

O ovo é um alimento protéico de alto valor nutritivo e tem suas proteínas distribuídas entre a clara e a gema. Atualmente, além da procura por este alimento devido à presença de macro e micronutrientes, há também um grande interesse por parâmetros de qualidade diferenciados. Muitos alimentos já são comercializados com selo de garantia de produto orgânico (Guia..., 1991).

Em estudos realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo foi relatado que os ovos de galinhas criadas soltas possuem cerca de quatro vezes mais vitamina A que os ovos de granja. Além dessa vantagem (determinada pela presença de maiores teores de carotenóides totais e retinol), o ovo de galinha caipira, criada em sistema orgânico, não contém resíduos de antibióticos e de outros produtos químicos, pois as aves de criação orgânica não recebem rações comerciais. Já as galinhas de granja, de criação convencional, tanto as criadas em galpões como em gaiolas, em sua maioria, são alimentadas com rações comerciais que apresentam antimicrobianos e aditivos químicos.

Observa-se que, também para os alimentos de origem animal, existe uma tendência de superioridade na qualidade nutricional do alimento orgânico quando comparado ao alimento convencional, porém este é um campo de pesquisa ainda novo que deve ser aprofundado em benefício de toda comunidade científica e, sobretudo, do consumidor (Wilkins, 1996).

Diante desses fatos pode-se questionar se existe uma modificação do perfil protéico de ovos de galinhas orgânicas. Ao iniciar-se a caracterização molecular de clara de ovo de aves criadas dentro desta forma alternativa, constatou-se a inexistência, na literatura, de informações sobre a obtenção de padrão de identidade protéica através de eletroforese.

Foram verificadas três diferentes técnicas de preparo da amostra:

- precipitação das proteínas com sulfato de amônio (Nakamura & Matsuda, 1983)
- precipitação das proteínas através de tratamento térmico (Chang et al., 2000)
- concentração das proteínas através de desidratação em spray-dryer (Galyean & Cotterill, 1979).

Desenvolvimento de Método de Preparação de Amostras para Solubilização de Proteínas de Clara de Ovo Orgânico para Aplicação em Eletroforese

Marília Penteado Stephan¹
Maria da Graça Fichel do Nascimento²

No presente trabalho foi desenvolvido um método alternativo de preparação de amostra para aplicação em eletroforese e obtenção de padrão de identidade protéica da clara de ovo, que pode ser aplicado tanto para ovo orgânico como convencional, através de identificação molecular das proteínas da clara.

Eletroforese de Proteínas

Utilizou-se o sistema de eletroforese da Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Foi utilizado gel de corrida na concentração de 12% e gel de aplicação da amostra na concentração de 4%. A corrida foi realizada durante sete horas sob uma tensão de 100V. Os marcadores de peso molecular dos padrões de proteínas utilizados foram (em kDa): 97-fosforilase b, 66 -albumina, 45 -ovalbumina, 30-anidrase carbônica, 20,1-inibidor de tripsina, 14,4- α lactalbumina. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor "coomassie blue R250", durante uma noite, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético (40% e 10%, respectivamente), durante três horas.

Preparação da Amostra de Clara de Ovo Orgânico

Foram utilizadas 10 claras de ovos de aves (*Gallus gallus*) da raça Isa Brown criadas em sistema orgânico. Para a preparação das claras, para homogeneização do seu material protéico e solubilização das proteínas,

¹ Farm., D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Rio de Janeiro, RJ, CEP 23020-470.
E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br

² Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: graca@ctaa.embrapa.br

usou-se, como método alternativo, a acetona como solvente. Foi utilizado um volume de solvente três vezes maior do que o volume de cada clara. Após homogeneização em "Waring Blender" as amostras foram submetidas ao processo de secagem a duas temperaturas, ambiente e 60°C. Entretanto, os filmes formados (Figs. 1 e 2) mostraram total insolubilidade nos veículos aquosos utilizados (Tabela 1).

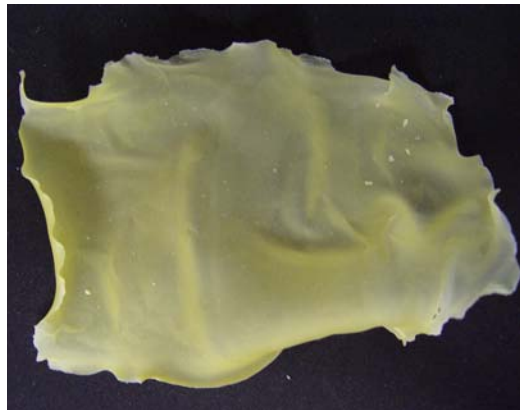


Fig. 1. Filme protéico de clara de ovo homogeneizada com acetona e totalmente desidratada à temperatura ambiente

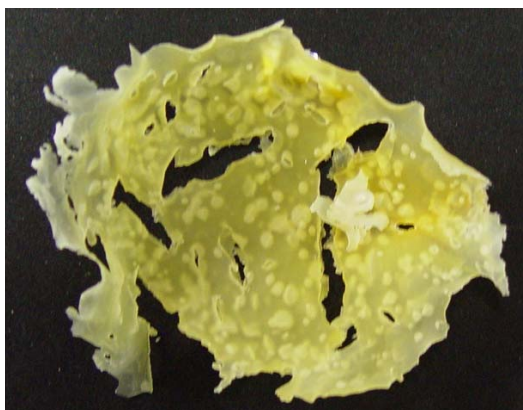


Fig. 2. Filme protéico de clara de ovo homogeneizada com acetona e totalmente desidratada a 60°C

Tabela 1. Teste de solubilização de clara de ovo desidratada em diferentes veículos aquosos

Temperatura de Desidratação	Veículos aquosos		
	Tampão fosfato 20 mM	Uréia 6M	Água
Temperatura ambiente	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
60°C	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel

A insolubilização foi caracterizada pela incapacidade de desfazer o filme protéico (Fig. 3A) durante ½ hora de agitação a uma concentração de 10 mg/mL. Para se solucionar este problema, fez-se uma secagem parcial do material e, conjuntamente, aplicou-se um tratamento de ultra-som (Fig. 3B). A secagem parcial foi realizada durante uma noite, a temperatura ambiente. Como resultado, observou-se uma total dispersão dos grânulos protéicos (Fig. 4) somente em uréia 6M (Fig. 3B). Desta maneira, obteve-se um material contendo níveis de solubilização adequados para aplicação em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).



(A) Insolúvel (B) Solúvel

Fig. 3. Efeito da desidratação na solubilidade das proteínas da clara de ovo. Clara de ovo totalmente desidratada (A) e parcialmente desidratada (B)



Fig. 4. Grupos de concentrado de proteínas da clara de ovo homogeneizada e parcialmente desidratada à temperatura ambiente

Na Fig. 5 pode-se observar o perfil de migração das proteínas de clara de ovo quando submetidas à corrente elétrica da eletroforese, com a presença de três bandas fortemente coradas (87,2 kDa; 43,3 kDa; 14,3 kDa), além dos marcadores de peso molecular dos padrões de proteínas. Os pesos moleculares destas proteínas correspondem, respectivamente, aqueles descritos para ovotransferrina, ovoalbumina e lisozima (Sgarbieri, 1996).

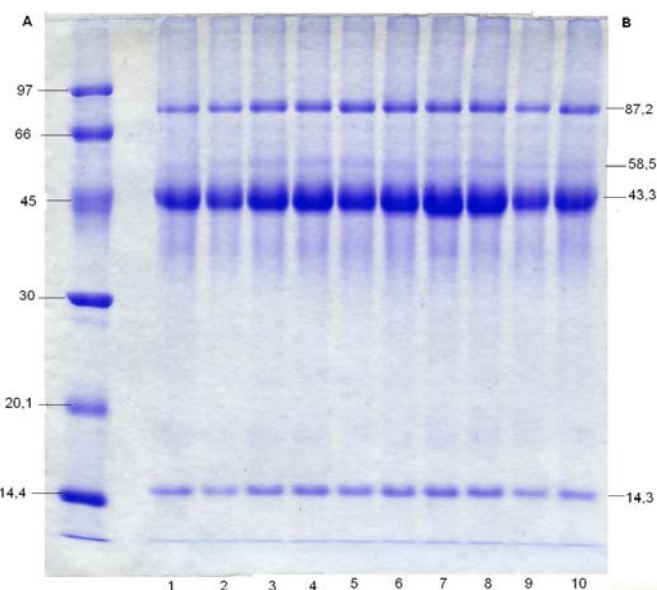


Fig. 5. Padrão de identidade de proteínas da clara de 10 ovos orgânicos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (A) peso molecular dos padrões de proteína, em kDa (B) peso molecular das proteínas da clara de ovo, em kDa

Na mesma figura, a presença de uma banda fracamente corada (58,5 kDa) pode ser objeto de novas pesquisas, pois na literatura não foi encontrada descrição de banda de semelhante peso molecular como uma fração integrante do "pool" protéico da clara de ovo. Conclui-se que a metodologia utilizada para separação e preparação das proteínas foi viável para se obter um padrão de identidade da clara dos ovos orgânicos, indicando que este mesmo procedimento pode também ser futuramente aplicado para ovos convencionais. O perfil eletroforético obtido neste estudo será de grande utilidade para futuros estudos, inclusive aqueles visando avaliar comparativamente ovos orgânicos e convencionais.

Considerações Finais

Os resultados serão úteis para futuras pesquisas, incluindo estudos comparativos com ovos convencionais. A metodologia de preparo da amostra apresentada, em relação a outros métodos citados, é vantajosa no sentido da facilidade e eficácia na identificação de proteínas em gel de eletroforese.

- A utilização do solvente acetona para homogeneização de clara de ovo associada à secagem parcial do material, com a utilização do ultra-som, mostrou-se uma técnica eficiente para solubilização das proteínas da clara de ovo.
- O padrão de identidade das proteínas da clara de ovo orgânico foi caracterizado por um bandejamento protéico com pesos moleculares de 87,2 kDa; 58,5 kDa; 43,3 kDa; 14,3 kDa.

Referências Bibliográficas

- GUIA Rural: manual de agricultura orgânica. São Paulo: Ed. Abril, 1991. p.53-55
- NAKAMURA, R.; MATSUDA, T. A new protein band appearing in the electrophoretic pattern of egg white heated at below 60°C. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 1, p. 87-91, 1983.
- CHANG, H. M. ; YANG, C. C. ; CHANG, Y. C. Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D.C., v. 48, p. 161-164, 2000.
- GALYEAN, R. D.; COTTERILL, O. J. Chromatography and eletrophoresis of native and spray-dried egg white. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 5, p. 1345-1349, 1979.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Liv. Varela, 1996.
- WILKINS, J. L. **Relatórios concluem que produtos orgânicos são mais nutritivos**. Rede de Agricultura Sustentável, 1996. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/san/nutritivo.htm>> . Acesso em: 2 julho 2004

Comunicado Técnico, 72

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 2410-9500
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9513
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2004): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: Regina Isabel Nogueira
Membros: Maria da Graça Fichel do Nascimento,
Maria Ruth Martins Leão, Neide Botrel Gonçalves,
Ronoel Luiz de O. Godoy, Virginia Martins da Matta

Expediente

Supervisor editorial: Maria Ruth Martins Leão
Revisão de texto: Comitê de Publicações
Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes