-se, aproximadamente, com  $m/z$  para todos os estados de carga (Distler *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017). A principal diferença entre os métodos HDMS<sup>E</sup> e o UDMS<sup>E</sup> é que no primeiro, a energia de colisão é fixa, enquanto no segundo, a energia de colisão é específica aos dados de IMS (Distler *et al.*, 2014; Distler *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que a eficiência de fragmentação melhorou em 105% no método UDMS<sup>E</sup> quando comparado com métodos sem mobilidade iônica (Distler *et al.*, 2014).

Em relação ao DDA, que possui as limitações citadas anteriormente, a estratégia DIA, empregada nos métodos MS<sup>E</sup>, só é limitada pela capacidade máxima do instrumento e, nesse sentido, para evitar alargamento dos picos e problemas na identificação de peptídeos e proteínas, deve ser evitada a sobrecarga da coluna (Distler *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017).

A qualidade de um estudo proteômico é analisada com base em informações de fragmentos, peptídeos e proteínas, que são representados em figuras. Para fragmentos é importante que a distribuição do erro de massa dos peptídeos em ppm (partes por milhão) seja normal. Para peptídeos são importantes o percentual de clivagens perdidas e de fragmentação na fonte, a acurácia de massa, a distribuição normal do erro de massa de acordo com a variação de  $m/z$  e o percentual de peptídeos detectados em até 5 ppm. No que concerne aos dados de proteínas é importante avaliar a média de peptídeos por proteína, a taxa de falsos positivos (*false discovery rate* - FDR), o número total de proteínas identificadas e a faixa dinâmica da análise (Souza *et al.*, 2017).

#### 2.4.2 Estudo de proteínas metabólicas do trigo por MS

No campo da espectrometria de massas envolvendo o estudo de proteínas metabólicas do trigo, desde algum tempo, autores apontaram para a necessidade de caracterização e identificação destas proteínas que são menos abundantes (Vensel *et al.*, 2005). Alguns estudos vêm sendo realizados e, a maioria das análises, utilizam eletroforese e MALDI-TOF (ionização e dessorção a laser assistida por matriz- tempo de voo) para análise do grão de trigo. Esses estudos mostram a classificação dessas proteínas de acordo com a função molecular e o processo biológico, cujos principais grupos envolvem metabolismo de carboidratos, resposta ao estresse/defesa e enovelamento/metabolismo de proteínas (Gao *et al.*, 2009; Merlino *et al.*, 2009; Debiton *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2012).

Alguns desses estudos analisaram uma ou duas cultivares de trigo em um determinado estágio de maturação (Hurkman *et al.*, 2009; Debiton *et al.*, 2011), enquanto outros exploraram cultivares em diferentes estágios de maturação (Gao *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2012). Contudo, nenhum deles utilizou uma abordagem que forneça ampla cobertura proteômica de proteínas menos abundantes, com uso de métodos espectrométricos de alta definição e com análise de um *pool* de proteínas de farinhas de trigo agrupadas por qualidade tecnológica em busca de encontrar distinção entre os grupos e um melhor entendimento dessas proteínas. Além disso, não há na literatura nenhum estudo envolvendo farinhas de trigo brasileiro de diferentes qualidades tecnológicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender a relação entre o perfil de proteínas metabólicas e as diferentes qualidades tecnológicas de farinhas de trigo brasileiro através do uso de cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) acoplada à espectrometria de massas de ultradefinição (UDMS<sup>E</sup>).

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar do teor de proteínas totais e umidade das diferentes cultivares de farinha de trigo brasileiro;
- Aplicar o sistema nanoUPLC-UDMS<sup>E</sup> para análise proteômica dos extratos proteicos obtidos;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas nas farinhas de trigo de diferentes qualidades tecnológicas;
- Utilizar a predição de domínios para a compreensão das proteínas diferencialmente expressas e não anotadas na literatura;
- Distinguir as amostras analisadas pela análise de componentes principais (PCA).
- Relacionar o perfil diferencial de proteínas metabólicas com a qualidade tecnológica das farinhas de trigo brasileiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As amostras compreenderam nove farinhas de diferentes qualidades tecnológicas provenientes de diversas cultivares de trigo (*Triticum aestivum*), safra 2014/2015, com colheita e manejo normal de sementes, cedidas pela empresa OR Melhoramento de Sementes Ltda., de Passo Fundo-RS, em colaboração com a Universidade de Passo Fundo (UPF).

As amostras foram selecionadas por apresentarem diferentes qualidades tecnológicas. Análises realizadas previamente pelos nossos colaboradores classificaram as farinhas nas categorias forte (FO), média (MD) ou fraca (FR), conforme mostrado na tabela 1. Para a classificação das farinhas foram considerados como parâmetros a força do glúten e a estabilidade, sendo utilizados métodos da AACC - American Association of Cereal Chemists (AACC, 2010) e da Instrução Normativa MAPA 38/2010 (Brasil, 2010). A força do glúten é determinada pelo método de alveografia, utilizando como parâmetros tenacidade e extensibilidade e a estabilidade, medida em farinógrafo, utiliza os parâmetros tempo de desenvolvimento da massa e absorção de água. Os dados utilizados para a

classificação encontram-se no ANEXO A. As farinhas foram armazenadas em freezer (-20 °C) até o momento da análise.

**Tabela 1.** Classificação das farinhas de diferentes cultivares em relação à força do glúten e à estabilidade.

<b>Cultivar</b>	<b>Classificação</b>
CAMPEIRO	FRACA
ORS VINTECINCO	FRACA
ORS VINTESETE	FRACA
MARFIM	MÉDIA
ORS1401	MÉDIA
ORS1402	MÉDIA
AMETISTA	FORTE
GUABIJU	FORTE
JADEÍTE 11	FORTE

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FARINHAS

Para o teor de umidade, utilizou-se o método de determinação de voláteis totais a 105 °C (AOAC, 1984), utilizando-se 1 g de amostra, em triplicata, que foi colocado em estufa até obtenção de peso constante. A determinação do teor de proteínas totais foi feita pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1984), a partir de 0,25 g de farinha em triplicata. As amostras foram adicionadas de ácido sulfúrico concentrado e aquecidas progressivamente até 400 °C, até obtenção de uma solução límpida. Após a digestão, foram realizadas as etapas de destilação da amônia e titulação com hidróxido de sódio padronizado. O fator de conversão de nitrogênio em proteína foi 5,7.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A extração foi realizada considerando a solubilidade das proteínas-alvo deste trabalho (albuminas e globulinas), segundo a classificação de Osborne (1907). Foram pesados 100 mg de cada amostra em microtubos (1,5 mL, Axygen) e foram

acrescentados 1 mL de tampão 80 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 40 mM iodoacetamida (IAM). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas em shaker (60 min; 200 rpm; 25 °C; TE-420, Tecnal, Brasil). Em seguida, foram centrifugadas (10.600 x g; 10 min; 20 °C; Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Alemanha) e os sobrenadantes foram transferidos para novos eppendorfs (2,0 mL, Axygen). A extração foi repetida, foi feita a união dos respectivos sobrenadantes e os extratos foram armazenados à -20 °C até a utilização. Durante o processo, os microtubos foram mantidos ao abrigo de luz.

#### 4.4 ETAPA DE DESSALINIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS (CLEAN-UP)

Para a etapa de *clean-up* foram utilizados filtros de 4 mL (Amicon 3 kDa, Millipore, Irlanda) previamente lavados com 3,5 mL de água Milli-Q e centrifugados (14.000 x g; 30 min; 4 °C). Então, 1,7 mL de amostra foram colocados no filtro e centrifugados (14.000 x g; 30 min; 8°C). Foram realizadas três lavagens com 1,7 mL de bicarbonato de amônio (50 mM; pH 8,5, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), seguidas de centrifugação (14.000 x g; 60 min; 8 °C). Em seguida, as amostras retidas nos filtros foram pipetadas e depositadas em novos eppendorfs identificados. Durante as etapas, as amostras foram mantidas em gelo e, depois do processo, congeladas em ultrafreezer a -80 °C (IULT 335 D, Indrel, Brasil).

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS EXTRATOS

A partir dos extratos proteicos concentrados obtidos na etapa de *clean-up*, foi realizado o método de quantificação de proteínas de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Partiu-se de uma solução com concentração de 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>, com diluições seriadas até a concentração final de 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>. As leituras foram realizadas em triplicata com dois ensaios em branco. Os extratos proteicos foram diluídos 20 vezes com água Milli-Q. Foram aliquotados, em triplicata, 20 µL de amostra ou padrão e acrescentados 1 mL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). O tempo de reação foi de 5 minutos com

proteção da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (UV-2700, Shimadzu, Japão) a 595 nm.

#### 4.6 POOL DE AMOSTRAS POR QUALIDADE TECNOLÓGICA

Após a quantificação de proteínas, um alíquota de 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi retirada e diluída em quantidades variadas de bicarbonato de amônio (50 mM; pH 8,5) com objetivo de obter concentração aproximada de 1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Foi constituído um *pool* dos extratos proteicos por qualidade tecnológica, a partir de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra, que foram agrupadas de acordo com a classificação de força do glúten em forte (FO), média (MD) e fraca (FR), resultando em três *pools* com volume final de 60  $\mu\text{L}$ .

#### 4.7 DIGESTÃO TRÍPTICA

Iniciou-se a digestão tríptica de cada *pool*, contendo 60  $\mu\text{g}$  de proteínas, adicionando-se 25  $\mu\text{L}$  de solução 0,2% v/v RapiGest SF (Waters Corp. Milford, USA). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas em banho-maria sem agitação (15 min; 80 °C) com temperatura controlada por termômetro. Após centrifugação (14.000 x *g*; 10 min; 4 °C), foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de 100 mM ditioneitol (DTT) em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (50 mM; pH 8,5). As amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex, incubadas em banho-maria (30 min; 60 °C) e depois centrifugadas (14.000 x *g*; 10 min; 4°C). Após adição de 2,5  $\mu\text{L}$  de 300 mM IAM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (50 mM; pH 8,5), as amostras foram agitadas em vórtex e ficaram em temperatura ambiente (em torno de 20 °C), ao abrigo de luz, por 30 minutos. Após reação com IAM, as amostras foram centrifugadas por 30 s em minicentrífuga *spin* (D1008, LAB1000; Brasil) e prosseguiu-se com a digestão. Foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) preparada em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (50 mM; pH 8,5), sendo a razão enzima:proteína de 1:60. As amostras passaram novamente pelo vórtex e minicentrífuga, e foram incubadas em bloco aquecedor (12 h; com agitação; 37 °C; MD-01N, Major Science, Taiwan) onde permaneceram *overnight*. Após essa etapa, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de 5% ácido trifluoroacético (TFA), seguindo-se com incubação em bloco aquecedor (90 min: sem agitação; 37 °C) e centrifugação (14.000 x *g*; 90 min; 4 °C). Os sobrenadantes foram transferidos,

centrifugados (14.000 x g; 60 min; 4 °C) e colocados em *vials* do tipo *total recovery* (Waters Corp.) para análise proteômica.

#### 4.8 ANÁLISE EM nanoUPLC-MS<sup>E</sup>

A análise em nanoUPLC dos peptídeos tripsinizados foi realizada usando um sistema nanoACQUITY UPLC (Waters Corp., Milford, MA), acoplado ao espectrômetro de massas de alta definição (Synapt G2-S HDMS, Waters Corp., Manchester, UK), com sistema de mobilidade iônica e analisador híbrido do tipo quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF, time-of-flight-TOF). O sistema cromatográfico foi equipado com uma coluna de captura nanoEase BEH130 C18 (5 µm, 180 µm x 20 mm; Waters Corp., USA) e coluna de fase reversa nanoAcquity HSS T3 C18 (1,8 µm, 100 µm x 100 mm; Waters Corp., USA). Utilizou-se a fase móvel A constituída por água ultrapura e fase móvel B de acetonitrila, ambas adicionadas de 0,1% (v/v) de ácido fórmico. As amostras foram mantidas a 8 °C, enquanto que a temperatura da coluna foi de 55 °C. As programações dos métodos cromatográficos utilizados encontram-se na tabela 2.

**Tabela 2.** Programação dos métodos cromatográficos para MS<sup>E</sup>, HDMS<sup>E</sup> e UDMS<sup>E</sup>.

<b>Método</b>	<b>Minutos</b>	<b>Fluxo (ηL.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>% A</b>	<b>%B</b>
<b>MS<sup>E</sup></b>	Inicial	600	93	07
	7,20	600	60	40
	8,51	600	15	85
	11,13	600	15	85
	12,44	600	93	07
<b>HDMS<sup>E</sup> e</b>	Inicial	600	93	07
<b>UDMS<sup>E</sup></b>	1,31	600	93	07
	91,31	600	60	40
	92,61	600	15	85
	95,23	600	15	85
	96,54	600	93	07



Primeiramente foram realizadas corridas de prospecção (*scouting run*) com injeção de 1 µL de amostra e duração de 20 minutos, utilizando método de aquisição multiplex (MS<sup>E</sup>) (Silva *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006). Em seguida, foi realizado o método multiplex de alta definição com sistema de mobilidade iônica HDMS<sup>E</sup> (Geromanos *et al.*, 2011), para diferenciar peptídeos por massa, estado de carga e conformação através do tempo de aceleração (*drift time*). Neste método, foram injetados 2 µL de amostra e o tempo de corrida foi de 90 min. Os espectros obtidos foram então processados no software DriftScope (Waters Corp.) e os dados foram utilizados para construção do método de ultra definição (UDMS<sup>E</sup>) (Distler *et al.*, 2014), que foi realizado em triplicata com tempo de 90 minutos cada. Nesse método foram injetados 2,5 µL da amostra FR, 3 µL da MD e 3,3 µL da FO e a normalização das quantidades injetadas de cada amostra foi feita a partir do cálculo da área total dos cromatogramas obtidos no *scouting run*. Foram feitas injeções de lavagem após as triplicadas de cada amostra. Em todos os métodos houve aplicação simultânea de baixa (6 eV) e alta energia para fragmentação (15 a 55 V).

Todas as análises foram realizadas em modo resolução com um poder de resolução mínimo de 35.000 (FWHM, do inglês *Full width at half maximum*, ou seja, largura à meia altura) com nanoelectrospray operando em modo positivo (nanoESI+). A temperatura da fonte de íons foi de 70 °C e a voltagem do capilar foi de 2,8 kV. A solução do calibrante foi liberada pela bomba auxiliar (ASM) com fluxo constante de 250 nL.min<sup>-1</sup> e concentração equimolar de Leu-Enc (Leucina Encefalina; *m/z* 556,2771) e GFP ([Glu]<sup>1</sup>-fibrinopeptídeo B) de 200 fmol.L<sup>-1</sup>. O analisador TOF foi calibrado com íons correspondentes aos fragmentos b<sup>+</sup> e y<sup>+</sup> (MS/MS) e a correção considerou a massa do íon precursor GFP duplamente protonado  $[M + 2H]^{2+} = 785,8426$ . O instrumento foi ajustado para transmissão de íons de massa entre *m/z* 50 e 2000, o tempo de varredura foi de 0,5 s e a magnitude da tensão elétrica do cone de 30 V.

#### 4.9 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Para identificação e quantificação de peptídeos e proteínas foi utilizado o *software Progenesis QI for Proteomics v.2.0* (Nonlinear Dynamics, USA), alimentado com o banco de dados de proteínas de *Triticum aestivum* do UNIPROT release

2016-07 (<http://www.uniprot.org>). Foi criado também banco de proteínas reversas utilizando o software ProteinLynxGlobalServer (PLGS) (Waters Corp., Manchester, UK) para monitorar a taxa de falsos positivos (*false discovery rate* - FDR) e os códigos foram removidos antes da classificação por ontologia genética e das análises de expressão e predição de domínios.

Para a busca no banco de dados foram então utilizados os seguintes parâmetros: tripsina foi selecionada como enzima, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável, massa máxima de proteínas de 250 kDa e apenas uma clivagem perdida por peptídeo. A taxa de FDR permitida foi menor que 4% e a tolerância de íons precursores (10 ppm) e fragmentos (20 ppm) foi determinada automaticamente. Para pareamento de íons, foram estipulados um ou mais fragmentos por peptídeo, três ou mais fragmentos por proteína e um ou mais peptídeos por proteína. Para a identificação de proteínas, a exatidão de massa aplicada foi inferior a 10 ppm e *score* maior que 3. Os parâmetros MS<sup>E</sup> foram: contagem de 150 íons para limite de energia baixa, 50 para limite de energia elevada e 750 para limite de intensidade.

A quantificação relativa das proteínas entre as amostras foi determinada a partir das intensidades absolutas obtidas, considerando-se que a resposta média do sinal dos espectros dos três peptídeos mais intensos por mol de proteína é constante dentro de um coeficiente de variação inferior a 10%, conforme demonstrado em Silva *et al.* (2006).

A classificação das proteínas por ontologia genética foi realizada através da plataforma *PatternLab for Proteomics* v. 4.0.0.62. O filtro utilizado foi de proteínas que aparecem em 3 das 3 replicatas, em todas as amostras, sendo, então, selecionados todos os códigos de proteínas não anotadas e apenas o primeiro código das linhas de proteínas anotadas. Foram retirados códigos redundantes.

Para obtenção dos dados de expressão, as amostras foram comparadas em pares (FO vs. FR, MD vs. FR e FO vs. MD) e os seguintes filtros foram utilizados: coeficiente de variância (CV máximo de 30%), *max fold change* (+/- 1,2 log<sub>2</sub>) e ANOVA (p<0,05). Foram consideradas apenas proteínas coexistentes nos pares de condições comparadas e que estavam presentes nas 3 replicatas (3/3).

Para predição de domínios foi utilizada a base de dados de famílias de proteínas Pfam 30.0 (junho 2016; 16.306 entradas; <http://pfam.xfam.org>), sendo empregados apenas os códigos relacionados a proteínas não anotadas que foram diferencialmente expressas nos gráficos de expressão (super e subexpressas).

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os dados de caracterização físico-química, foi feita a análise de variância (ANOVA) pelo software XLSTAT (ADDINSOFT) utilizando o teste de Tukey para a comparação das médias, considerando  $p < 0,05$  como diferença significativa.

Foi realizada a análise de componentes principais (PCA) utilizando-se o software *Progenesis Q1 for Proteomics* v.2.0 (Nonlinear Dynamics, USA) para analisar a distinção entre grupos de diferentes qualidades tecnológicas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FARINHAS

A análise do teor de umidade das amostras permitiu a quantificação de proteínas em base seca e a análise do teor proteico foi necessária para nortear a diluição dos extratos proteicos para quantificação de proteínas pelo método de Bradford. O teor de umidade (tabela 3) variou de 10,4 a 14,1%, enquanto o teor de proteínas variou de 11,4 a 16,9%, contudo as médias dos valores agrupados por qualidade tecnológica não foram estatisticamente diferentes ( $p=0,53$  e  $p=0,66$ , respectivamente). Dessa forma, não foi possível estabelecer relação entre a classificação das farinhas e o teor de proteínas, tendo as farinhas um teor médio de 14,2%, 13,2% e 14,6%, respectivamente para as amostras de classificação fracas, médias e fortes. Este resultado corrobora trabalhos anteriores que apontam que a qualidade da farinha e, conseqüentemente da massa, está associada à qualidade e não à quantidade de proteínas totais (Denčić *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013).

Os teores de umidade de todas as amostras analisadas apresentaram-se menores ao valor máximo de umidade em farinhas (15%) permitido pela legislação vigente (Brasil, 2005). O teor de umidade é um dos mais importantes parâmetros porque assegura maior estabilidade durante a estocagem. Está inversamente

relacionado com a matéria seca e afeta o rendimento de produtos processados. Teores de umidade abaixo do limite máximo permitido normalmente asseguram a conservação da qualidade das farinhas durante a estocagem comercial, uma vez que alto teor de umidade favorece deterioração por fatores intrínsecos e extrínsecos (Serna-Saldivar, 2010c).

**Tabela 3.** Teor de umidade e de proteínas das farinhas de diferentes cultivares agrupadas por qualidade.

<b>Cultivar</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Proteínas* (%)</b>
CAMPEIRO	10,68 ± 0,28 <sup>B</sup>	16,86 ± 0,72 <sup>A</sup>
ORS VINTECINCO	10,57 ± 0,26 <sup>B</sup>	12,16 ± 1,01 <sup>CD</sup>
ORS VINTESETE	14,12 ± 0,31 <sup>A</sup>	13,52 ± 0,38 <sup>BCD</sup>
<b>Valor médio (fracas):</b>	<b>11,79 ± 2,02</b>	<b>14,18 ± 2,42</b>
MARFIM	10,66 ± 0,91 <sup>B</sup>	14,71 ± 0,72 <sup>ABC</sup>
ORS1401	11,01 ± 0,29 <sup>B</sup>	13,30 ± 1,29 <sup>CD</sup>
ORS1402	11,02 ± 0,23 <sup>B</sup>	11,44 ± 1,24 <sup>D</sup>
<b>Valor médio (médias):</b>	<b>10,90 ± 0,20</b>	<b>13,15 ± 1,64</b>
AMETISTA	10,98 ± 0,28 <sup>B</sup>	12,94 ± 1,45 <sup>CD</sup>
GUABIJU	10,77 ± 0,07 <sup>B</sup>	16,18 ± 0,88 <sup>AB</sup>
JADEÍTE 11	10,44 ± 0,32 <sup>B</sup>	14,62 ± 0,38 <sup>ABC</sup>
<b>Valor médio (fortes):</b>	<b>10,73 ± 0,27</b>	<b>14,58 ± 1,62</b>

\*Percentual de proteína em base seca; Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS EXTRATOS

A quantificação de proteínas dos extratos proteicos foi realizada após a etapa de concentração de proteínas, com o objetivo de permitir a diluição das amostras para a concentração aproximada de  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Na tabela 4 estão apresentados os resultados da quantificação, bem como os volumes de amostra e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  utilizados nas diluições. As farinhas consideradas fracas apresentaram maior média de proteínas nesta quantificação ( $20,97 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) quando comparadas com as médias ( $19,03 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e fortes ( $20,71 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), contudo o conteúdo proteico não foi diferente

estatisticamente entre os grupos ( $p=0,91$ ). As amostras apresentaram concentrações entre 11,72 e 20,01  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  de proteínas, com média calculada de 20,24  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  e coeficiente de variação de 25%.

Tabela 4. **Concentração de proteínas nos extratos e diluição para construção do pool.**

Cultivar	Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ )*	Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Bicarbonato de Amônio ( $\mu\text{L}$ )
CAMPEIRO	29,01 $\pm$ 1,75 <sup>A</sup>	2	56,0
ORS	16,15 $\pm$ 0,85 <sup>E</sup>	2	30,5
VINTECINCO			
ORS	17,77 $\pm$ 0,60 <sup>DE</sup>	2	33,5
VINTESETE			
<b>Valor médio:</b>	<b>20,97 <math>\pm</math> 7,01</b>		
MARFIM	23,44 $\pm$ 0,61 <sup>B</sup>	2	45,0
ORS1401	11,72 $\pm$ 0,93 <sup>F</sup>	2	21,5
ORS1402	21,94 $\pm$ 0,27 <sup>BC</sup>	2	42,0
<b>Valor médio:</b>	<b>19,03 <math>\pm</math> 6,38</b>		
AMETISTA	18,39 $\pm$ 0,53 <sup>DE</sup>	2	35,0
GUABIJU	24,27 $\pm$ 0,68 <sup>B</sup>	2	45,5
JADEÍTE 11	19,47 $\pm$ 1,33 <sup>CD</sup>	2	37,0
<b>Valor médio:</b>	<b>20,71 <math>\pm</math> 3,13</b>		

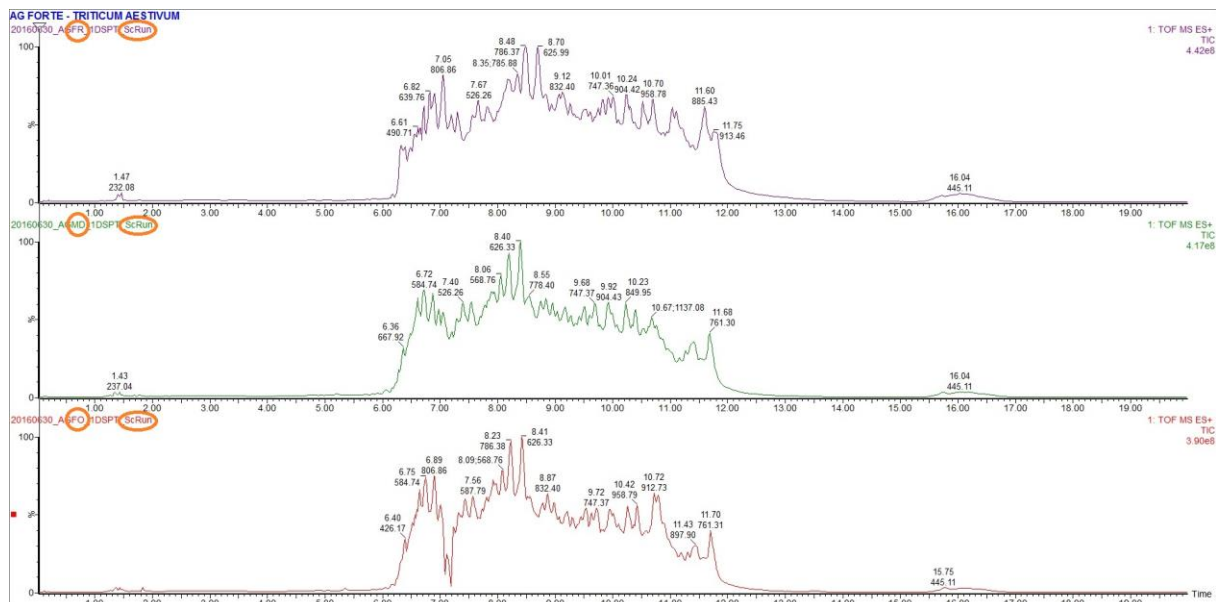
\*Quantificação de proteínas pelo método de Bradford; Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ).

### 5.3 INJEÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS EM nanoUPLC-MS<sup>E</sup>

#### 5.3.1 Método MS<sup>E</sup>

O método MS<sup>E</sup> foi realizado como uma corrida de prospecção, do inglês *scouting run* (ScRun), com o intuito de quantificar o teor de proteínas injetadas em cada amostra, por meio do cálculo da área total dos cromatogramas e, então normalizar as quantidades a serem injetadas para cada amostra no método UDMS<sup>E</sup>. O método escolhido não requer tomada de decisão em tempo real e o espectro é muito abrangente, por abarcar todos os precursores e fragmentos em todos os estados de carga, fatores que constituem vantagens sobre a utilização de DDA (Geromanos *et al.*, 2009). Os cromatogramas obtidos mostraram-se satisfatórios

apresentando uma intensidade de sinal elevada para todas as amostras analisadas ( $> 10^8$ ) (figura 3).



**Figura 3.** Cromatogramas de scouting run (ScRun), obtidos pelo método  $MS^E$ , para cada amostra (fraca -FR, média - MD e forte - FO) apresentados em TIC (*total ion count*).

### 5.3.2 Método $HDMS^E$

O método  $HDMS^E$  foi realizado no intuito de obter dados de mobilidade iônica que permitiram o ajuste do método  $UDMS^E$  em concordância com o tempo de aceleração, uma vez que a mobilidade iônica relaciona-se com  $m/z$  (Distler et al., 2016; Souza et al., 2017). Os cromatogramas obtidos (figura 4) mostram intensidade de sinal satisfatória e similaridade nos perfis cromatográficos das diferentes amostras analisadas.

### 5.3.3 Método $UDMS^E$

O método  $UDMS^E$  foi realizado com sincronismo da saída de relações  $m/z$  com duas ou mais cargas, garantindo que eram sinais de íons de peptídeos. A partir dos dados obtidos por mobilidade iônica, foi possível atribuir energias de colisão específicas para cada  $m/z$  de acordo com o tempo de aceleração (*drift time*) dos precursores, melhorando assim a eficiência de fragmentação (Distler et al., 2016).

A seguir são apresentados os cromatogramas obtidos por UDMS<sup>E</sup>, em triplicata, para cada amostra analisada (Figuras 5 a 7). Nota-se uma similaridade de eluição de picos em todas as amostras, que apresentaram picos mais intensos entre 35 e 45 min e entre 55 e 65 minutos.

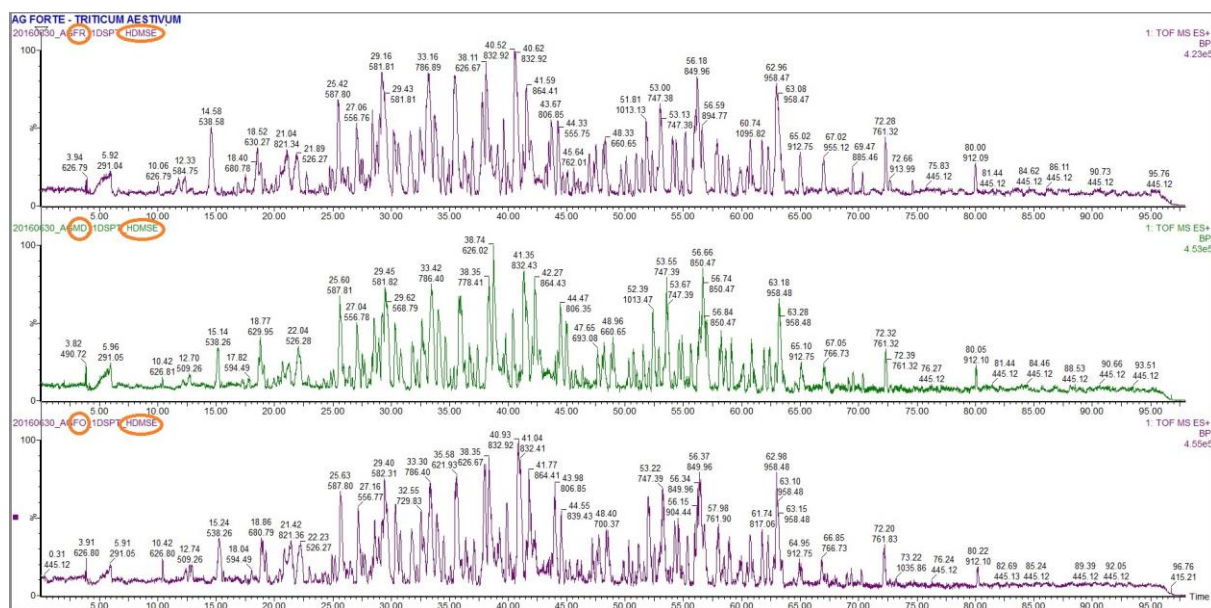


Figura 4. Cromatogramas obtidos pelo método HDMS<sup>E</sup> para cada amostra (fraca -FR, média - MD e forte - FO) apresentados em BPI (base peak intention).

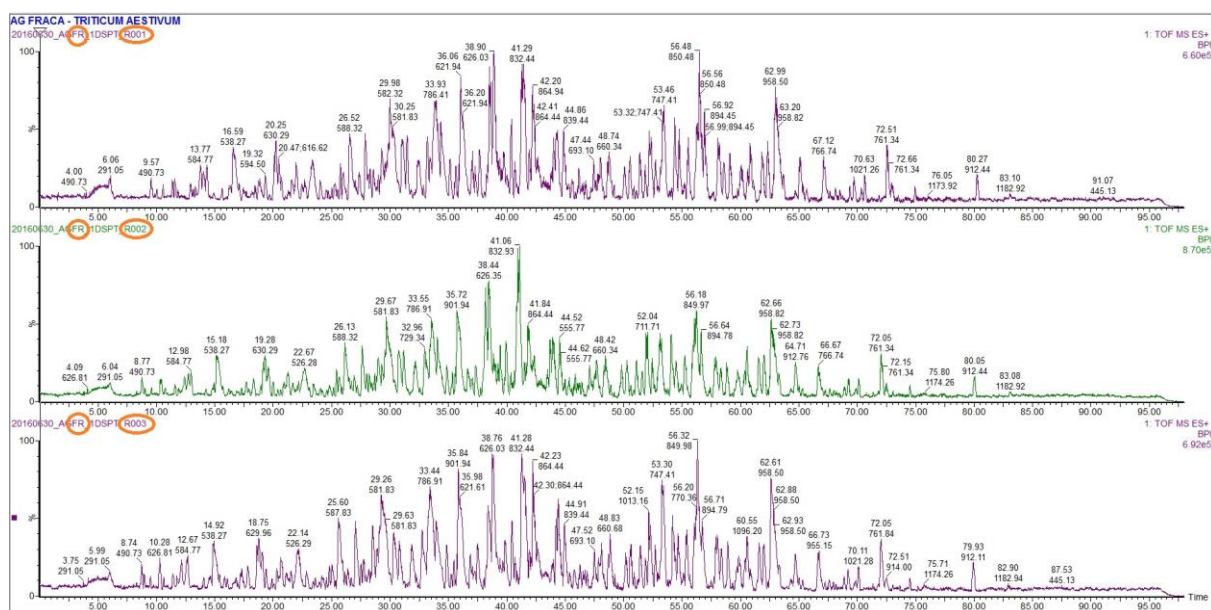


Figura 5. Cromatogramas das triplicatas (R001, R002 e R003) da amostra fraca (FR), obtidos pelo método UDMS<sup>E</sup> em BPI (base peak intention).

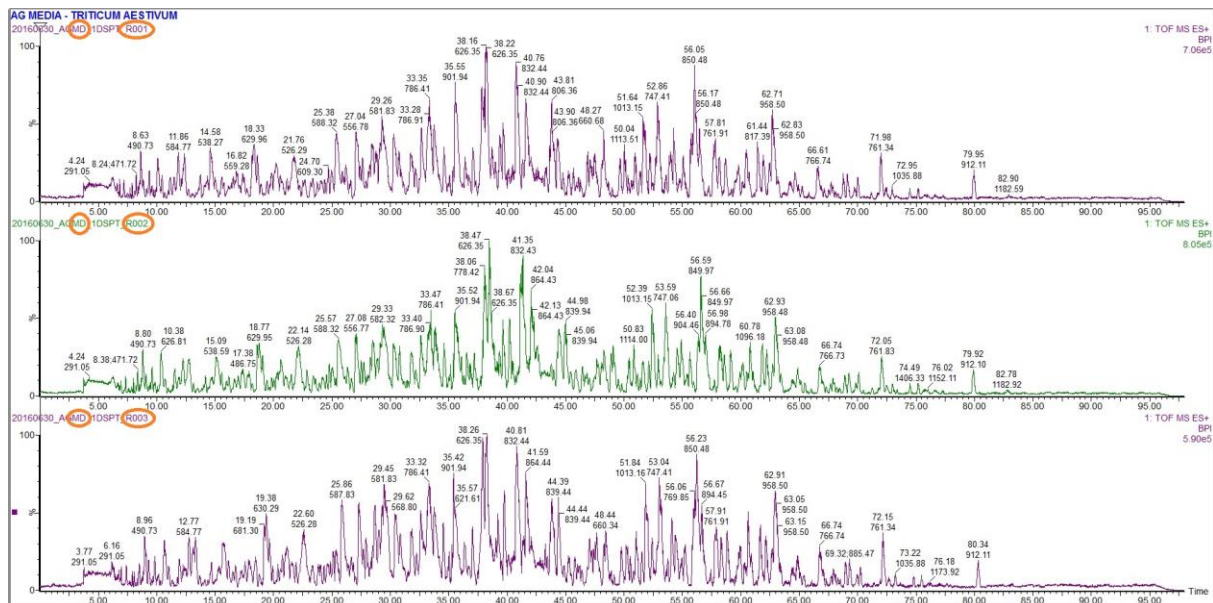


Figura 6. Cromatogramas das triplicatas (R001, R002 e R003) da amostra média (MD), obtidos pelo método UDMS<sup>E</sup> em BPI (*base peak intention*).

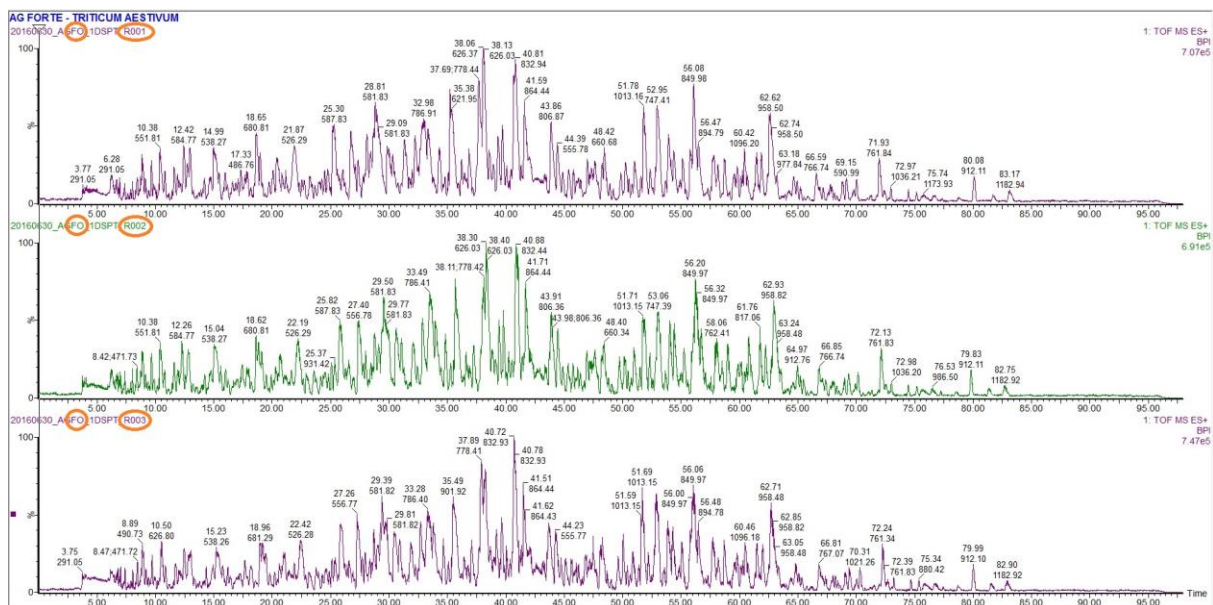
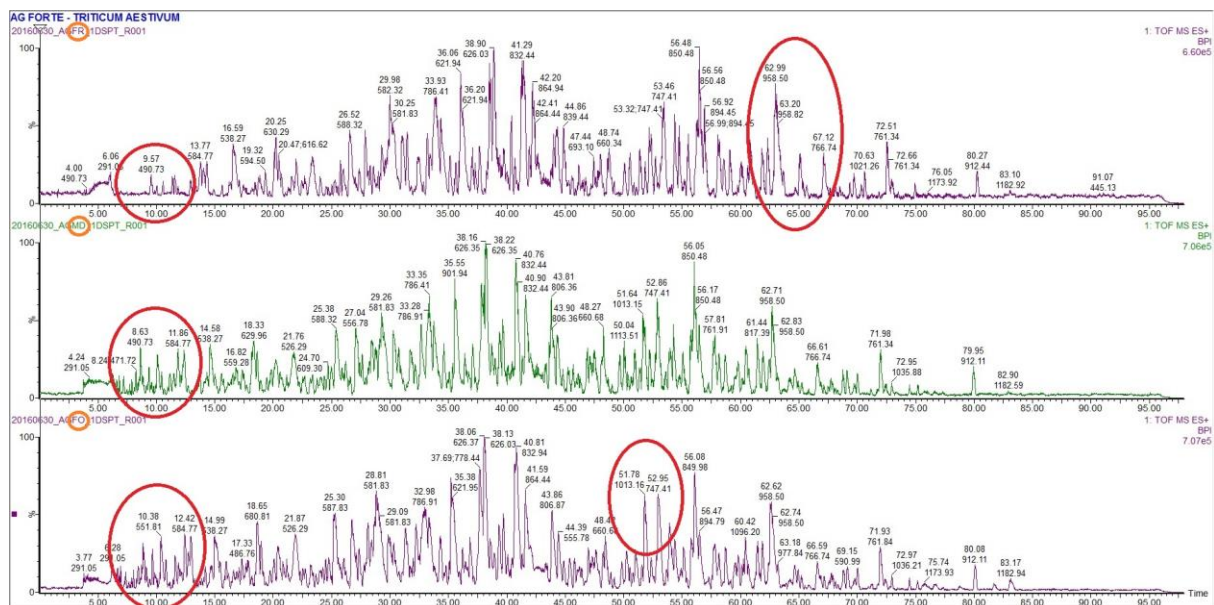


Figura 7. Cromatogramas das triplicatas (R001, R002 e R003) da amostra forte (FO), obtidos pelo método UDMS<sup>E</sup> em BPI (*base peak intention*).

Analisando os cromatogramas comparativos das três amostras (figura 8) é possível observar maior intensidade de picos nas amostras MD e FO em relação à FR no tempo aproximado de 10 min, melhor resolução de pico na amostra FO no tempo entre 50 e 55 min e picos mais intensos para a amostra FR no tempo próximo de 65 minutos.





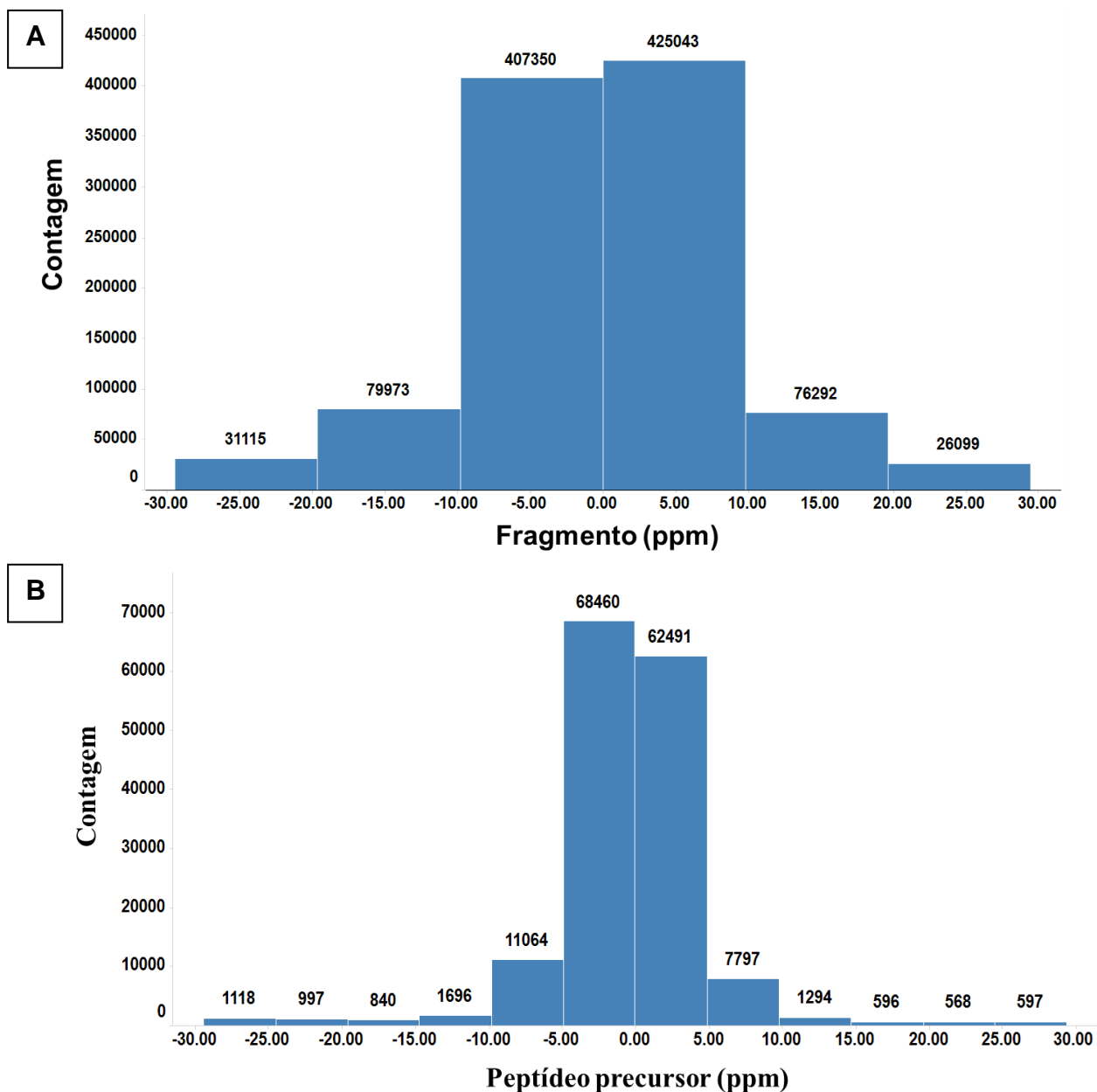
**Figura 8.** Cromatogramas comparativos entre amostras fraca (FR), média (MD) e forte (FO), obtidos pelo método UDMS<sup>E</sup> em BPI (*base peak intention*).

## 5.4 DADOS QUALITATIVOS DO EXPERIMENTO

### 5.4.1 Fragmentos e peptídeos

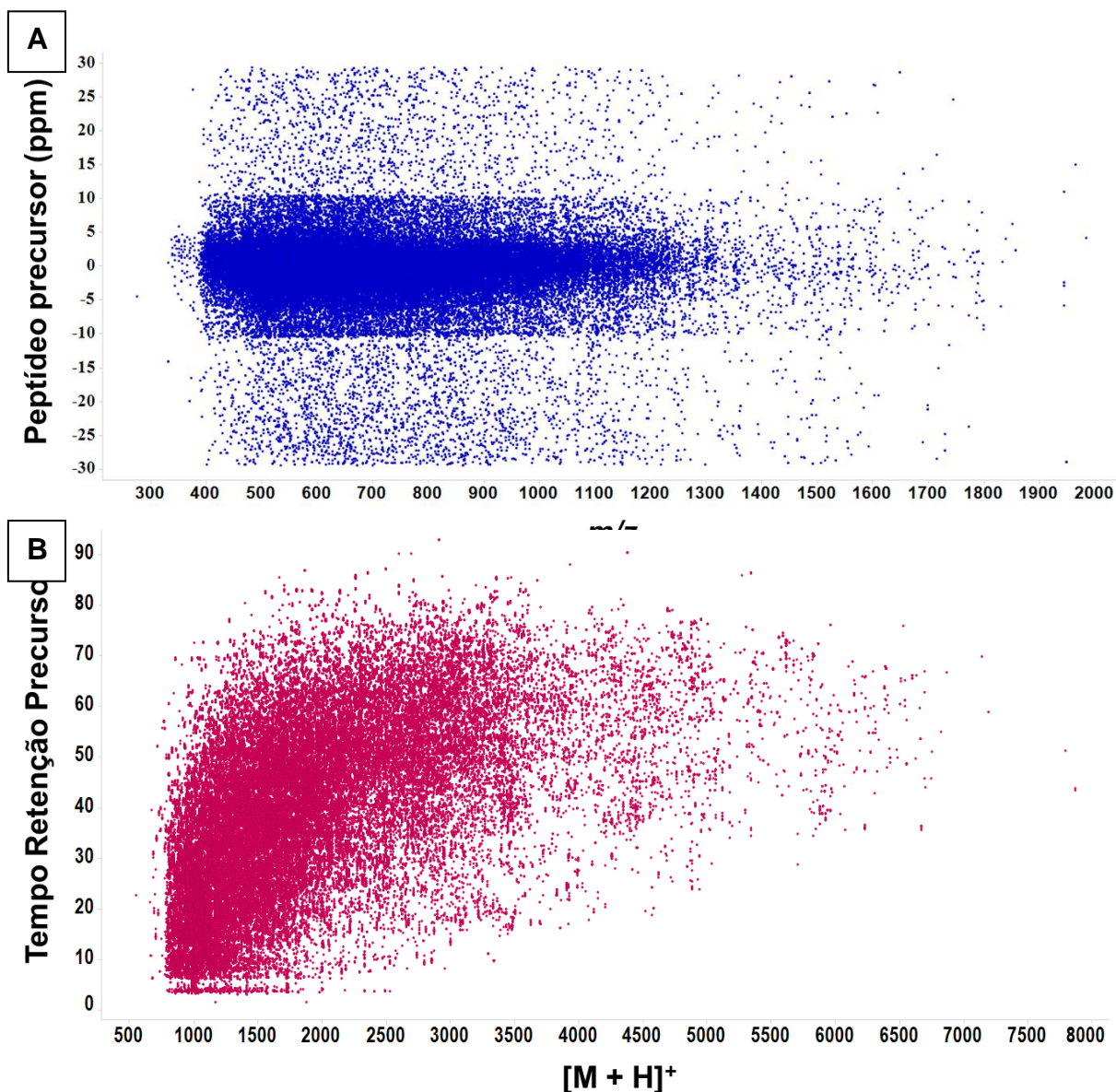
Um total de 1.045.872 fragmentos foram identificados com erro de massa de até 30 ppm, dos quais 832.393, ou seja, cerca de 80% dos fragmentos apresentaram erro menor que 10 ppm (figura 9A), utilizando distribuição do histograma em 6 *bins*. Para os peptídeos, admitindo-se até 5 ppm de margem de erro de massa, obteve-se 130.951 sinais, o que corresponde a 83% do total de 157.518 peptídeos identificados com erro de massa de até 30 ppm (figura 9B). O histograma de erro de peptídeos foi construído em 12 bins e utilizou-se a carga como critério físico-químico de filtro, sendo excluídos sinais apresentando apenas 1 carga, de forma a garantir análise apenas de sinais de peptídeos.

Considerando-se que o histograma de erro tem caráter preliminar em um estudo, a observação de distribuições normais de erro de massa tanto para os fragmentos quanto para os peptídeos, permitiu a continuidade da análise dos dados.



**Figura 9.** Histograma de erro de massa de A) fragmentos e B) peptídeos (ppm).

Foi possível observar uma linearidade da distribuição do erro de massa em relação a  $m/z$  (figura 10A), mostrando que mesmo com o aumento de  $m/z$  o erro é mantido em 5 ppm. Na figura 10B, observa-se um bom mapeamento dos peptídeos identificados, com maior densidade de peptídeos com massa monoisotópica de até 3.500 Da.



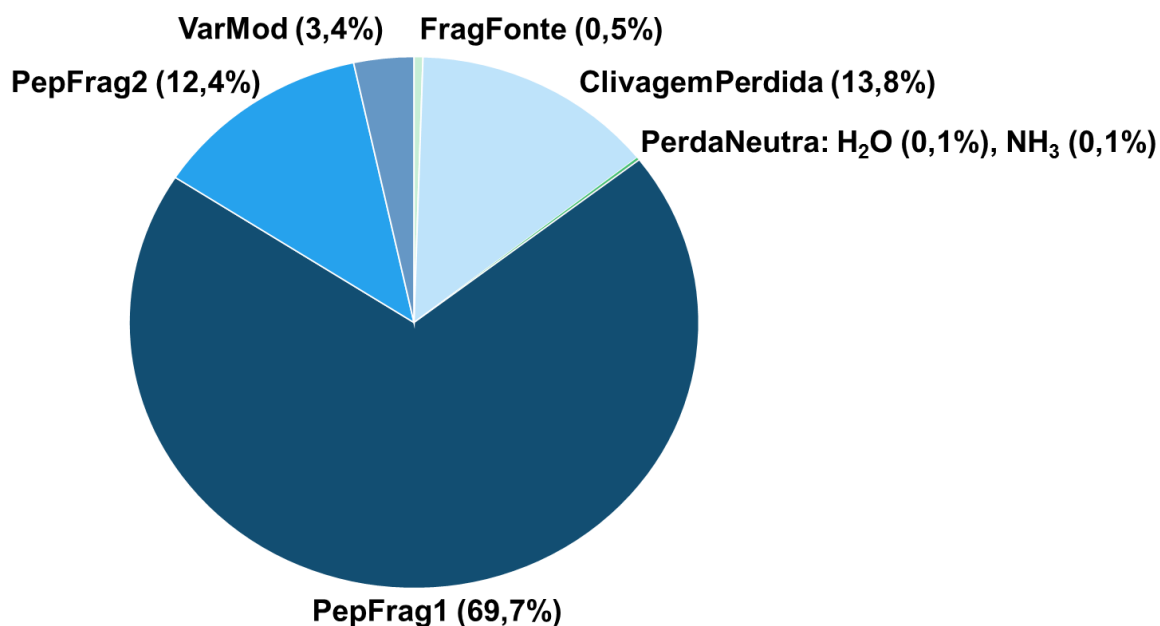
**Figura 10.** A) Distribuição do erro de massa (ppm) em relação à massa/carga ( $m/z$ ) e B) Densidade de massa dos peptídeos, considerando massa monoisotópica ( $[M + H]^+$ ).

Dados qualitativos relacionados aos peptídeos mostram que, dos 157.518 sinais associados a peptídeos, 69,7% foram fragmentados na primeira passagem (PepFrag1) pelo detector, ou seja, esses peptídeos foram os primeiros a serem identificados, enquanto que 12,4% foram identificados na segunda passagem (PepFrag2) (Figura 11). Para que peptídeos sejam identificados na primeira passagem, são considerados, entre outros fatores, apenas peptídeos tripsinizados que não apresentem clivagem perdida, tolerância de massa de precursores de 10 ppm e ao menos três íons de fragmentos com tolerância de massa de 20 ppm. Para identificação na segunda passagem o software assume que os peptídeos podem apresentar formas modificadas que incluem fragmentação na fonte, perda de  $H_2O$  e

NH<sub>3</sub>, clivagens perdidas, metioninas oxidadas, alquilações N-terminais e outras modificações variáveis (Li *et al.*, 2009).

O percentual de fragmentação na fonte foi de 0,5%, indicando que 99,5% da fragmentação ocorreu de forma controlada gerando fragmentos *b*<sup>+</sup> e *y*<sup>+</sup>. O valor encontrado foi considerado satisfatório, comparando-se com estudo que utilizou método de aquisição e equipamento semelhantes, encontrando 12% de peptídeos fragmentados na fonte sem que tal fato afetasse os resultados de identificação de proteínas (Murad e Rech, 2012). A fragmentação na fonte está diretamente relacionada com a energia de dessolvatação na interface do eletrospray da fonte de ionização. A energia de dessolvatação deve ser controlada pela tensão de cone, onde altas energias podem melhorar o rendimento da ionização (necessária para a análise por MS), mas também promover a fragmentação na fonte (Kim *et al.*, 2013). Este resultado indica que a tensão do cone utilizada no presente estudo (30 V) foi eficiente para evitar fragmentação na fonte e corrobora os dados apresentados por Distler *et al.* (2016), que indicam tensão do cone entre 30-35 V para minimizar fragmentação na fonte.

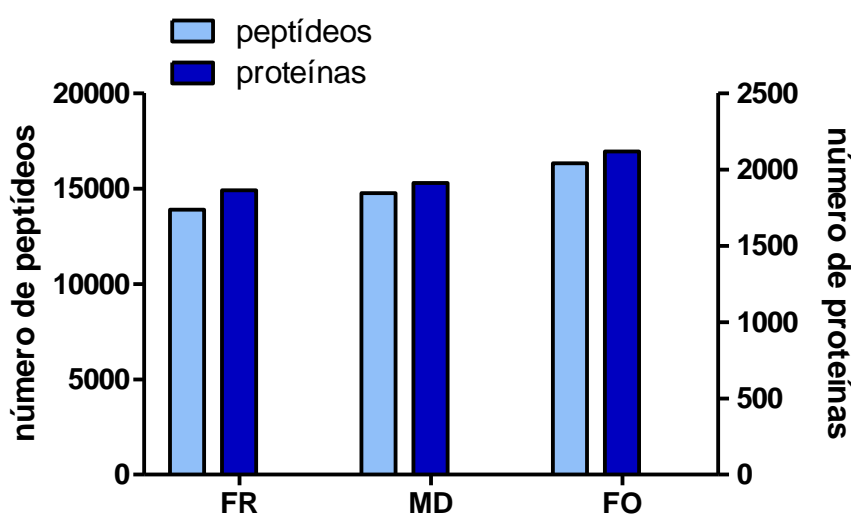
A eficiência da digestão enzimática (tripsina) foi indicada pelo percentual de clivagens perdidas (13,8%), que foi considerado satisfatório quando comparado com estudos prévios que obtiveram um percentual de 17% em estudo proteômico da soja (Murad e Rech, 2012). Clivagens perdidas acontecem quando a tripsina não hidrolisa sítios onde há lisina ou arginina devido à presença de resíduo de prolina, embora este parâmetro seja relacionado com as características da sequência primária da amostra analisada. As proteínas do trigo, principalmente as proteínas do glúten, são conhecidas por possuírem poucos sítios de clivagem e altos teores de resíduos de prolina, em torno de 10-15%, tornando difícil a obtenção de peptídeos tripsinizados e de tamanho adequado para identificação por espectrometria de massas (Vensel *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2014). As albuminas, apesar de apresentarem teor de prolina semelhante às gliadinas e gluteninas, apresentam juntamente com as globulinas cerca de 5 vezes mais resíduos de lisina e arginina (Kent e Evers, 1994).



**Figura 11.** Tipos de peptídeos identificados. PepFrag1 e PepFrag2 correspondem aos pares de peptídeos identificados quando comparados com base de dados no Progenesis QIP, VarMod corresponde às modificações variáveis permitidas, FragFonte corresponde à fragmentação que ocorreu na fonte de ionização, ClivagemPerdida indica sítio de clivagem perdida com uso de tripsina e PerdaNeutra H<sub>2</sub>O e NH<sub>3</sub> correspondem a perdas de água e amônia sofridas pelos precursores, respectivamente.

#### 5.4.2 Proteínas

Utilizando os filtros de 3 peptídeos/proteína e o máximo de 0,3 CV (30% de coeficiente de variância), a taxa de falsos positivos foi de 0,7% para peptídeos e 1,0% para proteínas. Assim, coletivamente em todas as amostras foram identificadas e quantificadas 5.894 proteínas e 44.981 peptídeos, resultando na média de 8 peptídeos por proteína. Este valor corresponde ao dobro do critério mínimo de qualidade utilizado em trabalhos prévios que utilizaram abordagem proteômica para caracterização de proteínas do trigo e que referem média de 3 a 4 peptídeos identificados por proteína (Ferreira *et al.*, 2014). Os valores de peptídeos e proteínas identificados (3/3 replicatas) de cada amostra estão apresentados na figura 12.

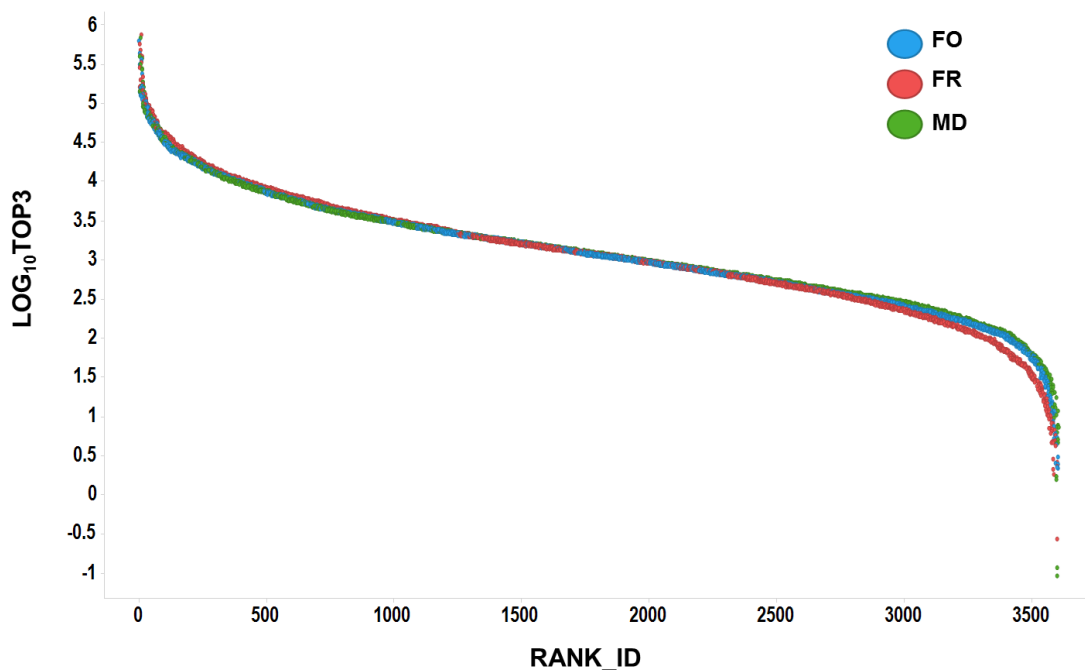


**Figura 12.** Número de peptídeos e proteínas identificadas em cada amostra, fraca (FR), média (MD) e forte (FO).

Atualmente, um dos principais desafios de abordagens proteômicas em amostras complexas é a faixa dinâmica de identificação de proteínas de baixa abundância (Francki *et al.*, 2011; Croote e Quake, 2016). As proteínas são expressas em diferentes concentrações na célula e a concentração de uma determinada proteína pode mudar ao longo do tempo, por isso é muito importante que o espectrômetro de massas seja capaz de detectar todas as proteínas, inclusive as menos abundantes (Souza *et al.*, 2017). As albuminas e globulinas do endosperma do trigo encaixam-se justamente nesta categoria de proteínas menos abundantes e, devido a isso, têm recebido relativamente pouca atenção e, conseqüentemente, são associadas a um papel secundário com relação à qualidade da farinha (Vensel *et al.*, 2005; Merlino *et al.*, 2009; Francki *et al.*, 2011).

Com o avanço das técnicas proteômicas e dos espectrômetros de massas, tem-se observado que uma maior capacidade de faixa dinâmica no instrumento analítico aumenta a identificação de proteínas de menor abundância, especialmente nas abordagens de quantificação livres de marcação (*label-free*) (Souza *et al.*, 2017). Notavelmente, neste estudo a abordagem proteômica utilizada revelou faixas dinâmicas de proteínas detectadas bastante abrangentes, com mais de 5 ordens de grandeza ( $\log_{10} > 5$ ), superando a taxa dinâmica esperada para amostras de sistemas biológicos complexos ( $\log_{10\max} = 3$ ) (Souza *et al.*, 2017). As taxas dinâmicas das

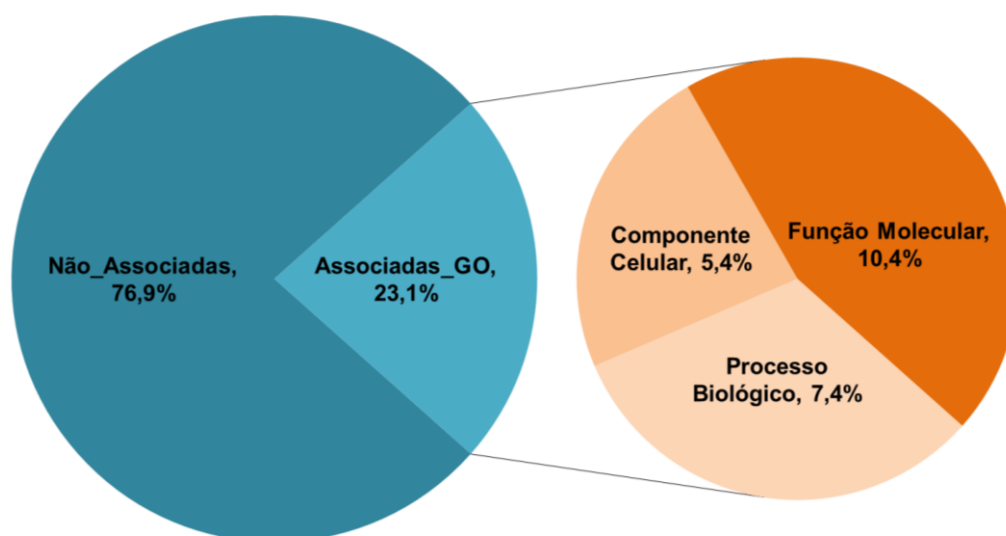
diferentes amostras foram muito semelhantes, indicando similaridade de distribuição quantitativa de expressão intracelular de proteínas (figura 13).



**Figura 13.** Faixas dinâmicas das amostras fraca (FR), média (MD) e forte (FO).

## 5.5 ONTOLOGIA GENÉTICA DAS PROTEÍNAS

A ontologia genética classifica proteínas de acordo com a função molecular exercida, o processo biológico envolvido e o componente celular de localização (Yang *et al.*, 2016). Após aplicação dos filtros, 5.787 códigos de proteínas foram utilizados na análise, contudo, apenas 23% foram classificados de acordo com a ontologia genética (figura 14), sendo 1.022 associações com função molecular, 729 com processo biológico e 528 com componente celular. É importante ressaltar que 80% dos códigos pertencem a proteínas do trigo que ainda não foram anotadas, fato que pode explicar o alto percentual de proteínas não associadas à ontologia genética.



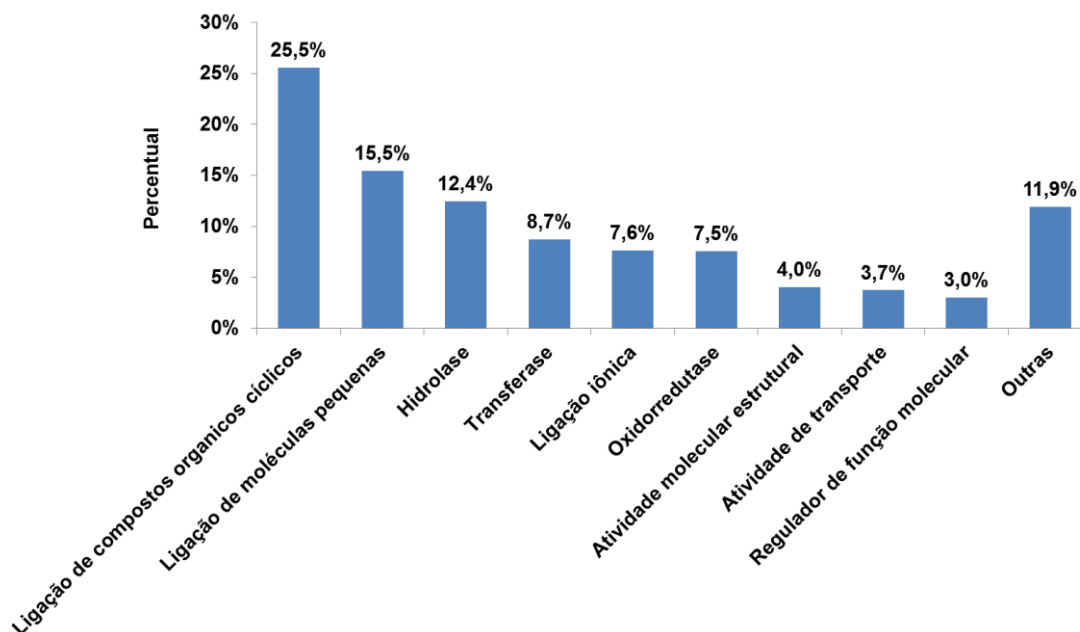
**Figura 14.** Percentual de proteínas associadas e não associadas à ontologia genética.

Em função molecular (figura 15), as principais categorias foram função de ligação (45%), seguidas das proteínas com ação de enzimas, hidrolases, transferases e oxidorreduções (29%), e das proteínas de ligação iônica (9%), estrutural (4%), de transporte (4%) e reguladoras (3%). Ao considerar o papel das proteínas em processos biológicos (figura 16), o maior percentual envolveu processos em organismos simples (38%), seguido da participação no metabolismo de compostos nitrogenados (15,9%), resposta a estímulos (9%), regulação biológica, processo metabólico primário (7%), entre outros.

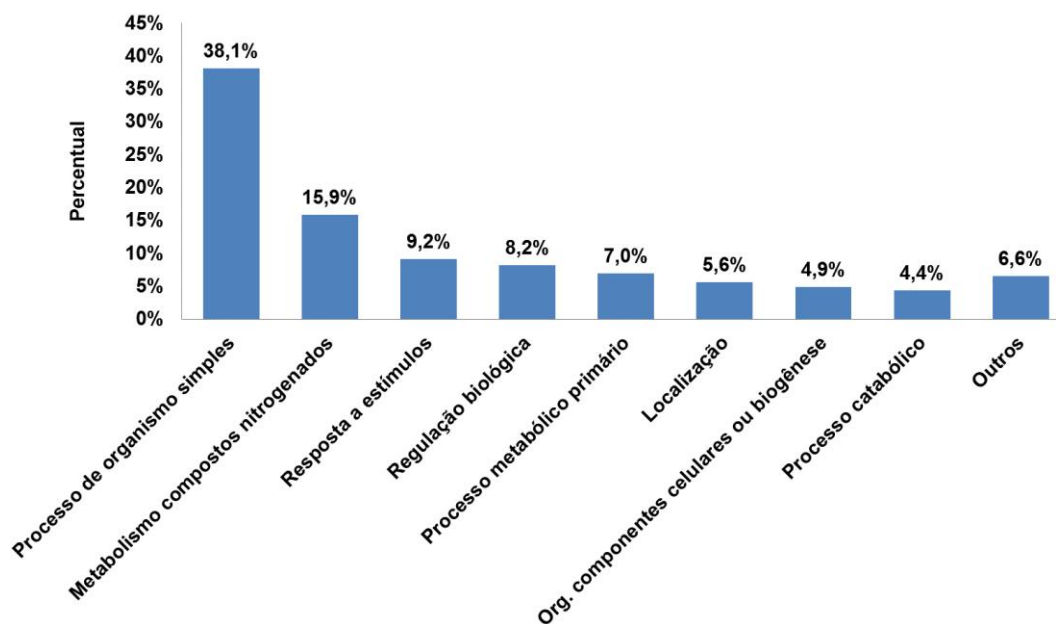
Na classificação de “outros” processos, destaca-se que o processo de enovelamento de proteínas coube a 0,8% das proteínas associadas à processos biológicos, o que corresponde à 6 proteínas. Trabalhos anteriores utilizando eletroforese bidimensional (2-DE) e MALDI-TOF para a caracterização de proteínas metabólicas de duas cultivares de *T. aestivum* encontraram entre 2 e 12 proteínas associadas ao enovelamento proteico (Gao *et al.*, 2009; Merlino *et al.*, 2009). Estas proteínas são extremamente importantes no processo de polimerização de gluteninas que acontece ao longo do desenvolvimento do grão de trigo (Ferreira *et al.*, 2012) e são relacionadas à qualidade do trigo (Lutz *et al.*, 2012). As principais proteínas identificadas nestes trabalhos prévios associadas ao enovelamento foram as chamadas HSP (do inglês, *heat shock proteins*), cujas principais funções são



prevenir a agregação intempestiva e garantir o correto envelhecimento e polimerização de determinadas proteínas (Gao *et al.*, 2009).

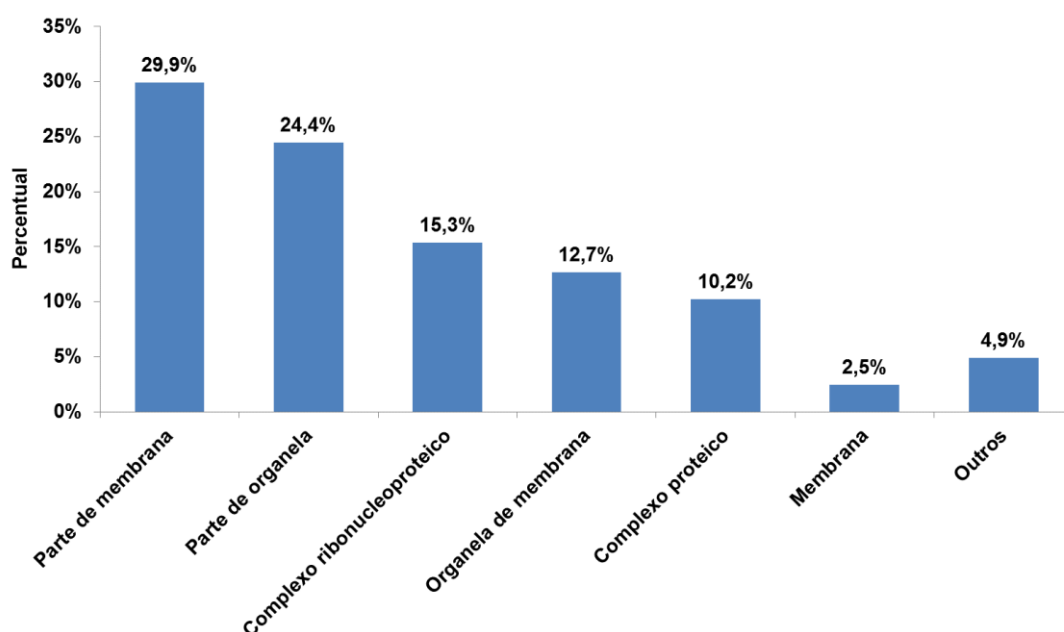


**Figura 15.** Distribuição das proteínas por função molecular. Na categoria “Outras” estão agrupadas categorias com menos de 3% (Atividade – antioxidante, de fator de transcrição de ácido nucleico, de isomerase, liase, ligase, de transcrição e ligação a proteínas e transdutor de sinal; Complexo macromolecular; e Ligação – amida, cofator, compostos de enxofre, conjunto de metais, derivados de carboidratos e lipídeos).



**Figura 16.** Distribuição das proteínas por processos biológicos. Na categoria “Outros” estão agrupadas categorias com menos de 2% (Biossíntese, Crescimento, Envelhecimento de proteínas, Metabolismo celular, Morte celular, Processo organismo multicelular e Reprodução).

Quando considerado o componente celular (figura 16), a maioria das proteínas faz parte da membrana (29,9%) ou de suas organelas (12,7%), de outras organelas celulares (24,4%) e dos complexos ribonucleoproteico (15,3%) e proteico (10,2%).

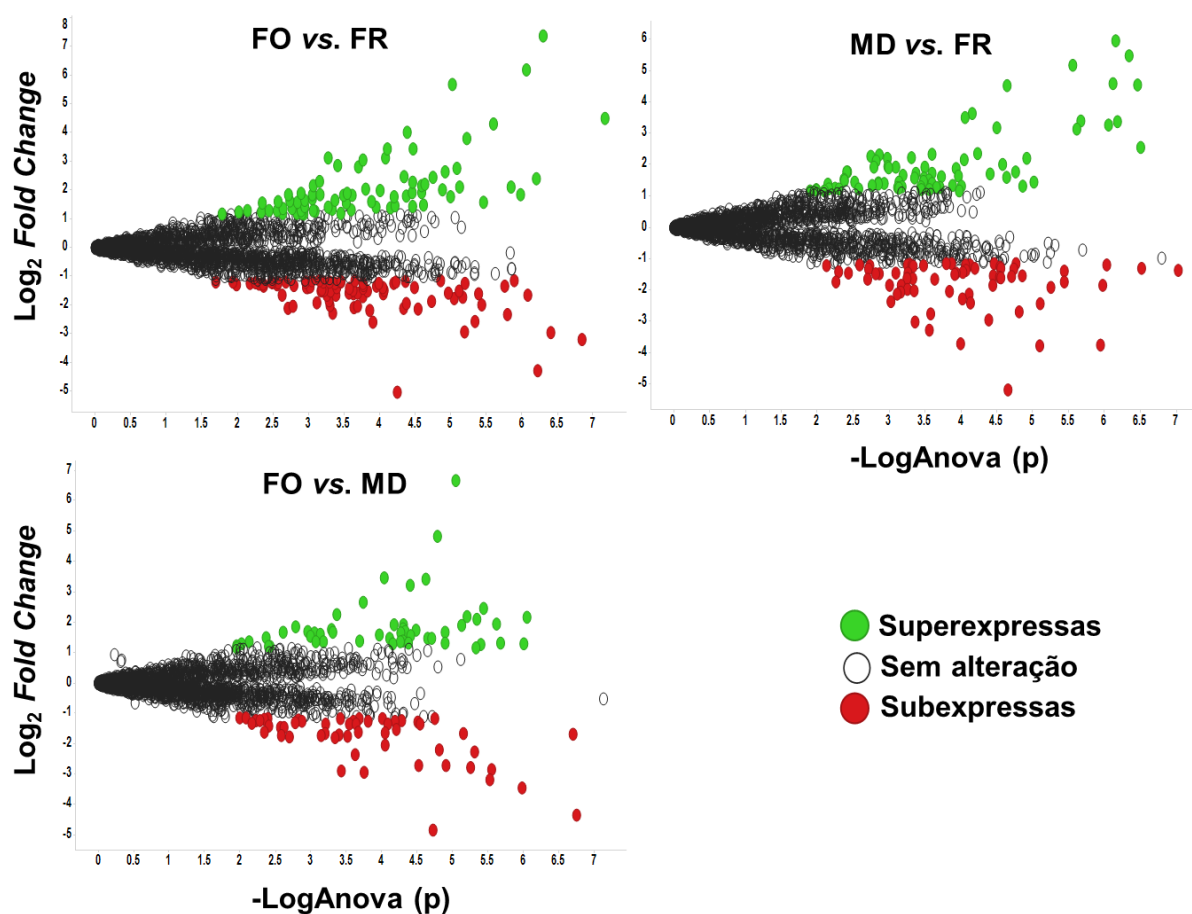


**Figura 17.** Distribuição das proteínas por componente celular. Na categoria “Outros” estão agrupadas categorias com menos de 2% (Complexo catalítico, Complexo oxidoredutase, Estrutura externa de encapsulamento, Lúmen de membrana, Organela não-membrana e Região extracelular).

## 5.6 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS

Gráficos do tipo *volcano plot* foram feitos para visualização de proteínas superexpressas e subexpressas entre as condições (figura 18). Após aplicação dos filtros já mencionados, a comparação FO vs. FR apresentou o maior número de proteínas diferencialmente expressas (162), sendo 77 super, 85 subexpressas e 1.946 sem alteração, representando, portanto um total de 2.108 proteínas quantificadas agrupadas. Em seguida, a comparação MD vs. FR apresentou 145 proteínas diferencialmente expressas, sendo 76 super, 69 subexpressas e 1.745 sem alteração, com total de 1.890 proteínas. Finalmente, a comparação entre FO vs. MD mostrou 107 proteínas diferencialmente expressas, sendo 52 super, 55 subexpressas e 2.029 sem alteração, com total de 2.136 proteínas.

Proteínas não anotadas representaram mais de 90% das proteínas superexpressas e mais de 80% das subexpressas para todas as condições analisadas e, por esse motivo, apenas as proteínas diferencialmente expressas nos pares de condições comparadas e que já foram anotadas estão apresentadas na tabela 5. A lista com todas as proteínas diferencialmente expressas, mostradas na figura 18, encontra-se no APÊNDICE A.



**Figura 18.** Expressão diferencial de proteínas comparando, em pares, as amostras forte (FO), média (MD) e fraca (FR).

Proteínas previamente relacionadas com a qualidade apresentaram-se diferencialmente expressas no estudo. Interessantemente, foram encontradas as duas isoformas de puroindolinas, A e B, contudo, a primeira (código PUIA) está subexpressa nas amostras FO e MD em relação à FR e a segunda (código PUIB) está superexpressa na MD em relação à FR. Estudos mostram que as puroindolinas estão relacionadas com a dureza e textura do grão de trigo, influenciando sua

**Tabela 5.** Proteínas anotadas e diferencialmente expressas no estudo.

<b>Código UNIPROT</b>	<b>Descrição UNIPROT</b>	<b>PU</b>	<b>ANOVA -Log</b>	<b>Log<sub>2</sub></b>
<b>Forte vs. Fraca</b>				
<b>W5B6C7</b>	Kinesin-like protein OS Triticum aestiv	4	3,1	2,1
<b>W5I3S0</b>	Peroxidase OS Triticum aestivum PE 3 SV	1	2,7	1,8
<b>AVLA4</b>	Avenin-like a4 OS Triticum aestivum PE 2	4	3,0	-1,2
<b>SPZ1C</b>	Serpin-Z1C OS Triticum aestivum PE 1 SV	8	4,9	-1,2
<b>GDA6</b>	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS Tritic	3	3,5	-1,2
<b>W5FW69</b>	Ribulose-phosphate 3-epimerase OS Triti	3	3,8	-1,2
<b>C3UZE5</b>	Pathogenesis-related protein 1-1 OS Tri	1	4,0	-1,4
<b>W5BC04</b>	Protein phosphatase methyltransferase 1 OS	1	3,0	-1,4
<b>DEF1</b>	Defensin-like protein 1 OS Triticum aesti	2	2,6	-1,7
<b>W5HMS9</b>	Kinesin-like protein OS Triticum aestiv	1	4,7	-1,9
<b>PUIA</b>	Puroindoline-A OS Triticum aestivum GN PI	4	6,2	-4,3
<b>Média vs. Fraca</b>				
<b>H1</b>	Histone H1 OS Triticum aestivum PE 2 SV 2	4	4,2	2,4
<b>W5DGC9</b>	Cysteine proteinase inhibitor OS Tritic	1	3,6	2,3
<b>W5I3S0</b>	Peroxidase OS Triticum aestivum PE 3 SV	1	2,4	1,8
<b>W5C8N6</b>	40S ribosomal protein S6 OS Triticum ae	2	2,9	1,4
<b>DEF1</b>	Defensin-like protein 1 OS Triticum aesti	2	3,1	1,2
<b>W5AQ04</b>	40S ribosomal protein S8 OS Triticum ae	3	3,4	1,2
<b>PUIB</b>	Puroindoline-B OS Triticum aestivum GN PI	6	2,0	1,2
<b>GLTA</b>	Glutenin_ low molecular weight subunit OS	4	4,8	-1,2
<b>GDA3</b>	Alpha/beta-gliadin A-III OS Triticum aest	1	4,5	-1,2
<b>W5HMS9</b>	Kinesin-like protein OS Triticum aestiv	1	3,3	-1,2
<b>GDA4</b>	Alpha/beta-gliadin A-IV OS Triticum aesti	1	6,0	-1,2
<b>W5EUP2</b>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] fl	6	4,1	-1,2
<b>GDA2</b>	Alpha/beta-gliadin A-II OS Triticum aesti	1	4,6	-1,3
<b>GDA9</b>	Alpha/beta-gliadin MM1 OS Triticum aestiv	1	6,5	-1,3
<b>Q6L6R7</b>	PK-R1 OS Triticum aestivum GN WNdr1B PE	1	2,4	-1,5
<b>WHW2</b>	Wheatwin-2 OS Triticum aestivum GN PR4B P	1	6,0	-1,8
<b>W5HMF6</b>	Phospholipid-transporting ATPase OS Tri	1	3,3	-2,0
<b>PUIA</b>	Puroindoline-A OS Triticum aestivum GN PI	4	5,9	-3,7
<b>W4ZWJ1</b>	Defensin OS Triticum aestivum GN PDF14	1	5,1	-3,8
<b>Forte vs. Média</b>				
<b>SPZ1A</b>	Serpin-Z1A OS Triticum aestivum GN WZCI	2	3,0	1,5
<b>GDA2</b>	Alpha/beta-gliadin A-II OS Triticum aesti	1	4,3	1,4
<b>WHW2</b>	Wheatwin-2 OS Triticum aestivum GN PR4B P	1	5,7	1,3
<b>GDA9</b>	Alpha/beta-gliadin MM1 OS Triticum aestiv	1	6,0	1,3
<b>GDA4</b>	Alpha/beta-gliadin A-IV OS Triticum aesti	1	5,3	1,2
<b>H1</b>	Histone H1 OS Triticum aestivum PE 2 SV 2	4	2,8	-1,2
<b>W5I6K9</b>	Annexin OS Triticum aestivum PE 3 SV 1	1	2,2	-1,2
<b>W5HJY2</b>	Annexin OS Triticum aestivum PE 3 SV 1	2	2,2	-1,2
<b>W5DGC9</b>	Cysteine proteinase inhibitor OS Tritic	1	3,7	-1,6
<b>DEF1</b>	Defensin-like protein 1 OS Triticum aesti	2	3,4	-2,9

Número de peptídeos únicos (PU), Log<sub>10</sub> negativo de ANOVA (-Log), Log<sub>2</sub> de *max fold change* (Log<sub>2</sub>). Valores de Log<sub>2</sub> superiores ou iguais a 1,2 correspondem a proteínas superexpressas e valores iguais ou inferiores -1,2 correspondem a proteínas subexpressas. Todos os código são acrescidos de: \_WHEAT.

orientação industrial, diminuindo a resistência mecânica à moagem e aumentando o rendimento da farinha. Uma maior dureza pode ocorrer por falha na expressão dos genes que codificam PUIA ou por mutações no gene que codificam a PUIB (Lillemo e Morris, 2000; Morris, 2002; Heinze *et al.*, 2016). Dessa forma, faz-se necessário um estudo complementar da expressão gênica para melhor entendimento do perfil de expressão encontrado.

Proteínas com função antifúngica presentes no trigo comum são associadas com melhor resistência da farinha durante o armazenamento. Além das puroindolinas B, a enzima peroxidase também se mostrou superexpressa nas amostras FO e MD em relação à FR, podendo indicar que as farinhas classificadas como fracas tem menor estabilidade no período de estocagem. Já foi demonstrado que essas proteínas tem função antifúngica, sendo expressas na cultivar de trigo comum e não na cultivar de trigo duro, conferindo maior resistência à farinha de trigo comum durante o armazenamento (Zhang *et al.*, 2016).

Algumas proteínas da fração glúten do trigo, apesar de serem consideradas de difícil extração sendo a maior parte delas insolúveis em tampões como Tris-HCl, também foram extraídas e mostraram-se diferencialmente expressas. A  $\alpha$ -gliadina (código GDA6) mostrou-se subexpressa na amostra FO em relação à FR, enquanto as  $\alpha$ -gliadinas (GDA2, GDA3, GDA4 e GDA9), bem como a LMW-GS (GLTA) mostraram-se subexpressas nas amostras MD em relação à FR. Além disso, as  $\alpha$ -gliadinas GDA2, GDA4 e GDA9 aparecem superexpressas na amostra FO em relação à MD. Estes resultados corroboram estudos que relacionam a qualidade tecnológica da farinha com a composição das subunidades das proteínas de reserva e não com a quantidade de proteínas (Denčić *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013).

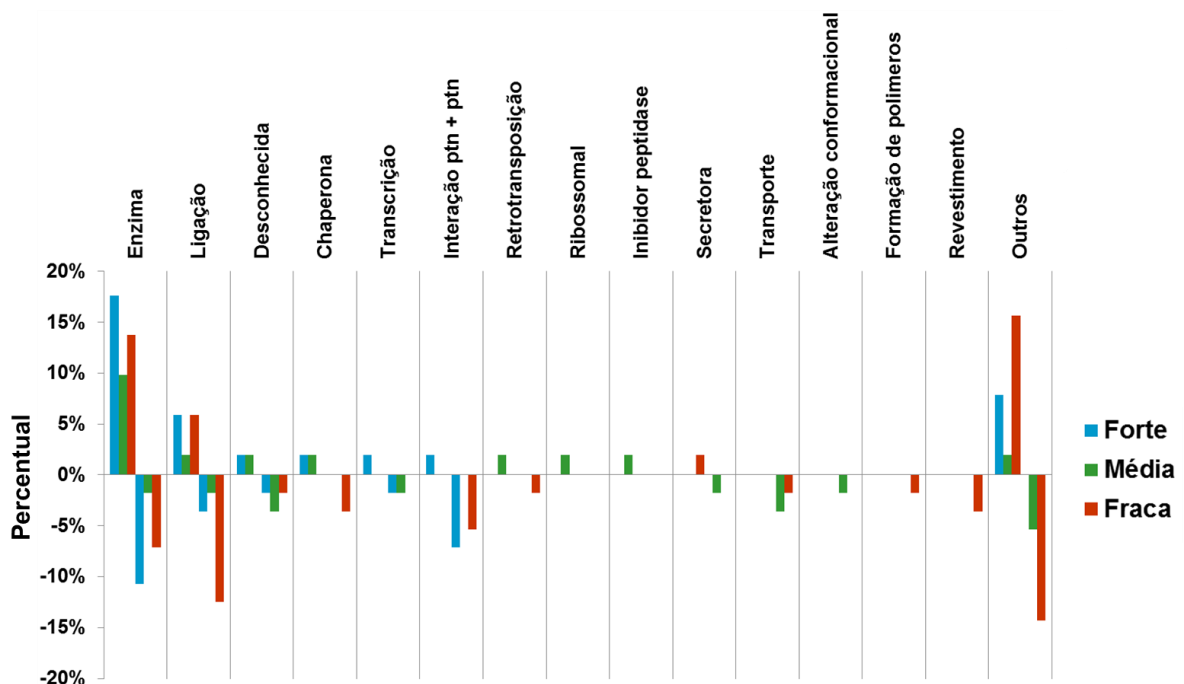
Ao analisar dados de expressão de proteínas sem considerar ponto corte de CV (dados não mostrados) encontramos a PDI superexpressa nas amostras FO e MD quando comparadas com à FR. Esse resultado pode ser associado às respectivas classificações de qualidade tecnológica dessas amostras, uma vez que a PDI relaciona-se com o envelhecimento das proteínas de reserva e tem papel fundamental no desenvolvimento de macropolímeros de glutenina durante a mistura da massa (Kimura *et al.*, 2015). Já a proteína inibidora de  $\alpha$ -amilase/tripsina foi encontrada subexpressa também nas duas amostras de melhor qualidade. A enzima

está envolvida com o metabolismo de carboidratos, prevenindo a degradação do amido por inibir a ação da enzima  $\alpha$ -amilase (Debiton *et al.*, 2011). Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que realizaram um mapeamento das proteínas solúveis do grão de trigo utilizando abordagens proteômicas (2-DE, MALDI-TOF) (Gao *et al.*, 2009; Merlino *et al.*, 2009). No entanto, como nestes trabalhos o número de proteínas identificadas foi relativamente baixo, estas proteínas não foram encontradas diferencialmente expressas nas cultivares estudadas.

## 5.7 PREDIÇÃO DE DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS NÃO ANOTADAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

Considerando o alto percentual de proteínas diferencialmente expressas encontradas nesse estudo, e que ainda não foram anotadas quanto à função, foi realizada a predição de domínios dessas proteínas com o objetivo de obter melhor compreensão das mesmas e em busca da possibilidade de relacionar a funcionalidade de seus domínios com as diferentes qualidades das amostras analisadas. Após a remoção dos códigos redundantes entre as condições, um total de 275 códigos de proteínas diferencialmente expressas foram relacionados para a predição de domínios, dos quais apenas 38 códigos não tiveram domínios associados, obtendo-se alto percentual de domínios encontrados (86%). Como alguns códigos foram associados a mais de um domínio, o número total de domínios encontrados foi de 246.

Para fins de comparação, após avaliação de domínios de proteínas superexpressas e subexpressas nas amostras, apenas domínios de proteínas que se mostraram superexpressos ou subexpressos em uma dada condição em relação às outras duas foram selecionados para análise de cada condição (figura 19). Verificou-se que é possível estabelecer diferenças entre as amostras. Com relação aos domínios superexpressos, os domínios relacionados com função enzimática apresentaram maior percentual na amostra FO (18%) em relação à FR (14%) e MD (10%), sendo principalmente ligadas ao metabolismo de carboidratos. As amostras FR e FO obtiveram maior expressão de domínios com função de ligação (6%) do que a amostra MD (2%), sendo esses domínios principalmente relacionados com a ligação de metais. Domínios relacionados com transcrição e interação proteína-proteína, apresentaram-se superexpressos apenas na amostra FO, enquanto que os relacionados com retrotransposição, ribossomos e inibidores de peptidases sobressaíram apenas na MD e, domínios relacionados à função secretora estavam superexpressos somente na FR.



**Figura 19.** Percentual de distribuição das funções associadas aos domínios das proteínas não anotadas e diferencialmente expressas.

É importante ressaltar que domínios relacionados à função de chaperonas, HEAT\_2 e HSP70, mostraram-se superexpressos nas amostras FO e MD, respectivamente (2% para ambas) e subexpressos na FR (-3,6%). A HSP70 pertence à família das chaperonas HSP envolvidas no enovelamento de proteínas, conforme já mencionado (Gao *et al.*, 2009). A expressão diferencial de chaperonas está relacionada ao enovelamento adequado das proteínas de reserva, podendo influenciar na qualidade da farinha (Osipova *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2015). Este resultado corrobora os dados recentemente apresentados por Kimura *et al.* (2015) que mostraram cinco grupos de famílias de PDI no endosperma amiláceo de grãos de trigo maduros. Os autores ressaltam ainda que a superexpressão de proteínas da família das PDI durante a fase de enchimento do grão sugerem que estas proteínas desempenham um papel importante também na formação de pontes dissulfeto intramoleculares de proteínas de reserva.

Com relação aos domínios subexpressos, verifica-se que os de função enzimática destacam-se novamente na amostra FO (-11%), seguidos da FR (-7%) e MD (-2%). Quanto aos domínios de ligação, a amostra FR obteve maior percentual de subexpressão (-12,5%) em relação à FO (-3,6%) e MD (-2%). Domínios relacionados à transcrição aparecerem subexpressos em FO e MD (-2%), enquanto que os relacionados com interação proteína-proteína estavam subexpressos apenas em FO (-7%) e FR (-5,4%). Interessantemente, domínios relacionados à formação de polímeros, mostraram-se subexpressos na amostra FR (-2%), podendo explicar a qualidade tecnológica inferior dessa amostra em relação às demais.

## 5.8 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

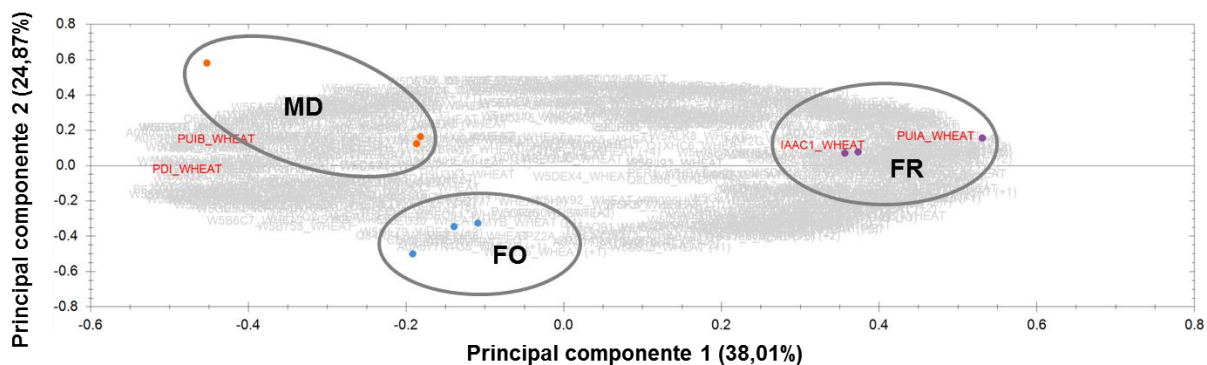
A PCA é uma ferramenta importante para análise de dados multivariados pois permite a representação das variações que ocorrem nas amostras a partir da construção de novos eixos, componentes principais, que explicam o espalhamento dos pontos. Por considerar a correlação entre muitas variáveis simultaneamente, a PCA permite a extração de uma quantidade maior de informações, muitas vezes impossível em caso de análise de variável por variável (Ferreira *et al.*, 1999). Assim, no contexto de análises por LC-MS, onde há um fornecimento de dados de alto



rendimento, ferramentas como a PCA permitem levar os dados levantados a conclusões práticas através de técnicas de quimiometria (Skov *et al.*, 2014)

Com o objetivo de examinar a distinção entre grupos de diferentes qualidades tecnológicas foi realizada uma PCA (figura 20). Os dois primeiros componentes principais explicam 63% das variações entre as amostras e distinguem claramente a amostra FR das amostras FO e MD. Os dados da PCA sobre o perfil diferencial das amostras FO e MD em relação à FR confirmam os resultados encontrados neste estudo para expressão e predição de domínios das proteínas. É possível notar ainda que as replicatas técnicas apresentaram boa reprodutibilidade, com exceção de uma replicata da amostra MD.

A diversidade de funções fisiológicas das proteínas identificadas nas amostras analisadas, assim como os diferentes perfis de expressão, podem ser os responsáveis pela discriminação encontrada na análise de PCA. No entanto, devido ao alto número de proteínas não anotadas, são necessárias mais investigações para compreender o impacto das proteínas metabólicas na elaboração da qualidade do trigo.



**Figura 20.** Análise de componentes principais (PCA) das amostras fraca (FR), média (MD) e forte (FO). Proteínas identificadas e anotadas estão em cinza. Em vermelho, o código de proteínas selecionadas: Proteína dissulfeto isomerase (PDI\_WHEAT) e Puroindolina B (PUIB\_WHEAT), superexpressas em FO e MD; Inibidor de alfa amilase (IAAC1\_WHEAT) e Puroindolina A (PUIA\_WHEAT) superexpressas em FR.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado pela primeira vez um estudo proteômico das proteínas metabólicas de farinha de trigo brasileiro, no intuito de obter melhor entendimento do impacto dessas proteínas na qualidade tecnológica.

As farinhas apresentaram teores de umidade e de proteínas totais semelhantes e os teores de umidade encontraram-se dentro do limite máximo permitido pela legislação.

A análise por UPLC-UDMS<sup>E</sup> proporcionou ótima cobertura de proteína com 83% dos peptídeos apresentando erro de até 5 ppm dentro de uma distribuição normal, e mostrou-se extremamente eficiente na identificação de proteínas associadas à fração proteica solúvel do trigo.

A comparação pareada das amostras apresentou um total de 414 proteínas diferencialmente expressas e, cerca de 85% destas proteínas ainda não foram notadas quanto à função.

Proteínas relacionadas com a qualidade, como puroindolinas, gliadinas e chaperonas (PDI) foram encontradas diferencialmente expressas nas amostras forte e média em relação à fraca.

A análise de predição de domínio das proteínas do trigo que ainda não foram anotadas apresentou alto percentual de cobertura e mostrou diferenças entre as amostras, destacando-se domínios com funcionalidade de chaperonas, como as da família HSP, que se apresentaram superexpressos nas amostras forte e média e subexpressos na fraca.

A análise de componentes principais permitiu uma clara distinção entre as farinhas de diferentes qualidades utilizando como parâmetro as proteínas identificadas e quantificadas.

Este estudo mostra que as frações de proteínas metabólicas são diferencialmente expressas nas farinhas de diferentes qualidades tecnológicas, principalmente quando comparadas com as amostras de baixas propriedades reológicas, classificadas como fracas, e, podem portanto contribuir para a compreensão da qualidade do trigo brasileiro.

Assim, os resultados deste trabalho fornecem novas perspectivas de avaliação da qualidade tecnológica de farinha de trigo brasileiro. Futuramente esses resultados devem ser associados com estudos que permitam anotação de proteínas ainda não anotadas no banco de dados, bem como com estudos intervarietais para melhor compreensão dos fatores determinantes da qualidade do trigo.

## REFERÊNCIAS

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

\_\_\_\_\_. **Approved Methods of Analysis**. AACC INTERNATIONAL, S. P., MN, U.S.A. MÉTODO Nº e 54-30 2010.

ABITRIGO. Associação Brasileira das Indústrias de Trigo. Acesso em: Dezembro/2016. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/>.

AOAC. **Official methods of analysis**: Association off Official Analytical Chemists. 1984.

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. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 211-217, 4// 2013. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381200391X> >.

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, n. 1, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BRASIL. **Instrução normativa nº 8, 03 jun. 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo**. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, P. E. A.: Diário Oficial da República Federativa do Brasil 2005.

\_\_\_\_\_. **Instrução Normativa nº 38 de 30 de novembro de 2010**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.: Diário Oficial da União 2010.

CONAB. **Acomp. safra bras. grãos**. Brasília. v.4 - safra 2016/17 - Quinto levantamento, n.5, 166 p. fevereiro 2017.

COSTA, M. S.; SCHOLZ, M. B. D. S.; FRANCO, C. M. L. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, p. 163-170, 2013. ISSN 0101-2061.

CROOTE, D.; QUAKE, S. R. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. **npj Systems Biology and Applications**, v. 2, p. 16022, 2016. ISSN 2056-7189.

CUNSOLO, V. et al. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 9, p. 768-784, 2014. ISSN 1096-9888.

DAHESH, M. et al. Polymeric Assembly of Gluten Proteins in an Aqueous Ethanol Solvent. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 38, p. 11065-11076, 2014/09/25 2014. ISSN 1520-6106. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jp5047134> >.

DEBITON, C. et al. Analyses of albumins, globulins and amphiphilic proteins by proteomic approach give new insights on waxy wheat starch metabolism. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 2, p. 160-169, 3// 2011. ISSN 0733-5210. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521010001979> >.

DELCOUR, J. A. et al. Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. **Annual Review of Food Science and Technology**, Vol 3, v. 3, p. 469-492, 2012. ISSN 1941-1413. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301795100023 >.

DENČIĆ, S.; MLADENOV, N.; KOBILJSKI, B. Effects of genotype and environment on breadmaking quality in wheat. **International Journal of Plant Production**, v. 5, n. 1, p. 71-82, 08/01 2011. ISSN 1735-6814. Disponível em: < [http://ijpp.gau.ac.ir/article\\_721.html](http://ijpp.gau.ac.ir/article_721.html) >.

DHAKA, V.; KHATKAR, B. S. Effects of Gliadin/Glutenin and HMW-GS/LMW-GS Ratio on Dough Rheological Properties and Bread-Making Potential of Wheat Varieties. **Journal of Food Quality**, v. 38, n. 2, p. 71-82, 2015. ISSN 1745-4557.

DISTLER, U. et al. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature methods**, v. 11, n. 2, p. 167-170, 2014. ISSN 1548-7091.

\_\_\_\_\_. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nat. Protocols**, v. 11, n. 4, p. 795-812, 04//print 2016. ISSN 1754-2189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.042> >.

DONG, K. et al. Albumin and globulin dynamics during grain development of elite Chinese wheat cultivar Xiaoyan 6. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 615-

622, 11// 2012. ISSN 0733-5210. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521012001774> >.

DUPONT, F. M. et al. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. **Proteome Science**, v. 9, n. 1, p. 1, 2011. ISSN 1477-5956.

FAOSTAT. **Food and Agricultural organization of the United Nations**. 2016

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, M. S. L. et al. A MALDI-TOF based study of the in-vivo assembly of glutenin polymers of durum wheat. **Food Research International**, v. 63, p. 89-99, 2014. ISSN 0963-9969.

\_\_\_\_\_. Physicochemical control of durum wheat grain filling and glutenin polymer assembly under different temperature regimes. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 1, p. 58-66, 2012. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521011001998> >.

FIEDLER, K. L. et al. Characterization of Grain-Specific Peptide Markers for the Detection of Gluten by Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 25, p. 5835-5844, 2014/06/25 2014. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf500997j> >.

FRANCKI, M. G.; CRAWFORD, A. C.; OLDACH, K. Transcriptomics, Proteomics and Metabolomics: Integration of Latest Technologies for Improving Future Wheat Productivity. In: NOUREDDINE, B. (Ed.). **Sustainable Agriculture and New Biotechnologies**. Boca Raton: CRC Press, 2011. cap. 18, p.425-452.

GAO, L. et al. Wheat quality related differential expressions of albumins and globulins revealed by two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE). **Journal of proteomics**, v. 73, n. 2, p. 279-296, 2009. ISSN 1874-3919.

GEROMANOS, S. J. et al. Simulating and validating proteomics data and search results. **Proteomics**, v. 11, n. 6, p. 1189-1211, 2011. ISSN 1615-9861.

\_\_\_\_\_. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1683-1695, 2009. ISSN 1615-9861.

GOESAERT, H. et al. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 12-30, 1// 2005. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224404001906> >. Acesso em: 2005/3//.

GUO, G. et al. Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). **BMC Plant Biol**, v. 12, p. 147, Aug 19 2012. ISSN 1471-2229.

HEINZE, K. et al. Puroindoline genes introduced into durum wheat reduce milling energy and change milling behavior similar to soft common wheats. **Journal of Cereal Science**, v. 71, p. 183-189, 9// 2016. ISSN 0733-5210. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521016302065> >.

HEMERY, Y. et al. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 327-347, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHK-4PRYFYP-1/2/10e6861717412a96b781d05c49d6145a> >.

HILL, K. et al. Surface and interfacial properties of water-soluble wheat proteins. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 319, n. 1, p. 180-187, 2008. ISSN 0927-7757.

HURKMAN, W. J. et al. Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 1, p. 12-23, 1// 2009. ISSN 0733-5210. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008001045> >.

KENT, N. L.; EVERS, A. D. Chemical Componentes. In: LTD, B. W. (Ed.). **Technology of Cereals: an introduction for students of food science and agriculture**. 4 ed. Grã-Bretanha: Pergamon, 1994. cap. 3, p.53-77.

KHAN, S. et al. Characterization of Wheat protein (Albumin) in different varieties of wheat cultivated in Sindh through SDS-PAGE Electrophoresis. **Sindh University Research Journal-SURJ (Science Series)**, v. 47, n. 2, 2015. ISSN 1813-1743.

KIM, J.-S. et al. In-source fragmentation and the sources of partially tryptic peptides in shotgun proteomics. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 2, p. 910-916, 2013. ISSN 1535-3893.

KIMURA, S. et al. Expression and characterization of protein disulfide isomerase family proteins in bread wheat. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015. ISSN 1471-2229.

LI, G.-Z. et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1696-1719, 2009. ISSN 1615-9853.

LILLEMO, M.; MORRIS, C. F. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 7, p. 1100-1107, 2000. ISSN 0040-5752.

LIU, W. et al. Comparative proteome analysis of glutenin synthesis and accumulation in developing grains between superior and poor quality bread wheat cultivars. **J Sci Food Agric**, v. 92, n. 1, p. 106-115, Jan 15 2012. ISSN 0022-5142.

LUTZ, E.; WIESER, H.; KOEHLER, P. Identification of Disulfide Bonds in Wheat Gluten Proteins by Means of Mass Spectrometry/Electron Transfer Dissociation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3708-3716, 2012/04/11 2012. ISSN 0021-8561. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf204973u> >.

MEJÍAS, J. H. et al. Analysis of Wheat Prolamins, the Causative Agents of Celiac Sprue, Using Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Nutrients**, v. 6, n. 4, p. 1578-1597, 2014.

MERLINO, M. et al. Mapping and proteomic analysis of albumin and globulin proteins in hexaploid wheat kernels (*Triticum aestivum* L.). **Theor Appl Genet**, v. 118, n. 7, p. 1321-37, May 2009. ISSN 0040-5752.

MORRIS, C. F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. **Plant molecular biology**, v. 48, n. 5-6, p. 633-647, 2002. ISSN 0167-4412.

MUCCILLI, V. et al. Characterisation of a specific class of typical low molecular weight glutenin subunits of durum wheat by a proteomic approach. **Journal of**



**Cereal Science**, v. 51, n. 1, p. 134-139, 1// 2010. ISSN 0733-5210. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521009001696> >.

MURAD, A. M.; RECH, E. L. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 82, 2012. ISSN 1472-6750.

NAEEM, H. A.; MACRITCHIE, F. Polymerization of glutenin during grain development in near-isogenic wheat lines differing at Glu-D1 and Glu-B1 in greenhouse and field. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 1, p. 7-12, 1 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHK-4DVW0JY-1/2/c1bd80abd67a81cd6a71063647a5ebdb> >.

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

OSIPOVA, S. V.; PERMYAKOVA, M. D.; PERMYAKOV, A. V. Role of non-prolamin proteins and low molecular weight redox agents in protein folding and polymerization in wheat grains and influence on baking quality parameters. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 49, p. 12065-12073, 2012. ISSN 0021-8561.

PAYNE, P. I. et al. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 40, n. 1, p. 51-65, 1987. ISSN 1097-0010.

PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R., Eds. **Trigo no Brasil - Bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo- RS -Brasil: Embrapa Trigo, p.488ed. 2011.

PIROZI, M. R. et al. Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. **Journal of cereal science**, v. 48, n. 1, p. 117-122, 2008. ISSN 0733-5210.

POPINEAU, Y. et al. Influence of high M<sub>r</sub> glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of glutens and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat Sicco. **Journal of Cereal Science**, v. 19, n. 3, p. 231-241, 1994. ISSN 0733-5210.

ROMBOUTS, I. et al. Improved identification of wheat gluten proteins through alkylation of cysteine residues and peptide-based mass spectrometry. **Sci. Rep.**, v. 3, 07/24/online 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/srep02279> >.

SAULNIER, L. Les grains de céréales : diversité et compositions nutritionnelles. **Cahiers de Nutrition et de Diététique**, v. 47, n. 1, p. S4-S15, 2012/09/01 2012. ISSN 0007-9960. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007996012702924> >.

SERNA-SALDIVAR, S. O. Grain Development, Morphology, and Structure. In: (Ed.). **Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes**. Boca Raton: CRC Press, 2010a. cap. 4, p.109-128.

\_\_\_\_\_. Cereal Grains: The Staff of Life. In: (Ed.). **Cereal Grains: Properties, Processing and Nutritional Attributes**. Boca Raton: CRC Press, 2010b. cap. 1, p.1-41.

\_\_\_\_\_. Physical Properties, Grading, and Specialty Grains. In: (Ed.). **Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes**. Boca Raton: CRC Press, 2010c. cap. 2, p.43-80.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 947-958, 2002. ISSN 0022-0957.

SHEWRY, P. R. et al. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. **Journal of Cereal Science**, v. 4, n. 2, p. 97-106, 1986. ISSN 0733-5210.

SILVA, J. C. et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. **Analytical chemistry**, v. 77, n. 7, p. 2187-2200, 2005. ISSN 0003-2700.

\_\_\_\_\_. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. **Molecular & cellular proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144-156, 2006.

SKOV, T. et al. Chemometrics in foodomics: handling data structures from multiple analytical platforms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 60, p. 71-79, 2014. ISSN 0165-9936.

SOUZA, G. H. M. F.; GUEST, P. C.; MARTINS-DE-SOUZA, D. LC-MS E, Multiplex MS/MS, Ion Mobility, and Label-Free Quantitation in Clinical Proteomics. **Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications**, p. 57-73, 2017. ISSN 1493967290.

SURGET, A.; BARRON, C. Histologie du grain de blé. **Industrie des céréales**, n. 145, p. 3-7, 2005.

TOMIĆ, J. et al. Albumins Characterization in Relation to Rheological Properties and Enzymatic Activity of Wheat Flour Dough. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 4, p. 805-816, 2015. ISSN 1680-7073.

VAN DEN BROECK, H. C. et al. Label free targeted detection and quantification of celiac disease immunogenic epitopes by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1391, n. 0, p. 60-71, 4/24/ 2015. ISSN 0021-9673.  
Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731500343X> >.

VENSEL, W. H. et al. Effect of cleavage enzyme, search algorithm and decoy database on mass spectrometric identification of wheat gluten proteins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1154-1161, 2011. ISSN 0031-9422.

VENSEL, W. H.; TANAKA, C. K.; ALTENBACH, S. B. Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. **Proteome science**, v. 12, n. 1, p. 8, 2014. ISSN 1477-5956.

VENSEL, W. H. et al. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. **Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 1594-611, Apr 2005. ISSN 1615-9853 (Print) 1615-9853.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115-119, 4// 2007. ISSN 0740-0020. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002006001535> >.

WRIGLEY, C. W. Giant proteins with flour power. **Nature**, v. 381, n. 6585, p. 738-739, 1996. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/381738a0> >.

YANG, M. et al. Characterization of proteins involved in early stage of wheat grain development by iTRAQ. **Journal of Proteomics**, v. 136, p. 157-166, 3/16/ 2016. ISSN 1874-3919. Disponível em: <  
[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391916300070](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391916300070) >.

ZHANG, S.-B. et al. Proteomic analysis reveals the fungal resistance of soft wheat during storage. **Journal of Stored Products Research**, v. 69, p. 195-198, 10// 2016.

ISSN 0022-474X. Disponível em: <  
[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X16301515](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X16301515) >.

**ANEXO A - TABELA COM PARÂMETROS REOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS UTILIZADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DA QUALIDADE TECNOLÓGICA DAS DIFERENTES CULTIVARES DE FARINHA DE TRIGO BRASILEIRO.**

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

Fonte: Universidade de Passo Fundo; - Sem informação

**APÊNDICE A – LISTA DE PROTEÍNAS ANOTADAS E NÃO ANOTADAS E DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO ESTUDO.**

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. FR</b>								
W5EL32_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	5.04E-07	6.297281907	165.4970577	7.4	Super
W5AI85_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	8.66E-07	6.062416257	73.3840435	6.2	Super
W5D3D7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	9.52E-06	5.021516914	51.48932461	5.7	Super
W5E483_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	2	6.78E-08	7.16872062	22.45583786	4.5	Super
Q43663_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	2.52E-06	5.598093383	19.79995533	4.3	Super
W5EDD5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	4.08E-05	4.388882089	16.02198575	4.0	Super
W5ALU2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	5.92E-06	5.227914103	13.96405345	3.8	Super
W5HJU8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	2	3.40E-05	4.468097305	10.878246	3.4	Super
W5AK55_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	7.76E-05	4.110135775	10.81948166	3.4	Super
W5BX88_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	8.24E-05	4.084019773	8.732031412	3.1	Super
W5CDG5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	24	1	0.000527056	3.278143323	8.66721359	3.1	Super
W5FQX9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000170443	3.768419668	8.251139027	3.0	Super
W5GR10_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000391282	3.407509784	7.243727779	2.9	Super
W5CI24_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000199344	3.700396341	6.980275645	2.8	Super
W5G589_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	8.17E-06	5.087957364	6.805663763	2.8	Super
W5DTD3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	1.20E-05	4.919200702	6.247684706	2.6	Super
W5E367_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	26	1	4.55E-05	4.34234705	5.486482685	2.5	Super
W5FCA4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	1.78E-05	4.750331599	5.434202388	2.4	Super
W5G312_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	6.30E-07	6.200721713	5.225730311	2.4	Super
W5BSG4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.000702151	3.15356952	4.881038144	2.3	Super
W5HAD2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	3.44E-05	4.463739477	4.83003246	2.3	Super
W5HXT3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	2.31E-05	4.636886112	4.564442715	2.2	Super
W5DVU9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	2.57E-05	4.590457274	4.45191076	2.2	Super
W5B6C7_WHEAT	Kinesin-like protein OS=Triticum aestiv	4	4	0.000861119	3.064936695	4.430348229	2.1	Super
W5I2W1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	7.52E-06	5.123508819	4.298750507	2.1	Super
W5CKQ8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	5	1.42E-06	5.847994191	4.278278913	2.1	Super
W5EEZ3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000156841	3.804541054	4.071786754	2.0	Super
W5HHR2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	1.31E-05	4.882123864	4.03948912	2.0	Super
W5A5M4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	9.91E-05	4.004058603	3.983907629	2.0	Super

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. FR (continuação)</b>								
W5ERU2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	2.56E-05	4.591747806	3.755044944	1.9	Super
W5BZV2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	3.50E-05	4.455507046	3.728819285	1.9	Super
W5GAG3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	0.000287363	3.54156988	3.697384888	1.9	Super
W5GXY9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.001272727	2.895264868	3.673370113	1.9	Super
W5I3S0_WHEAT	Peroxidase OS=Triticum aestivum PE=3 SV	2	1	0.001924738	2.715628329	3.583824468	1.8	Super
A0A096US61_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	5	1	0.000687448	3.16276001	3.566490439	1.8	Super
A0A096UQ18_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	14	4	0.000883191	3.053945252	3.558646316	1.8	Super
W5BSA4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	1.04E-06	5.982442237	3.556219869	1.8	Super
W5DC56_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	2	0.000319941	3.494929868	3.522561086	1.8	Super
W5H8W7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	0.000242746	3.614847546	3.517347289	1.8	Super
W5HQR0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	1	4.24E-05	4.37302333	3.46748856	1.8	Super
W4ZXM1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	6.30E-05	4.200773172	3.410727303	1.8	Super
W5GX10_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	1.00E-05	4.999483379	3.384553568	1.8	Super
W5BCJ2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000886892	3.052129403	3.214732046	1.7	Super
W5EJ04_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.001129747	2.947018773	3.144743254	1.7	Super
W5AL45_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000424781	3.371834506	3.131466734	1.6	Super
A0A096UR74_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	2	1	0.001837434	2.735788307	3.063480687	1.6	Super
W5F061_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	3	0.000130568	3.884162456	3.022212288	1.6	Super
W5A5I4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.002685766	2.570931833	2.997815581	1.6	Super
A0A077RX36_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	3	2	0.001432905	2.843782646	2.982743555	1.6	Super
W5DN34_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	3.44E-06	5.463480214	2.980146726	1.6	Super
W5EPJ0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.004442348	2.352387391	2.944093395	1.6	Super
W5E1B9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000293012	3.533114536	2.900071201	1.5	Super
W5FYR0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	2.43E-05	4.614556792	2.768847292	1.5	Super
W5EWR4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	9	5	6.06E-05	4.217183924	2.71437728	1.4	Super
W5EJJ7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	11	3	0.001135751	2.944716691	2.697052048	1.4	Super
A0A077RUM9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	7	5	3.43E-05	4.464914089	2.688662716	1.4	Super
W5GRU6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	16	1	0.000113129	3.946427387	2.646450325	1.4	Super
W5CNJ7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	0.000531276	3.27467963	2.625751143	1.4	Super
W5FJX1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	7.02E-05	4.153904972	2.58543945	1.4	Super
W5FTP9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.002281204	2.6418358	2.570601121	1.4	Super
W5BGX8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	17	1	0.001713894	2.766016088	2.554023737	1.4	Super

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. FR (continuação)</b>								
W5H4N5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000465808	3.331792607	2.533153988	1.3	Super
W5G1S5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	3	0.000250065	3.601946627	2.473234018	1.3	Super
W5DYW7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.007242773	2.140095118	2.442490295	1.3	Super
W5BYQ4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.001270278	2.896101259	2.432905763	1.3	Super
W5EM46_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	0.003590956	2.444789965	2.430736905	1.3	Super
W5FK23_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	12	5	0.000853452	3.068820761	2.419384035	1.3	Super
W5BUF3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	4	0.0027752	2.556705693	2.415305123	1.3	Super
W5G9Q5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	0.000811606	3.090654743	2.410356123	1.3	Super
W5G744_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.009584029	2.018451871	2.367560056	1.2	Super
W5HHP1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.004602912	2.336967352	2.332583004	1.2	Super
W5DHP5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	0.001233642	2.908810887	2.280559784	1.2	Super
W5A5D7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.001446259	2.839753986	2.270425666	1.2	Super
A0A077RTV4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	20	10	0.000352076	3.453364142	2.268414602	1.2	Super
W5I2E3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	18	3	0.002305614	2.637213307	2.255884894	1.2	Super
W5GZV1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	2	0.01638639	1.785516703	2.254121821	1.2	Super
A0A0C4B8L7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	2	1	0.001168364	2.932421871	2.239035069	1.2	Super
W5FP09_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	1.29E-06	5.890046936	2.225208035	-1.2	Sub
W5B5J4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	2	0.000221874	3.653893789	2.234848846	-1.2	Sub
AVLA4_WHEAT	Avenin-like a4 OS=Triticum aestivum PE=2	6	4	0.000891929	3.049669942	2.237532109	-1.2	Sub
W5B3W2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	9	3	0.00069712	3.156692689	2.24891653	-1.2	Sub
SPZ1C_WHEAT	Serpin-Z1C OS=Triticum aestivum PE=1 SV=	16	8	1.38E-05	4.860051041	2.248960211	-1.2	Sub
GDA6_WHEAT	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Tritic	3	3	0.00035369	3.451377192	2.281350917	-1.2	Sub
W5DYV0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	2	4.33E-05	4.363414937	2.28491258	-1.2	Sub
W5DU03_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000507103	3.294903454	2.292037606	-1.2	Sub
W4ZMR5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	1	0.020235676	1.693882289	2.294304199	-1.2	Sub
W5FJK1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	5.88E-05	4.230738923	2.296623023	-1.2	Sub
W5FQ63_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.00334739	2.475293736	2.300292089	-1.2	Sub
W5HXM8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.002099538	2.677876296	2.301401181	-1.2	Sub
W5CJK1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.00109918	2.958931299	2.304482445	-1.2	Sub
W5AAN8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	12	5	0.000617434	3.209409252	2.309546522	-1.2	Sub
W5AJ14_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.011573804	1.936523876	2.312378106	-1.2	Sub
W5H6I0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	24	1	0.000350324	3.45553054	2.325672357	-1.2	Sub



Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. FR (continuação)</b>								
A0A077RV04_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	14	1	0.005593462	2.252319341	2.330077249	-1.2	Sub
W5E7N2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.003242743	2.489087467	2.350085949	-1.2	Sub
W5A1J6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.002676144	2.572490465	2.351340203	-1.2	Sub
W5FW69_WHEAT	Ribulose-phosphate 3-epimerase OS=Triti	4	3	0.000172012	3.764441436	2.369325326	-1.2	Sub
W5DMI5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	4	0.000423143	3.373512624	2.37481209	-1.2	Sub
W4ZWA0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000102609	3.988815834	2.390976041	-1.3	Sub
W5A8S5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	5	6.39E-05	4.194619126	2.391864367	-1.3	Sub
W5A8Z9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	2	6.29E-06	5.201684861	2.39568181	-1.3	Sub
W5A1H3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	12	4	0.006675068	2.175544281	2.401200814	-1.3	Sub
W5B6Z4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	19	1	0.004312677	2.36525306	2.408526597	-1.3	Sub
W5FW60_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.004924142	2.307669451	2.430566609	-1.3	Sub
A0A077S7Z9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	2	1	0.00277264	2.557106526	2.463159127	-1.3	Sub
W5CMP0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	0.010309905	1.986745324	2.464575004	-1.3	Sub
W5GXL6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	0.000168842	3.772520105	2.49838453	-1.3	Sub
W5H7L9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.001604113	2.794765107	2.525915124	-1.3	Sub
W5BPK0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	0.004292372	2.367302635	2.545938739	-1.3	Sub
W5I1R5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	3	1.74E-06	5.759196871	2.554738666	-1.4	Sub
C3UZE5_WHEAT	Pathogenesis-related protein 1-1 OS=Tri	5	1	0.000111096	3.954302783	2.574011199	-1.4	Sub
W5HEX4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000953238	3.020798784	2.575467938	-1.4	Sub
W5BQ17_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	3.23E-05	4.490956101	2.626297701	-1.4	Sub
W5H3E0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000402997	3.394697885	2.626432102	-1.4	Sub
W5ABL5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.001060057	2.974670925	2.641342467	-1.4	Sub
W5BC04_WHEAT	Protein phosphatase methylesterase 1 OS	1	1	0.001027111	2.988382464	2.65523158	-1.4	Sub
W5AFS8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	30	3	9.06E-05	4.042988369	2.658129772	-1.4	Sub
W5DE90_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	0.000172635	3.76287236	2.695133843	-1.4	Sub
W5G2L0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000267681	3.572382228	2.695590604	-1.4	Sub
A0A0C4BD44_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	3	1	0.000648483	3.188101146	2.756522498	-1.5	Sub
W5HFG4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	8.65E-05	4.062933996	2.809244489	-1.5	Sub
W5B7A6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000236349	3.626446591	2.817239304	-1.5	Sub
W5CBH8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	2	0.000605067	3.218196346	2.830638555	-1.5	Sub
W5FC28_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	3	0.000671934	3.172673599	2.848781353	-1.5	Sub
A0A096UVP9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	8	5	7.67E-06	5.115487664	2.857803904	-1.5	Sub

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. FR (continuação)</b>								
W4ZN01_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000148396	3.828578078	2.869408105	-1.5	Sub
W5FQ59_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000494997	3.305397699	2.893678039	-1.5	Sub
W5BN50_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000205035	3.688171479	3.031322188	-1.6	Sub
W5BF07_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	1.08E-05	4.968142214	3.035458263	-1.6	Sub
W5I5B7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000269726	3.569076623	3.041754484	-1.6	Sub
W5CMJ7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	0.000233184	3.632302045	3.050885817	-1.6	Sub
W5C4W2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	4.07E-06	5.390537254	3.052204241	-1.6	Sub
A0A096URQ5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	7	2	8.95E-05	4.048287087	3.059721793	-1.6	Sub
DEF1_WHEAT	Defensin-like protein 1 OS=Triticum aesti	2	2	0.002349255	2.629069827	3.155218867	-1.7	Sub
W5F9E7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	0.000550294	3.25940554	3.168135007	-1.7	Sub
W5DGG7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000411331	3.385808782	3.181408295	-1.7	Sub
A0A077RY90_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	15	9	8.20E-07	6.086097829	3.18693004	-1.7	Sub
W5DNU1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	14	1	0.000172638	3.762863053	3.258359807	-1.7	Sub
W5BV10_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	6.76E-06	5.170029378	3.337869974	-1.7	Sub
W5E1D9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	2	8.91E-06	5.050351619	3.454987963	-1.8	Sub
W5F8Q1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	3	0.00051639	3.287022547	3.637481808	-1.9	Sub
W5HMS9_WHEAT	Kinesin-like protein OS=Triticum aestiv	2	1	1.87E-05	4.728203368	3.6944962	-1.9	Sub
A0A096UR34_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	7	1	0.000759206	3.119640271	3.805464596	-1.9	Sub
W5H0S1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	4.21E-05	4.375553258	3.901746417	-2.0	Sub
W5ELN5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	3.69E-06	5.432598851	4.019873903	-2.0	Sub
A0A0C4BF87_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	1	1	0.000502557	3.298814765	4.059721993	-2.0	Sub
W5EPG9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	0.000204269	3.689796813	4.135069708	-2.0	Sub
W4ZP32_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	3	0.00164614	2.783533254	4.156575763	-2.1	Sub
A0A096UL65_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	3	1	0.000228461	3.641188606	4.264836498	-2.1	Sub
W5G8E4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.001951017	2.70973895	4.327941389	-2.1	Sub
W5BBW7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	4.60E-05	4.337307808	4.360435214	-2.1	Sub
W5HD78_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	2.86E-05	4.543059312	4.466522801	-2.2	Sub
W5BQS0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	0.000137423	3.861939221	4.622861274	-2.2	Sub
W4ZQW8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000456617	3.340448336	4.866967232	-2.3	Sub
W5GEA5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	1.59E-06	5.798695197	5.075418124	-2.3	Sub
W5END1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	4.58E-06	5.339581369	6.028577152	-2.6	Sub
W5FP90_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000125099	3.902744553	6.065034967	-2.6	Sub

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. FR (continuação)</b>								
W5BCA3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	6.36E-06	5.19627937	7.750686957	-3.0	Sub
W5CLQ2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	3.89E-07	6.409864115	7.90329031	-3.0	Sub
W5F4U7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	1.42E-07	6.847878871	9.266640631	-3.2	Sub
PUIA_WHEAT	Puroindoline-A OS=Triticum aestivum GN=PI	4	4	6.01E-07	6.221274387	19.80058872	-4.3	Sub
A0A077RXA4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	1	1	5.63E-05	4.249795428	33.11535514	-5.0	Sub
<b>MD vs. FR</b>								
W5G589_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	6.96E-07	6.15711642	61.92177384	6.0	Super
W5HHR2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	4.53E-07	6.344212403	44.25079768	5.5	Super
W5ALU2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	2.75E-06	5.560923481	35.88164648	5.2	Super
W5HQR0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	1	7.64E-07	6.116846133	23.92330781	4.6	Super
W5H8W7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	3.46E-07	6.460642691	23.19474026	4.5	Super
W5AI85_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	2.29E-05	4.640432135	22.92894424	4.5	Super
W5DVU9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	6.98E-05	4.156363722	12.33337924	3.6	Super
W5EZK4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	8.79E-05	4.056089894	11.40472418	3.5	Super
W5H4N5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	2.14E-06	5.670339474	10.4625947	3.4	Super
W5I2W1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	6.65E-07	6.177430166	10.4196998	3.4	Super
W5GPH0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	14	1	8.76E-07	6.057568553	9.619959056	3.3	Super
Q43663_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	3.18E-05	4.497299468	9.087737007	3.2	Super
W5EWR4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	9	5	2.43E-06	5.613809703	8.776415031	3.1	Super
W5E483_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	2	3.15E-07	6.501408245	5.87194163	2.6	Super
H1_WHEAT	Histone H1 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=2	6	4	5.84E-05	4.233222537	5.137944755	2.4	Super
W5DGC9_WHEAT	Cysteine proteinase inhibitor OS=Tritic	3	1	0.000253129	3.596658908	5.030666406	2.3	Super
W5CDG5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	24	1	0.001364881	2.864905071	4.94062825	2.3	Super
W5GWU0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	11	1	0.00180092	2.744505698	4.847659039	2.3	Super
W5FQX9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000491469	3.308503842	4.670060007	2.2	Super
W5EPJ0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.001050466	2.978617849	4.627406962	2.2	Super
W5D GK7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	4	1.21E-05	4.915566823	4.586208624	2.2	Super
W5I7S7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	9.03E-05	4.044540664	4.445024314	2.2	Super
A0A077RT91_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	1	1	0.001519242	2.818373048	4.309497525	2.1	Super
W5HXT3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	2.64E-05	4.578936205	4.031755152	2.0	Super
W5EBD9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.001038636	2.983536547	3.846860131	1.9	Super
A0A096UR74_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	2	1	0.001615419	2.791714777	3.809539509	1.9	Super

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>MD vs. FR (continuação)</b>								
W5A8M8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	3	0.000803725	3.094892539	3.794081518	1.9	Super
W5ECE0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.000319662	3.495308801	3.781117191	1.9	Super
A0A096US61_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	5	1	0.001015906	2.993146666	3.727503595	1.9	Super
W5E1B9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000117152	3.931251407	3.658853022	1.9	Super
W5I3S0_WHEAT	Peroxidase OS=Triticum aestivum PE=3 SV	2	1	0.00378214	2.422262449	3.42720785	1.8	Super
A0A077RR29_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	4	3	1.72E-05	4.763681862	3.421531592	1.8	Super
W5EUP3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.003896934	2.409276931	3.419515388	1.8	Super
W5DC56_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	2	0.000250918	3.60046741	3.327773454	1.7	Super
W5HLM1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000424529	3.372092432	3.312145853	1.7	Super
W5CKI8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	13	3	3.90E-05	4.409435034	3.279948476	1.7	Super
A0A096UQI8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	14	4	0.00063916	3.194390298	3.172690882	1.7	Super
W5BDZ5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.00010884	3.96321295	3.103545337	1.6	Super
W5G1S5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	3	0.00018779	3.726328617	3.059902948	1.6	Super
W5GRJ7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	2.31E-05	4.636540385	3.017709599	1.6	Super
W5F0E4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.003208798	2.493657614	2.989340996	1.6	Super
W5EEZ3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000325562	3.487365852	2.982319059	1.6	Super
W5GAW0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	2	0.000442485	3.354101286	2.957515795	1.6	Super
W5DSA2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.004273022	2.369264883	2.894924718	1.5	Super
W5A5M4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000279201	3.554082734	2.831518143	1.5	Super
W5GVB7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.004202296	2.376513324	2.795159887	1.5	Super
W5F061_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	3	0.000330108	3.481343651	2.769095112	1.5	Super
W5B522_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.003015815	2.520595282	2.729908346	1.4	Super
W5GAV7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	3	0.000730356	3.136465451	2.726680101	1.4	Super
W5FIP7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	13	10	9.64E-06	5.01613125	2.704997002	1.4	Super
W5BCJ2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.00140182	2.853307845	2.688757505	1.4	Super
W5CNJ7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	0.000253061	3.596775153	2.656871938	1.4	Super
W5C8N6_WHEAT	40S ribosomal protein S6 OS=Triticum ae	4	2	0.001169645	2.931946074	2.644844736	1.4	Super
W5B457_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	6	0.007104472	2.148468165	2.615018629	1.4	Super
W4ZPS8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.00140362	2.852750534	2.607202802	1.4	Super
W5F2V2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.001731187	2.761656066	2.533029168	1.3	Super
W5GX10_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.000131304	3.881721799	2.510564463	1.3	Super
W5BQM0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	3	1.37E-05	4.8617513	2.480856057	1.3	Super

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>MD vs. FR (continuação)</b>								
W5FDV8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	9.81E-05	4.008154221	2.471560394	1.3	Super
W5BZV2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000657108	3.182363465	2.463031848	1.3	Super
W5HTK4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.000360903	3.442609696	2.432973179	1.3	Super
W5HI41_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	4	0.000195815	3.70815503	2.41773964	1.3	Super
A0A077RX36_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	3	2	0.000218239	3.661068122	2.406299568	1.3	Super
W5FEV1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.000760445	3.118932327	2.405431604	1.3	Super
B4ERW6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.005641062	2.248639114	2.388784691	1.3	Super
DEF1_WHEAT	Defensin-like protein 1 OS=Triticum aesti	2	2	0.00072681	3.138579227	2.372463843	1.2	Super
W5ERU2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.002649648	2.576811741	2.338320518	1.2	Super
W5AHR4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	3	0.004982017	2.302594811	2.334501972	1.2	Super
W5GXY9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.006922586	2.159731615	2.332366328	1.2	Super
W5AQ04_WHEAT	40S ribosomal protein S8 OS=Triticum ae	5	3	0.000357333	3.446926796	2.322237045	1.2	Super
PUIB_WHEAT	Puroindoline-B OS=Triticum aestivum GN=PI	8	6	0.010343432	1.985335328	2.309819165	1.2	Super
W5IAF2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	2	0.000276916	3.557651892	2.292182167	1.2	Super
W5GJZ4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.01030776	1.986835693	2.25681405	1.2	Super
W5C9Q4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	0.01255526	1.901174304	2.252060215	1.2	Super
W5BSG4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.007991672	2.097362347	2.247597635	1.2	Super
W5CJ84_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	0.000104993	3.978837731	2.247332339	1.2	Super
GLTA_WHEAT	Glutenin_ low molecular weight subunit OS	7	4	1.70E-05	4.769900175	2.229562406	-1.2	Sub
W5FNLO_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	2	0.000135161	3.86914749	2.235177757	-1.2	Sub
GDA3_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-III OS=Triticum aest	2	1	3.44E-05	4.463162422	2.238578807	-1.2	Sub
W5AV91_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.00015859	3.799724167	2.246874806	-1.2	Sub
W5HMS9_WHEAT	Kinesin-like protein OS=Triticum aestiv	2	1	0.000516789	3.286686471	2.255209238	-1.2	Sub
W5FGC6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.002584418	2.587637167	2.285724357	-1.2	Sub
GDA4_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-IV OS=Triticum aesti	2	1	9.29E-07	6.031970954	2.293982339	-1.2	Sub
W5EUP2_WHEAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] fl	15	6	7.49E-05	4.125276099	2.303424105	-1.2	Sub
W5D8A5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	8.67E-05	4.062101706	2.315047432	-1.2	Sub
W5GKG2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.000555545	3.255280793	2.316790355	-1.2	Sub
W5BGT4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	4	0.007466297	2.126894739	2.319022709	-1.2	Sub
W5HV14_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000483974	3.31517841	2.337345593	-1.2	Sub
W5B7R0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	0.00185052	2.732706156	2.338720776	-1.2	Sub
W5DGW8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	13	10	0.00033042	3.480933908	2.346630306	-1.2	Sub

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>MD vs. FR (continuação)</b>								
W5CFF9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.00046373	3.333734611	2.368710841	-1.2	Sub
W5FR78_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	14	1	2.88E-05	4.541181058	2.414149992	-1.3	Sub
W5H3J6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	6.37E-05	4.196048776	2.470413444	-1.3	Sub
GDA2_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-II OS=Triticum aesti	1	1	2.79E-05	4.554500077	2.478297062	-1.3	Sub
GDA9_WHEAT	Alpha/beta-gliadin MM1 OS=Triticum aestiv	2	1	3.05E-07	6.515193134	2.482242475	-1.3	Sub
W5EWP3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	2	0.001936804	2.712914269	2.50047865	-1.3	Sub
W5GU91_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	10	3	1.84E-05	4.734581709	2.517442251	-1.3	Sub
W4ZYV3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	8.44E-05	4.073814839	2.579286251	-1.4	Sub
A0A077RR37_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	8	4	9.41E-08	7.02646372	2.606482542	-1.4	Sub
W5G0E0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	3.61E-06	5.442357217	2.619326541	-1.4	Sub
W5FQ59_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.005049169	2.296780092	2.6795376	-1.4	Sub
W5ABL5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	9.37E-05	4.028163406	2.707961561	-1.4	Sub
W5FN58_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000116992	3.931844766	2.735407135	-1.5	Sub
W4ZWA0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000550167	3.259505529	2.742524195	-1.5	Sub
W4ZPQ5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000801399	3.096150965	2.74754288	-1.5	Sub
Q6L6R7_WHEAT	PK-R1 OS=Triticum aestivum GN=WNdr1B PE	1	1	0.003660836	2.436419713	2.766615205	-1.5	Sub
W5EMG9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	0.001360288	2.866369135	2.783928625	-1.5	Sub
W5CVL4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.001534643	2.813992758	2.784356209	-1.5	Sub
W5GBH5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	21	6	0.000121827	3.914256397	2.818045002	-1.5	Sub
W5HLQ8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	3	1.39E-05	4.857401604	2.93965336	-1.6	Sub
A0A077RWB3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	5	2	3.56E-05	4.448295533	2.944542134	-1.6	Sub
W5F2L4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	1.96E-05	4.706766436	2.961661484	-1.6	Sub
W4ZYB0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	2.89E-05	4.538447995	2.996990922	-1.6	Sub
W5EZJ2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	2.79E-05	4.553988802	3.063665549	-1.6	Sub
A0A096UK10_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	14	6	0.000554421	3.256160584	3.094323049	-1.6	Sub
W4ZN01_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000467719	3.330014973	3.096628473	-1.6	Sub
W5A1H3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	12	4	0.000562714	3.249712342	3.111862633	-1.6	Sub
W5E6W5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	2	0.000233001	3.632642279	3.132329393	-1.6	Sub
W5FC28_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	3	0.00198335	2.702600589	3.148717174	-1.7	Sub
A0A077S7Z9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	2	1	0.005495544	2.259989322	3.336054303	-1.7	Sub
W4ZQK3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	3.63E-06	5.440044611	3.365540899	-1.8	Sub

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>MD vs. FR (continuação)</b>								
WHW2_WHEAT	Wheatwin-2 OS=Triticum aestivum GN=PR4B P	7	1	1.05E-06	5.977752323	3.585428863	-1.8	Sub
W5DWN1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	3.59E-05	4.445175353	3.609396863	-1.9	Sub
W5DJ39_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000680002	3.167489549	3.609599985	-1.9	Sub
W5CMJ7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	0.000978886	3.009267969	3.623470269	-1.9	Sub
W5C4W2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	5.60E-06	5.252095906	3.773832963	-1.9	Sub
W5EFV5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.00055661	3.254448808	3.944507955	-2.0	Sub
W5HMF6_WHEAT	Phospholipid-transporting ATPase OS=Tri	3	1	0.000449845	3.346936843	4.090738814	-2.0	Sub
W5DU03_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000144563	3.839941373	4.109857326	-2.0	Sub
W4ZQW8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000689981	3.161162683	4.196329696	-2.1	Sub
W5AID0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.00076877	3.11420351	4.416257562	-2.1	Sub
W5DNU1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	14	1	7.70E-05	4.113315347	4.41957599	-2.1	Sub
W5AIG7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	9.56E-05	4.019659644	4.850788872	-2.3	Sub
W5BN50_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000941121	3.02635443	5.174687436	-2.4	Sub
W5HD78_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	7.39E-05	4.131321667	5.344596455	-2.4	Sub
W5H0S1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	7.86E-06	5.104731526	5.411247913	-2.4	Sub
W5F4U7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	1.54E-05	4.811818598	6.482856978	-2.7	Sub
W5I5B7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000262057	3.581603439	6.797894091	-2.8	Sub
W5BCA3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	4.07E-05	4.389986186	7.732922773	-3.0	Sub
W5HB80_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000436261	3.360253584	8.160607868	-3.0	Sub
W5D9H7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000274491	3.561472048	9.662271259	-3.3	Sub
W5DGB1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000100282	3.998775052	13.22293867	-3.7	Sub
PUIA_WHEAT	Puroindoline-A OS=Triticum aestivum GN=PI	4	4	1.13E-06	5.945372619	13.44643841	-3.7	Sub
W4ZWJ1_WHEAT	Defensin OS=Triticum aestivum GN=PDF14	2	1	7.93E-06	5.100513365	13.65887669	-3.8	Sub
W5FYR0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	2.20E-05	4.658226521	36.5130883	-5.2	Sub
<b>FO vs. MD</b>								
W5FYR0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	8.96E-06	5.047682856	101.0991657	6.7	Super
W5BPI4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	1.64E-05	4.78465985	28.25773192	4.8	Super
W5D9H7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	9.18E-05	4.03695793	11.01806566	3.5	Super
W5AIG7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	2.39E-05	4.621743325	10.59041384	3.4	Super
W5EDD5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	3.98E-05	4.399634087	9.254271329	3.2	Super
W5HAD2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000183217	3.73703457	6.270509147	2.6	Super

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. MD (continuação)</b>								
W4ZQK3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	3.65E-06	5.437301931	5.479304277	2.5	Super
W5CKQ8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	5	0.000429209	3.367331482	4.7507617	2.2	Super
W5DTD3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	6.21E-06	5.206928874	4.528956749	2.2	Super
A0A080YUF8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	13	9	8.85E-07	6.052854835	4.451813073	2.2	Super
W5BX88_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	4.50E-06	5.346359627	4.25456698	2.1	Super
W5E483_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	2	2.40E-06	5.620207545	3.824261083	1.9	Super
W5BLN0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	6.66E-05	4.176511667	3.761911802	1.9	Super
W5DTU3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	4.89E-05	4.310601453	3.742313194	1.9	Super
W5HHG2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	2	7.44E-06	5.128616437	3.694036275	1.9	Super
W5BPI1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	0.001632507	2.787144883	3.573564043	1.8	Super
W5A9U1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	9	2	4.97E-05	4.303831062	3.429373738	1.8	Super
W5FK23_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	12	5	0.00050965	3.292728271	3.370086264	1.8	Super
W5DWN1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	3.28E-05	4.483584911	3.322098115	1.7	Super
W5AV91_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	4.66E-05	4.331675558	3.228182127	1.7	Super
W5AAV3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.001103984	2.9570372	3.222139904	1.7	Super
W5AI85_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000491085	3.308843543	3.200498144	1.7	Super
W5AL45_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	1.27E-05	4.896834856	3.181505835	1.7	Super
W5EM46_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	0.002459669	2.609123292	3.174189233	1.7	Super
W5DJ39_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	5.37E-05	4.269945869	3.139175616	1.7	Super
A0A0C4B8L7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	2	1	0.000884742	3.053183543	3.107435056	1.6	Super
A0A077RRV1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	5	4	0.00073476	3.133854247	3.046497248	1.6	Super
W5C0I3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000107837	3.967231119	2.99559136	1.6	Super
W5F2L4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	3.90E-05	4.409356573	2.956177675	1.6	Super
SPZ1A_WHEAT	Serpin-Z1A OS=Triticum aestivum GN=WZCI	14	2	0.001013779	2.994056761	2.875008712	1.5	Super
W5HRZ1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.004255239	2.371076049	2.828710188	1.5	Super
W5GI71_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	2.26E-05	4.645980231	2.764922638	1.5	Super
W5GPV5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	1.97E-05	4.70557781	2.753777546	1.5	Super
W5FCA4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	7.69E-05	4.113910962	2.744048991	1.5	Super
GDA2_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-II OS=Triticum aesti	1	1	4.97E-05	4.303819399	2.587484263	1.4	Super
W5FDR2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	17	3	0.000205984	3.686166216	2.581918547	1.4	Super
W5FXF3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.007441212	2.128356347	2.555899774	1.4	Super
W5F651_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	2	0.000663815	3.177953058	2.553951339	1.4	Super



Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. MD (continuação)</b>								
W5I2J4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	2	5.49E-05	4.260580084	2.551944327	1.4	Super
W4ZPQ5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000852285	3.069415186	2.544831572	1.3	Super
W5BVI0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	4.22E-05	4.374212943	2.481164115	1.3	Super
WHW2_WHEAT	Wheatwin-2 OS=Triticum aestivum GN=PR4B P	7	1	2.11E-06	5.675418277	2.480300643	1.3	Super
W5FR78_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	14	1	1.26E-05	4.897948424	2.475609757	1.3	Super
W5DGW8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	13	10	7.02E-05	4.153968181	2.459991918	1.3	Super
GDA9_WHEAT	Alpha/beta-gliadin MM1 OS=Triticum aestiv	2	1	9.84E-07	6.006985955	2.445183818	1.3	Super
W4ZUP6_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.009558708	2.019600784	2.429477287	1.3	Super
W5BMQ3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	9	3	3.95E-06	5.403294161	2.391178436	1.3	Super
H6S4F9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.011153584	1.952585563	2.315010447	1.2	Super
W5DVM2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.003763178	2.424445257	2.312344465	1.2	Super
W5EVY2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.003976907	2.40045457	2.294099964	1.2	Super
W5I5B7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.011183417	1.95142549	2.234859561	1.2	Super
GDA4_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-IV OS=Triticum aesti	2	1	4.64E-06	5.333537733	2.228225833	1.2	Super
W5B936_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	2	0.010011886	1.999484121	2.233993088	-1.2	Sub
W5BRT1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.00823731	2.084214602	2.236319925	-1.2	Sub
W5C2D1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.00402395	2.395347402	2.247629523	-1.2	Sub
W5BV10_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000207073	3.683875862	2.260494351	-1.2	Sub
W5EPG9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	1.78E-05	4.748974478	2.260742368	-1.2	Sub
W5FBS8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.000381232	3.418810319	2.262206852	-1.2	Sub
W5FDV8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	9.70E-05	4.01342549	2.273962428	-1.2	Sub
W5DX55_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.004536176	2.343310069	2.275332482	-1.2	Sub
H1_WHEAT	Histone H1 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=2	6	4	0.001499024	2.82419133	2.317477867	-1.2	Sub
W5BQS0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	2	5.24E-05	4.281069683	2.354507738	-1.2	Sub
W5I6K9_WHEAT	Annexin OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	9	1	0.005931326	2.226848172	2.372173581	-1.2	Sub
W5HJY2_WHEAT	Annexin OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	9	2	0.005931322	2.226848471	2.372173581	-1.2	Sub
W4ZZP7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	0.0052528	2.279609148	2.381380479	-1.3	Sub
W5BW25_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	6.53E-05	4.18481534	2.39149166	-1.3	Sub
W5HTK4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	2	0.000154979	3.809725866	2.399727936	-1.3	Sub
W5HYJ3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.001340293	2.872800095	2.405469198	-1.3	Sub
W5CBD7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000249052	3.603709534	2.417255992	-1.3	Sub

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. MD (continuação)</b>								
W5I2W1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	3.07E-05	4.512486836	2.423890334	-1.3	Sub
W5EGW0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.001660859	2.779667298	2.475156871	-1.3	Sub
W5ET82_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.006765673	2.169688976	2.521980358	-1.3	Sub
W5GEA5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000286761	3.542479671	2.542647512	-1.3	Sub
W5BE20_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	7	1	8.16E-05	4.088399677	2.543666134	-1.3	Sub
W4ZXI9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000228379	3.641343078	2.546741625	-1.3	Sub
W4ZW78_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000620407	3.207323531	2.568541111	-1.4	Sub
W5ALU2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	2.88E-05	4.540731223	2.56957241	-1.4	Sub
W5B522_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.003913644	2.407418662	2.665135515	-1.4	Sub
W5DVU9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	0.002675955	2.572521263	2.770356349	-1.5	Sub
W5FP90_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.002372662	2.624764084	2.781576235	-1.5	Sub
W5A7Y2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	3	6.23E-05	4.205405918	2.895668193	-1.5	Sub
W5CJY3_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	13	1	0.004499056	2.346878615	3.070292681	-1.6	Sub
W5DGC9_WHEAT	Cysteine proteinase inhibitor OS=Tritic	3	1	0.000214007	3.669571358	3.08735382	-1.6	Sub
W5ELN5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	8.88E-05	4.051411356	3.131816222	-1.6	Sub
W5BZ77_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000631137	3.199876292	3.19065211	-1.7	Sub
W5FHW1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	23	12	7.02E-06	5.15371011	3.191190753	-1.7	Sub
W5EWR4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	9	5	2.00E-07	6.698144819	3.23330699	-1.7	Sub
W5B6Z4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	19	1	0.000401171	3.396670489	3.289848281	-1.7	Sub
W5HDF7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	0.000712728	3.147076222	3.305287496	-1.7	Sub
A0A096URS8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	3	1	0.00259418	2.58599991	3.335013189	-1.7	Sub
W5H048_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	0.000304697	3.51613159	3.355962465	-1.7	Sub
W5I7S7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	5	1	0.002007004	2.697451679	3.453443426	-1.8	Sub
W5CGW2_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	0.000452872	3.344024252	3.476160443	-1.8	Sub
W5H4N5_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	1	1	8.97E-05	4.047191568	4.130263992	-2.0	Sub
W5GPH0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	14	1	1.54E-05	4.811410557	4.572572423	-2.2	Sub
W5END1_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	4.87E-06	5.312699006	4.800268507	-2.3	Sub
W5A8M8_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	3	0.000235509	3.627991819	5.140852411	-2.4	Sub
W5EZK4_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	3	1	1.24E-05	4.907373495	6.564046975	-2.7	Sub
W5H8W7_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	6	1	3.00E-05	4.522911019	6.594384449	-2.7	Sub
W5HQR0_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	8	1	5.55E-06	5.2559924	6.899318453	-2.8	Sub
A0A0C4BER9_WHEAT	Uncharacterized protein OS=Trit	4	1	2.79E-06	5.554199816	7.20365656	-2.8	Sub

Código UNIPROT	Descrição UNIPROT	NP	PU	ANOVA (p)	-log ANOVA (p)	Max fold change	Log <sub>2</sub>	Perfil de Expressão
<b>FO vs. MD (continuação)</b>								
<b>DEF1_WHEAT</b>	Defensin-like protein 1 OS=Triticum aesti	2	2	0.000371698	3.429809769	7.485642678	-2.9	Sub
<b>W5H114_WHEAT</b>	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	2	0.000177252	3.751409802	7.746497505	-3.0	Sub
<b>W5G589_WHEAT</b>	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	2.99E-06	5.523679012	9.098564959	-3.2	Sub
<b>W5HHR2_WHEAT</b>	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	2	1	1.05E-06	5.978871746	10.95455301	-3.5	Sub
<b>A0A077S4H7_WHEAT</b>	Uncharacterized protein OS=Trit	1	1	1.78E-07	6.748382315	20.42347681	-4.4	Sub
<b>W5EVV8_WHEAT</b>	Uncharacterized protein OS=Triticum aes	4	1	1.88E-05	4.726810337	28.7380363	-4.8	Sub

Número de peptídeos (NP), número de peptídeos únicos (PU), Log<sub>10</sub> negativo de ANOVA (-Log), Log<sub>2</sub> de *max fold change* (Log<sub>2</sub>). Estão listadas proteínas diferencialmente expressas com coeficiente de variação menor do que 0,3. Valores de Log<sub>2</sub> superiores ou iguais a 1,2 correspondem a proteínas superexpressas (Super) e valores iguais ou inferiores -1,2 correspondem a proteínas subexpressas (Sub).